

Aus der Klinik für Nephrologie und Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*Charakterisierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-
Synthase-Aktivierung durch Sphingosin-1-Phosphat-Analoga*

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lars-Uwe Klöckl

aus Schwerin

Datum der Promotion: 25. Oktober 2013

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Abstrakt	- 1 -
2. Einführung	- 3 -
2.1. Physiologie des Endothels.....	- 3 -
2.1.1. Stickstoffmonoxid und NO-Synthasen	- 3 -
2.1.2. Endotheliale Dysfunktion.....	- 4 -
2.2. Atherosklerose	- 5 -
2.3. Sphingolipide	- 6 -
2.3.1. Sphingosin-1-Phosphat und seine biologische Bedeutung.....	- 7 -
2.3.1.1. Regulation der Gefäßspannung durch S1P	- 8 -
2.3.1.2. Bedeutung von S1P für die Apoptose von ECs	- 8 -
2.3.1.3. Bedeutung von S1P für Atherosklerose.....	- 8 -
2.3.2. S1P-Rezeptoren.....	- 10 -
2.3.2.1. S1P ₁ -Rezeptor:	- 10 -
2.3.2.2. S1P ₂ -Rezeptor:	- 10 -
2.3.2.3. S1P ₃ -Rezeptor:	- 11 -
2.3.2.4. S1P ₄ - und S1P ₅ -Rezeptor:.....	- 11 -
2.3.3. S1P-Analoga	- 12 -
2.3.3.1. FTY720	- 12 -
2.3.3.2. AUY954	- 13 -
2.3.3.3. SEW2871	- 13 -
2.3.3.4. KRP-203	- 13 -
2.3.3.5. VPC24191 und VPC23019	- 14 -
2.3.3.6. W146	- 14 -
2.3.3.7. CAY10444	- 14 -
2.4. Fragestellung	- 15 -
3. Material und Methoden	- 16 -
3.1. Material	- 16 -
3.2. Methoden.....	- 22 -
3.2.1. Zellbiologische Methoden	- 22 -
3.2.1.1. Medienwechsel und Passagieren der Zellen	- 22 -

3.2.1.2.	Zellzahlbestimmung	- 22 -
3.2.1.3.	Kryokonservierung der Zellen	- 23 -
3.2.1.4.	Auftauen der Zellen.....	- 23 -
3.2.1.5.	Stimulation der Zellen	- 23 -
3.2.2.	Molekularbiologische Methoden.....	- 24 -
3.2.2.1.	RNA-Isolation und -Aufreinigung aus HUVECs	- 24 -
3.2.2.2.	RNA-Isolation und -Aufreinigung aus Nierengewebe	- 24 -
3.2.2.3.	Quantitative Nukleinsäure-Analyse.....	- 24 -
3.2.2.4.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	- 24 -
3.2.2.5.	Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung von DNA.....	- 27 -
3.2.3.	Biochemische Methoden.....	- 27 -
3.2.3.1.	Protein-Lysat-Gewinnung aus HUVECs	- 27 -
3.2.3.2.	Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäureassay (BCA).....	- 27 -
3.2.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	- 27 -
3.2.3.4.	<i>Western-Blotting</i>	- 28 -
3.2.3.5.	Proteindetektion	- 28 -
3.2.3.6.	Signal-Quantifizierung.....	- 29 -
3.2.3.7.	<i>Stripping</i>	- 29 -
3.2.4.	Intrazelluläre NO-Bestimmung mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	- 30 -
3.2.4.1.	Stimulation und DAF2-DA-Beladung der Zellen	- 30 -
3.2.4.2.	Fixierung der Zellen	- 30 -
3.2.4.3.	NO-Messung.....	- 30 -
3.2.4.4.	Quantifizierung.....	- 31 -
3.2.5.	Nachweis von Signalproteinen mittels Bio-Plex-Technologie	- 31 -
3.2.6.	Physiologische Methoden	- 33 -
3.2.6.1.	Tiere.....	- 33 -
3.2.6.2.	Nierenexplantation.....	- 33 -
3.2.6.3.	Messmethode an der isoliert perfundierten Niere	- 34 -
3.2.7.	Statistische Auswertung.....	- 34 -
4.	Ergebnisse	- 35 -
4.1.	Nachweis von S1P ₁₋₃ -Rezeptoren mittels RT-PCR.....	- 35 -
4.2.	Fluoreszenzbasierte NO-Detektion am Mikroskop	- 36 -
4.2.1.	Zeitreihenanalyse bekannter S1P-Agonisten.....	- 36 -
4.2.2.	Dosiswirkungsbeziehung von AUY954 und pFTY720	- 39 -
4.2.2.1.	AUY954	- 39 -
4.2.2.2.	pFTY720	- 40 -

4.2.3.	Kompetitive Hemmung der NO-Produktion durch L-NAME	- 41 -
4.3.	Nachweis der eNOS-Aktivierung mittels <i>Western-Blotting</i>	- 42 -
4.3.1.	Konzentrationsabhängigkeit der eNOS-Aktivierung durch Stimulation mit AUY954	- 42 -
4.3.2.	Zeitabhängigkeit der eNOS-Aktivierung durch Stimulation mit AUY954	- 44 -
4.4.	Signaltransduktion	- 45 -
4.4.1.	Phosphoproteindetektion nach AUY954- und pFTY720-Stimulation	- 45 -
4.4.2.	Indirekter Nachweis der Akt-Beteiligung durch fluoreszenzmikroskopische NO-Detektion.....	- 47 -
4.5.	Hemmung der S1P-Rezeptor-Aktivierung unter Verwendung selektiver Antagonisten.....	- 48 -
4.5.1.	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Rezeptor-Antagonisierung	- 48 -
4.5.2.	Phosphoproteinbasierter Nachweis der Signaltransduktions-Hemmung	- 50 -
4.5.3.	Immunfluoreszenzbasierter Nachweis der Enzym-Hemmung	- 51 -
4.6.	Rezeptorsubtyp-Diskrimination an k.d.-S1P-Zellen	- 53 -
4.7.	Physiologische Wirkung der S1P-Agonisten AUY954 und pFTY720 an der isoliert perfundierten Niere	- 55 -
4.7.1.	Dosis-Wirkungs-Beziehung verwendeter Standardsubstanzen	- 55 -
4.7.2.	Applikation von AUY954	- 56 -
4.7.2.1.	Bolusapplikation von AUY954.....	- 56 -
4.7.2.2.	Dauerperfusion von AUY954	- 57 -
4.7.2.3.	Rezeptor-Desensitisierungsversuch mit AUY954	- 58 -
4.7.3.	Bolusapplikation von pFTY720	- 59 -
5.	Diskussion	- 60 -
6.	Literaturverzeichnis	- 70 -
Lebenslauf		i
Publikationen.....		i
Eidesstattliche Versicherung		iv
Danksagung.....		vi

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bildung und Abbau von Sphingolipiden ³³	- 6 -
Abbildung 2: Marker	- 19 -
Abbildung 3: Messprinzip der Bio-Plex-Methode (Bio-Rad)	- 32 -
Abbildung 4: Agarose-Gel-Elektrophorese nach RT-PCR-basierter Amplifizierung der S1P ₁₋₃ -Rezeptor-mRNA.....	- 35 -
Abbildung 5: Dosiswirkungsbeziehung bekannter S1P-Agonisten auf die NO-Produktion ..	- 37 -
Abbildung 6: Zeitabhängigkeit der NO-Produktion nach Stimulation mit AUY954	- 38 -
Abbildung 7: Dosiswirkungsbeziehung der AUY954-induzierten NO-Synthese.....	- 39 -
Abbildung 8: Dosiswirkungsbeziehung der pFTY720-induzierten NO-Synthese	- 40 -
Abbildung 9: Hemmung der AUY954-induzierten NO-Produktion durch L-NAME	- 41 -
Abbildung 10: Dosisabhängige eNOS-Phosphorylierung durch AUY954	- 43 -
Abbildung 11: Zeitabhängige eNOS-Phosphorylierung durch AUY954	- 45 -
Abbildung 12: Zeitabhängige Phosphorylierung des Signalproteins Akt durch AUY954 und pFTY720	- 46 -
Abbildung 13: Hemmung der AUY954- und pFTY720-induzierten NO-Produktion unter Verwendung eines Akt-Inhibitors.....	- 47 -
Abbildung 14: Hemmung der AUY954- und pFTY720-induzierten NO-Produktion unter Verwendung von S1P-Antagonisten.....	- 49 -
Abbildung 15: Phosphorylierung des Signalproteins Akt durch AUY954 und pFTY720 unter Co-Inkubation mit S1P-Antagonisten und einem Akt-Inhibitor	- 51 -
Abbildung 16: Hemmung der AUY954- und pFTY720-induzierten eNOS-Phosphorylierung unter Verwendung von S1P-Antagonisten	- 52 -
Abbildung 17: Wirkung von AUY954 und pFTY720 auf die NO-Produktion in k.d.-S1P-Zellen.....	- 54 -
Abbildung 18: Dosiswirkungskurven verwendeter Standardsubstanzen an der isoliert perfundierten Niere.....	- 55 -
Abbildung 19: Bolusapplikation von AUY954 nach Vorkontraktion mit AngII.....	- 56 -
Abbildung 20: Dauerperfusion von AUY954 nach Vorkontraktion mit AngII.....	- 57 -
Abbildung 21: Rezeptor-Desensitierungsversuch mit AUY954	- 58 -
Abbildung 22: Bolusapplikation von pFTY720.....	- 59 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien.....	- 16 -
Tabelle 2: Puffer und Lösungen	- 17 -
Tabelle 3: Zellkulturmedien	- 18 -
Tabelle 4: Stimulanzen und Inhibitoren	- 18 -
Tabelle 5: Kit-Systeme	- 18 -
Tabelle 6: Antikörper und zugehörige Blocking-Reagenzien	- 18 -
Tabelle 7: Marker	- 19 -
Tabelle 8: Zelllinien und Versuchstiere	- 19 -
Tabelle 9: Oligonukleotide.....	- 19 -
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien.....	- 20 -
Tabelle 11: Geräte und Laborhilfsmittel	- 20 -
Tabelle 12: Software	- 21 -
Tabelle 13: Zusammensetzung des Synthesegemisches zur RT-PCR	- 25 -
Tabelle 14: PCR-Programm zur Amplifizierung von S1P ₁₋₃ -Rezeptoren.....	- 26 -
Tabelle 15: Parameter zur optischen Fluoreszenzsignal-Quantifizierung	- 31 -

Abkürzungsverzeichnis

abMet-ATP	α,β -Methylen-Adenosintriphosphat
ACh	Acetylcholin
Akt	Akt Proteinkinase
AngII	Angiotensin II
AUY954	N-Vinyl-pyrrolidinon-3-[[2-[4-phenyl-3-(trifluoromethyl)phenyl]-1-benzothiophen-5-yl]-methylamino]propionsäure
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
CaM	Calmodulin
CAY10444	2(R,S)-Undecylthiazolidin-4(R)-carboxylsäure
cDNA	<i>engl.</i> complementary desoxyribonucleid acid
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CoA	Co-Enzym A
CO ₂	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl.</i> desoxyribonucleid acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECl	<i>engl.</i> ECL Advance™ blocking agent
ECL	<i>engl.</i> enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>engl.</i>	englisch
ERK	<i>engl.</i> extracellular signal-regulated kinase
et al.	<i>lat.</i> et alter
F	Frankreich
FIN	Finnland
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FAD	Flavinmononukleotid
FTY720	2-Amino-2-(4-octylphenetyl)propan-1,3-diol
Fwd	<i>engl.</i> forward
H ₄ B	Tetrahydrobiopterin
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GC	Guanin/ Cytosin
GTP	Guanosin-Triphosphat

HDL	<i>engl.</i> high density lipoprotein
HUVEC	humane Umbilicalvenen-Endothelzelle
i.e.	<i>lat.</i> id est
IE	internationale Einheiten
IL-8	Interleukin-8
IL-17	Interleukin-17
INF- γ	γ -Interferon
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
iRNA	<i>engl.</i> inhibitory ribonucleid acid
JNK	Janus-Kinase
k.d.	<i>engl.</i> knock-down
KRP-203	2-amino-2-[2-[2-chloro-4-[[3-(phenylmethoxy)phenyl]thio]phenyl]ethyl]-1,3-propandiol-Hydrochlorid
<i>lat.</i>	lateinisch
LDL	<i>engl.</i> low density lipoprotein
L-NAME	N ^{ω} -Nitro-L-Argininmethylester
L-NNA	N ^{ω} -Nitro-L-Arginine
L-NMMA	N ^{ω} -Monomethyl-L-Arginine
MAD	mittlerer arterieller Druck
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	<i>engl.</i> monocyte chemoattractant protein-1
MMP	Matrixmetallo-Proteinase
mRNA	<i>engl.</i> messenger ribonucleid acid
NADPH	Nikotinamiddinukleotidphosphat
NC	Negativkontrolle
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NP40	Nonident P-40
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
p	p-Wert
p38	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 38
p42	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 42
p44	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 44
p54	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 54

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pFTY70	2-Amino-2-(4-octylphenetyl)propan-1,3-diol-Phosphat
PI3K	Phosphoinositoltriphosphat-Kinase
PKA	Proteinkinase A
pKRP-203	2-amino-2-[2-[2-chloro-4-[[3-(phenylmethoxy)phenyl]thio]phenyl]ethyl]-1,3-propandiol-hydrochlorid-phosphat
PLC	Phospholipase C
Rac	Rac-Protein
Rev	<i>engl.</i> reverse
Rho	Rho-Protein
RNA	<i>engl.</i> ribonucleid acid
RNAse	Ribonuklease
ROS	radikale Sauerstoffspezies
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RT	Reverse Transkriptase
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P ₁₋₅	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEW2871	5-[4-phenyl-5-(trifluoromethyl)2-thienyl]-3-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-1,2,4-oxadiazol
Ser ¹¹⁷⁷	Serin-Rest in Position 1177
Sphk	Sphingosinkinase
TAE	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween® 20
Thr ⁴⁹⁵	Threonin-Rest in Position 495
TNF α	Tumor-Nekrosefaktor α
TNS	<i>engl.</i> trypsin neutralization solution
URM	<i>engl.</i> uniform requirements for manuscripts
VCAM-1	<i>engl.</i> vascular cell adhesion molecule-1

VEGF	<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor
VLDL	<i>engl.</i> very low density lipoprotein
VPC23019	(R)-Phosphorsäuremono-[2-amino-2-(3-octyl-phenylcarbonyl)ethyl]ester
VPC24191	(R)-Phosphorsäuremono-[2-amino-3-(4-octyl-phenylamino)propyl]ester
VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle
W146	(R)-3-amino-4-(3-hexylphenylamino)-4-oxobutylphosphonsäure
(^{-/-})	<i>engl.</i> knock-out
(^{+/+})	überexprimierend
*	signifikant

1. Abstrakt

Das Endothel hat eine zentrale Rolle in der vaskulären Homöostase, und pathologische Änderungen in diesem Gewebe bedingen die Entstehung und Aufrechterhaltung chronisch entzündlicher Atherosklerose. Endogene Sphingolipide, wie Sphingosin-1-Phosphat, wirken in diesem Zusammenhang anti-inflammatorisch, indem sie über verschiedene G-Protein-gekoppelte S1P-Rezeptoren die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) aktivieren. Stickstoffmonoxid seinerseits wirkt vasodilatativ und atheroprotektiv. Bislang kam in diesem Kontext synthetischen Sphingosin-1-Phosphat-Agonisten eine kontroverse Rolle bei der Aktivierung verschiedener S1P-Rezeptoren zu.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb das vasoaktive Potential des selektiven S1P₁-Agonisten AUY954 sowie das von pFTY720 getestet, welches agonistisch an S1P_{1/3} in Endothelzellen wirkt. Beide verwendeten Agonisten, AUY954 und pFTY720, führten zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Stickstoffmonoxid-Produktion, welche in Endothelzellen fluoreszenzmikroskopisch gemessen werden konnte. In der Folge konnte die Akt-abhängige eNOS-Phosphorylierung an dem aktivierenden Aminosäurerest Ser¹¹⁷⁷ detektiert werden. Der Einsatz des kompetitiven eNOS-Inhibitors L-NAME sowie eines Akt-Inhibitors blockierten eine NO-Produktion vollständig. Die Nutzung der S1P-Antagonisten W146, CAY10444 und VPC23019 sowie die Messungen an Zellen nach *knock-down* von S1P-Rezeptoren ergaben eine unterschiedliche Rezeptoraktivierung für AUY954 und pFTY720. Während durch Stimulation mit AUY954 über selektive S1P₁-Aktivierung eine potente Stickstoffmonoxid-Generation gemessen werden konnte, ergab sich für pFTY720 eine komplexere - möglicherweise kooperative - Aktivierung über S1P_{1/3}. Die vasodilative Relevanz von AUY954 ließ sich in physiologischen Messungen an isoliert perfundierten Nieren bestätigen. Für pFTY720 hingegen konnten lediglich vasokonstriktive Effekte gemessen werden, die abermals eine komplexere Wirkweise vermuten lassen.

Zusammenfassend könnte dem Einsatz von AUY954 eine bedeutende Rolle für den immunologischen und antiapoptotischen Schutz von Endothelzellen zukommen und die klinische Anwendung in immunsuppressiven und antiatherogenen Therapiestrategien weniger unerwünschte Arzneimittelwirkungen und eine bessere pharmakologische Kontrollierbarkeit mit sich bringen als das bereits klinisch erprobte pFTY720.

Characterization of endothelial nitric oxide synthase activation by sphingosine-1-phosphate agonists

The endothelium has a central role in vascular homeostasis, and pathological changes in this tissue cause the development and maintenance of chronic inflammatory atherosclerosis. Endogenous sphingolipids, such as sphingosine-1-phosphate, in this context have anti-inflammatory properties by interacting with different G-protein coupled S1P-receptors that activate the endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Nitric oxide in turn is vasodilative and atheroprotective. So far, synthetic agonists of sphingosine-1-phosphate have played a controversial role in terms of different S1P-receptor activation. Here, the vasoactive potential of the S1P₁-selective agonist AUY954 and that of pFTY720, which acts agonistically on S1P_{1/3} in endothelial cells, was tested. Both agonists, AUY954 and pFTY720, led to a dose- and time-dependent production of nitric oxide that could be measured in endothelial cells using fluorescence microscopy. Subsequently, Akt-dependent eNOS phosphorylation of the Ser¹¹⁷⁷ binding site was detected. Use of L-NAME, a competitive eNOS-inhibitor, as well as utilization of an Akt-inhibitor led to a complete blockage of NO production.

Usage of the S1P-antagonists W146, CAY10444 and VPC23019 as well as measurements in S1P-receptor *knock-down* cells revealed a different receptor activation upon stimulation with AUY954 and pFTY720. Whereas selective S1P₁ activation with AUY954 led to a powerful nitric oxide generation, a more complex - potentially cooperative - activation upon pFTY720 treatment was observed. The vasodilative relevance of AUY954 was verified in physiological measurements of isolated perfused kidneys. Upon pFTY720 usage on the other hand only vasoconstrictive properties could be measured, which again refer to a more complex activation effect.

In summary, the use of AUY954 might have a crucial role in the immunological and anti-apoptotic protection of endothelial cells and its clinical utilization in immunosuppressive and anti-atherogenic therapies might have less side effects and be better pharmacologically controllable than that of pFTY720, which has already been clinically proven.

2. Einführung

2.1. Physiologie des Endothels

Das Endothel ist eine einschichtige Zellschicht, die ubiquitär das Lumen der Blutgefäße auskleidet. Neben der Funktion das Blutkompartiment gegen den subendothelialen Raum abzugrenzen, vermittelt es vielfältige Effekte zur Aufrechterhaltung der physiologischen Integrität. Eine zentrale Funktion ist dabei die Regulation der Vasomotorik. Durch die Freisetzung dilatorischer Substanzen, die auf die glatte Gefäßmuskulatur im subendothelialen Raum wirken, kommt es zu einer Relaxation des entsprechenden Gefäßes und einer Verminderung des Blutflusses. Als physiologisch von bedeutender Relevanz sind hier vornehmlich die Dilatatoren Stickstoffmonoxid (NO) und das Arachidonsäurederivat Prostacyclin.^{1, 2} Die gegenteilige Wirkung, eine Vasokonstriktion, kann ebenfalls durch endothelial synthetisiertes Endothelin erzielt werden.³

2.1.1. Stickstoffmonoxid und NO-Synthasen

Die körpereigene Synthese von NO stellt den wichtigsten vasodilatatorischen Faktor der physiologischen Gefäßregulation dar.⁴ Die Bildung dieses lipophilen Moleküls mit einer biologischen Halbwertszeit von 2-5 Sekunden wird durch die Enzymklasse der NO-Synthasen katalysiert,⁵ von denen bis heute 3 Isoformen bekannt sind: Die konstitutiv exprimierte neuronale NO-Synthase (nNOS/ NOS I),⁶ die induzierbare Isoform in aktivierten Makrophagen (iNOS/ NOS II)⁷ sowie die konstitutiv exprimierte endotheliale NO-Synthase (eNOS/ NOS III), welche eine entscheidende Rolle für die Gefäßintegrität und die physiologische Blutdruckregulation spielt.⁸ Das Substrat dieser enzymatischen Reaktion ist L-Arginin, welches zu L-Citrullin und NO oxidiert wird. Dabei sind 4 Cofaktoren essentiell, i.e. Calmodulin (CaM), Tetrahydrobiopterin (H₄B), Flavinmononukleotid (FAD) und Nikotinamiddinukleotidphosphat (NADPH).

Wirkungsort des NO ist nicht das Endothel selbst, sondern die glatte Gefäßmuskelzelle (VSMC), in welche es durch Diffusion gelangt. Hier bindet es an die zytosolische Guanylatzyklase und aktiviert damit die Umwandlung von Guanosin-Triphosphat (GTP)

in zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP), welches seinerseits als Second-Messenger die Abnahme der zellulären Kalziumkonzentration bewirkt.⁹

Neben einer potenten Hemmung der Plättchenaggregation sowie einer Chemotaxis-Inhibition neutrophiler Granulozyten,^{5, 10} bewirkt dieser Signalweg vor allem die Abnahme der VSMC-Kontraktilität und somit eine Vasodilatation.

Außer einer Enzymregulation auf Transkriptions-, Translations- und Posttranslationsebene ist für die eNOS-Aktivität besonders die Phosphorylierung an bestimmten Aminosäureresten entscheidend.¹¹ Neben einer Vielzahl weiterer möglicher Phosphatbindestellen sind vor allem jene am besten untersucht und beschrieben, die in der CaM-Bindedomäne des Enzyms liegen. So führt bei der humanen eNOS-Variante eine Phosphorylierung des Serin-Restes in Position 1177 (Ser¹¹⁷⁷) sowie eine Dephosphorylierung des Threonin-Restes in Position 495 (Thr⁴⁹⁵) zu einer Enzymaktivierung und damit NO-Produktion. Die Kinasen, welche die Phosphorylierung vermitteln, variieren ebenso wie die Stimulanzen, die den Signalweg anstoßen. Scherkräfte, einer der physiologisch wichtigsten eNOS-Aktivatoren, induzieren Aktivität der Signalproteine Akt und PKA,^{12, 13} *vascular endothelial growth factor* (VEGF) führt zu einer Akt-Phosphorylierung, wohingegen eine Bradykinin-induzierte Phosphorylierung von Ser¹¹⁷⁷ über die CaM-Kinase II vermittelt wird.¹⁴

Die eNOS ist durch bestimmte L-Arginin-Analoga *in vitro* und *in vivo* hemmbar; zur Verfügung stehen N^ω-Monomethyl-L-Arginine (L-NMMA), N^ω-Nitro-L-Arginine (L-NNA) und N^ω-Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME).^{15,16}

2.1.2. Endotheliale Dysfunktion

Der Begriff endotheliale Dysfunktion beschreibt das Unvermögen des Endothels, seine physiologischen Aufgaben der Barrierefunktion, der Regulation des Gefäßtonus, der Blutgerinnung und der Expression bestimmter Zytokine in angemessener Weise zu leisten.¹⁷ Eine unpräzisere Definition meint mit endothelialer Dysfunktion die Unfähigkeit des Endothels auf einen physiologischen Reiz mit einer adäquaten NO-Produktion zu reagieren. Dieses Unvermögen spiegelt sich ätiologisch in vaskulopathologischen Entitäten wie Atherosklerose,¹⁸ Hypertonie^{5, 19} und koronarer Herzkrankheit,^{20, 21} aber auch in metabolischen Störungen wie Hypercholesterinämie¹⁹ und Diabetes mellitus²² wider.

2.2. Atherosklerose

Nach heutigem Verständnis ist die Atherosklerose eine Gefäßerkrankung, die durch inflammatorische Prozesse zu einer pathologischen Lipidspeicherung im vaskulären System führt. Azelluläre Änderungen wie veränderte Strömungsverhältnisse innerhalb des Gefäßlumens sind pathophysiologisch ebenso prädisponierend wie bestimmte zelluläre Veränderungen, die in komplexer Weise proinflammatorisch im Umfeld des Gefäßes wirken.²³

Oxidativer Stress, ausgelöst etwa durch verstärkte Scherkräfte im Gefäßlumen, induziert die endotheliale Expression von Adhäsions- und chemotaktisch wirkenden Molekülen - in besonderem Maße die von *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) - welche die Bindung von Leukozyten an das Endothel und eine Migration in die Intima bewirken.^{24, 25}

Gleichzeitig wird durch die veränderte vaskuläre Strömungssituation die Bildung von antiinflammatorisch wirkendem NO reduziert und die Expression von VCAM-1 zusätzlich verstärkt.²⁶

Eine weitere Wirkung oxidativen Stresses im Gefäßlumen besteht in der verstärkten Expression von Proteoglykanen durch VSMCs, welche dadurch vermehrt Lipoproteine binden können und deren oxidative Modifikation begünstigen.²⁷

Die eingewanderten Monozyten exprimieren *Scavenger*-Rezeptoren, nehmen die modifizierten Lipoproteine auf und werden zu Schaumzellen, die den Kern der als Plaque bezeichneten Gewebsveränderung bilden.²⁸

Im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion kommt es durch chemotaktische Zytokine zur Migration von VSMCs in die Intima und folgender Proliferation. Die intimale Läsion stabilisiert sich zytoarchitektonisch im Sinne einer Fibrosierung durch Bildung extrazellulärer Matrix.²⁹

Mit Fortbestehen der Entzündungssituation schreitet die Fibrosierung voran, während eingewanderte VSMCs zu einem gewissen Teil apoptotischen Veränderungen unterliegen, welche durch γ -Interferon (INF- γ) und *tissue factor* aus dem Inneren des Plaques abermals Inflammations-getriggert sind. Dies führt zu einer feinen fibrotischen Deckelung des lipidhaltigen Kerns.³⁰

Kommt es zu Instabilität und Ruptur des Plaques, so kann die Freisetzung der thrombogen wirkenden Lipide über Plättchenadhäsion und Thrombusbildung zu einer

Infarzierung und Ischämie des betroffenen Gefäßabschnittes führen; die fatalste Folge der Atherosklerose in Bezug auf Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt.³¹

2.3. Sphingolipide

Sphingolipide stellen eine Klasse von Membranbestandteilen dar, die in höheren und niederen Organismen gefunden werden können und von denen derzeit über 300 physiologisch vorkommende Varianten bekannt sind.³² Neben ihrer Barrierefunktion in Biomembranen fungieren diese auch als bioaktiv bezeichneten Lipide als intrazelluläre Signalmoleküle und Agonisten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren an der Zelloberfläche. Die große Gruppe der Sphingolipide leitet sich von dem ungesättigten Aminoalkohol Sphingosin ab, der über die gemeinsame Vorstufe des Ceramids entweder *de novo* aus Fettsäuren, der Aminosäure Serin und Palmitoyl-CoA oder durch Degradierung von Sphingomyelin gebildet werden kann (vgl. Abbildung 1).

Das ubiquitäre Vorkommen und die funktionelle Vielschichtigkeit der Sphingolipide legt eine Beteiligung an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen nahe, die in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus aktueller Forschung gerückt ist.³³

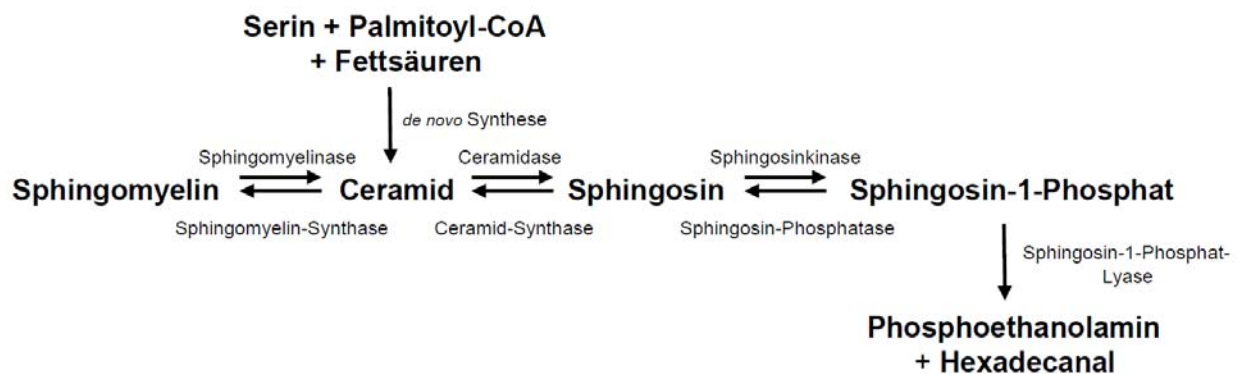


Abbildung 1: Bildung und Abbau von Sphingolipiden³³

Die Bildung von Sphingosin aus Sphingomyelin und *de novo* aus Fettsäuren, Serin und Palmitoyl-CoA über die gemeinsame Vorstufe Ceramid. Reversible Phosphorylierung führt zur Bildung von Sphingosin-1-Phosphat. Irreversibler Abbau durch Sphingosin-1-Phosphat-Lyase führt zur Bildung von Hexadecanal und Phosphoethanolamin.

2.3.1. Sphingosin-1-Phosphat und seine biologische Bedeutung

Eine Phosphorylierung von Sphingosin durch Sphingosinkinasen (Sphks), von denen derzeit 2 Isoformen bekannt sind,³⁴ führt zur Bildung des Sphingosin-1-Phosphats (S1P). Eine reversible Rückbildung zu Sphingosin wird durch die S1P-selektive Phosphatase ermöglicht, wohingegen ein irreversibler Abbau zu Phosphoethanolamin und Hexadecanal durch das Enzym S1P-Lyase erfolgt (vgl. Abbildung 1).³³ Diese homöostatische Regulation bezüglich des Ana- und Katabolismus von S1P gibt Hinweise auf die strukturelle und funktionelle Bedeutung dieses bioaktiven Lipids in der Regulation biologischer Abläufe. Eine physiologische Beteiligung von S1P an zellregulatorischen Prozessen konnte u.a. bezüglich Proliferation, Differenzierung und Migration nachgewiesen werden, aus der sich wiederum eine funktionelle Beteiligung an immunmodulatorischen, antiinflammatorischen und angiogenetischen Vorgängen ergibt. Die folgende Darstellung beschränkt sich dabei im Wesentlichen auf die biologische Bedeutung im Gefäßsystem. So reguliert S1P Signalwege von verschiedenen vaskulären Zellen wie Endothelzellen (ECs), VSMCs, Thrombozyten und Makrophagen.³³

Eine Beteiligung an pathophysiologischen Abläufen ist vor allem bezüglich der Entstehung und Aufrechterhaltung von Autoimmundefekten und im Speziellen der Multiplen Sklerose sowie in Hinblick auf die Bildung und Unterhaltung von Neoplasien sowie nervaler Dysfunktion beschrieben worden.³⁵⁻³⁷

Die humane Serumkonzentration von freiem S1P liegt im Bereich von 450-900 nmol/l und macht damit nur etwa 10% des im vaskulären System vorkommenden S1P aus.³⁸ Der weitaus größere Teil liegt an Albumin (30%) und die Lipoproteine HDL (50-70%), LDL (5-10%) und VLDL (2-5%) gebunden vor.³⁹⁻⁴¹

S1P bindet an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, von denen derzeit insgesamt fünf Subtypen beschrieben worden sind.⁴² Diese weisen ein gewebespezifisches Verteilungsmuster auf und aktivieren unterschiedliche G-Proteine, woraus sich wiederum differierende physiologische und pathophysiologische Funktionen schlussfolgern lassen.

Die homöostatische Feinregulation von S1P, seiner Derivate sowie seiner Bindung an verschiedene Plasmabestandteile und Rezeptoren ist Ausdruck einer sensiblen Regulation im Kontext von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen.

2.3.1.1. Regulation der Gefäßspannung durch S1P

Experimente in Ratten belegen, dass S1P in kleinen arteriellen Gefäßen, wie etwa im Mesenterium und der Niere, eine Vasokonstriktion bewirkt und derart den Blutfluss reduziert. Dieser Effekt zeigt sich jedoch nicht an großen arteriellen Gefäßen wie der Aorta, den Karotiden oder den Femoralarterien.^{33, 43, 44} An der Erhöhung der Gefäßspannung scheint der S1P₃-Rezeptor in jedem Fall beteiligt zu sein.⁴⁴

Vasodilative Effekte von S1P, die ebenfalls S1P₃-vermittelt zu sein scheinen, sind ferner auch beschrieben worden.^{40, 45} So sind vor allem große Gefäße, wie Aortae, in murinen Modellen responsiv auf Stimulation mit S1P im Sinne einer Vasodilatation.^{40, 45} Verantwortlich für die gegensätzliche Wirkung einer Stimulation durch S1P könnte die unterschiedliche Expression der verschiedenen S1P-Rezeptorsubtypen im kapillären Gefäßsystem sein.

2.3.1.2. Bedeutung von S1P für die Apoptose von ECs

Dysfunktionales Endothel ist unter anderem durch einen verstärkten Zellumsatz und höhere Apoptoseraten charakterisiert. S1P ist ein bedeutender Faktor, der ECs durch Inhibition von Caspasen und DNA-Fragmentierung vor dem apoptotischen Untergang zu schützen vermag.⁴⁶ Ein wesentlicher antiapoptotischer Faktor im vaskulären System ist NO. So führt eine Stimulation mit S1P in humanen ECs über S1P_{1/3} zur zytoprotektiven NO-Produktion, wohingegen diese Zellen bei Blockade der NO-Synthesen einer verstärkten Apoptoserate unterliegen.⁴⁷ Reaktive Sauerstoffradikale (ROS) führen zu einer verstärkten Aktivierung des im Zentrum des Apoptosesignalwegs stehenden Proteins p38. Durch die Wirkung von S1P kann diese Aktivierung in ECs wirksam verhindert werden.⁴⁸ Ein weiterer ubiquitär vorkommender proapoptotischer Faktor ist Tumor-Nekrosefaktor α (TNF α). So führt die exogene Zufuhr von S1P sowie die Aktivierung von Sphks in humanen ECs zu einer potenten Verhinderung der TNF α -vermittelten Apoptose.⁴⁹

2.3.1.3. Bedeutung von S1P für Atherosklerose

Atherosklerose ist Ausdruck einer chronischen Entzündungsreaktion des vaskulären Systems, die einer komplexen Regulation durch proinflammatorische Signale und - dem entgegenwirkend - gefäßprotektiven Schutzmechanismen unterliegt. S1P kann in diesem Zusammenhang sowohl pro- als auch antiatherogene Funktionen vermitteln. So

lassen sich Hinweise dafür finden, dass S1P die Expression von MCP-1, Interleukin-8 (IL-8) und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) in ECs steigert, auf diese Weise zu einer Unterhaltung der Entzündungssituation führt und eine Plaqueinstabilität sowie -ruptur begünstigt.^{50, 51} Demgegenüber inhibiert S1P über einen S1P₃-vermittelten Weg die Expression von MCP-1 in VSMCs.⁵² Eine ähnlich ambivalente Wirkung von S1P findet sich bei der Expression von Adhäsionsmolekülen, die für eine Leuko- und Monozyten-Diapedese in die atherosklerotische Läsion nötig sind. Sowohl Aktivierung als auch Inhibierung einer verstärkten Produktion sind in diesem Zusammenhang beschrieben worden.⁵³⁻⁵⁶ Eine verstärkte Aktivität der Sphks, wie sie in einem Sphk1-überexprimierenden EC-Modell beschrieben worden ist, zeigt einen proinflammatorischen Phänotyp.⁵⁷ Dagegen lässt sich durch die Wirkung von S1P ein verringertes Thromboserisiko beobachten, welches in einer Stabilisierung antikoagulativer Faktoren begründet liegt.⁵⁸ Darüber hinaus ist eine signifikante Plaquereduktion unter Applikation des S1P-Analogons FTY720 in verschiedenen Tiermodelle nachgewiesen worden.^{59, 60}

Wenngleich die S1P-vermittelten Effekte zunächst widersprüchlich erscheinen mögen, so lassen sich doch Erklärungsansätze für die pro- und antiinflammatorische Wirkung finden. Zum einen spielt das unterschiedliche Expressionsmuster der S1P-Rezeptorsubtypen im vaskulären System eine zentrale Rolle,⁶¹ zum anderen scheint die Wirkung von S1P als Ligand extrazellulärer Rezeptoren bzw. als intrazellulärer *second messenger* essentiell.⁶² So lassen sich Hinweise dafür finden, dass intrazelluläres S1P atherogene Effekte vermittelt, wohingegen die extrazelluläre Aktivität über S1P-Rezeptoren antiatherogene Wirkung hat.⁴¹

Darüber hinaus erscheint eine Funktionsmodulation durch Bindung von S1P an HDL bedeutungsvoll. Freies S1P induziert die Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM, wohingegen HDL-gebundenes S1P diese inhibiert.⁵⁶ Ebenso lässt sich die Menge von freiem S1P mit dem Schweregrad koronarer Gefäßerkrankung und der Inzidenz von akutem Myokardinfarkt korrelieren. In einer klinischen Studie zeigte sich, dass Patienten mit diesen kardialen Pathologien höhere Plasmaspiegel an freiem S1P aufwiesen, wohingegen in der gesunden Kontrollgruppe niedrigere Spiegel von freiem S1P und eine vornehmliche Bindung an HDL zu finden waren.⁶³

2.3.2. S1P-Rezeptoren

Bisher bekannte Daten statuieren vor allem für das kardiovaskuläre System eine zentrale Rolle der S1P-Rezeptor-Subtyp-Verteilung und daraus resultierend verschiedenartige Wirkeffekte von S1P,³³ weshalb im Folgenden zusammenfassend auf bekannte Eigenschaften der einzelnen Subtypen eingegangen werden soll.

2.3.2.1. S1P₁-Rezeptor:

Der S1P₁-Subtyp ist ein heptahelikaler Rezeptor, der im Gegensatz zu den anderen S1P-Rezeptoren ausschließlich mit dem heterotrimeren G_{i/o}-Protein gekoppelt ist. Seine Aktivierung führt zu einer Signaltransduktion über die Proteine ERK, PI3K/ Akt, Rac und eNOS. Sein Vorkommen in Blutgefäßen, Herz, Lunge, Hirn, Milz und Niere macht seine weite Verteilung deutlich und legt eine Beteiligung an immunologischen Prozessen sowie gefäßregulatorischen Funktionen nahe.⁶⁴ Vor allem ECs und VSMCs exprimieren S1P₁; diese stehen im Zentrum der Gefäßregulation sowie der Vermittlung zellulärer Immunität durch Kommunikation mit Leukozyten, Makrophagen und anderen hämatologischen Zellen. Studien mit Rezeptor-*knockout* (^{-/-})-Mäusen belegen diesen Zusammenhang, da S1P₁^{-/-} massive Störungen der Angiogenese haben und bereits *in utero* einen letalen Phänotyp zeigen.⁶⁵ VEGF und Thrombin induzieren die verstärkte Expression von S1P₁ in ECs und fokussieren somit eine Schlüsselrolle dieses Subtyps bezüglich Angiogenese und Wundheilung.⁶⁶ Eine Überexpression im Tiermodell führt aufgrund einer Intimahyperplasie wiederum zu arteriellen Defekten.⁶⁷

2.3.2.2. S1P₂-Rezeptor:

Der ubiquitär vorkommende S1P₂-Rezeptor interagiert mit den G-Proteine G_{i/o}, G_s, G_q und G_{12/13} und führt zu einer Aktivierung der Signalwege über PLC, JNK, p38, Rho und Rac. Bisherige Studien an S1P₂^{-/-}-Mäusen zeigen keine anatomischen Defekte, legen eine zentrale Bedeutung für Angiogenese und vaskuläre Integrität jedoch nahe. So führt das Fehlen des Signalweges über S1P₂ zu einer verminderten Gefäßkontraktilität und *-Resistance*.⁶⁸ Darüber hinaus ruft eine Hypoxie die verstärkte endotheliale Expression von S1P₂ hervor. In umgekehrter Weise kann eine physiologische retinale Neovaskularisation bei S1P₂^{-/-} nicht beobachtet werden.⁶⁹ Diese Fakten sprechen für die proangiogenetische und blutflusssteigernde Wirkung durch S1P₂. Wie über S1P₁

werden auch über S1P₂ immunologische Phänomene vermittelt. So führt die pharmakologische Antagonisierung von S1P₂ zu einer verminderten Plaquegröße in einem murinen S1P₂-überexprimierenden (^{+/+}) Atherosklerosemodell; demgegenüber zeigen S1P₂^{-/-}-Mäuse eine verringerte Expression des proinflammatorischen MCP-1.⁷⁰

2.3.2.3. S1P₃-Rezeptor:

Der S1P₃-Rezeptor interagiert mit den G-Proteinen G_{i/o}, G_s, G_q und G_{12/13} und aktiviert auf diese Weise die Signalwege über ERK, PLC, Akt, Rac und Rho. Auch der S1P₃-Rezeptor zeigt eine weite Expression in verschiedensten Geweben. So findet er sich außer im Gefäßsystem verstärkt in Herz, Lunge, Niere, Milz und Darm exprimiert, daneben aber auch in Zwerchfell und Knorpelgewebe. Darüber hinaus ist wie bei S1P₁ auch eine S1P₃-vermittelte Aktivierung der eNOS beschrieben worden.⁶⁴ In murinen *knockout*-Modellen findet sich bei fehlender Expression dieses Rezeptorsubtyps kein offensichtlich veränderter Phänotyp, was seinen Stellenwert in der Bedeutung der S1P-vermittelten Effekte jedoch nicht schmälert. Möglicherweise handelt es sich um einen redundanten Subtyp, dessen Funktion erst durch die Bildung von Heterotrimeren mit anderen S1P-Rezeptoren in Erscheinung tritt.⁷¹

2.3.2.4. S1P₄- und S1P₅-Rezeptor:

Die physiologischen Funktionen von S1P₄ und S1P₅ sind bis heute nicht hinreichend untersucht und auch die gewebespezifische Verteilung nicht zufriedenstellend geklärt. Es scheint jedoch gesichert, dass beide Rezeptoren mit G_{i/o} und G_{12/13} interagieren und S1P₄ PLC und Rho aktiviert, während S1P₅ die Signalwege über JNK und p54 anstößt. S1P₄ findet sich in Leukozyten und glatten Muskelzellen des Bronchialsystems, während S1P₅ einen ausschließlichen Bezug zum Nervensystem, insbesondere zur Weißen Substanz und zu Oligodendrozyten, zu haben scheint.^{33, 72} Bezüglich des Vorkommens von S1P_{4/5} im vaskulären System ist die Datenlage nicht suffizient gesichert. Mehrheitlich findet sich keine Expression von S1P_{4/5} im Gefäßsystem, jedoch statuieren einige wenige Autoren die Expression dieser Rezeptoren in ECs und VSMCs.⁷³

2.3.3. S1P-Analoga

Hinweise auf die physiologische und pathophysiologische Bedeutsamkeit von S1P und seiner Signalwege sind nicht nur von grundlagenwissenschaftlicher Bedeutung, sondern haben auch das Interesse geschürt, in diesen Abläufen pharmakologisch intervenieren zu können. So sind in den letzten zwei Forschungsdekaden viele Analogsubstanzen entwickelt worden, die sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen haben und zu einem Teil bereits in die klinische Erprobungsphase eingegangen sind. Im Folgenden soll auf die für die vorliegende Arbeit bedeutsamen S1P-Agonisten und -Antagonisten eingegangen werden.

2.3.3.1. FTY720

FTY720 wurde als Immunsuppressivum zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation entwickelt. Das Prodrug wird *in vivo* durch Sphk2 phosphoryliert⁷⁴ und bindet als biologisch aktive Form (pFTY720) an die Rezeptorsubtypen S1P_{1/3/4/5}.³⁵ Durch eine Inhibition der T-Zell-Proliferation hat es immunsuppressive Funktion⁷⁵ und führt im Tiermodell zu einer verminderten Inzidenz von posttransplantationsassoziiertem akuten Nierenversagen,⁷⁶ zu einer verminderten renalen Fibrose der Transplantate⁷⁶ sowie zu einem verlängerten Transplantatüberleben.⁷⁷ Für letzteres spricht auch eine Stimulation der eNOS über S1P₃ durch pFTY720 in arteriellen Gefäßen,⁴⁵ denn aufgrund dieses Mechanismus könnte eine NO-bedingte Vasodilatation zu einer verbesserten Transplantatdurchblutung führen.

Klinische Studien zur therapeutischen Immunsuppression nach Nierentransplantation, die mit FTY720 unter dem Wirkstoffnamen Fingolimod bis in Phase III geführt und im Jahre 2006 abgeschlossen wurden, zeigten aufgrund zu vieler unerwünschter Arzneimittelwirkungen keine Überlegenheit im Vergleich zu den etabliert immunsuppressiven Standards.^{78, 79} Die pharmakologische Mimikry ist nicht identisch mit der Wirkung von S1P. So aktiviert pFTY720 über S1P₃ G_i-vermittelte Signalwege, antagonisiert aber jene über G_q.⁸⁰ Ähnlich ambivalent stellt sich die Wirkung über S1P₁ dar; zwar wirkt pFTY720 hier agonistisch, führt jedoch über Internalisierung und Ubiquitinierung zu einer Rezeptor-Desensibilisierung in Lymphozyten.^{81, 82} Genau dieser funktionelle Antagonismus führt zu einer verminderten Lymphozytenmigration aus

sekundär lymphatischen in periphere Organe und das Zentralnervensystem.⁸³ Klinische Studien zur Pharmakotherapie bei Multipler Sklerose belegen eine verzögerte Schubhäufigkeit sowie ein gemildertes Voranschreiten der Symptomatik,⁸⁴ die sich durch die immunsuppressive Wirkung erklären lassen.⁸⁵ Seit 2011 ist FTY720 in der EU bei schweren Formen der Multiplen Sklerose unter dem Handelsnamen Gilenya® zugelassen.

2.3.3.2. AUY954

Der bisweilen wenig untersuchte Agonist AUY954 ist selektiv für S1P₁ und in seiner Struktur ähnlich zu FTY720. Seine physiologisch wirksame Konzentration liegt im niedrig-nanomolaren Bereich und auch ihm kommt über die S1P₁-vermittelten Effekte immunsuppressive Bedeutung zu. In einem murinen Herztransplantations-Modell zeigten die Tiere bei einer peripher verminderten Lymphozytenzahl nach oraler AUY954-Applikation ein verlängertes Überleben.⁸⁶ In einem experimentellen Modell zur Autoimmunneuritis bewirkte die Gabe von AUY954 eine signifikante Reduktion der Expression von Interleukin-17 (IL-17), einem proinflammatorischen Zytokin, das unter anderem ECs und Fibroblasten stimuliert und mit Autoimmunpathologien wie der Psoriasis oder Transplantatabstoßungen assoziiert ist.^{71, 87}

2.3.3.3. SEW2871

SEW2871 weist keine strukturellen Homologien zu S1P auf, fungiert jedoch als selektiver S1P₁-Agonist.⁸⁸ Analog zur Wirkung von pFTY720 an diesem Rezeptorsubtyp in Lymphozyten, forciert auch SEW2871 dessen Internalisierung,⁸⁹ ist jedoch nicht in der Lage, eine Degradierung des Rezeptors zu induzieren und somit das Expressionsniveau von S1P₁ zu beeinflussen.⁹⁰ In murinen Modellen schützt seine Applikation vor renaler Ischämie und akuter Tubulusnekrose durch ein antiinflammatorisches Wirken.^{91, 92}

2.3.3.4. KRP-203

KRP-203, ein weiterer selektiver S1P₁-Agonist mit strukturellen Homologien zu FTY720, zeigt ebenfalls immunsuppressive Wirkung.⁹³ Wie dieses wird es durch Phosphorylierung mittels Sphks in seine biologisch aktive Form überführt (pKRP-203). In Tiermodellen zur Transplantation von Niere und Herz verbessert die

pharmakologische Anwendung von KRP-203 das Transplantatüberleben bei geringeren unerwünschten Arzneimittelwirkungen im Vergleich zu FTY720.^{94, 95}

2.3.3.5. VPC24191 und VPC23019

VPC24191 und VPC23019 sind synthetische Analoga mit strukturellen Homologien zu S1P. Während VPC24191 agonistisch an S1P₁ und S1P₃ wirkt, zeigt VPC23019 antagonistische Wirkung an diesen beiden Subtypen.⁹⁶ Bislang finden sich keine Belege für den Einsatz dieser Substanzen im Tiermodell; allerdings erscheint ihre Verwendung vielversprechend, um subtypspezifische Wirkungen von S1P und seiner Analoga weiter diskriminieren zu können.³³

2.3.3.6. W146

Das chirale Analogon W146 ist ein selektiver S1P₁-Antagonist. Die *in vivo* Anwendung des (R)-Enantiomers in Mäusen führt zum Verlust der Kapillarintegrität von Haut und Lunge, ohne jedoch die periphere Lymphozytenzahl zu beeinflussen.⁹⁷

2.3.3.7. CAY10444

Die synthetische Substanz CAY10444, die mittels dreidimensionalem *Drugdesign* zur S1P-Analoga-Synthese entwickelt wurde, bindet an S1P₁ und S1P₃. Bei *in vitro* Verwendung einer Konzentration von 10 µmol/l antagonisiert sie über S1P₃, wohingegen die Bindung und Wirkung an S1P₁ bei dieser Konzentration weniger als 10% beträgt.⁹⁸ Aus diesem Grund ist bei Einsatz von CAY10444 in der angegebenen Konzentration von einer relativ selektiven S1P₃-Antagonisierung auszugehen.⁹⁹

2.4. Fragestellung

Die Aktivierung der eNOS und die damit einhergehende NO-Produktion stehen im Zentrum der physiologischen Endothelfunktion und haben darüber hinaus einen protektiven Stellenwert in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Atherosklerose. Eine Vielzahl von Studien belegt eine eNOS-Aktivierung durch S1P und seine Analoga. So konnte über S1P₃ bereits eine NO-Synthese durch Stimulation mit FTY720 nachgewiesen, die Beteiligung anderer Rezeptorsubtypen jedoch nicht ausgeschlossen werden. Mit der Weiterentwicklung neuer S1P-Agonisten und -Antagonisten eröffnete sich in den letzten Jahren die Möglichkeit, eine Rezeptorsubtyp-Beteiligung weiter zu diskriminieren und darüber hinaus selektivere Substanzen zu charakterisieren, welche die vaskuloprotektiven Effekte von S1P zu imitieren vermögen.

Ziel dieser Arbeit ist es deshalb:

1. Die Möglichkeit einer eNOS-Aktivierung durch den selektiven S1P₁-Agonisten AUY954 zu testen und ggf. weiter pharmakologisch zu charakterisieren.
2. Den Signaltransduktionsweg einer S1P-Agonist-vermittelten eNOS-Aktivierung zu ergründen.
3. Mithilfe selektiver S1P-Antagonisten und inhibitorischer *silencer* RNA (siRNA) eine pFTY720- und AUY954-induzierte NO-Produktion über S1P-Rezeptorsubtypen zu differenzieren.
4. Das vasoaktive Potential von pFTY720 und AUY954 in einem *ex vivo* Modell zu eruieren.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Albumin Fraktion V Protease-frei	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun AG (Melsungen, D)
Carbogen	Linde Gas Therapeutics (Unterschleißheim, D)
CaCl ₂	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	Bio-Rad (Hercules, USA)
Destain Solution Coomassie R-250	Bio-Rad (Hercules, USA)
DAF-2DA	Merck (Darmstadt, D)
DMSO	Merck (Darmstadt, D)
Dulbecco's MEM	Biochrom AG (Berlin, D)
ECl Advance™ blocking agent	GE healthcare (Buckinghamshire, UK)
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell GmbH (Heidelberg, D)
Essigsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Ethanol	Merck (Darmstadt, D)
Glucose	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
L-Glutamin [200 mM]	Biochrom AG (Berlin, D)
Glutaraldehyd	Merck-Schuchardt
H ₂ O, deionisiert	Millipore Corporation (Bedford, USA)
HCl	Merck (Darmstadt, D)
HEPES	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
KCl	Merck (Darmstadt, D)
Ketamin/ Xylazin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
MCDB 131 ± Phenolrot	c·c· pro (Oberdorla, D)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Methanol	Merck (Darmstadt, D)
MgCl ₂	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
NaCl	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
NaH ₂ PO ₄	VWR (Leuven, B)
NaHCO ₃	VWR (Leuven, B)
Penicillin/ Streptomycin 10000 U/10000 µg/ml	Biochrom AG (Berlin, D)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Probenecid; water soluble	Invitrogen (Eugene, USA)
Roti®-Block	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
SDS	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Super Signal® West Dura Luminol/ Enhancer Solution	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Super Signal® West Dura Stable Peroxid	Thermo Scientific (Rockford, USA)

Puffer Tris	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Tris-Azetat-EDTA-Puffer (TAE) 50x	BioRad (Hercules, USA)
Trypsin	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin-Neutralisationslösung (TNS)	PromoCell (Heidelberg, D)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

PBS-Dulbecco (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ ; low endotoxin)	Biochrom AG (Berlin, D)
Nonident P-40 Cell Lysis Buffer (NP 40)	Biosource (Camarillo, USA)
Lämmli Sample Buffer	BioRad (Hercules, USA)
Restore™ Western-Blot Stripping Buffer	Pierce (Rockford, USA)
Krebs-Henseleit-Puffer (1x):	16,012 g NaCl 0,446 g MgCl ₂ 2,016 g NaHCO ₃ 0,402 g KCl 2,220 g Glucose 0,116 g NaH ₂ PO ₄ 0,529 g CaCl ₂ <i>ad 2 l ddH₂O</i>
Laufpuffer (10x):	121 g Tris (Base) 238 g HEPES 10 g SDS <i>ad 1 l ddH₂O</i>
TBS (10x):	80 g NaCl 2 g KCl 30 g Rirs-HCL, pH 7,6 <i>ad 1 l ddH₂O</i>
TBST (1x):	2 ml Tween® 20 <i>ad 2 l TBS (1x)</i>
NP40-Lysepuffer:	7 ml Nonident P40 1 Tablette Complete Mini Proteaseinhibitor 1,2 mg [1 mM] PMSF
Lämmli-Probenpuffer:	950 µl Lämmli-puffer (2x) 50 µl β-Mercaptoethanol

Tabelle 3: Zellkulturmedien

HUVEC-Kulturmedium: 500 ml Endothelial Cell Growth Medium 2,44 % SupplementMix	PromoCell (Heidelberg, D)
HUVEC-Mangelmedium: 500 ml Endothelial Cell Growth Medium 0,5 % SupplementMix	PromoCell (Heidelberg, D)
HUVEC-Stimulationsmedium: 500 ml Endothelial Cell Growth Medium	PromoCell (Heidelberg, D)
Kryo-SFM	PromoCell (Heidelberg, D)

Tabelle 4: Stimulanzien und Inhibitoren

α , β -Methylen-Adenosintriphosphat	Sigma (Missouri, USA)
Acetylcholin	Sigma (Missouri, USA)
Akt Inhibitor IV	Calbiochem (Darmstadt, D)
Angiotensin II	Sigma (Missouri, USA)
CAY10444	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
pKRP203	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
L-NAME	Sigma (Missouri, USA)
AUY954	Novartis Intern. AG (Basel, CH)
pFTY720	Sigma (Missouri, USA)
SEW2871	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
VPC23019	Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, USA)
VPC24191	Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, USA)
W146	Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, USA)

Tabelle 5: Kit-Systeme

BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Bio-Plex™ Phosphoprotein Detection Kits	Bio-Rad (Hercules, USA)
RNeasy mini Kit	Qiagen, Inc. (Valencis, USA)

Tabelle 6: Antikörper und zugehörige Blocking-Reagenzien

anti-eNOS/ NOS Type III Ab (mouse) 1:1000 in Roti®-Block	BD (New Jersey, USA)
anti-Phospho-eNOS (Thr ⁴⁹⁵) Ab (rabbit) 1:500 in BSA	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-Phospho-eNOS (Ser ¹¹⁷⁷) Ab (rabbit) 1:1000 in BSA	Cell Signaling (Danvers, USA)
anti-mouse Ab 1:10000 in in Roti®-Block	KPL (Gaithersburg, USA)
anti-rabbit Ab 1:5000 in ECI	KPL (Gaithersburg, USA)

Tabelle 7: Marker

Precision Plus Protein™ Standards	Invitrogen (Eugene, USA)
Kaleidoscope™	
O'GeneRuler™ DNA Ladder, Ultra Low Range	Thermo Scientific (Rockford, USA)
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	Thermo Scientific (Rockford, USA)

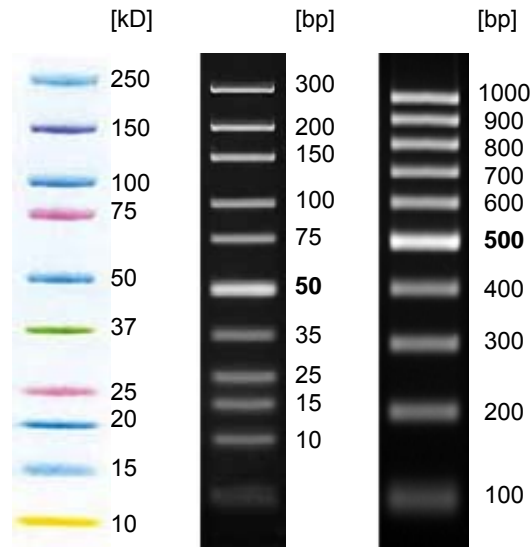


Abbildung 2: Marker

(a) Precision Plus Protein™ Standards Kaleidoscope™ (Proteingröße: [kD]) (b) O'GeneRuler™ DNA Ladder, Ultra Low Range (c) GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (DNA-Länge: [bp])

Tabelle 8: Zelllinien und Versuchstiere

HUVEC-c pooled	PromoCell (Heidelberg, D)
Wistar-Ratten	Charité-Tierzucht (Berlin, D)

Tabelle 9: Oligonukleotide

Name	Primer-Sequenz	Produkt-Länge
S1P ₁ [Mensch]	Fwd: 5'- TCA TCG TCC GGC ATT ACA ACT A- 3' Rev: 5'- GAG TGA GCT TGT AGG TGG TG- 3'	273 bp
S1P ₂ [Mensch]	Fwd: 5'- ATG GGC AGC TTG TAC TCG GAG- 3' Rev: 5'- CAG CCA GCA GAC GAT AAA GAC- 3'	720 bp
S1P ₃ [Mensch]	Fwd: 5'- CTT GGT CAT CTG CAG CTT CAT C- 3' Rev: 5'- TGC TGA TGC AGA AGG CAA TGT A- 3'	460 bp
S1P ₁ [Ratte] ¹⁰⁰	Fwd: 5'- CTG ACC TTC CGC AAG AAC ATC T- 3' Rev: 5'- CTT CAG CAA GGC CAG AGA CCT C- 3'	66 bp
S1P ₂ [Ratte] ¹⁰⁰	Fwd: 5'- GCC TTG TAC GTC CGA ATC TAC TTC- 3' Rev: 5'- AGC GTC TGA GGA CCA GCA A- 3'	67 bp
S1P ₃ [Ratte] ¹⁰⁰	Fwd: 5'- ACG CGC GCA TCT ACT TCC T- 3' Rev: 5'- TGG ATC TCT CGG AGT TGT GGT T- 3'	68 bp

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

96well-Platte (schwarz)	Greiner (Flacht, D)
Zellkultur-Schalen; 60 cm ²	Nunc™ (Wiesbaden, D)
Zellkultur-Schalen; 21 cm ²	Nunc™ (Wiesbaden, D)
12% Precise™ Proteingel, 1mm x 10 wells	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Deckgläser	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
entstaubte keimfreie Weichholzfaser	Fa. Altromin (Soest, D)
Reaktionsgefäß 20 ml, 15 ml, 2 ml, 1,5 ml	Nunc™ (Wiesbaden, D)
Zellkulturflaschen, 25 cm ² und 75 cm ²	Nunc™ (Wiesbaden, D)
Pasteurpipetten	Croning Incorporated (New York, USA)
serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Croning Incorporated (New York, USA)
Präparationsbesteck	FST (Foster City, USA)
Skalpell	Feather Safty Razor (Osaka, Japan)
sterile Pipettenspitzen	VWR (Darmstadt, D)
Spritzen und Kanülen (Sterican)	B. Braun AK (Melsungen, D)
Zellschaber	TPP (Trasadingen, CH)
iBlot Gel Transfer Stacks (Nitrocellulose)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Sterilfilter	Millipore Corporation (Bedford, USA)
ibidi 15 µ-slides 8 well	ibidi GmbH (Martinsried, D)
ibidi 60 µ-dishes	ibidi GmbH (Martinsried, D)

Tabelle 11: Geräte und Laborhilfsmittel

Analysenwaage	Sartorius (Göttingen, D)
Brutschrank (HeraCell)	Heraeus (Osterode, D)
Dokumentationssystem Chemi-smart 3000	Vilber Lourmat (Marne la Vallée, F)
Elektrophorese-Kammer	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Galaxy Ministar	VWR (Leuven, B)
Gefrierschränke -80°C	Heraeus (Osterode, D)
Gefrierschränke -20°C	Liebherr (Biberach an der Riß, D)
Hamilton 705 N (Microliter Syringes, 50 µl)	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, CH)
iBlot Dry Blotting System	Invitrogen (Carlsbad, USA)
iEMS Reader	MF LabSystems Oy (Helsinki, FIN)
IKA® MTS 2/4 digital	IKA (Staufen, D)
Inverses Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200)	Carl Zeiss (Göttingen, D)
Ismatec®	Ismatec SA – Labortechnik (Glattbrugg, CH)
Kühlschränke 4°C	Bosch (Stuttgart, D)
Luminex	xMAP™ Technology
Magnetrührer	IKA-Werk (Staufen im Breisgau, D)
Mikroskop (Wilovert A)	Hund (Wetzlar, D)
Milli-Q R Water purification system	Millipore Corporation (Bedford, USA)
Mithras LB 940	Berthold Technologies GmbH (Bad Wildbad, D)
Moist Chamber	Hugo Sachs Elektronik KG (March, D)
Neubauer-Zählkammer	Feinoptik-Jena (Jena, D)
pH-Meter	Schott (Mainz, D)
Pipettierhilfe (Pipettboy)	Integra Biosciences (Fernwald, D)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, D)

PlugSys	Hugo Sachs Elektronik KG (March, D)
Präparierbesteck	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Rüttelmühle MM301	Retsch GmbH (Haan, D)
Sterilwerkbank (Hera safe)	Heraeus (Osterode, D)
Thermogerät	Eppendorf (Hamburg, D)
Trockenschrank (T 12)	Heraeus (Osterode, D)
Vakuumpumpe	Bio-Rad (Hercules, USA)
Vortexer (94323)	Heidolph (Schwabach, D)
Wasserbad (SW 20)	Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach, D)
Zentrifuge (Labofuge 200)	Heraeus (Osterode, D)

Tabelle 12: Software

Ascent Software Version 2.6	Thermo Fisher Scientific (San José, USA)
AxioVision 4.5	Carl Zeiss (Göttingen, D)
Bio-Plex Manager™ 4.1.1.	Bio-Rad (Hercules, USA)
Bio-1D version 12.01a	Vilber Lourmat (Marne la Vallée, F)
ChemiCapt 3000, Version 2.4	Vilber Lourmat (Marne la Vallée, F)
HSE-BDAS 1.1.1.74	Kegler & Guhr (Groß-Zimmern, D)
MikroWin Version 4.41	Mikrotek Laborsysteme GmbH (Overath, D)
MS Office 2007	Microsoft Corporation (Santa Rossa, USA)
Prism 5 for Windows Version 5.00	GraphPad Software Inc. (La Jolla, USA)
EndNote X1.0.1	Thomson Reuters (New York, USA)

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

Im Rahmen von Rezeptorstudien und Signalweg-Analysen wurde mit humanen Umbilicalvenen-Endothelzellen (HUVECs) gearbeitet und deren Kultivierung in 25 bzw. 75 cm² großen Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5% durchgeführt. Für die Versuche wurden Zellen der Passagen 2 bis 9 verwendet. Die Zusammensetzung der jeweiligen Zellkulturmedien ist Tabelle 3 zu entnehmen.

3.2.1.1. Medienwechsel und Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden regelmäßig bei Erreichen von ca. 80% Konfluenz passagiert; dies entspricht einem Rhythmus von 2-3 Tagen. Die Konfluenz wurde vor jeder Passage mithilfe eines Mikroskops überprüft. Nach Absaugen des Mediums wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml TrypLE, einem rekombinant hergestellten Trypsinersatz, wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Der Vorgang wurde mit dem Mikroskop verfolgt und bei nahezu vollständiger Ablösung der Zellen mit 3 ml Trypsin-Neutralisationslösung (TNS) abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (2200x g, 5 min). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren voneinander gelöst. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 vereinzelt bzw. zur finalen Aussaat je nach Größe des verwendeten Zellträgers verdünnt.

3.2.1.2. Zellzahlbestimmung

Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und eines Mikroskops (100-fache Vergrößerung: Okular 10x, Objektiv 10x) wurden stichprobenartig Zellen gezählt und so auf die Gesamtmenge der Zellsuspension geschlossen. Auf dieser Grundlage wurden die Verdünnungen für die Neu- und Aussaat der Zellen ermittelt. Das jeweilige Volumen Zellsuspension wurde entnommen und je nach Anwendung mit dem entsprechenden Medium auf die gewünschte Zelldichte verdünnt. Die so eingestellte Zellsuspension wurde in Zellkulturschalen bzw. auf Objektträger ausgesät.

3.2.1.3. Kryokonservierung der Zellen

Die Kryokonservierung dient dem Zweck der Zell-Vorratshaltung bei -196°C in flüssigem Stickstoff.

Hierzu wurden die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase, i.e. vor Erreichen der vollständigen Konfluenz, wie in Kap. 3.2.1.1. beschrieben, geerntet. Abweichend davon wurde das Zellpellet nach dem Zentrifugieren in 2 ml Kryo-SFM resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mittels Isopropanol langsam auf -80°C abgekühlt und dann für die langfristige Vorhaltung in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

3.2.1.4. Auftauen der Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden bei Bedarf aufgetaut und sofort in ein 15 ml-Röhrchen mit Vollmedium (37°C) überführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert ($2500\times g$, 5 min) und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet in frischem Vollmedium resuspendiert und in einer neuen Kulturflasche ausgesät.

3.2.1.5. Stimulation der Zellen

Zur Vorbereitung einer gleichmäßigen Zellstimulation war es notwendig, den Zellzyklus der HUVECs zu synchronisieren.

Zu diesem Zweck wurde den Zellen 24 h vor der Stimulation das Vollmedium entzogen und durch Mangelmedium (vgl. Tabelle 3) ersetzt.

Die Stimulation mit den zu testenden Substanzen erfolgte nach Waschen der Zellen mit PBS in Stimulationsmedium (vgl. Tabelle 3).

3.2.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1. RNA-Isolation und -Aufreinigung aus HUVECs

Die RNA aus HUVECs wurde mittels RNeasy mini Kit (Qiagen) laut Herstellerprotokoll durchgeführt und anschließend in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

3.2.2.2. RNA-Isolation und -Aufreinigung aus Nierengewebe

Zur Isolation von RNA aus Nierengewebe wurden tiefgefrorene Gewebeproben (-80°C) à 25 mg mittels einer Rüttelmühle pulverisiert, unter Verwendung des RNeasy mini Kits (Qiagen) laut Herstellerprotokoll aufgereinigt und anschließend in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

3.2.2.3. Quantitative Nukleinsäure-Analyse

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Proben wurde die optische Dichte (OD) mit Hilfe eines NanoDrop®-ND-1000-Spektralphotometers (Eppendorf) gemessen.

Dafür wurden 1,5 µl der zu messenden Probe laut Herstellerprotokoll eingesetzt und die Absorption bei 260 nm (A_{260}) gemessen. Diese Wellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren, wobei $A_{260}=1$ 40 µg einzelsträngiger RNA/ ml bzw. 50 µg/ml einzelsträngiger DNA entsprechen.

3.2.2.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch PCR ist es möglich, kleinste Mengen spezifischer DNA-Sequenzen (*Template*) nachzuweisen und zu vervielfältigen. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der enzymatischen Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-*Primern*, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Man unterscheidet dabei die Zwischenschritte der Denaturierung, der Hybridisierung und der Elongation.

Während der Denaturierung werden die Doppelstränge der *Template*-DNA durch Temperatureinwirkung voneinander getrennt und liegen anschließend als Einzelstränge vor. Im zweiten Schritt, der Hybridisierung, binden spezifische *Primer* an komplementäre DNA-Abschnitte. In der Elongationsphase synthetisiert eine Polymerase ausgehend von den bereits gebundenen *Primern* den komplementären DNA-Strang,

sodass nach Renaturierung am Ende eines Zyklus die doppelte Menge doppelsträngiger DNA vorliegt. Durch mehrmalige Wiederholung eines solchen Zyklus kann die DNA exponentiell vervielfältigt werden.

cDNA-Synthese aus RNA mittels RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) ist eine Kombination aus zwei molekularbiologischen Methoden: Die Nutzung des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) zur Umschreibung von RNA in DNA und die anschließende Nutzung der PCR.

Um eine Probe als *Template* für eine PCR verwenden zu können, muss die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dies ist notwendig, da bei der Amplifikation von DNA sogenannte Taq-Polymerasen verwendet werden, die DNA-spezifisch sind und RNA nicht amplifizieren können. Das Synthetisieren der cDNA erfolgt mit der RNA-abhängigen Polymerase Reverse Transkriptase. Als *Primer* für die Reaktion dienen Hexaoligonukleotide mit einer zufälligen Sequenz (*Random Primer*) und Oligo-d(T)-*Primer*, die dem Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA komplementär sind.

Die in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR wurden mit dem High Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems) durchgeführt.

2 µg RNA wurden laut Herstellerangaben in 10 µl RNase-freiem Wasser eluiert und im Thermocycler (70°C, 5 min) erhitzt. Die Komponenten des Synthesegemisches wurden bei 4°C aufgetaut und, wie in Tabelle 13 beschrieben, pipettiert.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Synthesegemisches zur RT-PCR

Komponente:	Menge:
H ₂ O (RNase-frei)	3,2 µl
RNAsin	1 µl
10x RT-Puffer	2 µl
dNTPs [10 mM]	0,8 µl
10x <i>Random Primer</i>	2 µl
MultiScribe RT [50 U/ µl]	1 µl

Jede RNA-Probe wurde mit 10 µl Synthesegemisch versetzt und anschließend im Thermocycler in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion (1. Schritt: 10 min, -25°C; 2. Schritt: 2 h, 37°C) wurde in 35 Zyklen wiederholt und anschließend auf 4°C gekühlt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Amplifizierung der S1P-Rezeptor-cDNA mittels PCR

Zur Durchführung der PCR wurde der GoTaq Green® Master-Mix (Promega) verwendet. Dieser enthält bereits die nötige Taq-DNA-Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Magnesiumchlorid (MgCl₂), Reaktionspuffer sowie den für eine spätere Gelelektrophorese notwendigen farbigen Probenpuffer. Zugefügt werden mussten das zu verwendende *Template* sowie entsprechende *Primer*, deren Sequenzen Tabelle 9 zu entnehmen sind.

Jeder cDNA-Ansatz wurde mit je 1 µl *Forward-* (Fwd.) und *Reverse-Primer* (Rev.) versetzt und mit RNase-/ DNase-freiem Wasser auf 25 µl Gesamtvolumen gebracht.

Die Proben wurden zentrifugiert (1000x g, 1 min, 4°C) und das PCR-Programm (vgl. Tabelle 14) durch einen Thermocycler realisiert. Das PCR-Produkt wurde bis zur anschließenden Agarose-Gelelektrophorese bei -20°C gelagert.

Tabelle 14: PCR-Programm zur Amplifizierung von S1P₁₋₃-Rezeptoren

PCR-Programm „S1P₁₋₃ [Ratte]“

Initial-Denaturierung	95°C, 10 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	94°C, 30 sek	
Hybridisierung	55°C, 30 sek	
Elongation	72° C, 45 sek	
Final-Elongation	72°C, 5 min	

PCR-Programm „S1P₁₋₃ [Mensch]“

Initial-Denaturierung	96°C, 2 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	94°C, 45 sek	
Hybridisierung	58°C, 60 sek	
Elongation	72° C, 60 sek	
Final-Elongation	72°C, 5 min	

3.2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese zur Größenbestimmung von DNA

Mittels Agarose-Gelelektrophorese lassen sich Nukleinsäuren ihrer Größe nach auftrennen; durch Verwendung eines Längenstandards lässt sich anschließend ihre Größe bestimmen.

Für die Elektrophorese wurden 1-2%ige Agarosegele verwendet. Zur Herstellung der Gele wurden dafür 1 bzw. 2 g Agarose mit 100 ml TAE-Puffer (1x) in einer Mikrowelle aufgekocht und mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt. Die Mischung wurde in eine Gelkammer gegossen und das Gel nach Erkalten in eine Elektrophoreseapparatur überführt und mit TAE-Puffer (1x) beschichtet.

Nach Auftragen der Proben und Marker wurde eine Spannung (100 V, 30 min) angelegt. Im Folgenden wurden die Banden unter UV-Licht fotografiert und mithilfe des Längenstandards charakterisiert.

3.2.3. Biochemische Methoden

3.2.3.1. Protein-Lysat-Gewinnung aus HUVECs

In Vorbereitung der Zellen wurden diese zweimal mit PBS (4°C) gewaschen. Zur Zellyse wurden 70 µl NP40-Lysepuffer (4°C, Biosource) pro 60 cm²-Schale zugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt, in ein Ultraschallbad getaucht (4°C, 10 sek) und anschließend zentrifugiert (4500x g, 4°C, 5 min).

3.2.3.2. Proteinbestimmung mit dem Bicinchoninsäureassay (BCA)

Mithilfe des BCA™ Protein Assay Kits (Thermo Scientific) wurde die Proteinkonzentration der Zelllysate laut Herstellerprotokoll photometrisch bei 540 nm bestimmt.

3.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die gebräuchlichste Methode zur Auftrennung von Proteingemischen ist die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), bei der Proteine entsprechend ihrer Molmasse aufgetrennt werden.

Die Zelllysate wurden bei einem Gesamtvolumen von 50 µl je Tasche mit Lämmli-Probenpuffer auf eine Menge von 20 µg Protein eingestellt. Das Proben-Puffer-Gemisch wurde erhitzt (95°C, 5 min) und anschließend auf das Gel aufgetragen. Für die Gelelektrophorese wurden 12%ige SDS-Polyacrylamidgele (Thermo Scientific) eingesetzt und die Elektrophoresekammer mit zugehörigem 1x-Laufpuffer (vgl. Tabelle 2) gefüllt. Zur Identifikation des gesuchten Proteins anhand des Molekulargewichts wurde ein Proteinmarker eingesetzt (vgl. Tabelle 7). Die Elektrophorese wurde bis zum Lauffront-Ende des Gels bei einer konstanten Spannung (100 V, 90 min) durchgeführt.

3.2.3.4. Western-Blotting

Beim *Western-Blotting* werden die mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine vom Gel auf einen geeigneten Träger (hier eine Nitrocellulose-Membran) übertragen. In diesem Fall wurde hierzu das iBlot™ Dry Blotting Systems (Invitrogen) verwendet und der Transfer für 7 min bei einer konstanten Spannung von 20 V durchgeführt.

Zur Kontrolle des erfolgreichen Proteintransfers wurden die SDS-Polyacrylamid-Gele anschließend für 10 min in Coomassie-Blau inkubiert und dann für mehrere Stunden in Entfärberlösung gewaschen, um so unspezifische Anfärbungen durch Coomassie-Blau zu entfernen und die Proteinbanden im Gel zu visualisieren.

3.2.3.5. Proteindetektion

Prinzip der Proteindetektion ist es, die auf der Trägermembran befindlichen Proteine durch eine Antikörper-vermittelte Enzymreaktion nachzuweisen.

Dafür wurden zunächst die unspezifischen Proteinbindungsstellen für mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit *Blocking*-Reagenz inkubiert. Der Blot wurde danach mit einem unmarkierten anti-Antigen-Antikörper (Primärantikörper), der an das Zielprotein bindet, über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBST gewaschen (3x 5 min), um überschüssige Antikörper zu entfernen. Der Blot wurde im Anschluss mit einem Peroxidase-gekoppelten, speziesspezifischen Sekundärantikörper inkubiert (2 h, Raumtemperatur). Dieser Antikörper erkennt und bindet an den speziesspezifischen konstanten Teil des Primärantikörpers und katalysiert eine proteinkonzentrationsabhängige Lichtreaktion.

Die verwendeten Antikörper und zugehörigen *Blocking*-Reagenzien sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Über den Peroxidase-markierten Sekundärantikörper konnte die spezifische Proteinbindung visualisiert werden. Dabei katalysiert die Peroxidase in der *enhanced chemoluminescence* (ECL) -Reaktion die Oxidation von Luminol und löst damit eine Chemolumineszenz aus, die von einer Kamera detektiert werden kann.

Hierzu wurde die Membran erneut mit TBST gewaschen (3x 5 min, Raumtemperatur) und dann in Detektionslösung inkubiert (Super Signal® West Dura, 5 min).

3.2.3.6. Signal-Quantifizierung

Zur Quantifizierung des Lumineszenzsignals wurde die Bio-1D-Software (Vilber Lourmat) mit folgenden Einstellungen verwendet.

Quantifizierungsabschnitte:	gleich groß
Rolling Ball:	Stufe 7
Threshold:	50% des Grauwert-Maximums der Negativkontrolle

3.2.3.7. Stripping

Das *Stripping* dient dazu, bereits gebundene Antikörper von einer Trägermembran wieder zu entfernen. Unter wiederholter Anwendung ist es so möglich, auf einer Membran verschiedene Proteine durch mehrere spezifische Antikörperreaktionen zu detektieren.

Hierzu wurde die Trägermembran in Restore™ Western-Blot Stripping Buffer inkubiert (10 min) und anschließend mit TBST gewaschen (3x 5 min) bevor die erneute Proteindetektion mit dem Blocken der Membran fortgesetzt wurde.

3.2.4. Intrazelluläre NO-Bestimmung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Als direktes Korrelat einer eNOS-Aktivierung wurde die intrazelluläre NO-Produktion in HUVECs mittels DAF2-DA-Färbung visualisiert. Bei dieser histochemischen Methode werden die Zellen mit DAF2-DA, einem nicht fluoreszierenden, zellmembrangängigen Stoff behandelt. Durch zytosolische Esterasen wird Diaminoacetat aus dem Molekül abgespalten und in die impermeable, nicht fluoreszierende Form des DAF2 umgewandelt. Dies reagiert in Anwesenheit von NO zu einem stark fluoreszierenden Triazol.

3.2.4.1. Stimulation und DAF2-DA-Beladung der Zellen

HUVECs ($1,2 \times 10^5$ Zellen) wurden auf μ -dishes (ibidi) ausplattiert und für einen Zeitraum von 48 h kultiviert. Um die Zellen in ihrem Zellzyklus zu synchronisieren (Arrest in G₀) wurde 24 h vor Versuchsbeginn das Voll- durch Mangelmedium ersetzt (vgl. Tabelle 3).

Die Stimulation der Zellen erfolgte in Stimulationsmedium (vgl. Tabelle 3) bei 37°C und 5% CO₂. Während der letzten 20 min der Stimulation wurden die Zellen mit DAF2-DA [5 μ mol/l] in Stimulationsmedium inkubiert. Im Falle einer Co-Stimulation mit Inhibitoren und Rezeptorantagonisten wurden die Zellen zuzüglich bereits 20 min vor Stimulation mit diesen in Stimulationsmedium inkubiert.

3.2.4.2. Fixierung der Zellen

Die Fixierung der verwendeten Zellen wurde mit Glutaraldehyd durchgeführt. Neben einer Zell-Konservierung unmittelbar nach Stimulationsende potenziert diese Behandlung die zu messende Fluoreszenz durch eine Interaktion der Aldehydgruppen des Glutaraldehyds mit reaktiven Aminogruppen des DAF2-DA-Moleküls.^{101, 102} Hierzu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit PBS in Glutaraldehyd-Lösung (2%, 4°C, 3 min) fixiert und anschließend erneut zweifach mit PBS gewaschen.

3.2.4.3. NO-Messung

Zum Zweck der Dokumentation und nachfolgender NO-Quantifizierung wurden mindestens 3 zufällig ausgewählte Zellgruppen (je 10-100 Zellen) mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops (Exzitationsfilter: 470–490 nm, dichromatischer Spiegel:

505 nm, Emissionfilter: 515 nm) mit einer einheitlichen Belichtungszeit pro Versuchsserie fotografiert, um derart Unterschiede in der Fluoreszenzintensität optisch sichtbar zu machen und für die spätere Quantifizierung zu speichern.

3.2.4.4. Quantifizierung

Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals (Fluoreszenzintensität/ Fläche) erfolgte mithilfe der AxioVisio-Software (Carl Zeiss GmbH). Dabei wurde der Farbwert des Bildes in Relation zur Zellfläche gesetzt und für alle Analysen einheitliche Parameter zur Auswertung festgelegt (vgl. Tabelle 15).

Tabelle 15: Parameter zur optischen Fluoreszenzsignal-Quantifizierung

Parameter:	Einstellung:
Helligkeit	-0,50
Kontrast	1,02
Gamma-Wert	0,80
Sigma-Filter	96
<i>Shading</i> -Korrektur	0
Kantenverbesserung	
Schwellenwert-Korrektur	1638
Größe	3
Segmentierung	
Toleranz	5
Randgröße	3
<i>Treshold</i>	1403

3.2.5. Nachweis von Signalproteinen mittels Bio-Plex-Technologie

Beim Bio-Plex™-Suspensions-Array-System (Bio-Rad) handelt es sich um ein flussbasiertes Mikroplatten-Lesegerät, das durch Verwendung eines Dual-Lasers theoretisch bis zu 100 unterschiedliche Analyte pro Versuchsansatz detektieren und quantifizieren kann. Ähnlich wie bei einem *Sandwich*-Immunoassay kommen hierbei zwei verschiedene Antikörper zum Einsatz. Der erste, welcher kovalent mit einem farbkodierten Molekül, *bead* genannt, verknüpft ist, bindet dabei spezifisch an das Zielprotein. Ein zweiter, biotinylierter Detektionsantikörper wiederum bindet spezifisch an ein anderes Epitop desselben Zielproteins. Nach Zugabe von Streptavidin-

Phycoerythrin, welches als Reportermolekül an den Detektionsantikörper bindet, können die *Sandwich*-Komplexe photometrisch detektiert und quantifiziert werden.

Durch Messung der *bead*-spezifischen Eigenfluoreszenz und gleichzeitiger Detektion der *bead*-Oberflächen-Fluoreszenz kann die Menge des Zielproteins in der Probe ermittelt werden.

Da das zu bestimmende Signalprotein Akt in phosphorylierter Form aktiv und in dephosphorylierter Variante inaktiv ist, wurden die zu untersuchenden Proben in zwei Ansätzen analysiert. Im ersten Ansatz wurden dabei nur die phosphorylierten Varianten des Signalproteins einer Probe detektiert, während im zweiten Ansatz derselben Probe die Menge an Signalprotein unabhängig von der Phosphorylierung bestimmt wurde.

Durch eine Gesamtproteinmengen-Bestimmung der Proben mittels BCA und dem Verhältnis aus phosphorylierter Variante zum Gesamt-Signalprotein war es möglich, das Fluoreszenzsignal phosphorylierten Akts in Relation zum Gesamtgehalt an Signalprotein und dies in Relation zum Gesamtproteingehalt der Probe zu setzen.

Analysiert wurden HUVEC-Lysate mithilfe des Bio-Plex™ Phosphoprotein Detection Kits (Bio-Rad). Nach Stimulation der Zellen in 60 cm²-Schalen (vgl. Kap. 3.2.1.5.) wurden diese nach Herstellerangaben in 100 µl Lysepuffer aufgeschlossen und für die Messung aufbereitet. Mithilfe der Bio-Plex Manager™ Software (Bio-Rad) wurden die Messung gesteuert und die Daten ausgewertet.

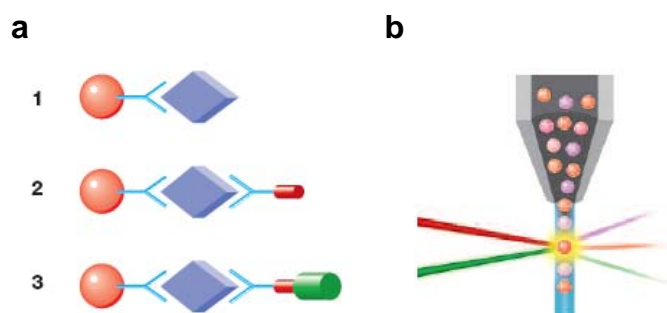


Abbildung 3: Messprinzip der Bio-Plex-Methode (Bio-Rad)

(a) Bei der Bio-Plex-Methode bindet der mit einem spezifischen *bead* konjugierte Primärantikörper an das Zielprotein (1), gefolgt von der Bindung des biotinylierten Detektionsantikörpers (2) und dem Reportermolekül Streptavidin-Phycoerythrin (3).

(b) Durch das Bio-Plex-Lesegerät werden mittels eines roten Klassifizierungs- und eines grünen Reporter-Lasers die *bead*-spezifische Spektral-Adresse und das zugehörige Reporter-Signal ermittelt.

3.2.6. Physiologische Methoden

Die physiologische Messmethode an isoliert perfundierten Nieren wurde genutzt, um den Einfluss potentiell vasoaktiver Substanzen *ex vivo* testen zu können. Hierzu waren Organentnahmen aus Ratten nötig.

Erlaubnis zur Durchführung von Tierexperimenten:

Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und
Soziales Berlin – Organentnahme an Ratten
Aktenzeichen: O 0212/02

3.2.6.1. Tiere

Die Nieren, die zur myographischen Messung verwendet wurden, stammten aus Wistar-Ratten mit einem Durchschnittsalter von 100 Tagen und einem mittleren Körpergewicht von 300 g. Sie wurden in Kolonie bei einer Raumtemperatur zwischen 19 und 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-70% in einem begehbaren Tierstall ohne Fenster gehalten. Ein Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden wurde durch ein Zeitschaltprogramm vorgegeben (Tag = Dauerbeleuchtung von 6 bis 18 Uhr). Als Einstreu diente entstaubte, keimfreie Weichholzfaser, deren Wechsel zweimal pro Woche erfolgte. Trinkwasser und Trockenfutter wurden *ad libitum* angeboten, zusätzlich dreimal je Woche Körner und Obst. Zwischen Anlieferung und dem ersten Tierversuch lagen mindestens 5 Tage zur Akklimatisierung. Die Nierenexplantation wurde zwischen 8 und 14 Uhr durchgeführt.

3.2.6.2. Nierenexplantation

Die Nierenexplantation erfolgte nach Anästhesie mittels intraperitonealer Applikation von Ketamin [50 mg/ 100 g KG] und Xylazin [10 mg/ 100 g KG]. Im Zustand der Schmerzreflexlosigkeit wurden zuerst die Bauchdecke, dann das Peritoneum mit einem Y-förmigen Schnitt eröffnet. Um die Nieren freizulegen, wurden die Bauchorgane nach lateral verlagert und die linke Niere sowie die *Vasa renales*, die *Aorta abdominalis* und die *Vena cava inferior pars abdominalis* vom umliegenden Bindegewebe und der *Capsula renalis* stumpf freipräpariert. Nach dem supra- und infrarenalen Ligieren der *Aorta abdominalis* wurde diese mit einer Mikroschere halbkreisförmig eröffnet und ein

Katheter retrograd bis in die *Arteria renalis* vorgeschoben. Weitere Ligaturen um *Aorta* und *Arteria renalis* dienten hierbei dem Fixieren des Katheters.

Zur Vermeidung einer intrarenalen Thrombosierung wurden die präparierten Nieren vor der Explantation mit Heparin [500 IE] über den Katheter gespült.

Nach sofortiger Entnahme wurden die Nieren in die Wärmekammer des Myographen gespannt, mit Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert und der basale Perfusionsdruck je nach Gefäßdurchmesser durch Regulation der zuführenden Pumpe auf Werte zwischen 80 und 100 mmHg eingestellt.

3.2.6.3. Messmethode an der isoliert perfundierten Niere

Der basale mittlere arterielle Druck (MAD) der isoliert perfundierten Rattennieren betrug nach Äquilibration 80-100 mmHg. Während der Perfusionsversuche sank dieser um bis zu 25 mmHg ab. Diese Autoregulation der blutdruckregulierenden Gefäßabschnitte wurde als normal gewertet. Bei größeren basalen Änderungen des MAD wurde der Versuch abgebrochen.

Die applizierten Substanzen wurden in Krebs-Henseleit-Lösung verdünnt. Die Bolusapplikation der Standardsubstanzen Angiotensin II (AngII [1 µmol/l]) und α,β -Methylen-Adenosintriphosphat (abMet-ATP [10 µmol/l]) erfolgte zu Versuchsbeginn, die von Acetylcholin (ACh [1 µmol/l]) nach Vorkontraktion der Niere mit AngII [1 µmol/l]. Entsprechende MAD-Änderungen wurden mit Referenzkurven verglichen und der Versuch nur dann weitergeführt, wenn die erwartete MAD-Änderung durch die Standardsubstanzen im Referenzbereich lag.

Anschließend wurde die Wirkung von potentiell vasoaktiven Substanzen auf den renalen MAD der Ratten durch intrarenal-arterielle Bolus- und Dauer-Applikation unter kontinuierlicher Aufzeichnung des MAD gemessen.

3.2.7. Statistische Auswertung

Durchschnittswerte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mithilfe eines zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests durch die Prism 5-Software (GraphPad) durchgeführt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant (*) gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis von S1P₁₋₃-Rezeptoren mittels RT-PCR

Zum Nachweis der Expression von S1P₁₋₃ für die folgenden Experimente wurde die Rezeptor-mRNA der drei Subtypen mittels RT-PCR aus HUVECs und Nierengewebe aus Wistar-Ratten amplifiziert und durch anschließende Agarose-Gel-Elektrophorese visualisiert.

Wie in Abbildung 4 ersichtlich, werden die Rezeptoren S1P₁₋₃ sowohl in Rattennieren als auch in HUVECs exprimiert.

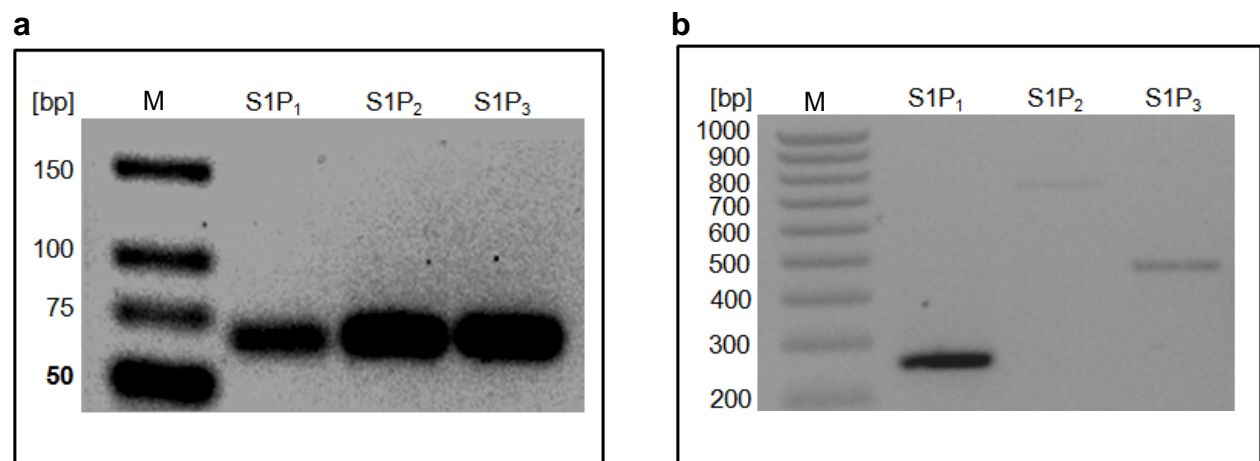


Abbildung 4: Agarose-Gel-Elektrophorese nach RT-PCR-basierter Amplifizierung der S1P₁₋₃-Rezeptor-mRNA

Detektion der cDNA-Banden von S1P₁₋₃ aus Zelllysaten von (a) Nierengewebe aus Wistar-Ratten, (b) aus HUVECs (M: Marker [bp]).

4.2. Fluoreszenzbasierte NO-Detektion am Mikroskop

4.2.1. Zeitreihenanalyse bekannter S1P-Agonisten

Wie aus der Literatur bekannt, kann eine Stimulation mit S1P zu einer Aktivierung der eNOS und somit zu einer NO-Generation in ECs führen. Zur Testung einer potentiellen NO-Produktion durch bekannte S1P-Analoga wurde ein Versuch konzipiert, durch den eine NO-Produktion in HUVECs visualisiert werden kann. Hierzu wurden ECs mit einer Auswahl bekannter S1P-Analoga zeitabhängig stimuliert und mit dem Fluorophor DAF2-DA behandelt. Abbildung 5 zeigt eine repräsentative Zusammenstellung DAF2-DA-behandelter HUVECs nach Stimulation mit den verwendeten S1P-Agonisten (Abbildung 5a) sowie die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten/ Fläche über die Zeit (Abbildung 5b). Die quantitativen Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten/ Fläche zum Zeitpunkt 40 min nach Stimulation sind in Abbildung 5c repräsentiert.

Wie Abbildung 5b zu entnehmen ist, besitzen alle verwendeten S1P-Agonisten das Potential, eine NO-Generation anzustoßen, die sich jedoch bei gleichen Stimulationskonzentrationen und -zeiten in quantitativ unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten und einem verschiedenartigen Wirkprofil widerspiegelt. So lag das Fluoreszenzmaximum aller Agonisten zwar zwischen 40 und 60 min, wohingegen das Aktivierungspotential und die Stimulationskinetik über die Zeit jedoch variierten. Eine Stimulation mit AUY954 zum Zeitpunkt 40 min führte zu einer signifikanten Zunahme des Fluoreszenzsignals auf $227,6 \pm 68,0\%$, die Anwendung von pFTY720 zu einer Zunahme auf $207,5 \pm 25,2\%$ gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Auch die S1P-Agonisten VPC24191 und pKRP-203 zeigten nach 40minütiger Stimulation eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität/ Fläche auf $219,7 \pm 48,0\%$ bzw. $155,8 \pm 52,6\%$. Lediglich die 40minütige Stimulation mit SEW2871 ergab mit $129,3 \pm 41,6\%$ keine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität/ Fläche. Wie aus Abbildung 5b ersichtlich, zeigte die Stimulation mit diesem Agonisten erst zu einem späteren Zeitpunkt, i.e. nach 60 min, eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität/ Fläche auf $164,5 \pm 42,7\%$.

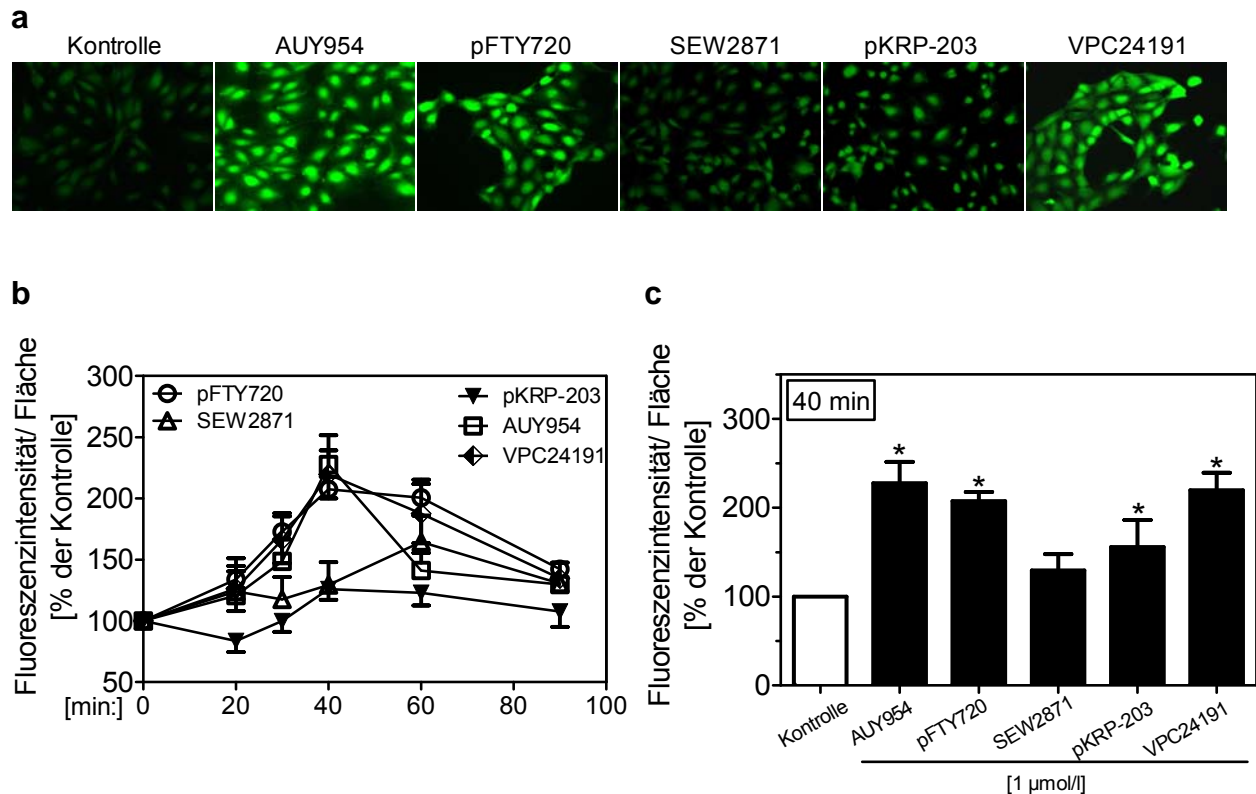


Abbildung 5: Dosiswirkungsbeziehung bekannter S1P-Agonisten auf die NO-Produktion

(a) Repräsentative Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs nach Stimulation mit AUY954, pFTY720, SEW2871, pKRP-203, VPC24191 [je 1 µmol/l, 40 min] im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

(b) Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensitäten/ Fläche [% der Kontrolle] unter Agonist-Stimulation über die Zeit [0-90 min].

(c) Quantifizierung der relativen Fluoreszenzintensitäten/ Fläche [% der Kontrolle] unter Agonist-Stimulation nach 40 min. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. Kontrolle; $n \geq 3$)

Da DAF2-DA-basierte Zeitreihenanalysen für die fluoreszenzmikroskopische NO-Messung in HUVECs bereits beschrieben wurden⁴⁵, sind im Folgenden lediglich die Ergebnisse einer AUY954-induzierten NO-Produktion in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer dargestellt. Abbildung 6 repräsentiert eine Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs nach Stimulation mit AUY954 über die Zeit (Abbildung 6a) sowie die zugehörige Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals (Abbildung 6b). Dabei ergab sich zu jedem Stimulationszeitpunkt eine signifikante Zunahme der Fluoreszenzintensität/ Fläche gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Die Stimulationskinetik zeigte über einen Zeitraum von 40 min eine Signalzunahme auf ein Maximum von $227,6 \pm 68,0\%$, nach weiteren 20 min einen Abfall des relativen Fluoreszenzsignals auf $141,1 \pm 25,2\%$ und lag nach insgesamt 90 min mit $129,6 \pm 5,7\%$ nur geringfügig über der unstimulierten Kontrolle. Aus diesem Grund wurde für die

weitere Durchführung fluoreszenzmikroskopischer Versuche mit AUY954 in dieser Arbeit eine Stimulationszeit von 40 min definiert.

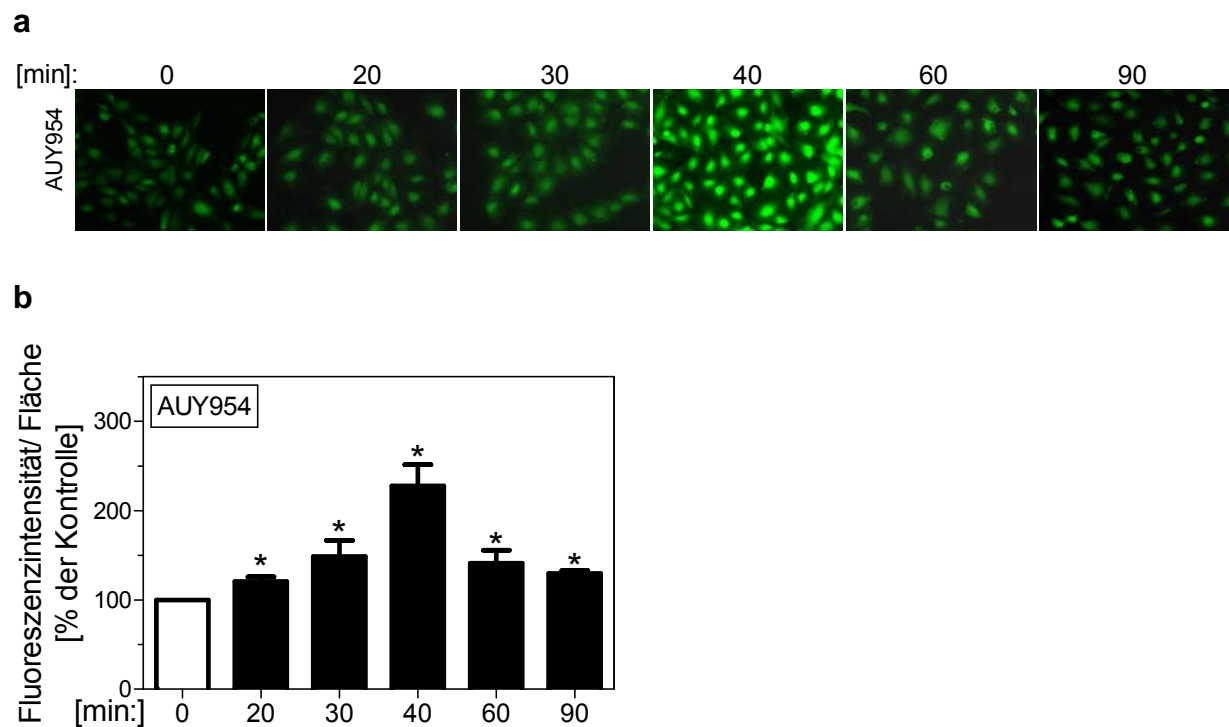


Abbildung 6: Zeitabhängigkeit der NO-Produktion nach Stimulation mit AUY954

(a) Repräsentative Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs nach Stimulation mit AUY954 [1 μ mol/l] über die Zeit [0-90 min] im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

(b) Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals: Fluoreszenzintensität/ Fläche [% der Kontrolle] nach AUY954-Stimulation. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. Kontrolle; $n \geq 3$)

4.2.2. Dosiswirkungsbeziehung von AUY954 und pFTY720

4.2.2.1. AUY954

Im Zusammenhang mit der fluoreszenzmikroskopischen Analyse einer AUY954-evozierten NO-Produktion wurde die Dosiswirkungsbeziehung in humanen ECs analysiert. Abbildung 7 zeigt eine repräsentative Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs, die mit AUY954 in steigenden Konzentrationen stimuliert wurden (Abbildung 7a). Die Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals (Abbildung 7b) ergab eine signifikante Signalzunahme für Agonistkonzentrationen zwischen 0,1-10 $\mu\text{mol/l}$ auf Werte von $170,6 \pm 39,1\%$, $227,6 \pm 68,0\%$ bzw. $244,9 \pm 53,3\%$ gegenüber der unstimulierten Kontrolle (100%). Da HUVECs bei Verwendung einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ AUY954 zum Teil morphologische Veränderungen zeigten, wurde trotz eines Signalmaximums bei dieser Konzentration für die weiteren fluoreszenzmikroskopischen Analysen in dieser Arbeit eine Agonistkonzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ definiert.

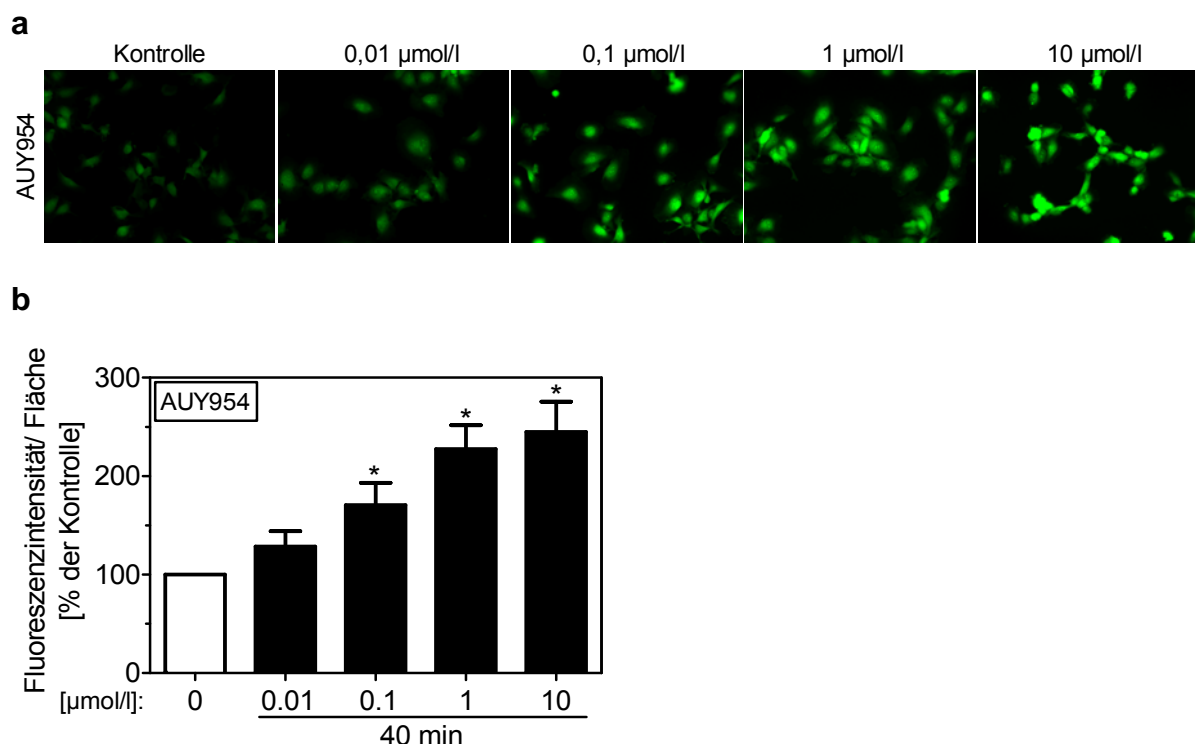


Abbildung 7: Dosiswirkungsbeziehung der AUY954-induzierten NO-Synthese

(a) Repräsentative Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs nach Stimulation mit AUY954 [0,01-10 $\mu\text{mol/l}$, 40 min] im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

(b) Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals: Fluoreszenzintensität/ Fläche [% der Kontrolle] nach AUY954-Stimulation. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. Kontrolle; $n \geq 3$)

4.2.2.2. pFTY720

Analog zu den Zeitreihenanalysen von FTY720 wurde auch der Dosiswirkungszusammenhang bezüglich einer NO-Produktion in HUVECs bereits beschrieben.⁴⁵ Zur Vermeidung von Unterschieden bei der Versuchsdurchführung und zur späteren objektiven Vergleichsanalyse wurden auch mit der phosphorylierten Agonistvariante pFTY720 fluoreszenzmikroskopische Messungen zur Dosiswirkungsbeziehung in HUVECs durchgeführt. Abbildung 8 zeigt eine repräsentative Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs, die mit pFTY720 in steigenden Konzentrationen stimuliert wurden (Abbildung 8a). Die Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals (Abbildung 8b) ergab eine signifikante Signalzunahme für Agonistkonzentrationen zwischen 0,1-10 $\mu\text{mol/l}$ auf Werte von $147,3 \pm 42,0\%$, $211,5 \pm 25,9\%$ bzw. $188,3 \pm 36,2\%$ gegenüber der unstimulierten Kontrolle (100%). Das Wirkmaximum wurde in diesem Zusammenhang unter Verwendung einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ erzielt.

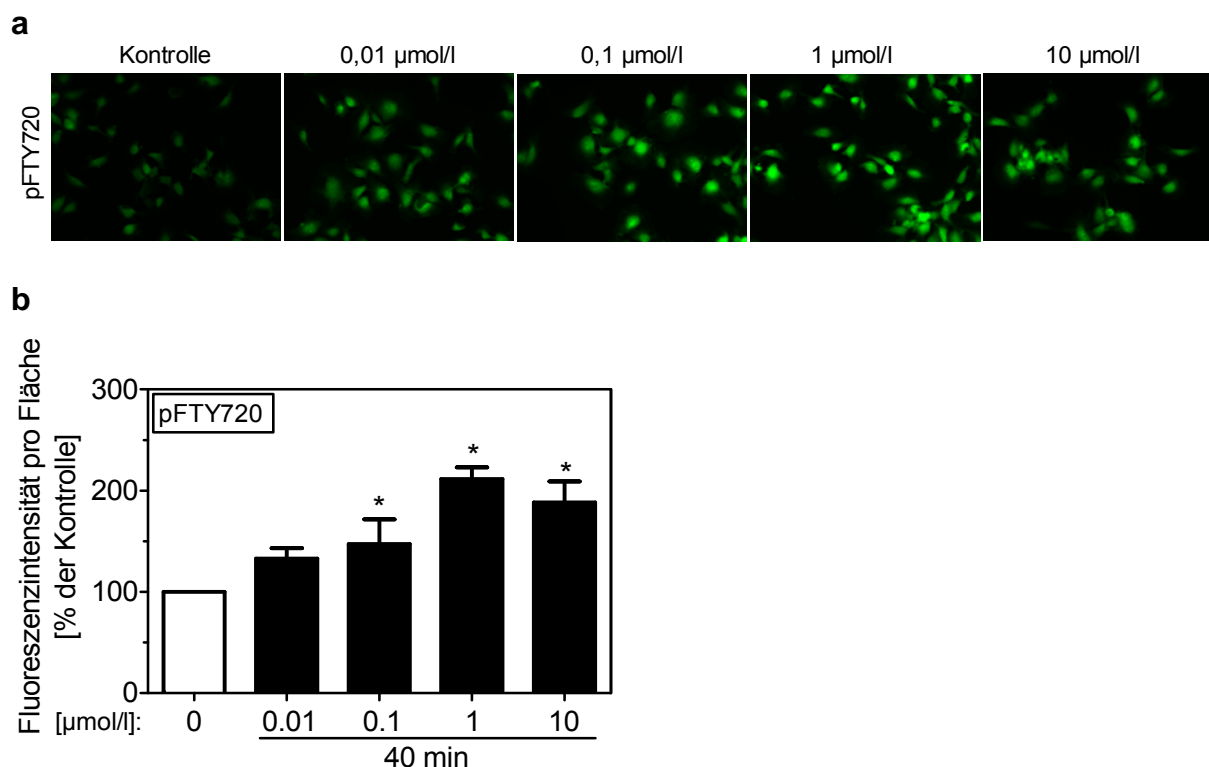


Abbildung 8: Dosiswirkungsbeziehung der pFTY720-induzierten NO-Synthese

(a) Repräsentative Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs nach Stimulation mit pFTY720 [0,01-10 $\mu\text{mol/l}$, 40 min] im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

(b) Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals: Fluoreszenzintensität/ Fläche [% der Kontrolle] nach pFTY720-Stimulation. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. Kontrolle; $n \geq 3$)

4.2.3. Kompetitive Hemmung der NO-Produktion durch L-NAME

Unter Verwendung des kompetitiven eNOS-Inhibitors L-NAME lässt sich eine NO-Produktion in ECs nahezu vollständig aufheben.

Zur Antagonisierung einer AUY954-induzierten NO-Synthese wurden HUVECs mit L-NAME und dem Agonisten co-inkubiert und das Ausmaß der NO-Synthese durch Behandlung mit DAF2-DA fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. Abbildung 9 zeigt eine repräsentative Zusammenstellung von nach Stimulation angefärbten HUVECs, die mit und ohne L-NAME inkubiert wurden (Abbildung 9a). Die zugehörige Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals (Abbildung 9b) macht deutlich, dass das durch AUY954 evozierte Fluoreszenzsignal unter Parallelinkubation mit L-NAME signifikant inhibiert werden konnte und mit $35,0 \pm 2,3\%$ lediglich auf Niveau der unstimulierten Kontrolle ($45,1 \pm 15,5\%$) lag.

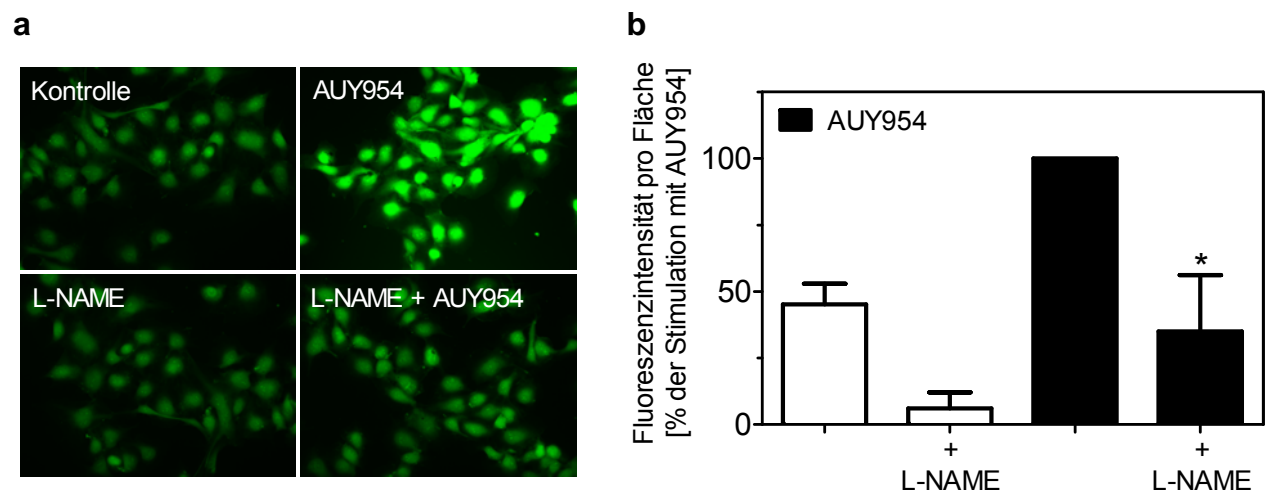


Abbildung 9: Hemmung der AUY954-induzierten NO-Produktion durch L-NAME

(a) Repräsentative Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs nach Stimulation mit AUY954 [1 $\mu\text{mol/l}$, 40 min] unter Verwendung von L-NAME [100 $\mu\text{mol/l}$, 20 min Vorinkubation] im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

(b) Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals: Fluoreszenzintensität/ Fläche [% der Stimulation mit AUY954]. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. Agonist-Stimulation; $n=4$)

4.3. Nachweis der eNOS-Aktivierung mittels *Western-Blotting*

Eine Aktivierung der S1P-Rezeptoren in humanen ECs kann zu einer Phosphorylierung von Ser¹¹⁷⁷ innerhalb des eNOS-Proteins führen und dieses dadurch aktivieren.⁴⁰ Analog dazu kann eine Dephosphorylierung von Thr⁴⁹⁵ den gleichen Effekt bewirken.¹⁴ Dass eine Stimulation mit pFTY720 über S1P₃ zu einer wirksamen Ser¹¹⁷⁷-Phosphorylierung führt, ist bereits im Rahmen einer anderen Arbeit publiziert.⁴⁵ Demgemäß wurde im Zusammenhang mit dieser Arbeit die Phosphorylierung der beiden Aminosäurereste nach AUY954-Stimulation mittels *Western-Blotting* detektiert.

4.3.1. Konzentrationsabhängigkeit der eNOS-Aktivierung durch Stimulation mit AUY954

In Abhängigkeit steigender Konzentrationen des verwendeten Agonisten AUY954 wurden HUVECs in Zellkultur stimuliert und nach anschließender Lyse für die Detektion der im Zentrum einer eNOS-Aktivierung stehenden Phosphorylierungsstellen an den Aminosäureresten Ser¹¹⁷⁷ und Thr⁴⁹⁵ aufbereitet.

Abbildung 10a zeigt einen repräsentativen *Western-Blot* nach konzentrationsabhängiger Stimulation mit AUY954. Dargestellt sind die Chemolumineszenzbanden nach Bindung spezifischer Detektionsantikörper, die gegen die Epitope gerichtet sind, welche die phosphorylierten Aminosäurereste Ser¹¹⁷⁷ und Thr⁴⁹⁵ enthalten. Darüber hinaus wurde zur relativen Quantifizierung ein phosphorylierungsunabhängiges Epitop der eNOS (eNOS total) detektiert. Die relativen Bandenintensitäten sind Abbildung 10b zu entnehmen. Die Stimulation zeigte dabei unter jeder verwendeten Agonistkonzentration eine signifikante Zunahme des Chemolumineszenzsignals bezüglich der relativen Ser¹¹⁷⁷-Phosphorylierung, dessen Maximum mit 356,1±141,5% bei einer Konzentration von 1 µmol/l AUY954 gegenüber der unstimulierten Kontrolle (100%) lag. Wenngleich auch die Phosphorylierung des Aminosäurerestes Thr⁴⁹⁵ geringen Schwankungen unterlag, fanden sich bei der Quantifizierung keine signifikanten Unterschiede zwischen stimulierten Proben und unstimulierter Kontrolle.

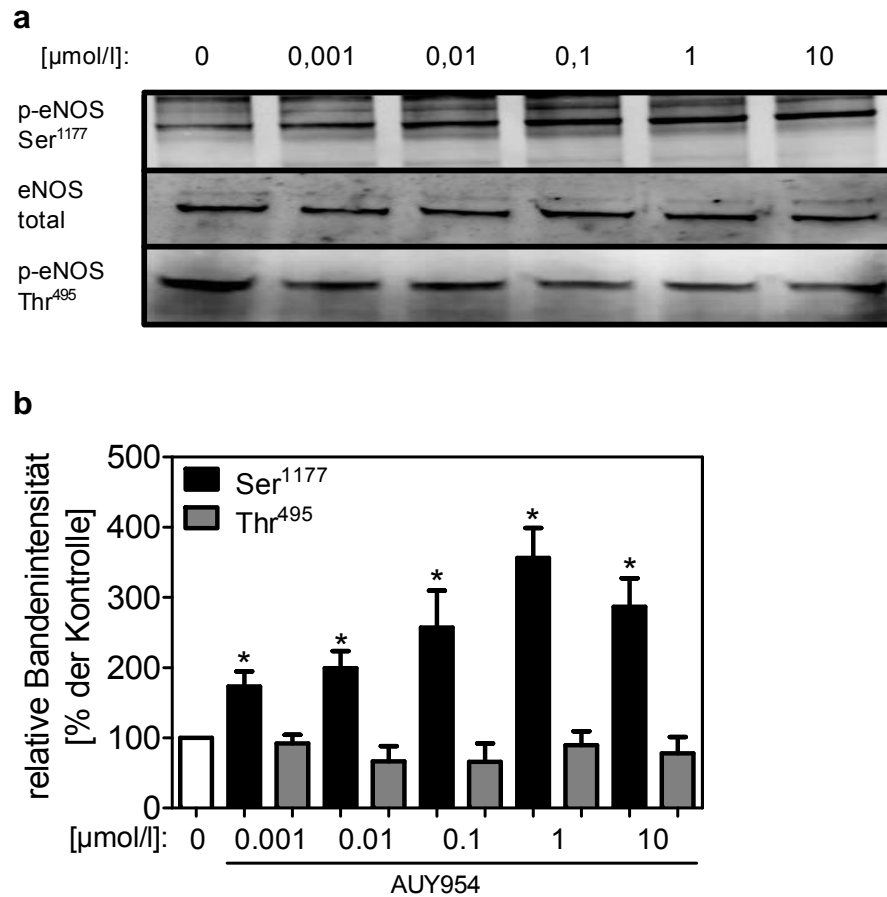


Abbildung 10: Dosisabhängige eNOS-Phosphorylierung durch AUY954

(a) Repräsentativer *Western-Blot* aus HUVEC-Lysaten, nach Stimulation mit AUY954 [0,001-10 $\mu\text{mol/l}$, 40 min]. Detektion der eNOS-Phosphorylierungen (p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ und p-eNOS Thr⁴⁹⁵) sowie des Gesamtzyms (eNOS total) nach *Stripping* unter Verwendung entsprechender Antikörper.

(b) Quantifizierung des Phosphorylierungs-Signals normiert auf den Gesamtzym-Gehalt: relative Bandenintensität [% der Kontrolle]. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. Kontrolle; $n \geq 3$)

4.3.2. Zeitabhängigkeit der eNOS-Aktivierung durch Stimulation mit AUY954

Gemäß den Versuchen zur Konzentrationsabhängigkeit einer eNOS-Aktivierung durch AUY954 wurde auch die Abhängigkeit einer Stimulation von der Zeit getestet.

Abbildung 11a zeigt einen repräsentativen *Western-Blot* nach zeitabhängiger Stimulation mit AUY954. Dargestellt sind die Chemolumineszenzbanden nach spezifischer Antikörperbindung gegen die phosphorylierten Ser¹¹⁷⁷- und Thr⁴⁹⁵-beinhaltenden Epitope sowie gegen das phosphorylierungsunabhängige Epitop (eNOS total). Die relativen Bandenintensitäten sind Abbildung 11b zu entnehmen. Die Analyse zeigte dabei zu jedem Stimulationszeitpunkt eine signifikante Ser¹¹⁷⁷-Phosphorylierung, deren Maximum nach 40 min bei $320,1 \pm 158,3\%$ gegenüber der unstimulierten Kontrolle lag und bei anhaltender Agoniststimulation (60 min) stabil auf diesem Niveau blieb ($320,0 \pm 108,4\%$).

Die relative Phosphorylierung an Thr⁴⁹⁵ zeigte zu den Zeitpunkten 5, 10 und 30 min nach Stimulation signifikante Abnahmen auf $73,0 \pm 25,8\%$, $50,4 \pm 15,7\%$ und $76,3 \pm 14,7\%$. Diese Beobachtung ließ sich jedoch zu den Zeitpunkten 20, 40 und 60 min nicht verifizieren.

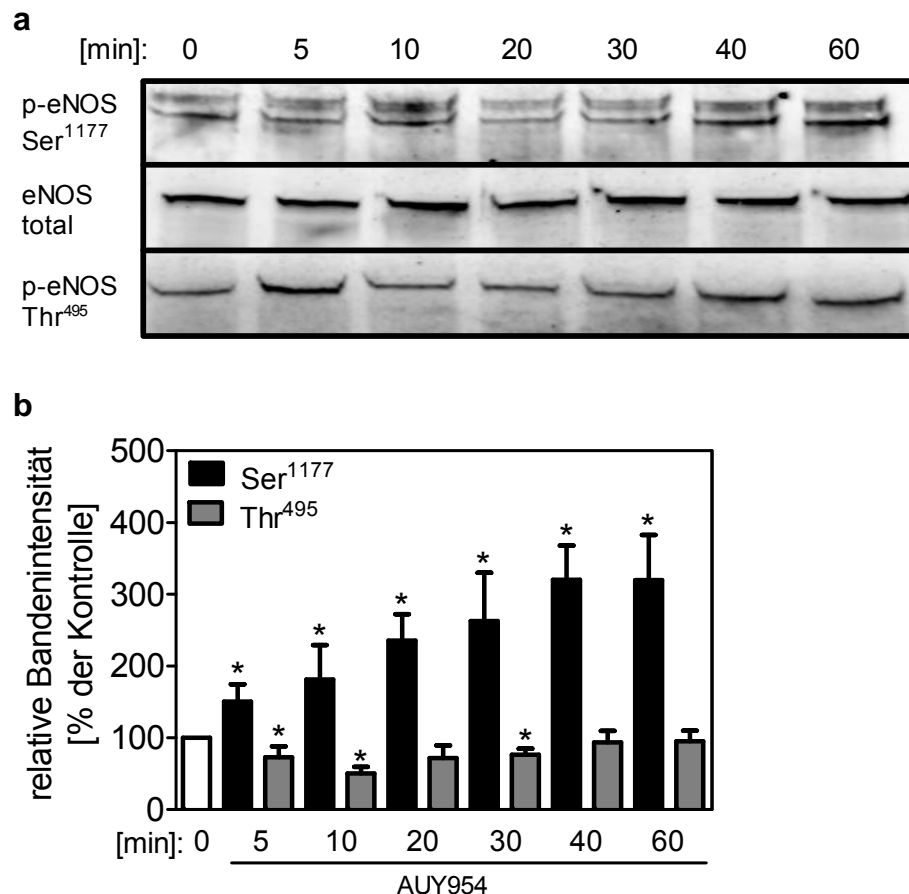


Abbildung 11: Zeitabhängige eNOS-Phosphorylierung durch AUY954

(a) Repräsentativer *Western-Blot* aus HUVEC-Lysaten nach Stimulation mit AUY954 [0-60 min, 1 $\mu\text{mol/l}$]. Detektion der eNOS-Phosphorylierungen (p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ und p-eNOS Thr⁴⁹⁵) sowie des Gesamtzyms (eNOS total) nach *Stripping* unter Verwendung entsprechender Antikörper.

(b) Quantifizierung des Phosphorylierungs-Signals normiert auf den Gesamtzyms-Gehalt: relative Bandenintensität [% der Kontrolle]. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. Kontrolle; $n \geq 3$)

4.4. Signaltransduktion

4.4.1. Phosphoproteindetektion nach AUY954- und pFTY720-Stimulation

Nach derzeitig wissenschaftlichem Kenntnisstand steht im Zentrum einer eNOS-Aktivierung die Phosphorylierung des Signalproteins Akt.¹⁰³ Für eine eNOS-Stimulation durch FTY720 konnte eine Beteiligung dieses Signalproteins auf der Basis von *Western-Blot*-Analysen bereits nachgewiesen werden.⁴⁵ Da auch die Daten dieser Arbeit eine Beteiligung des Akt-Signalwegs bezüglich einer eNOS-Aktivierung durch

AUY954 nahelegen, wurde unter molekularbiologischer Verwendung der Bio-Plex-Methode die relative Akt-Phosphorylierung nach Stimulation mit AUY954 und pFTY720 in HUVEC-Lysaten bestimmt.

Abbildung 12 repräsentiert die quantitative Analyse der relativen Akt-Phosphorylierung nach Stimulation mit AUY954 und pFTY720 über die Zeit. Für die Inkubation mit AUY954 ließ sich zu den Zeitpunkten 5 und 10 min eine signifikante Zunahme der relativen Akt-Phosphorylierung von $185,0 \pm 54,1\%$ bzw. $263,0 \pm 93,0\%$ gegenüber der unstimulierten Kontrolle messen. Analog fand sich bei Stimulation mit pFTY720 eine signifikante Zunahme der relativen Akt-Phosphorylierung auf $202,8 \pm 126,9\%$, $297,3 \pm 263,3\%$ und $236,7 \pm 148,7\%$ zu den Zeitpunkten 2,5, 5 und 10 min. Der kinetische Verlauf der Akt-Aktivierung macht eine Zunahme der Phosphorylierung bis auf ein Maximum nach 10 min für AUY954 und nach 5 min für pFTY720 deutlich. Nach einer Inkubationszeit von 30 min war eine Akt-Phosphorylierung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle hingegen nicht länger signifikant erhöht.

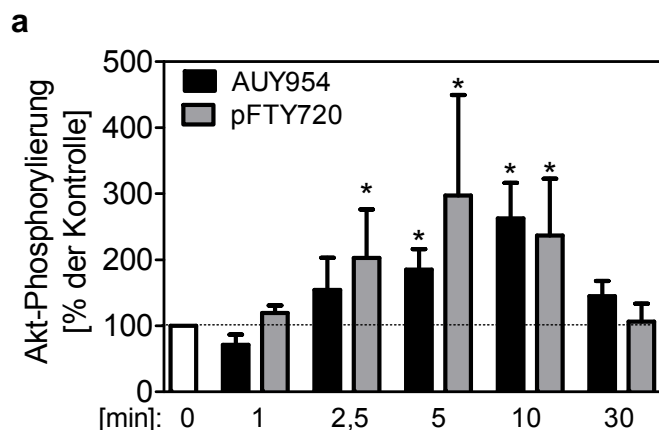


Abbildung 12: Zeitabhängige Phosphorylierung des Signalproteins Akt durch AUY954 und pFTY720

Quantitative Analyse der relativen Akt-Phosphorylierung [% der Kontrolle] über die Zeit [0-30 min] nach Stimulation mit AUY954 [0,1 $\mu\text{mol/l}$] und pFTY720 [0,1 $\mu\text{mol/l}$]. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. Kontrolle; $n \geq 3$)

4.4.2. Indirekter Nachweis der Akt-Beteiligung durch fluoreszenz-mikroskopische NO-Detektion

Unter Verwendung eines Akt-Inhibitors war es möglich, die Beteiligung des Akt-Signalproteins auch auf zellulärer Ebene durch Detektion von NO nachzuweisen.

HUVECs wurden hierzu in Co-Inkubation des Akt-Inhibitors mit AUY954 und pFTY720 stimuliert, mit DAF2-DA behandelt und das relative Fluoreszenzsignal mithilfe eines Mikroskops detektiert. Abbildung 13 zeigt eine repräsentative Zusammenstellung von nach Stimulation angefärbten HUVECs, die mit und ohne Akt-Inhibitor co-inkubiert wurden (Abbildung 13a). Die zugehörige Quantifizierung macht deutlich, dass das durch AUY954 induzierte Fluoreszenzsignal unter Parallelinkubation mit Akt-Inhibitor signifikant inhibiert wurde und mit $27,2 \pm 8,2\%$ auf Niveau der unstimulierten Kontrolle lag (Abbildung 13b). Analog dazu sank das Fluoreszenzsignal bei Stimulation durch pFTY720 und Co-Inkubation mit Akt-Inhibitor signifikant auf $48,0 \pm 9,1\%$ (Abbildung 13c).

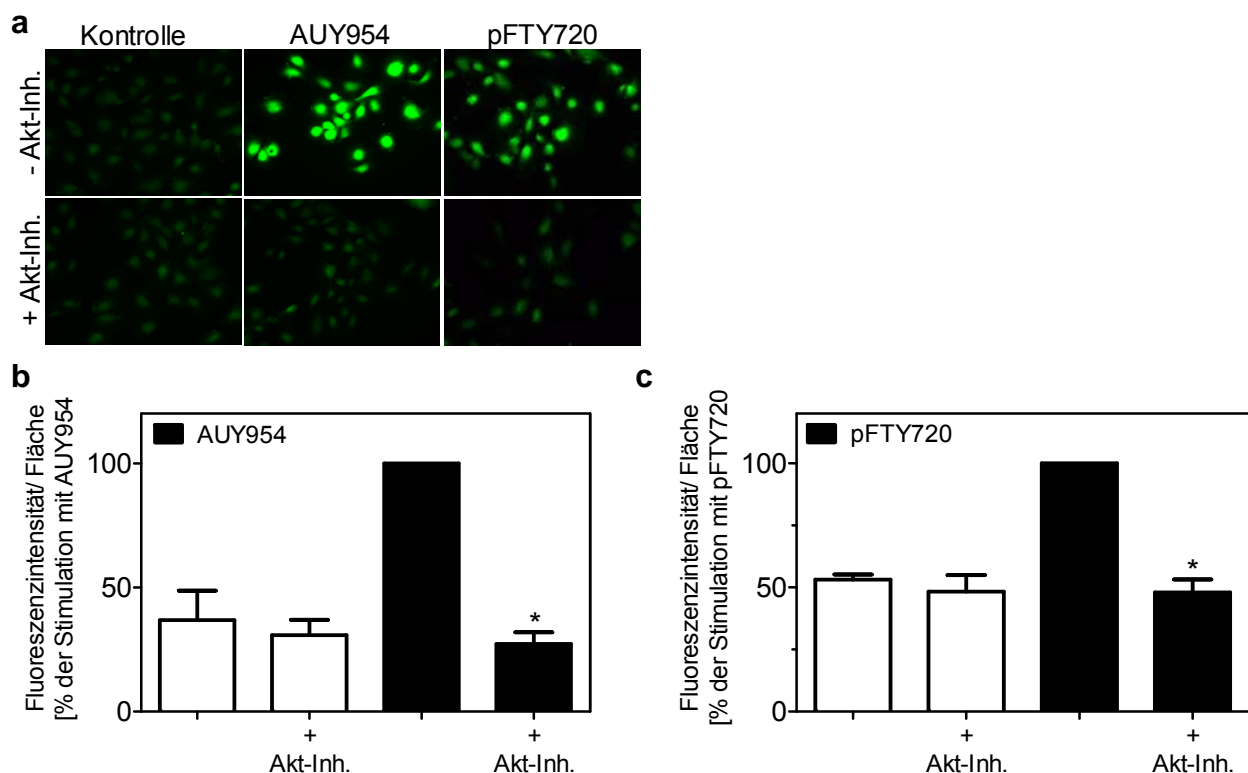


Abbildung 13: Hemmung der AUY954- und pFTY720-induzierten NO-Produktion unter Verwendung eines Akt-Inhibitors

(a) Repräsentative Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs nach Stimulation mit AUY954 und pFTY720 [je 1 µmol/l, 40 min] unter Verwendung eines Akt-Inhibitors (Akt-Inh.) [0,01 µmol/l, 20 min Vorinkubation] im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

(b, c) Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals: Fluoreszenzintensität pro Fläche [% der Stimulation mit (b) AUY954 bzw. (c) pFTY720]. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. Agonist-Stimulation; $n=3$)

4.5. Hemmung der S1P-Rezeptor-Aktivierung unter Verwendung selektiver Antagonisten

4.5.1. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Rezeptor-Antagonisierung

Durch die Neuentwicklung spezieller S1P-Antagonisten eröffnete sich in den letzten Jahren die Möglichkeit, die Signaltransduktion über einzelne Rezeptorsubtypen selektiv zu hemmen.

Zur Inhibierung einer Agonist-induzierten NO-Synthese wurden HUVECs in Anwesenheit der Antagonisten VPC23019, W146 und CAY10444 mit AUY954 und pFTY720 co-inkubiert und das Ausmaß der NO-Synthese durch Behandlung mit DAF2-DA fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. Abbildung 14 zeigt eine repräsentative Zusammenstellung von nach Stimulation angefärbten HUVECs, die mit VPC23019, W146 und CAY10444 co-inkubiert wurden (Abbildung 14a). Die zugehörige Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals ist Abbildung 14b zu entnehmen.

Dabei zeigte sich unter Co-Inkubation mit AUY954 und dem selektiven S1P₁-Antagonisten W146 eine signifikante Dezimierung des Fluoreszenzsignals, das mit $46,9 \pm 13,5\%$ auf Kontrollniveau lag. Die entsprechende Co-Stimulation unter Verwendung von pFTY720 und W146 hingegen ergab Fluoreszenzintensitäten, die mit $104,6 \pm 6,6\%$ denen einer vollen Stimulation ohne die Anwendung des Antagonisten entsprachen (100%).

Bei analoger, selektiver Antagonisierung des S1P₃-Rezeptors mittels CAY10444 ließ sich erwartungsgemäß für die Stimulation mit AUY954 kein signifikanter Rückgang des Fluoreszenzsignals ($97,3 \pm 17,3\%$) messen. Jedoch ließ sich auch für den entsprechenden Antagonisierungsversuch mit pFTY720 und CAY10444 kein signifikanter Rückgang des Fluoreszenzsignals messen, das mit $101,4 \pm 12,5\%$ einer vollen Signalausprägung entsprach.

Erst durch die entsprechende Verwendung einer Dreifach-Inkubation, bestehend aus Agonist und den beiden Antagonisten W146 und CAY10444, konnte sowohl für AUY954 als auch für pFTY720 eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität gemessen werden, die mit $50,5 \pm 14,8\%$ bzw. $53,2 \pm 22,6\%$ auf Kontrollniveau lag.

Eine signifikante Signalreduktion ergab sich für beide Agonisten ebenfalls unter Parallelinkubation mit dem selektiven S1P_{1/3}-Antagonisten VPC23019. So lag das durch AUY954 evozierte Fluoreszenzsignal mit 42,2±22,3% hier lediglich auf Niveau der unstimulierten Kontrolle (41,7±11,2%). Analog dazu wurde auch das durch pFTY720 induzierte Fluoreszenzsignal signifikant auf 56,0±9,2% gegenüber der unstimulierten Kontrolle (52,4±10,1%) dezimiert.

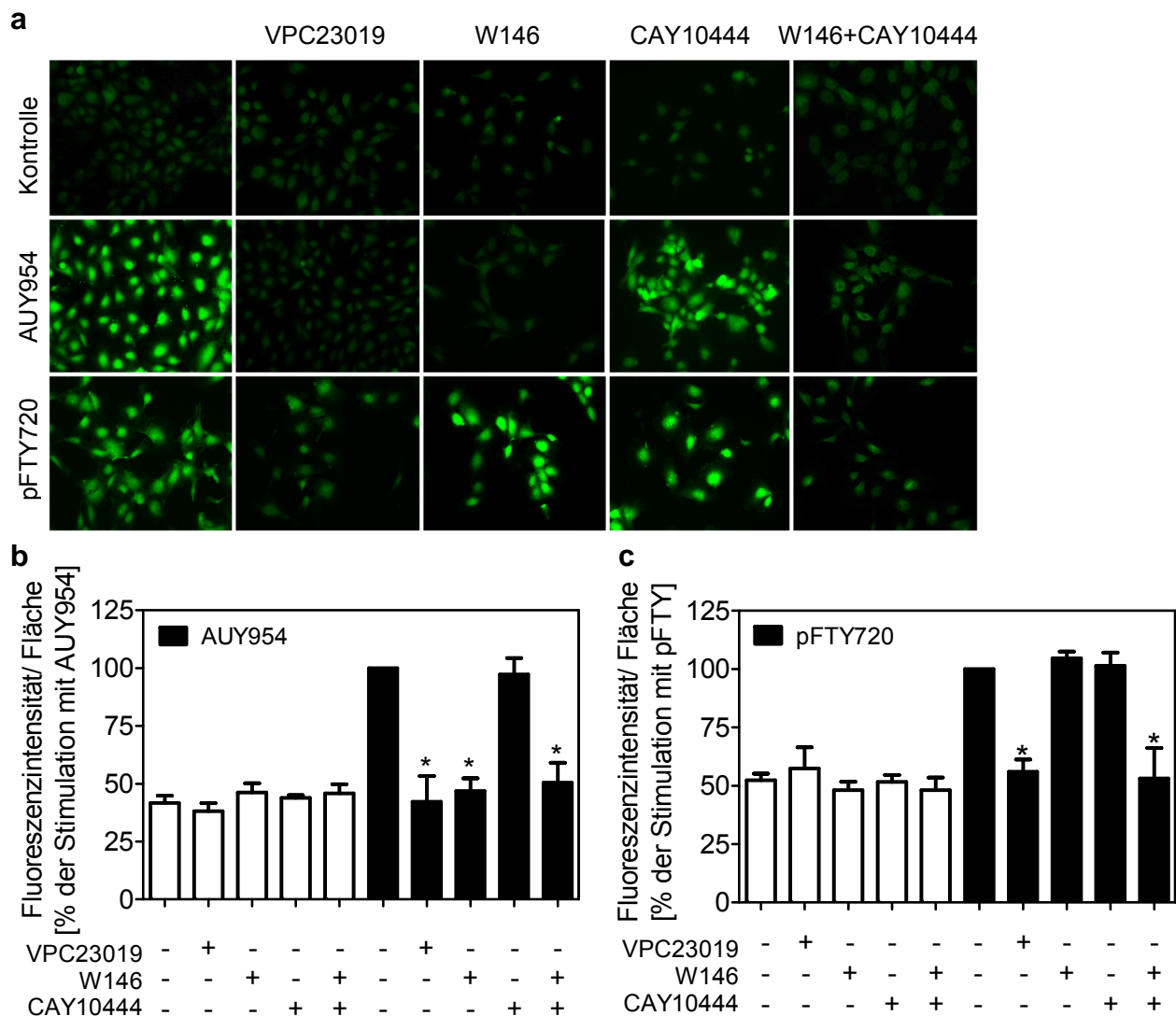


Abbildung 14: Hemmung der AUY954- und pFTY720-induzierten NO-Produktion unter Verwendung von S1P-Antagonisten

(a) Repräsentative Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs nach Stimulation mit AUY954 und pFTY720 [je 1 µmol/l, 40 min] in Co-Inkubation mit den S1P-Antagonisten VPC23019 [10 µmol/l], W146 [1 µmol/l] und CAY10444 [10 µmol/l] im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

(b, c) Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals: Fluoreszenzintensität/ Fläche [% der Stimulation mit (b) AUY954 bzw. (c) pFTY720]. (*p<0,05 signifikant verschieden vs. Agonist-Stimulation; n≥3)

4.5.2. Phosphoproteinbasierter Nachweis der Signaltransduktions-Hemmung

Ausgehend von den Erkenntnissen einer selektiven Rezeptorblockade durch die beschriebenen Antagonisten, wurde unter Verwendung der Bio-Plex-Methode die relative Akt-Phosphorylierung nach Co-Inkubation jener mit den Agonisten AUY954 und pFTY720 in HUVEC-Lysaten bestimmt.

Hierfür wurden HUVECs mit AUY954 und pFTY720 unter Hinzunahme von VPC23019, W146 und CAY10444 stimuliert und deren Proteingemische nach Zelllyse photometrisch analysiert. In einem parallelen Ansatz wurde unter Verwendung des Akt-Inhibitors ein analoger Hemmversuch durchgeführt.

Abbildung 15 repräsentiert die quantitative Analyse der relativen Akt-Phosphorylierung nach Co-Inkubation der Agonisten mit den Antagonisten sowie dem Akt-Inhibitor.

Für AUY954 ließ sich unter Co-Inkubation mit VPC23019 bzw. W146 eine signifikante Reduktion der relativen Akt-Phosphorylierung von $207,5 \pm 86,2\%$ auf $102,3 \pm 10,4\%$ bzw. $83,30 \pm 34,2\%$ messen, die damit auf Niveau der unstimulierten Kontrolle lag. Unter analoger Anwendung von CAY10444 war keine signifikante Abnahme der relativen Akt-Phosphorylierung ($171,6 \pm 16,9\%$) gegenüber alleiniger Stimulation durch AUY954 messbar.

Unter Co-Inkubation von pFTY720 mit den entsprechenden Antagonisten ließ sich lediglich für die Verwendung von VPC23019 eine signifikante Reduktion der relativen Akt-Phosphorylierung auf $80,2 \pm 18,6\%$ erzielen, wohingegen bei Einsatz von W146 das Signal bei $150,2 \pm 33,31\%$ und durch Anwendung von CAY10444 mit $164,8 \pm 8,4\%$ auf Niveau einer vollen Stimulation durch pFTY720 ($192,6 \pm 106,8\%$) lag.

Der parallele Hemmversuch mittels Akt-Inhibitor führte sowohl bei Stimulation mit AUY954 wie auch bei Inkubation mit pFTY720 zu einer signifikanten Reduktion der relativen Akt-Phosphorylierung mit $90,10 \pm 9,1\%$ bzw. $113,0 \pm 28,5\%$ auf Kontrollniveau (100%).

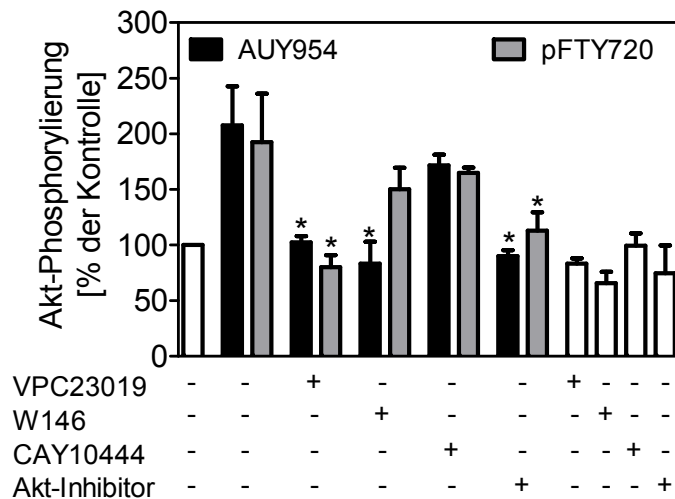


Abbildung 15: Phosphorylierung des Signalproteins Akt durch AU954 und pFTY720 unter Co-Inkubation mit S1P-Antagonisten und einem Akt-Inhibitor

Quantitative Analyse der relativen Akt-Phosphorylierung [% der Kontrolle] nach Stimulation mit AU954 [0,1 $\mu\text{mol/l}$, 10 min] und pFTY720 [0,1 $\mu\text{mol/l}$, 10 min] unter Co-Inkubation der S1P-Antagonisten VPC23019 [10 $\mu\text{mol/l}$], W146 [1 $\mu\text{mol/l}$] und CAY10444 [10 $\mu\text{mol/l}$] sowie unter Co-Inkubation mit dem Akt-Inhibitor [0,01 $\mu\text{mol/l}$]. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. Agonist-Stimulation; $n \geq 3$)

4.5.3. Immunfluoreszenzbasierter Nachweis der Enzym-Hemmung

Nebst einer Inhibition auf Rezeptor- und Signaltransduktionsebene wurde auch der Effekt einer S1P-Antagonisierung auf die Phosphorylierung der eNOS und damit der Aktivität des Effektorenzyms getestet.

Hierzu wurden HUVECs mit den Agonisten und Antagonisten co-inkubiert und die relative Phosphorylierung der beiden für eine Enzymaktivierung bedeutsamen Aminosäurereste Ser¹¹⁷⁷ und Thr⁴⁹⁵ analysiert.

Abbildung 16a zeigt einen repräsentativen *Western-Blot* nach AU954- und pFTY720-Stimulation in Co-Inkubation mit den Antagonisten. Dargestellt sind die Chemolumineszenzbanden nach Bindung spezifischer Detektionsantikörper, die gegen die Epitope gerichtet sind, welche die phosphorylierten Aminosäurereste Ser¹¹⁷⁷ und Thr⁴⁹⁵ enthalten. Darüber hinaus wurde zur relativen Quantifizierung ein phosphorylierungsunabhängiges Epitop der eNOS (eNOS total) detektiert. Die relativen Bandenintensitäten sind Abbildung 16b zu entnehmen.

Unter Co-Inkubation mit VPC23019 und W146 ließ sich für die Stimulation mit AU954 eine signifikante Reduktion der Ser¹¹⁷⁷-Phosphorylierung erzielen. Die relative Bandenintensität lag hierunter bei $94,8 \pm 32,6\%$ bzw. $61,0 \pm 29,1\%$ gegenüber einer

Intensität von $138,5 \pm 10,4\%$ bei alleiniger Stimulation mit AUY954. Die Verwendung von CAY10444 führte zu keiner signifikanten Signalreduktion bei Co-Inkubation mit AUY954 ($152,7 \pm 58,3\%$).

Bei entsprechender Verwendung von pFTY720 konnte lediglich für die Ser¹¹⁷⁷-Phosphorylierung nach Co-Inkubation mit VPC23019 eine signifikante Reduktion auf $69,5 \pm 40,6\%$ gegenüber einer alleinigen Agonist-Stimulation ($126,5 \pm 11,2\%$) detektiert werden. Bei analogem Gebrauch von W146 und CAY10444 ließ sich keine signifikante Reduktion der relativen Bandenintensität erwirken ($118,3 \pm 47,2\%$ bzw. $110,8 \pm 49,2\%$).

Wie schon in den Versuchen zum Nachweis der eNOS-Aktivierung durch AUY954 und pFTY720 (vgl. Kap. 4.3.) unterlag auch hier die Thr⁴⁹⁵-Phosphorylierung Schwankungen, die jedoch nicht signifikant waren.

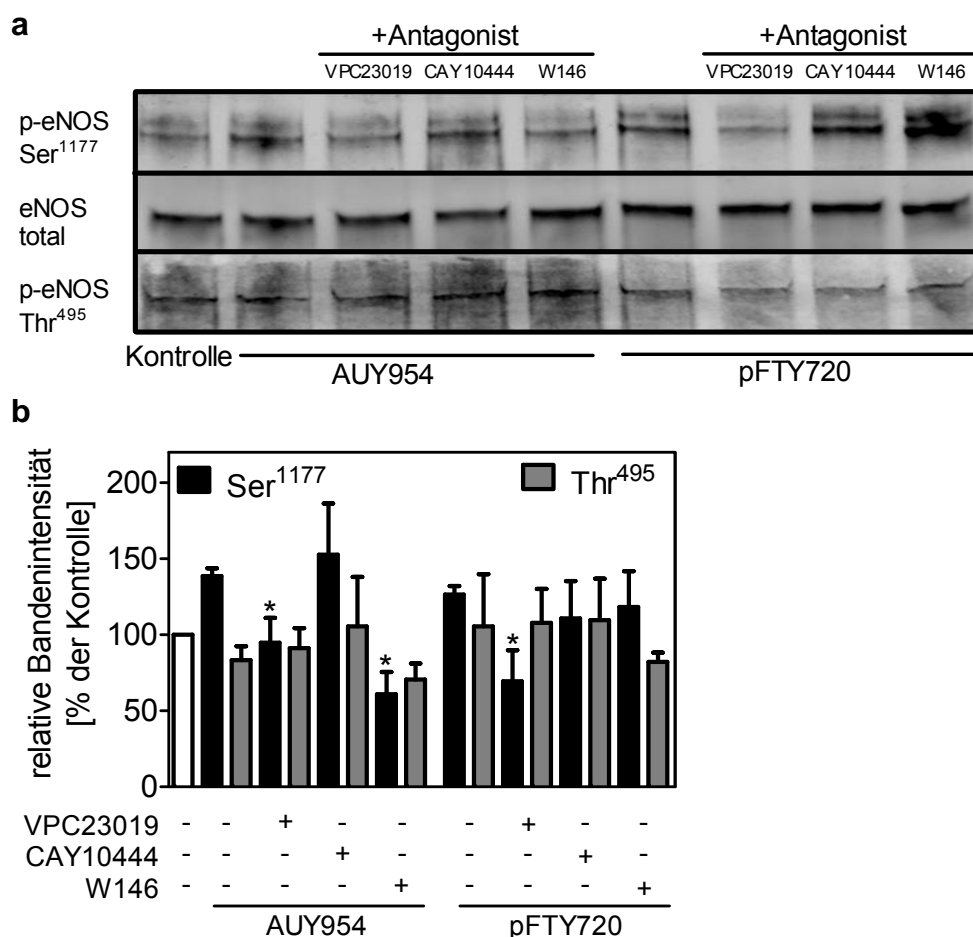


Abbildung 16: Hemmung der AUY954- und pFTY720-induzierten eNOS-Phosphorylierung unter Verwendung von S1P-Antagonisten

(a) Repräsentativer *Western-Blot* aus HUVEC-Lysaten, nach Stimulation mit AUY954 [$1 \mu\text{mol/l}$, 40 min] in Co-Inkubation mit den S1P-Antagonisten VPC23019 [$10 \mu\text{mol/l}$], CAY10444 [$10 \mu\text{mol/l}$] und W146 [$1 \mu\text{mol/l}$]. Detektion der eNOS-Phosphorylierungen (p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ und p-eNOS Thr⁴⁹⁵) sowie des Gesamtzyms (eNOS total) nach *Stripping* unter Verwendung entsprechender Antikörper.

(b) Quantifizierung des Phosphorylierungs-Signals normiert auf den Gesamtzyms-Gehalt: relative Bandenintensität [% der Kontrolle]. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. Agonist-Stimulation; $n=4$)

4.6. Rezeptorsubtyp-Diskrimination an k.d.-S1P-Zellen

Mithilfe von siRNA ist es möglich, die Expression von Proteinen auf posttranskriptioneller Ebene negativ zu regulieren. Die siRNA bindet dabei komplementär an die mRNA des untranslatierten Zielproteins und führt zu einer Translationssuppression. Auf diese Weise ist es möglich, Zellen zu schaffen, die bestimmte Proteine nicht exprimieren; diese Translationssuppression bezeichnet man als *knock-down* (k.d.).

Zur Diskriminierung der Subtypbeteiligung einer S1P-Rezeptor-Stimulation durch AUY954 und pFTY720 wurden HUVECs generiert, deren Expression von S1P₁, S1P₃ bzw. S1P_{1/3} minimiert war. Der hierfür notwendige *knock-down* unter Verwendung spezifischer siRNA sowie die notwendigen Expressionskontrollen waren in der Arbeitsgruppe bereits realisiert sowie validiert worden und sind in der vorliegenden Arbeit deshalb nicht näher beschrieben. Da die siRNA gegen die jeweilige S1P-Rezeptor-Sequenz einen unterschiedlichen Gehalt an Guanin/ Cytosin (GC) beinhaltete und dieser möglicherweise Einfluss auf den Eintritt in die Zielzelle sowie den Stimulationseffekt hätten haben können, wurden für beide S1P-siRNA-Sequenzen entsprechende non-funktionale siRNA-Kontrollen mit einem korrespondierenden GC-Gehalt verwendet.

Abbildung 17a zeigt eine repräsentative Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs, die den drei k.d.-Populationen entstammen sowie Zellen aus einer Kontrollpopulation ohne siRNA-Behandlung. Auf die optische Darstellung der entsprechenden Kontrollen, welche mit non-funktionaler siRNA behandelt wurden, ist der Übersichtlichkeit halber verzichtet worden. Die HUVECs wurden mit AUY954 bzw. pFTY720 stimuliert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals ist Abbildung 17b zu entnehmen.

Dabei zeigte sich in der k.d.-S1P₁-Population eine signifikante Abnahme der AUY954-induzierten Fluoreszenzintensität auf $109,7 \pm 14,5\%$ gegenüber der Kontrollgruppe ($200,4 \pm 61,4\%$). Für die Stimulation mit pFTY720 konnte lediglich eine geringe, nicht signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität auf $175,4 \pm 57,5\%$ gegenüber der Kontrollgruppe ($235,4 \pm 130,7\%$) nachgewiesen werden. Analog zeigte die Verwendung des selektiven S1P₁-Agonisten AUY954 in der k.d.-S1P₃-Population keine signifikanten Änderungen der Fluoreszenzintensitäten gegenüber der entsprechenden

Kontrollgruppe ($210,9 \pm 48,1\%$ und $225,3 \pm 18,9\%$), wohingegen die Stimulation mit pFTY720 in dieser Population zu einem signifikanten Fluoreszenzabfall auf $149,2 \pm 30,9\%$ gegenüber der Kontrollgruppe ($249,1 \pm 58,6\%$) führte.

K.d.-Zellen, die weder S1P₁ noch S1P₃ translatierten, zeigten sowohl bei Stimulation mit AUY954 wie auch unter Verwendung von pFTY720 eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität, die mit $96,9 \pm 3,3\%$ bzw. $102,7 \pm 5,4\%$ auf Niveau der unstimulierten Kontrolle (100%) lag. Demgegenüber konnte in der entsprechenden Kontrollpopulation eine vollständige Aktivierung der NO-Produktion mit Fluoreszenzintensitäten von $198,8 \pm 34,8\%$ und $209,4 \pm 59,6\%$ gemessen werden.

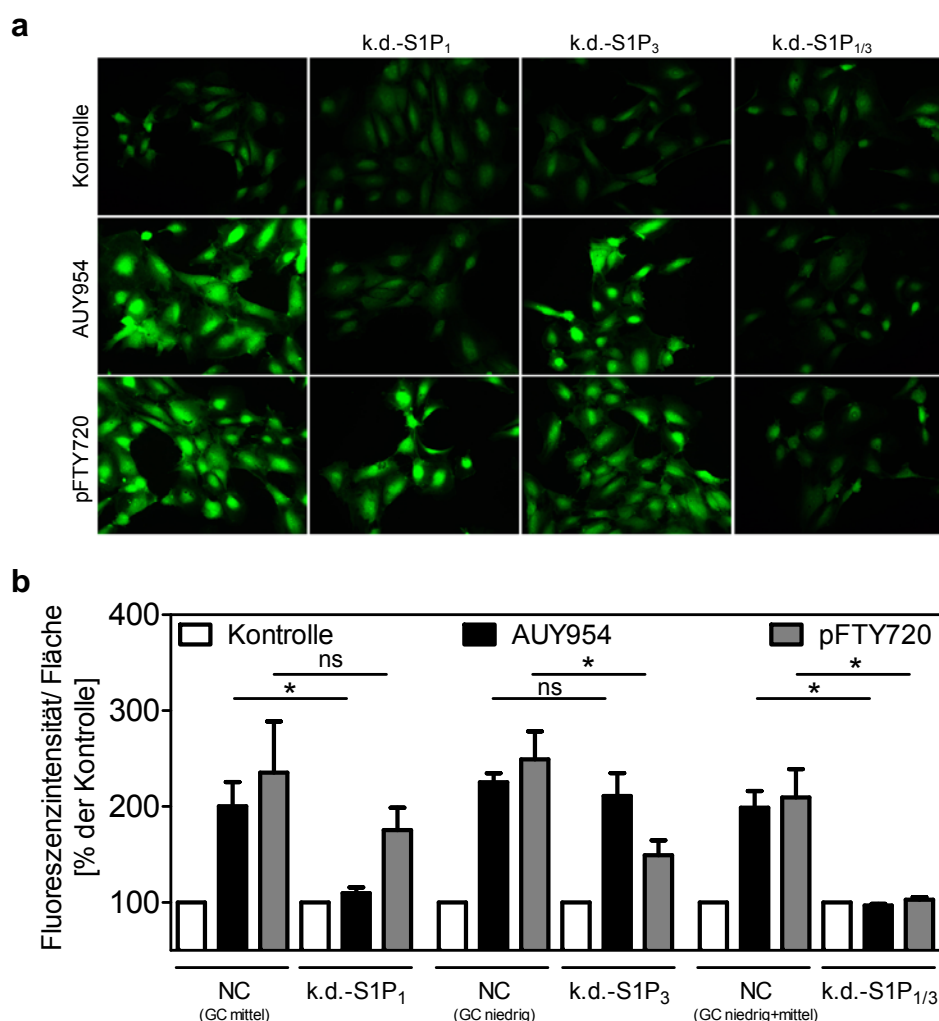


Abbildung 17: Wirkung von AUY954 und pFTY720 auf die NO-Produktion in k.d.-S1P-Zellen

(a) Repräsentative Übersicht DAF2-DA behandelter HUVECs nach Stimulation mit AUY954 und pFTY720 [je $1 \mu\text{mol/l}$, 40 min] in verschiedenen k.d.-S1P-Populationen (k.d.-S1P₁₋₃) im Vergleich zur Kontrolle ohne siRNA-Behandlung.

(b) Quantifizierung des relativen Fluoreszenzsignals: Fluoreszenzintensität/ Fläche [% der jeweiligen Kontrolle] unter Agonist-Stimulation [$1 \mu\text{mol/l}$, 40 min]. NC (GC niedrig/ mittel): Negativkontrollen mit unterschiedlichem GC-Gehalt non-funktionaler siRNA. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. jeweilige Negativkontrolle, ns: $p > 0,05$ nicht signifikant verschieden vs. jeweilige Negativkontrolle; $n = 4-6$)

4.7. Physiologische Wirkung der S1P-Agonisten AUY954 und pFTY720 an der isoliert perfundierten Niere

4.7.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung verwendeter Standardsubstanzen

Die Regulation des arteriellen Drucks in der Niere erfolgt maßgeblich durch das dynamische Gleichgewicht zwischen Kontraktilität der glatten Gefäßmuskulatur und dilatorischer Wirkung des Endothels. Diese fragile Balance ist abhängig von der physiologischen Integrität und Unversehrtheit der Nierengefäße.

Um diese Grundvoraussetzung nach Nierenexplantation für die anschließende Messdurchführung zu prüfen, wurden die vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen AngII und abMet-ATP sowie der Vasodilatator ACh als Standards verwendet. Diese wurden vor jeder Versuchsdurchführung als Boli appliziert und die Änderung des MAD gemessen.

Abbildung 18 zeigt die in separaten Experimenten erstellten Dosiswirkungskurven der verwendeten Standardsubstanzen, welche als Referenzwerte für die Intaktheit der Nierengefäße in den folgenden Versuchen dienen.

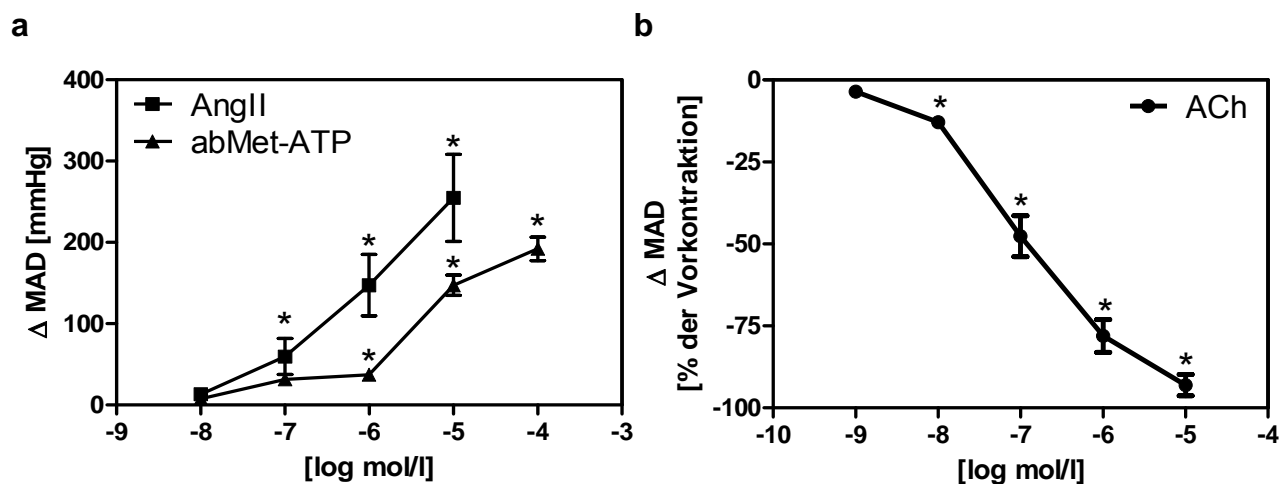


Abbildung 18: Dosiswirkungskurven verwendeter Standardsubstanzen an der isoliert perfundierten Niere

(a) Absolute MAD-Änderungen: Δ MAD [mmHg] nach Bolusapplikation von AngII [0,001-10 μ mol/l] und abMet-ATP [0,001-10 μ mol/l] in logarithmischer Auftragung [log mol/l].

(b) Relative MAD-Änderungen: Δ MAD [% der Vorkontraktion] nach Bolusapplikation von ACh [0,0001-10 μ mol/l], nach Vorkontraktion mit AngII [1 μ mol/l] in logarithmischer Auftragung [log mol/l]. (* p <0,05 signifikant verschieden vs. basaler MAD; bei fehlendem Fehlerbalken liegt die Standardabweichung innerhalb des Symbols; $n \geq 3$)

4.7.2. Applikation von AUY954

Die potentielle Wirkung des S1P-Agonisten AUY954 auf die Gefäßspannung und den MAD wurde mittels Bolusapplikation und Dauerperfusion an isoliert perfundierten Rattennieren getestet.

4.7.2.1. Bolusapplikation von AUY954

Mögliche vasokonstriktive Eigenschaften von AUY954 wurden unter Basalbedingungen, vasodilatives Potential nach Vorkontraktion mit AngII getestet. Abbildung 19a zeigt den Ausschnitt eines Originalgraphen zur Bolusapplikation von AUY954. Da unter Basalbedingungen keine signifikant vasoaktiven Eigenschaften gemessen wurden, sind hier lediglich die MAD-Änderungen nach Vorkontraktion dargestellt. Die Relativwerte der Dilatation bezogen auf den jeweiligen Wert der Vorkontraktion sind Abbildung 19b zu entnehmen. Signifikante Verluste der Vorkontraktion von $-8,0 \pm 6,1\%$ bis $-14,7 \pm 7,2\%$ wurden bei Agonist-Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{mol/l}$ registriert.

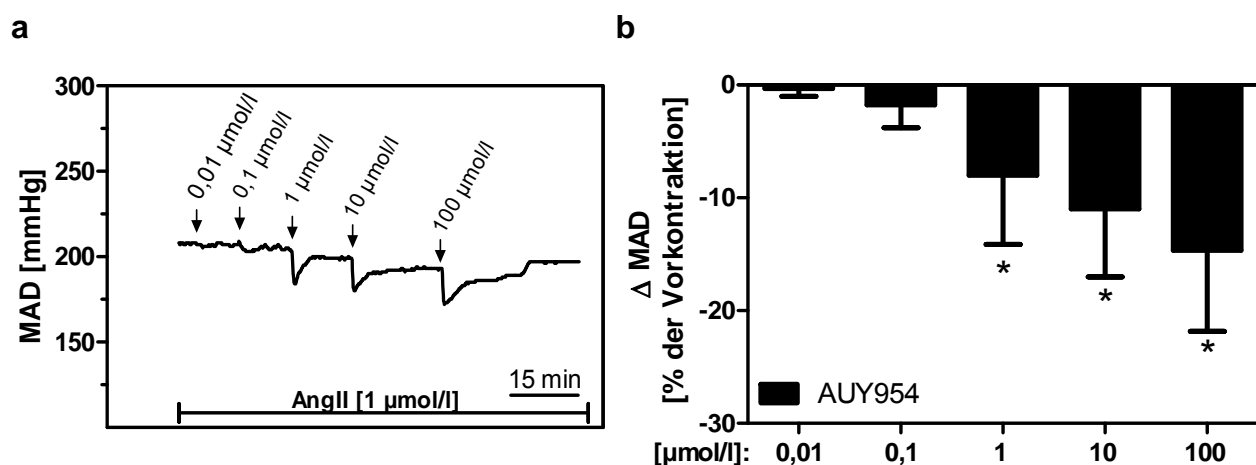


Abbildung 19: Bolusapplikation von AUY954 nach Vorkontraktion mit AngII

(a) Ausschnitt eines repräsentativen Originalgraphen der Bolusapplikation von AUY954 [0,01-100 µmol/l] an der isoliert perfundierten Niere. MAD-Änderung [mmHg] über die Zeit unter gleichzeitiger Dauerperfusion mit AngII [1 µmol/l].

(b) MAD-Relativwerte: ΔMAD [% der Vorkontraktion]. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. basaler MAD; $n=5$)

4.7.2.2. Dauerperfusion von AUY954

Das Gefäßsystem der Niere unterliegt einer Autoregulation durch den juxtaglomerulären Apparat. Im Sinne eines Feedback-Mechanismus kann es so zu Änderungen des Gefäßtonus kommen. Aus diesem Grund ist es entscheidend, ob eine vasoaktive Substanz kurzzeitig, i.e. im Bereich von wenigen Sekunden, oder längerfristig im vaskulären System präsent ist.

Die vasodilatativen Eigenschaften von AUY954 wurden hierzu in Form von Dauerperfusionsversuchen getestet.

In Vorbereitung dessen wurden die isoliert perfundierten Niere mit einer Dauerstimulation durch AngII stabil vorkontrahiert. Einem Bolus des verwendeten Dilatationsstandards ACh [10 $\mu\text{mol/l}$] folgten Dauerperfusionsversuche von AUY954 über einen Zeitraum von je mindestens 10 min.

Abbildung 20 zeigt den Ausschnitt eines Originalgraphen zur Dauerperfusion mit AUY954 (Abbildung 20a) sowie die relativen MAD-Änderungen (Abbildung 20b). Eine Dauerstimulation mit 1 und 10 $\mu\text{mol/l}$ AUY954 führte hierbei zu einem signifikanten Verlust der Vorkontraktion von $-11,1 \pm 4,8\%$ bzw. $-42,0 \pm 12,6\%$.

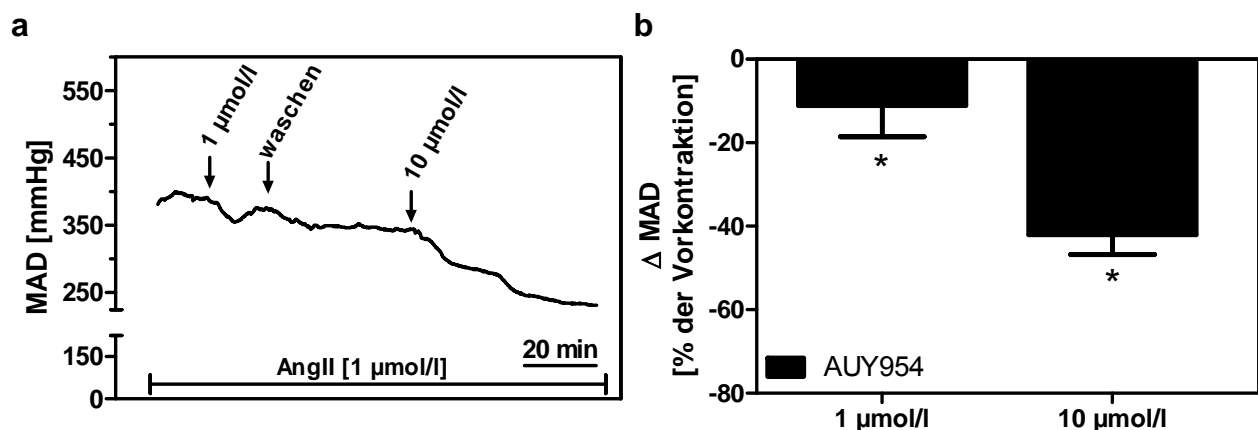


Abbildung 20: Dauerperfusion von AUY954 nach Vorkontraktion mit AngII

(a) Ausschnitt eines repräsentativen Originalgraphen der Dauerperfusionsversuche mit AUY954 [1; 10 $\mu\text{mol/l}$] an der isoliert perfundierten Niere. MAD-Änderung [mmHg] über die Zeit unter gleichzeitiger Dauerperfusion mit AngII [1 $\mu\text{mol/l}$].

(b) MAD-Relativwerte: Δ MAD [% der Vorkontraktion]. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. basaler MAD; $n=7$)

4.7.2.3. Rezeptor-Desensibilisierungsversuch mit AUY954

Im Rahmen der Autoregulation von Blutgefäßen kann es bei häufiger Stimulation und/oder physiologisch hohen Konzentrationen der Stimulanz zur Rezeptordesensibilisierung kommen.

Um eine mögliche Rezeptordesensibilisierung durch AUY954 zu eruieren, wurde auf vorkontrahiertem Niveau durch Dauerperfusion von AngII die Stimulanz in hoher Konzentration und kurzen Zeitintervallen, i.e. im Abstand von ca. 5 min, sobald der MAD sich auf ein stabiles Niveau eingestellt hatte, mehrfach hintereinander als Bolus appliziert. Abbildung 21 zeigt das Ausmaß einer entsprechenden MAD-Änderung über die Dauer von 6 Applikationen in Folge als Ausschnitt eines Originalgraphen (Abbildung 21a) sowie die relativen MAD-Änderungen (Abbildung 21b). Dabei konnte zu keinem Zeitpunkt einer wiederholten Bolus-Applikation von AUY954 eine signifikante Abnahme des MAD gegenüber der Erstapplikation gemessen werden.

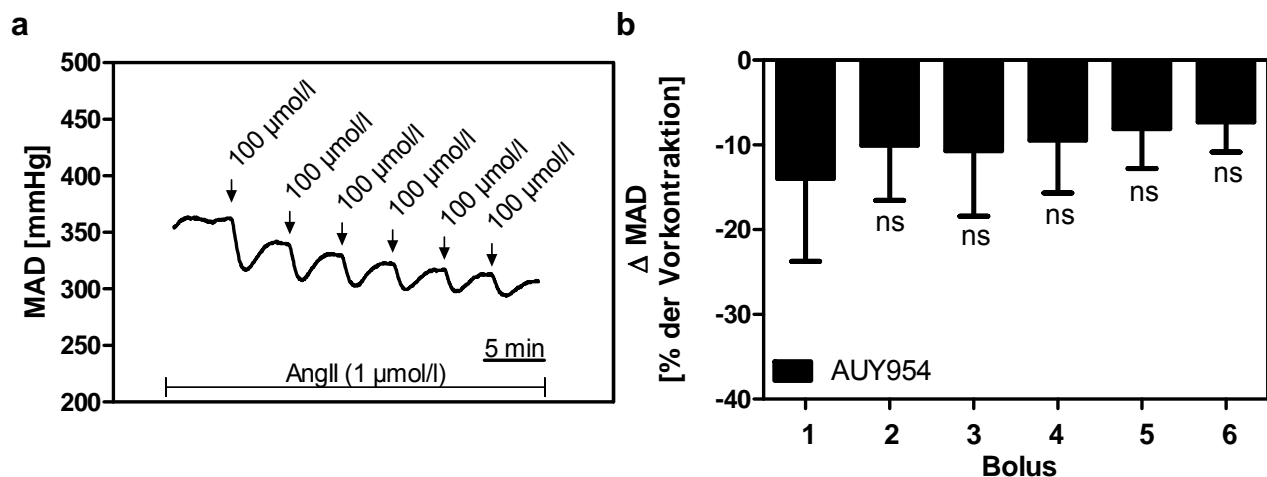


Abbildung 21: Rezeptor-Desensibilisierungsversuch mit AUY954

(a) Ausschnitt eines repräsentativen Originalgraphen der wiederholten Bolusapplikation von AUY954 [100 µmol/l] an der isoliert perfundierten Niere unter Dauerperfusion mit AngII [1 µmol/l]. MAD-Änderung [mmHg] über die Zeit.

(b) Quantitative Auswertung der MAD-Änderungen: ΔMAD [% der Vorkontraktion] nach Applikation von AUY954 über die Dauer von 6 Bolus-Applikationen in Folge. (ns: $p > 0,05$ nicht signifikant verschieden vs. Bolus 1, $n=4$)

4.7.3. Bolusapplikation von pFTY720

Die potentielle Wirkung des S1P-Agonisten pFTY720 auf die Gefäßspannung und den MAD wurde mittels Bolusapplikation an isoliert perfundierten Rattennieren getestet. Hierzu wurde - analog zu den Versuchen mit AUY954 - der Agonist in steigenden Konzentrationen zunächst unter Basalbedingungen, dann nach Vorkontraktion mit AngII als Bolus appliziert und die MAD-Änderung in der Niere gemessen.

Abbildung 22 zeigt den Ausschnitt eines Originalgraphen zur Bolusapplikation von pFTY720 (Abbildung 22a) sowie die Quantifizierung der absoluten MAD-Änderung unter Basalbedingungen (Abbildung 22b). Dabei zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme des MAD sowohl unter Basalbedingungen wie auch auf vorkontrahiertem Niveau. Signifikante MAD-Steigerungen konnten bereits ab einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{mol/l}$ mit einer Differenz von $5,0 \pm 0,0$ mmHg bis hin zu einer Änderung um $189,7 \pm 54,0$ mmHg bei einer verwendeten Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ gemessen werden. Hinweise auf vasodilatives Potential von pFTY720 ergaben sich bei diesem Versuchsaufbau nicht, weshalb auf die Durchführung von Dauerperfusionsversuchen verzichtet wurde.

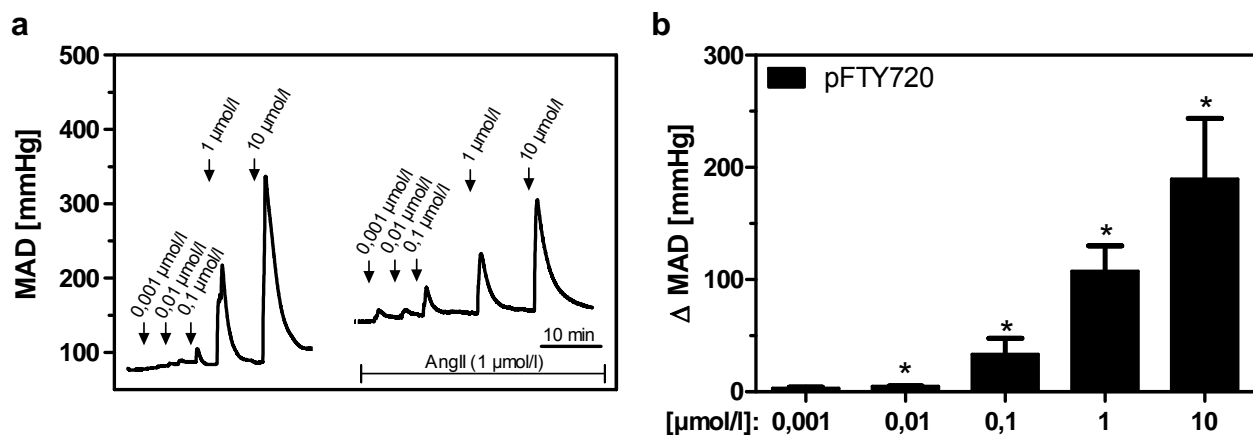


Abbildung 22: Bolusapplikation von pFTY720

(a) Ausschnitte eines repräsentativen Originalgraphen der Bolusapplikation von pFTY720 [0,001-10 $\mu\text{mol/l}$] an der isoliert perfundierten Niere basal und nach Vorkontraktion mit AngII [1 $\mu\text{mol/l}$]. MAD-Änderung [mmHg] über die Zeit.

(b) MAD-Relativwerte: ΔMAD [mmHg]. (* $p < 0,05$ signifikant verschieden vs. basaler MAD $n=4$)

5. Diskussion

Endothelial synthetisiertes NO stellt den bedeutendsten Faktor für die Vermittlung vasodilatatorischer Effekte dar und spielt auf diese Weise eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität und der physiologischen Funktionalität des Endothels.

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass S1P und auch sein Analogon FTY720 potente Wirkstoffe sind, die eNOS als ein Schlüsselenzym in der Regulation des vaskulären Tonus über S1P-Rezeptoren zu aktivieren. Es finden sich Belege dafür, dass für die endothelprotektiven Eigenschaften von S1P und FTY720 vor allem die Subtypen S1P₁ und S1P₃ eine Rolle spielen.^{45, 47, 104} So wirkt die Applikation von FTY720 einerseits direkt über eine NO-Generation endothelialer Dysfunktion entgegen, indem es durch eine effektive Reduktion des Blutflusses vasale Scherkräfte minimiert, andererseits durch eine Inhibierung proinflammatorischer Zytokine die Migration von Immunzellen in atherosklerotische Läsionen reduziert und so ein Voranschreiten des inflammatorischen Prozesses mindert.^{33, 60} Es konnte anhand muriner S1P₃^{-/-}-Studien demonstriert werden, dass der S1P₃-Rezeptor an der zugrunde liegenden Signaltransduktion durch FTY720 beteiligt ist.⁴⁵ Die denkbare Funktion von S1P₁ in diesem Zusammenhang konnte jedoch zu jenem Zeitpunkt nicht abschließend beurteilt werden, da aufgrund fehlender Rezeptorantagonisten sowie der Tatsache, dass S1P₁^{-/-}-Tiere bereits *in utero* einen letalen Phänotyp zeigen,⁶⁵ analoge Versuche in entsprechenden *knockout*-Tieren nicht möglich waren.

Mit der Weiterentwicklung selektiver Rezeptoragonisten und -antagonisten sowie der Etablierung neuer siRNA-Protokolle eröffnete sich die Möglichkeit einer genaueren Diskrimination der beschriebenen vasoaktiven und funktionellen Endotheleffekte.

Hypothese der vorliegenden Arbeit war es, dass nicht nur über S1P₃ sondern auch über S1P₁ eine potente NO-Generation durch S1P-Analoga evoziert werden kann; ferner, dass im Zentrum des vermittelnden Weges das Signalprotein Akt und die aktivierende Phosphorylierung des eNOS-Enzyms stehen; und deshalb durch die selektive Wirkung über S1P₁ eine physiologisch relevante Vasodilatation möglich ist.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in HUVECs alle 3 für das Gefäßsystem potentiell relevanten S1P-Rezeptorsubtypen auf mRNA-Ebene exprimiert werden. Scheinbar quantitative Unterschiede lassen sich aus der Visualisierung jedoch nicht

schlussfolgern, da diese zum einen in unterschiedlich starker Expression der mRNA, zum anderen aber auch in unterschiedlichen *Primer*-Affinitäten während der Amplifikation begründet sein könnten. Nichtsdestotrotz vertreten auch andere Autoren die Auffassung, dass in humanen Endothelzellen vornehmlich S1P₁ und S1P₃ exprimiert werden, wohingegen der Expression von S1P₂ ein deutlich geringeres bis fehlendes Ausmaß zukommt.^{80, 105, 106}

Auch der Nachweis von S1P₁₋₃ in Nierengewebe führte zu einem positiven Resultat; jedoch sind Schlussfolgerungen zur Verteilung der einzelnen Rezeptorsubtypen in diesem Fall noch schwieriger zu ziehen. Eine Aussage darüber, ob die nachgewiesene mRNA aus renalem Gefäßendothel stammt, lässt sich nicht treffen, da für die Analyse homogenisierte Organteile verwendet wurden. Mittels Gen-Expressionsanalysen gelang anderen Autoren jedoch der Nachweis, dass alle drei Rezeptorsubtypen in Rattennieren exprimiert werden, wobei der Expression von S1P₁ quantitativ die größte Bedeutung zukommt.¹⁰⁷ Darüber hinaus ergaben auch analoge Untersuchungen mit murinem Nierengewebe eine Dominanz von S1P₁ gegenüber den anderen beiden Subtypen, die sich sowohl im Kortex, wie auch in der Medulla nachweisen ließ.¹⁰⁸

Ausgehend von diesen Befunden wurde mittels einer fluoreszenzbasierten Methode das NO-generierende Potential bekannter S1P-Agonisten in ECs getestet. Hierbei zeigte sich, dass alle verwendeten Agonisten - unabhängig von ihrer Selektivität zu den einzelnen Subtypen - die Fähigkeit besitzen, eine NO-Produktion zeit- und konzentrationsabhängig anzustoßen. Die Hypothese, dass durch Agoniststimulation allein über S1P₁ eine NO-Produktion und somit Vasodilatation erzielt werden kann, wird durch diese Beobachtung unterstrichen, da AUY954, SEW2871 und pKRP-203 selektiv über S1P₁ wirken.^{86, 88, 93}

Auch die über S1P₁ und S1P₃ wirkenden Agonisten pFTY720 und VPC24191 sind in der Lage, eine potente NO-Generation in HUVECs anzustoßen. Dies ist im Einklang mit früheren Veröffentlichungen.⁴⁵ Inwieweit der beobachtete Effekt jedoch auf S1P₁ und S1P₃ im Einzelnen zurückzuführen ist, lässt sich durch das verwendete Versuchsdesign nicht klären. Eine weitere Schlussfolgerung, die sich aus diesen Beobachtungen ziehen lässt, ist, dass die einzelnen Agonisten unterschiedliche Rezeptoraffinitäten und/ oder eine ungleiche Kinetik haben. So differiert nicht nur quantitativ das Ausmaß der NO-Produktion, sondern auch der Zeitpunkt eines individuellen Maximums. Unter den Bedingungen des vorliegenden Assaydesigns sind hervorzuheben: AUY954 als

potentester NO-Generator zu einem Zeitpunkt von 40 min und SEW2871, das in diesem Versuch die langsamste Kinetik mit einem Signalmaximum nach 60 min zeigte. Vergleiche anderer Autoren zu einer differenzierten pharmakologischen Effektmessung in umfassend gegenüberstellender Weise, wie sie für S1P₃-Agonisten ausführlich beschrieben worden sind,¹⁰⁹ existieren für die unterschiedlichen S1P₁-Analoge in dieser Form bislang nicht.

Als generell limitierend bei der Anwendung dieser Methode erwies sich die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten von der Vitalität der Zellen. Die Verwendung mehrerer Agenzien führte zu morphologischen Veränderungen der HUVECs, die bereits lichtmikroskopisch im Sinne eines Abkugeln der Zellen sichtbar waren. Dies ließ auf eine erhöhte Toxizität und somit auf eine eingeschränkte Vitalität der HUVECs schließen. Zur Vermeidung falsch positiver Fluoreszenzintensitäten, die sich aus einer Konzentrierung des Fluorophors in dem verdichteten Zytoplasma ergeben hätten, wurde der Versuch unter diesen Umständen abgebrochen und das generelle Problem dadurch minimiert, dass in den verschiedenen Versuchsansätzen Zellen einer Charge unter gleichen Stimulationsbedingungen behandelt wurden. Dennoch blieb die Qualitätsbeurteilung schlussendlich abhängig vom Experimentator und damit subjektiv gefärbt. Zur genaueren Objektivierung einer möglichen Agenzien-Toxizität hätte an dieser Stelle eine Methodik Anwendung finden müssen, die beispielsweise anhand der Messung zellulärer Syntheseleistung den potentiell schädigenden Einfluss des Agens mit der Vitalität der Zellen korreliert.

Bereits im Jahre 2005 konnte gezeigt werden, dass FTY720 in HUVECs über eine Aktivierung zu einer eNOS-Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷ führt und letztlich in einer NO-Produktion gipfelt.⁴⁵ Davon ausgehend wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit *Western-Blot*-Analysen durchgeführt, welche die Erkenntnis zur Ser¹¹⁷⁷-Phosphorylierung durch FTY720 bestätigten und analog dazu für AUY954 einen signifikanten Phosphorylierungseffekt nachwiesen. Dieser konnte, wie auch für FTY720, als konzentrations- und zeitabhängig beschrieben werden.

Entsprechende Analysen zur Dephosphorylierung von Thr⁴⁹⁵, dem zweiten Aminosäurerest, der im Zentrum der eNOS-Aktivität steht,¹⁴ zeigten mehrheitlich keine signifikanten Änderungen der Phosphorylierung. Eine Ausnahme hierzu stellen die Daten der zeitabhängigen Stimulationsversuche mit AUY954 zu den Zeitpunkten 5, 10 und 30 min dar, zu denen sich Signifikanzen ergaben. Diese bestätigten sich jedoch

weder zu den Zeitpunkten 20, 40 oder 60 min, noch in den analogen konzentrationsabhängigen Stimulationsversuchen. Aus diesem Grund werden die Signifikanzen zu jenen Zeitpunkten als ein statistischer Fehler gewertet, der sich bei einer größeren Stichprobe ($n > 5$) nicht ergäbe. Die Tatsache, dass auch andere Autoren eine Thr⁴⁹⁵-Dephosphorylierung durch S1P-Analoga-Stimulation für die eNOS-Aktivität als nicht essentiell ansehen,^{45, 110} macht diese Interpretation für AUY954 wahrscheinlich, wenngleich auch der abschließende Beweis an dieser Stelle nicht geführt werden konnte.

Die Anwendung der Bio-Plex-Methode zur Aktivitätsmessung von Signalproteinen ergab quantitativ vergleichbare Werte einer relativen Akt-Phosphorylierung nach Stimulation mit AUY954 bzw. pFTY720 als Ausdruck einer - in beiden Fällen - potenten Signalproteinaktivierung. Dies spricht dafür, dass die Signalkaskade zur eNOS-Aktivierung durch S1P-Analoga über eine Aktivierung dieses Signalproteins verläuft. Es deckt sich dadurch mit der wohl meistbeschriebenen Transduktionskaskade einer eNOS-Aktivierung durch vorangegangene Akt-Phosphorylierung¹⁰³ sowie mit den Ergebnissen aus *Western-Blot*-Analysen nach pFTY720-Stimulation.⁴⁵ Andere denkbare, Akt-unabhängige eNOS-Induktionswege, wie sie etwa unter Beteiligung von p42/ p44 MAPK beschrieben worden sind,¹¹¹ lassen sich zumindest durch die Beobachtung ausschließen, dass nach Agoniststimulation unter Verwendung eines Akt-Inhibitors keine signifikant über der Kontrolle liegende NO-Produktion gemessen werden konnte.

Die Beteiligung von S1P₁ und S1P₃ in der Signaltransduktion von AUY954 und pFTY720 auf Rezeptorebene wurde zunächst fluoreszenzmikroskopisch unter Co-Inkubation mit selektiven S1P-Rezeptor-Antagonisten geprüft. Dabei ergab die Auswertung einer Stimulation durch AUY954 unter selektiver S1P₁-Antagonisierung mit W146 erwartungsgemäß eine vollständige Signalinhibition. Eine Zellstimulation mit pFTY720 unter ausschließlicher Antagonisierung von S1P₁ hatte keinerlei Reduktion des Fluoreszenzsignals zur Folge. Die gleichzeitige Antagonisierung von S1P_{1/3} mit VPC23019 führte bei Stimulation mit pFTY720, wie analog auch mit AUY954, jedoch zu einer vollständigen Reduktion des Fluoreszenzsignals bis auf Kontrollniveau. Ähnliche Beobachtungen konnten bei Inkubation der Agonisten in Anwesenheit des selektiven S1P₃-Antagonisten CAY10444 gemacht werden. Hier kam es in beiden Fällen zu einer vollständigen Signalausprägung, die sich von den Vergleichsgruppen ohne Antagonist

faktisch nicht unterscheiden ließ. Dies deckt sich im Fall von AUY954 mit den Erkenntnissen der anderen Versuche, da eine Antagonisierung von S1P₃ auch hier keinen Einfluss auf das evozierte Fluoreszenzsignal vermuten ließ. Im Fall einer Stimulation mit pFTY720 hingegen eröffnet sich spekulativer Raum. Der Erklärungsansatz einer zu niedrig konzentrierten Verwendung von CAY10444 erscheint unwahrscheinlich, da bei Co-Inkubation von W146, CAY10444 und paralleler Agonist-Stimulation, wie auch bei analoger Anwendung von VPC23019, das Fluoreszenzsignal komplett inhibierbar war und sich nicht signifikant von der Kontrolle unterschied. Des Weiteren ist auch in anderen Arbeiten der Einsatz von 10 µmol/l CAY10444 als ausreichend für eine selektive und erfolgreiche Antagonisierung von S1P₃ beschrieben worden.^{98, 99}

Ein Erklärungsansatz von zentraler Bedeutung bietet sich durch die in der Literatur beschriebene Redundanz von S1P_{1/3}, deren volle Funktionalität erst durch die Bildung von Homo- und Heterotrimeren möglich sei.^{71, 112, 113} Speziell in HUVECs fanden sich auch durch die Arbeiten anderer Autoren Hinweise auf eine mögliche Transaktivierung von S1P_{1/3}.⁸⁰ Darüber hinaus sind Transaktivierungen von S1P-Rezeptoren mit anderen Rezeptorsystemen vorstellbar und bereits mehrfach beschrieben worden.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Unter anderem wurde die Transaktivierung des VEGF-Rezeptors durch S1P nachgewiesen. Es gelang der Beleg, dass eine Inhibition des VEGF-Rezeptors und eine deshalb ausbleibende Transaktivierung von S1P-Rezeptoren, die S1P-induzierte, aktivierende Phosphorylierung von Akt und eNOS reduziert.¹¹⁷ Im Kontext der vorliegenden Arbeit erscheint dies als ein vielversprechender Ansatz zur Diskrimination S1P-Rezeptor-vermittelter Effekte.

Demzufolge ist denkbar, dass es nur im Zusammenspiel von S1P₁ und S1P₃ durch Heterodimerisierung oder aber sogar im Wechselspiel mit anderen Rezeptorsystemen zu einer vollständigen Aktivierung der eNOS und damit einer potenten NO-Generation kommt.

Wird, wie in dem hier diskutierten Stimulationsversuch mit pFTY720, lediglich S1P₁ oder S1P₃ antagonisiert, so steht dieser Rezeptorsubtyp auch weiterhin für eine Heterodimerbildung zur Verfügung und der beobachtete Effekt einer voll ausgeprägten NO-Produktion könnte genau durch eine solche Kooperation mit dem jeweils anderen Subtyp zustande kommen. Andere Arbeiten zu einem vergleichbaren Einsatz dieser selektiven S1P-Antagonisten sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt rar, sodass der

Abgleich mit Daten anderer Autoren kaum möglich ist. Dennoch ist auf eine Veröffentlichung aus dem Jahre 2004 hinzuweisen, die explizit von einem kooperativen Effekt von S1P_{1/3} im vaskulären System ausgeht. Begründung dafür ist die Beobachtung, dass S1P_{1/3}^{-/-}-Mäuse zeitlich zu einem früheren Embryonalstadium vaskuläre Defizite zeigen als S1P₁^{-/-}-Tiere.¹¹²

Zur weiteren Verifizierung der These, dass sowohl S1P₁ als auch S1P₃ bedeutungsvoll in Hinblick auf eine eNOS-Aktivierung sind und in vorstellbarer Weise kooperieren könnten, wurden Analysen an k.d.-S1P-Zellen durchgeführt.

Dabei ergab sich bei der anschließenden fluoreszenzmikroskopischen Testung durch Stimulation mit AUY954 eine komplette Signalreduktion bis auf Kontrollniveau in der k.d.-S1P₁-Population, wohingegen es in k.d.-S1P₃-Zellen erwartungsgemäß zu einem vollen Stimulationssignal kam.

Bei entsprechend selektivem k.d.-S1P₁ ließ sich durch Stimulation mit pFTY720 - anders als bei den Antagonisierungs-Versuchen - eine tendenzielle Signalreduktion beobachten, die statistisch jedoch nicht signifikant war. Die geringe Stichprobenzahl (n=4-6) aus der sich möglicherweise eine falsch negative Signifikanz ergibt, sei an dieser Stelle jedoch in Hinblick auf mögliche Fehlerquellen erwähnt.

Analog ließ sich in der Population, die S1P₃ nicht translatierte, nach Stimulation mit pFTY720 eine signifikante Signalreduktion nachweisen. Dennoch war dieses Signal auch signifikant stärker in Bezug auf die unstimulierte Kontrolle (p: 0,0294), was seinerseits Hinweis auf einen S1P₁-vermittelten Effekt ist.

Ist das Expressionsniveau einer der beiden Rezeptorsubtypen in den Zellen derart vermindert wie im Falle einer k.d.-Translationssuppression, so steht dieser Subtyp nicht mehr für eine Kooperation zur Verfügung. Als Folge davon kann ein voller Stimulationseffekt wie bei partieller Rezeptor-Antagonisierung auch nicht beobachtet werden. Der Umstand, dass das Fluoreszenzsignal bei *knock-down* einer der beiden Subtypen dennoch signifikant größer als die unstimulierte Kontrolle war, lässt sich in diesem Zusammenhang daraus erklären, dass eine eNOS-Aktivierung durch den jeweils anderen Subtyp noch *per se* graduell getragen und vermittelt wird. Der Doppel-*knock-down* von S1P_{1/3} macht auch diese Tatsache deutlich, denn das Fluoreszenzsignal unterschied sich sowohl bei Stimulation mit AUY954 als auch mit pFTY720 nicht von der unstimulierten Kontrolle. Nebenbefundlich kann hieraus auch geschlossen werden, dass S1P₂ - außer im Sinne eines denkbar kooperativen

Effektes - nicht aktiv an einer eNOS-Aktivierung durch diese beiden Agonisten beteiligt ist. Diese Tatsache ist wiederum Ausdruck der in der Literatur beschriebenen fehlenden Affinität der Substanzen zu diesem Subtyp.

In weiterführenden Analysen zur Wirkung der S1P-Antagonisten wurde der Effekt auf die Phosphorylierung des Signalproteins Akt und die der Ser¹¹⁷⁷- und Thr⁴⁹⁵-Reste der eNOS untersucht. Hierbei ergaben sich analoge Rückschlüsse wie in den fluoreszenzmikroskopischen Versuchen. Einzig die Antagonisierung von S1P₁ mit W146 bzw. VPC23019 führte im Fall einer Stimulation mit AUY954 zu einer signifikant reduzierten Signaltransduktion, die sich in einer verminderten Akt-Phosphorylierung und geringerer eNOS-Aktivität widerspiegelte. Bei Stimulation mit pFTY720 konnte bei gleichem Versuchsdesign nur dann eine signifikante Reduktion der Signaltransduktion detektiert werden, wenn S1P₁ und S1P₃ zeitgleich antagonisiert wurden. Wenngleich auch hier eine geringe Stichprobenzahl (n=4) in die Betrachtung möglicher Fehlerquellen einbezogen werden muss, so sind die Daten in Zusammenschau der durchgeführten Analysen doch ein Indiz für das kooperative Verhalten von S1P_{1/3} bei Stimulation mit pFTY720.

Als Limitation der Untersuchung fällt bei Beurteilung der *Western-Blot*-Quantifizierungen auf, dass die relative Bandenintensität im Fall der Co-Inkubation von AUY954 und pFTY720 mit den Antagonisten insgesamt geringer ausfällt als bei alleiniger Verwendung der Agonisten (vgl. Abbildung 10, 11 und 16). Dies liegt am wahrscheinlichsten an der Vitalität der HUVECs zu Stimulationsende. Schon morphologisch zeigten sich vor Lyse lichtmikroskopische Zellveränderungen, die eine reduzierte Zellvitalität und damit bei Messung eine geringere Effektausprägung wahrscheinlich machen. Versuche, das Protokoll zu optimieren, gestalteten sich schwierig, da auf den Einsatz der Agenzien-Lösungsmittel in Summe zur Gewährleistung eines einheitlichen Versuchsdesigns nicht verzichtet werden konnte.

Die Daten der Nierenperfusionsversuche verdeutlichen die physiologische Relevanz einer AUY954-Applikation *ex vivo*. Sowohl die Bolusapplikation als auch die Dauerperfusion mit diesem selektiven S1P₁-Agonisten führten zu einer signifikanten Reduktion des MAD an isoliert perfundierten Rattennieren. Eine Korrelation von vasodilatierender Wirkung und eNOS-Aktivierung ist daher in Zusammenschau der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse sehr wahrscheinlich.

Die analoge *ex vivo* Applikation von pFYT720 zeigte indessen gegenteilige Wirkung. So wurde hier durch konzentrationssteigernde Boli eine hochsignifikant vasokonstriktive Wirkung erzielt, wohingegen vasodilative Effekte auch nach Vorkontraktion nicht beobachtet werden konnten. Dieser Umstand steht dennoch nicht im Widerspruch zu anderen Arbeiten oder gar zur physiologischen Relevanz eines FTY720-Effekts. Wie bereits dargelegt werden konnte, bewirkt die Applikation von pFTY720 an murinen vorkontrahierten Aortenringen einen signifikanten Verlust des MAD und somit eine Vasodilatation; ein Effekt, der unter Nutzung eines $S1P_3^{-/-}$ -Modells zumindest in Anteilen nachweislich $S1P_3$ -vermittelt ist.⁴⁵ Da die Verteilung der Rezeptorsubtypen in den einzelnen Gefäßabschnitten variiert, sind durch die Nutzung der Messmethode an der isoliert perfundierten Niere aus diesem Grunde lediglich Aussagen zur Organphysiologie im Ganzen möglich; zellbiologische Konsequenzen lassen sich daraus jedoch nicht gewinnen. In welchem Gefäßabschnitt dieses komplexen Organs und durch welches Zusammenwirken vasoaktiver Regularien ein organphysiologischer Effekt letztlich zustande kommt, muss unter Nutzung dieser Methode unbeantwortet bleiben. Hinzu kommt, dass zumindest für das physiologisch vorkommende S1P sowohl vasodilative wie auch -konstriktive Wirkungen beschrieben worden sind.^{40, 44} Die organphysiologische Wirkung entsprechender Analoga erklärt sich somit aus ihrer Selektivität für die einzelnen Rezeptorsubtypen und deren Expressionsmuster im Gefäßsystem.

FTY720 desensibilisiert selektiv $S1P_{1/2/5}$ -Rezeptoren in Lymphozyten, beeinflusst jedoch nicht die Expression von $S1P_{3/4}$ in diesen.⁸² Im Endothel hingegen findet sich nach Stimulation mit S1P und pFTY720 keine Negativregulation von $S1P_3$ auf der Zelloberfläche und zumindest nur eine umstrittene Desensibilisierung von $S1P_1$, wie andere Arbeiten belegen.^{80, 104, 118, 119} Dieser Umstand könnte dazu führen, dass jene Substanzen auch bei Dauerapplikation ihre atheroprotektiven Eigenschaften vermitteln.⁶⁰ Bezogen auf AUY954 wurden aus diesem Grund zu einer orientierenden Testung in Hinblick auf eine potentielle Rezeptordesensibilisierung und damit eines veränderten physiologischen Effekts wiederholte Bolusapplikationen von AUY954 an isoliert perfundierten Nieren durchgeführt. Die in hoher Konzentration und relativ kurzer Folge applizierten Boli ergaben im Verlauf keine signifikanten Unterschiede zur MAD-Änderung nach Erstapplikation. Ein Indiz dafür, dass auch AUY954 $S1P_1$ in ECs nicht zu internalisieren oder gar zu degradieren vermag. Dennoch muss angemerkt werden,

dass dieser Versuch aus verschiedenen Gründen durchaus kritisch zu bewerten ist. Erstens wurde bewusst eine hochmikromolare Konzentration (100 $\mu\text{mol/l}$) verwendet, die zwar eine potentielle Internalisierung forcieren sollte, andererseits aber unphysiologisch ist und deshalb durchaus eine endotheltoxische Wirkung vermuten lässt. Zweitens betrug die Versuchsdauer höchstens 40 min. Folglich ist denkbar, dass kein Effekt gemessen werden konnte, weil eine Internalisierung des Rezeptors erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet. Hierüber lässt sich jedoch nur spekulieren, da Daten anderer Autoren zum potentiellen Desensitierungsvermögen von AUY954 derzeit nicht existent sind und auch keine grundlegend einheitlichen Rückschlüsse aus Daten zum Desensitierungsvermögen anderer Vergleichssubstanzen wie pFTY720 oder S1P zu ziehen sind.^{80, 104, 118, 119} Drittens ist auch hier die Niere als komplexes Organ mit der zusätzlichen Fähigkeit einer internen Autoregulation des Blutdrucks als Modell kritisch zu bewerten, da das Versuchsdesign einen Rückschluss von organphysiologischen Phänomenen auf molekularbiologische Vorgänge abschließend nicht zulässt. Zu diesem Zweck und um klare Aussagen bezüglich einer möglichen Rezeptordesensitierung durch AUY954 treffen zu können, müssten weitere Modellversuche und molekularbiologische Expressionsanalysen folgen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten belegen, dass AUY954 und pFTY720 eine endotheliale NO-Generation vergleichbar potent anzustoßen vermögen. Diese wiederum wirkt zum einen direkt antiatherogen, indem sie durch eine lokale Reduktion des Blutflusses Scherkräfte zu minimieren vermag, zum anderen wirkt sie antiapoptotisch⁴⁷ und vermindert die Expression von MCP-1, was indirekt antiatherogenen Effekt hat.^{41, 120} Aus der hier vorgeschlagenen Aktivierungskaskade der eNOS durch AUY954 und pFTY720 lassen sich zwei grundlegende Rückschlüsse ziehen: Einerseits ist für den vollen Stimulationseffekt durch pFTY720 in ECs die Co-Existenz im Sinne eines kooperativen oder transaktivierenden Effektes von S1P_{1/3} nötig. Andererseits kann durch die Wirkung über S1P₁ mit AUY954 eine selektive eNOS-Aktivierung erzeugt werden, die in der Potenz der von pFTY720 vergleichbar ist.

Die beschriebene komplexe Wirkweise von pFTY720 über S1P_{1/3} sowie die relative Unselektivität für die einzelnen S1P-Rezeptorsubtypen könnte ein Erklärungsansatz dafür sein, dass klinische Studien mit dieser Substanz aufgrund zu vieler unerwünschter Arzneimittelwirkungen abgebrochen werden mussten.^{78, 79} Mit dem Agonisten AUY954 könnte sich in diesem Zusammenhang folglich die Möglichkeit einer Atherosklerose-

Therapie ergeben, die sich durch eine bessere pharmakologische Kontrollierbarkeit auszeichnet. Darüber hinaus ist auch die immunsuppressive Wirkung dieses Agonisten beschrieben worden,^{71, 86, 87} weshalb bei klinischem Einsatz nach Transplantation nicht nur Abstoßungsreaktionen minimiert werden könnten, sondern durch die gefäßprotektive Wirkung die lokale Durchblutung verbessert und das Organ vor transplantationsassoziierter Atherosklerose wirksam geschützt werden könnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Furchgott R.F. and Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980. 288(5789): p. 373-6.
2. Ignarro L.J. Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J*, 1989. 3(1): p. 31-6.
3. Ohkita M., Tawa M., Kitada K., and Matsumura Y. Pathophysiological Roles of Endothelin Receptors in Cardiovascular Diseases. *J Pharmacol Sci*.
4. Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J*, 1997. 18 Suppl E: p. E19-29.
5. Moncada S., Palmer R.M., and Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991. 43(2): p. 109-42.
6. Mayer B., John M., Heinzl B., et al. Brain nitric oxide synthase is a bipterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett*, 1991. 288(1-2): p. 187-91.
7. Stuehr D.J., Cho H.J., Kwon N.S., Weise M.F., and Nathan C.F. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(17): p. 7773-7.
8. Pollock J.S., Forstermann U., Mitchell J.A., et al. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(23): p. 10480-4.
9. Moncada S. and Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 1993. 329(27): p. 2002-12.
10. Gryglewski R.J., Chlopicki S., Swies J., and Niezabitowski P. Prostacyclin, nitric oxide, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. 748: p. 194-206; discussion 206-7.
11. Fleming I., Bauersachs J., Fisslthaler B., and Busse R. Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res*, 1998. 82(6): p. 686-95.
12. Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 1999. 399(6736): p. 601-5.
13. Boo Y.C., Sorescu G., Boyd N., et al. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem*, 2002. 277(5): p. 3388-96.
14. Fleming I., Fisslthaler B., Dimmeler S., Kemp B.E., and Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*, 2001. 88(11): p. E68-75.
15. Boger R.H., Bode-Boger S.M., Gerecke U., and Frolich J.C. Long-term administration of L-arginine, L-NAME, and the exogenous NO donor molsidomine modulates urinary nitrate and cGMP excretion in rats. *Cardiovasc Res*, 1994. 28(4): p. 494-9.
16. Rees D.D., Palmer R.M., Schulz R., Hodson H.F., and Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 1990. 101(3): p. 746-52.

17. Gimbrone M.A., Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol*, 1995. 75(6): p. 67B-70B.
18. Zeiher A.M., Drexler H., Saubier B., and Just H. Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest*, 1993. 92(2): p. 652-62.
19. Cai H. and Harrison D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 2000. 87(10): p. 840-4.
20. Ludmer P.L., Selwyn A.P., Shook T.L., et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*, 1986. 315(17): p. 1046-51.
21. Golino P., Piscione F., Willerson J.T., et al. Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients. *N Engl J Med*, 1991. 324(10): p. 641-8.
22. Stehouwer C.D., Lambert J., Donker A.J., and van Hinsbergh V.W. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res*, 1997. 34(1): p. 55-68.
23. van der Giet M., Tolle M., and Kleuser B. Relevance and potential of sphingosine-1-phosphate in vascular inflammatory disease. *Biol Chem*, 2008. 389(11): p. 1381-90.
24. Huo Y. and Ley K. Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand*, 2001. 173(1): p. 35-43.
25. Gu L., Okada Y., Clinton S.K., et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell*, 1998. 2(2): p. 275-81.
26. De Caterina R., Libby P., Peng H.B., et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, 1995. 96(1): p. 60-8.
27. Lee R.T., Yamamoto C., Feng Y., et al. Mechanical strain induces specific changes in the synthesis and organization of proteoglycans by vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 2001. 276(17): p. 13847-51.
28. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002. 420(6917): p. 868-74.
29. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): p. 115-26.
30. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 2001. 104(3): p. 365-72.
31. Naghavi M., Libby P., Falk E., et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation*, 2003. 108(15): p. 1772-8.
32. Merrill A.H., Jr., Hannun Y.A., and Bell R.M. Introduction: sphingolipids and their metabolites in cell regulation. *Adv Lipid Res*, 1993. 25: p. 1-24.
33. Schuchardt M., Tolle M., Prufer J., and van der Giet M. Pharmacological relevance and potential of sphingosine 1-phosphate in the vascular system. *Br J Pharmacol*. 163(6): p. 1140-62.
34. Liu H., Chakravarty D., Maceyka M., Milstien S., and Spiegel S. Sphingosine kinases: a novel family of lipid kinases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2002. 71: p. 493-511.
35. Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther*, 2007. 115(1): p. 84-105.

36. Gardell S.E., Dubin A.E., and Chun J. Emerging medicinal roles for lysophospholipid signaling. *Trends Mol Med*, 2006. 12(2): p. 65-75.
37. Birgbauer E. and Chun J. New developments in the biological functions of lysophospholipids. *Cell Mol Life Sci*, 2006. 63(23): p. 2695-701.
38. Yatomi Y., Igarashi Y., Yang L., et al. Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem*, 1997. 121(5): p. 969-73.
39. Murata N., Sato K., Kon J., et al. Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions. *Biochem J*, 2000. 352 Pt 3: p. 809-15.
40. Nofer J.R., van der Giet M., Tolle M., et al. HDL induces NO-dependent vasorelaxation via the lysophospholipid receptor S1P3. *J Clin Invest*, 2004. 113(4): p. 569-81.
41. Okajima F. Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1582(1-3): p. 132-7.
42. Lee M.J., Van Brocklyn J.R., Thangada S., et al. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science*, 1998. 279(5356): p. 1552-5.
43. Bischoff A., Czyborra P., Meyer Zu Heringdorf D., Jakobs K.H., and Michel M.C. Sphingosine-1-phosphate reduces rat renal and mesenteric blood flow in vivo in a pertussis toxin-sensitive manner. *Br J Pharmacol*, 2000. 130(8): p. 1878-83.
44. Salomone S., Yoshimura S., Reuter U., et al. S1P3 receptors mediate the potent constriction of cerebral arteries by sphingosine-1-phosphate. *Eur J Pharmacol*, 2003. 469(1-3): p. 125-34.
45. Tolle M., Levkau B., Keul P., et al. Immunomodulator FTY720 Induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3. *Circ Res*, 2005. 96(8): p. 913-20.
46. Cuvillier O., Rosenthal D.S., Smulson M.E., and Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate inhibits activation of caspases that cleave poly(ADP-ribose) polymerase and lamins during Fas- and ceramide-mediated apoptosis in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem*, 1998. 273(5): p. 2910-6.
47. Kwon Y.G., Min J.K., Kim K.M., et al. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem*, 2001. 276(14): p. 10627-33.
48. Moriue T., Igarashi J., Yoneda K., et al. Sphingosine 1-phosphate attenuates H₂O₂-induced apoptosis in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 368(4): p. 852-7.
49. Xia P., Wang L., Gamble J.R., and Vadas M.A. Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 1999. 274(48): p. 34499-505.
50. Lin D.A. and Boyce J.A. Lysophospholipids as mediators of immunity. *Adv Immunol*, 2006. 89: p. 141-67.
51. Langlois S., Gingras D., and Beliveau R. Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation. *Blood*, 2004. 103(8): p. 3020-8.
52. Tolle M., Pawlak A., Schuchardt M., et al. HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. 28(8): p. 1542-8.

53. Whetzel A.M., Bolick D.T., Srinivasan S., et al. Sphingosine-1 phosphate prevents monocyte/endothelial interactions in type 1 diabetic NOD mice through activation of the S1P1 receptor. *Circ Res*, 2006. 99(7): p. 731-9.
54. Lee H., Lin C.I., Liao J.J., et al. Lysophospholipids increase ICAM-1 expression in HUVEC through a Gi- and NF-kappaB-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 287(6): p. C1657-66.
55. Lin C.I., Chen C.N., Lin P.W., and Lee H. Sphingosine 1-phosphate regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through S1P1 and S1P3. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 355(4): p. 895-901.
56. Kimura T., Tomura H., Mogi C., et al. Sphingosine 1-phosphate receptors mediate stimulatory and inhibitory signalings for expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Cell Signal*, 2006. 18(6): p. 841-50.
57. Limaye V., Vadas M.A., Pitson S.M., and Gamble J.R. The effects of markedly raised intracellular sphingosine kinase-1 activity in endothelial cells. *Cell Mol Biol Lett*, 2009. 14(3): p. 411-23.
58. Ruf W., Furlan-Freguia C., and Niessen F. Vascular and dendritic cell coagulation signaling in sepsis progression. *J Thromb Haemost*, 2009. 7 Suppl 1: p. 118-21.
59. Nofer J.R., Bot M., Brodde M., et al. FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*, 2007. 115(4): p. 501-8.
60. Keul P., Tolle M., Lucke S., et al. The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(3): p. 607-13.
61. Daum G., Grabski A., and Reidy M.A. Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. 29(10): p. 1439-43.
62. Spiegel S. and Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4(5): p. 397-407.
63. Sattler K.J., Elbasan S., Keul P., et al. Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease. *Basic Res Cardiol*. 105(6): p. 821-32.
64. Takuwa Y., Okamoto Y., Yoshioka K., and Takuwa N. Sphingosine-1-phosphate signaling and biological activities in the cardiovascular system. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1781(9): p. 483-8.
65. Liu Y., Wada R., Yamashita T., et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*, 2000. 106(8): p. 951-61.
66. Takeya H., Gabazza E.C., Aoki S., Ueno H., and Suzuki K. Synergistic effect of sphingosine 1-phosphate on thrombin-induced tissue factor expression in endothelial cells. *Blood*, 2003. 102(5): p. 1693-700.
67. Inoue S., Nakazawa T., Cho A., et al. Regulation of arterial lesions in mice depends on differential smooth muscle cell migration: a role for sphingosine-1-phosphate receptors. *J Vasc Surg*, 2007. 46(4): p. 756-63.
68. Lorenz J.N., Arend L.J., Robitz R., Paul R.J., and MacLennan A.J. Vascular dysfunction in S1P2 sphingosine 1-phosphate receptor knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007. 292(1): p. R440-6.
69. Skoura A., Sanchez T., Claffey K., et al. Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina. *J Clin Invest*, 2007. 117(9): p. 2506-16.

70. Wang F., Okamoto Y., Inoki I., et al. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 deficiency leads to inhibition of macrophage proinflammatory activities and atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest.* 120(11): p. 3979-95.
71. Ishii I., Friedman B., Ye X., et al. Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3. *J Biol Chem*, 2001. 276(36): p. 33697-704.
72. Jaillard C., Harrison S., Stankoff B., et al. Edg8/S1P5: an oligodendroglial receptor with dual function on process retraction and cell survival. *J Neurosci*, 2005. 25(6): p. 1459-69.
73. Michel M.C., Mulders A.C., Jongsma M., Alewijnse A.E., and Peters S.L. Vascular effects of sphingolipids. *Acta Paediatr Suppl*, 2007. 96(455): p. 44-8.
74. Allende M.L., Sasaki T., Kawai H., et al. Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720. *J Biol Chem*, 2004. 279(50): p. 52487-92.
75. Wolf A.M., Eller K., Zeiser R., et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 potently inhibits regulatory T cell proliferation in vitro and in vivo. *J Immunol*, 2009. 183(6): p. 3751-60.
76. Delbridge M.S., Shrestha B.M., Raftery A.T., El Nahas A.M., and Haylor J.L. Reduction of ischemia-reperfusion injury in the rat kidney by FTY720, a synthetic derivative of sphingosine. *Transplantation*, 2007. 84(2): p. 187-95.
77. Hwang M.W., Matsumori A., Furukawa Y., et al. FTY720, a new immunosuppressant, promotes long-term graft survival and inhibits the progression of graft coronary artery disease in a murine model of cardiac transplantation. *Circulation*, 1999. 100(12): p. 1322-9.
78. Tedesco-Silva H., Pescovitz M.D., Cibrik D., et al. Randomized controlled trial of FTY720 versus MMF in de novo renal transplantation. *Transplantation*, 2006. 82(12): p. 1689-97.
79. Salvadori M., Budde K., Charpentier B., et al. FTY720 versus MMF with cyclosporine in de novo renal transplantation: a 1-year, randomized controlled trial in Europe and Australasia. *Am J Transplant*, 2006. 6(12): p. 2912-21.
80. Sensken S.C., Staubert C., Keul P., et al. Selective activation of G alpha i mediated signalling of S1P3 by FTY720-phosphate. *Cell Signal*, 2008. 20(6): p. 1125-33.
81. Oo M.L., Thangada S., Wu M.T., et al. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. *J Biol Chem*, 2007. 282(12): p. 9082-9.
82. Graler M.H. and Goetzl E.J. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J*, 2004. 18(3): p. 551-3.
83. Brinkmann V., Cyster J.G., and Hla T. FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *Am J Transplant*, 2004. 4(7): p. 1019-25.
84. Kappos L., Radue E.W., O'Connor P., et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 362(5): p. 387-401.
85. Kappos L., Antel J., Comi G., et al. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*, 2006. 355(11): p. 1124-40.
86. Pan S., Mi Y., Pally C., et al. A monoselective sphingosine-1-phosphate receptor-1 agonist prevents allograft rejection in a stringent rat heart transplantation model. *Chem Biol*, 2006. 13(11): p. 1227-34.

87. Zhang Z.Y., Zhang Z., Zug C., et al. AUY954, a selective S1P(1) modulator, prevents experimental autoimmune neuritis. *J Neuroimmunol*, 2009. 216(1-2): p. 59-65.
88. Sanna M.G., Liao J., Jo E., et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J Biol Chem*, 2004. 279(14): p. 13839-48.
89. Jo E., Sanna M.G., Gonzalez-Cabrera P.J., et al. S1P1-selective in vivo-active agonists from high-throughput screening: off-the-shelf chemical probes of receptor interactions, signaling, and fate. *Chem Biol*, 2005. 12(6): p. 703-15.
90. Wei S.H., Rosen H., Matheu M.P., et al. Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses. *Nat Immunol*, 2005. 6(12): p. 1228-35.
91. Awad A.S., Ye H., Huang L., et al. Selective sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in mouse kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. 290(6): p. F1516-24.
92. Lien Y.H., Yong K.C., Cho C., Igarashi S., and Lai L.W. S1P(1)-selective agonist, SEW2871, ameliorates ischemic acute renal failure. *Kidney Int*, 2006. 69(9): p. 1601-8.
93. Shimizu H., Takahashi M., Kaneko T., et al. KRP-203, a novel synthetic immunosuppressant, prolongs graft survival and attenuates chronic rejection in rat skin and heart allografts. *Circulation*, 2005. 111(2): p. 222-9.
94. Fujishiro J., Kudou S., Iwai S., et al. Use of sphingosine-1-phosphate 1 receptor agonist, KRP-203, in combination with a subtherapeutic dose of cyclosporine A for rat renal transplantation. *Transplantation*, 2006. 82(6): p. 804-12.
95. Suzuki C., Takahashi M., Morimoto H., et al. Efficacy of mycophenolic acid combined with KRP-203, a novel immunomodulator, in a rat heart transplantation model. *J Heart Lung Transplant*, 2006. 25(3): p. 302-9.
96. Davis M.D., Clemens J.J., Macdonald T.L., and Lynch K.R. Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists. *J Biol Chem*, 2005. 280(11): p. 9833-41.
97. Sanna M.G., Wang S.K., Gonzalez-Cabrera P.J., et al. Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo. *Nat Chem Biol*, 2006. 2(8): p. 434-41.
98. Koide Y., Hasegawa T., Takahashi A., et al. Development of novel EDG3 antagonists using a 3D database search and their structure-activity relationships. *J Med Chem*, 2002. 45(21): p. 4629-38.
99. Salomone S. and Waeber C. Selectivity and specificity of sphingosine-1-phosphate receptor ligands: caveats and critical thinking in characterizing receptor-mediated effects. *Front Pharmacol*. 2: p. 9.
100. Rao T.S., Lariosa-Willingham K.D., Lin F.F., et al. Pharmacological characterization of lysophospholipid receptor signal transduction pathways in rat cerebrocortical astrocytes. *Brain Res*, 2003. 990(1-2): p. 182-94.
101. Sugimoto K., Fujii S., Takemasa T., and Yamashita K. Detection of intracellular nitric oxide using a combination of aldehyde fixatives with 4,5-diaminofluorescein diacetate. *Histochem Cell Biol*, 2000. 113(5): p. 341-7.
102. Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., et al. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett*, 1998. 427(2): p. 263-6.

103. Fleming I. and Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. 284(1): p. R1-12.
104. Garcia J.G., Liu F., Verin A.D., et al. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest*, 2001. 108(5): p. 689-701.
105. Tamama K., Kon J., Sato K., et al. Extracellular mechanism through the Edg family of receptors might be responsible for sphingosine-1-phosphate-induced regulation of DNA synthesis and migration of rat aortic smooth-muscle cells. *Biochem J*, 2001. 353(Pt 1): p. 139-146.
106. Kimura T., Watanabe T., Sato K., et al. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J*, 2000. 348 Pt 1: p. 71-6.
107. Kirby R.J., Jin Y., Fu J., et al. Dynamic regulation of sphingosine-1-phosphate homeostasis during development of mouse metanephric kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009. 296(3): p. F634-41.
108. Zhu Q., Xia M., Wang Z., Li P.L., and Li N. A novel lipid natriuretic factor in the renal medulla: sphingosine-1-phosphate. *Am J Physiol Renal Physiol*. 301(1): p. F35-41.
109. Jongsma M., van Unen J., van Loenen P.B., et al. Different response patterns of several ligands at the sphingosine-1-phosphate receptor subtype 3 (S1P(3)). *Br J Pharmacol*, 2009. 156(8): p. 1305-11.
110. Boo Y.C. and Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. 285(3): p. C499-508.
111. Nakai K., Yoneda K., Morieue T., et al. HB-EGF-induced VEGF production and eNOS activation depend on both PI3 kinase and MAP kinase in HaCaT cells. *J Dermatol Sci*, 2009. 55(3): p. 170-8.
112. Kono M., Mi Y., Liu Y., et al. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem*, 2004. 279(28): p. 29367-73.
113. Van Brocklyn J.R., Behbahani B., and Lee N.H. Homodimerization and heterodimerization of S1P/EDG sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta*, 2002. 1582(1-3): p. 89-93.
114. Hobson J.P., Rosenfeldt H.M., Barak L.S., et al. Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. *Science*, 2001. 291(5509): p. 1800-3.
115. Rosenfeldt H.M., Hobson J.P., Milstien S., and Spiegel S. The sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 is essential for platelet-derived growth factor-induced cell motility. *Biochem Soc Trans*, 2001. 29(Pt 6): p. 836-9.
116. Tanimoto T., Lungu A.O., and Berk B.C. Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor beta receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2004. 94(8): p. 1050-8.
117. Tanimoto T., Jin Z.G., and Berk B.C. Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS). *J Biol Chem*, 2002. 277(45): p. 42997-3001.
118. Singer, II, Tian M., Wickham L.A., et al. Sphingosine-1-phosphate agonists increase macrophage homing, lymphocyte contacts, and endothelial junctional

- complex formation in murine lymph nodes. *J Immunol*, 2005. 175(11): p. 7151-61.
119. Sanchez T., Estrada-Hernandez T., Paik J.H., et al. Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability. *J Biol Chem*, 2003. 278(47): p. 47281-90.
120. Tsao P.S., Wang B., Buitrago R., Shyy J.Y., and Cooke J.P. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation*, 1997. 96(3): p. 934-40.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Artikel

Klöckl, L.*; Tölle, M.*; Schuchardt, M.; Wiedon, A.; Zidek, W.; van der Giet, M., S1P₁- and S1P₃-receptor mediate eNOS-activation in endothelial cells. British Journal of Pharmacology (Manuskript in Vorbereitung)
** authors contributed equally to the manuscript*

Tölle, M.; Schuchardt, M.; Wiedon, A.; Huang, T.; **Klöckl, L.**; Jankowski, J.; Jankowski, V.; Zidek, W.; van der Giet, M., Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. Br J Pharmacol, 2010. 161(3): p. 530-40.

Abstracts

Tölle, M.; Schuchardt, M.; **Klöckl, L.**; Zidek, W.; van der Giet, M., Die Aktivierung von S1P₁ und S1P₃ in Endothelzellen resultiert in einer NO Produktion. Kongress der Deutschen Hochdruckliga, 2012.

Klöckl, L., Schuchardt, M., Zidek, W.; van der Giet, M.; Tölle, M., AUY954, a selective S1P₁ agonist, and pFTY720 activate eNOS in an Akt-mediated pathway by different S1P receptor interaction. DGfN, 2011. 3(FV 05).

Tölle, M.; **Klöckl, L.**; Wiedon, A.; Schuchardt, M.; Huang, T.; Zidek, W.; van der Giet, M., The S1P₁ agonist AUY954 activates eNOS via Akt-mediated pathway. Journal of Hypertension, 2010. 28(p e11).

Tölle, M.; Schuchardt, M.; Huang, T.; Wiedon, A.; **Klöckl, L.**; Zidek, W.; van der Giet, M., The dinucleotide Up4a activates P2Y receptors in the kidney to induce vasoactive response. Journal of Hypertension, 2010. 28(p e193).

Tölle, M.; **Klöckl, L.**; Wiedon, A.; Schuchardt, M.; Huang, T.; Zidek, W.; van der Giet, M., The S1P₁ agonist AUY954 activates eNOS via Akt-mediated pathway. European Society on Hypertension, 2010.

Tölle, M.; **Klöckl, L.**; Schuchardt, M.; Wiedon, A.; Huang, T.; Zidek, W.; van der Giet, M., AUY954, a selective S1P₁ agonist, activates eNOS in human umbilical vein endothelial cells. Hypertonie 2010 der Deutschen Hochdruckliga, 2010

Tölle, M.; Schuchardt, M.; Wiedon, A.; Huang, T.; **Klöckl, L.**; Jankowski, J.; Jankowski, V.; Zidek, W.; van der Giet, M., Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. Br J Pharmacol, 2010. 161(3): p. 530-40.

Tölle, M.; Schuchardt, M.; Huang, T.; Wiedon, A.; **Klöckl, L.**; Zidek, W.; van der Giet, M., The dinucleotide Up4a activates P2Y receptors in the kidney to induce vasoactive response. European Society on Hypertension, 2010.

Tölle, M.; Schuchardt, M.; Huang, T.; Wiedon, A.; **Klöckl, L.**; Zidek, W.; van der Giet, M., The dinucleotide Up4a activates P2Y receptors in the kidney to induce vasoaktive response. ERA-EDTA, 2010.

Huang, T.; **Klöckl, L.**; Wiedon, A.; Schuchardt, M.; Jemielity, J.; Zidek, W.; van der Giet, M.; Tölle, M.; Adenosin-Tetraphosphat: Stärkster purinerner endothelial sezernierter Vasokonstriktor. Kongress der Deutschen Hochdruckliga, 2009.

Wiedon, A.; Bastine, J.; Schuchardt, M.; Huang, T.; **Klöckl, L.**; Zidek, W.; van der Giet, M.; Tölle, M., Uridin-Adenosin-Tetraphosphat ist ein potenter Stimulator der Migration und Proliferation in glatten Gefäßmuskelzellen. Kongress der Deutschen Hochdruckliga, 2009.

Vorträge

Klöckl, L., Schuchardt, M., Zidek, W.; van der Giet, M.; Tölle, M., AUY954, a selective S1P₁ agonist, and pFTY720 activate eNOS in an Akt-mediated pathway by different S1P receptor interaction. DGfN, 2011. 3(FV 05).

Tölle, M.; **Klöckl, L.**; Wiedon, A.; Schuchardt, M.; Huang, T.; Zidek, W.; van der Giet, M., The S1P₁ agonist AUY954 activates eNOS via Akt-mediated pathway. Journal of Hypertension, 2010. 28(p e11).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lars-Uwe Klöckl, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Charakterisierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase-Aktivierung durch Sphingosin-1-Phosphat-Analoga*“ selbständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Lars-Uwe Klöckl hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Klöckl, L.***, Tölle, M.*; Schuchardt, M.; Wiedon, A.; Zidek, W.; van der Giet, M., S1P₁- and S1P₃-receptor mediate eNOS-activation in endothelial cells. British Journal of Pharmacology (Manuskript in Vorbereitung)

** authors contributed equally to the manuscript*

Beitrag im Einzelnen:

- Molekularbiologischer Nachweis von S1P-Rezeptoren mittels RT-PCR
- Fluoreszenzmikroskopische NO-Detektion
- *Western-Blot*-Analysen zur Enzymaktivierung
- Messungen zur Signaltransduktion mittels Bio-Plex-Methode
- Statistische Analysen
- Erstellen des Manuskripts in Anteilen

Publikation 2: Tölle, M.; Schuchardt, M.; Wiedon, A.; Huang, T.; **Klöckl, L.**; Jankowski, J.; Jankowski, V.; Zidek, W.; van der Giet, M., Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. Br J Pharmacol, 2010. 161(3): p. 530-40.

Beitrag im Einzelnen:

- Physiologische Messungen an der isoliert perfundierten Niere

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Danksagung

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. med. Markus van der Giet für die Möglichkeit, unter seiner Leitung promovieren zu können, die interessante Thematik dieser Arbeit, die fruchtbaren Ideen zur Weiterentwicklung inhaltlicher Schwerpunkte sowie für die stete Ansprechbarkeit; nicht zuletzt danke ich für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts;

Herrn PD Dr. med. Markus Tölle für die herzliche Aufnahme in seine Laborgruppe, für die Einarbeitung in die physiologische Methodik sowie für den regen gedanklichen Austausch und den beharrlichen Glauben an den Erfolg dieser Arbeit;

Frau Dr. rer. nat. Mirjam Schuchardt für ihre Kooperation und Bereitstellung der k.d.-S1P-Zellen, für ihr stets offenes Ohr bei Fragen und Problemen, ihr kritisches Hinterfragen der Ergebnisse während der Entwicklung dieser Arbeit und die mentale Impulsgebung bei der Lösung inhaltlicher Schwierigkeiten sowie für die kritischen Anmerkungen zu diesem Manuskript;

Frau Annette Wiedon für ihre umfassende Kooperation und Unterstützung bei der Etablierung der Methodik, für ihren stetigen Mutzuspruch beim Vorantreiben dieser Arbeit und den effektiven gedanklichen Austausch und nicht zuletzt für ihre freundschaftlich-wohlwollende Zusammenarbeit;

Frau Jasmin Prüfer, Frau Nicole Prüfer, Frau Patricia Wolter, Frau Dr. rer. medic. Tao Huang und Frau Joschika Bastine für die stete Unterstützung bei technischen Abläufen und Problemen, für die fruchtbaren Diskussionen, Anregungen und Erfahrungsberichte sowie für die Schaffung eines konstruktiven Arbeitsklimas;

Herrn Prof. Dr. med. Gilbert Schönfelder für die Vermittlung dieser Promotionstätigkeit und die Unterstützung bei der Lösung mancherlei logistischer Probleme;

Herrn Philipp Möller für die objektive Beurteilung und präzise Durchsicht dieses Manuskripts;

Tom für seine Unterstützung und Loyalität, Aufmunterungen und kraftschöpfenden Ablenkungen auf dem Weg zur Fertigstellung dieser Arbeit;

meiner Schwester Juliane-Constance für ihr stets offenes Ohr, ihre mentale Unterstützung und Fürsorglichkeit in jeder Lebenslage;

in ganz besonderem Maße meinem Vater und meiner Mutter, die mir meine Studienzzeit und meine Promotion erst ermöglicht haben; über alle Maßen danke ich dafür, dass sie mir zu jeder Zeit geschätzte Zuhörer, Kritiker und Mutmacher sind und an meinen persönlichen wie auch beruflichen Werdegang glauben.