

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Deutsches Herzzentrum und

1. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

Bedeutung von Sphingosin 1-Phosphat für die Thrombozytenfunktion

-

Etablierung eines Flusskammermodells zur *in vitro* Analyse von murinen Thrombozyten

Elisabeth Heiß

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. St. Massberg

2. apl. Prof. Dr. I. V. Ott

Die Dissertation wurde am 22.02.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 14.12.2011 angenommen.

Inhalt

Inhalt	2
1 Einleitung.....	6
1.1 <i>Thrombozyten</i>	7
1.1.1 Morphologie.....	7
1.1.2 Funktion	8
1.1.2.1 Thrombozyten und Hämostase.....	8
1.1.2.2 Thrombozytäre Membranglykoproteine	9
1.1.2.2.1 Integrine	10
1.1.2.2.2 Leuzinreiche Glykoproteine.....	10
1.1.2.2.3 Rezeptoren vom Immunglobulintyp.....	11
1.1.2.2.4 Selektine.....	11
1.2 <i>Modelle zum Studium der Plättchenfunktion und der Thromboseentstehung</i>	13
1.2.1 In vivo Modelle.....	13
1.2.2 In vitro Modelle	13
1.3 <i>Atherosklerose</i>	16
1.4 <i>Sphingosin 1-Phosphat</i>	21
1.4.1 Struktur und Metabolismus	21
1.4.1.1 Sphingosinkinasen	21
1.4.1.2 S1P-Metabolismus in Thrombozyten und Erythrozyten	23
1.4.2 S1P-Rezeptoren und die Wirkungen von S1P	24
1.4.2.1 S1P und Atherosklerose.....	25
1.4.3 Modulatoren am S1P-Rezeptor	28
1.4.3.1 FTY720	28
1.4.3.2 SEW2871	29
1.4.4 Klinischer Ausblick.....	29
2 Zielsetzung.....	31
3 Material und Methoden.....	32
3.1 <i>Herstellung der Zellsuspension zur Perfusion in der Flusskammer</i>	32
3.1.1 Hepes-Tyrode's Puffer	32
3.1.2 Isolierung von Thrombozyten aus murinem Vollblut	32
3.1.2.1 Versuchstiere	32

3.1.2.1.1	Haltungsbedingungen	32
3.1.2.1.2	Genetischer Hintergrund.....	33
3.1.2.1.2.1	Kontrollstämme	33
3.1.2.1.2.2	Knockout-Stämme.....	33
3.1.2.2	Prämedikation	34
3.1.2.3	Blutentnahme.....	34
3.1.2.4	Thrombozytenpräparation.....	35
3.1.3	Gewinnung humaner Erythrozyten	36
3.1.3.1	Blutspender	36
3.1.3.2	Erythrozytenisolation	36
3.1.4	Perfusionslösung	36
3.2	<i>Flusskammersystem</i>	37
3.2.1	Flusskammer	37
3.2.2	Beschichtung der Kammeroberfläche	37
3.2.3	Flusskammer und Pumpsystem.....	39
3.2.4	Rheologie.....	40
3.2.5	Perfusionszyklus	41
3.2.6	Versuchsablauf	42
3.3	<i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	43
3.3.1	Technisches Prinzip.....	43
3.3.2	Das Fluorochrom 5(6)- Carboxyfluorescein diacetate - succinimidyl ester	45
3.4	<i>Dokumentation</i>	47
3.5	<i>Experimentelle Gruppen</i>	48
3.5.1	Modelletablierung: Prüfung der Spezifität der Thrombozytenadhäsion.....	48
3.5.1.1	Blockade der Kollagenbeschichtung mit löslichem GPVI.....	48
3.5.1.2	GPIIb ^{-/-} und die Auswirkungen auf die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen 49	
3.5.1.3	Von Willebrand Faktor	49
3.5.1.3.1	Rezeptorblockade mit Anti-GPIb α	49
3.5.1.3.2	GPIIb ^{-/-} und die Thrombozytenadhäsion auf von Willebrand Faktor.....	50
3.5.1.4	Laminin als Kontrolloberfläche	50
3.5.2	Bedeutung von S1P für die Thrombozytenfunktion in vitro.....	50
3.5.2.1	Charakterisierung von S1P durch die S1P-Rezeptormodulatoren FTY720 und SEW2871	50
3.5.2.1.1	Das Vehikel DMSO (Dimethylsulfoxid).....	50
3.5.2.1.2	FTY720.....	51
3.5.2.1.3	SEW2871	51

3.5.2.1.4	Versuchsprotokoll.....	52
3.5.2.2	Untersuchungen im Sphingosinkinase-1 Knockout-Modell der Maus.....	52
3.5.2.2.1	Versuchsprotokoll.....	53
3.5.2.3	Untersuchungen im Sphingosinkinase-2 Knockout-Modell der Maus.....	53
3.5.2.3.1	Versuchsprotokoll.....	53
3.6	<i>Auswertung und Statistik</i>	54
4	Ergebnisse	55
4.1	<i>Etablierung eines in vitro Modells zur Untersuchung der Adhäsion von murinen Thrombozyten</i>	55
4.1.1	Einstellungen und Anpassungen des Flusskammersystems	55
4.1.2	Evaluierung der Beschichtungen der Kammeroberfläche	55
4.1.2.1	Vergleich der Beschichtungen untereinander	55
4.1.2.2	Spezifitätstests.....	56
4.1.2.2.1	Hemmung der Kollagen-spezifischen Plättchenadhäsion durch lösliches GPVI-Fc	56
4.1.2.2.2	Verminderte Adhäsion GPIIb-defizienter Thrombozyten an Fibrinogen und vWF	57
4.1.2.2.3	Blockierung der Plättchenanheftung auf vWF durch anti-GPIb α	59
4.1.2.2.4	Laminin als Kontrolloberfläche.....	60
4.2	<i>Bedeutung von S1P für die Thrombozytenadhäsion in vitro</i>	62
4.2.1	Auswirkungen von FTY720 und SEW2871 auf die Plättchenadhäsion	62
4.2.2	Thrombozytenadhäsion im SK1 ^{-/-} -Modell.....	66
4.2.3	Thrombozytenadhäsion in der SK2 ^{-/-} -Maus.....	69
4.3	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	72
4.3.1	Etablierung eines in vitro Modells zur Untersuchung der Adhäsion muriner Thrombozyten	72
4.3.1.1	Einstellungen und Anpassungen des Flusskammersystems	72
4.3.1.2	Evaluierung der Beschichtungen der Kammeroberfläche	72
4.3.2	Bedeutung von S1P für die Thrombozytenadhäsion in vitro	73
4.3.2.1	Auswirkungen von FTY720 und SEW2871 auf die Plättchenadhäsion	73
4.3.2.2	Thrombozytenadhäsion im SK1 ^{-/-} -Modell.....	73
4.3.2.3	Thrombozytenadhäsion in der SK2 ^{-/-} -Maus.....	73
5	Diskussion	74
5.1	<i>Wahl der Versuchstiere</i>	74
5.2	<i>Diskussion des Flusskammermodells</i>	75
5.3	<i>Diskussion der Modelletablierung</i>	77
5.4	<i>Rolle der Sphingosinkinasen, S1P und der S1P-Rezeptoren für die Thrombozytenadhäsion in vitro</i> ...	79

5.5	<i>Möglicher Einfluss der Thrombozytenhemmung durch S1P auf die Atherosklerose</i>	83
5.6	<i>Ausblick</i>	84
6	Zusammenfassung	85
7	Summary	87
8	Literaturverzeichnis	89
9	Abbildungsverzeichnis	94
10	Abkürzungen	97
11	Danksagung	99
12	Lebenslauf	100

1 Einleitung

Laut statistischem Bundesamt und statistischen Erhebungen der WHO sind Herz-Kreislaufkrankungen die mit Abstand häufigste Todesursache in Deutschland und der modernen westlichen Welt. Eine Hauptursache für diese Erkrankungen, z.B. Schlaganfall, Herzinfarkt und periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), ist die chronisch entzündliche Erkrankung der arteriellen Blutgefäße, die Atherosklerose. Durch Ruptur fortgeschrittener, atheromatöser Plaques kommt es zum akuten Auftreten thrombotischer Gefäßverschlüsse (Atherothrombose). Thrombozyten spielen hierbei eine zentrale Rolle. Sie sind nicht nur verantwortlich für die natürliche Hämostase und Reparaturvorgänge nach einer Gefäßverletzung, sondern haben eine wesentliche Bedeutung in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen. Thrombozyten sind jedoch nicht nur als Auslöser für Komplikationen an der späten Atherosklerose beteiligt, auch bei der Initiation der Atherogenese spielen sie bekanntermaßen eine wichtige Rolle. Aus diesen Gründen werden Thrombozytenaggregationshemmer schon seit längerem in der Sekundärprophylaxe von Herzinfarkt und Schlaganfall eingesetzt. Zwar kann ein Teil der Komplikationen der Atherosklerose so schon heute verhindert werden. Man ist jedoch noch weit davon entfernt, den Krankheitsprozess aufhalten oder sogar rückgängig machen zu können. Nicht zuletzt deshalb, weil die Pathogenese der Atherosklerose, der Atherothrombose und vor allem die daran beteiligten Regulationsmechanismen noch nicht bekannt sind. Weitere Grundlagenforschung ist deshalb dringend nötig. Ziel ist es mit diesem Verständnis die Entwicklung atherosklerotischer Gefäßläsionen zu hemmen um die Häufigkeit von Herz-Kreislaufkrankungen zu verringern.

1.1 Thrombozyten

Thrombozyten sind die Wächter der vaskulären Integrität (Ruggeri and Mendolicchio 2007, S. 1673). Sie besitzen alles, was der Körper braucht, um einen akuten Notfall zu überleben: sie sind essentiell für die normale Hämostase, dichten das Blutgefäß im Fall einer Verletzung gegen Infektionen ab, produzieren aber auch Chemokine, die mikrobielle Eindringlinge bekämpfen können (von Hundelshausen, Petersen, and Brandt 2007, S.710). Dieselben Prozesse laufen jedoch auch bei pathologischen Zuständen im Gefäß ab, z.B. an der atherosklerotischen Plaque. Dies fördert das Auftreten sekundärer Komplikationen der Atherosklerose wie Herzinfarkt oder Schlaganfall.

1.1.1 Morphologie

Blutplättchen sind die kleinsten korpuskulären Blutbestandteile mit einem mittleren korpuskulären Volumen (MCV) von 7,5 – 10 fl für humane und ca. 4,7 fl für murine Thrombozyten (Jirouskova, Shet, and Johnson 2007, S.662). Hervorgegangen aus Zellfragmenten der Megakaryozyten, besitzen sie keinen Zellkern und können deswegen nur eingeschränkt Proteine neu synthetisieren. Im menschlichen peripheren Blut zirkulieren ca. 150 000 – 300 000 Plättchen pro μl (George 2000, S.1532), bei der Maus ist die Thrombozytenzahl mit ca. $1,1 \times 10^6$ pro μl Blut deutlich höher (Jirouskova, Shet, and Johnson 2007, S.662). Die mittlere Überlebenszeit der Zellen beträgt sieben bis zehn Tage, danach werden die überalterten Thrombozyten im retikuloendothelialen System der Leber und Milz abgebaut (Gawaz, S.4).

Im Ruhezustand haben Thrombozyten eine diskoide Form. Nach Aktivierung verändern sie durch Neuordnung der Aktin- und Myosinfilamente im Zytoskelett ihre Gestalt. Man nennt diesen Vorgang „Spreading“, da die Plättchen dabei lange dendritische Ausläufer, die sogenannten Pseudopodien, bilden und sich „ausstrecken“. Die Oberfläche der Zellen vergrößert sich dadurch von $8 \mu\text{m}^2$ auf $13 \mu\text{m}^2$ (George 2000, S.1531).

Man unterscheidet vier strukturelle Bereiche innerhalb eines Thrombozyten, die sich auch funktionell voneinander unterscheiden. Die **periphere Zone** besteht aus der Zytoplasmamembran, der außen eine Glykokalix, eine Schicht mit verschiedenen Glykoproteinen und Mukopolysacchariden, aufgelagert ist. Die Zytoplasmamembran besteht aus einer polarisierten Phospholipidschicht. Darin sind verschiedenartige Rezeptoren integriert, die der Plättchenfunktion dienen. Die **strukturelle Zone** ist für die Formhaltung im ruhenden Thrombozyten und die Formveränderung des Blutplättchens während der Aktivierung verantwortlich. Sie besteht aus Strukturproteinen, darunter sind Mikrotubuli und Aktin. **Membransysteme** durchziehen die Zelle von außen bis tief nach innen. Man unterscheidet das offene kanalikuläre System und das dichte tubuläre System. Letzteres leitet sich vom rauen

1 Einleitung

endoplasmatischen Retikulum ab. Es kann gespeicherte Ca^{2+} -Ionen freisetzen, die für Metabolismus und Aktivierung der Zellen sehr wichtig sind. Im Inneren des Blutplättchens befindet sich die **Zone der Organellen**. Sie besteht aus Glykogenspeicher, Mitochondrien und Speichergranula. Letztere sind typisch für Plättchen. Nach den gespeicherten Substanzen und ihrer Dichte kann man sie in drei Formen unterteilen: Die Lysosomen unterscheiden sich kaum von denen anderer Zellen und enthalten hydrolytische Enzyme. Dichte Granula sind wichtig für die Plättchenaggregation. Sie enthalten ADP, Ca^{2+} und andere proaggregatorische Faktoren. Die α -Granula sind am zahlreichsten vorhanden. Sie beinhalten viele verschiedene Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen. Darunter sind Enzyme, Adhäsionsfaktoren, z.B. Fibrinogen oder von Willebrand Faktor, Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet derived growth factor), Zytokine, z.B. CD40L, RANTES (regulated upon activation and normal T cell expressed and secreted chemokine) und PF4 (Plättchenfaktor 4), und Koagulationsfaktoren, z.B. Plasminogen und PAI-1 (Plasminogen Aktivator Inhibitor-1) (Gawaz, S.5-7). Murine α -Granula sind heterogener und in geringerer Anzahl pro Plättchen als beim Menschen vorhanden (Jirouskova, Shet, and Johnson 2007, S.663).

Obwohl sich die Thrombozyten von Menschen und Mäusen in Größe, Anzahl und Struktur teilweise erheblich voneinander unterscheiden, sind sie funktionell sehr ähnlich (Jirouskova, Shet, and Johnson 2007, S.661).

1.1.2 Funktion

1.1.2.1 Thrombozyten und Hämostase

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Thrombozyten im Gefäßsystem ohne am intakten, nicht aktivierten Endothel adhären zu werden. Bei einer Gefäßverletzung werden subendotheliale Matrixproteine freigelegt. Diese Proteine fördern in hohem Maße die Plättchenadhäsion. Die wichtigsten sind vWF (von Willebrand Faktor), Kollagene, v.a. Typ I und III, Fibronectin und Vitronectin. Unter pathologischen Bedingungen, z.B. bei Vorliegen eines früh atherosklerotisch veränderten dysfunktionalen Endothels, können Thrombozyten auch an die aktivierte, jedoch mikroskopisch noch intakte Gefäßwand binden (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008, S.404). Die Thrombozytenadhäsion und –aggregation im Bereich einer Gefäßwandläsion bezeichnet man als primäre Hämostase. Der Weg vom zirkulierenden Thrombozyten bis zum Plättchenaggregat ist komplex und verläuft in mehreren Schritten. Auch ohne vorherige Aktivierung werden die Plättchen durch in Kollagen gebundenem vWF aus dem Blutstrom abgefangen. Durch Bindung an den GPIIb-V-III-Komplex entsteht eine langsame, kontinuierliche Bewegung der Thrombozyten an der Gefäßoberfläche (Ruggeri and Mendolicchio 2007, S.1675-1677). Diese nur vorübergehende Interaktion nennt man „Tethering“ oder Rollen, sie ist vor allem bei den hohen Scherraten im arteriellen Sys-

1 Einleitung

tem und insbesondere an Gefäßabgängen oder Stenosen effektiv (Savage, Saldivar, and Ruggeri 1996, S.289). Durch diesen ersten Kontakt wird nachfolgend die Adhäsion von GPIIb/IIIa (Glykoprotein VI) an Kollagen ermöglicht. Dadurch kommt es zur Thrombozytenaktivierung. Die Blutplättchen degranulieren und es werden Gerinnungsfördernde Inhaltsstoffe frei, die die Thrombusformation vorantreiben. Wachstumsfaktoren induzieren die Proliferation von Fibroblasten und Gefäßmuskelzellen, prokoagulatorische Faktoren medieren den *shape change* der Thrombozyten und die Konformationsänderung von Integrinen vom niedrig affinen zum hoch affinen Zustand. Zusätzlich werden Integrine aus intrazellulären Speichern in die Zellmembran eingebaut (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008, S.404). Das Integrin GPIIb-IIIa vermittelt nach Aktivierung die feste Thrombozytenadhäsion durch Bindung an Fibrinogen. Die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten über Fibrinogenbrücken nennt man Aggregation und wird ebenfalls von diesem Rezeptor vermittelt (Savage, Saldivar, and Ruggeri 1996, S.289). Andere Integrine tragen zur Plättchenadhäsion und Stabilisierung des Thrombus *in vivo* bei, spielen jedoch alleine eine untergeordnete Rolle. Integrin $\alpha_2\beta_1$, oder GPIa, ist ein Kollagenrezeptor, das Integrin $\alpha_v\beta_3$ bindet bevorzugt Vitronectin, Integrin $\alpha_5\beta_1$ vermittelt die Adhäsion an Fibronectin und Integrin $\alpha_6\beta_1$ die Bindung an Laminin (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008, S.406-410).

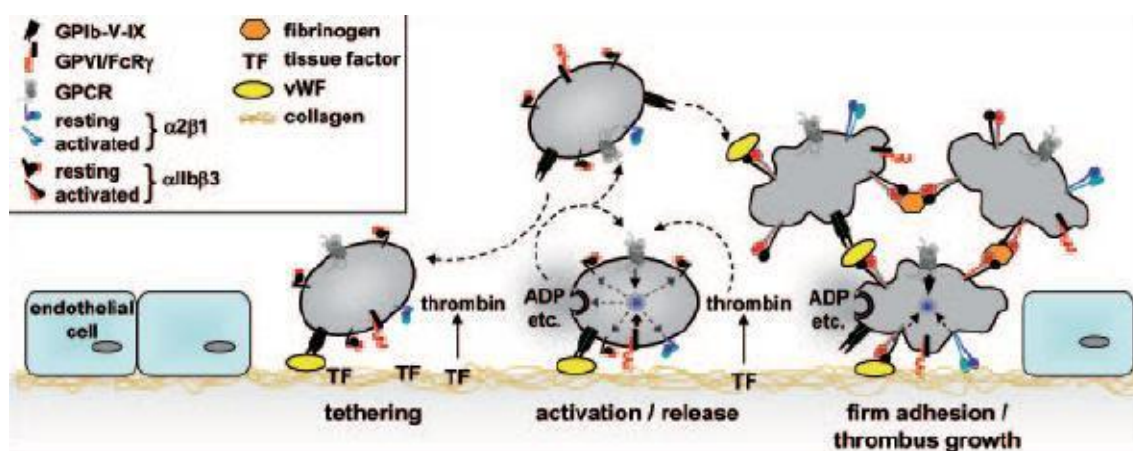


Abb. 1.1: Mechanismen der Plättchenadhäsion und -aggregation (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008, S.404).

1.1.2.2 Thrombozytäre Membranglykoproteine

Die zahlreichen Interaktionen der Thrombozyten untereinander, mit anderen Zellarten, Gerinnungsfaktoren und Strukturen der extrazellulären Matrix werden über transmembranäre Rezeptoren vermittelt. Aufgrund ihres Aufbaus unterscheidet man vier verschiedene Gruppen: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Rezeptoren vom Immunglobulintyp und Selektine.

1 Einleitung

1.1.2.2.1 Integrine

Integrine sind heterodimere Transmembranrezeptoren, die auf fast allen Zellen vorkommen und an vielen physiologischen Regulationsprozessen beteiligt sind (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008, S.407). Sie bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, die nicht-kovalent miteinander verbunden sind. Bei der Aktivierung des Thrombozyten werden vermehrt Integrine auf der Zellwand exprimiert und sie werden von einem niedrig affinen in einen hoch affinen Funktionszustand überführt. Die Signalübertragung dafür kann auf zwei Wegen geschehen. Als „inside-out-signaling“ bezeichnet man es, wenn das Integrin über seinen zytoplasmatischen Anteil aktiviert wird. „Outside-in-signaling“ nennt man eine Konformationsänderung durch die Bindung von Liganden.

Bisher kennt man fünf verschiedene Integrine. Drei gehören zur β_1 -Klasse ($\alpha_2\beta_1$ = Kollagenrezeptor, $\alpha_5\beta_1$ = Fibronectinrezeptor, $\alpha_6\beta_1$ = Lamininrezeptor), zwei zur β_3 -Klasse ($\alpha_{IIb}\beta_3$ = Fibrinogenrezeptor, $\alpha_v\beta_3$ = Vitronectinrezeptor) (Gawaz, S.30-36).

$\alpha_2\beta_1$ wird auch als GPIa bezeichnet und ist ein Kollagenrezeptor. Er spielt eine signifikante, aber keine entscheidende Rolle bei der Thrombozytenadhäsion (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008, S.408).

Das zahlenmäßig am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein des Thrombozyten ist das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb-IIIa) mit 50 000 – 80 000 Kopien pro Thrombozyt. Es wird nur auf Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert. GPIIb-IIIa bindet mit der größten Affinität an Fibrinogen, weshalb es auch als Fibrinogenrezeptor bezeichnet wird, akzeptiert aber auch vWF, Fibronectin und Vitronectin als Liganden. Über diesen Rezeptor werden feste Plättchenadhäsion an Oberflächen sowie Plättchenaggregation, d.h. Kontakte zwischen zwei Thrombozyten, vermittelt. Die Verbindung, die dabei entsteht ist irreversibel. Sie ist am effektivsten bei niedrigen Scherraten (Savage, Saldivar, and Ruggeri 1996, S.289-291).

1.1.2.2.2 Leuzinreiche Glykoproteine

Wegen ihres Reichtums an der Aminosäure Leuzin fasst man eine Gruppe von Plättchenrezeptoren zur Gruppe der leuzinreichen Glykoproteine zusammen. Dazu gehören der Thrombinrezeptor GPIV und der GPIb-V-IX-Komplex. Letzterer ist ein mit 25 000 Kopien pro Thrombozyt stark exprimierter, nur auf Blutplättchen und seinen Vorläufern vorkommender Rezeptor mit Bindungsstellen für vWF, Thrombin, Mac-1, P-Selektin, HMWK (high molecular weight kininogen) und Factor XII (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008, S.405-406). Er besteht aus vier Untereinheiten. GPIb α trägt die vWF-Bindungsstelle und ist mit GPIb β nicht-kovalent verbunden. Dieses GPIb-Molekül bindet ein GPIX-Molekül. Je zwei GPIb-IX-Verbindungen bilden zusammen mit einem zentralen Molekül GPV den GPIb-V-IX-Komplex (Gawaz, S.37-38). Dieser Komplex ist essentiell für die initiale Phase der Plättchen-

1 Einleitung

Gefäßwand-Interaktion. Durch die Bindung von vWF, das an Kollagen immobilisiert ist, werden die Plättchen bei hohen Scherraten aus dem Blutfluss gefangen und mit der verletzten Gefäßwand in Kontakt gebracht. Die entstehende Verbindung ist jedoch nicht stabil, es entsteht vielmehr eine langsame Bewegung über das Endothel, das „Tethering“ oder „Rollen“ der Thrombozyten (Massberg et al. 2003, S.41). Über die P-Selektin-Bindungsstelle vermittelt der Rezeptorkomplex einen ebenfalls vorübergehenden Kontakt an aktiviertes Endothel. Mac-1 ist ein Chemokin und wird von Leukozyten exprimiert. Durch die Interaktion mit der entsprechenden Bindungstasche trägt GPIIb-V-IX zur Chemotaxis der Leukozyten zum entzündeten Gefäß bei (Jennings 2009, S.6A), (Gawaz, S.39).

1.1.2.2.3 Rezeptoren vom Immunglobulintyp

Es sind drei thrombozytäre Adhäsionsrezeptoren aus der Immunglobulin- (Ig-) Superfamilie bekannt.

PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) und ICAM-2 (intracellular adhesion molecule-2) sind vermutlich für heterotypische Zell-Zell-Kontakte verantwortlich, d.h. sie vermitteln Kontakte zwischen Thrombozyten und anderen Zellarten, wie Subendotheliale Zellen (PECAM-1) und Leukozyten (ICAM-2) (Gawaz, S.41), (Huo and Ley 2004, S.19-20).

GPVI ist der wichtigste Kollagenrezeptor. Er ist entscheidend an der Thrombozytenaktivierung nach Kontakt mit GPIIb-V-IX beteiligt. Durch einen intrazellulären Signalweg nach GPVI-Aktivierung gehen Integrine in den hochaffinen Zustand über und die feste Plättchenadhäsion bzw. -aggregation wird so ermöglicht. Eine experimentelle Ausschaltung von GPVI auf Plättchen hat im Gegensatz zur Blockierung des zweiten Kollagenrezeptors Integrin $\alpha_2\beta_1$ eine deutliche Verminderung der Plättchenadhäsion zur Folge, was die Bedeutung des Rezeptors vom Immunglobulintyp gegenüber dem Integrin in der kollagenvermittelten Thrombozytenadhäsion verdeutlicht (Ruggeri and Mendolicchio 2007, S.1677-1680), (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008, S.406-407), (Jennings 2009, S.4A-7A), (Massberg et al. 2003, S.41-48), (Massberg et al. 2004).

1.1.2.2.4 Selektine

Selektine sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren, die heterotypische Zell-Zell-Kontakte vermitteln.

Thrombozyten verfügen über P-Selektin. Es ist in den α -Granula des ruhenden Thrombozyten gespeichert und wird nur bei Aktivierung an der Oberfläche exprimiert. P-Selektin kommt außerdem auf Endothelzellen vor, dort wird es in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Leukozytenrekrutierung an das inflammatorisch veränderte Endothel bei der Atherosklerose sowie bei der Leukozyten-Plättchen-Interaktion

1 Einleitung

(Huo and Ley 2004, S.19-20), (Gawaz, S.37-38), (Gawaz 2006, S.208), (Jennings 2009, S.8A), (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008, S.404).

So unterschiedlich die einzelnen thrombozytären Membranglykoproteine in ihrer Struktur sind, so unterschiedlich sind auch die Aufgaben, die sie wahrnehmen. Die Rezeptoren sind nicht nur für die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten im Rahmen der normalen Hämostase zuständig, sondern vermitteln auch eine Reihe proinflammatorischer Prozesse.

1.2 Modelle zum Studium der Plättchenfunktion und der Thromboseentstehung

Interaktionen zwischen Thrombozyten und der Gefäßwand spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung von Erkrankungen wie Atherosklerose, Thrombose und Sepsis. Um die Pathophysiologie dieser Erkrankungen verstehen zu lernen und sie dann erfolgreich behandeln zu können, hat man verschiedene Modelle entwickelt, mit denen man die Interaktionen zwischen Blutzellen und Endothel bzw. subendothelialer Matrix abbilden kann. *In vivo* Modelle untersuchen die Vorgänge im lebenden Objekt, *in vitro* Modelle in einer künstlich geschaffenen Umgebung.

1.2.1 *In vivo* Modelle

In vivo Modelle bilden am ehesten die tatsächliche Situation im Gefäß ab. Deshalb sind sie die wesentliche Methode um physiologische Prozesse und Krankheitsmechanismen zu untersuchen. In Tiermodellen kann man gezielt Gefäßverletzungen setzen um eine Thrombose zu induzieren. Diese Verletzung kann durch Chemikalien (Kurz, Main, and Sandusky 1990, S.269-280), Laser (Falati et al. 2002, S.1175-1180) oder Ligation (Massberg et al. 2005, S.1180-1188), (Massberg et al. 2003, S.41-49) hervorgerufen werden. Jede Möglichkeit hat ihre Vor- und Nachteile und setzt künstlich den natürlichen Prozess der Thrombusformation in Gang. Einzelne Zellarten und ihre Interaktionen können dann nach entsprechender Vorbereitung mittels Intravitalmikroskopie sichtbar gemacht werden (Furie and Furie 2005, S.3355-3356).

Der Vorteil dieser Methoden ist, dass so die natürlichen pathophysiologischen Abläufe studiert werden können. Andererseits besteht im lebenden Organismus kaum die Möglichkeit Einfluss auf einzelne Parameter zu nehmen um experimentell standardisierte Bedingungen zu schaffen. Zudem sind die Vorgänge meist sehr komplex. Man kann nur eingeschränkt Aussagen über einzelne Mechanismen gewinnen, da durch die zahlreichen Interaktionen viele Überlagerungsmöglichkeiten bestehen.

1.2.2 *In vitro* Modelle

An dieser Stelle setzen *in vitro* Modelle an. Sie simulieren stark vereinfacht einen zu untersuchenden Aspekt des Pathomechanismus. Zur Untersuchung der Plättchenfunktion stehen zahlreiche dieser Modelle zur Verfügung.

Die Messung der Plättchenaggregation ist eine einfache und gebräuchliche Methode sowohl in der klinischen Routine als auch in der Forschung. Sie beruht darauf, dass Thrombozyten je nach Aktivierungszustand ihre photometrischen Eigenschaften ändern. Die Lichttransmis-

1 Einleitung

sion der Zelllösung nimmt zunächst leicht ab, wenn die Plättchen bei Aktivierung ihre Form ändern und nimmt dann stark zu, wenn sie anschließend Aggregate bilden. Durch Zugabe von Agonisten oder Antagonisten der Plättchenfunktion kann so direkt eine Aussage über die Wirkung des zugegebenen Stoffes auf die Zellen getroffen werden oder man misst die Reagibilität der Plättchen durch Zugabe einer Substanz mit bekannter Wirkung (Rand, Leung, and Packham 2003, S.310-311), (Gawaz, S.43-47).

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich spezifische Veränderungen der Thrombozytenmembran bei der Aktivierung schnell und zuverlässig darstellen. Durch ihre zellartspezifische Größe und Granularität, die sich bei Passieren eines Laserstrahls in einem charakteristischen Vorwärts- bzw. Seitwärtsstreulicht äußern, lassen sich Plättchen von anderen Blutzellen unterscheiden. Die Markierung mit Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern, die spezifisch gegen die zu untersuchenden Epitope gerichtet sind (z.B. anti-CD41 gegen GPIIb-IIIa), ermöglicht Aussagen über verschiedene funktionelle Veränderungen der Thrombozytenoberfläche z.B. bei Aktivierung (Gawaz, S.48-52), (Rand, Leung, and Packham 2003, S.313-314).

Die beiden soeben beschriebenen Methoden sind hilfreiche Werkzeuge um isolierte Details der Thrombozytenfunktion darzustellen. Von der Situation *in vivo* sind diese Methoden jedoch weit entfernt. Dadurch ist die direkte Anwendung der gewonnenen Erkenntnisse oft problematisch. Eine physiologischere Situation lässt sich mit einem Flusskammermodell herstellen. Ein vereinfachtes und dem jeweiligen Bedarf angepasstes Gefäßmodell wird dargestellt durch eine Glasoberfläche, auf der einzelne Bestandteile der extrazellulären Matrix präsentiert werden. In einem künstlich erzeugten Blutstrom werden die Zellen über die beschichtete Kammeroberfläche perfundiert. Dabei hat man die Möglichkeit verschiedene Parameter wie z.B. Scherrate, rheologische Faktoren (Hämatokrit, Pufferzusammensetzung, Temperatur, etc.) und Gefäßstruktur zu steuern. Die Thrombozytenadhäsion wird mikroskopisch erfasst. Das am häufigsten verwendete Modell ist die „parallel plate flow chamber“. Durch die parallele Anordnung zweier Glasplättchen ergibt sich eine rechtwinklige Kammer. Die Bodenfläche kann mit einer adhäsiven oder antiadhäsiven Substanz beschichtet werden (Martin et al. 2007, S.1-7), (Holme et al. 1997), (Massberg et al. 2004). Eine andere Methode ist die Verwendung von mikrokapillaren Röhren als Perfusionskammer. Der Blutfluss wird bei Flusskammerversuchen in der Regel durch eine Perfusorpumpe generiert (Kulkarni et al. 2004, S.167-185). Limitiert wurden die Versuche in der Vergangenheit durch den meist erheblichen Bedarf an Zellmaterial (Massberg et al. 2004).

Um natürlichere Flussbedingungen zu erreichen und damit näher an die *in vivo* Situation zu gelangen, wurde von einer Arbeitsgruppe eine *ex vivo* „Maus-betriebene“ Flusskammer entwickelt. Der Blutfluss wird durch das Herz der Maus aufrechterhalten, die Kammer wird wie

1 Einleitung

ein externes Blutgefäß an den Kreislauf der Maus angeschlossen. Bei dieser Methode geht jedoch die Steuerbarkeit einzelner Parameter, wie Scherrate oder hämodynamische Bedingungen, verloren (Hafezi-Moghadam, Thomas, and Cornelssen 2004, S.C877-C891).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *in vivo* Modelle für Plättchenfunktion und Thromboseentstehung zwar die geeigneten Mittel sind um pathophysiologische Prozesse möglichst natürlich darzustellen. Grenzen sind jedoch erreicht, wenn es um die Aufdeckung mechanistischer Details geht. Hierzu sind *in vitro* Modelle besser geeignet. Mit ihnen lassen sich komplexe Vorgänge vereinfacht darstellen. Die Flusskammer ist eine Art künstliches Gefäß, mit dem man das Verhalten von Thrombozyten unter Flussbedingungen studieren kann. Die experimentellen Bedingungen sind zwar steuerbar, der Versuchsaufbau orientiert sich aber dennoch an der *in vivo* Situation. Die Verwendung von Thrombozyten genetisch modifizierter Mäuse könnte weiteren Aufschluss über die Pathophysiologie von Erkrankungen wie Atherosklerose und Thrombose bringen. Ihr Einsatz in Flusskammern war bisher durch den hohen Bedarf an Blutzellen für diese Versuche limitiert.

1.3 Atherosklerose

Die WHO (World Health Organisation) definiert Atherosklerose als "eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia." Diese Veränderungen der arteriellen Gefäße sind die morphologische Grundlage der vaskulären Erkrankungen Herzinfarkt und zerebraler Infarkt, die in der industrialisierten Welt die weitaus häufigste Todesursache sind.

Nach heutigem wissenschaftlichem Forschungsstand gilt die Atherosklerose als eine chronisch entzündliche Erkrankung, die sich in ihrem Wesen, d.h. den zugrundeliegenden Entzündungsmechanismen, nicht von anderen fibroproliferativen Erkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder Leberzirrhose unterscheidet, auch wenn jedes Organ oder Gewebe auf charakteristische Art und Weise reagiert. Basierend auf der von R. Ross aufgestellten „response to injury Hypothese“ steht nach heutigem Kenntnisstand am Anfang der Atherogenese die endotheliale Dysfunktion (Ross 1999, S.115-120). Sie wird hervorgerufen bzw. begünstigt durch die bekannten Risikofaktoren der Atherosklerose. Zu nennen sind vor allem arterielle Hypertonie, Zigarettenrauchen, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und Adipositas, aber auch Infektionen durch Chlamydia pneumoniae, Viren der Herpesgruppe und ein erhöhter Plasmahomozysteinspiegel sind Triggerfaktoren (Libby, Ridker, and Maseri 2002, S.1135-1138).

Eine der ersten Zellarten, die an dem dysfunktionalen Endothel adhären werden, sind Thrombozyten. Sie spielen damit eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Atherosklerose. Die Plättchenaktivierung in der frühen Phase der Atherosklerose geschieht zum einen durch die Risikofaktoren der Atherosklerose, zum anderen durch das veränderte Milieu am geschädigten Endothel (Huo and Ley 2004, S.18-19). Die Matrixproteine vWF und Kollagen werden bei Schädigung des Endothels freigesetzt. Der erste lockere Kontakt der Plättchen mit der Gefäßwand wird vermutlich initiiert durch die Bindung des GPIIb-V-IX-Komplexes mit endotheliale vWF und GPVI mit Kollagen. Zusätzlich spielt der Rezeptor P-Selektin eine wichtige Rolle bei diesem Kontakt. Die feste Adhäsion wird durch GPIIb/IIIa und die Bindung an Fibrinogen vermittelt. Weitere Thrombozyten können sich durch Ausbildung von Fibrinogenbrücken anlagern (Gawaz 2006, S.206). Die Bedeutung der Thrombozyten für die Initiierung der Atherosklerose konnte u.a. durch Studien an Atherosklerosemodellen der Maus nachgewiesen werden. Der ApoE-defizienten Maus fehlt das Gen für Apolipoprotein E, das Lipoprotein Remnants zur Leber transportiert. Dadurch leidet sie an Hypercholesterinämie und entwickelt besonders nach atherogener Diät bereits früh atherosklerotische Läsionen,

1 Einleitung

die denen beim Menschen ähnlich sind. Schon vor Ausbildung makroskopisch sichtbarer Läsionen ist die Thrombozytenadhäsion an das Endothel bei diesen Tieren erhöht. Durch Hemmung von GPIIb/IIIa und GPIIb konnte die Atheroprogression verringert werden (Massberg et al. 2002, S.887-895), (Massberg et al. 2005, S.1180-1187).

Die aktivierten Plättchen setzen eine Vielzahl von proinflammatorischen und mitogenen Substanzen frei, die die Chemotaxis, Adhäsion und Transmigration von Monozyten und T-Lymphozyten – den Hauptakteuren der atherosklerotischen Entzündung – fördern. Besonders zu erwähnen sind CD40L, das die Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) erhöht und RANTES (regulated-on-activation, normal T-cell expressed and -secreted chemokine), das den Monozytenarrest auf dem entzündeten Endothel triggert (Gawaz 2006, S.207-208), (Massberg et al. 2002, S.887-888). Am dysfunktionalen Endothel ist zudem die Permeabilität gesteigert und es kommt zur verstärkten intimalen Lipidretention und –modifikation. Die eingewanderten Monozyten differenzieren sich in der Intima zu Makrophagen und werden durch Aufnahme von Cholesterinestern zu Schaumzellen. Es entstehen die ersten makroskopisch sichtbaren Läsionen der Atherosklerose, die Fettstreifen, auch „fatty streaks“ genannt. Sie sind regelmäßig bereits im Kindes- und Jugendalter zu finden und sind noch reversibel. Sie können sich jedoch auch weiterentwickeln zu sog. fortgeschrittenen Läsionen, den fibrösen Plaques oder frühen Fibroatheromen, die ca. ab dem 15. – 30. Lebensjahr auftreten. Sie entstehen durch Proliferation der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand durch Wachstumsfaktoren, die von Plättchen und Makrophagen sezerniert werden. Diese Muskelzellen geben Proteoglykane, Kollagen und elastische Fasern ab und produzieren so fibröses Gewebe. Einige Faktoren fördern den Zelltod von Makrophagen und glatten Muskelzellen. Durch vermehrte Freisetzung von proinflammatorischen Substanzen und Chemokinen werden immer mehr Schaumzellen in die Intima eingelagert. So entsteht eine Plaque mit nekrotischem, lipidreichem Kern und einer fibrösen Hülle, zum Teil werden Kalksalze eingelagert. Ungefähr ab dem 55. Lebensjahr muss man mit dem Auftreten von komplizierten atherosklerotischen Läsionen rechnen. Diese fortgeschrittenen Fibroatherome sind von Ruptur bedroht, da proteolytische Enzyme aus Makrophagen, z.B. Kollagenasen oder INF- γ (Interferon- γ), das die Kollagensynthese hemmt, freigesetzt werden und die fibröse Hülle andauern können. In der fortgeschrittenen Läsion werden außerdem vermehrt prothrombotische Substanzen, z.B. tissue factor, produziert, die eine Thrombose triggern können. Durch eine Ruptur werden die prothrombotischen Substanzen freigelegt und es kommt wiederum zur Anlagerung von Thrombozyten (Packard and Libby 2008, S.27-28). Es resultiert eine thrombotische Verlegung des betroffenen Gefäßes, die klinisch z.B. bei Koronarthrombose als Myokardinfarkt imponiert. Man unterscheidet dabei vier verschiedene Klassen von Plaques,

1 Einleitung

die zu einem akuten klinischen Ereignis führen. Mit 50 – 60% am häufigsten kommt es zu einer Thrombose durch Ruptur einer instabilen Plaque. In weiteren 20% entsteht die Thrombose auf dem Boden einer Endothelerosion. In ca. 2% der Fälle verlegt ein kalzifizierter Knoten das betroffene Gefäß. Die Ursache für ein klinisches Ereignis muss jedoch nicht thrombotischer Natur sein. Auch eine fortgeschrittene Stenose ohne Thrombose kann zu einer Ischämie führen. In ca. 60% der Fälle gehen einem plötzlichen Herztod subklinische Plaque-rupturen oder –erosionen voraus, gefolgt von Thrombosen und nachfolgenden Reparaturen. Die Plaque wächst während dieses Zyklus anfangs unbemerkt, denn die Arterie kompensiert die Lumenreduktion zunächst mittels Dilatation. Dieser Prozess wird *Remodeling* genannt (Ross 1999, S.115). Erst wenn die Plaqueausdehnung mehr als 40% beträgt verringert jedes weitere Wachstum der atherosklerotischen Läsion das arterielle Lumen und wirkt sich so möglicherweise auf die Hämodynamik aus. Eine Stenose ist entstanden (Insull 2009, S.S3-S9).

1 Einleitung

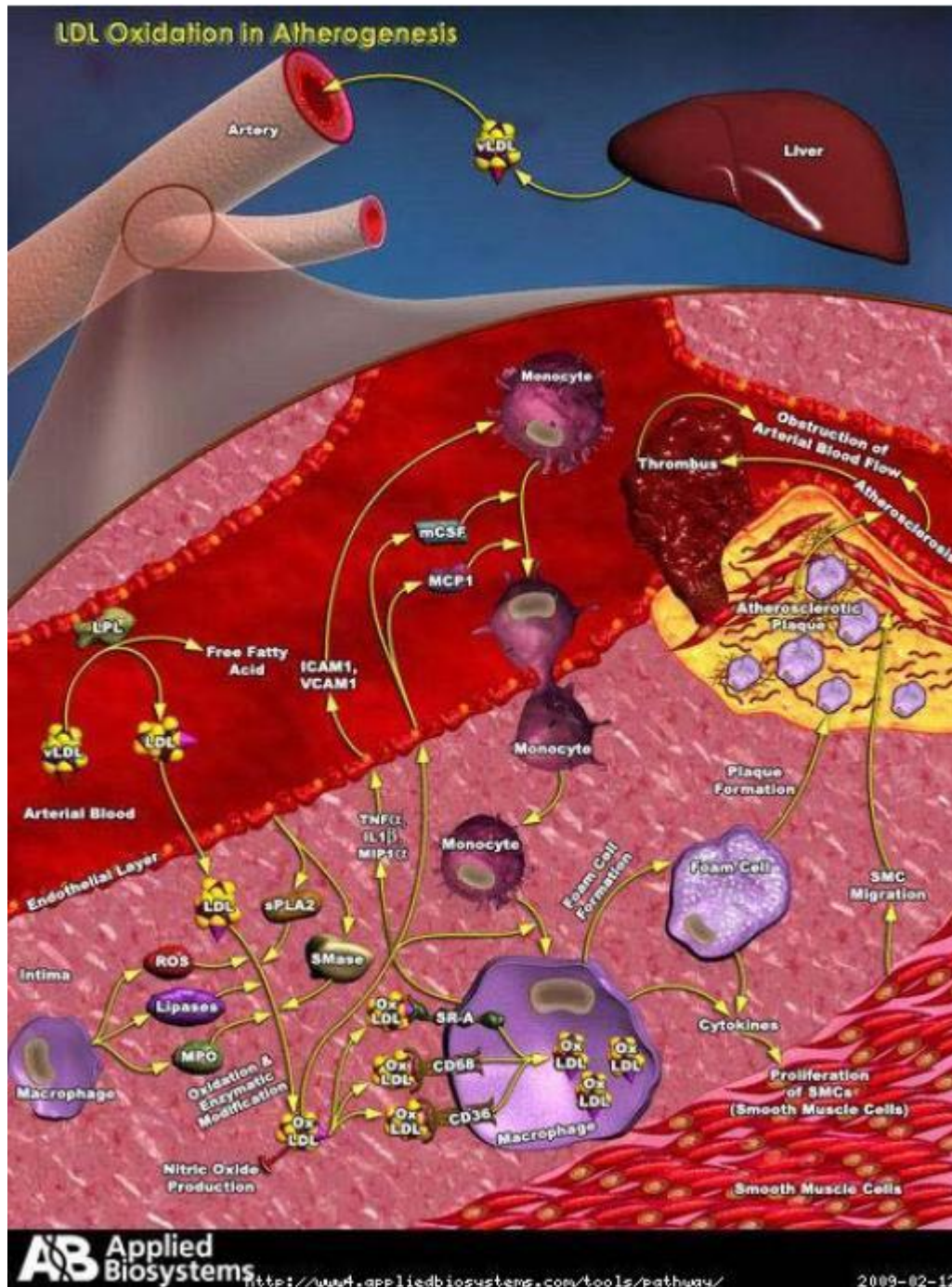


Abb. 1.2: Schritte der Atherogenese: Aufnahme und Modifikation von LDL, Transmigration von Monozyten und Schaumzellbildung; Proliferation von Gefäßmuskelzellen, Formation einer atherosklerotischen Plaque, Plaqueruptur und Plaquetrombose mit Alteration des Blutflusses (AB)

Das heutige Verständnis von der Pathogenese der Atherosklerose eröffnet eine Reihe therapeutischer Möglichkeiten. Bereits in der klinischen Anwendung befinden sich Thrombozytenaggregationshemmer, wie z.B. Aspirin. Dadurch kann die Bildung von atherosklerotischen Läsionen und das Auftreten thrombotischer Komplikationen verringert werden (Huo and Ley 2004). Aufgrund ihrer pleiotropen Effekte wirken sich Statine günstig auf Plauegröße, ent-

1 Einleitung

zündliche Aktivität (Plaquestabilität) und Häufigkeit der klinischen Ereignisse aus (Insull 2009, S.S10-S11). Immunsuppressiva und antiinflammatorische Medikamente könnten Einzug in die Behandlung der Atherosklerose finden. Bei der Anwendung von medikamentenbeschichteten Stents nach Angioplastie versucht man gezielt gegen die Entzündung vorzugehen. Man verwendet dazu beispielsweise das Immunsuppressivum Sirolimus. Dadurch kann die Restenoserate signifikant verringert werden. Für die Prävention der Atherosklerose wäre eine Art Impfung mit einem krankheitsverwandten Antigen denkbar. In einem Experiment konnte die Atherosklerose bereits durch Impfung von Mäusen mit oxidiertem LDL vermindert werden (Hansson 2005, S.1692).

1.4 Sphingosin 1-Phosphat

Sphingosin 1-Phosphat (S1P) ist ein bioaktives Sphingolipid. Es nimmt auf verschiedenartige Prozesse im Körper regulierenden Einfluss. Als bedeutender multifunktionaler, physiologischer Mediator spielt es u.a. eine Rolle in der Vaskulogenese, in der Zellzyklusregulation, sowie in der Zellkommunikation des Immunsystems. Jedoch auch an pathologischen Prozessen konnte eine Beteiligung von S1P nachgewiesen werden. Tumorangiogenese, Inflammation und Atherogenese sind wichtige krankhafte Zustände, bei denen S1P eine Rolle spielt. Neue Therapieansätze für Immunsuppression nach Organtransplantationen und Multiple Sklerose sind klinische Forschungsfelder (Taha, Hannun, and Obeid 2006, S.120), (Levade et al. 2001, S.960-963).

1.4.1 Struktur und Metabolismus

Grundgerüst für die Sphingolipide ist Ceramid. Es kann über eine Reaktionskette *de novo* aus Serin und Palmitoyl-CoA hergestellt werden oder über einen sog. *salvage pathway* durch Hydrolyse von Sphingomyelin aus Membranen. Letztere Reaktion wird durch das Enzym Sphingomyelinase (SM) katalysiert. Ausgehend von Ceramid werden die bioaktiven Sphingolipide Ceramid 1-Phosphat, Sphingosin und S1P generiert (Taha, Hannun, and Obeid 2006, S.113).

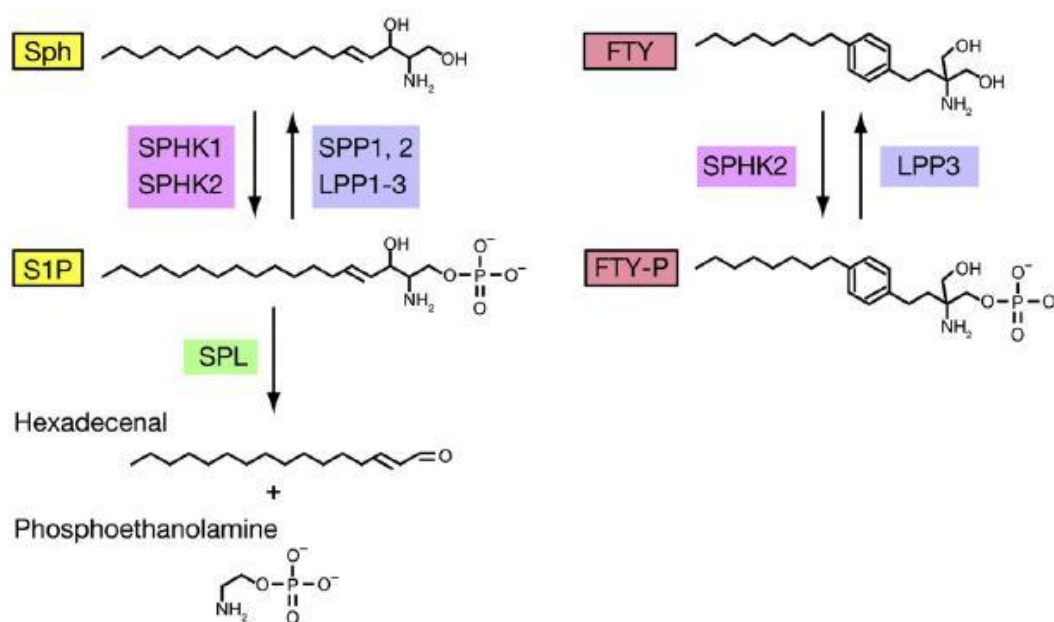
1.4.1.1 Sphingosinkinasen

Sphingosinkinasen (SK) synthetisieren unter ATP-Aufwendung S1P aus Sphingosin und regeln so die relativen Level von S1P, Sphingosin und Ceramid (Abb. 1.3). Es sind zwei Isotypen (SK1 und SK2) mit unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften bekannt. Das lässt möglicherweise eine voneinander unabhängige Regulation zu. SK1 kommt im Zytosol vor; SK2 besitzt zusätzlich Transmembranregionen, befindet sich also in der Plasmamembran (Xu, Hansen-Schwartz, and Edvinsson 2004, S.851). Sphingosinkinasen sind spezifisch für Dihydrosphingosine, SK2 besitzt jedoch eine geringere Substratspezifität als SK1 (Taha, Hannun, and Obeid 2006, S.116). Um die Mechanismen der Regulation im Zellgefüge noch besser erforschen zu können, wurden Sphingosinkinase Knock-out Modelle der Maus entwickelt. Die Untersuchungsergebnisse in der Maus lassen Rückschlüsse auf die Situation im menschlichen Körper zu, da die Aminosäuresequenz der humanen SK1 und der murinen SK1 zu 85% übereinstimmen und sogar zu 92% ähnlich sind (Nava et al. 2000). Sowohl SK1- als auch SK2- defiziente Tiere (knockout) sind lebensfähig, fertil und ohne offensichtliche Auffälligkeiten. SK1/2-Doppelknockout-Mäuse sind nur als bedingte Varianten überlebensfähig, das heißt, das SK1-Gen wird erst 3-5 Tage nach der Geburt ausgeschnitten. Bei herkömmlicher Züchtung sterben die Embryonen an Hämorrhagien aufgrund unzureichender

1 Einleitung

Entwicklung des vaskulären Systems. Das impliziert, dass S1P für die Entwicklung des Gefäßsystems unabdingbar ist, nicht aber für das reife Gefäßsystem. Trotzdem spielt S1P für die Regulation vaskulärer Funktionen oder in pathologischen Situationen vermutlich eine Rolle. S1P-Plasmalevel sind in SK1 defizienten Mäusen um 50%, in SK2-Knockout Tieren um 25% reduziert, SK1/2-Doppelknockout-Embryos enthalten kein S1P (Kihara and Igarashi 2008, S.498-500), (Allende et al. 2004, S.52488-52489), (Zemann et al. 2006, S.1456).

Der Abbau von Sphingosin 1-Phosphat geschieht ebenfalls auf verschiedenen Wegen, diese sind auf Abb. 1.3 schematisch dargestellt. Das Enzym S1P-Lyase (SPL) degradiert S1P zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin (Hla 2004, S.401-402). Die intrazelluläre S1P-Phosphatase (SPP) konvertiert S1P in Sphingosin. Es wurden zwei Gene identifiziert: SPP1 wird ubiquitär exprimiert, SPP2 gewebespezifisch. Lipidphosphatphosphatasen (LPP1, LPP2, LPP3) sind für den extrazellulären Abbau von S1P verantwortlich. Sie sind weniger substratspezifisch als SPP und erkennen viele phosphorylierte Lipide als Substrat an. LPP3 z.B. dephosphoryliert FTY720, einen S1P-Rezeptormodulator (Kihara and Igarashi 2008, S.498). In den meisten Zellen ist die Aktivität der degradierenden Enzyme höher als die der produzierenden, so dass die intrazellulären S1P-Konzentrationen gering sind. Extrazelluläre (Plasma-) S1P-Level bewegen sich zwischen 330 nM und 420 nM, S1P kommt im Plasma zu ca. 60% gebunden an Albumin und Lipoproteine vor. Dabei ist S1P am häufigsten an HDL (>LDL>VLDL) und am seltensten an Albumin gebunden. Durch diese Bindung ist die Bioaktivität von S1P reduziert und es ist vor Abbau durch Ektoenzyme wie Lipidphosphatphosphatasen geschützt (Yatomi 2008, S.608), (Tolle et al. 2007, S.172). Die Halbwertszeit von S1P im Plasma beträgt ungefähr 15 Minuten (Venkataraman et al. 2008, S.669-675).



1 Einleitung

Abb. 1.3: Metabolismus von S1P und dem S1P-Rezeptormodulator FTY-720 (Kihara and Igarashi 2008, S.497)

1.4.1.2 S1P-Metabolismus in Thrombozyten und Erythrozyten

Eine besondere Rolle im S1P Metabolismus kommt den Blutplättchen zu. Sie besitzen eine hochaktive SK, ihnen fehlt jedoch die S1P-Lyase. Dadurch werden sie zu S1P-Speichern und Quelle für Plasma-S1P. Bisher sind zwei unabhängige Freisetzungssysteme für S1P in Thrombozyten bekannt (Abb. 1.4): ein ATP-abhängiges, das durch physiologische Reize wie Thrombin und Scherstress stimuliert wird und durch Glyburid inhibiert wird, sowie ein ATP-unabhängiges, vermutlich ein Ca^{2+} -abhängiger Transporter. Die stimulusabhängige S1P-Freisetzung scheint mit einer Protein C Aktivierung verknüpft zu sein. Neuere Erkenntnisse bringen auch Erythrozyten als Quelle für Plasma-S1P in die Diskussion. Möglicherweise sind Thrombozyten für die lokale Umgebungskonzentration von S1P, die durch Aktivierung erreicht wird, verantwortlich und die Erythrozyten für ein basales Level an S1P. Erythrozyten haben nämlich eine wesentlich geringere Sphingosinkinase-Aktivität als Plättchen, besitzen aber weder S1P-Lyase noch S1P-Phosphatase. Ebenfalls dafür spricht, dass Sphingosin 1-Phosphat aus Erythrozyten ständig, und vermutlich stimulusunabhängig, freigesetzt wird. Aufgrund ihres wesentlich größeren Zellvolumens im Vergleich zu den Thrombozyten ist ihr gesamter S1P-Gehalt erheblich (Yatomi 2008, S.606-607), (Kihara and Igarashi 2008, S.500). Dass jedoch in thrombopenen und anämischen Mäusen der S1P-Plasmaspiegel nicht erniedrigt ist, weist darauf hin, dass noch andere Zellen zur Aufrechterhaltung der S1P-Konzentration beitragen. Eine Studie weist das für vaskuläre Endothelzellen nach (Venkataraman et al. 2008, S.669-675).

Es konnte gezeigt werden, dass S1P auch als Effektormolekül am Thrombozyten wirken kann. Extrazelluläres S1P steht in Verdacht die Plättchenfunktion zu beeinflussen (Yatomi et al. 1997, S.5291).

1 Einleitung

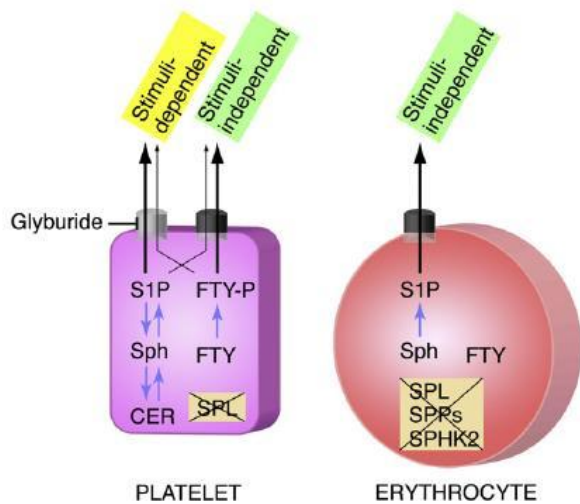


Abb. 1.4: Freisetzung von S1P und dem S1P-Rezeptormodulator FTY-720 aus Thrombozyten und Erythrozyten (Kihara and Igarashi 2008, S.497)

1.4.2 S1P-Rezeptoren und die Wirkungen von S1P

Verschiedene Wirkmechanismen für S1P werden diskutiert. Zum einen fungiert intrazelluläres S1P als *second messenger*, indem es die Ca^{2+} -Homöostase beeinflusst sowie Zellwachstum, Zellproliferation und eine Hemmung der Apoptose induziert. Dieser Signalweg wurde in Hefen nachgewiesen. Es bleibt offen, welche Rolle er in Säugetierzellen spielt (Hla 2004, S.401-402). Zum anderen bindet extrazelluläres S1P an fünf G-Protein gekoppelte Oberflächenrezeptoren. Ursprünglich identifiziert als ein Genprodukt in endothelialen Zellen mit einer Aufgabe in der Angiogenese, wurden sie als EDG-Rezeptoren (endothelial differentiation gene) bezeichnet und später in S1P-Rezeptoren ($\text{S1P}_1/\text{EDG1}$, $\text{S1P}_2/\text{EDG5}$, $\text{S1P}_3/\text{EDG3}$, $\text{S1P}_4/\text{EDG6}$, $\text{S1P}_5/\text{EDG8}$) umbenannt (Taha, Hannun, and Obeid 2006, S.120). Die Bindung von S1P an den jeweiligen Rezeptor löst intrazellulär eine Reaktionskaskade aus, die von dem jeweiligen Rezeptorsubtyp abhängig ist (Abb. 1.5). Die Aktivierung eines G_i -Proteingekoppelten Signalweges, z.B. Ras und MAPK durch S1P_1 wirkt inhibitorisch, durch $\text{S1P}_{2/3}$ angeregte G_q - und $\text{G}_{12/13}$ -Proteine, die z.B. in den Rho-Signalweg führen, wirken aktivierend. Auch auf diesen Wegen kann Ca^{2+} in Zellen mobilisiert werden. Über die Bindungseigenschaften von S1P_4 und S1P_5 ist noch wenig bekannt.

1 Einleitung

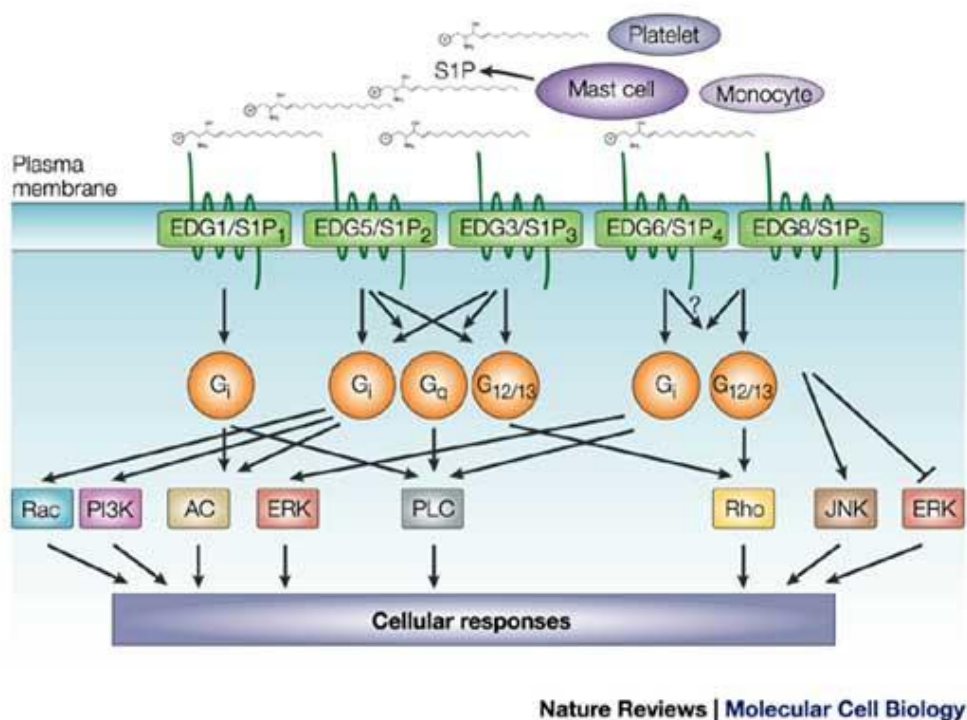


Abb. 1.5: Signalwege für S1P über Oberflächenrezeptoren (Spiegel and Milstien 2003).

S1P₁ - S1P₃ werden ubiquitär exprimiert; S1P₄ nur in lymphatischem Gewebe, S1P₅ in Gehirn und Haut (Kihara and Igarashi 2008, S.496). Für das kardiovaskuläre System scheinen nach derzeitiger Studienlage die Rezeptoren S1P₁ – S1P₃ die größte Rolle zu spielen. S1P ist entscheidend an der Entwicklung des Gefäßsystems beteiligt. Die Effekte werden über S1P₁ vermittelt. S1P₁-defiziente Mäuse sterben intrauterin an Tag 12,5 bis 14,5 an einer Hämorrhagie aufgrund unzureichender Vaskulogenese (Liu et al. 2000, S.951-961). Eine weitere Funktion, die S1P₁ und auch S1P₃ nach zahlreichen Beobachtungen zugeschrieben wird, ist eine proangiogenetische Wirkung in Tumormodellen, vermittelt über eine Rac-Aktivierung. Schließlich ist die Interaktion von S1P mit S1P₁ entscheidend für die Lymphozytenauswanderung aus sekundärem lymphatischem Gewebe. Dieses Erkenntnis wurde gewonnen durch Beobachtung einer S1P₁-Downregulation durch FTY720-P, einem S1P-Agonisten, der sich in der klinischen Erprobung als Immunmodulator befindet (siehe 1.4.3.1) (Massberg and von Andrian 2006, S.1088-1089).

1.4.2.1 S1P und Atherosklerose

Die Rolle von S1P in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Atherosklerose wird kontrovers diskutiert. Einige Studien sehen S1P als atherogenen Faktor, andere als antiatherogenen Faktor. Eine klinische Studie von Deutschman et. al. ergibt, dass S1P ein stärkerer Indikator für eine KHK ist, als die etablierten Risikofaktoren Alter, Geschlecht,

1 Einleitung

Familienanamnese, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und arterieller Hypertonus. (Xu, Hansen-Schwartz, and Edvinsson 2004, S.852), (Deutschman et al. 2003, S.62-68). Andererseits wird insbesondere HDL-assoziiertes S1P für eine Reihe von antiatherogenen Effekten verantwortlich gemacht (Taha, Hannun, and Obeid 2006, S.123). Eine mögliche Erklärung ist die Annahme, dass intrazelluläres S1P als atherogener Mediator fungiert, während extrazelluläres S1P über S1P₁ und S1P₃ atheroprotektiv wirkt (Xu, Hansen-Schwartz, and Edvinsson 2004, S.850), (Karliner 2002, S.218). Eine andere Hypothese erklärt die unterschiedlichen Wirkungen durch gegensätzliche Effekte der verschiedenen S1P-Rezeptoren. Die Expressionslevel der jeweiligen Rezeptortypen im betreffenden Gewebe in der entsprechenden Situation könnte also auch eine Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse in Bezug auf die Rolle von S1P in der Atherosklerose sein.

S1P ist beteiligt an der Proliferation der Gefäßwand und Plaquestabilisierung. Während der Atherosklerose kommt es zu einer Entzündungsreaktion am Endothel, induziert durch Zytokine oder oxidiertes LDL. In diesem Geschehen können Lipide wie Ceramid, Lactosylceramid (LacCer) und S1P die Expression von Adhäsionsmolekülen hochregulieren und so die Adhäsion und Migration von Monozyten und Gefäßmuskelzellen induzieren, was ein entscheidendes Ereignis in der Initiation und Progression der Atherogenese darstellt (Levade et al. 2001, S.963). Andere Studien zeigen, dass S1P inhibierend auf die Migration von Zellen wirken kann. Diese widersprüchlichen Effekte werden wahrscheinlich durch die Stimulation unterschiedlicher S1P-Rezeptoren hervorgerufen. S1P₁ soll demnach die Zellmigration fördern, S1P₂ hemmt die Migration (Hla 2004, S.404).

Einer der Haupteffekte von S1P auf das Endothel ist die Verminderung der Permeabilität, was die Diapedese von Immunzellen erschwert. Das ist von großer Bedeutung für die Reduktion bzw. Inhibition der Atherosklerose. Dieser Effekt wird über S1P₁- und S1P₃-Rezeptoren und die nachfolgende Aktivierung der G_i-Proteine Rho und Rac vermittelt. Ebenfalls über S1P₃ aktiviert S1P den antiinflammatorisch wirkenden TGFβ-Signalweg und wirkt als solches auch der entzündlichen Gefäßreaktion bei der Atherosklerose entgegen (Tolle et al. 2007, S.173).

Zumindest teilweise kann der antiatherogene Effekt von Sphingolipiden durch die Bindung von S1P an HDL erklärt werden (Yatomi 2008, S.608). Über eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels und nachfolgende Aktivierung der PI-3-Kinase und Aktivitätssteigerung von Akt kommt es zu einer erhöhten Aktivität der eNOS und einer damit einhergehenden NO-Freisetzung. NO wirkt am Endothel als Vasodilatator. Bei S1P₃-defizienten Tieren reduziert sich dieser Effekt um 60%, was die Folgerung nahe legt, dass diese Wirkung hauptsächlich über S1P₃ vermittelt wird (Nofer et al. 2004, S.569-580). S1P₂-vermittelt verursacht S1P dagegen in Koronararterien eine Vasokonstriktion (Tolle et al. 2005, S.918).

1 Einleitung

Das Gleichgewicht zwischen Ceramid, als apoptotischem Faktor, und S1P, das Zellproliferation und -überleben begünstigt, trägt zur Entscheidung über Leben oder Tod einer Zelle bei. Viele Stimuli, u.a. Wachstumsfaktoren, aktivieren das Enzym Sphingosinkinase, das S1P produziert und im Umkehrschluss die Ceramid vermittelte Zellapoptose unterdrückt (Taha, Hannun, and Obeid 2006, S.113-131). Apoptose von Endothelzellen im dysfunktionalen Endothel spielt eine wichtige Rolle in der Atheroskleroseentwicklung. S1P wirkt aufgrund seiner steigernden Effekte auf die NO-Produktion antiapoptotisch und damit atheroprotektiv.

Auf Thrombozyten wirkt NO aus dem Endothel funktionshemmend (Gawaz, S.2). Diese Tatsache würde eine Plättchenfunktionshemmende Wirkung von S1P nahe legen. Andererseits haben Untersuchungen ergeben, dass extrazelluläres S1P, das während der Plättchenaktivierung aufgrund einer Stimulation des Stimuli-abhängigen ATP-Transporters durch Thrombin freigesetzt wird, eine Formveränderung von Plättchen induziert und die Aggregationsreaktion fördert (Yatomi et al. 1997, S.5291), (Karliner 2002, S.217). Plättchen spielen eine entscheidende Rolle im atherosklerotischen Geschehen, da sie eine der ersten Zellarten sind, die am dysfunktionalen Endothel bei der Atherosklerose adhären werden und Plättchenaktivierung außerdem zu Thrombosen in der fortgeschrittenen Atherosklerose, z.B. bei Plaqueruptur führen kann. Sie haben Bedeutung als S1P-Quelle, könnten aber auch Zielzellen für S1P sein.

Die jeweiligen Signalwege sind in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 1.6) noch einmal zusammengefasst.

1 Einleitung

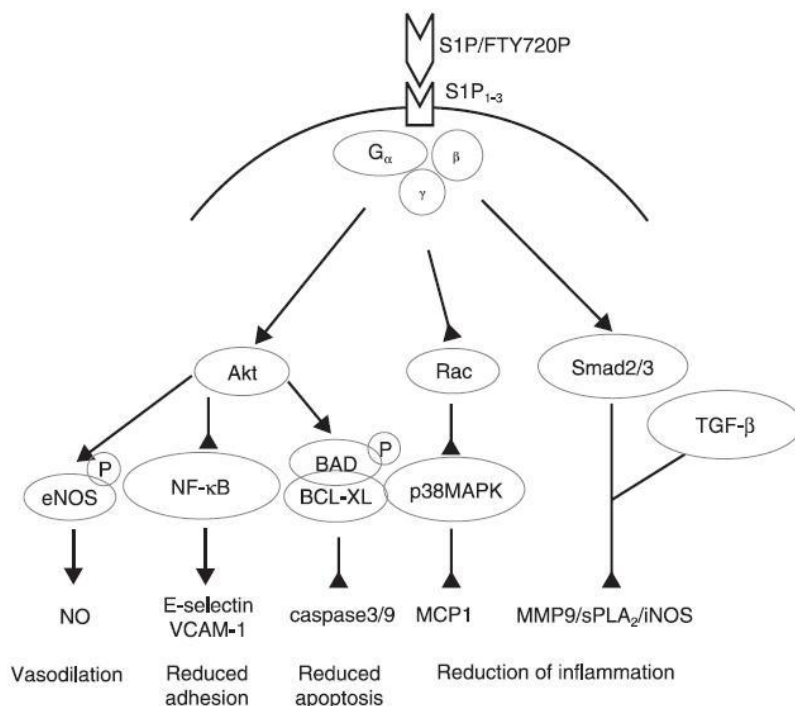


Abb. 1.6: Atherosklerose und S1P – bedeutende Signalwege (Tolle et al. 2007, S.176)

1.4.3 Modulatoren am S1P-Rezeptor

Um die komplexen Signalwege von S1P und den Sphingolipiden genauer zu erforschen, kann man entweder mit Hilfe von Knockout-Modellen den betreffenden Signalweg ausschalten (siehe 1.4.1.1) oder aber man stimuliert ihn gezielt durch S1P-Rezeptormodulatoren. Das sind Moleküle, die wie S1P selbst an allen oder einzelnen seiner Rezeptoren binden.

1.4.3.1 FTY720

FTY720, auch bekannt unter dem Namen Fingolimod, wurde schon in der traditionellen chinesischen Medizin eingesetzt. Es ist ein Abkömmling des Pilzes *Isaria sinclairii*, ein chemisches Derivat von Myriocin (Massberg and von Andrian 2006, S.1088-1089). Es wurde in der Neuzeit als Immunmodulator weiterentwickelt und befindet sich derzeit in der Erprobung in klinischen Phase II/III Studien in der Anwendung gegen Multiple Sklerose.

FTY720 wird von SK2 ca. 30mal effektiver als von SK1 zum aktiven FTY720-P phosphoryliert, LPP3 dephosphoryliert FTY720-P. Plättchen und Erythrozyten können FTY720 importieren, aber nur Plättchen können FTY720-P herstellen und ins Medium abgeben, wodurch Thrombozyten zur Hauptquelle von phosphoryliertem FTY720 im Plasma werden (siehe Abb. 1.4). (Yatomi 2008, S.606). Das hängt wahrscheinlich mit der fehlenden SK2-Aktivität der Erythrozyten zusammen. Die Freisetzung von FTY720-P aus Thrombozyten ist unabhängig

1 Einleitung

von der Plättchenaktivierung (Kihara and Igarashi 2008, S.500), (Anada, Igarashi, and Kihara 2007, S.107). Fingolimod bindet an alle S1P-Rezeptoren mit Ausnahme von S1P₂. FTY720-P verhindert die Auswanderung von Lymphozyten aus dem Thymus und aus sekundären lymphatischen Organen, was zu einer Verminderung der zirkulierenden Lymphozyten führt. Ob Fingolimod dabei als Agonist oder als Antagonist wirkt, wird derzeit noch diskutiert. Das Antagonistenmodell besagt, dass bei Einwirkung von FTY720-P der S1P₁-Rezeptor nicht wieder zur Zelloberfläche rezykliert wird, im Gegensatz dazu, wenn das einwirkende Agens S1P ist. So kommt es zu einem konsekutiven Verlust des S1P₁-Rezeptors und damit zur Desensibilisierung durch FTY720-P. Diese Erkenntnisse ergeben sich aus Experimenten mit S1P₁- bzw. SK1- Knockout Mäusen. Das Agonistenmodell basiert auf Beobachtungen, dass S1P₁ die Durchlässigkeit von lymphatischem Gewebe reguliert. Behandlung mit FTY720-P bewirkt in diesem Modell eine Aktivierung von S1P₁ und damit eine verstärkte Zell-Zell-Interaktion, was eine verminderte Durchlässigkeit für Lymphozyten zur Folge hat. Diese Erkenntnisse ergeben sich aus mikroanatomischen Analysen nach Behandlung mit FTY720 und dem selektiven S1P₁-Liganden SEW2871 (Kihara and Igarashi 2008, S.498). Seitdem S1P in den Fokus der Atheroskleroseforschung gerückt ist, werden auch die Möglichkeiten von FTY720 in dieser Hinsicht erprobt. So fand man z.B. heraus, dass FTY720-P eNOS via S1P₃ aktiviert und im Folgenden eine Vasorelaxation induziert (Tolle et al. 2005, S.917). Eine andere Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen einer Behandlung mit FTY720-P und reduzierten Atheroskleroseläsionen in der ApoE^{-/-}-Maus, einem Atherosklerosemodell (Keul et al. 2007, S.607-612).

1.4.3.2 SEW2871

SEW2871 ist ein selektiver S1P₁-Rezeptormodulator. Im Gegensatz zu FTY720 induziert SEW2871 keine Rezeptordownregulation, erreicht aber dennoch eine Immunsuppression. Dieser Befund gibt einen Hinweis auf eine agonistische Wirkungsweise (Kihara and Igarashi 2008, S.498). Auch der typische Nebeneffekt von FTY720, die Induktion von Bradykardien, fehlt bei SEW2871 (Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1894). Als Medikament wurde der S1P-Rezeptormodulator bisher in klinischen Studien bei akutem ischämischem Nierenversagen eingesetzt und verbesserte dort die Nierenfunktion um 40% (Lien et al. 2006). In einer anderen Studie konnte auch die antiinflammatorische Wirkung von SEW2871 nachgewiesen werden. In Gefäßen von Typ I Diabetikern zeigte sich eine Downregulation der VCAM1-Expression nach Behandlung mit SEW2871 (Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1896).

1.4.4 Klinischer Ausblick

Die Forschung rund um die Signalwege von S1P ist in den letzten Jahren stark vorangeschritten. Möglicherweise entwickelt man zukünftig spezifische Inhibitoren der S1P-Kinase, -

1 Einleitung

Phosphatase oder -Lyase, um die Konzentration des bioaktiven S1Ps zu beeinflussen (Levade et al. 2001, S.964). Auch Agonisten oder Antagonisten an S1P-Rezeptoren wären als Medikamente denkbar. Eines befindet sich bereits jetzt in klinischer Anwendung. Erwähnt sei hier noch einmal FTY720 als Beispiel für einen Immunmodulator, der vielleicht bald eine neue Option für Multiple Sklerose Patienten darstellen könnte. Aber auch Modulatoren am S1P-Rezeptor, die nicht das Immunsystem als Ziel haben, sind Objekt der Forschung. Die selektive Beeinflussung von im Gefäßsystem exprimierten S1P-Rezeptoren ist ein vielversprechender neuer Therapieansatz im Kampf gegen die Atherosklerose (Keul et al. 2007, S.607).

2 Zielsetzung

Die exakten Signalwege, die dem chronisch entzündlichen Prozess der Atherosklerose zugrunde liegen, sind nicht vollständig erforscht. Nach neuen Erkenntnissen spielen Thrombozyten sowohl in der Initiierung als auch dem Progress atherosklerotischer Läsionen eine entscheidende Rolle. Die Bedeutung von S1P und Sphingosinkinasen für die Thrombozytenfunktion sind nicht bekannt.

Es stellen sich somit folgende Aufgaben:

- Entwicklung eines Flusskammermodells, das durch minimalen Materialeinsatz die Verwendung von murinen Thrombozyten für die Experimente und ihre Betrachtung unter möglichst physiologischen, arteriellen Bedingungen erlaubt.
- Erprobung dieses neuen Modells mit Hilfe bereits etablierter Tests.
- Untersuchung der Bedeutung von S1P für die Thrombozytenadhäsion und mögliche Konsequenzen für die Atherogenese anhand des vorher etablierten Modells. Für diese Experimente werden Sphingosinkinase-Knockout-Mäuse und die S1P-Rezeptormodulatoren FTY720 und SEW2871 herangezogen.

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung der Zellsuspension zur Perfusion in der Flusskammer

3.1.1 HEPES-Tyrode's Puffer

Zur Präparation der Zellen wird HEPES-Tyrode's Puffer verwendet. Er wird zubereitet aus 0,1g BSA (A-8022 SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 0,1g D(+)-Glucose (G-8270 SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 10 ml 10fach konzentriertem Tyrodes und 90 ml Aqua destillata (A. dest.). Mit 1 ml HEPES wird sie auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Bei der Hälfte davon wird der pH-Wert mit HCl auf 6,5 gesenkt.

3.1.2 Isolierung von Thrombozyten aus murinem Vollblut

3.1.2.1 Versuchstiere

Die Maus bietet sich aus verschiedenen Gründen als Versuchstier an. Zum einen ist sie einfach in der Haltung sowie schnell in der Aufzucht neuer Generationen. Zum anderen stehen zahlreiche Knockout-Stämme zur Erforschung der Thrombozytenfunktion zur Verfügung.

Die verwendeten Tiere sind alle sechs bis zehn Wochen alt und männlichen Geschlechts.

3.1.2.1.1 Haltungsbedingungen

Um gute hygienische Bedingungen gewährleisten zu können werden die Mäuse in Gruppen von maximal sechs Tieren in leicht zu reinigenden bzw. desinfizierenden Käfigen vom Makrolon Typ II (Ehret GmbH, Emmendingen) untergebracht. Als Einstreu dient entkeimtes und entstaubtes Weichholzgranulat (Tiereinstreu Faser, Fa. Altromin, Lage), welches zweimal wöchentlich gewechselt wird. Die Temperatur im Käfig wird durch eine Klimaanlage bei 20 – 24°C, die Luftfeuchtigkeit bei 60 – 70 % konstant gehalten. Eine Beleuchtungsanlage sorgt dafür, dass die nachtaktiven, stressanfälligen Tiere einem geregelten zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt werden. In der Hell-Phase werden 50-100 Lux im Käfig erreicht. Allen Tieren steht jederzeit sterilisiertes Leitungswasser und pelletiertes Futter zur freien Verfügung. Damit die Tiere ihren Spiel- und Nestbautrieb befriedigen können, erhalten sie sterilisierten Zellstoff und Kriechröhrchen aus Pappe.

Das vorliegende Versuchsvorhaben ist von der Regierung von Oberbayern gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG. in der Fassung vom 18.05.2006) genehmigt.

3 Material und Methoden

3.1.2.1.2 Genetischer Hintergrund

3.1.2.1.2.1 Kontrollstämme

Es gibt verschiedene genetische Stämme in der Mäusezucht. Ein sehr verbreiteter Wildtypstamm ist C57Bl/6J, der auch bei den meisten vorliegenden Versuchen als Kontrollstamm verwendet wird, da er den genetischen Hintergrund für die Knock-out-Stämme GPIIb^{-/-} und SK1^{-/-} bildet.

Als Kontrollgruppe für die Knockout-Stämme SK1^{-/-} und SK2^{-/-} werden jeweils eigene WT-Stämme benutzt. Sie bestehen aus Rückzüchtungen aus dem Knockout-Stamm. Dazu wird SK1^{-/-} mit C57Bl/6J zu SK1^{+/+} und SK2^{-/-} mit Balb/c zu SK2^{+/+} zurückgekreuzt.

3.1.2.1.2.2 Knockout-Stämme

GPIIb^{-/-}

Knockout-Mäuse sind Tiere, bei denen durch gezielte genetische Manipulationen ein Gen oder mehrere Gene gezielt abgeschaltet werden. Die GPIIb^{-/-}-Maus entbehrt den GPIIb/IIIa-Rezeptor auf Thrombozyten. Erstmals im Labor von Jonathan Frampton gezüchtet, dient der GPIIb Knockout-Stamm seither als wichtiges Modell in der Erforschung der Thrombozytenfunktion. Die Rolle des Integrins GPIIb/IIIa in der Hämostase konnte so weiter spezifiziert werden. Die Mäuse sind auf dem genetischen Hintergrund von C57Bl/6J gezüchtet. Die homozygoten Tiere sind lebensfähig und fertil, obwohl die Blutplättchen durch den fehlenden Fibrinogenrezeptor dysfunktional sind und es gelegentlich zu Anämien aufgrund einer erhöhten Blutungsneigung kommt (Emambokus and Frampton 2003, S.35-36).

SK1^{-/-}

SK1^{-/-} Mäusen fehlt aufgrund genetischer Manipulationen das Gen für die Sphingosinkinase 1. Dieses Enzym ist im Stoffwechsel der Sphingolipide zu einem wesentlichen Anteil beteiligt an der Umsetzung von Sphingosin zu S1P. Beobachtungen über eine Reduktion der S1P-Level um mehr als 50% im Serum von SK1-defizienten Tieren verwundern deshalb nicht. Im Gewebe jedoch sinkt die Konzentration von S1P nicht, so dass auch noch andere Mechanismen der S1P-Produktion vermutet werden müssen (Allende et al. 2004, S.52487-52491). Die Tiere sind eine Züchtung auf dem genetischen Hintergrund von C57Bl/6J. Sie sind lebensfähig und fertil und haben einen unauffälligen Phänotyp.

SK2^{-/-}

Um die Mechanismen des S1P-Metabolismus noch besser erforschen zu können, erscheint es sinnvoll auch die Wirkung einer fehlenden Sphingosinkinase 2 auf den Organismus zu untersuchen. Die SK2^{-/-} Mäuse zeigen eine stark reduzierte SK-Aktivität in von der SK2 favo-

3 Material und Methoden

risierten Bedingungen, keinen Unterschied aber zu Wildtypen in von der SK1 favorisierten Bedingungen. Im Gegensatz zur SK1^{-/-} Maus findet sich im Serum der SK2^{-/-} Tiere eine nur um 25% reduzierte S1P-Konzentration. Interessanterweise phosphoryliert SK2 FTY720 ca. 30mal effektiver als SK1. In der SK2^{-/-} Maus konnte deshalb konsequenterweise keine Lymphopenie durch FTY720 induziert werden (Zemann et al. 2006, S.1456-1457).

SK2^{-/-} sind auf Balb/c-Hintergrund gezüchtet. Die Tiere haben einen unauffälligen Phänotyp, sie sind lebensfähig und fertil.

Alle Tiere, die für die Experimente verwendet werden, sind entweder kommerziell erworben (Charles River Laboratories, www.criver.com), oder Nachkommen aus der eigenen Zucht.

3.1.2.2 Prämedikation

Für einige Versuche ist es nötig die Tiere vor der Blutentnahme mit einem der verschiedenen S1P-Rezeptormodulator vorzubehandeln. Dies geschieht mittels intraperitonealer Injektion fünf Stunden vor der Blutentnahme. Dazu wird die Maus kurz inhalativ mit Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Dreieich; Verdampfer: Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen, eingerichtet von Völker Vet, Völker GmbH, Kaltenkirchen) betäubt. Anschließend wird der jeweilige S1P-Rezeptormodulator, FTY720 oder SEW2871, bzw. das Vehikel DMSO allein mit Hilfe einer feinen Injektionskanüle in den rechten unteren Quadranten unter das Bauchfell gespritzt. Nach Abfluten des Inhalationsgases erwachen die Tiere sehr rasch aus der Narkose. Bis zur Blutentnahme werden die normalerweise unauffälligen Tiere beobachtet.

3.1.2.3 Blutentnahme

Vor der Blutgewinnung wird die Maus durch Inhalationsanästhesie mittels Isofluran (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Dreieich; Verdampfer: Ohmeda Isotec 3, Fa. Eickmeyer, Tuttlingen, eingerichtet von Völker Vet, Völker GmbH, Kaltenkirchen) betäubt. Die Blutentnahme erfolgt dann am narkotisierten Tier durch kardiale Punktion. Dazu wird das Fell über dem Sternum mit einer Schere eröffnet und der Thorax freipräpariert. Mit einer 26 Gx1/2"-Kanüle (0,45 mm x 13 mm) auf einer 2 ml Spritze wird das Herz transthorakal vorsichtig punktiert. Der Einstich erfolgt senkrecht links parasternal in der Mitte des Sternums (Abb. 3.1). Es ist darauf zu achten, dass man dem Herzmuskel beim Einstich keine größere Verletzung zufügt, da dieser reich an dem Plättchen aktivierenden tissue factor ist (Jirouskova, Shet, and Johnson 2007, S.661-669). Mit dieser Technik kann man etwa 0,8 - 1 ml Vollblut, entsprechend 85 – 95 ml/kg Körpergewicht, gewinnen (Riches et al. 1973, S.281). Es wird mit 0,3 ml Acid-Citrat-Dextrose (ACD) antikoaguliert. ACD besteht aus 85 mM Na₃-Citrat (S-4641 SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 64,9 mM Citronensäure

3 Material und Methoden

(C-7129 SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 111 mM Glucose (G-8270 SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in A. dest., hat einen pH-Wert von 4,69 und ist sterilfiltriert. Nach der Blutentnahme wird das Tier euthanasiert.

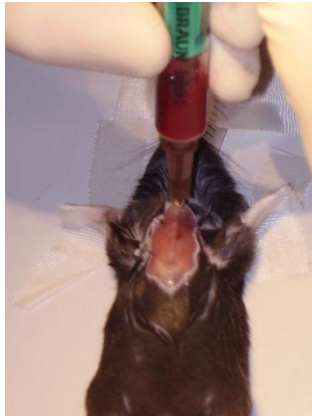


Abb. 3.1: Blutentnahme bei der Maus durch kardiale Punktion

3.1.2.4 Thrombozytenpräparation

Sämtliche Schritte zur Isolation der Blutplättchen werden mit größter Sorgfalt und unter möglichst physiologischen Bedingungen durchgeführt um eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Die nachstehend beschriebene Präparation ist, wenn sachgemäß durchgeführt, ein schonendes Verfahren um Plättchen zu isolieren ohne sie zu aktivieren und zur Aggregation zu bringen (Vassallo and Murphy 2006, S.323-330) (Massberg et al. 1998, S.27-29). Das antikoagulierte Vollblut wird von der 2 ml Spritze vorsichtig in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt, mit Hapes-Tyrode's Puffer pH 6,5 auf ein Volumen von 2 ml aufgefüllt und 20 Minuten bei 700 rpm, entsprechend 92g, ohne Bremse zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0). Das dadurch gewonnene plättchenreiche Plasma (PRP) wird mit Hilfe einer 3 ml Transferpipette vorsichtig abpipettiert, wiederum in ein 5 ml Rundbodenröhrchen überführt und mit Hapes-Tyrode's Puffer pH 6,5 auf ein Gesamtvolumen von 4 ml aufgefüllt. Dieser Lösung setzt man 20 µl CFDA-SE - ein Fluoreszenzfarbstoff für die unter 3.3 beschriebene Fluoreszenzmikroskopie - in einer Konzentration von 250 µg/ml zu und inkubiert sie für zwei Minuten im Dunkeln, bevor sie für zehn Minuten bei 2600 rpm, entsprechend 1268g, mit Bremse (Heraeus Megafuge 1.0) zentrifugiert wird. Nach Absaugen des Überstands kann man das entstandene Thrombozyten-Pellet in 500 µl Hapes-Tyrode's Puffer pH 6,5 vorsichtig resuspendieren und bis zum Gebrauch dunkel lagern.

3 Material und Methoden

3.1.3 Gewinnung humaner Erythrozyten

3.1.3.1 Blutspender

Durch Punktion einer Cubitalvene wird gesunden menschlichen Blutspendern mit Hilfe eines Butterfly Venenkatheters Vollblut entnommen. Das für einen Versuch benötigte Gesamtvolumen von 17 ml wird in zwei 8,5 ml fassende Monovetten abgenommen, die bereits 1 ml CPDA zur Antikoagulation enthalten.

3.1.3.2 Erythrozytenisolation

In ein 50 ml Falcon werden 17 ml Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB) im Verhältnis 1:1 zum Vollblut vorgelegt. Darauf wird vorsichtig in einer Schicht das eben gewonnene Vollblut pipettiert. Anschließend wird der Ansatz bei 2000 rpm (600g) für 16 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Dadurch entsteht der charakteristische Ficoll-Gradient (Abb. 3.2), durch den sich verschiedene Zellpopulationen voneinander separieren lassen.



Abb. 3.2: Ficoll-Gradient (GE)

In diesem Fall sind nur die Erythrozyten von Interesse, die nach der Zentrifugation die unterste Schicht bilden. Die darüber liegenden Schichten werden also ab präpariert, so dass die roten Blutkörperchen am Boden übrig bleiben. Die Reinheit und der Ausgangshämatokrit werden jedes Mal mit dem Zellzählgerät Sysmex® überprüft.

3.1.4 Perfusionslösung

Zur Perfusion durch die Flusskammer kommt eine standardisierte Zellsuspension. Hapes Tyrodes Puffer pH 7,4 wird mit oben beschriebenem Erythrozytenkonzentrat in der Weise gemischt, dass sich ein Hämatokrit von 35% und ein Gesamtvolumen von 3 ml ergibt. Dazu pipettiert man unmittelbar vor der Perfusion vorsichtig 1×10^7 Thrombozyten pro ml Pufferlösung. Um die Blutplättchen reaktionsfähig zu machen, muss Calcium und Magnesium vorhanden sein. Diese Kofaktoren werden jeweils in einer Konzentration von 1 Millimol pro Liter in Form von CaCl_2 und MgCl_2 zugegeben.

3.2 Flusskammersystem

3.2.1 Flusskammer

Die so hergestellte Perfusionslösung wird zur Beobachtung der Thrombozytenadhäsion durch eine Flusskammer perfundiert. Dies ist eine sehr gute Möglichkeit um Zellen unter möglichst physiologischen Bedingungen zu beobachten. Für die Versuche kommt das *ibidi μ-slide VI* zur Anwendung (Abb. 3.3). Das ist eine Kunststoffplatte, die sechs kleine, durchsichtige Einwegkammern mit ähnlichen optischen Eigenschaften wie Glas enthält. Sie ist damit sehr gut zur mikroskopischen Betrachtung von Zellen geeignet.

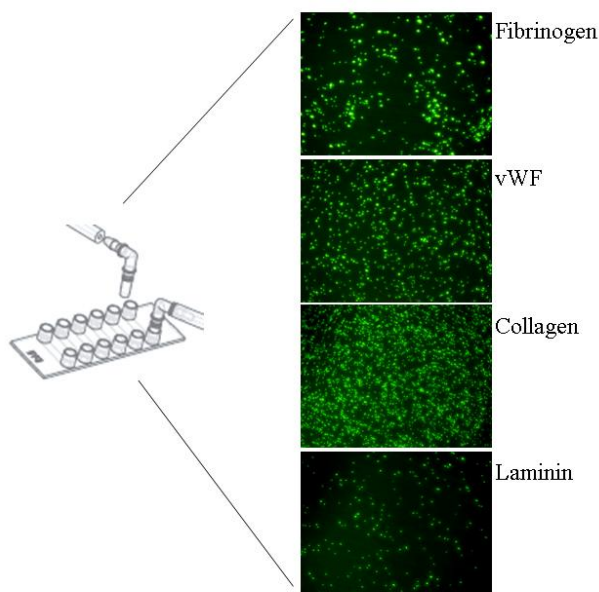


Abb. 3.3: *ibidi μ-slide VI*; Thrombozytenadhäsion auf unterschiedlich beschichteten Oberflächen (*ibidi GmbH*)

Die Abmessungen der Kammer sind sehr klein ($h \times b \times l = 0,4\text{mm} \times 3,8\text{mm} \times 17\text{mm}$), so dass das Fassungsvermögen von 30 μl pro Kanal – entsprechend einem Tropfen Blut - sehr gering ist. Dies stellt einen enormen Vorteil für die Arbeit mit murinen Thrombozyten dar, wo Material sehr begrenzt ist.

3.2.2 Beschichtung der Kammeroberfläche

Die unbeschichteten Kammern werden steril verpackt geliefert und können nach Bedarf mit Proteinen beschichtet werden. Diese haften sich am hydrophoben Kammerboden an und werden so den Blutplättchen bei der Perfusion präsentiert; es entsteht das für das jeweilige Protein charakteristische Adhäsionsmuster (Abb. 3.3).

3 Material und Methoden

Für die Versuche werden Kanäle mit folgenden Beschichtungen benötigt, sie werden nach dem jeweils angegebenen Protokoll beschichtet:

Protein	verdünnt in	gewaschen mit
rCollagenI, 40µg/ml	Eisessig	PBS
mLaminin, 40µg/ml	PBS	Aqua dest.
mFibrinogen, 10µg/ml	Hepes-Tyrode's Puffer, ph 7,4	Hepes-Tyrode's Puffer, ph 7,4
hvwf, 40µg/ml	Aqua dest.	Aqua dest.

Abb. 3.4: Protokoll zur Beschichtung der ibidi Kammern (rCollagenI = Collagen Typ I, Rat Tail 3,48 mg/ml, BD Biosciences, Two Oak Park, Bedford; mLaminin = mouse Laminin, mg/ml. #23017-015, Invitrogen; mFibrinogen = mouse Fibrinogen, 1mg/ml, # F4385, Sigma; hvwf = human von Willebrand Faktor, 1mg/ml, #681300, Calbiochem)

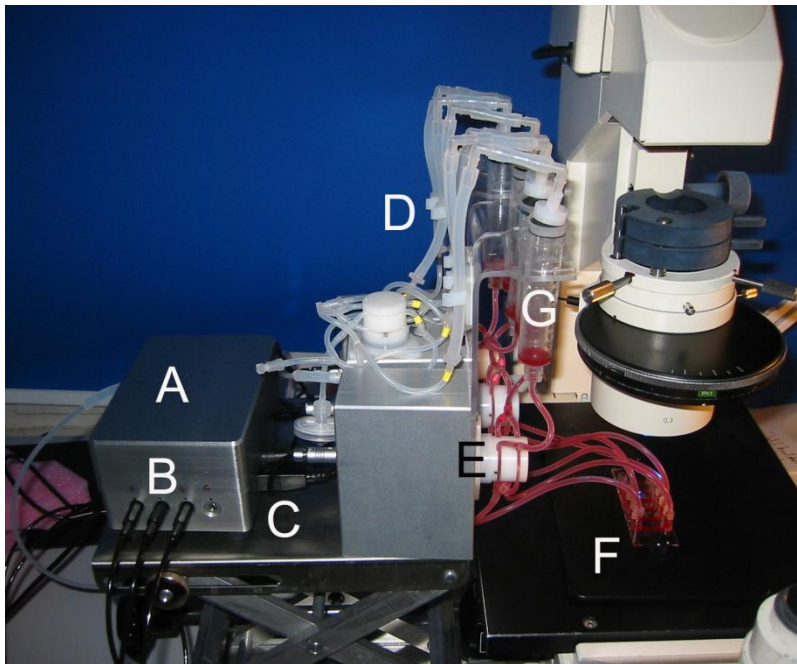
Laminin dient dabei als Kontrolloberfläche, die keine spezifische Thrombozytenadhäsion erzeugt.

Die jeweiligen Verdünnungsfaktoren, Verdünnungs- und Waschmittel wurden durch zahlreiche Testversuche, Erfahrungen anderer Labore (Kulkarni et al. 2004, S.177) und durch Empfehlungen der Kammer- und Proteinhersteller erarbeitet.

Übereinstimmend mit dem von Ibidi erstellten Protokoll zur Beschichtung der Kammern, werden alle Kanäle unter der Sterilbank mit 30 µl der gewünschten Proteinlösung beschickt und für 40 min inkubiert. Anschließend wird die Flüssigkeit abgesaugt und mit 200 µl der zugehörigen Spüllösung gereinigt, die sofort wieder abgesaugt wird. Nach einer kurzen Trockenphase sind die Kammern bereit zur Perfusion (Horn 2007).

3 Material und Methoden

3.2.3 Flusskammer und Pumpsystem



Kontrolleinheit

- A: Pumpe
- B: Ventilsteuerungseinheit
- C: USB-Kabel
- D: Luftschläuche

Flusseinheit

- E: Ventile
- F: μ -slide in der Halterung
- G: Reservoir

Abb. 3.5: *ibidi Pump-System auf Zeiss® Axiovert 100*

Dazu wird das Slide in eine Halterung montiert (Abb. 3.5). Diese dient erstens der Stabilisierung, so dass die Platte mit den sechs Kammern nicht kippt, wenn das Flusskit angeschlossen wird. Zweitens hat das Plättchen nur die Größe eines Objektträgers und ist damit zu klein für die Apertur des Mikroskops, so dass es beim Betrachten der Zellen ständig verrutschen würde. Die Halterung wurde aus eloxiertem Aluminium maßgefertigt (Fa. K. Karbach GmbH, 85579 Neubiberg).

Das *ibidi*-Perfusions-System besteht aus zwei Einheiten: der Kontroll-Einheit und der Fluss-Einheit.

Die Kontrolleinheit ist eine Computer-kontrollierte Luftdruckpumpe. Durch Luftdruck, der von oben über einen Schlauch im Deckel des Reservoirs appliziert wird, wird die Flüssigkeit im Behälter und somit im gesamten nachgeschalteten System bewegt (Abb. 3.6). Durch diese Art der Flusserzeugung wird der mechanische Stress, der auf die Zellen einwirkt und sie vorzeitig aktivieren könnte, minimiert. Es wird wechselseitig negativer Luftdruck auf die Perfusionsflüssigkeit ausgeübt. Die zugehörige Software *Suction Control* (Abb. 3.7) steuert den Phasenwechsel des Luftdrucks und das gleichzeitige Schalten des Ventils, damit die Flussrichtung in der Kammer konstant bleibt, während sie sich in den Behältern ändert. So lassen sich bis zu drei Kammern parallel perfundieren.

3 Material und Methoden

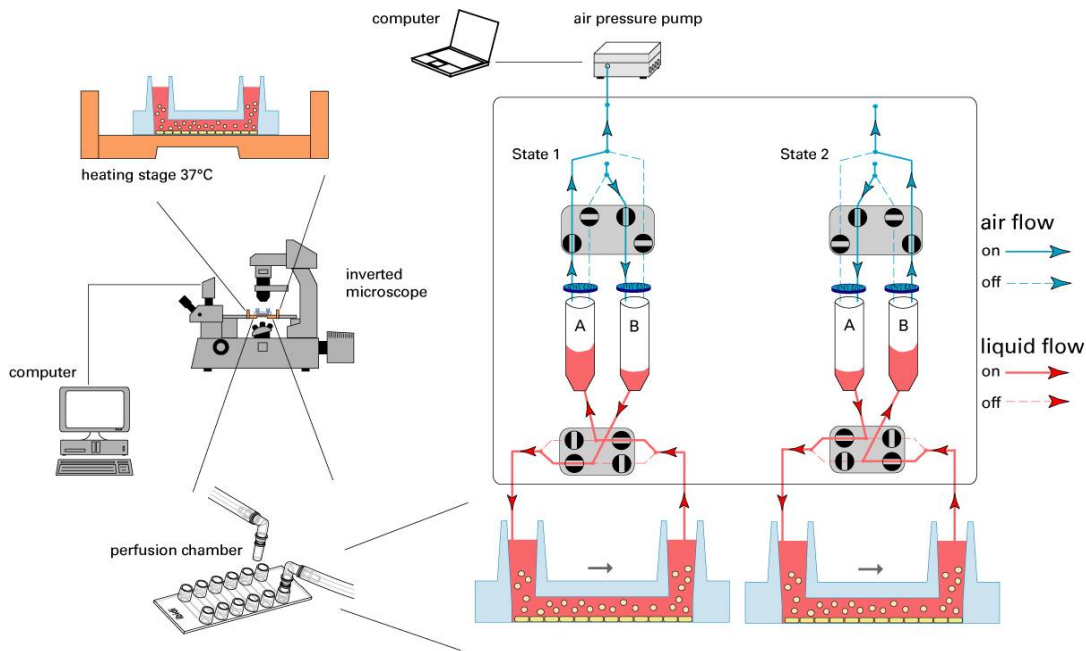


Abb. 3.6: ibidi Pumpsystem – Flussrichtung und Ventilschaltung (Quelle: (Ibidi_GmbH))

Die Fluss-Einheit enthält pro perfundierter Kammer zwei Reservoirs inklusive Halterung, die Schläuche und die dafür nötigen Verbindungsstücke. Der Zu- und Abfluss aus der Kammer wird über einen geknickten Adapter (Elbow Male Luer: LE7230-6, Value Plastics Inc., www.valueplastics.com, 1/8", 3,2 mm ID Tubing, natural Polypropylene, # 12457) mit den Silikonschläuchen (Tygon 3350, Silicone, 1/16 x 1/8) verbunden, die die Perfusionslösung zu den beiden Reservoiren (15 ml Falcon, BD Biosciences) pumpen. So werden die beiden Behälter immer abwechselnd voll- und leergepumpt. Damit die Flussrichtung im Kanal sich dadurch nicht bei jedem Phasenwechsel ändert, ist ein Ventil zwischengeschaltet, das die Fließrichtung konstant hält. Dafür zweigt sich das Schlauchsystem vor dem Ventil auf (Y-Stecker: Y 420-6, Value Plastics Inc., www.valueplastics.com, 3/32", 2,4 mm ID Tubing, natural Polypropylene, # 12649) und wird hinterher wieder zusammen geführt (siehe Abb. 3.6).

3.2.4 Rheologie

Üblicherweise errechnet man die Scherrate in einer Flusskammer nach folgender Formel (Kulkarni et al. 2004, S.166):

$$Q(\text{ml} / \text{s}) = \frac{h(\text{cm})^2 \cdot b(\text{cm}) \cdot \gamma(1 / \text{s})}{6}$$

Es ist allerdings zu beachten, dass diese Formel nur für Newton'sche Flüssigkeiten gilt. Die im Versuch verwendete Flüssigkeit entspricht diesen Kriterien nicht, die Formel ist folglich

3 Material und Methoden

nicht anwendbar. In diesem Fall wird der verwendete Perfusionsdruck von 1,5 mbar abgeleitet von der Flussgeschwindigkeit der Plättchen im Zentralstrom bei *in vivo* Versuchen mit Mäusen. Die Flussrate wird so eingestellt, dass sich die im Strom befindlichen Plättchen mit ähnlicher Geschwindigkeit bewegen wie in den *in vivo* Versuchen.

3.2.5 Perfusionszyklus

Die Pumpeinheit ist über ein USB-Kabel mit einem Computer verbunden. Über die Steuerungssoftware *Suction Control* werden die Pumpe und die Ventile angesteuert und geregelt. Im *Scheduler*, einer Art Zeittafel für die Pumpe, legt man fest, wie die Ventile geschaltet werden, welcher Druck von der Pumpe aufgebaut werden soll und wann bzw. in welchen Abständen die Zyklusphase von "negativer Druck auf den einen Behälter" zu "negativer Druck auf den anderen Behälter" wechselt. In Abb. 3.7 ist das Programm für die Versuche abgebildet. Die Ventile sind wechselweise an bzw. abgeschaltet, was für eine konstante Flussrichtung sorgt. Die erste Spalte ist die Zeitleiste. Es beginnt zum Zeitpunkt 0. Der Phasenwechsel zwischen Drücken und Saugen findet alle 20 Sekunden statt. In Spalte 2 wird der in Spalte 3 zu regelnde Parameter genannt, d.h. entweder Druck (p1) oder Ventile (v1 bzw. v2), die in Spalte 3 mit true bzw. false an- und abgeschaltet werden. Der erwünschte Druck beträgt -1,5 mbar, wie aus Spalte 3 ersichtlich ist. Für die Erzeugung von Unterdruck ist die Einstellung von höheren Werten erforderlich, da das Gerät mit einem Fehler von ca. 10% laut Angaben des Herstellers stärker drückt als saugt. Nach eigenen Erfahrungen ist dieser Fehler bei dem geringen Druckniveau aber noch höher. Nebem dem voreingestellten Druckniveau sieht man auf der unteren Skala immer das aktuelle Druckniveau. So ist es leicht möglich die Einstellung anzupassen.

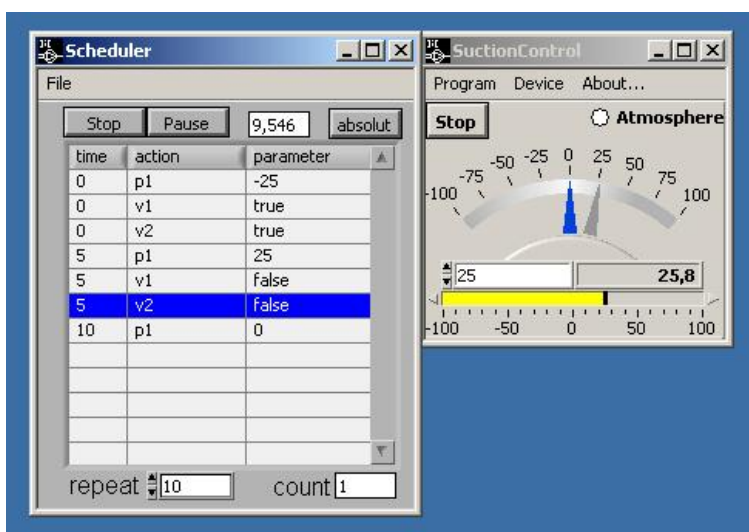


Abb. 3.7: Steuerungssoftware *Suction Control* mit *Scheduler* (Ibidi_GmbH). Links 25 mbar eingestellter Druck, rechts 25,8 mbar tatsächlicher Druck

3 Material und Methoden

3.2.6 Versuchsablauf

Die Perfusionsflüssigkeit wird in ein Reservoir vorgelegt. Anschließend werden die Reservoirs luftdicht verschlossen und mit der Luftzufuhr der Pumpe verbunden. Die Perfusion beginnt dann umgehend mit einer höherbarigen Startsequenz, die dazu dient sämtliche Luftblasen aus dem System zu entfernen, um einen reibungslosen Fluss bei dem später niedrigeren Druck zu gewährleisten. Diese Startsequenz dauert 5 x 5 Sekunden bei 25 mbar. Es schließt sich das oben beschriebene Versuchsprotokoll unmittelbar an. Dieser Zyklus wird so lange wiederholt bis der Versuch abgeschlossen ist. Ist die Perfusion beendet muss das Flusskit vor der nächsten Anwendung gründlich gereinigt werden. Das kann auf zwei Arten geschehen. Entweder man spült die Schläuche mit Hilfe einer Clean-Sequenz, nachdem man das Perfundat abgesaugt hat, oder man entfernt die Schläuche und wäscht sie mit verdünnter SDS-Lösung und Wasser. Nach der Reinigung steht das System zur erneuten Perfusion zur Verfügung.

3.3 Fluoreszenzmikroskopie

Da murine Thrombozyten mit einem mittleren korpuskulären Volumen (MCV) von 4,7 fl (Jirouskova, Shet, and Johnson 2007) im Gegensatz zu humanen Thrombozyten mit einem MCV von 7,5 – 10 fl deutlich kleiner sind und zusätzlich durch die Überlagerung durch die zugegebenen Erythrozyten die mikroskopische Betrachtung der Blutplättchen sehr erschwert ist, bedient man sich zur Verbesserung der Bildqualität der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung. Dazu werden die Thrombozyten wie unter 3.1.2.4 beschrieben, während der Präparation mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE markiert.

3.3.1 Technisches Prinzip

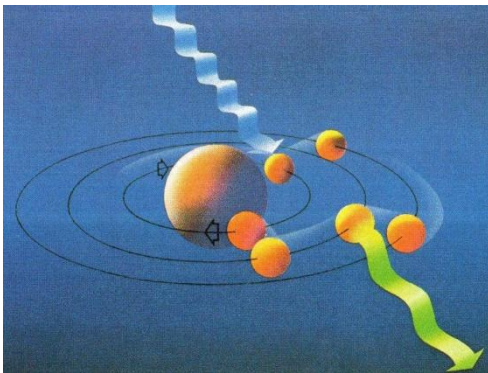


Abb. 3.8: Entstehung von Fluoreszenz (Becker).

Unter Fluoreszenz versteht man die Fähigkeit mancher Atome Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und Licht einer anderen, größeren Wellenlänge zu emittieren (Becker, S.5; Herman, S.1). Während der Anregung wird ein Elektron auf ein höheres Energieniveau gehoben. Von dort fällt es jedoch unter Aussendung des für das Fluorochrom charakteristischen Fluoreszenzlichtes sofort wieder auf seine ursprüngliche Elektronenschale zurück. Dabei geht ein kleiner Teil der Energie verloren. Das emittierte Licht hat eine niedrigere Energie als das absorbierte Licht, ist also länger wellig. Dieses Phänomen, das entscheidend ist um die Fluoreszenz als Technologie gezielt einsetzen zu können, nennt man Stokes' Shift (Herman, S.5). Für jeden Fluorophor existiert ein typisches Absorptions- und Emissionsspektrum, anhand dessen die Photonen mithilfe geeigneter Filter detektiert werden können.

3 Material und Methoden

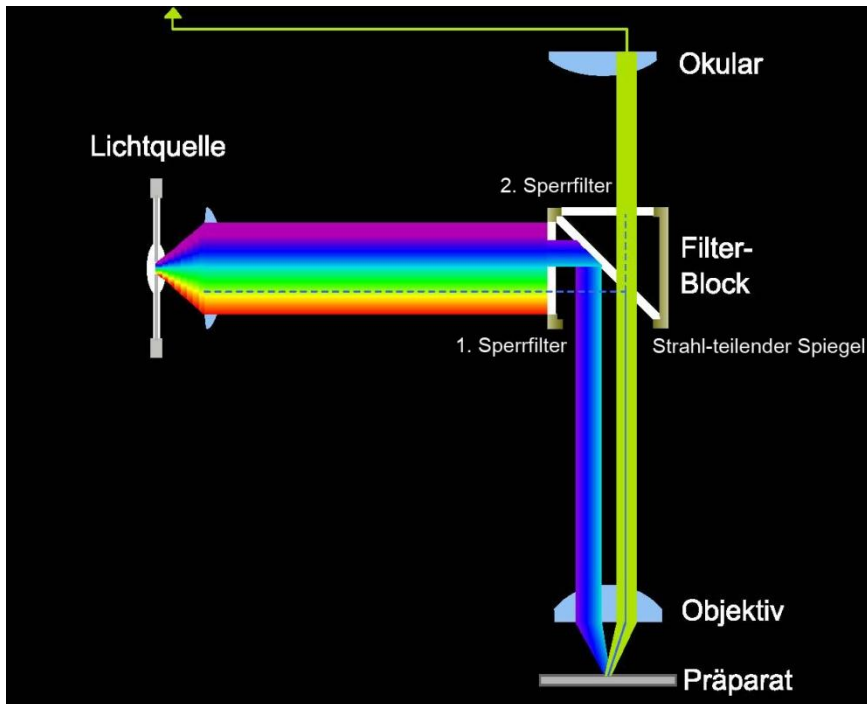


Abb. 3.9: Strahlengang im Fluoreszenzmikroskop (modifiziert aus (www.mikroskopie.de))

In der modernen Fluoreszenzmikroskopie werden Auflichtmikroskope anstelle der früher gebräuchlichen Durchlichtmikroskope verwendet. Dieses Experiment wird mit dem inversen Auflichtmikroskop *Axiovert 100* (Carl Zeiss AG, Oberkochen) durchgeführt. Als Lichtquelle dient eine 50 Hz Quecksilberdampfdrucklampe. In Abb. 3.9 ist der Strahlengang in einem Fluoreszenzmikroskop dargestellt. Von der Lichtquelle wird Licht in einem breiten Spektrum emittiert. Der erste Sperrfilter lässt nur Licht im Bereich der Anregungswellenlänge passieren, in diesem Fall Blaulicht. Der strahlteilende Spiegel im Inneren des Filterblocks reflektiert Licht unterhalb einer bestimmten Wellenlänge nach unten und lässt Licht mit höheren Wellenlängen durch. So wird das blaue Licht nach unten zum Präparat gelenkt und regt dort das Fluorochrom zu einem grünlichen Leuchten an. Das grüne Licht wird vom strahlteilenden Spiegel durch gelassen und gelangt zum zweiten Sperrfilter, der alle eventuell vorhandenen unerwünschten Wellenlängen herausfiltert. In 20facher Vergrößerung erkennt man die Thrombozyten als grünlich leuchtende Spots auf dunklem Hintergrund.

Um die Bilder später objektiv auswerten zu können werden sie mit Hilfe der Kamera *Axiocam Color* (Carl Zeiss AG, Oberkochen), die auf das dafür vorgesehene Kameraokular aufgesetzt werden kann, ab fotografiert und mit Hilfe der zugehörigen Software *Axio Vision 3.1* gespeichert.

3 Material und Methoden

3.3.2 Das Fluorochrom 5(6)- Carboxyfluorescein diacetate - succinimidyl ester

Der Fluoreszenzfarbstoff CFDA-SE (Abb. 3.10) (C-1157, Molecular Probes, Inc., Eugene, USA) ist ein Xanthen-Derivat, das in seiner diacetylierten Form noch keine fluoreszierenden Eigenschaften zeigt. Als lipophiles Molekül ist es fähig passiv Membranen zu überwinden und entlang dem Konzentrationsgefälle in die Zelle zu diffundieren.

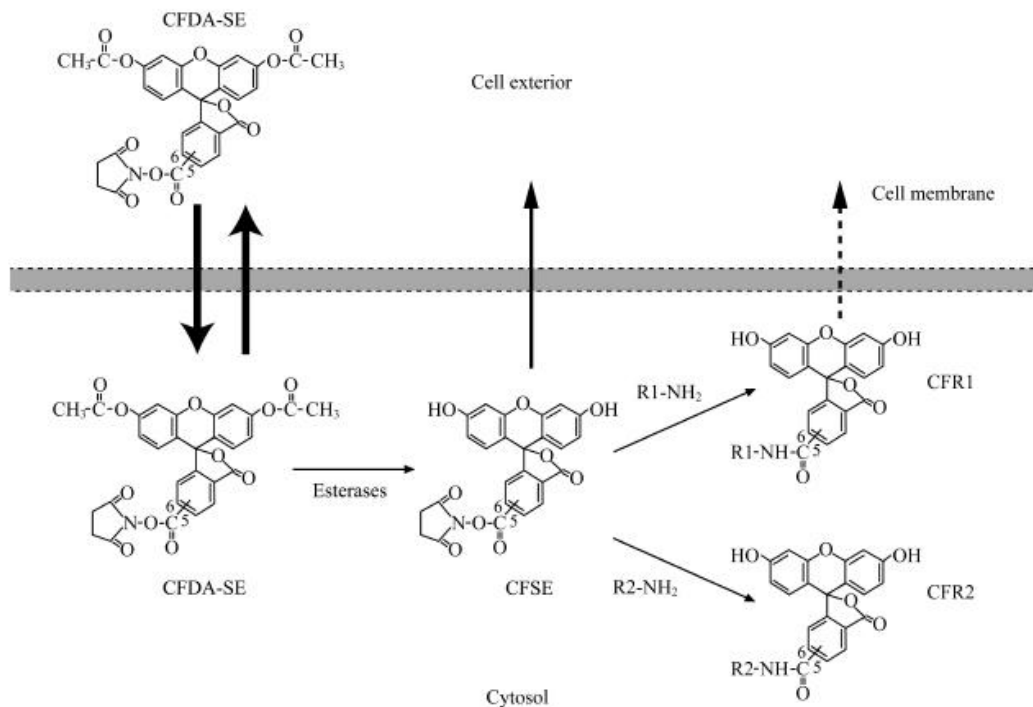


Abb. 3.10: CFDA-SE – Strukturformel und Reaktionen in der Zelle (Wang et al. 2005)

Dort wird es durch intrazelluläre Esterasen deacetyliert (Afri, Frimer, and Cohen 2004, S.124; Wang et al. 2005, S.379-380). Es entsteht das anionische CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester), welches stark grünlich fluoreszierendes Licht abgibt. CFSE bindet über die Succinimidyl-Ester-Gruppe kovalent an Proteine und ist damit in der Zelle gefangen (Wang et al. 2005, S.379). Laut Wang ist CFDA-SE weder toxisch noch beeinflusst es die Lebensfähigkeit der markierten Zellen (Wang et al. 2005, S.383-384).

3 Material und Methoden

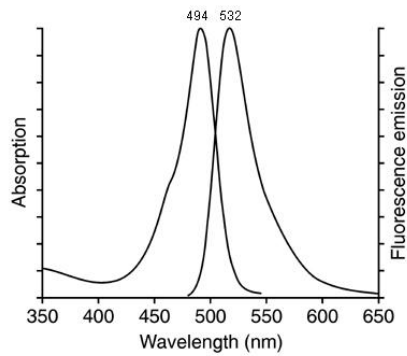


Abb. 3.11: Fluoreszenzspektrum für CFDA-SE (nach (Fluorophores.org))

Auch aufgrund seiner optischen Eigenschaften eignet sich CFDA-SE sehr gut als Zellmarker. Mit einem Absorptionsmaximum $\lambda_1 = 494$ nm und einem Emissionsmaximum $\lambda_2 = 522$ nm (Abb. 3.11), wird der Fluorophor demnach im Bereich von blauem Licht angeregt und emittiert Licht im grünen Bereich. Durch dunkle Lagerung und möglichst kurze Belichtungszeiten schützt man das Fluorochrom vor vorzeitigem Ausbleichen, das heißt frühzeitigem Verlust seiner fluoreszierenden Eigenschaften. Deswegen werden die Thrombozyten, sobald sie mit CFDA-SE gefärbt sind, in einem UV-dichten, braunen Eppendorfgefäß gelagert. Der Strahlengang im Mikroskop wird nur zur unmittelbaren Betrachtung der Zellen geöffnet, um eine unnötige Bestrahlung zu vermeiden.

3.4 Dokumentation

An jedem Versuchstag werden Thrombozyten in Perfusionslösung durch die vier verschiedenen vorbeschichteten Kammern perfundiert. Es werden jeweils zunächst drei Kammern perfundiert. Nach fünf Minuten und nach zehn Minuten Perfusion wird die Plättchenadhäsion unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der Kamera *Axio cam Color* (Carl Zeiss AG, Oberkochen) festgehalten. Die Aufnahmen werden immer nach demselben Schema in genau definierter Reihenfolge gemacht, um einem systematischen Fehler aufgrund zeitlicher Verzögerung vorzubeugen. Es werden an repräsentativen Kammerabschnitten vier Fotos von jeder Kammer gemacht. Anschließend wird die vierte Kammer nach dem gleichen Schema perfundiert. Es hat sich als praktikabel erwiesen Versuche mit zwei Mäusen parallel durchzuführen. Es ergeben sich dann drei Perfusionszyklen: in den ersten beiden Zyklen drei zu perfundierende Kammern, im dritten Zyklus zwei zu perfundierende Kammern. Die Fotos werden mit der Bildanalyse-Software *CapImage* (Ingenieurbüro Dr. Zeintl) ausgewertet (Abb. 3.12). Maßzahl für die Adhäsion der Thrombozyten ist die Fläche, die diese auf dem Bildausschnitt einnehmen. Diese Fläche in Mikrometern kann das Programm berechnen. Für jede Kammer werden alle verfügbaren Bilder eines Perfusionsdurchgangs ausgewertet, der Mittelwert der so errechneten Fläche ergibt den Ausgangswert für weitere Analysen.

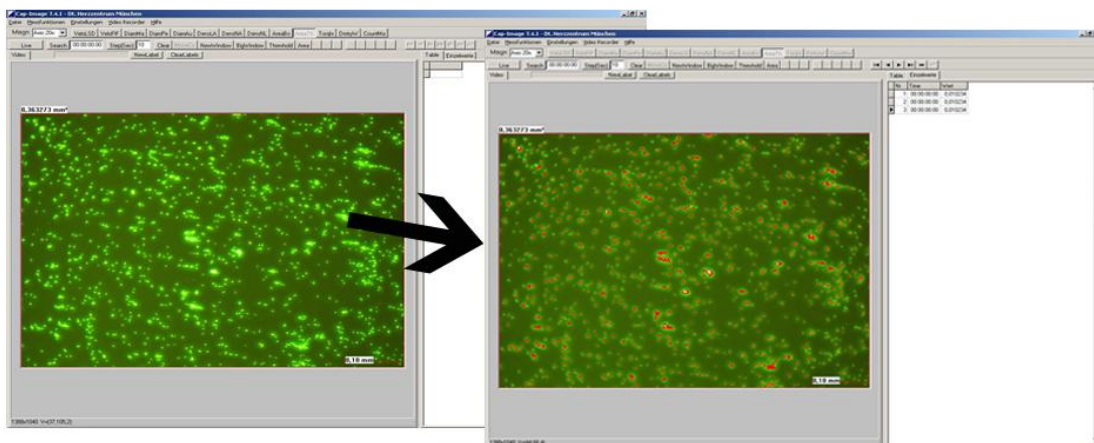


Abb. 3.12: Berechnung der Fläche der adhärennten Thrombozyten mit *CapImage*®.

3.5 Experimentelle Gruppen

3.5.1 Modelletablierung: Prüfung der Spezifität der Thrombozytenadhäsion

Nach Ausräumung aller technischer Schwierigkeiten, die eine schonende Präparation der Zellen, eine suffiziente Beschichtung der Oberflächen, ein störungsfreies Setup der Pumpe, möglichst physiologische hämodynamische Einstellungen sowie einen möglichst reibungslosen Versuchsablauf betreffen, ist vor Aufnahme der eigentlichen Versuche eine Evaluation der neu eingeführten Methode nötig. Ein Nachteil der ibidi-Kammern ist, dass sich auf der unbeschichteten Kammeroberfläche eine sehr gute Plättchenadhäsion zeigt. Nicht zuletzt deshalb ist zu prüfen, ob die Adhäsion der Thrombozyten wirklich spezifisch für die unterschiedlichen Oberflächen ist. Mittels spezifischer Eingriffe in den entsprechenden Bindungsweg des Thrombozytenrezeptors, der durch die beschichtete Oberfläche angesprochen wird (z.B. GPVI für Kollagen) soll ermittelt werden, ob die Bindung an die Kammeroberfläche wirklich über den Rezeptor für das beschichtete Protein vermittelt und die Adhäsion somit spezifisch ist, oder ob es sich um eine unspezifische Anheftung handelt. Je nach vorhandenen Möglichkeiten werden blockierende Antikörper oder Thrombozyten transgener Mäuse für die Versuche verwendet. Die Tests sind allesamt bereits etabliert und werden an dieser Stelle nur exemplarisch zur Modelletablierung nachvollzogen.

3.5.1.1 Blockade der Kollagenbeschichtung mit löslichem GPVI

Um die Spezifität der über den Kollagenrezeptor vermittelten Plättchenadhäsion an Kollagen zu überprüfen, wird die mit rat Collagen Typ I vorbeschichtete Kammer mit löslichem GPVI inkubiert. GPVI ist ein normalerweise transmembranes Protein aus der Immunglobulin Superfamilie. Es besteht aus zwei Domänen, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen (Ruggeri and Mendolicchio 2007, S.1679). Hier wird eine lösliche, gentechnisch hergestellte Variante verwendet. Die extrazelluläre Domäne des GPVI ist an humanes Fc-Fragment gebunden. Das lösliche GPVI-Fc wird in einer Konzentration von 0,8 mg/ml in die mit rat Collagen Typ I vorbeschichtete Kammer gegeben und für fünf Minuten inkubiert. Dabei bindet GPVI an das immobilisierte Kollagen und besetzt so die gesamte beschichtete Oberfläche. Die Thrombozyten können dann während der Perfusion nicht mehr über ihren eigenen GPVI-Rezeptor an Kollagen binden und am Kammerboden adhären werden. Als Kontrolle dienen äquimolare Mengen an Fc-Fragment. Dieses wird ebenso wie GPVI-Fc auf die Kollagen-Oberfläche aufgebracht, geht jedoch keine Interaktionen mit Kollagen ein (Massberg et al. 2004).

3 Material und Methoden

3.5.1.2 GPIIb^{-/-} und die Auswirkungen auf die Thrombozytenadhäsion an immobilisiertes Fibrinogen

Das Glykoprotein IIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) vermittelt sowohl Kontakte zwischen Plättchen und Fibrinogenoberfläche als auch die Vernetzung von Thrombozyten. Es kommt durch GPIIb also zu einer Adhäsion und einer Aggregation von Thrombozyten. In diesem Fall wird vorrangig die Adhäsion untersucht. Die Plättchen liegen in gewaschener Form vor. Der Zellansatz enthält kein Blutplasma und damit kein lösliches Fibrinogen, das zur Aggregation führen könnte (Savage, Saldivar, and Ruggeri 1996, S.289). Das GPIIb-Knockout-Modell produziert Thrombozyten ohne Fibrinogenrezeptoren. Bei der Perfusion über die mit Fibrinogen beschichtete Kammer sollte sich eine verminderte Plättchenadhäsion der GPIIb-defizienten Thrombozyten im Vergleich zum Versuch mit WT-Thrombozyten ergeben. Dies wurde bereits *in vivo* und *in vitro* in früheren Versuchen nachgewiesen (Massberg et al. 2005, S.1182), (Ruggeri and Mendolicchio 2007, S.1680-1681).

3.5.1.3 Von Willebrand Faktor

Zwei Mechanismen sind im Wesentlichen für die Bindung an von Willebrand Faktor verantwortlich. Hauptsächlich ist es die über den GPIb-IX-V-Komplex vermittelte lockere Adhäsion. Das entscheidende Molekül ist hierbei GPIb α , das vor allem bei hohen Scherraten in der Lage ist Thrombozyten abzufangen und ein sogenanntes „Tethering“, ein Rollen auf der Oberfläche, herbeizuführen. Dabei wird die Geschwindigkeit der Zellen so gebremst, dass weitere Zellkontakte möglich werden. Von Willebrand Faktor und GPIb α kommen so eine zentrale Rolle in der Initiation der Plättchenadhäsion zu. Allerdings bindet GPIIb-IIIa auch an von Willebrand Faktor, vermittelt in dem Geschehen aber eher feste Bindungen (Ruggeri and Mendolicchio 2007, S.1675-1676).

3.5.1.3.1 Rezeptorblockade mit Anti-GPIb α

Man gibt zum üblichen Zellansatz 20 μ l des blockierenden Antikörpers anti-GPIb α in einer Konzentration von 0,5 mg/ml. Dadurch wird die Bindungsstelle für von Willebrand Faktor blockiert und die Adhäsion an die mit vWF vorbeschichtete Oberfläche kann nur noch über alternative Mechanismen geschehen, also im Wesentlichen über GPIIb-IIIa. Man erwartet ein deutlich reduziertes Tethering und eine deutlich verminderte Plättchenadhäsion gegenüber einem nicht blockierten Perfusionsdurchgang (Massberg et al. 2002, S.891).

3 Material und Methoden

3.5.1.3.2 GPIIb^{-/-} und die Thrombozytenadhäsion auf von Willebrand Faktor

Wie eingangs erläutert, vermittelt GPIIb in geringem Maße auch eine Thrombozytenadhäsion über von Willebrand Faktor. Zu einem Teil wird also die Bindung bei der Verwendung von Thrombozyten GPIIb-defizienter Mäuse beeinträchtigt sein. Da der Hauptmechanismus der Adhäsion über GPIIbα jedoch unberührt bleibt, wird ein Teil der Adhäsion bestehen bleiben. Bei diesem Versuch wird die Plättchenadhäsion GPIIb-defizienter Thrombozyten gegenüber der Adhäsion gesunder Thrombozyten auf von Willebrand Faktor verglichen.

3.5.1.4 Laminin als Kontrolloberfläche

Vorversuche haben eine starke Adhäsivität der unbeschichteten ibidi-Kammeroberfläche (uncoated) über verschiedene unspezifische Adhäsionsmechanismen ergeben. Um die unspezifische Adhäsion auf einem Matrixprotein zu messen und damit die Stärke der Voraktivierung der Plättchen im jeweiligen Versuch abzuschätzen, wird eine Kammer mit Laminin beschichtet. Es werden die Thrombozytenadhäsionen bei Perfusion über Laminin bzw. über uncoated miteinander verglichen. Die Thrombozyten stammen aus C57Bl/6J-Mäusen.

3.5.2 Bedeutung von S1P für die Thrombozytenfunktion in vitro

Ein Ziel der Arbeit ist die Bedeutung von S1P für die Thrombozytenfunktion *in vitro* genauer kennenzulernen und damit seiner Rolle im Geschehen der Atherogenese näher zu kommen. Diesem Ziel kann man sich von zwei Seiten nähern. Zum einen indem man Agonisten des Zielmoleküls einsetzt und so den betreffenden Stoffwechselweg nach seinen Bedingungen verändert. Zum anderen indem man hemmend auf den Stoffwechselweg einwirkt und gezielt, mittels Verwendung von Knockout-Mäusen, die Produktion des Zielmoleküls ausschaltet. Beide Methoden werden nachfolgend angewendet.

3.5.2.1 Charakterisierung von S1P durch die S1P-Rezeptormodulatoren FTY720 und SEW2871

3.5.2.1.1 Das Vehikel DMSO (Dimethylsulfoxid)

Da FTY720 und SEW2871 in wässrigen Puffern kaum löslich sind, wird gerne DMSO (Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) als Lösungsmittel verwendet. Durch seinen dipolaren Aufbau ($(H_3C)_2S=O$) verbindet es sich nämlich sowohl mit wässrigen als auch mit organischen Medien. Nachteilig ist die bekannte Toxizität von DMSO zu bewerten. Unter anderem ist schon lange ein Plättchenaggregationshemmender Effekt bekannt (Brayton 1986). Nach

3 Material und Methoden

derzeitigem Kenntnisstand ist DMSO aber in einer Konzentration von bis zu 10% anwendbar, ohne signifikante Zytotoxizität zu verursachen (Da Violante et al. 2002, S.1601-1603).

3.5.2.1.2 FTY720

FTY720 (Fa. Cayman Chemical, #10006292) ist ein Stoff mit der Summenformel $C_{19}H_{33}NO_2$, der mit den Rezeptoren $S1P_{1, 3-5}$ interagiert. Im phosphorylierten Zustand hat es sehr große Strukturähnlichkeiten mit $S1P$ (Abb. 3.13 und Abb. 3.14).

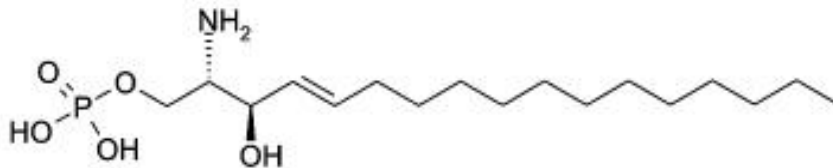


Abb. 3.13: Strukturformel von $S1P$ (Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1895)

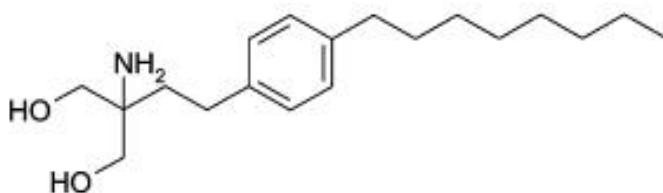


Abb. 3.14: Strukturformel von FTY720 (Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1895)

FTY720 (Fingolimod) liegt in kristallinem Zustand vor und wird für den Gebrauch in DMSO in einer Konzentration von 5 mg/ml unter Argonatmosphäre gelöst und bis zur Anwendung bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt. Alle Reagenzien werden zur intraperitonealen Injektion im Verhältnis 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und bei Raumtemperatur verwendet.

3.5.2.1.3 SEW2871

Ebenfalls in kristalliner Form erhältlich, löst man den selektiven $S1P_1$ -Rezeptorliganden SEW2871 mit der Summenformel $C_{20}H_{10}F_6N_2OS$ genauso wie FTY720 in DMSO unter Argonatmosphäre. In einer Konzentration von 10 mg/ml wird es bis zur Verwendung bei $-20^{\circ}C$ aufbewahrt. Die intraperitoneale Verabreichung erfolgt nach Erwärmung auf Raumtemperatur und in Verdünnung um den Faktor 2,5 mit 0,9% NaCl.

3 Material und Methoden

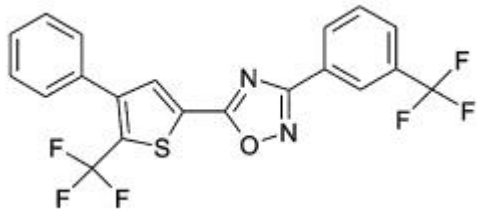


Abb. 3.15: Strukturformel von SEW2871 (Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1895)

3.5.2.1.4 Versuchsprotokoll

Diese Versuchsreihe besteht aus drei Versuchsgruppen zu je $n = 5-6$. Die ersten beiden Versuchsgruppen werden fünf Stunden vor Blutentnahme mittels intraperitonealer Injektion mit einem S1P-Rezeptormodulator vorbehandelt. In der ersten Versuchsgruppe werden jeder Maus $150 \mu\text{l}$ einer FTY720-Lösung in der Konzentration von $0,5 \text{ mg/ml}$ injiziert (hergestellt wie unter 3.5.2.1.2. beschrieben). Die Mäuse der zweiten Versuchsgruppe erhalten jeweils $150 \mu\text{l}$ einer SEW-Lösung in der Konzentration von 4 mg/ml . Da diese in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst sind und dabei mit einer gewissen Toxizität und damit einer unspezifischen Hemmung der Plättchenadhäsion zu rechnen ist, wird der dritten Versuchsgruppe als Kontrolle DMSO, 1:10 mit NaCl 0,9% verdünnt, verabreicht. Nach der Blutentnahme erfolgen die Präparation der Zellen und die Herstellung der Perfusionslösung nach dem standardisierten Protokoll. Fünf Minuten vor der Perfusion werden die Thrombozyten erneut behandelt um einen ausreichenden Kontakt mit den S1P-Rezeptormodulatoren zu gewährleisten. In den Versuchsgruppen gibt man $36 \mu\text{l}$ der 5 mg/ml FTY720-Lösung bzw. der 10 mg/ml SEW2871-Lösung zu 1 ml Thrombozytensuspension. Die Kontrollgruppe erhält $36 \mu\text{l}$ DMSO 10% pro Milliliter Thrombozytensuspension. Die verwendeten Dosierungen wurden von den vorangegangenen *in vivo* Versuchen der Arbeitsgruppe abgeleitet. Es folgt die Perfusion in gewohnter Weise über die Oberflächen Kollagen Typ1, Fibrinogen, Laminin und von Willebrand Faktor. Dokumentiert und verglichen werden die Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion auf den verschiedenen Oberflächen in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen nach fünf und zehn Minuten.

3.5.2.2 Untersuchungen im Sphingosinkinase-1 Knockout-Modell der Maus

Sphingosinkinasen phosphorylieren Sphingosin zu S1P. Es sind zwei Isotypen mit unterschiedlichen strukturellen und biochemischen Eigenschaften bekannt. Zellen von SK1^{-/-} Mäusen enthalten keine Sphingosinkinase 1. Dadurch kommt es zu einer signifikanten Re-

3 Material und Methoden

duktion der S1P-Level im Serum, das normalerweise aus aktivierten Thrombozyten und nach neuesten Beobachtungen auch aus Erythrozyten freigesetzt wird (Allende et al. 2004, S.52491), (Yatomi 2008, S.607).

3.5.2.2.1 Versuchsprotokoll

Um die Rolle der Sphingosinkinase 1 für die Plättchenadhäsion zu charakterisieren, wird die Adhäsion von Thrombozyten von SK1^{+/+} Mäusen und SK1^{-/-} Mäusen auf den Oberflächen rat Collagen Typ I, mouse Fibrinogen, mouse Laminin und human von Willebrand Faktor nach fünf und zehn Minuten Perfusion miteinander verglichen. Die Größe der Versuchsgruppen beträgt dabei für SK1^{+/+} n = 4 und für SK1^{-/-} n = 5-7.

3.5.2.3 Untersuchungen im Sphingosinkinase-2 Knockout-Modell der Maus

Verschiedene Beobachtungen ergeben Unterschiede in den Funktionen der Sphingosinkinase-Isoformen. Obwohl die Aktivität der SK2 in der SK2^{-/-} Maus vollständig unterdrückt ist, findet sich im Gegensatz zur SK1^{-/-} Maus nur eine geringe Reduktion des Serum-S1P-Spiegels (Zemann et al. 2006, S.1456), (Taha, Hannun, and Obeid 2006, S. 113-120). Es ist deshalb denkbar, dass sich die Unterdrückung der Sphingosinkinase 2 anders auf die Thrombozytenadhäsion auswirkt als die Ausschaltung der Sphingosinkinase 1.

3.5.2.3.1 Versuchsprotokoll

Separat zur Sphingosinkinase 1 wird deshalb nun auch der Einfluss der Sphingosinkinase 2 im Knockout-Versuch dargestellt. Ebenso wie im Versuch mit SK1^{-/-} wird die Adhäsion von Thrombozyten aus SK2^{+/+} Mäusen mit Thrombozyten aus SK2^{-/-} Tieren auf den bekannten Oberflächen nach fünf und zehn Minuten Perfusion verglichen. Die Gruppengröße beträgt für SK2^{+/+} n = 3 und für SK2^{-/-} n = 3-4.

3.6 Auswertung und Statistik

Alle Auswertungen und graphischen Darstellungen werden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel (Microsoft Corporation) erstellt. Um die Menge an Daten summarisch darzustellen, werden einige Methoden der deskriptiven Statistik angewandt. Eine Aussage über die Zuverlässigkeit der Ergebnisse kann damit aber noch nicht getroffen werden. Dazu sind Analysen aus dem Bereich der induktiven Statistik nötig. Mit diesen Tests kann man Wahrscheinlichkeitsrechnungen durchführen, die ergeben, ob eine Abweichung in den Messergebnissen zufällig zustande gekommen ist, oder ob die Abweichung signifikant ist, das heißt überzufällig groß ist. Dazu definiert man ein Signifikanzniveau. Messergebnisse mit einer Testwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ werden als signifikant angesehen. Zur Ermittlung der Wahrscheinlichkeit wird der t-test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Für diese statistischen Berechnungen wird das Statistikprogramm SigmaStat (Systat Software, Inc.) zu Hilfe genommen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines *in vitro* Modells zur Untersuchung der Adhäsion von murinen Thrombozyten

4.1.1 Einstellungen und Anpassungen des Flusskammersystems

Eine Flusskammer ist ein *in vitro* Modell, das es ermöglicht in Echtzeit Zellen unter Flussbedingungen zu beobachten. Ein Ziel dieser Arbeit ist es eine neuartige Flusskammer an die speziellen Erfordernisse für die Arbeit mit murinen Thrombozyten anzupassen. Dieses System ist besonders auf die Arbeit mit kleinem verfügbarem Volumen ausgelegt. Das Fassungsvermögen je Kanal beträgt nur 30 µl, das zusätzliche Volumen von Verbindungsschläuchen und Reservoirs ist auf ein Minimum reduziert worden. Durch Rezirkulation der perfundierten Zellen und optimale zeitliche Abstimmung des Steuerprogramms wird der Materialeinsatz ebenfalls verringert.

Die Erzeugung einer Flussbewegung durch Luftdruck ist ein für die Zellen besonders schonendes Verfahren. Da die Thrombozyten zu keiner Zeit in direkten Kontakt mit dem Pumpmechanismus gelangen, wie es etwa bei einer Rollerpumpe der Fall ist, werden die Plättchen durch das Pumpen kaum voraktiviert. Außerdem schafft dieser Mechanismus ein sehr gleichmäßiges Flussprofil. Lediglich beim Umschalten der Flussrichtung des Luftdrucks kommt es zu einer kleinen Verzögerung, die sich in einem kurzen Stocken der Flussbewegung bemerkbar macht. Nachteilig ist der komplexe Aufbau des Flusssystems.

Die Zugabe von Erythrozyten ist aufgrund des Flussprofils in der Kammer nötig und unterstützt die Adhäsion der Mäusethrombozyten. Als Ersatz für die nur begrenzt vorhandenen murinen Erythrozyten werden humane Blutkörperchen eingesetzt. Sie führen zu keinerlei Interaktionen mit den Blutplättchen. Ein physiologischer Hämatokrit hat sich als praktikabel erwiesen.

4.1.2 Evaluierung der Beschichtungen der Kammeroberfläche

4.1.2.1 Vergleich der Beschichtungen untereinander

Die Perfusion von isolierten murinen Thrombozyten über beschichtete Proteine der extrazellulären Matrix bei arteriellen Scherraten führt zu einer starken Plättchenadhäsion. Adhäsion und Aggregation der Zellen auf Kollagen, vWF und Fibrinogen ergeben oberflächenspezifische Profile (siehe Abb. 4.1). An Kollagen und vWF zeigt sich eine starke Anheftung, die gleichmäßig über die Kammeroberfläche verteilt ist. An Fibrinogen ist die Thrombozytenbindung geringer und unregelmäßiger. Die Plättchen liegen nicht einzeln, sondern bilden oft

4 Ergebnisse

kleine Aggregate. Die Adhäsion auf Laminin zeigt eine unspezifische Bindung an und ist nur gering.

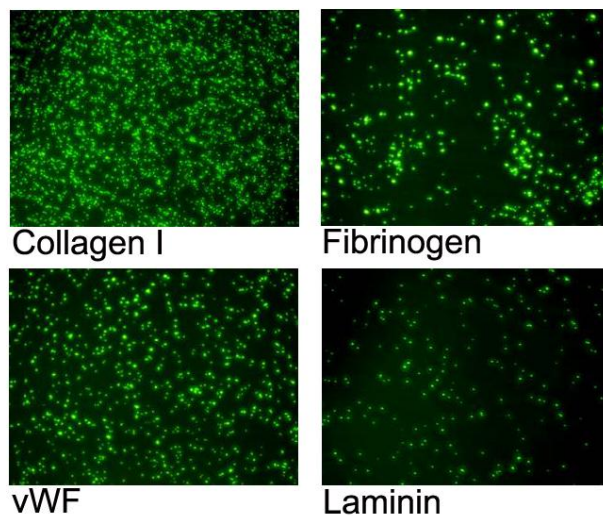


Abb. 4.1: Oberflächenspezifische Adhäsionsprofile, Aufnahmen nach 10 Minuten Perfusion

4.1.2.2 Spezifitätstests

Um die Oberflächenspezifität der Thrombozytenbindung zu überprüfen, werden Tests durchgeführt, die den Bindungsweg des Plättchens an das jeweilige Protein behindern. Das führt zu einer verringerten Adhäsion der Thrombozyten auf der jeweiligen Oberfläche. Gemessen wird jeweils die Fläche der adhärennten Thrombozyten auf der Kammeroberfläche in μm^2 .

4.1.2.2.1 Hemmung der Kollagen-spezifischen Plättchenadhäsion durch lösliches GPVI-Fc

GPVI ist der wichtigste Kollagenrezeptor des Thrombozyten. Um die Spezifität der Plättchenbindung an die mit rCollagenI beschichtete Oberfläche nachzuweisen, werden die Thrombozytenbindungsstellen des immobilisierten Kollagens durch Vorinkubation der Kammer mit löslichem GPVI-Fc – einer nicht-membranständigen Form des Kollagenrezeptors - blockiert. Dadurch können die anschließend perfundierten Thrombozyten nicht mehr über ihren GPVI-Rezeptor an die Oberfläche binden. Um unspezifische hemmende Effekte durch den Fc-Teil des Antikörpers zu relativieren, werden als Referenzversuch Thrombozyten über Kollagen, vorinkubiert mit Fc, perfundiert. Der Vergleich mit der Plättchenadhäsion an natives Kollagen zeigt, dass die Effekte durch Fc nur minimal sind. Die Behandlung mit GPVI-Fc ergibt eine Reduktion der Adhäsion gegenüber einer Behandlung mit dem Fc-Teil alleine um 81,24% nach fünf Minuten Perfusion und um 78,53% nach zehn Minuten (siehe Abb. 4.2 und Abb. 4.3).

4 Ergebnisse

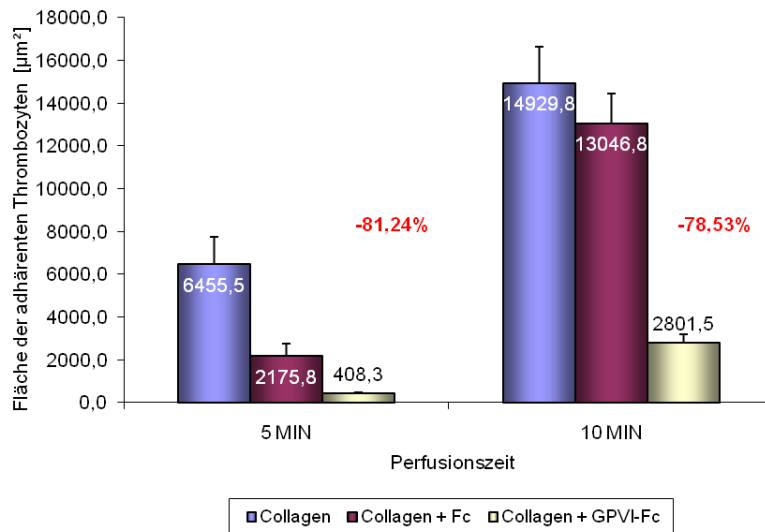


Abb. 4.2: Hemmung der Kollagen-spezifischen Plättchenadhäsion durch lösliches GPVI-Fc. Verglichen wird die Fläche der adhärenen Thrombozyten in μm^2 nach 5 und 10 min.

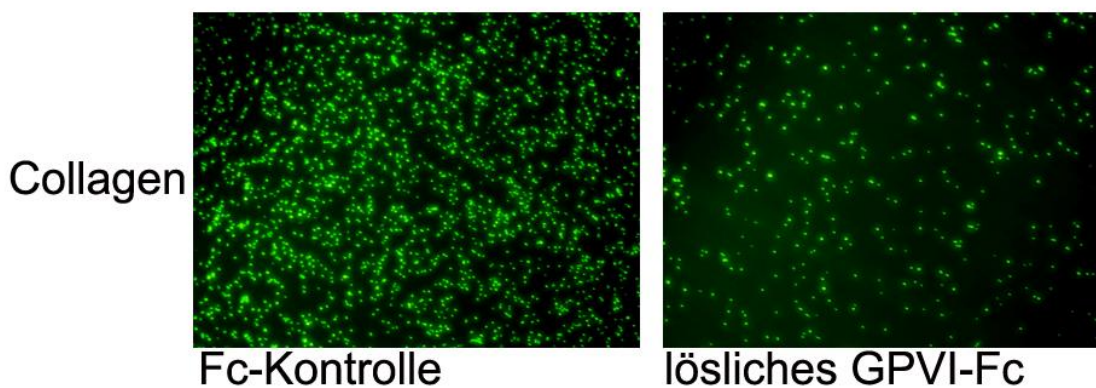


Abb. 4.3: Vergleich der Plättchenadhäsion auf Kollagen + Fc und Kollagen + löslichem GPVI-Fc nach 10 min Perfusion

4.1.2.2.2 Verminderte Adhäsion GPIIb-defizienter Thrombozyten an Fibrinogen und vWF

Die Thrombozyten GPIIb-defizienter Mäuse tragen keinen funktionell aktiven Fibrinogenrezeptor. Bei diesen Zellen ist folglich die Adhäsion an immobilisiertes Fibrinogen selektiv gehemmt. Die Fläche der adhärenen Thrombozyten ist bei GPIIb^{-/-}-Tieren im Gegensatz zu Wildtyptieren um 82,38% nach fünf Minuten und um 78,53% nach zehn Minuten Versuchsdauer reduziert (Abb. 4.4 und Abb. 4.5).

4 Ergebnisse

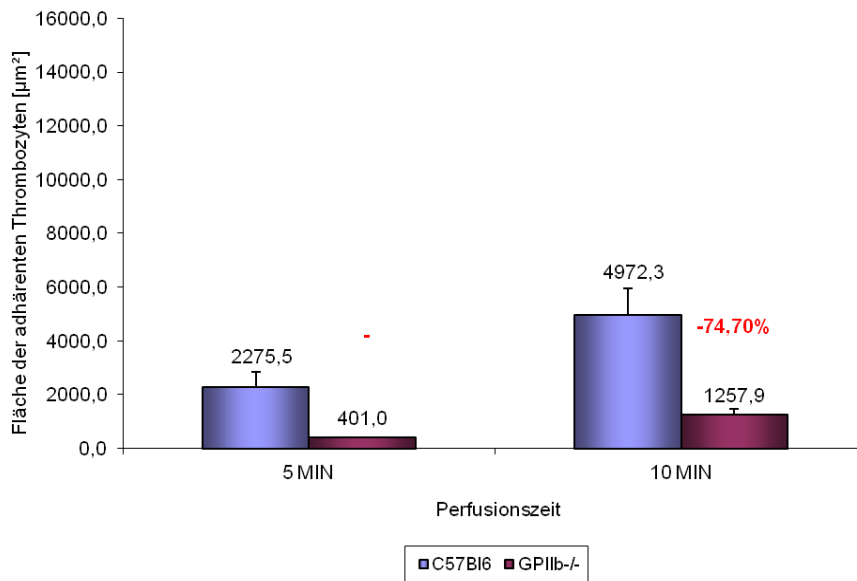


Abb. 4.4: verminderte Adhäsion an Fibrinogen aufgrund des fehlenden GPIIb/IIIa-Rezeptors auf den Thrombozyten der Knockout-Mäuse.

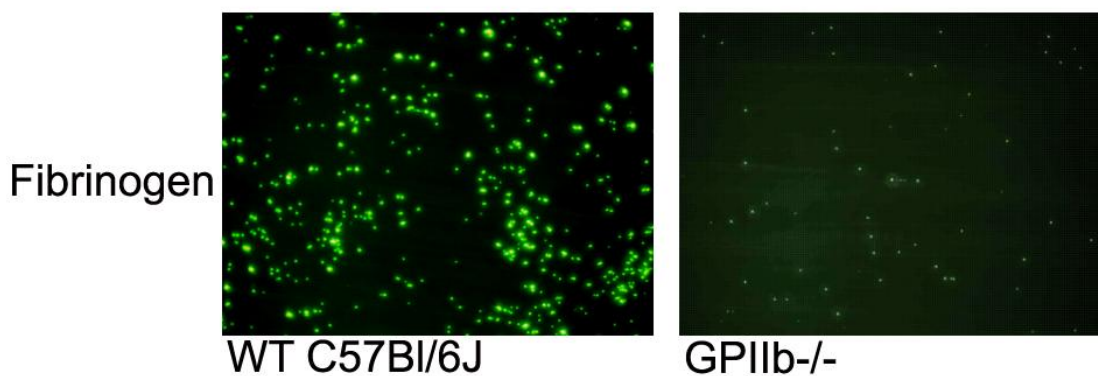


Abb. 4.5: Plättchenadhäsion auf Fibrinogen, WT C57Bl/6J vs. GPIIb^{-/-}

Auch vWF ist ein Substrat für den GPIIb-Rezeptor. Wie aus Abb. 4.6 und Abb. 4.7 ersichtlich, binden die GPIIb-defizienten Thrombozyten auch in geringerer Zahl an die mit vWF beschichtete Oberfläche. Die Adhäsion ist nach fünf Minuten um 87,51% und nach zehn Minuten um 62,62% geringer als bei Wildtypen.

4 Ergebnisse

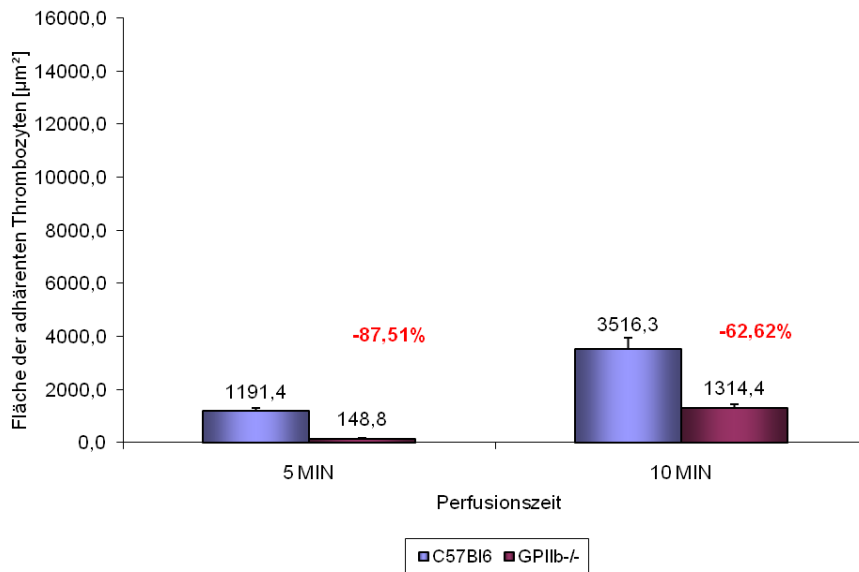


Abb. 4.6: verminderte Adhäsion GPIIb-defizienter Thrombozyten an vWF

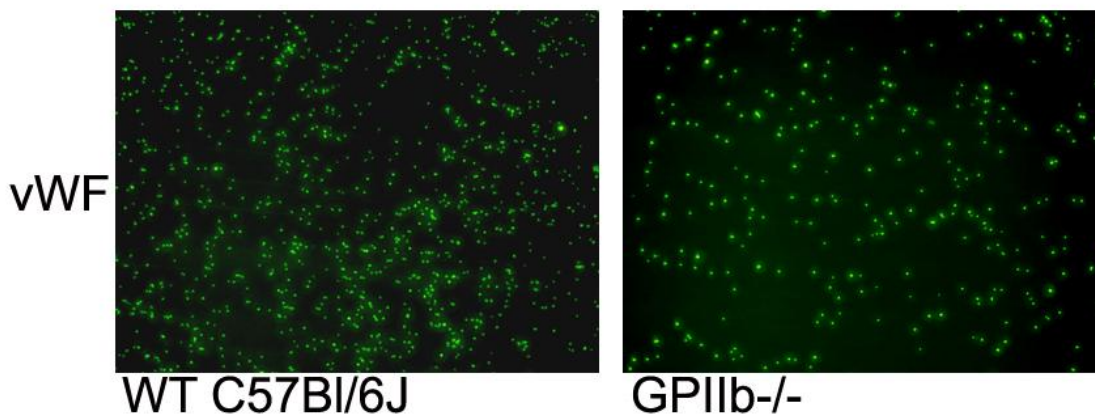


Abb. 4.7: Vergleich WT C57Bl/6J und GPIIb^{-/-}: Thrombozytenadhäsion auf vWF nach 10 min Perfusion.

4.1.2.2.3 Blockierung der Plättchenanheftung auf vWF durch anti-GPIIb α

Der wichtigste Rezeptor für den Kontakt zwischen Plättchen und vWF ist der GPIIb-V-IX-Komplex. GPIIb α ist der Teil des Rezeptorkomplexes, der die Bindung zu vWF vermittelt. Durch Zugabe des Antikörpers anti-GPIIb α zum Zellansatz wird dieses Molekül auf den Thrombozyten blockiert. Es werden im Vergleich zum Versuch ohne Antikörperzugabe deutlich weniger Thrombozyten adhären (Abb. 4.9). Abb. 4.8 zeigt nach fünf Minuten Versuchszeit eine um 85,48% und nach zehn Minuten um 63,26% geringere Adhäsion.

4 Ergebnisse

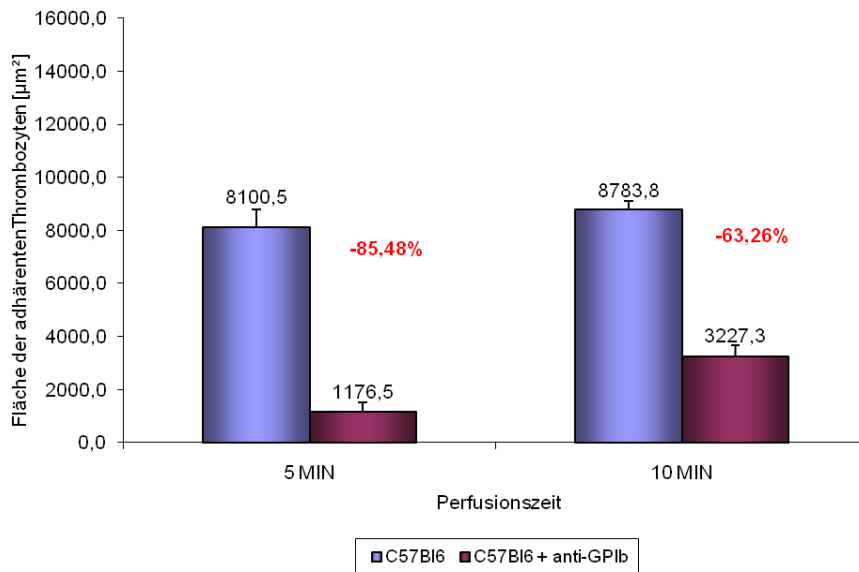


Abb. 4.8: Blockierung von GPIIb führt zu verminderter Plättchenadhäsion auf vWF

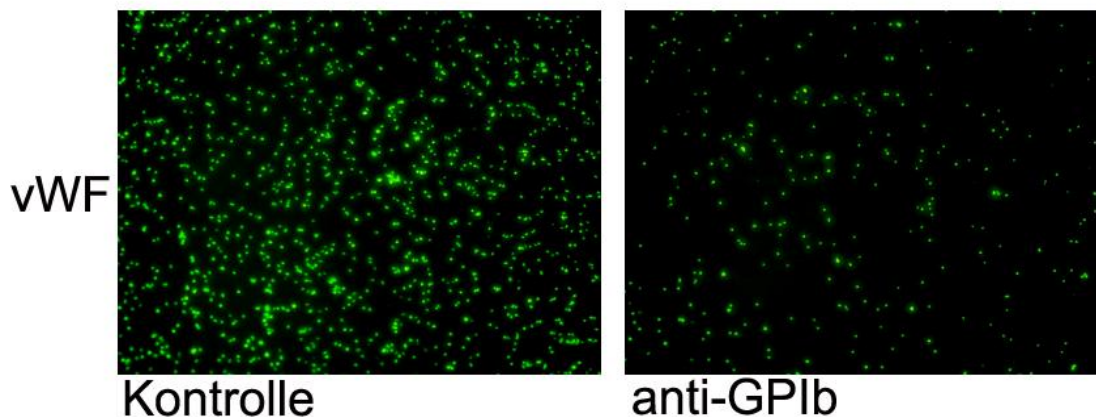


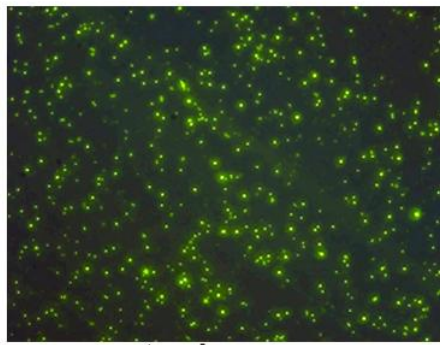
Abb. 4.9: Thrombozytenadhäsion nach 10 min Perfusion über vWF, Vergleich WT C57Bl/6J und nach Behandlung mit anti-GPIIb

4.1.2.2.4 Laminin als Kontrolloberfläche

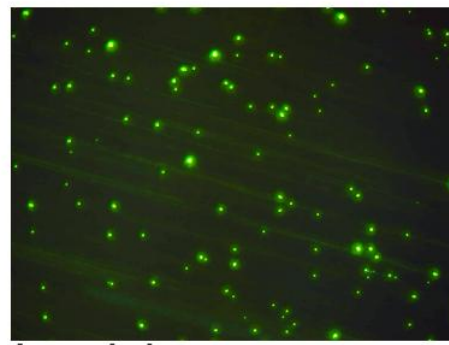
Bei Vorversuchen mit unbeschichteten Kammern (uncoated) ist stets eine starke Thrombozytenbindung aufgetreten. Nach Beschichtung der Kammer mit Laminin ist die Plättchenadhäsion deutlich reduziert gegenüber der unbeschichteten Kammeroberfläche. Laminin wird daher auch als Kontrolloberfläche bezeichnet.

4 Ergebnisse

C57Bl/6



uncoated



Laminin

Abb. 4.10: Plättchenbindung nach 10 min Perfusion über uncoated bzw. Laminin, Mäusestamm: C57Bl/6J

4.2 Bedeutung von S1P für die Thrombozytenadhäsion *in vitro*

Um die Bedeutung von S1P für die Thrombozytenadhäsion charakterisieren zu können, wird das neue Flusskammersystem angewandt. Die Thrombozyten jeder Versuchsgruppe werden über die soeben etablierten Beschichtungen perfundiert und das entstehende Adhäsionsmuster nach fünf und zehn Minuten dokumentiert. Verglichen wird jeweils die Fläche der adhärenen Thrombozyten in μm^2 der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe. Eine Versuchsserie untersucht den Einfluss einer Vorbehandlung der Tiere und deren Thrombozyten mit den S1P-Rezeptormodulatoren FTY720 oder SEW2871, die zweite und dritte Versuchsreihe erforschen, wie sich ein Fehlen der SK1 in SK1^{-/-} und der SK2 in SK2^{-/-} auswirkt.

4.2.1 Auswirkungen von FTY720 und SEW2871 auf die Plättchenadhäsion

Zunächst werden die Effekte der S1P-Rezeptorliganden FTY720 und SEW2871 auf die Thrombozytenadhäsion untersucht. Dazu wird den Versuchstieren je nach Versuchsgruppe fünf Stunden vor der Blutentnahme entweder das Lösungsmittel DMSO oder einer der S1P-Rezeptormodulatoren FTY720 bzw. SEW2871 intraperitoneal verabreicht. Eine zweite Behandlung der Thrombozyten erfolgt fünf Minuten vor der Perfusion. Die Gruppengröße beträgt $n = 4-6$ je Gruppe.

Da DMSO bekanntlich die Plättchenfunktion unspezifisch hemmt (Brayton 1986), wird die mit dem Vehikel behandelte Gruppe als Kontrollgruppe verwendet und mit den mit S1P-Rezeptormodulatoren behandelten Tieren verglichen. Die Adhäsion ist auf sämtlichen Oberflächen bei den mit DMSO behandelten Thrombozyten etwas geringer als bei den Plättchen der unbehandelten C57Bl/6J-Wildtypiere. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (Abb. 4.11).

4 Ergebnisse

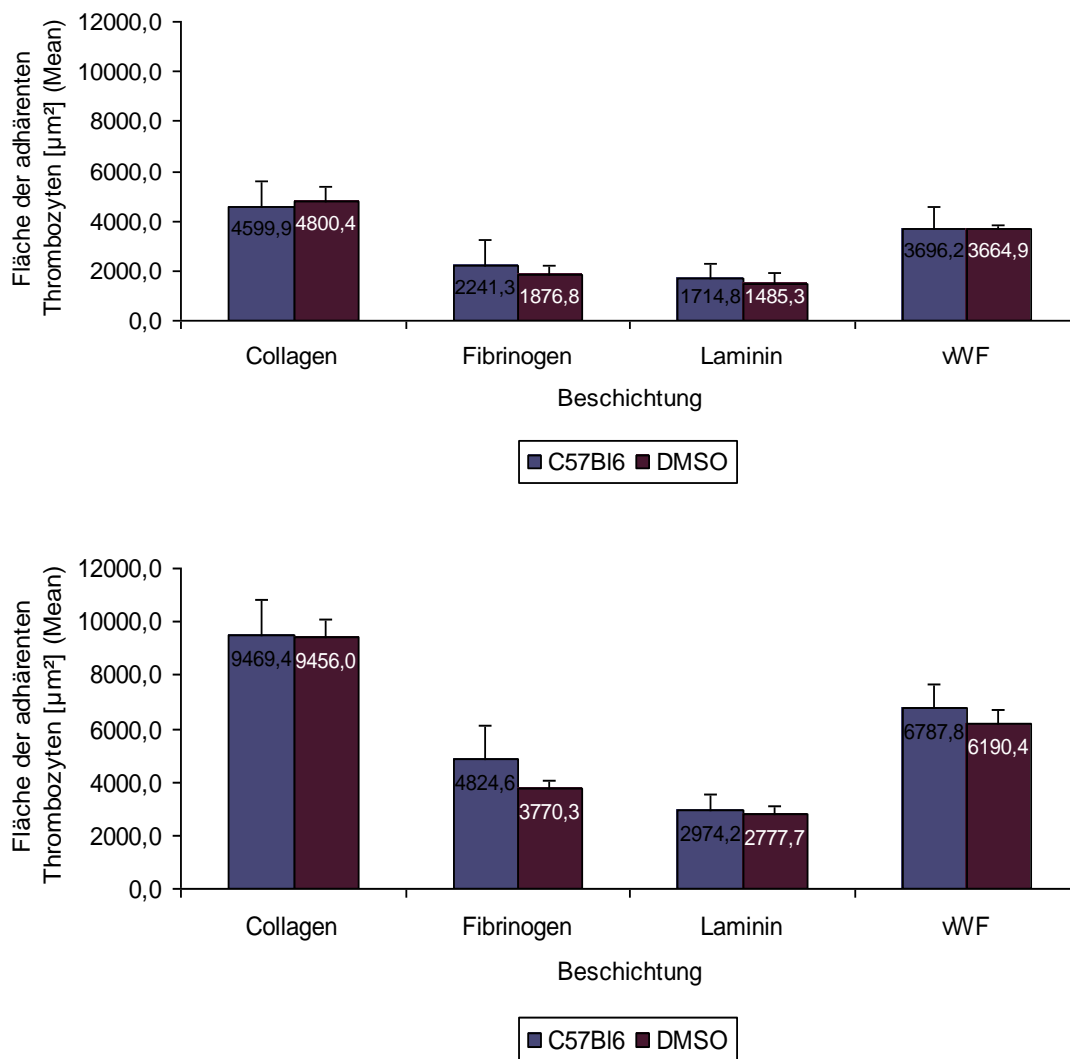


Abb. 4.11: Vergleich der Adhäsion von C57Bl/6J und DMSO-behandelten Thrombozyten nach 5 min (oben) und 10 min (unten)

Der Vergleich der SEW-Gruppe mit der Kontrollgruppe ergibt eine deutlich verminderte Plättchenadhäsion auf allen Oberflächen. Die Thrombozytenhemmung ist signifikant für die Oberflächen Kollagen, Fibrinogen und vWF. Bei Thrombozyten der FTY-Gruppe ist die Adhäsion noch geringer; der Unterschied zur DMSO-Versuchsgruppe ist signifikant auf allen vier Beschichtungen. Die Abb. 4.12 - Abb. 4.15 zeigen die Reduktion der Plättchenbindung ausgedrückt in Fläche der adhärennten Thrombozyten in µm², getrennt nach Beschichtungen. Abb. 4.16 veranschaulicht die Ergebnisse anhand von ausgewählten Bildern.

4 Ergebnisse

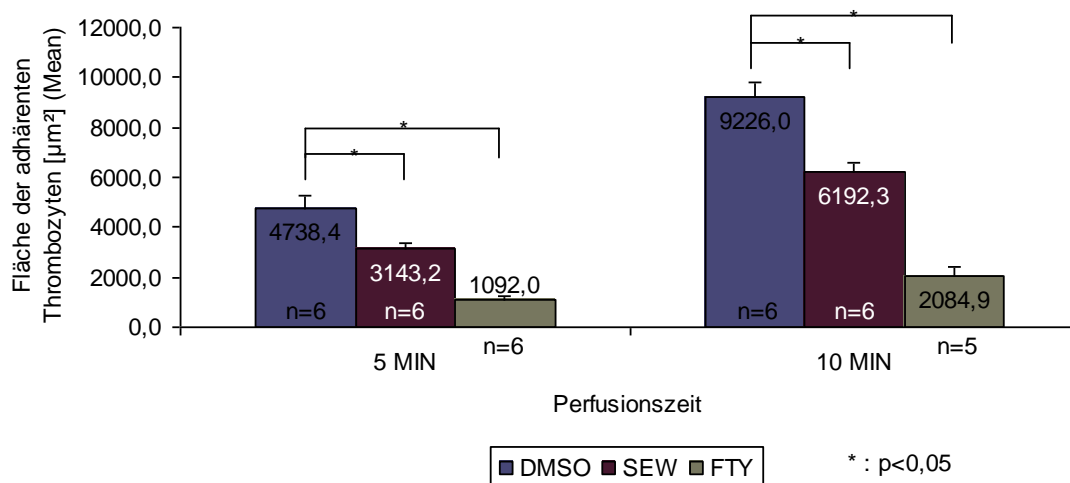


Abb. 4.12: Vergleich der Adhäsion zwischen DMSO u. SEW bzw. DMSO u. FTY nach 5 min und 10 min; Beschichtung: Kollagen.

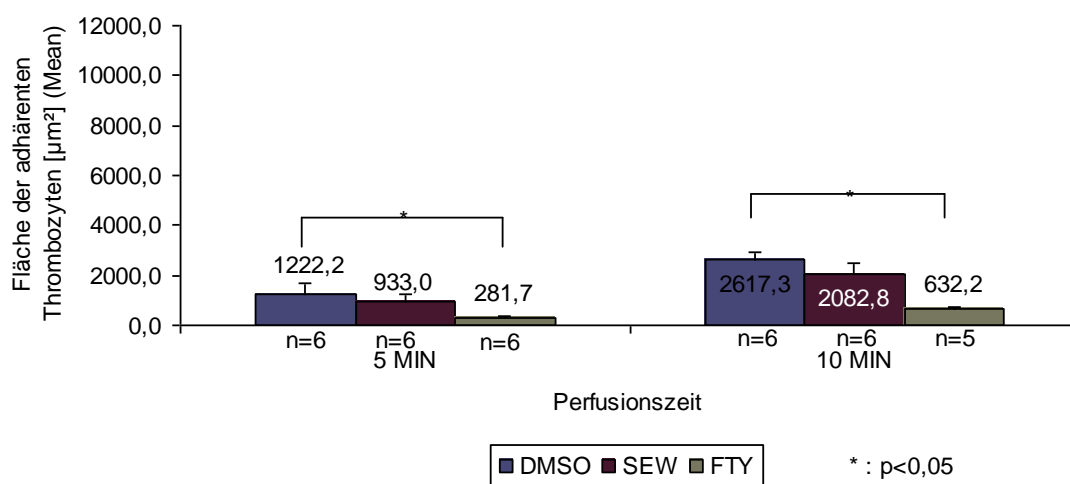


Abb. 4.13: Vergleich der Adhäsion zwischen DMSO u. SEW bzw. DMSO u. FTY nach 5 min und 10 min; Beschichtung: Laminin

4 Ergebnisse

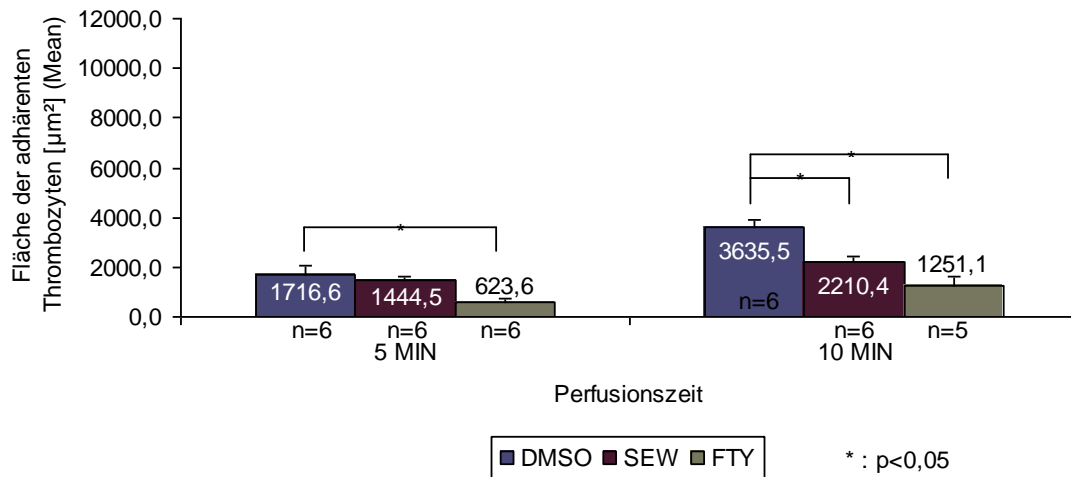


Abb. 4.14: Vergleich der Adhäsion zwischen DMSO u. SEW bzw. DMSO u. FTY nach 5 min und 10 min; Beschichtung: Fibrinogen

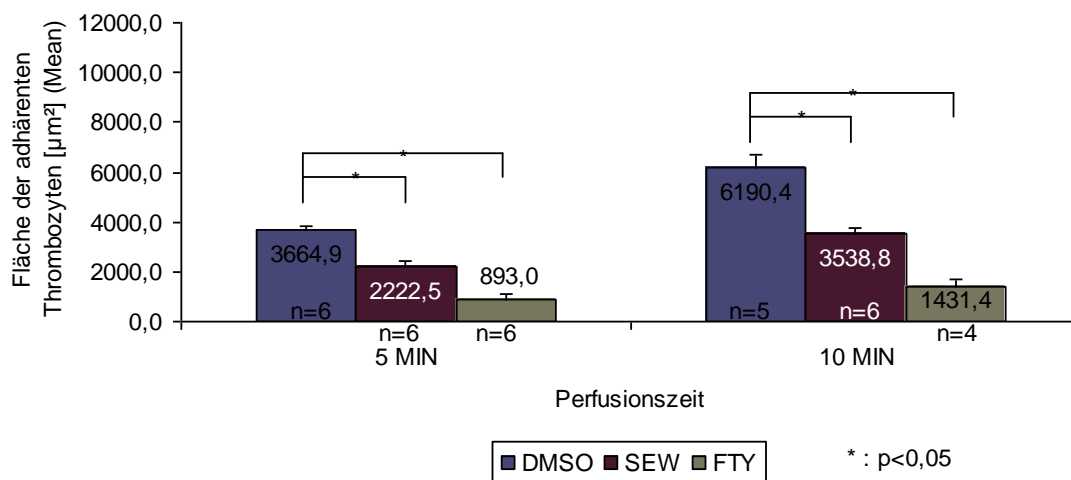


Abb. 4.15: : Vergleich der Adhäsion zwischen DMSO u. SEW bzw. DMSO u. FTY nach 5 min und 10 min; Beschichtung: von Willebrand Faktor

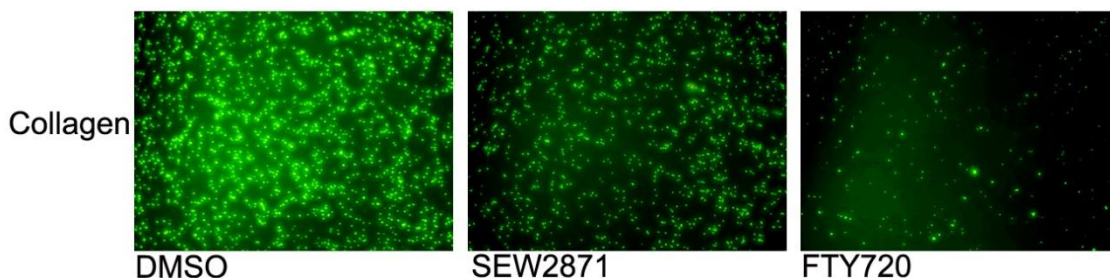


Abb. 4.16: Vergleich der Thrombozytenadhäsion auf Kollagen nach 10min Perfusion nach Behandlung mit DMSO, SEW2871 oder FTY720.

4 Ergebnisse

4.2.2 Thrombozytenadhäsion im SK1^{-/-}-Modell

Eine zweite Versuchsreihe soll die Auswirkungen eines erniedrigten S1P-Gehalts in den Thrombozyten untersuchen. Dazu werden SK1-Knockout-Mäuse verwendet. Die S1P-Konzentration im Serum ist bei diesen Tieren um mehr als 50% verringert (Allende et al. 2004, S.52489), (Taha, Hannun, and Obeid 2006, S.124).

Um einen Unterschied in der Plättchenfunktion aufgrund des genetischen Hintergrunds auszuschließen, werden als Kontrollgruppe für die Versuchsserie SK1^{+/+}-Tiere verwendet. Das ist ein Stamm, der durch Rückkreuzung aus SK1^{-/-} gezüchtet wird. Jeder Gruppe gehören n = 4-7 Tiere an. Ein Vergleich zwischen C57Bl/6J und SK1^{+/+}-Wildtyp ergibt aber keine signifikanten Unterschiede in der Plättchenadhäsion zwischen den beiden Gruppen (Abb. 4.17).

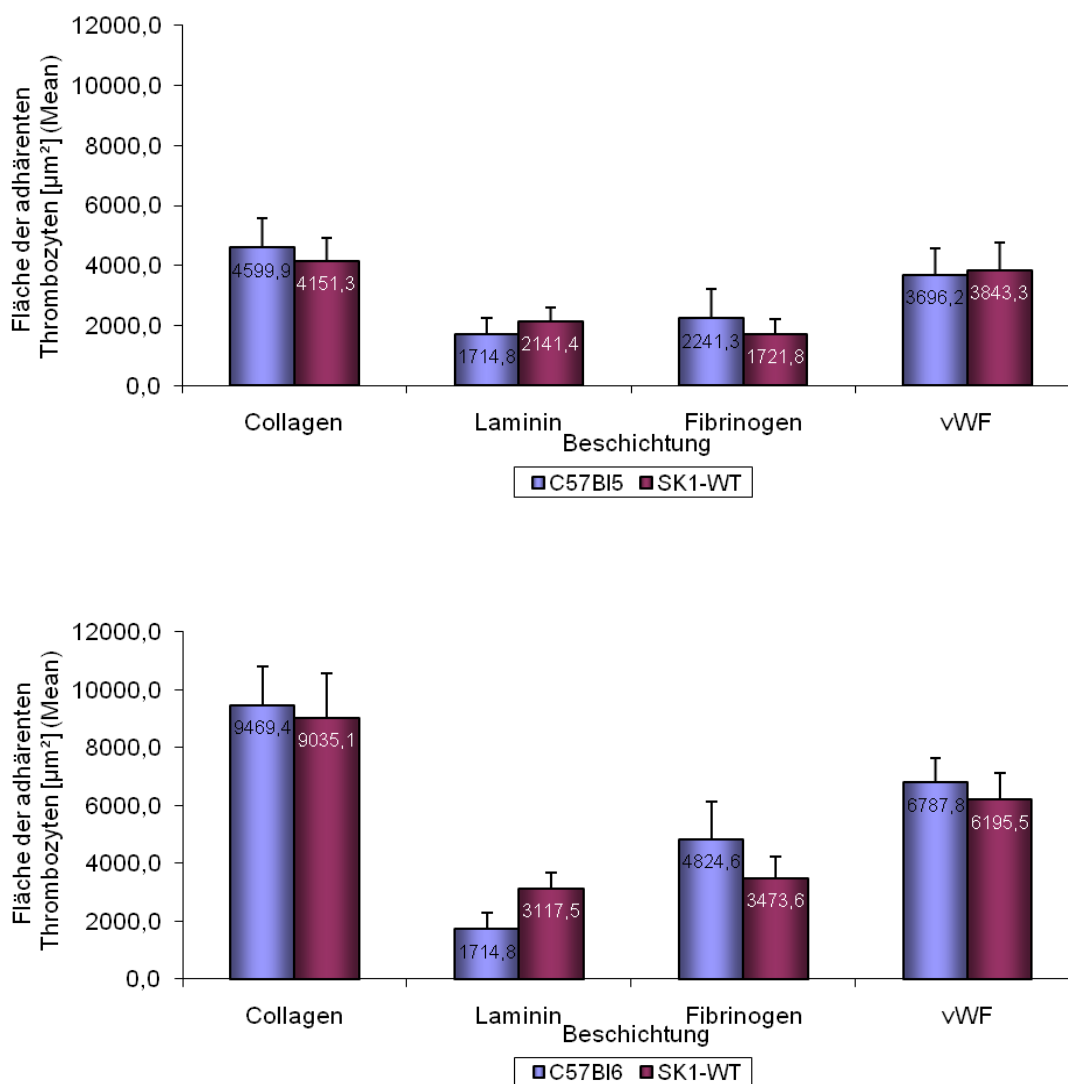


Abb. 4.17: Vergleich der Thrombozytenadhäsion von C57Bl/6J und SK1-WT nach 5 min (oben) und 10 min (unten).

4 Ergebnisse

Die Messung der Fläche der adhärenenten Thrombozyten ergibt eine dezent vermehrte Adhäsion SK1-defizienter Plättchen gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Abb. 4.18 - Abb. 4.21). Nach fünf Minuten Perfusion über Kollagen oder vWF ist die Plättchenanheftung deutlich vermehrt (Abb. 4.18 und Abb. 4.22). Wie aus Abb. 4.22 ersichtlich, ergibt die Perfusion von SK1^{-/-}-Thrombozyten über vWF nach 10 min sogar eine signifikant erhöhte Adhäsion gegenüber SK1^{+/+}.

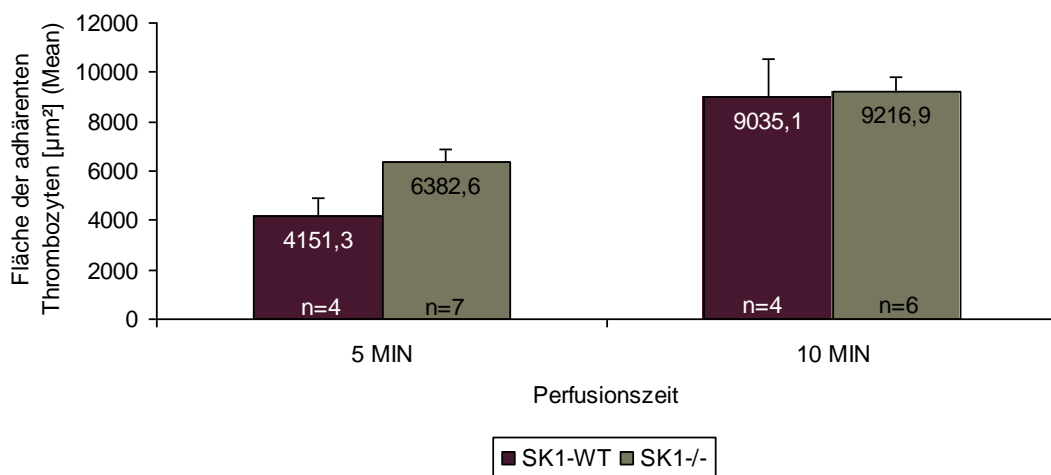


Abb. 4.18: Thrombozytenadhäsion nach 5 min u. 10 min, SK1-WT vs. SK1^{-/-}, Beschichtung: Kollagen

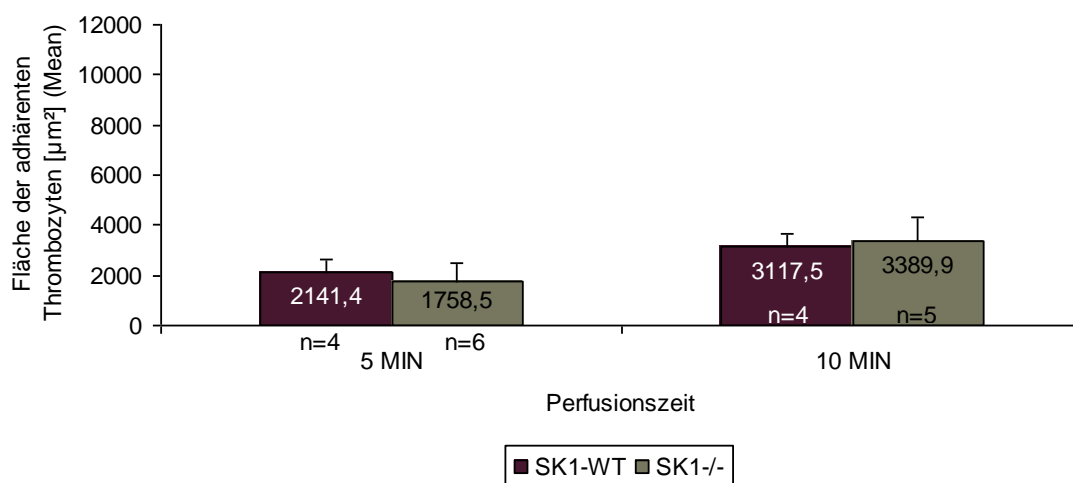


Abb. 4.19: Adhäsion von SK1-WT- gegenüber SK1^{-/-}-Thrombozyten nach 5 min und 10 min Perfusion, Beschichtung: Laminin

4 Ergebnisse

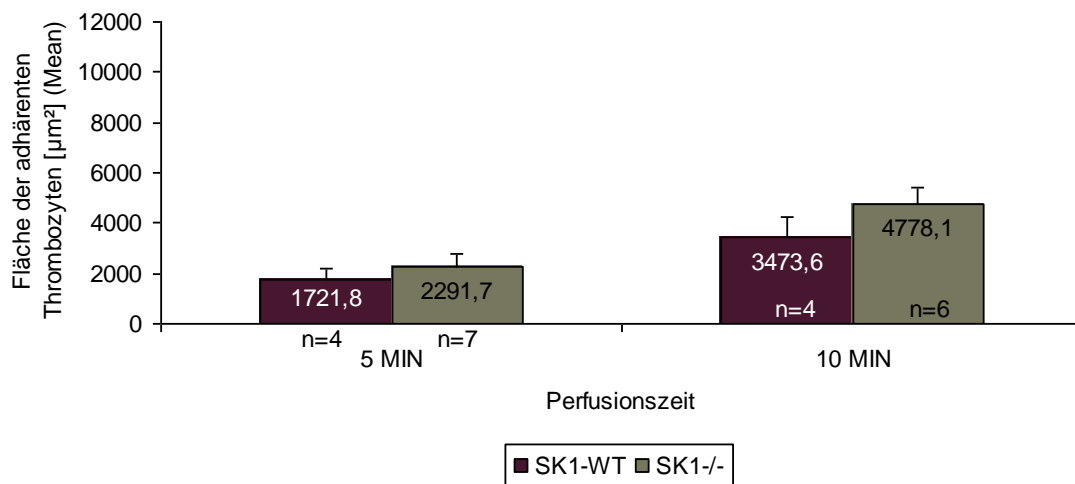


Abb. 4.20: Plättchenadhäsion nach 5 min und 10 min bei SK1-WT und SK1^{-/-}, Beschichtung: Fibrinogen

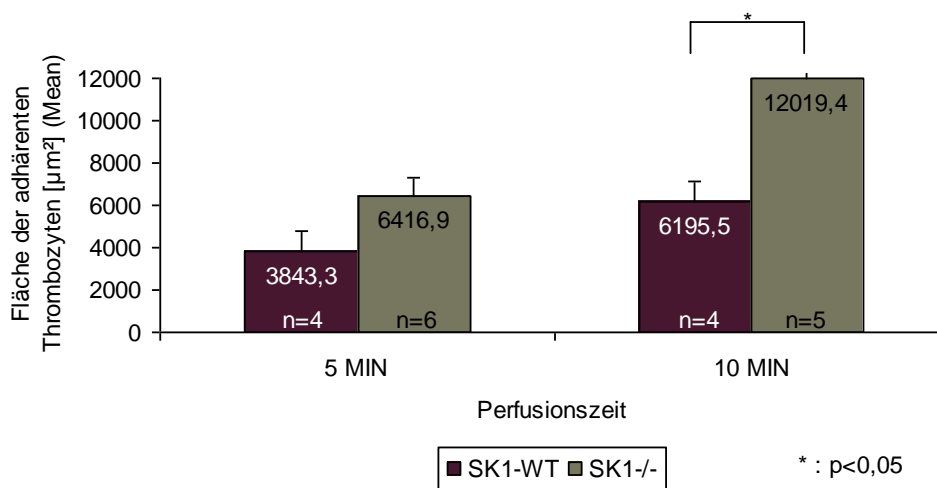


Abb. 4.21: Vergleich der Thrombozytenadhäsion nach 5 min u. 10 min, SK1-WT und SK1^{-/-}, Beschichtung: vWF

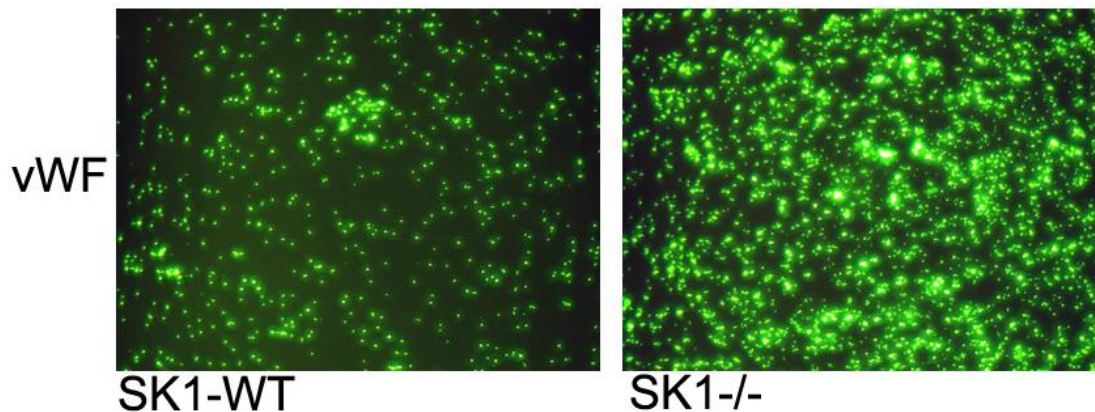


Abb. 4.22: Plättchenadhäsion auf vWF nach 10 min Perfusion bei SK1-WT und SK1^{-/-}.

4.2.3 Thrombozytenadhäsion in der SK2^{-/-}-Maus

Eine dritte Versuchsreihe soll klären, wie es sich auswirkt, wenn keine funktionell aktive SK2 im Thrombozyten vorhanden ist. SK2^{-/-} ist ein neu generierter Knockout-Stamm. Die S1P-Serumkonzentration der Tiere ist im Gegensatz zu SK1—Knockout Mäusen nur geringgradig verringert (Zemann et al. 2006, S.1456).

Als Kontrollgruppe werden wiederum rückgekreuzte Mäuse verwendet, sie werden SK2^{+/+} genannt. Der genetische Hintergrund der Tiere ist hier Balb/c im Gegensatz zu allen anderen Versuchsreihen, die Mäuse auf C57Bl/6J-Basis verwenden. Jede Versuchsgruppe besteht aus n = 2-4 Tieren.

SK2^{-/-} und SK2^{+/+} werden hinsichtlich ihrer Unterschiede in der Thrombozytenadhäsion verglichen. Das Adhäsionsniveau ist bei diesem Stamm insgesamt niedriger. Die Kontrollgruppe zeigt eine geringere Plättchenadhäsion als die Kontrollgruppe SK1-WT. Es sind auf keiner Oberfläche signifikante Unterschiede in der Adhäsion zwischen SK2^{+/+} und SK2^{-/-} feststellbar.

4 Ergebnisse

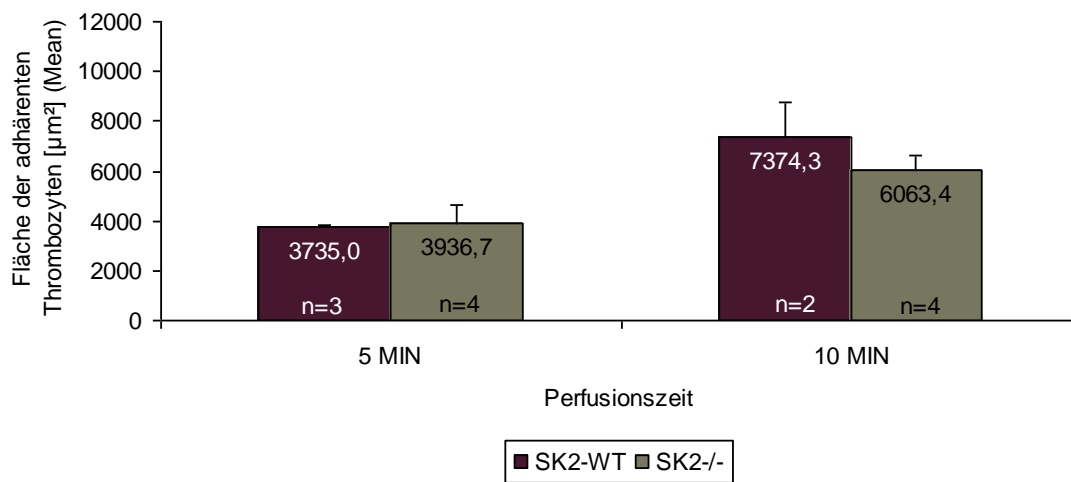


Abb. 4.23: Die Adhäsion von SK2-defizienten und SK2-Wildtyp Plättchen nach 5 min und 10 min Perfusion werden verglichen, Beschichtung: Kollagen

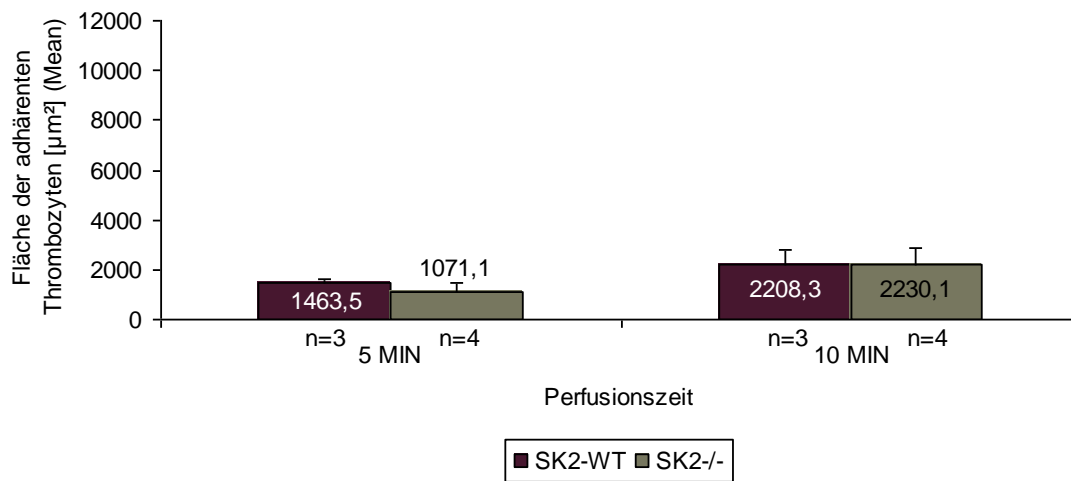


Abb. 4.24: Vergleich der Thrombozytenadhäsion von SK2^{-/-} und SK2-WT nach 5 min und 10 min Perfusion, Beschichtung: Laminin

4 Ergebnisse

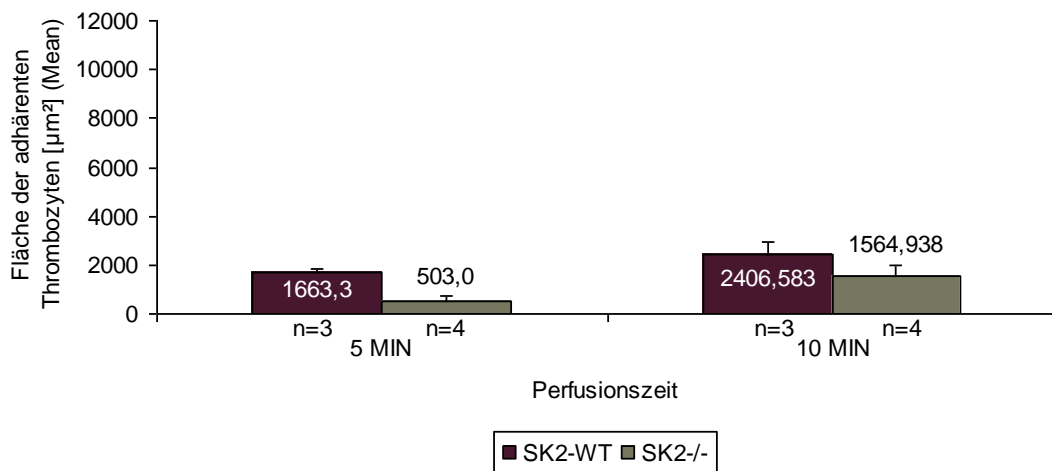


Abb. 4.25: Plättchenadhäsion von SK2^{-/-} und SK2-WT, Vergleich nach 5 min und 10 min Perfusion, Beschichtung: Fibrinogen

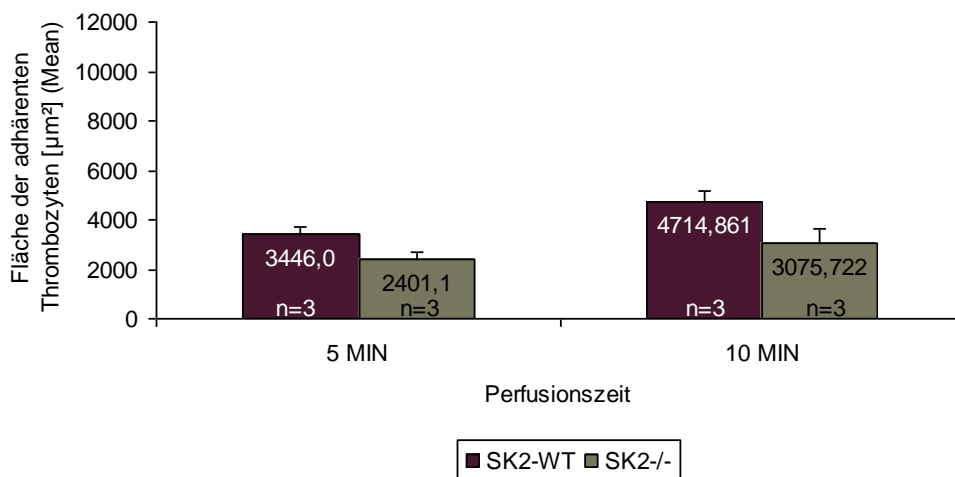


Abb. 4.26: Vergleich der Thrombozytenadhäsion von SK2^{-/-} und SK2-WT nach 5 min und 10 min Perfusion, Beschichtung: vWF

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.3.1 Etablierung eines in vitro Modells zur Untersuchung der Adhäsion muriner Thrombozyten

4.3.1.1 Einstellungen und Anpassungen des Flusskammersystems

Durch das kleine Kammervolumen, eine Minimierung des Totraumvolumens in Schläuchen und Reservoirs und eine Rezirkulation der Perfusionslösung kommt ein geringstmöglicher Materialeinsatz von 3 ml Lösung pro zu perfundierender Kammer zustande. Dadurch eignet sich die Kammer sehr gut für den Betrieb mit murinen Thrombozyten.

Eine Flussbewegung, die den physiologischen Verhältnissen möglichst nahe kommt, wird erreicht durch die Verwendung eines entsprechenden Pumpmechanismus und durch eine geeignete Anpassung des Programmablaufs.

Um eine suffiziente Thrombozytenadhäsion zu erreichen, ist die Zugabe von Erythrozyten nötig. Humane Erythrozyten haben sich als geeignet erwiesen, da sie in ausreichender Menge verfügbar sind und keine Interaktionen mit den murinen Thrombozyten hervorrufen. Ein physiologischer Hämatokrit ist zugleich wirkungsvoll und komplikationsarm.

4.3.1.2 Evaluierung der Beschichtungen der Kammeroberfläche

Der Vergleich der Thrombozytenadhäsion auf den verwendeten Oberflächen Kollagen, Laminin, Fibrinogen und vWF ergibt ein spezifisches Muster für jede Beschichtung.

Die Spezifität der Plättchenbindung für die jeweilige Oberfläche wird mit Hilfe spezieller Tests geprüft:

Die Kollagen-spezifische Plättchenadhäsion wird durch Behandlung der Kollagenoberfläche mit GPVI-Fc verhindert.

GP1Ib-defiziente Thrombozyten adhären nur schwach an Fibrinogen und deutlich weniger an vWF als Plättchen von C57Bl/6J-Mäusen.

Die Blockierung von GPIIb/IIIa am Thrombozyten durch den entsprechenden Antikörper anti-GPIIb/IIIa führt zu einer nur schwach ausgeprägten Thrombozytenadhäsion auf vWF.

4 Ergebnisse

4.3.2 Bedeutung von S1P für die Thrombozytenadhäsion in vitro

4.3.2.1 Auswirkungen von FTY720 und SEW2871 auf die Plättchenadhäsion

Durch die Behandlung der Versuchstiere mit SEW2871 wird die Thrombozytenadhäsion auf allen Oberflächen deutlich gehemmt. Die Hemmung ist signifikant für Kollagen, Fibrinogen und vWF.

Nach Behandlung mit FTY720 ist die Plättchenadhäsion noch stärker reduziert als nach Gabe von SEW2871.

4.3.2.2 Thrombozytenadhäsion im SK1^{-/-}-Modell

Die Adhäsion SK1-defizienter Thrombozyten ist im Vergleich zu SK-WT-Thrombozyten auf allen Oberflächen dezent vermehrt.

Nach fünf Minuten Perfusion der SK1^{-/-}-Thrombozyten über Kollagen oder vWF sind deutlich mehr Plättchen adhärent als bei Perfusion von WT-Thrombozyten.

Nach zehnminütiger Perfusion über vWF ist die Plättchenadhäsion bei SK1^{-/-} sogar signifikant erhöht.

4.3.2.3 Thrombozytenadhäsion in der SK2^{-/-}-Maus

Die Adhäsionsbereitschaften SK2-kompetenter und SK2-defizienter Thrombozyten unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Die Adhäsion von SK2-WT-Thrombozyten ist geringer als von SK1-WT-Thrombozyten. Aufgrund unterschiedlicher genetischer Hintergrundstämme (C57Bl/6J vs. Balb/c) sind diese Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar.

5 Diskussion

5.1 Wahl der Versuchstiere

Für alle beschriebenen Versuche wurden murine Thrombozyten verwendet. Murine Plättchen sind humanen Plättchen funktionell sehr ähnlich, auch wenn sie sich hinsichtlich Größe, Struktur und Anzahl durchaus voneinander unterscheiden (Jirouskova, Shet, and Johnson 2007, S.661-669). Die Sphingosinkinase-1 von Mäusen ist zu 85% identisch mit der humanen Variante (Nava et al. 2000, S.81-84). Der Vorteil der Maus als Versuchsmodell ist, dass an ihr genetische Veränderungen vorgenommen werden können, d.h. bestimmte Gene können gezielt abgeschaltet oder überexprimiert werden, um die Effekte des betreffenden Genprodukts zu untersuchen. Diese Tatsachen machen die Maus zu einem geeigneten Versuchsmodell, um die Thrombozytenadhäsion *in vitro* und den Einfluss von S1P auf dieselbe zu studieren.

C57Bl/6J ist ein häufig verwendeter genetisch gesunder Mäusestamm. Er ist der typische Wildtypstamm, der als Kontrollgruppe verwendet wird. Auch in der vorliegenden Arbeit werden die Kontrollversuche mit C57Bl/6J durchgeführt. Um einen systematischen Fehler aufgrund von Abweichungen in Alter, Gewicht und Geschlecht zu vermeiden, werden nur männliche Tiere im Alter von sechs bis zehn Wochen verwendet.

Die GPIIb^{-/-}-Knockout-Maus ist ein etabliertes Versuchsmodell um die Auswirkungen eines fehlenden Fibrinogenrezeptors auf die Funktion des Plättchens zu untersuchen. Aus diesem Grund eignet es sich zur Erprobung der Fibrinogenbeschichtung in dem neuen Flusskammermodell.

Mit Mäusen der Linien SK1^{-/-} und SK2^{-/-} können die Auswirkungen einer verringerten Sphingosinkinase-Aktivität und damit einem verminderten S1P-Plasmalevel erforscht werden. Bei beiden Knockout-Stämmen ist die S1P-Produktion jedoch nicht vollständig unterdrückt (S1P ist in SK1^{-/-} um mehr als 50%, in SK2^{-/-} um ca. 25% verringert), so dass SK1/2^{-/-} (kein S1P im Plasma nachweisbar) die noch besseren Versuchsobjekte wären (Kihara and Igarashi 2008, S.498). Zum Versuchszeitpunkt sind diese noch nicht verfügbar gewesen.

5.2 Diskussion des Flusskammermodells

Das neue Flusskammersystem kommt mit nur drei Millilitern Gesamtvolumen pro perfundiertem Kanal aus. Dies ist auf das kleine Kammervolumen (30 μ l), größtmögliche Volumeneinsparungen bei den Verbindungsschläuchen und den Reservoiren und die Rezirkulation der Zelllösung zurückzuführen. Dadurch ist dieses System besonders geeignet für Versuche mit begrenzt verfügbarem Material, wie es bei Versuchen mit murinen Thrombozyten der Fall ist.

Im Gefäßsystem wirken verschiedene Kräfte auf die Zellen ein. Je nach Geschwindigkeit ändern sich im Blut die Viskosität und damit auch die Reibungskräfte zwischen den Zellen. Dieses komplexe Kräftespiel nennt man Scherstress τ [dyn/m^2] oder Scherrate γ [$1/\text{s}$]. Arterielle Scherraten im Kreislaufsystem bewegen sich zwischen 800/s und 10 000/s im Bereich von Stenosen (Kulkarni et al. 2004, S.165), (Kroll et al. 1996, S.1526). Zielwert in dieser Versuchsreihe ist eine arterielle Scherrate. Ein weiteres Kriterium für eine physiologische Flusssituation ist die Einhaltung realistischer Flussgeschwindigkeiten. Um das zu erreichen, können intravitalmikroskopische Aufzeichnungen aus früheren Versuchen zu Hilfe genommen werden. Hier sieht man in welcher Geschwindigkeit fluoreszenzmarkierte Thrombozyten *in vivo* durch das Kreislaufsystem der lebenden Maus gepumpt werden. Anders als bei früheren Versuchen in der Arbeitsgruppe mit einer anderen Flusskammer und mit humanen Thrombozyten ist bei diesem Flusskammermodell die Zugabe von Erythrozyten zur Perfusionslösung nötig, damit Thrombozyten am Kammerboden adhären werden. Die Viskosität der Perfusionslösung entspricht in etwa der von Blut. Da Plasma eine Newton'sche Flüssigkeit ist, wird die Viskosität von Blut hauptsächlich von den Blutzellen bestimmt. Vermutlich hängt die geringe Plättchenadhäsion im Ibidi-Flusskammersystem damit zusammen, dass murine Thrombozyten kleiner sind als humane (Jirouskova, Shet, and Johnson 2007, S.662) und die Ibidi-Kammer mit 0,4 mm recht hoch ist, im Gegensatz zu 0,1 mm Höhe in der alten Kammer (Massberg et al. 2004, S.397-409). Durch diese beiden Faktoren ist vermutlich der Kontakt der kleinen Thrombozyten in der hohen Kammer erschwert. Die zugegebenen Erythrozyten ordnen sich gemäß Fahreus-Lindqvist-Effekt im Zentralstrahl an (=Axialmigration) und drücken so die kleineren Blutplättchen wandwärts. Dort wirkt zum einen der maximale Scherstress auf die Zellen (Kroll et al. 1996, S.1526), zum anderen kommen die Thrombozyten rein mechanisch besser mit den vorbeschichteten Proteinen in Kontakt. Da die Berechnung der Scherrate bei nicht-Newton'schen Flüssigkeit aufgrund der sich ändernden Eigenschaften im Fluss sehr schwierig ist, wird zur Ermittlung einer sinnvollen Flussrate die Flussgeschwindigkeit *in vivo* herangezogen. Bei einem eingestellten Druck von 1,5 millibar erzielt man eine Flussrate $Q = 2 \text{ ml}/\text{min}$. Diese Einstellung ergibt ein

5 Diskussion

physiologisches Geschwindigkeitsprofil.

Die Erythrozyten einer Maus reichen für einen Versuch nicht aus, auch das Poolen der roten Blutkörperchen aus mehreren Mäusen hat sich als ineffektiv erwiesen, da es mit hohem zeitlichen und materiellen Aufwand verbunden wäre. Humane Erythrozyten sind prinzipiell geeignet. Die murinen Thrombozyten interagieren aufgrund fehlender Blutgruppeneigenschaften nicht mit den humanen roten Blutzellen. Frisch präparierte Erythrozyten ohne Konservierungsmittel sind am schonendsten für die Thrombozyten. Wie in Vorversuchen festgestellt aktivieren Erythrozytenkonzentrate aus der Blutbank die Thrombozyten, vermutlich aufgrund der zugesetzten Substanzen oder der einsetzenden Hämolyse bei Lagerung.

Die Flusskammer ist ein geeignetes *in vitro* Modell, um isoliert die Thrombozytenadhäsion zu betrachten. Die physiologischen Verhältnisse werden vereinfacht. Zum einen, weil nur ein Matrixprotein anstelle des gesamten Endothels die Möglichkeit zur Bindung der Zellen bietet und zum anderen, weil gewaschene Thrombozyten ohne Plasma perfundiert werden, also nur eine Interaktion zwischen beschichtetem Protein und Thrombozyt möglich ist. Diese Situation lässt Rückschlüsse auf den Bindungsmechanismus zu. Auch wenn die Flusskammer ein besonders physiologisches Modell darstellt, handelt es sich dennoch um eine *in vitro* Methode. Der Vorteil gegenüber *in vivo* Modellen ist, dass viele Parameter nach Bedarf angepasst werden können: Flussgeschwindigkeit, Zusammensetzung der Zelllösung, Temperatur und die Gefäßstruktur (Beschichtung, Bifurkationen, Stenosen). Noch näher an der physiologischen Situation sind „Maus-betriebene“ *ex vivo* Flusskammermodelle. Es wird ein künstliches Gefäß an den Blutkreislauf der lebenden Maus angeschlossen. Der Nachteil an dieser Methode ist, dass weniger Parameter zu steuern sind. Die hämodynamischen Eigenschaften und die Flussgeschwindigkeit sind von der Maus vorgegeben (Hafezi-Moghadam, Thomas, and Cornelissen 2004, S.876-892).

Der Pumpmechanismus, der das Flusssystem antreibt ist besonders schonend für die Zellen. Die Flüssigkeit in den Reservoirs wird nur mittels Luftdruck bewegt, die Thrombozyten kommen also, anders als zum Beispiel bei einer Rollerpumpe, nie in direkten Kontakt mit dem Mechanismus und es sind keine Zonen mit erhöhter Scherrate im System vorhanden. Die Anordnung von drei Ventilen und drei getrennten Flusssystemen in Parallelschaltung erlaubt den direkten Vergleich der Adhäsion auf drei Oberflächen nach gleichzeitiger Perfusion.

5.3 Diskussion der Modelletablierung

Die Spezifitätstests sollen zeigen, ob die Thrombozyten wirklich über den für das beschichtete Matrixprotein spezifischen Bindungsmechanismus adhären werden.

GPVI ist der bedeutendste Kollagenrezeptor des Thrombozyten. Wie bereits aus früheren Versuchen bekannt ist, verhindert lösliches GPVI-Fc die Bindung zwischen Thrombozyt und immobilisiertem Kollagen (Massberg et al. 2004, S.397-409), (Massberg et al. 2003, S.41-49). Die Thrombozytenadhäsion an Kollagen ist sowohl in den vergangenen Versuchen, als auch im aktuellen Versuch stark vermindert. Allerdings ist immer noch eine Bindung an Kollagen über das Integrin GPIa möglich (Ruggeri and Mendolicchio 2007, S.1677-1680). GPIIb-Knockoutmäuse exprimieren kein GPIIb (Emambokus and Frampton 2003, S.33-45). GPIIb ist der Fibrinogenrezeptor des Thrombozyten, vermittelt mit geringerer Affinität jedoch auch die Bindung zu Fibronectin, Vitronectin und vWF (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008, S.408-410). Deshalb ist bei seinem Fehlen die Thrombozytenadhäsion sowohl auf Fibrinogen als auch auf vWF stark vermindert. In vergangenen Versuchen ist dieser Effekt bereits bestätigt worden (Massberg et al. 2002), (Massberg et al. 2005). GPIIb vermittelt durch Interaktion mit Fibrinogen nicht nur die Plättchen-Oberflächen-Adhäsion, sondern auch Plättchen-Plättchen-Bindungen. Dadurch erklärt sich, dass bei Perfusion über Fibrinogen Thrombozyten nicht nur einzeln adhären werden, sondern sich kleine Aggregate ausbilden. Bei Kontakt mit immobilisiertem Fibrinogen bleibt es aber bei Mikrothromben (Ruggeri and Mendolicchio 2007, S.1673-1682; Savage, Saldivar, and Ruggeri 1996, S.289-297).

Während die Bindung des Thrombozyten an Fibrinogen ausschließlich durch GPIIb vermittelt wird, gibt es für vWF auch die Möglichkeit über GPIa zu binden. Dieser Mechanismus ist besonders für die initiale Plättchenadhäsion von Bedeutung. Bei Blockade von GPIIb mit dem passenden Antikörper anti-GPIIb ist die Plättchenadhäsion an vWF folglich reduziert (Kleinschnitz et al. 2007; Ruggeri and Mendolicchio 2007, S.1675-1677).

Nach neueren Untersuchungen kann Laminin zur Plättchenaktivierung beitragen, indem es über das Integrin $\alpha_6\beta_1$ die Bindungen zwischen Kollagen und GPVI bzw. zwischen vWF und GPIIb-V-IX unterstützt. Bei der Perfusion isolierter Thrombozyten ohne Plasma über Laminin allein kann dieser Mechanismus folglich aber nicht wirksam sein. Daher kommt es nur zu einer geringen Adhäsion der Plättchen an Laminin über unspezifische Mechanismen (Inoue, Suzuki-Inoue, and Ozaki 2008, S.16279-16282).

Die dennoch stattfindende Adhäsion nach Blockade des für die Oberfläche spezifischen Bindungswegs ist zum einen auf die angesprochenen alternativen Bindungsmöglichkeiten und zum anderen auf unspezifische Adhäsion aufgrund übermäßiger Aktivierung oder lückenhafter Beschichtung zurückzuführen.

5 Diskussion

Nach fünf Minuten Perfusion ist die Thrombozytenadhäsion jeweils stärker gehemmt als nach zehn Minuten. Das deutet darauf hin, dass die Plättchen nach zehn Minuten bereits stärker aktiviert sind und damit eher auch unspezifisch binden. Ein zusätzlicher Grund für diese Beobachtung könnte sein, dass nach einer gewissen Aktivierungszeit die Bindung an Integrine zunimmt. Diese müssen erst ihre Konformation ändern um bindungsfähig zu werden (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008, S.407-410).

Die beschriebenen Tests belegen, dass durch Beschichtung der Kammeroberfläche eine Thrombozytenadhäsion über spezifische Mechanismen erreicht werden kann. Nachfolgend können also Unterschiede in der Adhäsion auf verschiedenen Oberflächen dem jeweiligen Protein und seinem Bindungsmechanismus an Plättchen zugeordnet werden.

5.4 Rolle der Sphingosinkinasen, S1P und der S1P-Rezeptoren für die Thrombozytenadhäsion *in vitro*

In SK1^{-/-}-Mäusen ist bekanntlich keine aktive SK1 nachweisbar, die S1P-Produktion ist dadurch um mehr als 50% reduziert. In SK2^{-/-}, also bei Fehlen einer aktiven SK2 ist die S1P-Plasmakonzentration um 25% reduziert. Bei SK1/2-Doppelknockouts ist die S1P-Produktion vollständig ausgeschaltet (Kihara and Igarashi 2008, S.498).

Die veränderte Verfügbarkeit von S1P scheint Auswirkungen auf die Plättchenfunktion zu haben. Thrombozyten SK1-defizienter Tiere adhäreren in den beschriebenen Versuchen stärker an die ihnen präsentierten Oberflächen, v.a. an Kollagen (5 min Ergebnis) und an vWF, als die Thrombozyten der Kontrolltiere. Allerdings wird die Adhäsion bei Fehlen der SK2 nicht beeinflusst. Die Versuchsgruppen SK2-WT verglichen mit SK2^{-/-} sind aufgrund der momentan noch limitierten Nachzuchtmöglichkeiten mit n = 2-4 zu klein um verlässliche Aussagen treffen zu können. Die Ergebnisse der Versuchsreihe sollten nach Auffüllung der Versuchsgruppen erneut bewertet werden. Zudem ist eine Wiederholung der Versuche mit SK2^{-/-} auf C57Bl/6J-Hintergrund wegen einer besseren Vergleichbarkeit der Versuche mit SK1^{-/-} sinnvoll. Diese Tiere sind zum Zeitpunkt der Versuche noch nicht verfügbar gewesen. Das Adhäsionsniveau bei den Balb/c-Tieren ist nämlich auf allen Oberflächen niedriger als bei den C57Bl/6J-Tieren. Ein möglicher Grund dafür, dass Thrombozyten ohne SK2 nicht stärker adhäreren als Wildtyptiere ist, dass die S1P-Produktion bei diesen Tieren nur um 25% gesenkt ist (im Gegensatz zur über 50%igen Reduktion bei SK1^{-/-}) und das verbleibende S1P ausreicht um die Plättchen auf ihrem physiologischen Aktivierungsgrad zu halten.

Plättchen galten bisher als Hauptquelle und –Speicherort für S1P. Neueren Erkenntnissen zufolge setzen aber auch Erythrozyten S1P frei. Anders als Thrombozyten, die S1P nach Aktivierung abgeben, sezernieren sie S1P kontinuierlich (Yatomi 2008). Daher ist es möglich, dass durch die Zugabe von humanen, Sphingosinkinase enthaltenden Erythrozyten der Mangel an S1P aus SK-defizienten Thrombozyten ausgeglichen wird. Dagegen spricht, dass die Erythrozyten erst unmittelbar vor der Perfusion zugegeben werden und ein Aufbau einer relevanten S1P-Konzentration im Medium nicht so schnell erfolgen kann. Um diese Möglichkeit jedoch ausschließen zu können sollten die Versuche ohne Erythrozyten wiederholt werden. Eine Verwendung von kleinen Kunststoffkügelchen, sog. Beads, als Ersatz für die Blutkörperchen ist ebenso denkbar wie die erneute Durchführung der Versuche in einer anderen Flusskammer, in der die Zugabe von Erythrozyten nicht nötig ist.

Um den Einfluss von S1P auf die Thrombozytenadhäsion umfassend klären zu können, sollten die Thrombozyten von SK1/2^{-/-} auf ihre Adhäsionseigenschaften hin untersucht werden, weil ihnen S1P völlig fehlt. Diese Tiere stehen der Arbeitsgruppe derzeit noch nicht zur Ver-

5 Diskussion

fügung.

Es bleibt zu klären, wie S1P im vorliegenden Versuch auf die Thrombozyten einwirkt. Das Plasma und damit auch das darin enthaltene S1P werden bei der Isolierung der Thrombozyten entfernt. Allerdings müsste auch der S1P-Gehalt SK-defizienter Plättchen geringer sein als bei Wildtypen. Es gibt Hinweise, dass S1P aus Thrombozyten als lokaler Mediator wirkt, d.h. es wird aus den Zellen freigesetzt und wirkt dann von außen auf diese ein (Yatomi et al. 1997). Vermutlich ist Proteinkinase C an dem Freisetzungsvorgang beteiligt. Fünf Minuten nach Aktivierung sind 35% und zehn Minuten danach 53% des in Plättchen gespeicherten S1P aus den Zellen freigesetzt worden (Yatomi et al. 1997, S.5294). Der davon ausgelöste Effekt wird allerdings kontrovers diskutiert. Es gibt Untersuchungen, die eine Konformationsänderung und gesteigerte Aggregationsneigung durch exogenes S1P zeigen (Karlner 2002; Yatomi et al. 1997); (Randriamboavonjy et al. 2009). Diese Wirkung wird ersten Hinweisen zufolge durch eine Aktivierung des RhoA-Rho-Kinase-Signalwegs und nachfolgende Calciummobilisierung aus intrazellulären Speichern hervorgerufen (Levade et al. 2001). Dieser Signalweg wird möglicherweise durch Stimulation von S1P₃ verursacht (Randriamboavonjy et al. 2009). Rho und Rac werden eine Mitwirkung bei zytoskelettalen Rearrangements und der Zellmotilität zugeschrieben und können so vermutlich auf die Formänderung der Thrombozyten Einfluss nehmen (Payne, Milstien, and Spiegel 2002). Auch S1P₁ und S1P₂ scheinen einen Einfluss auf die Plättchenaktivierung zu haben, jedoch ohne die Calciumhomöostase zu beeinflussen (Payne, Milstien, and Spiegel 2002), (Rapizzi et al. 2007). Interessant ist die Beobachtung von (Rapizzi et al. 2007), dass S1P₁ und S1P₂ regulär exprimiert die Calciummobilisierung fördern, jedoch bei ektopter Expressierung die Calcium-Freisetzung hemmen. Entgegen dieser Beobachtungen beschreibt eine Studie von (Nugent and Xu 2000) die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch S1P. Schließlich könnte S1P auch als sog. Second Messenger die Plättchenaktivierung beeinflussen. S1P ist nämlich fähig durch intrazelluläre Bindung an noch nicht bekannte Ziele ebenfalls Calcium freizusetzen (Taha, Hannun, and Obeid 2006, S.120). Gegen diese Möglichkeit spricht die Feststellung von (Yatomi et al. 1997, S.5293), dass nur exogen zugeführtes S1P die Plättchenaggregation steigert.

Die Versuche ergeben eine Verminderung der Plättchenadhäsion durch Behandlung der Tiere bzw. der Thrombozyten mit FTY720 oder SEW2871. Man kann festhalten, dass die Hemmung durch FTY720 stärker ist als durch das S1P₁-selektive SEW2871. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass S1P₁ mit der Plättchenhemmung zu tun hat, jedoch nicht allein dafür verantwortlich ist. Durch FTY720 werden zusätzlich die Rezeptoren S1P₃ – S1P₅ angesprochen. Das Resultat ist eine noch geringere Plättchenadhäsion als bei Behandlung mit SEW2871.

5 Diskussion

FTY720 entfaltet seine Wirkung im phosphorylierten Zustand. Diese Phosphorylierung wird überwiegend durch SK2 bewerkstelligt (Kihara and Igarashi 2008, S.498), (Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1894-1896). Demnach sollte eine Behandlung mit FTY720 bei SK2^{-/-}-Mäusen ohne Wirkung auf die Thrombozyten bleiben. Diese Hypothese könnte mit weiteren Versuchen geklärt werden.

FTY720 und SEW2871 sind S1P-Analoga an definierten S1P-Rezeptoren. Es bleibt unklar, ob sie ihre Wirkung als Agonisten oder als Antagonisten an diesen Rezeptoren entfalten. Bei Langzeiteinwirkung von FTY720 ist eine antagonistische Wirkung auf das Immunsystem erwiesen. Durch Rezeptorinternalisierung und -degradierung wird das Expressionslevel von S1P₁ auf Lymphozyten gesenkt (Massberg and von Andrian 2006, S.1089). Diese Fähigkeit zur Verminderung der auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren ist jedoch möglicherweise abhängig von der Dauer der Einwirkung, vom stimulierten Gewebe und vom angesprochenen Rezeptorsubtyp (Massberg and von Andrian 2006, S.1089), (Keul et al. 2007, S.612). In Plättchen ist also sowohl eine agonistische als auch eine antagonistische Wirkungsweise denkbar. Im Gegensatz zu FTY720 ist SEW2871 nicht in der Lage das Expressionslevel von S1P₁ herunterzuregulieren (Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1896). SEW2871 wirkt also als Agonist am S1P₁-Rezeptor. Für die vorliegenden Versuche bedeutet das Folgendes: SEW2871 hemmt die Thrombozytenadhäsion durch seine agonistische Wirkung am S1P₁-Rezeptor. Folglich muss auch die Hemmung der Plättchen durch FTY720 durch eine Stimulation von S1P-Rezeptoren erfolgen. Die Hemmung fällt nach Behandlung mit FTY720 vermutlich stärker aus als nach Behandlung mit SEW2871, weil durch FTY720 mehrere Rezeptorsubtypen angesprochen werden. Zu dieser Überlegung passt auch das Ergebnis der Versuchsreihe mit SK1-Knockout Tieren. Durch den verringerten S1P-Gehalt der Thrombozyten ist dort die Plättchenadhäsion gesteigert. Bei S1P-analoger Stimulierung der S1P-Rezeptoren mit S1P-Agonisten ist dagegen die Plättchenadhäsion vermindert.

Über den dahinter stehenden Mechanismus kann derzeit nur spekuliert werden. Eine Arbeitsgruppe entdeckte, dass FTY720 die Aktivität der S1P-Lyase hemmt. Dadurch steige der S1P-Gehalt in Thrombozyten an und FTY720 hätte somit eine S1P-agonistische Wirkung ohne an S1P-Rezeptoren zu binden (Bandhuvula et al. 2005, S.33697-33700). Dieser Mechanismus mag zur Wirkung von FTY720 beitragen. In den durchgeführten Versuchen kann er jedoch keine Bedeutung haben, da Plättchen keine S1P-Lyase besitzen. Auch wenn der genaue Wirkmechanismus der S1P-Agonisten FTY720 und SEW2871 nicht geklärt ist, kann eine Bindung an S1P-Rezeptoren, wie sie bereits für andere Bereiche nachgewiesen wurde (Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1894-1896), (Massberg and von Andrian 2006, S.1088-1091), angenommen werden. Welche Rezeptoren im Einzelnen dafür verantwortlich sind und

5 Diskussion

welche Signalwege diese in den Zellen aktivieren oder hemmen, könnte durch Versuche mit S1P-Rezeptor-defizienten Mäusen untersucht werden.

Letztendlich bleiben der Mechanismus, durch den S1P und die S1P-Rezeptormodulatoren SEW2871 und FTY720 die Plättchenfunktion beeinflusst, und der Grund für die beobachtete Plättchenhemmung durch S1P oder S1P-analoge Stimulierung nicht vollständig geklärt. Die Bedeutung von S1P im kardiovaskulären System und für die Thrombozyten ist aufgrund seiner komplexen Interaktionen mit den verschiedenen S1P-Rezeptoren und mit anderen Rezeptorklassen schwer zu erfassen. Die teilweise widersprüchlichen Studienergebnisse könnten mitunter auf die Anwendung verschiedener Versuchsmodelle zurückgeführt werden. Für die Wirkung von S1P auf die Atherosklerose scheinen vor allem S1P₁ – S1P₃ von Bedeutung zu sein (Tolle et al. 2007, S.171-179). Welche Rezeptoren letztlich für die Wirkung auf Thrombozyten verantwortlich sind, kann jedoch erst geklärt werden, wenn bekannt ist, welche S1P-Rezeptoren von Thrombozyten exprimiert werden.

5.5 Möglicher Einfluss der Thrombozytenhemmung durch S1P auf die Atherosklerose

Auch wenn die genauen molekularen und zellulären Signalwege, die zu Atherosklerose und arterieller Thrombose führen noch nicht hinreichend geklärt sind, ist die große Bedeutung von Thrombozyten für die Atherogenese schon lange bekannt. Thrombozyten sind eine der ersten Zellarten, die am dysfunktionellen Endothel in den Frühstadien der Atherosklerose adhären werden. Sie spielen somit eine wichtige Rolle bei der Initiation der Atherosklerose. Doch auch für die Entstehung der Hauptkomplikation der Atherosklerose, der Atherothrombose, sind Thrombozyten von großer Bedeutung (Ross 1999, S.120). Eine Studie von Keul et. al. (Keul et al. 2007) und Ergebnisse aus *in vivo* Versuchen innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe zeigen eine stark verminderte Atherosklerosebildung in ApoE^{-/-} nach Behandlung mit dem S1P-Agonisten FTY720. Neben anderen Mechanismen ist dies vermutlich auf eine verminderte Thrombozytenaggregation nach Einwirkung von FTY720 oder SEW2871 zurückzuführen, die ebenfalls in einem Versuch gezeigt werden konnte. Diese Resultate passen zu den Ergebnissen aus den vorliegenden Versuchen. Durch weitere *in vivo* und *in vitro* Experimente lassen sich zukünftig vielleicht die Signalwege aufklären, die für die veränderte Thrombozytenfunktion nach Applikation der S1P-Agonisten oder durch veränderte S1P-Level in SK-Knockout-Mäusen verantwortlich sind.

5.6 Ausblick

Die Rolle von S1P in der Atherosklerose und für die Plättchenadhäsion wird derzeit noch kontrovers diskutiert (Levade et al. 2001, S.963; Randriamboavonjy et al. 2009). Die Wirkung von S1P auf das kardiovaskuläre System und die Thrombozytenadhäsion ist sehr komplex aufgrund mehrerer beteiligter Rezeptoren und deren unterschiedlicher Expression auf verschiedenen Zellarten. Weitere Grundlagenforschung zur Aufklärung der Mechanismen und Signalwege ist nötig, um künftig neue spezifischere Therapiestrategien zur Verhinderung der Atherogenese und Atheroprogression zu entwickeln. Denkbar sind Versuche mit Rezeptorspezifischen S1P-Agonisten und –Antagonisten, mit S1P-Rezeptor-Knockout-Mäusen oder Inhibitoren der Sphingosinkinase, S1P-Lyase und S1P-Phosphatase (Davis et al. 2005, S.9833-9841; Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1893-1900). Modulatoren des S1P-Rezeptors könnten in der Zukunft neuartige Medikamente im Kampf gegen die Atherosklerose sein, die derzeit in der industrialisierten Welt eine der häufigsten Todesursachen darstellt (Libby, Ridker, and Maseri 2002, S.1135). Sie könnten lokal, z.B. in Medikamenten-beschichteten Stents, appliziert werden. Durch diese Anwendungsform könnten systemische Nebenwirkungen, genannt sei die S1P₃-vermittelte Bradykardie bei Gabe von FTY720, verringert werden (Levade et al. 2001, S.963-964). Erste klinische Studien weisen eine Hemmung von hyperaktiven Plättchen bei Diabetes mellitus Typ II Patienten durch Aktivierung von S1P₂ nach (Randriamboavonjy et al. 2009). FTY720 wird derzeit als Immunsuppressivum in Studien am Patienten angewendet. Eine neue therapeutische Möglichkeit für FTY720 ist sein Einsatz als Atheroprotektivum. Für diese Anwendung könnte die immunsuppressive Wirkung zum limitierenden Faktor werden. Die Entwicklung eines Medikaments, das selektiv Einfluss auf das Gefäßsystem und die an der Atherosklerose beteiligten Zellen, z.B. Makrophagen und Thrombozyten, nimmt und dabei das Immunsystem unbeeinflusst lässt (Tolle et al. 2007, S.177), wäre wünschenswert. Umgekehrt könnten organtransplantierte Patienten von der breiten Wirkung des FTY720 sogar profitieren. So konnte das Medikament bei Nierentransplantierten Patienten das Risiko für eine Transplantatabstoßung verringern. Zudem könnte es möglicherweise die sich regelmäßig im Transplantat entwickelnde Atherosklerose vermindern (Keul et al. 2007, S.612). Diese ersten klinischen Erfolge und die vielen noch unerforschten Möglichkeiten der Beeinflussung der S1P-vermittelten Signalwege verdeutlichen die Wichtigkeit weiterer Grundlagenforschung auf diesem Gebiet.

6 Zusammenfassung

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle sowohl in der initialen Phase der Atherosklerose als auch bei thrombembolischen Komplikationen der späten Atherosklerose. Sie werden als eine der ersten Zellarten am dysfunktionalen Endothel adhären und setzen eine Reihe proinflammatorischer Substanzen frei. Erosionen und Plaquerupturen führen zur Aktivierung von Thrombozyten und zu ihrer Aggregation sowie zur Bildung eines Thrombus. Die Folge ist ein Herzinfarkt oder Schlaganfall. Die genauen Mechanismen, die die Aktivierung der Thrombozyten im atherosklerotischen Gefäß auf molekularer und zellulärer Ebene beeinflussen und regulieren sind bisher noch nicht vollständig bekannt.

In dieser Dissertation wurde ein neues Flusskammermodell entwickelt. Diese Mehrkanal-Flusskammer erlaubt einen direkten Vergleich der Interaktionen zwischen Thrombozyten und verschiedenen Matrixproteinen unter arteriellen Flussbedingungen. Der Versuchsaufbau ist so konstruiert, dass zur Perfusion nur eine geringe Menge an Blutzellen benötigt wird. Daher ist dieses Flusskammersystem eine adäquate Methode zur Analysierung von Mausmodellen (z.B. Knockout-Mäuse).

Sphingosin 1-Phosphat (S1P) gehört zur Gruppe sogenannter bioaktiver Sphingolipide, dem unter anderem eine regulatorische Funktion bei der Atherosklerose zugesprochen wird. Wie es auf diesen Prozess wirkt, ist bislang nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von S1P, den Sphingosinkinasen (SK1 und SK2) und der S1P-Rezeptoren (S1P₁₋₅) auf die Thrombozytenadhäsion untersucht.

Dazu wurde das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten, die mit einem der S1P-Rezeptormodulatoren SEW2871 oder FTY720 vorbehandelt waren, in der neuen Flusskammer analysiert. Die Bindung an S1P₁- bzw. S1P_{1,3-5}-Rezeptoren löste eine deutliche Reduzierung der Plättchenadhäsion auf allen verwendeten Oberflächen aus.

Demgegenüber führte eine Perfusion von Thrombozyten SK1-defizienter Mäuse zu einer teilweise erheblichen Steigerung der Thrombozytenadhäsion. Der bei den SK1^{-/-}-Mäusen verringerte S1P-Gehalt der Blutplättchen hatte vor allem bei Perfusion über von Willebrand Faktor (vWF) einen steigernden Effekt auf die Plättchenadhäsion.

6 Zusammenfassung

Das Fehlen der SK2 in SK2^{-/-} Tieren schien dagegen keinen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten zu haben. Der Grund dafür bleibt unbekannt.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass S1P und die S1P-Rezeptoren einen Einfluss auf die für die Atherosklerose so wichtige Thrombozytenadhäsion haben. In anderen Studien und durch Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass S1P auch Effekte auf inflammatorische und proliferative Prozesse im atherosklerotischen Gefäß hat.

Die Signalwege von S1P sind möglicherweise Angriffspunkte für neuartige Medikamente im Kampf gegen die Atherosklerose. FTY720 und SEW2871 befinden sich derzeit bereits in klinischer Erprobung als Immunmodulatoren. Um ihre Anwendungsmöglichkeiten als Medikamente gegen Atherosklerose zu prüfen und um neue Therapieansätze zu entwickeln, ist weitere Grundlagenforschung auf diesem Gebiet dringend geboten.

7 Summary

The role of sphingosine 1-phosphate for platelet function – establishing an *in vitro* flow chamber model to analyse murine platelets

Thrombocytes play a pivotal role in the initial stage of atherosclerosis and in thromboembolic complications of late atherosclerosis. They adhere to the dysfunctional endothelium as one of the first cells and release many different inflammatory substances. Erosion and plaque rupture of atherosclerotic plaques lead to activation and aggregation of platelets and initiate thrombus formation. The clinical consequences are heart attack or stroke. The molecular and cellular mechanisms which regulate the activation of thrombocytes in the atherosclerotic vasculature are not yet completely understood.

Within the framework of this dissertation, a novel flow chamber model was developed. This multichannel flow chamber allows to directly compare the interactions between platelets and different matrix proteins under arterial flow conditions. Only few blood cells are required for this experimental setup. Thus, this perfusion system is a suitable method to analyse mouse models (e.g. knockout mice).

Sphingosine 1-phosphate is one bioactive sphingolipid, which is reported to have - among others - also regulatory functions in the process of atherosclerosis. However, the underlying mechanisms remain elusive.

In this doctoral thesis, I investigated the influence of S1P, the sphingosine kinases (SK1 and SK2) and the S1P-receptors (S1P₁₋₅) on platelet adhesion.

For this purpose the characteristics of thrombocyte binding was analysed in the new flow chamber after treating platelets with the S1P-receptormodulators SEW2871 or FTY720. The binding to S1P₁ respectively S1P_{1,3-5} caused a considerable reduction of platelet adhesion on all surfaces.

In contrast to this finding, using SK1-deficient mice and perfusing their thrombocytes, which contain less S1P, led to increased platelet adhesion. This was especially the case when *von Willebrand factor* was coated as matrix protein in flow chamber studies.

In summary, the presented results show the influence of S1P and S1P-receptors on platelet adhesion, which is very important for atherosclerosis. In further studies we and others were able to demonstrate that S1P also effects inflammation and proliferation in the atherosclerotic vasculature.

Thus, signalling pathways modulated by S1P represent an interesting and novel therapeutic target and may be effective against atherosclerosis. Several clinical trials currently address the immunomodulating effect of FTY720 and SEW2871. To test their properties as potential

7 Summary

drugs for the treatment of atherosclerosis and to generate new therapeutic strategies, further basic research is required.

8 Literaturverzeichnis

AB. *Applied Biosystems* von

http://www4.appliedbiosystems.com/tools/pathway/protein_list_grp.php?pathway=LDL%20Oxidation%20in%20Atherogenesis&pname=SMPD1,SMPD2,SMPD3,cPLA2Alpha,cPLA2Beta,cPLA2Gamma.

Afri, M., A. A. Frimer, and Y. Cohen. 2004. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer. Part IV: Locating 2',7'-dichlorofluorescein (DCF), 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) in the lipid bilayer. *Chem Phys Lipids* 131 (1):123-33.

Allende, M. L., T. Sasaki, H. Kawai, A. Olivera, Y. Mi, G. van Echten-Deckert, R. Hajdu, M. Rosenbach, C. A. Keohane, S. Mandala, S. Spiegel, and R. L. Proia. 2004. Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J Biol Chem* 279 (50):52487-92.

Anada, Y., Y. Igarashi, and A. Kihara. 2007. The immunomodulator FTY720 is phosphorylated and released from platelets. *Eur J Pharmacol* 568 (1-3):106-11.

Bandhuvula, P., Y. Y. Tam, B. Oskouian, and J. D. Saba. 2005. The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity. *J Biol Chem* 280 (40):33697-700.

Becker, Eberhard. *Fluoreszenzmikroskopie*.

Brayton, C. F. 1986. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet* 76 (1):61-90.

Da Violante, G., N. Zerrouk, I. Richard, G. Provot, J. C. Chaumeil, and P. Arnaud. 2002. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull* 25 (12):1600-3.

Davis, M. D., J. J. Clemens, T. L. Macdonald, and K. R. Lynch. 2005. Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists. *J Biol Chem* 280 (11):9833-41.

Deutschman, D. H., J. S. Carstens, R. L. Klepper, W. S. Smith, M. T. Page, T. R. Young, L. A. Gleason, N. Nakajima, and R. A. Sabbadini. 2003. Predicting obstructive coronary artery disease with serum sphingosine-1-phosphate. *Am Heart J* 146 (1):62-8.

Emambokus, N. R., and J. Frampton. 2003. The glycoprotein IIb molecule is expressed on early murine hematopoietic progenitors and regulates their numbers in sites of hematopoiesis. *Immunity* 19 (1):33-45.

Falati, S., P. Gross, G. Merrill-Skoloff, B. C. Furie, and B. Furie. 2002. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med* 8 (10):1175-81.

Fluorophores.org. *CFDA-SE* von

http://www.analytchem.tugraz.at/fluorophores/Show_SearchResult.php?Spacer=0&SubstanceID=14&Application=1.

Furie, B., and B. C. Furie. 2005. Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest* 115 (12):3355-62.

8 Literaturverzeichnis

- Gawaz, M. 2006. Platelets in the onset of atherosclerosis. *Blood Cells Mol Dis* 36 (2):206-10.
- Gawaz, Meinrad Paul. *Blood platelets*.
- GE. *GE Healthcare Bio-Sciences, Amersham Biosciences* [cited].
- George, J. N. 2000. Platelets. *Lancet* 355 (9214):1531-9.
- Hafezi-Moghadam, A., K. L. Thomas, and C. Cornelissen. 2004. A novel mouse-driven ex vivo flow chamber for the study of leukocyte and platelet function. *Am J Physiol Cell Physiol* 286 (4):C876-92.
- Hansson, G. K. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352 (16):1685-95.
- Herman, Brian. *Fluorescence microscopy*.
- Hla, T. 2004. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin Cell Dev Biol* 15 (5):513-20.
- Holme, P. A., U. Orvim, M. J. Hamers, N. O. Solum, F. R. Brosstad, R. M. Barstad, and K. S. Sakariassen. 1997. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (4):646-53.
- Horn, Elias. *Coating procedures for the ibidi μ -Slide product family 2007* von: http://www.ibidi.de/service/app_notes/AN08_Coating.pdf.
- Huo, Y., and K. F. Ley. 2004. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 14 (1):18-22.
- Huwiler, A., and J. Pfeilschifter. 2008. New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets. *Biochem Pharmacol* 75 (10):1893-900.
- Ibidi_GmbH. μ -slide VI. Martinsried.
- Inoue, O., K. Suzuki-Inoue, and Y. Ozaki. 2008. Redundant mechanism of platelet adhesion to laminin and collagen under flow: involvement of von Willebrand factor and glycoprotein Ib-IX-V. *J Biol Chem* 283 (24):16279-82.
- Insull, W., Jr. 2009. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med* 122 (1 Suppl):S3-S14.
- Jennings, L. K. 2009. Role of platelets in atherothrombosis. *Am J Cardiol* 103 (3 Suppl):4A-10A.
- Jirouskova, M., A. S. Shet, and G. J. Johnson. 2007. A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations. *J Thromb Haemost* 5 (4):661-9.
- Karliner, J. S. 2002. Lysophospholipids and the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta* 1582 (1-3):216-21.
- Keul, P., M. Tolle, S. Lucke, K. von Wnuck Lipinski, G. Heusch, M. Schuchardt, M. van der Giet, and B. Levkau. 2007. The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (3):607-13.

8 Literaturverzeichnis

- Kihara, A., and Y. Igarashi. 2008. Production and release of sphingosine 1-phosphate and the phosphorylated form of the immunomodulator FTY720. *Biochim Biophys Acta* 1781 (9):496-502.
- Kleinschnitz, C., M. Pozgajova, M. Pham, M. Bendszus, B. Nieswandt, and G. Stoll. 2007. Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation* 115 (17):2323-30.
- Kroll, M. H., J. D. Hellums, L. V. McIntire, A. I. Schafer, and J. L. Moake. 1996. Platelets and shear stress. *Blood* 88 (5):1525-41.
- Kulkarni, S., W. S. Nesbitt, S. M. Dopheide, S. C. Hughan, I. S. Harper, and S. P. Jackson. 2004. Techniques to examine platelet adhesive interactions under flow. *Methods Mol Biol* 272:165-86.
- Kurz, K. D., B. W. Main, and G. E. Sandusky. 1990. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* 60 (4):269-80.
- Levade, T., N. Auge, R. J. Veldman, O. Cuvillier, A. Negre-Salvayre, and R. Salvayre. 2001. Sphingolipid mediators in cardiovascular cell biology and pathology. *Circ Res* 89 (11):957-68.
- Libby, P., P. M. Ridker, and A. Maseri. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105 (9):1135-43.
- Lien, Y. H., K. C. Yong, C. Cho, S. Igarashi, and L. W. Lai. 2006. S1P(1)-selective agonist, SEW2871, ameliorates ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 69 (9):1601-8.
- Liu, Y., R. Wada, T. Yamashita, Y. Mi, C. X. Deng, J. P. Hobson, H. M. Rosenfeldt, V. E. Nava, S. S. Chae, M. J. Lee, C. H. Liu, T. Hla, S. Spiegel, and R. L. Proia. 2000. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 106 (8):951-61.
- Martin, Y., M. Lepine, A. Bannari, and P. Vermette. 2007. Instrument and technique for the in vitro screening of platelet activation from whole blood samples. *Rev Sci Instrum* 78 (5):054302.
- Massberg, S., K. Brand, S. Gruner, S. Page, E. Muller, I. Muller, W. Bergmeier, T. Richter, M. Lorenz, I. Konrad, B. Nieswandt, and M. Gawaz. 2002. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 196 (7):887-96.
- Massberg, S., S. Eisenmenger, G. Enders, F. Krombach, and K. Messmer. 1998. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)* 198 (1):23-35.
- Massberg, S., M. Gawaz, S. Gruner, V. Schulte, I. Konrad, D. Zohlhofer, U. Heinzmann, and B. Nieswandt. 2003. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 197 (1):41-9.
- Massberg, S., I. Konrad, A. Bultmann, C. Schulz, G. Munch, M. Peluso, M. Lorenz, S. Schneider, F. Besta, I. Muller, B. Hu, H. Langer, E. Kremmer, M. Rudelius, U. Heinzmann, M. Ungerer, and M. Gawaz. 2004. Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo. *Faseb J* 18 (2):397-9.

8 Literaturverzeichnis

- Massberg, S., K. Schurzinger, M. Lorenz, I. Konrad, C. Schulz, N. Plesnila, E. Kennerknecht, M. Rudelius, S. Sauer, S. Braun, E. Kremmer, N. R. Emambokus, J. Frampton, and M. Gawaz. 2005. Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation* 112 (8):1180-8.
- Massberg, S., and U. H. von Andrian. 2006. Fingolimod and sphingosine-1-phosphate--modifiers of lymphocyte migration. *N Engl J Med* 355 (11):1088-91.
- Nava, V. E., E. Lacana, S. Poulton, H. Liu, M. Sugiura, K. Kono, S. Milstien, T. Kohama, and S. Spiegel. 2000. Functional characterization of human sphingosine kinase-1. *FEBS Lett* 473 (1):81-4.
- Nofer, J. R., M. van der Giet, M. Tolle, I. Wolinska, K. von Wnuck Lipinski, H. A. Baba, U. J. Tietge, A. Godecke, I. Ishii, B. Kleuser, M. Schafers, M. Fobker, W. Zidek, G. Assmann, J. Chun, and B. Levkau. 2004. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest* 113 (4):569-81.
- Nugent, D., and Y. Xu. 2000. Sphingosine-1-phosphate: characterization of its inhibition of platelet aggregation. *Platelets* 11 (4):226-32.
- Packard, R. R., and P. Libby. 2008. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem* 54 (1):24-38.
- Payne, S. G., S. Milstien, and S. Spiegel. 2002. Sphingosine-1-phosphate: dual messenger functions. *FEBS Lett* 531 (1):54-7.
- Rand, M. L., R. Leung, and M. A. Packham. 2003. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci* 28 (3):307-17.
- Randriamboavonjy, V., K. Badenhoop, H. Schmidt, G. Geisslinger, B. Fisslthaler, and I. Fleming. 2009. The S1P(2) receptor expressed in human platelets is linked to the RhoA-Rho kinase pathway and is down regulated in type 2 diabetes. *Basic Res Cardiol*.
- Rapizzi, E., C. Donati, F. Cencetti, P. Pinton, R. Rizzuto, and P. Bruni. 2007. Sphingosine 1-phosphate receptors modulate intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 353 (2):268-74.
- Riches, A. C., J. G. Sharp, D. B. Thomas, and S. V. Smith. 1973. Blood volume determination in the mouse. *J Physiol* 228 (2):279-84.
- Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 (2):115-26.
- Ruggeri, Z. M., and G. L. Mendolicchio. 2007. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 100 (12):1673-85.
- Savage, B., E. Saldivar, and Z. M. Ruggeri. 1996. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84 (2):289-97.
- Spiegel, S., and S. Milstien. 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (5):397-407.

8 Literaturverzeichnis

- Taha, T. A., Y. A. Hannun, and L. M. Obeid. 2006. Sphingosine kinase: biochemical and cellular regulation and role in disease. *J Biochem Mol Biol* 39 (2):113-31.
- Tolle, M., B. Levkau, P. Keul, V. Brinkmann, G. Giebing, G. Schonfelder, M. Schafers, K. von Wnuck Lipinski, J. Jankowski, V. Jankowski, J. Chun, W. Zidek, and M. Van der Giet. 2005. Immunomodulator FTY720 Induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circ Res* 96 (8):913-20.
- Tolle, M., B. Levkau, B. Kleuser, and M. van der Giet. 2007. Sphingosine-1-phosphate and FTY720 as anti-atherosclerotic lipid compounds. *Eur J Clin Invest* 37 (3):171-9.
- Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt. 2008. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (3):403-12.
- Vassallo, R. R., and S. Murphy. 2006. A critical comparison of platelet preparation methods. *Curr Opin Hematol* 13 (5):323-30.
- Venkataraman, K., Y. M. Lee, J. Michaud, S. Thangada, Y. Ai, H. L. Bonkovsky, N. S. Parikh, C. Habrukowich, and T. Hla. 2008. Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate. *Circ Res* 102 (6):669-76.
- von Hundelshausen, P., F. Petersen, and E. Brandt. 2007. Platelet-derived chemokines in vascular biology. *Thromb Haemost* 97 (5):704-13.
- Wang, X. Q., X. M. Duan, L. H. Liu, Y. Q. Fang, and Y. Tan. 2005. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37 (6):379-85.
- www.mikroskopie.de. *Strahlengang im Fluoreszenzmikroskop* von:
<http://Mikroskopie.de/kurse/navigation/fluoreszenz/kurs.htm>.
- Xu, C. B., J. Hansen-Schwartz, and L. Edvinsson. 2004. Sphingosine signaling and atherogenesis. *Acta Pharmacol Sin* 25 (7):849-54.
- Yatomi, Y. 2008. Plasma sphingosine 1-phosphate metabolism and analysis. *Biochim Biophys Acta* 1780 (3):606-11.
- Yatomi, Y., S. Yamamura, F. Ruan, and Y. Igarashi. 1997. Sphingosine 1-phosphate induces platelet activation through an extracellular action and shares a platelet surface receptor with lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 272 (8):5291-7.
- Zemann, B., B. Kinzel, M. Muller, R. Reuschel, D. Mechtcheriakova, N. Urtz, F. Bornancin, T. Baumruker, and A. Billich. 2006. Sphingosine kinase type 2 is essential for lymphopenia induced by the immunomodulatory drug FTY720. *Blood* 107 (4):1454-8.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Mechanismen der Plättchenadhäsion und –aggregation (Varga-Szabo, Pleines, and Nieswandt 2008,S.404).	9
Abb. 1.2: Schritte der Atherogenese: Aufnahme und Modifikation von LDL, Transmigration von Monozyten und Schaumzellbildung; Proliferation von Gefäßmuskelzellen, Formation einer atherosklerotischen Plaque, Plaqueruptur und Plaquethrombose mit Alteration des Blutflusses (AB).....	19
Abb. 1.3: Metabolismus von S1P und dem S1P-Rezeptormodulator FTY-720 (Kihara and Igarashi 2008, S.497)	23
Abb. 1.4: Freisetzung von S1P und dem S1P-Rezeptormodulator FTY-720 aus Thrombozyten und Erythrozyten (Kihara and Igarashi 2008, S.497).....	24
Abb. 1.5: Signalwege für S1P über Oberflächenrezeptoren (Spiegel and Milstien 2003).	25
Abb. 1.6: Atherosklerose und S1P – bedeutende Signalwege (Tolle et al. 2007, S.176)	28
Abb. 3.1: Blutentnahme bei der Maus durch kardiale Punktion.....	35
Abb. 3.2: Ficoll-Gradient (GE)	36
Abb. 3.3: ibidi μ -slide VI; Thrombozytenadhäsion auf unterschiedlich beschichteten Oberflächen (Ibidi_GmbH).....	37
Abb. 3.4: Protokoll zur Beschichtung der ibidi Kammern (rCollagenI = Collagen Typ I, Rat Tail 3,48 mg/ml, BD Biosciences, Two Oak Park, Bedford; mLaminin = mouse Laminin, mg/ml. #23017-015, Invitrogen; mFibrinogen = mouse Fibrinogen, 1mg/ml, # F4385, Sigma; hWVF = human von Willebrand Faktor, 1mg/ml, #681300, Calbiochem)	38
Abb. 3.5: ibidi Pump-System auf Zeiss® Axiovert 100	39
Abb. 3.6: ibidi Pumpsystem – Flussrichtung und Ventilschaltung (Quelle: (Ibidi_GmbH))	40
Abb. 3.7: Steuerungssoftware Suction Control mit Scheduler (Ibidi_GmbH). Links 25 mbar eingestellter Druck, rechts 25,8 mbar tatsächlicher Druck	41
Abb. 3.8: Entstehung von Fluoreszenz (Becker).....	43
Abb. 3.9: Strahlengang im Fluoreszenzmikroskop (modifiziert aus (www.mikroskopie.de)) ..	44
Abb. 3.10: CFDA-SE – Strukturformel und Reaktionen in der Zelle (Wang et al. 2005)	45
Abb. 3.11: Fluoreszenzspektrum für CFDA-SE (nach (Fluorophores.org)).....	46
Abb. 3.12: Berechnung der Fläche der adhärenen Thrombozyten mit CapImage®.	47
Abb. 3.13: Strukturformel von S1P (Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1895)	51

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.14: Strukturformel von FTY720 (Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1895)	51
Abb. 3.15: Strukturformel von SEW2871 (Huwiler and Pfeilschifter 2008, S.1895)	52
Abb. 4.1: Oberflächenspezifische Adhäsionsprofile, Aufnahmen nach 10 Minuten Perfusion	56
Abb. 4.2: Hemmung der Kollagen-spezifischen Plättchenadhäsion durch lösliches GPVI-Fc. Verglichen wird die Fläche der adhärenen Thrombozyten in μm^2 nach 5 und 10 min.	57
Abb. 4.3: Vergleich der Plättchenadhäsion auf Kollagen + Fc und Kollagen + löslichem GPVI-Fc nach 10 min Perfusion	57
Abb. 4.4: verminderte Adhäsion an Fibrinogen aufgrund des fehlenden GPIIb/IIIa-Rezeptors auf den Thrombozyten der Knockout-Mäuse.	58
Abb. 4.5: Plättchenadhäsion auf Fibrinogen, WT C57Bl/6J vs. GPIIb ^{-/-}	58
Abb. 4.6: verminderte Adhäsion GPIIb-defizienter Thrombozyten an vWF	59
Abb. 4.7: Vergleich WT C57Bl/6J und GPIIb ^{-/-} : Thrombozytenadhäsion auf vWF nach 10 min Perfusion.	59
Abb. 4.8: Blockierung von GPIIb führt zu verminderter Plättchenadhäsion auf vWF	60
Abb. 4.9: Thrombozytenadhäsion nach 10 min Perfusion über vWF, Vergleich WT C57Bl/6J und nach Behandlung mit anti-GPIIb	60
Abb. 4.10: Plättchenbindung nach 10 min Perfusion über uncoated bzw. Laminin, Mäusestamm: C57Bl/6J	61
Abb. 4.11: Vergleich der Adhäsion von C57Bl/6J und DMSO-behandelten Thrombozyten nach 5 min (oben) und 10 min (unten)	63
Abb. 4.12: Vergleich der Adhäsion zwischen DMSO u. SEW bzw. DMSO u. FTY nach 5 min und 10 min; Beschichtung: Kollagen	64
Abb. 4.13: Vergleich der Adhäsion zwischen DMSO u. SEW bzw. DMSO u. FTY nach 5 min und 10 min; Beschichtung: Laminin	64
Abb. 4.14: Vergleich der Adhäsion zwischen DMSO u. SEW bzw. DMSO u. FTY nach 5 min und 10 min; Beschichtung: Fibrinogen	65
Abb. 4.15: : Vergleich der Adhäsion zwischen DMSO u. SEW bzw. DMSO u. FTY nach 5 min und 10 min; Beschichtung: von Willebrand Faktor	65
Abb. 4.16: Vergleich der Thrombozytenadhäsion auf Kollagen nach 10min Perfusion nach Behandlung mit DMSO, SEW2871 oder FTY720.	65

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.17: Vergleich der Thrombozytenadhäsion von C57Bl/6J und SK1-WT nach 5 min (oben) und 10 min (unten).....	66
Abb. 4.18: Thrombozytenadhäsion nach 5 min u. 10 min, SK1-WT vs. SK1 ^{-/-} , Beschichtung: Kollagen	67
Abb. 4.19: Adhäsion von SK1-WT- gegenüber SK1 ^{-/-} -Thrombozyten nach 5 min und 10 min Perfusion, Beschichtung: Laminin	67
Abb. 4.20: Plättchenadhäsion nach 5 min und 10 min bei SK1-WT und SK1 ^{-/-} , Beschichtung: Fibrinogen	68
Abb. 4.21: Vergleich der Thrombozytenadhäsion nach 5 min u. 10 min, SK1-WT und SK1 ^{-/-} , Beschichtung: vWF	68
Abb. 4.22: Plättchenadhäsion auf vWF nach 10 min Perfusion bei SK1-WT und SK1 ^{-/-}	69
Abb. 4.23: Die Adhäsion von SK2-defizienten und SK2-Wildtyp Plättchen nach 5 min und 10 min Perfusion werden verglichen, Beschichtung: Kollagen.....	70
Abb. 4.24: Vergleich der Thrombozytenadhäsion von SK2 ^{-/-} und SK2-WT nach 5 min und 10 min Perfusion, Beschichtung: Laminin.....	70
Abb. 4.25: Plättchenadhäsion von SK2 ^{-/-} und SK2-WT, Vergleich nach 5 min und 10 min Perfusion, Beschichtung: Fibrinogen	71
Abb. 4.26: Vergleich der Thrombozytenadhäsion von SK2 ^{-/-} und SK2-WT nach 5 min und 10 min Perfusion, Beschichtung: vWF	71

10 Abkürzungen

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
5 (6)-CFDA-SE	5 (6)-Carboxyfluorescein succinimidyl ester
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
ACD	Acid Citrat Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calciumion
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDG	endothelial differentiation gene
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fc	fragment crystalline (des Immunglobulins)
fl	Femtoliter
GP	Glykoprotein
HCl	Salzsäure
HDL	high density lipoprotein
HMWK	high molecular weight kininogen
Hz	Hertz
ICAM-2	intracellular adhesion molecule-2
Ig	Immunglobulin
INF-γ	Interferon- γ
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzkrankheit
LacCer	Lactosylceramid
LDL	low density lipoprotein
LPP	Lipidphosphatphosphatase
Mac-1	Membrane attack complex-1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mbar	Millibar

10 Abkürzungen

MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MCV	Mittleres Corpuskuläres Volumen
mFbg	murines Fibrinogen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalzlösung
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PBS	phosphate buffered saline
PCAM-1	Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1
PDGF	Platelet derived growth factor
PF4	Plättchenfaktor 4
PI-3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PRP	plättchenreiches Plasma
RANTES	regulated upon activation and normal T-cell expressed and secreted
rpm	rounds per minute
S1P	Sphingosin 1-Phosphat
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SK1/2	Sphingosinkinase ½
SM	Sphingomyelinase
SPL	Sphingosin 1-Phosphat-Lyase
SPP	Sphingosin 1-Phosphat-Phosphatase
TGFβ	transforming growth factor β
USB	universal serial bus
UV	Ultraviolet
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	very low density lipoprotein
vWF	Von Willebrand Faktor
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp

11 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Steffen Maßberg bedanke ich mich für die Überlassung des interessanten Themas und die kompetente fachliche Führung.

Herrn Dr. Christian Schulz danke ich für die engagierte wissenschaftliche Betreuung, die alltägliche Motivation bei der Laborarbeit und für die kritische Durchsicht meiner Ergebnisse.

Für die Unterstützung bei technischen Fragen der Laborarbeit bedanke ich mich herzlich bei Michael Lorenz, Sandra Kerstan, Marie-Luise von Brühl und Katrin Schürzinger.