

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

DISSERTATION

„Einfluss des lysophospholipidbasierten Immunmodulators FTY720 auf  
die Cyclosporin A induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in  
glatten Gefäßmuskelzellen“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lukas Witte

aus Hannover

Gutachter/in:      1. Prof. Dr. med. M. van der Giet  
                             2. Prof. Dr. med. B. Sanner  
                             3. Prof. Dr. med. K. Kisters

**Datum der Promotion: 08.04.2011**

**Erlaubnis für die Durchführung von Tierexperimenten:**

Aktenzeichen: O 0086/ 01

Datum der behördlichen Genehmigung: 27.04.2001

**I. Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung .....	1
1.1 Niereninsuffizienz .....	2
1.2 Nierentransplantation und deren medikamentöse Begleittherapie .....	2
1.3 Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie .....	5
1.4 Neue immunsuppressive Therapieoptionen .....	6
1.5 Lysophospholipide .....	8
1.6 Fragestellung .....	11
2. Material und Methoden .....	12
2.1 Material .....	12
2.1.1 Substanzen.....	12
2.1.2 Pufferlösungen .....	13
2.1.3 Versuchstiere .....	13
2.1.4 Geräte und Hilfsmittel .....	14
2.1.5 Verbrauchsmaterialien .....	15
2.1.6 Software .....	15
2.2 Methoden.....	15
2.2.1 Anlegen einer Zellkultur aus glatten Gefäßmuskelzellen .....	15
2.2.2 Zellpflege .....	16
2.2.3 Einführung in die Fluoreszenztechnik.....	16
2.2.4 Das Fluorochrom H <sub>2</sub> DCFDA .....	17
2.2.5 Vorbereitung der Zellen.....	18
2.2.6 Beladung mit H <sub>2</sub> DCFDA .....	18
2.2.7 Stimulation.....	19
2.2.8 Messung am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader (FLIPR) .....	19
2.2.9 Statistische Auswertung .....	20
3. Ergebnisse .....	21
3.1 Zeitabhängige Auswirkung von Interleukin-1-β, Cyclosporin A, Sphingosin-1- Phosphat, SEW-2871 und FTY720-P auf die Produktion von ROS durch VSMCs.....	21
3.1.1 Zeitreihe mit Interleukin-1β .....	22
3.1.2 Zeitreihe mit Cyclosporin A.....	23
3.1.3 Zeitreihe mit Sphingosin-1-Phosphat.....	24

3.1.4 Zeitreihe mit SEW-2871 .....	25
3.1.5 Zeitreihe mit FTY720-P .....	26
3.2 Dosisabhängige Auswirkung von Interleukin-1- $\beta$ , Cyclosporin A, Sphingosin-1- Phosphat, SEW-2871 und FTY720-P auf die Produktion von ROS durch VSMCs.....	27
3.2.1 Konzentrationsreihe mit Interleukin-1 $\beta$ .....	28
3.2.2 Konzentrationsreihe mit Cyclosporin A.....	29
3.2.3 Konzentrationsreihe mit Sphingosin-1-Phosphat.....	30
3.2.4 Konzentrationsreihe mit SEW-2871 .....	31
3.2.5 Konzentrationsreihe mit FTY720-P .....	32
3.3 Dosisabhängiger Einfluss von Sphingosin-1-Phosphat, FTY720-P und SEW-2871 auf Cyclosporin A stimulierte VSMCs .....	33
3.3.1 Dosisabhängige Reaktion von Sphingosin-1-Phosphat mit Cyclosporin A.....	34
3.3.2 Dosisabhängige Reaktion von FTY720-P mit Cyclosporin A.....	35
3.3.3 Dosisabhängige Reaktion von SEW-2871 mit Cyclosporin A .....	36
3.4 Einfluss der S1P-Rezeptorantagonisten JTE-013, VPC-23019 und CAY-10444 auf die durch Interaktion von S1P, FTY720-P und SEW-2871 mit CyA entstehende ROS- Produktion in VSMCs .....	37
3.4.1 Reaktion von CyA und S1P mit JTE-013, VPC-23019 und CAY-10444 .....	38
3.4.2 Reaktion von CyA und FTY720-P mit JTE-013, VPC-23019 und CAY-10444.....	39
3.4.3 Reaktion von CyA und SEW-2871 mit JTE-013, VPC-23019 und CAY-10444 .....	40
4. Diskussion .....	41
5. Zusammenfassung .....	45
6. Literaturverzeichnis.....	47
7. Danksagung .....	53
8. Lebenslauf .....	54
Erklärung.....	55

**II. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Metabolismus des Sphingomyelins.....	9
Abbildung 2: Jablonski-Diagramm (modifiziert).....	16
Abbildung 3: Aufbau von (a) H <sub>2</sub> DCFDA, (b) H <sub>2</sub> DCF und Bildung von (c) fluoreszierenden DCF durch ROS .....	18
Abbildung 4: Darstellung einer zeitabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H <sub>2</sub> DCFDA nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$ (10ng/ml).....	22
Abbildung 5: Darstellung einer zeitabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H <sub>2</sub> DCFDA nach Stimulation mit Cyclosporin A (10 $\mu$ g/ml).....	23
Abbildung 6: Darstellung einer zeitabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H <sub>2</sub> DCFDA nach Stimulation mit Sphingosin-1-Phosphat .....	24
Abbildung 7: Darstellung einer zeitabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H <sub>2</sub> DCFDA nach Stimulation mit SEW-2871 (1 $\mu$ g/ml).....	25
Abbildung 8: Darstellung einer zeitabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H <sub>2</sub> DCFDA nach Stimulation mit FTY720-P (10 $\mu$ g/ml).....	26
Abbildung 9: Darstellung einer dosisabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H <sub>2</sub> DCFDA nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$ .....	28
Abbildung 10: Darstellung einer dosisabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H <sub>2</sub> DCFDA nach Stimulation mit Cyclosporin A .....	29
Abbildung 11: Darstellung einer dosisabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H <sub>2</sub> DCFDA nach Stimulation mit Sphingosin-1-Phosphat.....	30
Abbildung 12: Darstellung einer dosisabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H <sub>2</sub> DCFDA nach Stimulation mit SEW-2871 (1 $\mu$ g/ml).....	31

Abbildung 13: Darstellung einer dosisabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H <sub>2</sub> DCFDA nach Stimulation mit FTY720-P .....	32
Abbildung 14: Darstellung einer dosisabhängigen Hemmung der Cyclosporin A (10µg/ml) induzierten ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten durch Kombination dem Lysophospholipid S1P.....	34
Abbildung 15: Darstellung einer dosisabhängigen Hemmung der Cyclosporin A (10µg/ml) induzierten ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten durch Kombination mit dem S1P-Analogon FTY720-P .....	35
Abbildung 16: Darstellung einer dosisabhängigen Hemmung der Cyclosporin A (10µg/ml) induzierten ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten durch Kombination mit dem S1P <sub>1</sub> -Rezeptoragonisten SEW-2871 .....	36
Abbildung 17: Darstellung einer Hemmung der Cyclosporin A (10µg/ml) induzierten ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten durch Sphingosin-1-Phosphat (1µg/ml) alleine und in Kombination mit spezifischen Antagonisten am S1P <sub>1/3</sub> - (VPC-23019 10µmol/l), S1P <sub>3</sub> - (Cay-10444 1µmol/l) und S1P <sub>2</sub> -Rezeptor (JTE-013 10µmol/l).....	38
Abbildung 18: Darstellung einer Hemmung der Cyclosporin A (10µg/ml) induzierten ROS-Produktion aus glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten durch FTY720-P (1µg/ml) alleine und in Kombination mit spezifischen Antagonisten am S1P <sub>1/3</sub> - (VPC-23019 10µmol/l), S1P <sub>3</sub> - (Cay-10444 1µmol/l) und S1P <sub>2</sub> -Rezeptor (JTE-013 10µmol/l).....	39
Abbildung 19: Darstellung einer Hemmung der Cyclosporin A (10µg/ml) induzierten ROS-Produktion aus glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten durch SEW-2871 (1µg/ml) alleine und in Kombination mit spezifischen Antagonisten am S1P <sub>1/3</sub> - (VPC-23019 10µmol/l), S1P <sub>3</sub> - (Cay-10444 1µmol/l) und S1P <sub>2</sub> -Rezeptor (JTE-013 10µmol/l).....	40

**III. Abkürzungsverzeichnis**

APC (engl.)	antigenpräsentierende Zellen
CyA	Cyclosporin A
DCF	2',7'-dichlorfluorescein
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
eNOS	endotheliale Stickstoffoxid-Synthase
FLIPR (engl.)	Fluorescence-Image-Plate-Reader
GRF	glomeruläre Filtrationsrate
HDL (engl.)	high density lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
IL	Interleukin
MCP-1 (engl.)	monocyte chemoattractant protein 1
MHC (engl.)	Major histocompatibility complex
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogenkarbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOX	NADPH-Oxidase
H <sub>2</sub> DCF	2',7'-dihydrodichlorfluorescein
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MMF	Mycophenolate Mofetil
PBS (engl.)	Phosphat-Buffered-Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SM	Sphingomyelin
SPC	Sphingosylphosphorylcholin
VSMC (engl.)	vascular smooth muscle cell (glatte Gefäßmuskelzelle)

## 1. Einleitung

Trotz vieler medizinischer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten gibt es bisweilen keinen Weg, der bei einem Organversagen an einer Transplantation vorbeiführt. So wurden zum Beispiel nach Angaben der Deutschen Stiftung für Organtransplantation im Jahr 2007 2.907 nierenkranke Patienten mit einem neuen Organ versorgt. Laut Eurotransplant standen Ende 2007 jedoch 5.009 weitere Patienten aus Deutschland auf der Warteliste für eine Nierentransplantation. Außerdem mussten laut dem Bericht von QuaSi-Niere 2006 800 bereits organtransplantierte Patienten in die Dialysebehandlung zurückkehren (Frei 2008). Aufgrund des Mangels an Spenderorganen ist es wichtig, die Empfänger gut auszuwählen und die Zahl der Organverluste durch Insuffizienz und Abstoßung so weit wie möglich zu reduzieren. Deswegen wird umfangreich an den immunologischen Problemen bei Transplantationen und möglichen pharmazeutischen Interventionsmöglichkeiten geforscht.

Allgemein lässt sich beobachten, dass es in den letzten zehn Jahren mit der Einführung neuer Immunsuppressiva zu einer deutlichen Reduktion akuter Abstoßungskrisen von ca. 50% auf 20-30% in der Posttransplantationsphase kam (Meier-Kriesche, Schold et al. 2004; Flechner, Feng et al. 2005). Deshalb steht zurzeit vor allem die Therapie der chronischen Transplantatdysfunktion im Vordergrund der Forschung. Hierbei handelt es sich um eine arteriosklerotisch bedingte Gefäßvaskulopathie, die letztendlich zur Organinsuffizienz führt (Trapp and Weis 2005). Ursache hierfür sind neben den transplantationstechnisch bedingten Schädigungen und immunologischen Einflüssen auch Nebenwirkungen der verwendeten immunsuppressiven Medikamente. Viele dieser toxischen Schäden manifestieren sich auf direktem und indirektem Weg an den Gefäßen des Transplantats. So führen einige Medikamente zum Beispiel über Enzyminduktion zu einer pathologischen Sauerstoffradikalproduktion, die direkten Einfluss auf die Gefäßhomeostase hat (Trapp and Weis 2005).

Um diese Probleme zu reduzieren, sind in den letzten Jahren einige Medikamente mit verschiedenen neuen Ansätzen entwickelt und erprobt worden. Unter ihnen befindet sich das FTY720, ein Sphingosin-1-Rezeptorantagonist, der die Migration von T-Lymphozyten beeinflusst. Darüber hinaus wird weiterhin an den pathophysiologischen Grundlagen der Transplantatdysfunktion geforscht, da bis heute immer noch viele Fragen offen sind.

### **1.1 Niereninsuffizienz**

Wie kommt es überhaupt dazu, dass ein Patient eine neue Niere benötigt? Ursache ist meist eine terminale Niereninsuffizienz. Diese rein funktionelle klinische Bezeichnung beschreibt generell die eingeschränkte Fähigkeit der Niere, harnpflichtige Substanzen in ausreichendem Maße auszuschcheiden. Allgemein lässt sich eine schnelle akute von einer langwierigen chronischen Form unterscheiden.

Anhand der Proteinurie und der glomerulären Filtrationsrate (GFR) unterteilt man die chronische Nierenkrankheit in verschiedene Stadien. Im Krankheitsverlauf nimmt in der Regel die GFR weiter ab und die Proteinurie zu. Im Terminalstadium, mit einer GFR kleiner als  $15\text{ml/min}/1.73\text{m}^2$ , ist meist eine Nierenersatztherapie durch Dialyse oder Nierentransplantation notwendig. Laut QuaSi-Niere gab es 2006 in Deutschland 17.548 Neuaufnahmen in die chronische Nierenersatztherapie. Dies entspricht einer Zunahme von 1.521 Patienten gegenüber dem Vorjahr. Die Sterberate stieg jedoch ebenfalls von 10.975 im Jahr 2005 auf 12.130 Patienten im Jahr 2006. Seit der statistischen Erfassung 1994 gab es bis Ende 2006 in der Nierenersatztherapie einen Zuwachs von 54.656 auf 91.718 Patienten. Dies entspricht einem Anstieg von 67% (Frei 2008).

Es gibt viele verschiedene Gründe, die zu einer Abnahme der Nierenleistung führen können. Hierzu zählen unter anderem vaskuläre, glomeruläre und tubuläre Erkrankungen. Die häufigsten Ursachen eines terminalen Nierenversagens bei prävalenten Patienten in Deutschland sind eine Glomerulonephritis (23%) sowie der Diabetes mellitus Typ I und II (23%). Während die Diagnosehäufigkeit für Diabetes mellitus im Vergleich zu den Vorjahren stagniert, nimmt die der vaskulären Nephropathie, einer weiteren Grunderkrankung des Alters, stetig zu (Frei 2008). Aus den oben genannten Zahlen lässt sich erkennen, dass sich das Problem des Spendernierenmangels auch in Zukunft weiter zuspitzen wird.

### **1.2 Nierentransplantation und deren medikamentöse Begleittherapie**

Obwohl die Nierentransplantation bei chronischem Nierenversagen für geeignete Patienten die beste Behandlungsoption darstellt, ist sie nicht unproblematisch. Es kommt vor, dass das Immunsystem des Empfängers das neue Organ als fremd erkennt und eine entsprechende Immunantwort erfolgt. Gründe hierfür sind zum einen die Antigeneigenschaften des Spenderorgans und zum anderen die Erkennung fremder Antigene durch immunkompetente Zellen des Empfängers. Besonders die akute Transplantatabstoßung in der Initialphase nach Nierentransplantation stellt ein großes Problem dar, weil sie neben dem drohenden Transplantatverlust ebenso die Langzeitprognose ungünstig beeinflusst (Vanrenterghem 1998).

Die angesprochenen Antigeneigenschaften zeigen sich hauptsächlich in Form von MHC-Merkmalen (major histocompatibility complex) auf den Zelloberflächen, die zum Beispiel besonders stark vom Gefäßendothel exprimiert werden. T-Lymphozyten können diese fremden MHC-Komplexe direkt erkennen und lösen eine Kaskade von Aktivierungsprozessen aus, die letztendlich zur akuten Abstoßung des Organs in der frühen Posttransplantationsphase führen kann. Fremde Peptide des Spenders sind ebenfalls imstande auf indirektem Weg das Immunsystem zu aktivieren, indem sie durch Antigen präsentierende Zellen (APC) an die HLA-Proteine des Empfängers gebunden und dann den Lymphozyten in den sekundären Lymphorganen präsentiert werden. Zusammen mit einer Co-Stimulation durch weitere akzessorische Moleküle auf APC-Zellen erfolgt über verschiedene Signaltransduktionswege die Aktivierung weiterer T-Zellen. Daraufhin werden vielfältige Mediatoren der Immunantwort in der Zelle produziert und ausgeschüttet, unter anderem das Interleukin-2. Es bewirkt zusammen mit weiteren Wachstumsfaktoren eine Aktivierung des „Target of Rapamycin“-Proteinkomplexes und fördert so die klonale Expansion von immunreaktiven T-Zellen (Halloran 2004). In den sekundären Lymphfollikeln werden außerdem B-Zellen aktiviert, welche die entsprechenden Antigenbindungseigenschaften besitzen. Diese produzieren in der Folge spezifische Alloantikörper (Griendling, Minieri et al. 1994; Budde, Giessing et al. 2006).

Um diese Abstoßungsreaktionen möglichst zu vermeiden, ist es wichtig, eine Transplantation im Vorfeld genau zu planen. Dabei werden die ABO-Blutgruppeneigenschaften zwischen Spender und Empfänger abgeglichen und eine exakte Gewebetypisierung mit Bestimmung der jeweiligen HLA-Eigenschaften durchgeführt. Des Weiteren wird das Empfängerblutplasma auf bereits präformierte Antikörper gegen das Spenderorgan untersucht (Mayer and Persijn 2006).

Ein verbleibendes Restrisiko für eine akute Abstoßung versucht man durch immunsuppressive Maßnahmen beim Empfänger zu kontrollieren. Das primäre Ziel der Therapie ist die Verhinderung einer Abstoßungsreaktion bei einem akzeptablen Ausmaß an auftretenden Nebenwirkungen. Die Aufgaben der Immunsuppression unterscheiden sich in den verschiedenen Phasen nach der Transplantation und müssen entsprechend angepasst werden. Die wichtigste Phase ist die Initialtherapie in den ersten drei Monaten nach der Operation, da in diesem Zeitraum das Risiko einer Abstoßung des Spenderorgans am größten ist (Budde, Giessing et al. 2006). Sie kann bei Patienten mit erhöhtem immunologischen Risiko, beispielsweise bei Nachweis präformierter Antikörper, noch um eine Induktionstherapie erweitert werden. Im weiteren Verlauf ist durch graduelle Dosisreduktion der Immunsuppressiva eine Erhaltungstherapie anzustreben.

Das Standardschema in der Initialphase besteht zumeist aus einem Calcineurin-Inhibitor (z.B. Cyclosporin oder Tacrolimus), einem Glukokortikoid (z.B. Prednisolon oder Methylodopa) und einem Nukleosidsynthesehemmer (z.B. Mycophenolatmofetil). Es ist erweiterbar durch Lymphozytenantikörper (z.B. Daclizumab) oder IL-2-Rezeptorantagonisten (z.B. Orthoclone®) (Budde, Giessing et al. 2006).

Die Kortikosteroide bilden die Grundlage der Therapie nach erfolgter Transplantation, weil sie an verschiedenen Orten Einfluss auf die Immunantwort haben. Sie inhibieren zum Beispiel über den zytoplasmatischen Glukokortikoidrezeptor die Genexpression inflammatorisch wirkender Proteine. Der Standard ist zurzeit eine ca. dreimonatige hochdosierte Initialtherapie. Aufgrund der hohen Rate an Nebenwirkungen wird anschließend eine möglichst geringe Erhaltungsdosis angestrebt (Pascual, Theruvath et al. 2002).

Die Mycophenolsäure ist ein selektiver Antimetabolit eines zentralen Enzyms der *de novo* Purinnukleotidsynthese. Dieser führt vor allem in Lymphozyten zu einer Unterbrechung der DNA-Synthese und somit zu einer Proliferationshemmung. Hauptvertreter der Gruppe ist das Mycophenolatmofetil (MMF), das als Standardmedikament in über 80% der Initialtherapien nach Transplantationen eingesetzt wird (Budde, Giessing et al. 2006).

Calcineurin-Inhibitoren wirken auf einen Signaltransduktionsweg, der nach einer T-Zellaktivierung über eine Translokation eines Transskriptionsfaktors vom Zytoplasma in den Zellkern die Bildung von IL-2 und weiteren Zytokinen fördert (Budde, Giessing et al. 2006). Die beiden Hauptvertreter dieser Klasse sind Cyclosporin A und Tacrolimus. Sie werden im Zytoplasma an Immunophilinen gebunden. Der entstehende Komplex hemmt die Phosphataseaktivität des Calcineurins und unterbindet hierdurch die Synthese von IL-2 und anderen wichtigen Zytokinen des Immunsystems (Halloran 2004). Größtes Problem dieser Substanzgruppe ist eine Neuro- und Nephrotoxizität (Budde, Giessing et al. 2006).

Wie bereits erwähnt, kann bei Patienten mit erhöhtem immunologischen Risiko eine Induktionstherapie mit Antikörperpräparationen in Erwägung gezogen werden. Nach intravenöser Gabe von T-Zell-depletierenden Antikörpern binden sich diese an Membranproteine der T-Zellen und lösen eine Zellyse aus. Sie besitzen eine hohe immunsuppressive Potenz, die jedoch mit vielen Nebenwirkungen durch opportunistische Infekte und maligne Tumore einhergeht. Neueren Ursprungs sind die monoklonalen Antikörper gegen den IL-2-Rezeptor. Sie binden selektiv an den IL-2-Rezeptor aktivierter T-Zellen und verhindern eine klonale Expansion. In großen multizentrischen Studien wurde eine deutliche Reduktion der akuten Abstoßungsreaktion bei nur geringen Nebenwirkungen nachgewiesen (Vincenti, Kirkman et al. 1998).

### 1.3 Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie

Neben den direkten Folgen der Immunsuppression wie erhöhter Infektionsneigung, vermehrter Tumorinduktion und generellen toxischen Schäden kommt es auch zu spezifischen medikamentösen Auswirkungen wie zum Beispiel arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie oder Nephrotoxizität (Budde, Giessing et al. 2006).

Darüber hinaus kann trotz optimaler immunsuppressiver Therapie durch eine pathologische Endothelaktivierung eine arteriosklerotische Transplantatvaskulopathie entstehen, die langfristig eine Transplantatinsuffizienz nach sich zieht (Kitamoto and Egashira 2004). Ausgelöst wird dieser Aktivierungsprozess durch verstärkte Immigration und Adhäsion von Immunzellen am geschädigten Endothel, was eine chronische Entzündung zur Folge hat (Blantz and Munger 2002). Unterstützt wird dieser Vorgang durch transplantationsbedingte Ischämien und Reperfusionsschäden (Trapp and Weis 2005). Leider konnte bisher kein großer Einfluss auf dieses Problem genommen werden, das langfristig bei der Mehrheit der transplantierten Patienten auftritt (Trapp and Weis 2005).

Heute ist bekannt, dass ein wesentlicher auslösender Faktor für diese endotheliale Dysfunktion die immunsuppressiven Medikamente selbst sind (Weis, Wildhirt et al. 2000). Sie nehmen Einfluss auf bedeutsame endotheliale Eigenschaften wie oxidative Stressreaktionen, Apoptose, Wachstum, Metabolismus, Endothelin-1-Freisetzung und Stickstoffoxid (NO) -Produktion (Blantz and Munger 2002). Dass oxidativer Stress Zelluntergang durch Apoptose auslösen kann, ist belegt (Pohlman and Harlan 2000). Er steigert außerdem die metabolische Aktivität und beeinflusst in Verbindung mit der NO-Produktion die Adhäsion von Immunzellen an Endothelzellen (Kitamoto and Egashira 2004). NO verringert dabei die endotheliale Adhäsion von Zellen, wohingegen eine Endothelin-1-Freisetzung diese fördert (Li, Chu et al. 2003). Apoptose wird dabei als einer der ersten Schritte bei der Entstehung der Arteriosklerose angesehen, während die Zellproliferation als wichtiges Zeichen für endotheliale Reparationsvorgänge steht (Trapp and Weis 2005).

Neben NO gibt es weitere Sauerstoffverbindungen, die für die Gefäßhomeostase eine große Rolle spielen. Fast alle Zellen des Gefäßsystems produzieren  $O_2^-$  und  $H_2O_2$ , welche die wichtigsten Vertreter der Gruppe der reaktiven Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, kurz: ROS) sind (Griendling, Sorescu et al. 2000). Sie spielen eine bedeutende Rolle als Signalmoleküle bei normalen Zellfunktionen wie beispielsweise der Koordination des Wachstumsfaktor-Signalweges, der Steuerung von Transkriptionsfaktoren der Genexpressionen für Wachstum, Differenzierung und Apoptose und beeinflussen darüber hinaus die GTPaseabhängigen Umbauvorgänge des Zellskeletts (Lyle and Griendling 2006).

$O_2^-$  wird durch verschiedene Enzymsysteme gebildet. Die Hauptproduktion in Gefäßzellen erfolgt durch die Xanthin- und die NADPH-oxidase (Griendling, Minieri et al. 1994). Neben der möglichen direkten Signalwirkung durch  $O_2^-$ , entstehen vor allem weitere reaktive Gruppen. So bindet und deaktiviert  $O_2^-$  zum Beispiel Stickstoffoxid, das sonst primär den Vasotonus regelt, und es entsteht zellschädigendes Stickstoffperoxid. Außerdem kann durch eine Superoxiddismutase das stabilere  $H_2O_2$  gebildet werden. Dieses beeinflusst verschiedene Signalkaskaden, die unter anderem das Zellwachstum, die Vasokonstriktion, Zellmigration und Entzündungsreaktionen steuern (Lassegue and Clempus 2003). Der Abbau in den Zellen erfolgt über Katalasen und Peroxidasen, die das  $H_2O_2$  in Wasser und andere Metabolite spalten (Rhee, Kang et al. 1999).

Die enzymatische Produktion und Elimination von ROS wird dabei eng reguliert. So können unter anderem auch Hormone wie Angiotensin II, der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , platelet-derived growth factor und Interleukin (IL)-1 $\beta$  die Enzymexpression und -aktivität beeinflussen (Visner, Chesrown et al. 1992; Crosby, Wahle et al. 1996; Fukai, Siegfried et al. 1999). Unter normalen physiologischen Bedingungen reichen die zellulären antioxidativen Enzyme aus, um anfallende ROS zu eliminieren. Bei einer Gefäßerkrankung kommt es jedoch häufig zu einer überschießenden ROS-Produktion, welche die enzymatische Kapazität überschreitet. Dies führt zu oxidativem Stress, der unphysiologische Reaktionen an den Gefäßen auslöst und hierdurch die Schädigung verstärkt (Lyle and Griendling 2006). Infolgedessen ist es wichtig, die Entstehung von ROS sowie die genauen intrazellulären Angriffspunkte und ihre jeweilige Bedeutung bei kardiovaskulären Erkrankungen genauer zu erforschen.

#### **1.4 Neue immunsuppressive Therapieoptionen**

Die Entdeckung, dass das häufig verwendete Immunsuppressivum Cyclosporin A mitverantwortlich für einen chronischen Transplantatverlust ist, hat die Nachfrage nach neuen, weniger toxischen Medikamenten erhöht. Dabei kommt es vor allem auf eine Minderung der Nebenwirkungen und eine Reduzierung der immunsuppressiven Last für den Patienten an (Budde, Giessing et al. 2006).

Einen interessanten Ansatz bietet hier ein neues immunmodulierendes Medikament (Ferguson 2004), das in der Erprobung befindliche FTY720. Zurzeit wird die Anwendung in *de novo* renaltransplantierten Patientengruppen (Skerjanec, Tedesco et al. 2005) und in weiteren therapeutischen Gebieten wie zum Beispiel der Behandlung von Multipler Sklerose (Kappos, Antel et al. 2006) erforscht. FTY720 ist eine synthetische Nachbildung des natürlichen Wirkstoffs Myriocin, der von Kulturen des Pilzes *Isaria sinclairii* gebildet wird (Budde, Giessing

et al. 2006). Es ist der erste Vertreter einer neuen Medikamentengruppe von Sphingosin-1-Rezeptorantagonisten. Nach einer Phosphorylierung *in vivo* bindet es an den von Thymo- und Lymphozyten exprimierten G-proteingekoppelten Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor (S1P-Rezeptor) und bewirkt eine Aufnahme des Rezeptors in die Zelle (Brinkmann, Cyster et al. 2004). Dies hat zur Folge, dass die Zellen gegenüber dem Einfluss des natürlichen Ligands, dem S1P, unempfindlich sind (Matloubian, Lo et al. 2004). Dadurch wird der S1P-abhängige Vorgang, der normalerweise den Austritt der Lymphozyten aus den Lymphknoten regelt, gehemmt und es kommt dort zu einem Pooling der Zellen außerhalb der Blutbahn. Folglich können die Immunzellen nicht wieder rezirkulieren und werden so von den Spenderorganen und anderem entzündlichen Gewebe ferngehalten. Dabei bleiben die eingeschlossenen B- und T-Zellen aktiv, sodass die humorale Immunantwort weiterhin gewährleistet ist (Pinschewer, Ochsenbein et al. 2000). Die bisherige Datenlage lässt somit vermuten, dass FTY720 Spenderorgane vor Immunreaktionen des Wirts schützen kann, ohne dass eine generalisierte Immunsuppression notwendig ist. Diese Eigenschaft ist bisher einmalig in der Gruppe der Immunsuppressiva (Brinkmann, Cyster et al. 2004).

Die Reduzierung der S1P-Rezeptoren auf den Lymphozyten durch FTY720 und die dadurch verminderte T-Lymphozytenzirkulation hat möglicherweise auch Einfluss auf die Entstehung von Arteriosklerose. Der Beginn und das Fortschreiten dieser chronisch-entzündlichen Gefäßerkrankung sind eng mit einer T-zellgesteuerten Immunantwort verknüpft (Hansson and Libby 2006). FTY720 hat in Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen beispielsweise das Fortschreiten von arteriosklerotischen Läsionen verhindert (Keul, Tölle et al. 2007).

Das S1P-Analogon FTY720 wurde bereits als potentieller Agonist an den G-Protein gekoppelten Rezeptoren für S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> identifiziert (Brinkmann, Davis et al. 2002). Die immunsuppressive Wirkung von FTY720 wird nach neuesten Studien hauptsächlich dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptor zugeschrieben, da dieser eine entscheidende Rolle bei der Lymphozytenzirkulation spielt. Bei S1P<sub>1</sub>-defizienten Mäusen waren weder die Thymozyten in der Lage den Thymus noch die B- und T-Zellen befähigt die peripheren Lymphknoten wieder zu verlassen (Matloubian, Lo et al. 2004).

Darüber hinaus fand sich eine endothelabhängige vasodilatierende Wirkung von FTY720 auf Mäuseaorten. Bei Aortenringen von Mäusen ohne endotheliale Stickstoffoxid-Synthetase (eNOS) wurde dieser Effekt nicht beobachtet, was für eine Beteiligung eines eNOS/NO Signalwegs spricht. Der Umstand, dass FTY720 ebenfalls eine NO Freisetzung über eine Proteinkinase-B abhängige Phosphorylierung und Aktivierung von eNOS bewirkt, spricht für diese These (Tölle, Levkau et al. 2005). Dabei muss FTY720 zuvor von einer Sphingosin-Kinase

phosphoryliert werden, um seine biologische Aktivität zu erlangen (Sanchez, Estrada-Hernandez et al. 2003). Als Angriffspunkt wurde der S1P<sub>3</sub>-Rezeptor identifiziert, da bei S1P<sub>3</sub>-defizienten Mäusen der vasodilatierende Effekt ausblieb (Tölle, Levkau et al. 2005).

Die eNOS ist ein Kalzium/Calmodulin abhängiges Enzym und sitzt genau wie der S1P- Rezeptor auf der Zellmembran. Sie wird in endothelialen Gefäßzellen durch einen vorübergehenden Anstieg des intrazellulären Kalziums aktiviert, der über g-proteingekoppelte Rezeptoren ausgelöst werden kann. Die genauen Signaltransduktionswege für die S1P abhängige eNOS-Aktivierung sind jedoch noch nicht endgültig geklärt. Bekannt ist bisher nur, dass der *endotheliale growth factor* oder erhöhter Gefäßdruck eine Phosphorylierung der Proteinkinase B bewirkt und auf diesem Weg die eNOS aktiviert werden kann (Igarashi and Michel 2000).

Diese Entdeckung ist für die Transplantationsmedizin von besonderer Bedeutung, da gerade die NO-Freisetzung eine entscheidende Rolle bei myokardialen Verletzungen und Reperfusionsschäden spielt (Bolli 2001). Durch Gabe von HDL und S1P ließen sich die myokardiale Infarktgröße und die Schäden nach Reperfusion bei Mäusen signifikant senken. Außerdem konnte eine Abnahme der Apoptoserate der geschädigten Kardiomyozyten *in vitro* und *vivo* nachgewiesen werden (Theilmeier, Schmidt et al. 2006).

### 1.5 Lysophospholipide

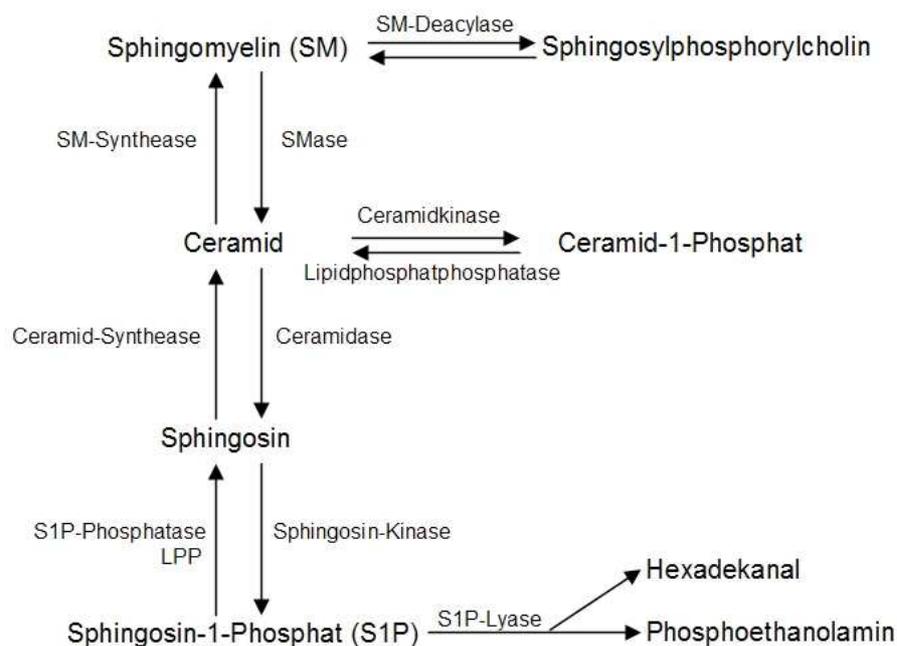
Wie lässt sich die Wirkung des Sphingosin-1-Phosphat-Analogon FTY720 erklären? Um diese Frage zu beantworten, müssen die High Density Lipoprotein (HDL)-Fraktion des Blutplasmas und die Untergruppe der Lysophospholipide näher betrachtet werden.

In den letzten Jahren sind die schon seit langem bekannten Lysophospholipide immer mehr Ziel der Forschung geworden. Mehrere epidemiologische und klinische Studien haben gezeigt, dass es eine gegensätzliche Beziehung zwischen dem HDL-Level im Blut und dem Auftreten von Herz- und Gefäßerkrankungen gibt (NCEP 2002). Dieses positive Langzeitergebnis wird hauptsächlich dem Umkehrerfolg von HDL auf den Cholesterintransport zugeschrieben, der zu einer Fettreduzierung in arteriosklerotischen Plaques führt (Linsel-Nitschke and Tall 2005). Zusätzlich besitzt HDL eine antiinflammatorische Wirkung. In Tierexperimenten wurden bei der zusätzlichen Gabe von HDL eine Unterdrückung von Zyto- und Chemokinen sowie eine Abnahme von Akut-Phase-Proteinen beobachtet (Ridker, Glynn et al. 1998; Cockerill, Huehns et al. 2001). Überdies bewirkt sie eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen und folglich eine verringerte Einwanderung von Leukozyten in die Gefäßwand (Barter, Nicholls et al. 2004). Es zeigte sich, dass HDL die thrombininduzierte Produktion von dem *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) hemmt (Tölle, Pawlak et al. 2008). Dieses Protein spielt eine

entscheidende Rolle bei der Monozyteninfiltration in die entzündete Gefäßwand, die den ersten Schritt in der Pathogenese von arteriosklerotischen Plaques darstellt (Charo and Ransohoff 2006). Die Hemmung von MCP-1 geht mit einer Unterdrückung von ROS einher, welche die MCP-1 Produktion in VSMCs steuern. Diese erfolgt über eine Blockierung der NADPH-Oxidase durch Hemmung der vorangehenden Rac1-Aktivierung. Dieser Effekt zeigt sich ebenfalls für Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Sphingosylphosphorylcholin (SPC) und ist abhängig von dem S1P<sub>3</sub>-Rezeptor (Tölle, Pawlak et al. 2008).

In den letzten Jahren wurde die Bedeutung von Sphingolipiden als wichtige Signalmoleküle erkannt. Dabei scheinen die Sphingosinmetaboliten Ceramid, S1P und SPC wichtige Elemente bei der Steuerung des Gefäßtonus zu sein. Außerdem nehmen sie Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose (Spiegel and Milstien 2002).

Das Sphingomyelin (SM) ist Bestandteil von Zellmembranen und stellt gleichzeitig eine Vorstufe zur Bildung von weiteren Sphingolipiden dar (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Metabolismus des Sphingomyelins

Eine SM-Deacylase formt hieraus das vasoaktive SPC. Wird das SM dagegen durch eine Sphingomyelase hydrolysiert, entsteht Ceramid. Dieses kann entweder durch eine Ceramidkinase zu Ceramid-1-Phosphat phosphoryliert oder durch eine Ceramidase weiter zu Sphingosin metabolisiert werden. Sowohl der Schritt zurück zu SM mit Hilfe der Sphingomyelinsynthase als auch der Weg von Ceramid-1-Phosphat zu Ceramid durch eine unspezifische Lipidphosphatphosphatase ist möglich. Eine Phosphorylierung von Sphingosin durch

Sphingosinkinase erzeugt S1P. Außerdem kann Sphingosin durch die Ceramidsynthese wieder in Ceramid umgewandelt werden. Das S1P kann zum einen durch eine S1P-Phosphatase oder unspezifische Lipidphosphatphosphatasen zu Sphingosin zurück gewandelt oder zum anderen durch eine S1P-Lyase zu Hexadecanal und Phosphoethanolamin gespalten werden (Melendez 2008).

Hierbei sind Ceramid, S1P und SPC in Bezug auf die vaskulären Reaktionen die wichtigsten Metaboliten des Sphingomyelins. Sie finden sich im Blutplasma sowie –serum und können durch Thrombozyten sowohl gespeichert als auch freigesetzt werden. Darüber hinaus werden sie auch lokal in der Gefäßwand gebildet (Alewijne, Peters et al. 2004).

Viele Studien haben inzwischen den bedeutsamen Einfluss von Sphingolipiden (Ceramid, S1P und SPC) auf das Herz-Kreislauf-System bestätigt. So wurde herausgefunden, dass Ceramide eine Weitstellung von isolierten Rattenaorten bewirken können (Johns, Osborn et al. 1997). S1P und SPC führen *in vitro* zu einer Konstriktion von isolierten Mikrogefäßen aus Mesenterium und Niere (Bischoff, Czyborra et al. 2000). Dies bestätigte sich bei Experimenten *in vivo*, bei denen es zu einer Abnahme des entsprechenden Blutflusses kam (Bischoff, Czyborra et al. 2000). Bezüglich der gefäßerweiternden Wirkung von S1P und SPC ist die Studienlage widersprüchlich (Alewijne, Peters et al. 2004; Watterson, Ratz et al. 2005; Hemmings 2006). Es häufen sich allerdings die Anzeichen dafür, dass Ceramid bevorzugt intrazellulär und S1P und SPC eher extrazellulär über spezifische Rezeptoren wirken. Die SPC-Rezeptoren konnten bisher jedoch noch nicht sicher identifiziert werden (Michel, Mulders et al. 2007).

Wie lassen sich diese zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse erklären? Neben der unterschiedlichen Gefäßgröße und den verschiedenen Eigenschaften von Endothel und glatter Gefäßmuskulatur scheint ebenfalls die Expression der verschiedenen S1P-Rezeptorsubtypen eine Rolle zu spielen (Michel, Mulders et al. 2007).

Bisher konnten fünf verschiedene Unterformen des G-Protein gekoppelten S1P-Rezeptors identifiziert werden. Dabei scheinen vor allem S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> eine Rolle im Herz-Kreislauf-System zu spielen. Diese finden sich bei Mäusen überwiegend in Geweben von Herz und Lunge (Zhang, Contos et al. 1999). Während S1P<sub>1</sub> und S1P<sub>2</sub> bei Menschen in gleichem Maße im Herzen und der Aorta exprimiert werden, findet sich für S1P<sub>3</sub> ein deutlicher Schwerpunkt bei glatten aortalen Gefäßmuskel- und Endothelzellen (Mazurais, Robert et al. 2002). Der S1P<sub>4</sub>-Rezeptor beschränkt sich hauptsächlich auf lymphatisches und blutbildendes Gewebe sowie auf die Lunge (Graler, Bernhardt et al. 1998). Die Expression von S1P<sub>5</sub>-Rezeptoren ist insgesamt gering. Die höchste Konzentration findet sich in der Milz sowie in der weißen Substanz des zentralen Nervensystems (Hla, Lee et al. 2001).

### **1.6 Fragestellung**

Es ist bekannt, dass Cyclosporin eine ausgeprägte endotheliale Dysfunktion verursacht. Ursächlich ist wahrscheinlich die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies, die eine drastische Verminderung der endothelial produzierten NO-Bioverfügbarkeit bewirkt. Des Weiteren konnte mehrfach erfolgreich gezeigt werden, dass Lysophospholipide wie SIP protektive Eigenschaften besitzen, die durch rezeptorvermittelte Vorgänge gesteuert werden. Daher stellt sich die Frage, ob bei nierentransplantierten Patienten durch eine Therapie mit lysophospholipid-basierten Immunmodulatoren eine Verbesserung der Transplantatfunktion erreicht werden kann. Ziel dieser Dissertationsarbeit soll sein, die Einflüsse des lysophospholipid-basierten Immunmodulators FTY720 auf die Cyclosporin A induzierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies zu untersuchen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Substanzen

- alpha smooth muscle actin antibody (ASM-1) Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- Antikörper gegen von-Willebrand-Faktor Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- CAY-10444 Cayman Chemical (Tallinn, Estland)
- CO<sub>2</sub> Linde AG (Pullach, Deutschland)
- Cyclosporin A Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- Fetales Kälberserum Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
- FTY720 Novartis (Nürnberg, Deutschland)
- Glukose Merck (Darmstadt, Deutschland)
- H<sub>2</sub>DCFDA (2',7'-dihydrodichlorofluorescein diacetate) Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
- HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure) Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- Interleukin-1-β Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- JTE-013 Cayman Chemical (Tallinn, Estland)
- Kaliumchlorid (KCl) Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- L-Glutamin Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
- Magnesiumchlorid Merck (Darmstadt, Deutschland)
- NADPH Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- Natriumchlorid (NaCl) Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- Natriumhydrogenkarbonat Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Penicillin G Biochrom
- S1P Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- SEW-2871 Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
- Streptomycin Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
- Tiron Merck (Darmstadt, Deutschland)

- Trypsin Roth (Karlsruhe, Deutschland)
- VPC-23019 Cayman Chemical (Tallinn, Estland)

### 2.1.2 Pufferlösungen

Zur Herstellung von einem Liter *phosphate buffered saline* (PBS) löst man folgende Stoffe in 800ml bidestilliertem Wasser:

- Natriumchlorid (NaCl) 8g
- Kaliumchlorid (KCl) 0,2g
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1,44g
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 0,24g

Anschließend wird der pH-Wert mit Hilfe eines pH-Meters und Hydrogenchlorid (HCl) auf 7,4 titriert. Danach wird durch zusätzliche Gabe von H<sub>2</sub>O das Volumen auf einen Liter erweitert (Sambrook 1989).

Als weitere Puffersubstanz wird die Krebs-Ringer-Hepes-Lösung eingesetzt.

Bei einer Säurekonstante von  $pK_s = 7,55$  (bei 20°C) besitzt sie eine gute Pufferkapazität zwischen pH 6,8–8,2 (Good, Winget et al. 1966).

Krebs Ringer-Hepes-Puffer:            140.0 mM NaCl  
(pH 7.4)                                    5.0 mM NaHCO<sub>3</sub>  
    1.0 mM MgCl<sub>2</sub>  
    1.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
    10.0 mM Glukose  
    20.0 mM HEPES

### 2.1.3 Versuchstiere

Für die Versuche werden glatte Gefäßmuskelzellen aus Aorten von männlichen Wistar-Kyoto-Ratten benutzt. Die normotensiven sechs Monate alten Tiere stammen von der Firma Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere werden frühestens sechs Tage nach Anlieferung für Tierversuche verwendet. Die Haltung erfolgt in Kolonien in klimatisierten Räumen bei 19 – 21°C Raumtemperatur und 50% - 70% relativer Luftfeuchtigkeit. Der hell/dunkel Tagesrhythmus beträgt zwölf Stunden. Die Einstreu der Käfige besteht aus entstaubten und entkeimten Weichholzfäsern (Altromin, Lage, Deutschland). Neben stets bereitstehendem Wasser und Trockenfutter erfolgt dreimal wöchentlich eine Nahrungsergänzung durch Obst und Getreidekörner.

Die Haltung und die Verwendung der Tiere erfolgen nach geltendem deutschem Recht und gemäß den entsprechenden Protokollen der Ethikkommission des Landesamts für Gesundheit und Technische Sicherheit Berlin (LAGETSI).

#### 2.1.4 Geräte und Hilfsmittel

- Analysewaage Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
- Arbeitsbank für Zellkultur Heraeus Holding GmbH (Osterode, Deutschland)
- Computer Fujitsu Siemens Computer GmbH (München, Deutschland)
- Fluoreszenz-Image-Plate-Reader (FLIPR) Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
- Gefrierschränke -20°C Heraeus Holding GmbH (Osterode, Deutschland)
- Gefrierschränke -80°C Robert Bosch GmbH (Stuttgart, Deutschland)  
Liebherr GmbH (Biberach an der Riss, Deutschland)
- Glasbehälter Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
- Inkubationsschrank Heraeus Holding GmbH (Osterode, Deutschland)
- Kühlschränke Robert Bosch GmbH (Stuttgart, Deutschland)  
Liebherr GmbH (Biberach an der Riss, Deutschland)
- Magnetrührer IKA-Werk GmbH (Staufen, Deutschland)
- Mikroskop Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
- Monitor LG Electronics (Seoul, Korea)
- Neubauer-Zählkammer VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
- pH-Messgerät Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Pinzette VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
- Pipetten Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Saugpipette VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
- Saugpumpe VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
- Vortex Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach, Deutschland)
- Warmwasserbecken Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
- Zentrifuge Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)

### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

- Einwegskalpelle Otto Rüttgers GmbH & Co. (Solingen, Deutschland)
- Glaspipetten VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
- Pipettenspitzen Süd Laborbedarf (Gautingen, Deutschland)
- Reaktionsgefäße 0,5ml Sarstedt AG & Co. (Nürmbrecht, Deutschland)
- Reaktionsgefäße 1,5ml/2.0ml Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
- Reaktionsgefäße 15ml/20ml BD Falcon (Franklin Lakes, USA)
- Zellkulturflaschen 10ml/25ml/50ml Nunc GmbH & Co. KG, Langensfeld, Deutschland
- Zellschaber Biochrom AG (Berlin, Deutschland)

### 2.1.6 Software

- Mikrowin 2000 v4.41 Mikrotek Laborsysteme (Overath, Deutschland)
- MS Explorer 7.0 Microsoft Corp. (Redmond, USA)
- MS Office 2003 Professional Microsoft Corp. (Redmond, USA)
- Prism 5.0 Graph Pad Software (San Diego, USA)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anlegen einer Zellkultur aus glatten Gefäßmuskelzellen

Die in den Experimenten benutzten glatten Gefäßmuskelzellen stammen aus thorakalen Aorten von Wistar-Kyoto-Ratten. Dazu wird die Ratte durch eine intraperitoneal injizierte Überdosis einer Lösung aus Xylazin (12mg/ml) und Ketamin (80mg/ml) getötet und fixiert. Anschließend wird die Haut mit einem Skalpell eingeschnitten und mit Hilfe einer sterilen Schere und einer Pinzette entfernt. Danach wird der Thorax eröffnet, die Aorta freipräpariert und der Abschnitt zwischen dem linken Ventrikel und der ilialen Bifurkation entnommen. Das gewonnene Stück wird in eine Petrischale mit Kulturmedium gegeben und sowohl anhängendes Gewebe als auch die Adventitia mit Hilfe einer Pinzette entfernt. Übrig bleiben die muskulären Bestandteile der Aorta, die mit einer Schere der Länge nach aufgeschnitten werden. Im nächsten Schritt wird die Innenseite mit einem Skalpell vom Endothel befreit und leicht angeraut. Es folgte die Zerlegung der Aorta mit dem Skalpell in ca. 1-2 mm große quadratische Stücke. Diese werden mit der Innenseite nach unten auf den Boden einer Kulturflasche aufgetragen und anschließend in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) inkubiert, das zusätzlich 10% fetales Kälberserum, 100U/ml Penicillin G und 100mg/ml Streptomycin enthält.

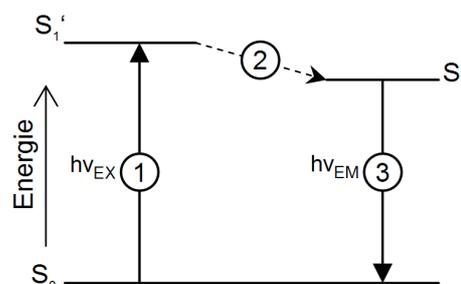
Die Zellkulturen werden in einer feuchten Atmosphäre mit 95% Raumluft und 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C inkubiert.

### 2.2.2 Zellpflege

Das Medium wird anfangs nach 24 Stunden und danach in zwei- bis dreitägigen Abständen gewechselt. Acht bis zehn Tage nach der ersten Aussaat bildet sich ein einschichtiger konfluenter Zellrasen. Daraufhin erfolgt die Subkultivierung mit einer Zelldichte von ca.  $1,3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in wöchentlichen Intervallen. Dies geschieht durch Ablösung der VSMCs mit Hilfe von 0,05% Trypsin und anschließender Zentrifugation und Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer. Diese Prozedur wird bis zum Erreichen der achten Passage wiederholt. Mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpers ASM-1 gegen das alpha-Aktin der glatten Muskelzellen wird der immunhistochemische Nachweis erbracht, dass es sich wirklich um VSMCs handelt. Die entsprechende Anfärbung zeigt unter dem Fluoreszenzmikroskop, dass alle Zellen markiert und im Zytosol die erwarteten Aktinfilamente zu finden sind. Der Ausschluss einer Kontamination durch Endothelzellen oder Fibroblasten erfolgt immunhistochemisch durch Antikörper gegen den von-Willebrand-Faktor, der mit einem Fluorochrom gekoppelt ist. Der Trypan-Blau-Ausschlusstest zeigt eine Lebensfähigkeit der Zellen von über 95%.

### 2.2.3 Einführung in die Fluoreszenztechnik

Fluoreszenz, also die Emission von Licht, ist das Ergebnis aus einem dreiteiligen Prozess, der in bestimmten Molekülen stattfindet. Bei diesen Molekülen handelt es sich meist um polyzyklische Kohlenwasserstoffe oder Heterozyklen. Solche Fluoreszenzfarbstoffe werden benutzt, um beispielsweise eine definierte Region bei einem Testobjekt zu markieren oder bestimmte Reize nachzuweisen. Dabei werden drei Phasen durchlaufen: die Anregung (Exzitation), die Zeit im angeregtem Zustand und die Emission von Licht (Fluoreszenz):



**Abbildung 2:** Jablonski-Diagramm (modifiziert). Es beschreibt (1) den Prozess der Exzitation durch Lichtenergie ( $h\nu_{EX}$ ) aus dem Grundzustand ( $S_0$ ), (2) der Zeit im angeregten Zustand ( $S_1'$  bis  $S_1$ ) und (3) der folgenden Fluoreszenzemission ( $h\nu_{EM}$ ).

In der ersten Phase wird das fluoreszenzfähige Molekül durch Absorption energiereicher Photonen einer Glühlampe oder eines Lasers angeregt. Dadurch wird dieses für einen begrenzten Zeitraum von 1-10ns auf ein höheres Energieniveau angehoben. In dieser Zeit kommt es zu verschiedenen Konformationsänderungen innerhalb des Moleküls und zu Interaktionen mit anderen Molekülen in der Umgebung. In der Regel wird anschließend ein relativ stabiler Zustand erreicht, der dann eine Fluoreszenz ermöglicht. Es kommt aber auch vor, dass angeregte Moleküle aufgrund verschiedener Prozesse ohne Lichtemission zum Grundzustand zurückkehren. Beispiele hierfür sind die Fluoreszenzlöschung durch Kollisionen von Molekülen oder die Energieübertragung auf einen anderen Fluoreszenzfarbstoff.

In der Emissionsphase gibt das angeregte Molekül die absorbierte Energie in Form eines Photons wieder ab und kehrt in den energieärmeren Grundzustand zurück. Dabei ist das abgegebene Licht langwelliger als das aufgenommene, da in der zweiten Phase ein Teil der aufgenommenen Energie bereits verbraucht wurde (Stokessche Regel). So können die emittierten Photonen unabhängig von den exzitierten gemessen werden, wodurch eine hohe Sensitivität bei niedriger Hintergrundstrahlung erreicht wird.

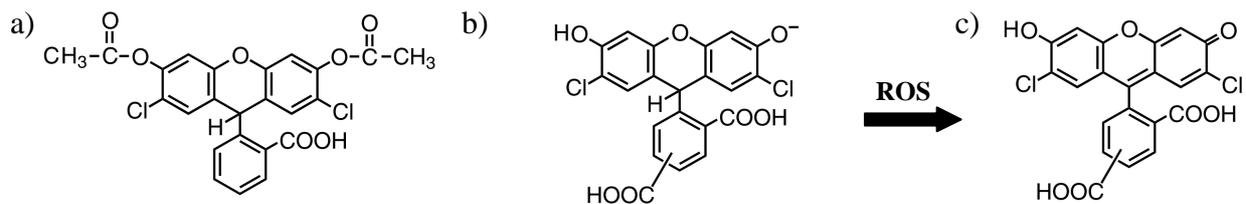
Der oben beschriebene Prozess aus Exzitationsphase, Fluoreszenzlebensdauer und Emissionsphase ist in vielen tausend Zyklen wiederholbar. Dies führt zu einer Verstärkung des Signals und zu einer weiteren Steigerung der Sensitivität. Begrenzt wird dieser Vorgang nur durch das so genannte Photobleichen, bei dem das Fluorochrom durch verschiedene Interaktionen im angeregten Zustand unwiederbringlich zerstört wird. Dieser Effekt nimmt zu, je länger und energiereicher das anregende Licht appliziert wird. Die Ausgabe erfolgt in der Regel als elektronisches Signal oder als fotografische Abbildung.

#### **2.2.4 Das Fluorochrom H<sub>2</sub>DCFDA**

Der Nachweis für die Bildung von ROS erfolgt mit Hilfe des Fluorochroms 2',7'-Dihydrodichlorfluorescein-Diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA).

Diese Methode wurde ursprünglich zum quantitativen Nachweis von Wasserstoffperoxid in wässrigen Lösungen benutzt (Cathcart, Schwiers et al. 1983). Heutzutage gilt sie außerdem als zuverlässige Methode, um ROS mit hoher Sensitivität und Spezifität nachzuweisen (LeBel, Ischiropoulos et al. 1992; Shen, Shi et al. 1996).

Das nicht fluoreszierende H<sub>2</sub>DCFDA diffundiert in die Zelle, wo die Acetatgruppen von intrazellulären Esterasen abgespalten werden. Hierdurch verliert das Molekül seine Zellpermeabilität. In Gegenwart von ROS oxidiert 2',7'-Dihydrodichlorfluorescein (H<sub>2</sub>DCF) zu dem fluoreszierenden 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Aufbau von (a) H<sub>2</sub>DCFDA, (b) H<sub>2</sub>DCF und Bildung von (c) fluoreszierenden DCF durch ROS

Das Absorptionsspektrum für den reduzierten Farbstoff liegt bei 270 nm, das zweigipflige Emissionsspektrum bei 485 nm sowie 535 nm.

### 2.2.5 Vorbereitung der Zellen

Für die Experimente werden konfluente glatte Gefäßmuskelzellen aus der 6.-8. Passage verwendet, die zuvor gepoolt und danach auf die jeweiligen Versuchsansätze verteilt werden.

Vor der Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff werden die Zellen durch Inkubation in einem phenolrotfreien Medium mit einem geringeren Anteil an fetalem Kälberserum (0,1%) sowie 100U/ml Penicillin G und 100mg/ml Streptomycin über 48 Stunden ruhiggestellt.

Anschließend erfolgt eine fünfmalige Waschung mit vorgewärmtem Phosphat-Puffer (PBS). Danach werden die Zellen mit einem Schaber vorsichtig vom Boden der Kulturflasche abgelöst und bei 1000U/min über fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit dem restlichen Wachstumsmedium wird vorsichtig abpipettiert und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Nun wird die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop bestimmt und mit zusätzlichem PBS auf die erforderliche Zellkonzentration von 1.000.000 Zellen/ml verdünnt.

### 2.2.6 Beladung mit H<sub>2</sub>DCFDA

Unmittelbar vor Beginn der Experimente wird ein Teil des bei -20°C tiefgefrorenen H<sub>2</sub>DCFDA aufgetaut und mit Hilfe von Dimethylsulfoxid (DMSO) eine konzentrierte Stammlösung hergestellt. Die weitere Verdünnung bis zur Arbeitskonzentration erfolgt später mit aminfreien PBS, um eine extrazelluläre Hydrolyse des H<sub>2</sub>DCFDA zu minimieren.

Die vorbereiteten Zellen werden bei 37°C im Brutschrank mit 5µg/ml H<sub>2</sub>DCFDA für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wird der Puffer mit dem Fluoreszenzfarbstoff wieder entfernt und die Zellen erneut in dem oben beschriebenen phenolrotfreien Kulturmedium resuspendiert. Es folgt eine Wartezeit von einer Stunde, in der sich die Zellen erholen können und gleichzeitig genug

Zeit für die zellulären Esterasen besteht, das H<sub>2</sub>DCFDA in H<sub>2</sub>DCF zu spalten. Anschließend sind die Zellen zur Stimulation bereit.

### 2.2.7 Stimulation

Die Stimulation der H<sub>2</sub>DCFDA beladenen Zellen durch die Testsubstanzen wird nach einem festen Schema durchgeführt. Zunächst werden die Stoffe mit PBS-Puffer auf ihre erforderlichen Konzentrationen verdünnt. Anschließend erfolgt die Inkubation der vorbereiteten Zellen bei 37°C mit dem jeweiligen Stoff. Als Negativkontrolle dient der Radikalfänger Tiron (100 mM).

Für die Zeitreihen wird die Stimulation mit einer festen Stoffkonzentration über eine Zeitspanne von 240 Minuten gemessen. Neben dem Startwert (0 Minuten) betragen die gewählten Zeiträume 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120 und 240 Minuten. Die verwendeten Stoffe sind Interleukin-1-β (10mg/ml), Cyclosporin A (10μg/ml), Sphingosin-1-Phosphat (10μg/ml), SEW-2871 (1μg/ml) und FTY720-P (10μg/ml).

Bei den Dosis-Wirkungskurven werden verschiedene Konzentrationen der oben genannten Stoffe zur Stimulation über 60 Minuten benutzt. Die verwendeten Dosierungen reichen dabei von 1ng/ml bis 1mg/ml.

Nachdem die optimalen Stimulationszeiten und Konzentrationen bestimmt worden sind, wird mit den Inhibitionsversuchen begonnen. Dazu werden die Inhibitoren S1P, SEW-2871 und FTY720-P in den Konzentrationen von 1ng/ml bis 100μg/ml jeweils 30 Minuten vor der Stimulation mit Cyclosporin A (10μg/ml) zugegeben und während der gesamten Stimulation im Medium belassen.

Um die Rezeptorabhängigkeit der Lysophospholipidwirkung zu untersuchen, werden Versuche mit spezifischen S1P-Rezeptorinhibitoren durchgeführt, die 15 Minuten vor der Zugabe der jeweiligen Lysophospholipide dem Medium hinzugefügt werden. Dabei handelt es sich um den S1P<sub>1/3</sub> Rezeptorinhibitor VPC-23019 (10μmol/l), den S1P<sub>2</sub> Rezeptorinhibitor JTE-013 (10μmol/l) und den S1P<sub>3</sub> Rezeptorinhibitor CAY-10444 (1μmol/l). Als Negativ-Kontrolle wird auch hier der Radikalfänger Tiron (100mM) mitgeführt.

### 2.2.8 Messung am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader (FLIPR)

Gemessen wird am FLIPR Mithras LB940 der Firma Berthold. Verwendet werden ausschließlich schwarze Microfluor-Platten mit 96 Vertiefungen. Die Temperatur beträgt während der gesamten Messung 37°C. Die benutzten Filter für die Wellenlängen betragen 485nm mit einem Bandfilter von 20nm für die Exzitation und 535nm mit einem Bandfilter von 15nm für die Emission.

Für das Experiment wird eine NADPH-Stammlösung (10 mmol/l) aufgetaut und auf Eis gelagert. Kurz vor der geplanten Messung wird mit dieser Lösung der Injektor des FLIPRs geladen. Gestartet wird die Reaktion durch die einmalige Zugabe von 5  $\mu$ l der NADPH-Lösung über den Injektor in 195  $\mu$ l Zellsuspension, was einer Endkonzentration von 250  $\mu$ mol/l entspricht. Hierbei wird das entstandene DCF angeregt und anschließend die Emission über 800ms ermittelt. Im gewählten Modus werden alle Zellen der Reihe nach über die Zeit des Experiments gemessen. Zur Kontrolle der NADPH unabhängigen DCF-Fluoreszenz werden bei jedem Durchgang Werte von Zellen ohne Zusatz von NADPH mitgemessen.

### **2.2.9 Statistische Auswertung**

Die Resultate sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes angeführt. Die Reaktionen werden in Prozenten bezogen auf den Basalwert erfasst. Die über Mikrowin 2000 gespeicherten Daten werden unter Zuhilfenahme des Analyseprogramms Prism 5.0 statistisch ausgewertet, wobei ein Wert von  $P < 0.05$  als statistisch signifikant gilt. Die erhobenen Resultate beschreiben Gruppen von unverbundenen Stichproben mit potenziell unterschiedlicher Standardabweichung. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wird aus diesem Grund der verteilungsunabhängige U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney angewendet.

### **3. Ergebnisse**

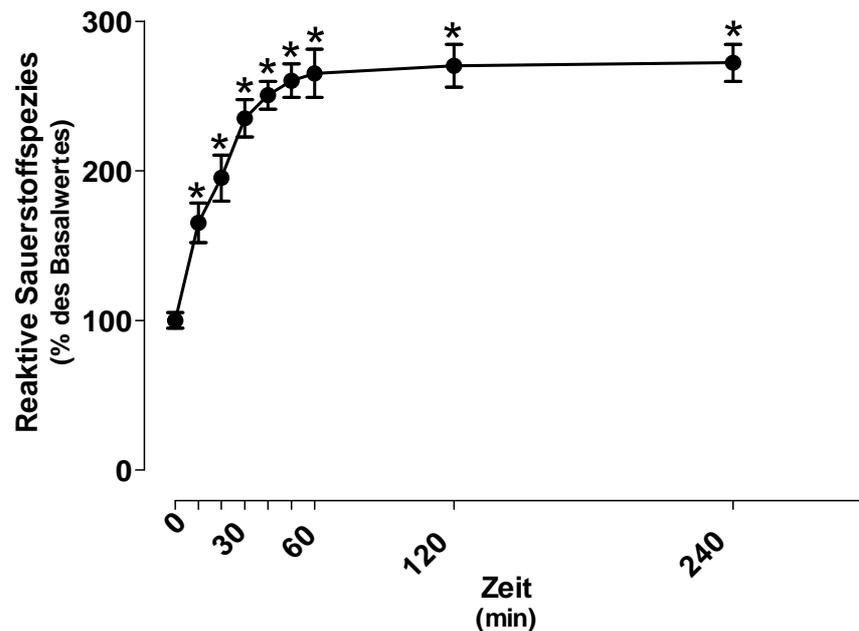
Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt. Es erfolgt zunächst die Beschreibung der verschiedenen Zeit- und Dosisreihen. Anschließend wird in der Auswertung der Kernfrage nachgegangen, ob Lysophospholipide wie Sphingosin-1-Phosphat, SEW-2871 und neuere lysophospholipidbasierte Immunmodulatoren wie FTY720-P Einfluss auf die Cyclosporin A abhängige Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten haben. Die Ergebnisse am Ende dienen dem Versuch, durch Kombination von spezifischen Antagonisten der verschiedenen S1P-Rezeptoren, Rückschlüsse auf die beteiligten Rezeptorsubtypen zu ziehen.

#### **3.1 Zeitabhängige Auswirkung von Interleukin-1- $\beta$ , Cyclosporin A, Sphingosin-1-**

##### **Phosphat, SEW-2871 und FTY720-P auf die Produktion von ROS durch VSMCs**

Um die optimale Stimulationszeit für die genannten Stoffe zu ermitteln, sind zunächst Zeitreihen mit einer festen Konzentration erstellt worden. Ausgangswert für die Messungen ist bei allen Versuchsreihen der zu Beginn ermittelte Basiswert. Zur besseren Darstellung wird von allen Werten die entsprechende Hintergrundstrahlung abgezogen. Insgesamt sind alle Experimente mindestens sechs Mal wiederholt worden, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Die erfolgreich durchgeführten Negativkontrollen mit dem Radikalfänger Tiron (100 mM) sind hier der Übersichtlichkeit halber nicht abgebildet.

### 3.1.1 Zeitreihe mit Interleukin-1 $\beta$

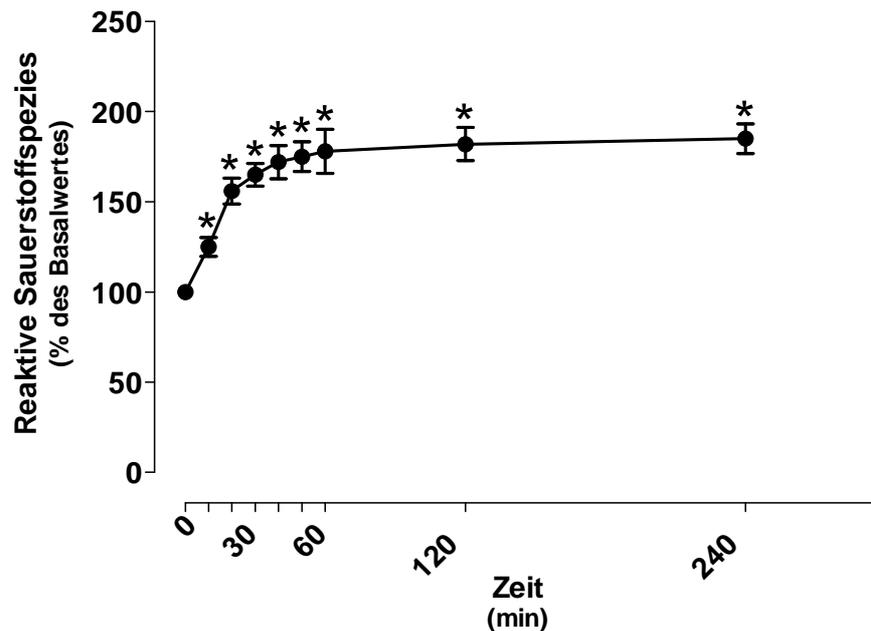


**Abbildung 4:** Darstellung einer zeitabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H<sub>2</sub>DCFDA nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  (10ng/ml) – Gemessen wurde die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies über 240 Minuten am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle;  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

Als Positivkontrolle für den Assay ist Interleukin-1 $\beta$  verwendet worden, welches für eine starke Stimulation von VSMCs zur Bildung von ROS bekannt ist (Abbildung 4). Hierbei zeigt sich bei einer Konzentration von 10ng/ml bereits nach zehn Minuten eine signifikante Steigerung der ROS-Produktion auf über 60% des Ausgangswertes. Nach 20 Minuten hat sich der Wert fast verdoppelt. Über die Zeit nimmt die Steigung langsam ab, sodass bei den letzten drei Werten ein Plateau erreicht wird, das ungefähr dem 2,7fachen des Ausgangswertes entspricht. Die entstandene Sättigungskurve lässt vermuten, dass die maximal mögliche ROS-Produktion erreicht worden ist.

Da die Steigerung der Fluoreszenz nach 60 Minuten nur noch gering ist, die Gefahr der Zellschädigung jedoch mit jeder Verlängerung des Experiments zunimmt, erscheint diese Zeit für die später folgenden Messungen mit IL-1 $\beta$  ideal zu sein (Interleukin-1 $\beta$ :  $[EC_{50}] = -8,3 \pm 0,1$  max. ROS-Produktion =  $272 \pm 8,1\%$ ,  $n \geq 6$ ).

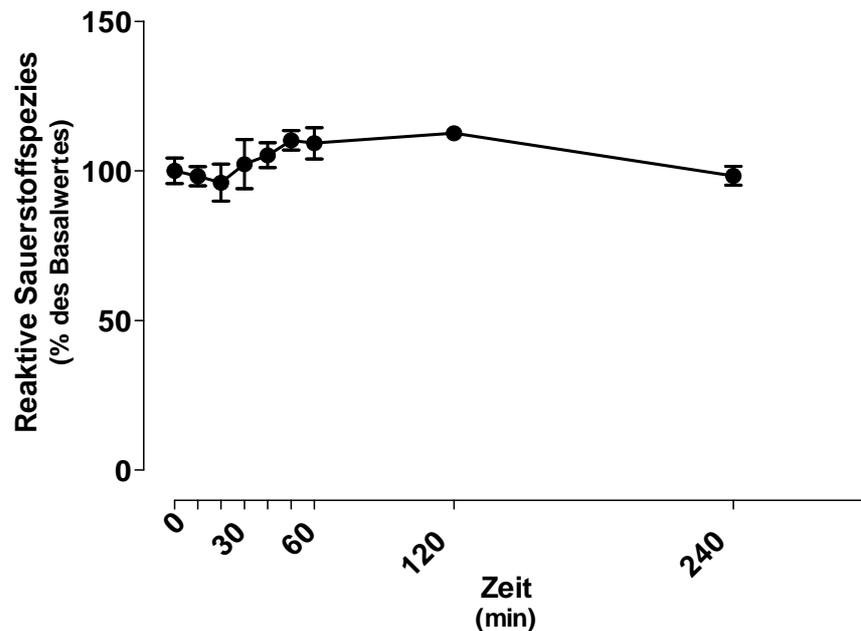
### 3.1.2 Zeitreihe mit Cyclosporin A



**Abbildung 5:** Darstellung einer zeitabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors  $H_2DCFDA$  nach Stimulation mit Cyclosporin A ( $10\mu g/ml$ ) – Gemessen wurde die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies über 240 Minuten am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle;  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

Nachdem der Test mit IL-1 $\beta$  erfolgreich verlaufen ist, gilt es, die Auswirkungen von Cyclosporin A auf die ROS-Produktion von VSMCs zu untersuchen. Hier ist ebenfalls eine Zeitreihe von 0 bis 240 Minuten mit den DCF-beladenen Zellen erstellt worden (Abbildung 5). Die gewählte Cyclosporin A Konzentration beträgt  $10\mu g/ml$ . Als Ausgangswert dient erneut der ermittelte Basiswert zum Beginn der Messung. Nach zehn Minuten ist bereits eine signifikante Steigerung der Fluoreszenz um 25% zu verzeichnen. Diese setzt sich fort, sodass nach 60 Minuten 175% des Basalwertes gemessen wird. Wie schon bei IL-1 $\beta$  beobachtet, kommt es im weiteren Verlauf zu einer Abflachung der Kurve. Dies ist entweder auf die begrenzte Enzymkapazität der Zellen oder auf den Effekt der Fotobleichung zurückzuführen. Der Endwert nach 240 Minuten beträgt 182% des Ausgangswertes. Da die Steigerung nach 60 Minuten nur noch gering ausfällt, werden die folgenden Experimente mit Cyclosporin A auf diesen Zeitraum beschränkt (Cyclosporin A:  $[EC_{50}] = -5,2 \pm 0,1$  max. ROS-Produktion =  $182 \pm 5,0\%$ ,  $n \geq 6$ ).

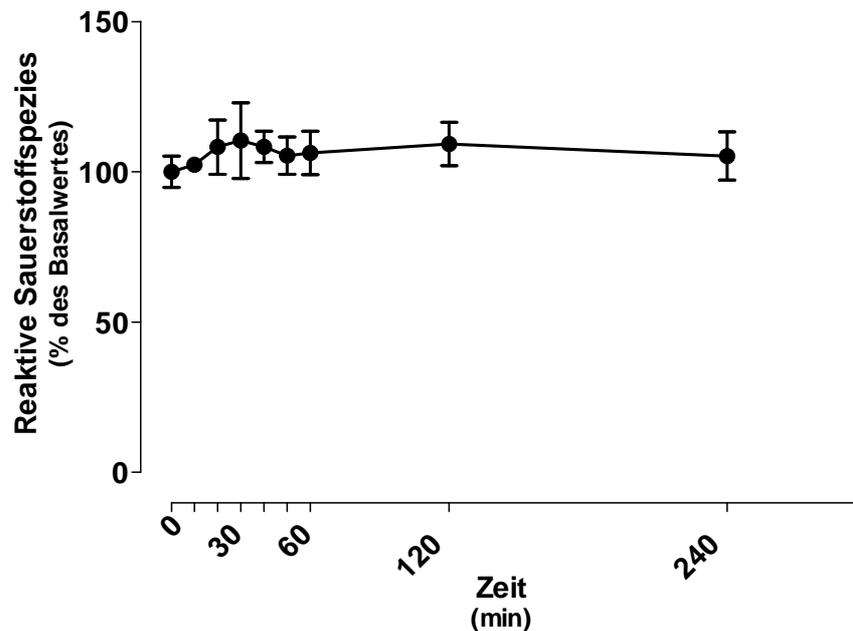
### 3.1.3 Zeitreihe mit Sphingosin-1-Phosphat



**Abbildung 6:** Darstellung einer zeitabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors  $H_2DCFDA$  nach Stimulation mit Sphingosin-1-Phosphat ( $10\mu g/ml$ ) – Gemessen wurde die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies über 240 Minuten am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes.  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

Nachdem der Beweis gelungen ist, dass Cyclosporin A eine Produktion von radikalen Sauerstoffspezies in VSMCs auslösen kann, gilt es nun, das Lysophospholipid Sphingosin-1-Phosphat in einer Zeitreihe auf diese Eigenschaft hin zu untersuchen. Dafür sind mit DFC beladene glatte Gefäßmuskelzellen mit  $10\mu g/ml$  Sphingosin-1-Phosphat stimuliert und anschließend die Fluoreszenz in den oben beschriebenen Zeitabständen gemessen worden (Abbildung 6). Über den gesamten Zeitraum kommt es hier zu keiner signifikanten Steigerung der ROS-Produktion über den Ausgangswert hinaus. Interessanterweise erfolgt aber auch keine entscheidende Abnahme der Fluoreszenzmenge.

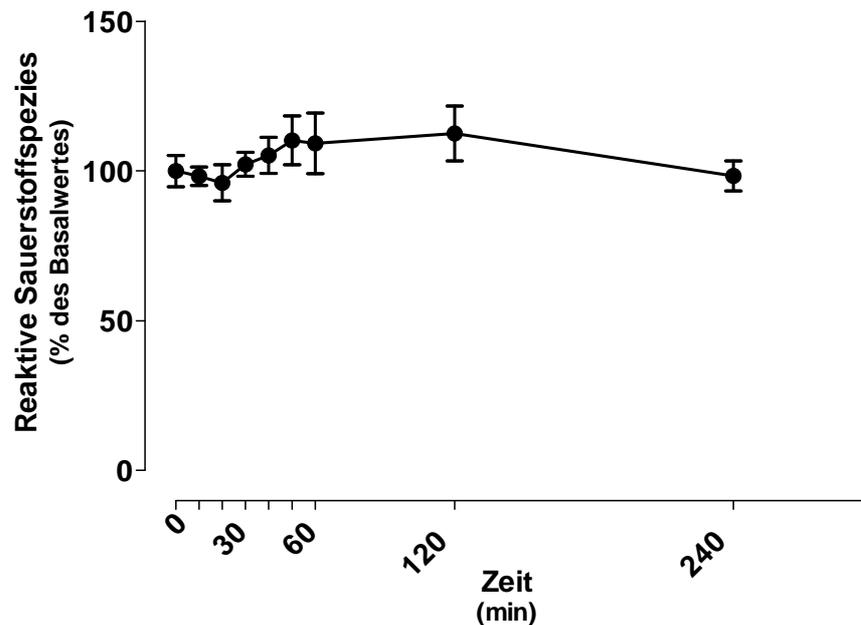
### 3.1.4 Zeitreihe mit SEW-2871



**Abbildung 7:** Darstellung einer zeitabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors  $H_2DCFDA$  nach Stimulation mit SEW-2871 ( $1\mu g/ml$ ) – Gemessen wurde die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies über 240 Minuten am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes.  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

Es ist weiter untersucht worden, welchen Einfluss der selektive  $S1P_1$ -Rezeptoragonist SEW-2871 auf die ROS-Produktion von VSMCs hat (Abbildung 7). Hierzu sind erneut glatte Gefäßmuskelzellen mit  $H_2DCFDA$  beladen und anschließend mit  $1\mu g/ml$  SEW-2871 über 240 Minuten stimuliert worden. Ähnlich wie bei  $S1P$  ergibt sich im Vergleich mit dem Basalwert keine signifikante Veränderung der durch die VSMCs gebildeten ROS-Menge.

### 3.1.5 Zeitreihe mit FTY720-P



**Abbildung 8:** Darstellung einer zeitabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors  $H_2DCFDA$  nach Stimulation mit FTY720-P ( $10\mu g/ml$ ) – Gemessen wurde die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies über 240 Minuten am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes.  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

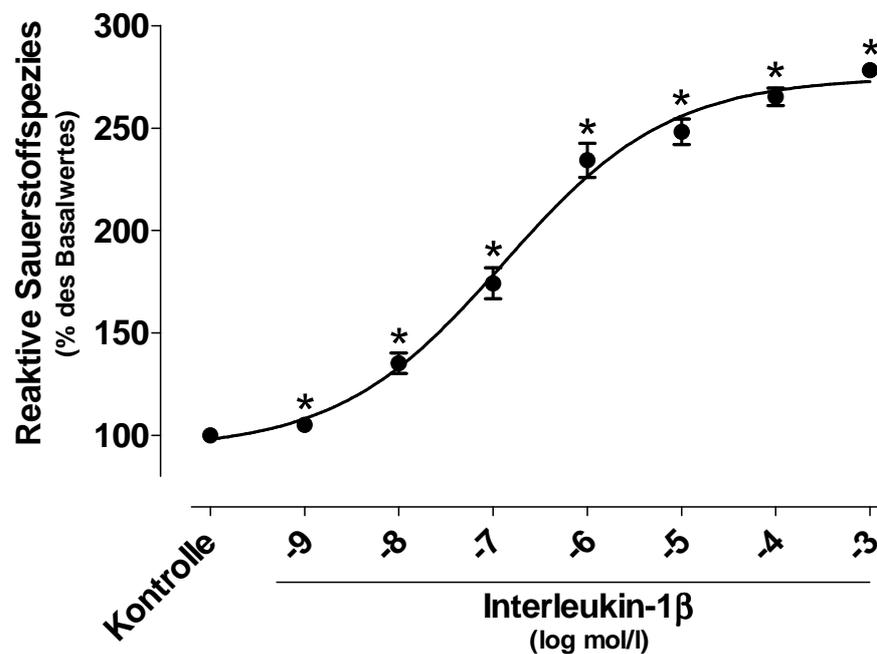
Nachdem S1P und SEW-2871 keinen Einfluss auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies gezeigt haben, ist das gleiche Experiment mit dem phosphorilierten S1P-Analogen und Immunsuppressivum FTY720 durchgeführt worden (Abbildung 8). Die verwendete Konzentration von FTY720-P beträgt  $10\mu g/ml$ . Ähnlich wie bei S1P ist es hierdurch zu keiner signifikanten Veränderung der Fluoreszenzmenge gekommen. Die gemessenen Werte liegen größtenteils auf dem Niveau des Ausgangswertes. Folglich hat FTY720-P alleine weder positiven noch negativen Einfluss auf die ROS-Bildung in VSMCs.

### **3.2 Dosisabhängige Auswirkung von Interleukin-1- $\beta$ , Cyclosporin A, Sphingosin-1-**

#### **Phosphat, SEW-2871 und FTY720-P auf die Produktion von ROS durch VSMCs**

Nachdem im ersten Durchlauf feste Konzentrationen von Interleukin-1- $\beta$ , Cyclosporin A, Sphingosin-1-Phosphat, SEW-2871 und FTY720-P in den Zeitreihen verwendet worden sind, sind im Folgenden Versuchsreihen mit unterschiedlichen Stoffkonzentrationen durchgeführt worden. Ziel ist es, den jeweiligen dosisabhängigen Einfluss auf die Bildung von ROS durch VSMCs zu untersuchen. Die verwendeten Dosierungen reichen dabei in Zehnerpotenzen von 1ng/ml bis 1mg/ml. Es sind erneut VSMCs mit H<sub>2</sub>DCFDA beladen und die Menge an produzierten reaktiven Sauerstoffspezies durch die einzelnen Stoffe mit Hilfe eines FLIPRs detektiert worden. Die Messdaten sind anschließend im jeweiligen Verhältnis zum unstimulierten Basiswert dargestellt. Bei den folgenden Experimenten ist jeweils nach 60 Minuten gemessen worden, da sich dieser Wert in den bisher beschriebenen Zeitreihen als optimal für die Detektion von ROS herausgestellt hat. Alle folgenden Experimente sind in der entsprechenden Versuchsanordnung mindestens sechs Mal durchgeführt worden, um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Die durchgeführten Negativkontrollen mit dem Radikalfänger Tiron (100mM) sind hier der Übersichtlichkeit halber nicht abgebildet.

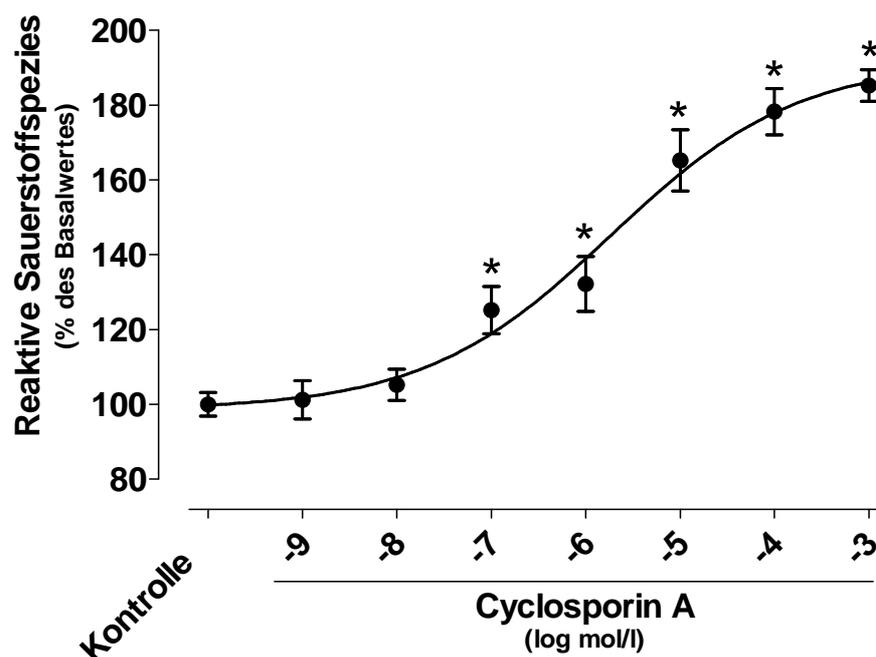
### 3.2.1 Konzentrationsreihe mit Interleukin-1 $\beta$



**Abbildung 9:** Darstellung einer dosisabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors H<sub>2</sub>DCFDA nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  – Gemessen wurde jeweils die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies nach 60 Minuten Stimulation durch Stoffkonzentrationen von 1ng/ml bis 1mg/ml am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle; P < 0,05; n  $\geq$  6.

Die erste Messreihe ist erneut mit Interleukin-1 $\beta$  als Positivkontrolle für die Bildung von ROS durchgeführt worden. Es galt einzuschätzen, ob die zuvor gewählte Konzentration von 10ng/ml in der Zeitreihe ausreichend ist (Abbildung 9). Bereits bei einer Dosis von 1ng/ml kommt es im Vergleich mit der Ausgangsdosis zu einer signifikanten Steigerung der ROS-Produktion. Die weiteren Werte steigen konzentrationsabhängig von 135% des Basalwertes bei 10ng/ml über 234% bei 1 $\mu$ g/ml bis hin zum Maximalwert von 278% bei einer Konzentration von 1mg/ml (IL-1 $\beta$ : [EC<sub>50</sub>] = -6,9  $\pm$  0,1 max. ROS-Produktion = 275  $\pm$  5,2%, n  $\geq$  6).

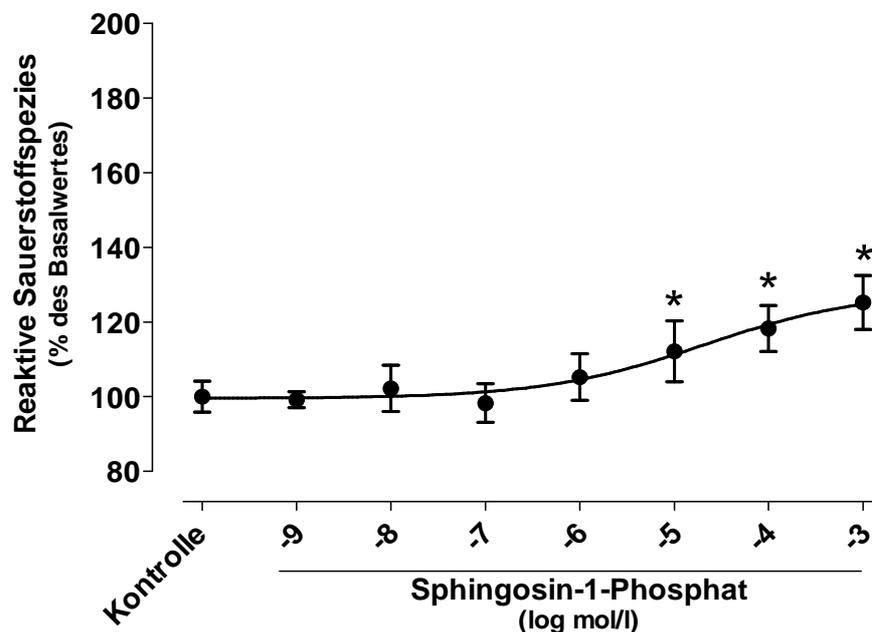
### 3.2.2 Konzentrationsreihe mit Cyclosporin A



**Abbildung 10:** Darstellung einer dosisabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors  $H_2DCFDA$  nach Stimulation mit Cyclosporin A – Gemessen wurde jeweils die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies nach 60 Minuten Stimulation durch Stoffkonzentrationen von 1ng/ml bis 1mg/ml am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle;  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

Zur Ermittlung einer optimalen Cyclosporin A Dosierung für die Stimulation einer Bildung von ROS durch VSMCs ist eine Konzentrationsreihe nach bereits genanntem Schema (s. 3.2) durchgeführt worden (Abbildung 10). Durch DCF und einen FLIPR ist die jeweilige fluorometrische Intensität nach 60 Minuten aufgezeichnet worden. Bei den niedrigen Konzentrationen ist zunächst keine signifikante Steigerung der Fluoreszenz und somit der Menge an ROS registrierbar. Erst ab einer Konzentration von 100ng/ml kommt es zu einer bedeutsamen Zunahme auf 125% des Basalwertes. Diese setzt sich fort über 165% bei einer Dosis von 10 $\mu$ g/ml bis hin zu einem Maximalwert von 185% bei 1mg/ml (CyA:  $[EC_{50}] = -5,7 \pm 0,1$  max. ROS-Produktion =  $192 \pm 10,1\%$ ,  $n \geq 6$ ).

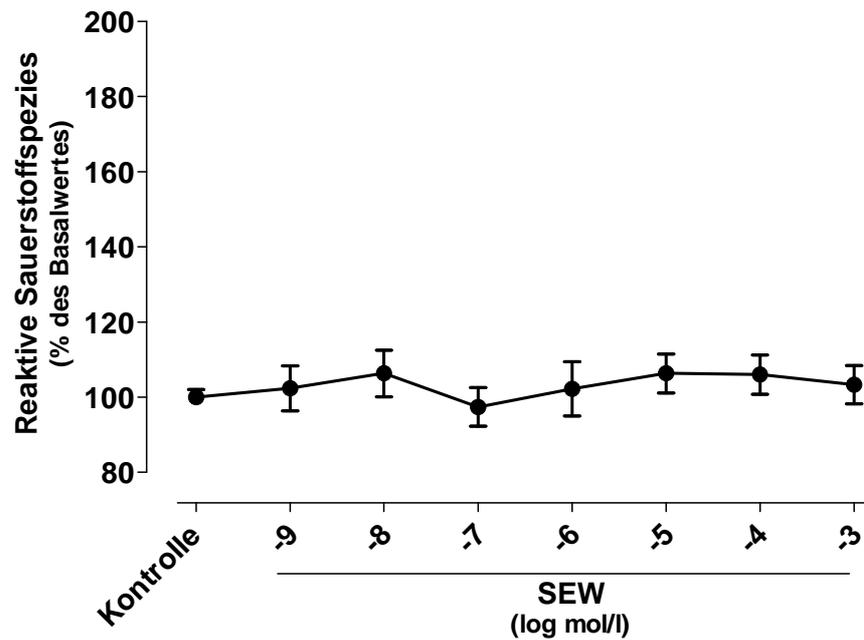
### 3.2.3 Konzentrationsreihe mit Sphingosin-1-Phosphat



**Abbildung 11:** Darstellung einer dosisabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors  $H_2DCFDA$  nach Stimulation mit Sphingosin-1-Phosphat – Gemessen wurde jeweils die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies nach 60 Minuten Stimulation durch Stoffkonzentrationen von 1ng/ml bis 1mg/ml am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes. \* = signifikanter Unterschied zur Kontrolle;  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

In der oben beschriebenen Zeitreihe von Sphingosin-1-Phosphat in einer Konzentration von 10 $\mu$ g/ml hat sich keine signifikante ROS-Produktion durch VSMCs gezeigt (s. 3.1.3). In der jetzt durchgeführten Konzentrationsreihe mit Dosierungen von 1ng/ml bis 1mg/ml ist die Fluoreszenz mit einem FLIPR nach 60 Minuten gemessen worden (Abbildung 11). Dabei kommt es in den geringeren und mittleren Konzentrationsstärken zu keinem auffälligen Anstieg der ROS-Produktion. Überraschenderweise findet sich ab einer Dosis von 10 $\mu$ g/ml zwar nur ein leichter, aber doch signifikanter Anstieg der Fluoreszenzmenge auf 112% des Ausgangswertes. Dieser setzt sich fort über 118% bei einer Konzentration von 100 $\mu$ g/ml bis zu 125% bei der Maximaldosis von 1mg/ml. Dieser Effekt ist wahrscheinlich einem zelltoxischen Effekt des S1P in diesen unphysiologisch hohen Dosen zuzuschreiben (S1P:  $[EC_{50}] = -4,6 \pm 0,1$  max. ROS-Produktion =  $128 \pm 16,2\%$ ,  $n \geq 6$ ).

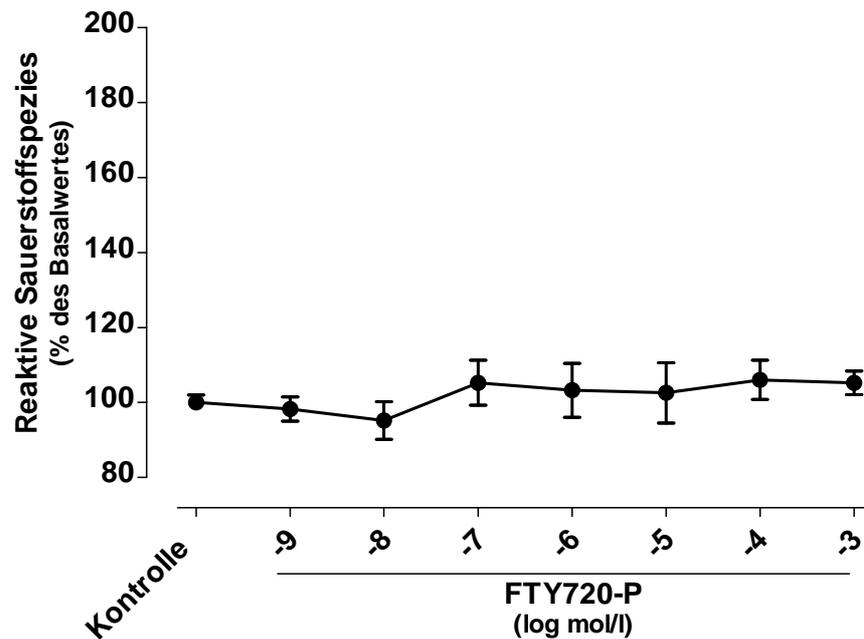
### 3.2.4 Konzentrationsreihe mit SEW-2871



**Abbildung 12:** Darstellung einer dosisabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors  $H_2DCFDA$  nach Stimulation mit SEW-2871 ( $1\mu g/ml$ ) – Gemessen wurde jeweils die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies nach 60 Minuten Stimulation durch Stoffkonzentrationen von  $1ng/ml$  bis  $1mg/ml$  am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes.  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

Abbildung 12 stellt die Konzentrationsreihe mit SEW-2871 dar. Hier zeigt der  $S1P_1$ -Agonist SEW-2871 im Vergleich zur Zeitreihe (s. 3.1.4) keine signifikanten Veränderungen der ROS-Produktion gegenüber dem Ausgangswert.

### 3.2.5 Konzentrationsreihe mit FTY720-P



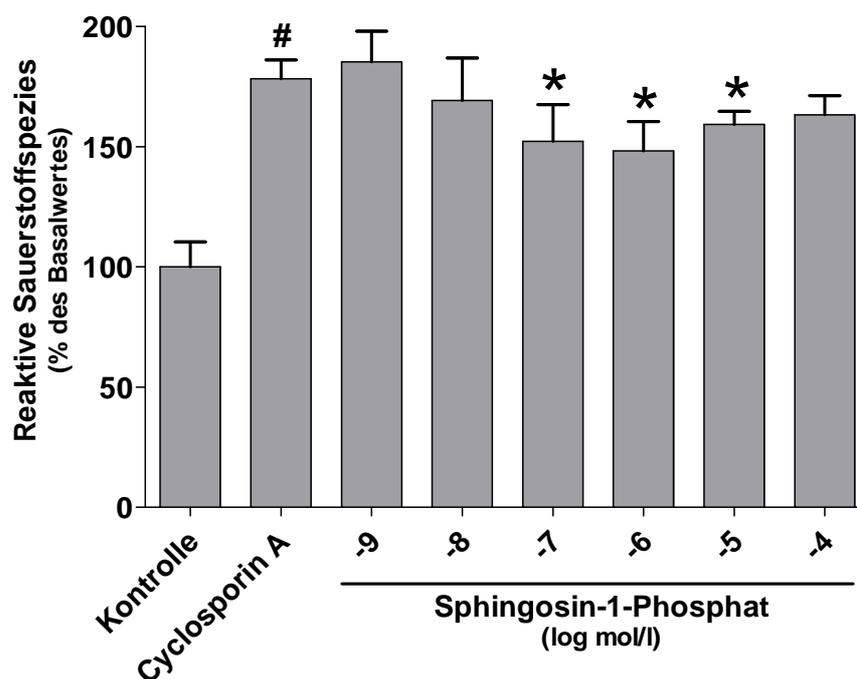
**Abbildung 13:** Darstellung einer dosisabhängigen ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit Hilfe des Fluorophors  $H_2DCFDA$  nach Stimulation mit FTY720-P – Gemessen wurde jeweils die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies nach 60 Minuten Stimulation durch Stoffkonzentrationen von 1ng/ml bis 1mg/ml am Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes.  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

Nachdem FTY720-P in der Konzentration von 10 $\mu$ g/ml in der Zeitreihe (s. 3.1.5) keinen Einfluss auf die Menge an produzierten reaktiven Sauerstoffspezies gezeigt hat, ist nun ein möglicher dosisabhängiger Effekt untersucht worden (Abbildung 13). Das Ergebnis zeigt, dass auch höhere oder niedrigere Dosen keine signifikanten Auswirkungen haben. Der bei dem S1P beobachtete Effekt einer deutlichen Stimulation in höheren Dosen bleibt beim FTY720-P aus.

### **3.3 Dosisabhängiger Einfluss von Sphingosin-1-Phosphat, FTY720-P und SEW-2871 auf Cyclosporin A stimulierte VSMCs**

Die bisher durchgeführten Experimente haben deutlich gezeigt, dass Cyclosporin A sowohl zeit- als auch dosisabhängig eine ROS-Produktion in VSMCs stimuliert. Dieser Effekt ist dagegen für das Sphingosin-1-Phosphat nur in hohen Dosen und für SEW-2871 und FTY720-P gar nicht beobachtet worden. Nun ist der zentralen Frage nachgegangen worden, ob diese Stoffe einen positiven oder negativen Einfluss auf die Cyclosporin A induzierte und gleichzeitig zellwandschädigende ROS-Bildung besitzen. Hierfür sind jeweils glatte Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten mit H<sub>2</sub>DCFDA beladen und die Inhibitoren S1P, FTY720-P und SEW in Konzentrationen von 1ng/ml bis 100µg/ml vorgelegt worden. Nach 30 Minuten ist die Stimulation durch Cyclosporin A (10µg/ml) erfolgt. Der Einfluss auf die ROS-Produktion ist fluoreszenztechnisch mit einem FLIPR registriert worden. Um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sind alle folgenden Experimente mindestens sechs Mal wiederholt worden. Die ebenfalls durchgeführten Negativkontrollen mit dem Radikalfänger Tiron (100 mM) sind hier der Übersichtlichkeit halber nicht abgebildet.

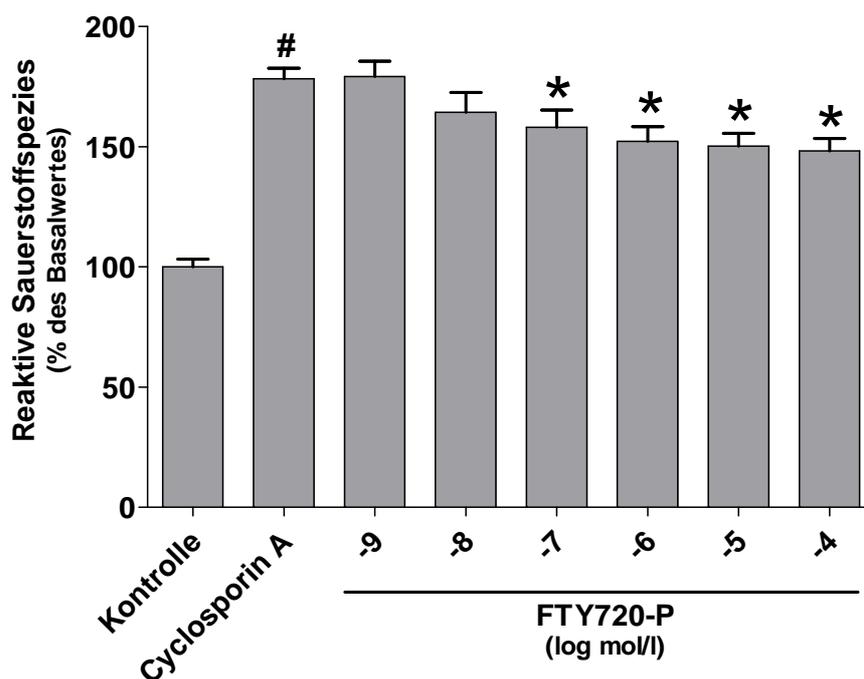
### 3.3.1 Dosisabhängige Reaktion von Sphingosin-1-Phosphat mit Cyclosporin A



**Abbildung 14:** Darstellung einer dosisabhängigen Hemmung der Cyclosporin A (10µg/ml) induzierten ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten durch Kombination dem Lysophospholipid S1P – Dargestellt sind jeweils ausgehend vom Kontrollwert die prozentuale Menge an reaktiven Sauerstoffspezies nach 60 Minuten Stimulation durch S1P-Konzentrationen von 1ng/ml bis 100µg/ml im Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert ± dem Standardfehler des Mittelwertes. # = signifikante ROS-Produktion; \* = signifikante Hemmung im Vergleich zur reinen CyA-Stimulation; P < 0,05; n ≥ 6.

Das Ergebnis aus der Kombination des Immunsuppressivums Cyclosporin A (10µg/ml) und verschiedenen Dosierungen des Lysophospholipids S1P ergibt eine signifikante Reduktion der fluoreszenztechnisch bestimmten ROS-Menge bei den Konzentrationen von 100ng/ml, 1µg/ml und 10µg/ml (Abbildung 14). Cyclosporin A hat alleine die ROS-Produktion auf 178% des Ausgangswertes gesteigert. Die anschließend stärkste Hemmung erfolgt durch 1µg/ml S1P, das die ROS-Menge um 30% auf 148% des Basalwertes reduziert. Interessanterweise steigt die Fluoreszenz bei höheren S1P-Konzentrationen wieder an, bis bei der S1P-Dosis von 100µg/ml kein hemmender Effekt mehr registrierbar ist. Dies erklärt sich durch die Beobachtung aus den Konzentrationsreihen, in denen es bei hohen Konzentrationen zu einer eigenständigen Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch S1P kommt. Vermutlich wird hierdurch der hemmende Einfluss überlagert.

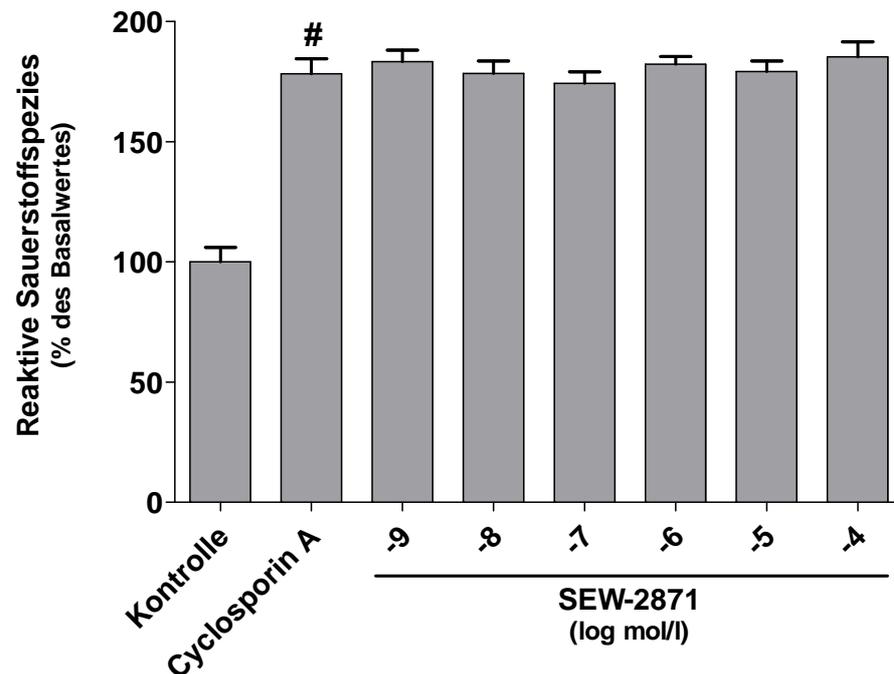
### 3.3.2 Dosisabhängige Reaktion von FTY720-P mit Cyclosporin A



**Abbildung 15:** Darstellung einer dosisabhängigen Hemmung der Cyclosporin A (10 $\mu$ g/ml) induzierten ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten durch Kombination mit dem S1P-Analogen FTY720-P – Dargestellt sind jeweils ausgehend vom Kontrollwert die prozentuale Menge an reaktiven Sauerstoffspezies nach 60 Minuten Stimulation durch FTY720-P Konzentrationen von 1ng/ml bis 100 $\mu$ g/ml im Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes. # = signifikante ROS-Produktion; \* = signifikante Hemmung im Vergleich zur reinen CyA-Stimulation; P < 0,05; n  $\geq$  6.

In dieser Versuchsreihe soll die Frage geklärt werden, welchen Einfluss FTY720-P auf die Bildung von ROS durch Cyclosporin A in VSMCs hat (Abbildung 15). Hierzu ist FTY720-P in steigenden Konzentrationen von 1ng/ml bis 100 $\mu$ g/ml vorgelegt worden. Nach 30 Minuten ist eine Stimulation mit Cyclosporin A (10 $\mu$ g/ml) erfolgt. Das fluoreszenztechnisch ermittelte Ergebnis zeigt eine Cyclosporin A induzierte Steigerung von 178% gegenüber dem Basiswert. In niedrigen Konzentrationen hat FTY720-P keinen nennenswerten Einfluss auf die Menge an produzierten ROS. Erst ab einer Dosis von 100ng/ml kommt es im Vergleich zur Stimulation mit reinem Cyclosporin A zu einer signifikanten Hemmung der ROS-Menge um 20%. Diese Entwicklung setzt sich bei höheren FTY720-P Konzentrationen fort. Die stärkste Hemmung erfolgt bei 100 $\mu$ g/ml FTY720-P mit einer 30%-igen Reduktion der Cyclosporin A induzierten ROS-Produktion.

### 3.3.3 Dosisabhängige Reaktion von SEW-2871 mit Cyclosporin A



**Abbildung 16:** Darstellung einer dosisabhängigen Hemmung der Cyclosporin A (10µg/ml) induzierten ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten durch Kombination mit dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten SEW-2871 – Dargestellt sind jeweils ausgehend vom Kontrollwert die prozentuale Menge an reaktiven Sauerstoffspezies nach 60 Minuten Stimulation durch SEW-2871 Konzentrationen von 1ng/ml bis 100µg/ml im Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert ± dem Standardfehler des Mittelwertes. # = signifikante ROS-Produktion, P < 0,05; n ≥ 6.

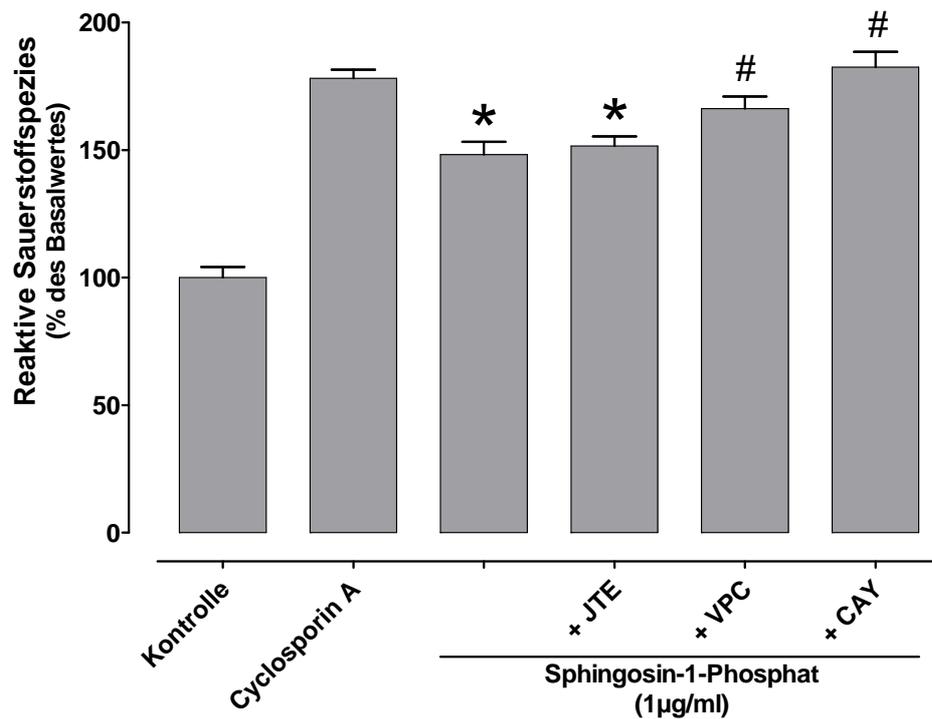
Nachdem sowohl S1P als auch FTY720-P in verschiedenen Konzentrationen einen hemmenden Einfluss auf die durch Cyclosporin A gesteigerte Bildung von ROS gehabt haben, stellt sich die Frage, ob diese Wirkung auch mit einem reinen S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten zu erreichen ist. Hierfür sind H<sub>2</sub>DCFDA beladene VSMCs SEW-2871-Konzentrationen von 1ng/ml bis 100µg/ml ausgesetzt und anschließend mit Cyclosporin A (10µg/ml) stimuliert worden (Abbildung 16). SEW-2871 zeigt jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Cyclosporin A induzierte ROS-Produktion. Es lässt sich deshalb vermuten, dass der bei S1P und FTY720-P beobachtete Prozess wahrscheinlich nicht über den S1P<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelt wird.

### **3.4. Einfluss der S1P-Rezeptorantagonisten JTE-013, VPC-23019 und CAY-10444 auf die durch Interaktion von S1P, FTY720-P und SEW-2871 mit CyA entstehende ROS-Produktion in VSMCs**

In den beschriebenen Experimenten kann für S1P und FTY720-P ein hemmender Einfluss auf die CyA abhängige ROS-Bildung in VSMCs nachgewiesen werden. Der S1P<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist SEW-2871 hat dagegen keinen Einfluss auf dieses Geschehen. Um zu klären, welche S1P-Rezeptorsubtypen bei den beobachteten Effekten eine Rolle spielen, sind die Stoffe mit verschiedenen Antagonisten kombiniert worden. VPC-23019 blockiert die S1P<sub>1/3</sub>-Rezeptoren, JTE-013 dagegen selektiv den S1P<sub>2</sub>- und CAY-10444 den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor. Für die Messreihen ist stets der gleiche Versuchsaufbau gewählt worden: H<sub>2</sub>DCFDA beladene VSMCs sind mit VPC-23019, JTE-013 oder CYA-10444 für 15min bei 37°C vorinkubiert worden.

Nach Zugabe von S1P, FTY720-P oder SEW-2871 ist jeweils die Stimulation mit Cyclosporin A erfolgt. Um eine Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten, sind alle Experimente mindestens sechs Mal wiederholt worden. In den hier der Übersichtlichkeit halber grafisch nicht dargestellten Experimenten zeigen die gewählten Antagonisten weder alleine noch in Kombination mit Cyclosporin A einen signifikanten Einfluss auf die ROS-Produktion von VSMCs.

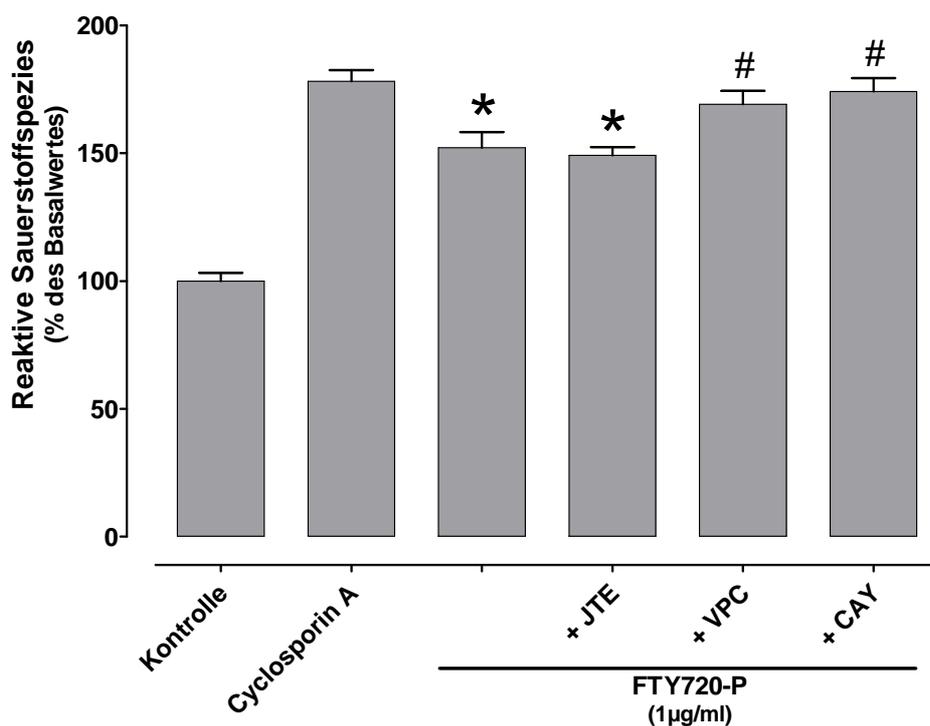
### 3.4.1 Reaktion von CyA und S1P mit JTE-013, VPC-23019 und CAY-10444



**Abbildung 17:** Darstellung einer Hemmung der Cyclosporin A (10 µg/ml) induzierten ROS-Produktion von glatten Gefäßmuskelzellen aus Rattenaorten durch Sphingosin-1-Phosphat (1 µg/ml) alleine und in Kombination mit spezifischen Antagonisten am  $S1P_2$ - (JTE-013 10 µmol/l),  $S1P_{1/3}$ - (VPC-23019 10 µmol/l) und  $S1P_3$ -Rezeptor (Cay-10444 1 µmol/l) - Dargestellt ist jeweils ausgehend vom Kontrollwert die prozentuale Menge an reaktiven Sauerstoffspezies nach 60 Minuten Stimulation im Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes. \* = signifikante Hemmung der CyA-induzierten ROS-Produktion; # = signifikanter Aufhebung der ROS-Hemmung durch S1P;  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

Wie oben dargestellt (s. 3.3.1), hat das S1P in mittleren Konzentrationen die Bildung von ROS durch Cyclosporin A in VSMCs gesenkt. Im folgenden Experiment sind verschiedene S1P-Rezeptorantagonisten hinzugefügt worden, um nähere Aufschlüsse über die beteiligten Rezeptorsubtypen zu bekommen (Abbildung 17). Hierbei zeigt sich, dass der  $S1P_{1/3}$ -Rezeptorantagonist VPC-23019 diesen Effekt teilweise wieder aufhebt, wohingegen JTE-013, ein  $S1P_2$ -Rezeptorantagonist, keinen signifikanten Einfluss auf das Geschehen hat. Ein spezifischer Antagonist am  $S1P_3$ -Rezeptor, das CAY-10444, schafft es sogar den hemmenden Einfluss von S1P auf die ROS-Bildung vollständig aufzuheben. Folglich ist von einem erheblichen Einfluss des  $S1P_3$ -Rezeptors bei der Wirkung von S1P auszugehen.

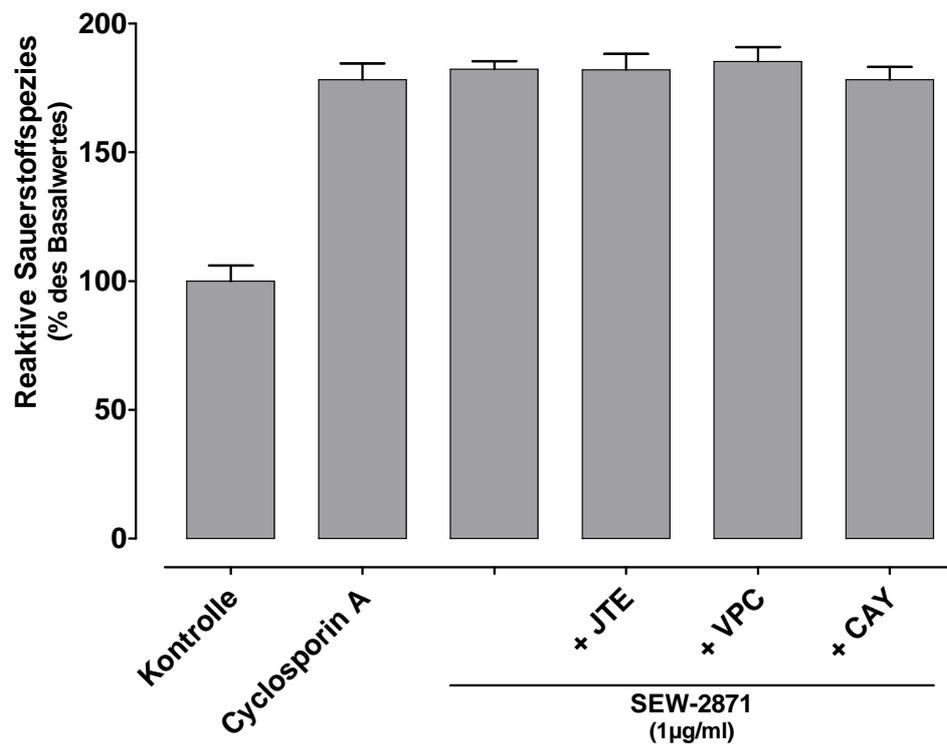
### 3.4.2 Reaktion von CyA und FTY720-P mit JTE-013, VPC-23019 und CAY-10444



**Abbildung 18:** Darstellung einer Hemmung der Cyclosporin A (10µg/ml) induzierten ROS-Produktion aus glatten Gefäßmuskelnzellen von Rattenaorten durch FTY720-P (1µg/ml) alleine und in Kombination mit spezifischen Antagonisten am  $S1P_2$ - (JTE-013 10µmol/l),  $S1P_{1/3}$ - (VPC-23019 10µmol/l) und  $S1P_3$ -Rezeptor (Cay-10444 1µmol/l) - Dargestellt ist jeweils ausgehend vom Kontrollwert die prozentuale Menge an reaktiven Sauerstoffspezies nach 60 Minuten Stimulation im Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes. \* = signifikante Hemmung der CyA-induzierten ROS-Produktion; # = signifikanter Aufhebung der ROS-Hemmung durch  $S1P$ ;  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

Nachdem CAY-10444 und VPC-23019 im vorangegangenen Experiment eine Hemmung der  $S1P$ -Wirkung zur Folge gehabt haben, ist nun untersucht worden, ob bei FTY720-P ein ähnliches Ergebnis erzielt wird (Abbildung 18). Tatsächlich hebt VPC-23019 auch die Wirkung von FTY720-P teilweise wieder auf. Die fluoreszenztechnisch bestimmte ROS-Menge steigt von 152% des Basalwertes um 17% auf 169% an. JTE-013 hat hier ebenfalls keinen nennenswerten Einfluss. CAY-10444 dagegen erreicht durch Blockade des  $S1P_3$ -Rezeptors einen erneuten Anstieg der ROS-Produktion auf 174% des Basalwertes und gleicht damit die hemmende Wirkung von FTY720-P fast vollständig wieder aus.

### 3.4.3 Reaktion von CyA und SEW-2871 mit JTE-013, VPC-23019 und CAY-10444



**Abbildung 19:** Darstellung einer Hemmung der Cyclosporin A (10 µg/ml) induzierten ROS-Produktion aus glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten durch SEW-2871 (1 µg/ml) alleine und in Kombination mit spezifischen Antagonisten am  $S1P_2$ - (JTE-013 10 µmol/l),  $S1P_{1/3}$ - (VPC-23019 10 µmol/l) und  $S1P_3$ -Rezeptor (Cay-10444 1 µmol/l) - Dargestellt ist jeweils ausgehend vom Kontrollwert die prozentuale Menge an reaktiven Sauerstoffspezies nach 60 Minuten Stimulation im Fluoreszenz-Image-Plate-Reader. Die Werte entsprechen dem Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler des Mittelwertes.  $P < 0,05$ ;  $n \geq 6$ .

Bisher hat der  $S1P_1$ -Rezeptoragonist SEW-2871 keinen entscheidenden Einfluss auf die ROS-Bildung in VSMCs gezeigt. Das hat sich auch nicht durch die Zugabe der Rezeptorantagonisten geändert (Abbildung 19). Dieses Ergebnis stützt die schon in den vorherigen Experimenten gewonnene Vermutung, dass der  $S1P_1$ -Rezeptor, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle in der Wirkung von S1P und FTY720-P auf die ROS-Produktion in VSMCs spielt.

#### 4. Diskussion

Die Nierentransplantation ist neben der Dialyse eine der Behandlungsmöglichkeiten bei terminaler Niereninsuffizienz oder dem Verlust beider Nieren. Sie bietet gegenüber der Dialyse den Vorteil, dass die betroffenen Patienten an Lebensqualität gewinnen und besser in ihrem sozialen Umfeld integriert bleiben. Die Organübertragung sollte möglichst schon vor einer Dialysetherapie stattfinden, da selbst eine gute Dialysetherapie nicht vor den häufigen Begleiterkrankungen schützen kann. 2009 fanden laut Eurotransplant in Deutschland etwa 2100 Nierentransplantationen statt, ca. 7600 Patienten standen auf der Warteliste.

Viele frühe Transplantationsversuche zu Beginn und Mitte des vergangenen Jahrhunderts – in der BRD wurde 1963 die erste Nierenübertragung durchgeführt - scheiterten an den nicht zu beherrschenden Abstoßungsreaktionen. Erst die Entdeckung der immunsuppressiven Wirkung des Stoffes Cyclosporin A verhalf der Transplantationsmedizin schließlich Anfang der 80er Jahre zum Durchbruch. Über die Inhibierung von Calcineurin, einem Enzym, welches eine Schlüsselrolle bei der Einleitung und Verstärkung der T-zellvermittelten Immunantwort spielt, war erstmals eine gezielte Hemmung von T-Lymphozyten möglich. Bis heute sind Calcineurininhibitoren in Kombination mit Proliferationshemmern fester Bestandteil vieler immunsuppressiver Therapieschemata.

Der Einsatz von Calcineurininhibitoren ist dennoch umstritten. Neben den direkten Folgen der Immunsuppression wie erhöhter Infektionsneigung, vermehrter Tumorinduktion und generellen toxischen Schäden, kommt es auch zu spezifischen Auswirkungen durch die einzelnen Medikamente. Cyclosporin A ist beispielsweise nephrotoxisch und kann zu erhöhtem Blutdruck führen (Budde, Giessing et al. 2006). Außerdem ist bekannt, dass Cyclosporin A nach längerer Anwendung zu einer endothelialen Dysfunktion führen kann (Weis, Wildhirt et al. 2000). Eine zentrale Rolle scheint dabei der erhöhte oxidative Stress zu spielen, der über eine Verminderung der endothelial produzierten NO-Bioverfügbarkeit zur Vasokonstriktion von renalen Arterien führt und darüber hinaus einen Zelluntergang durch Apoptose auszulösen vermag (Pohlman and Harlan 2000).

Diese Arbeit konnte außerdem zeigen, dass Cyclosporin A in VSMCs sowohl dosis- als auch konzentrationsabhängig eine starke Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bewirkt. Dies trifft auch auf eine Konzentration von Cyclosporin A von ca. 1 µg/ml zu, was in etwa dem therapeutischen Zielspiegel nach einer Nierentransplantation entspricht.

In den letzten Jahren sind überdies verschiedene Langzeitschäden durch Cyclosporin A bekannt geworden. Trotz optimal eingestellter immunsuppressiver Therapie kann beispielsweise durch

die beschriebene pathologische Endothelaktivierung eine arteriosklerotische Transplantatvaskulopathie entstehen, die langfristig eine Insuffizienz des Spenderorgans nach sich zieht (Kitamoto and Egashira 2004). Ausgelöst wird dieser Aktivierungsprozess durch verstärkte Immigration und Adhäsion von Immunzellen am Endothel, was eine chronische Entzündung zur Folge hat. Diese führt zu Störungen wichtiger endothelialer Eigenschaften wie Apoptose, Wachstum, Metabolismus, Endothelin-1-Freisetzung und Stickstoffoxid-Produktion und verstärkt zusätzlich den Entzündungsprozess (Blantz and Munger 2002).

Eine medikamentöse Alternative könnte aufgrund immunmodulierender Eigenschaften das neu entwickelte FTY720 darstellen (Ferguson 2004). Es ist der erste Vertreter einer neuen Medikamentengruppe von Sphingosin-1-Rezeptoragonisten. Durch die Blockade des S1P-Rezeptors wird der Austritt von Lymphozyten aus den Lymphknoten gehemmt und es kommt zu einem Pooling außerhalb der Blutbahn. Folglich können die Immunzellen nicht wieder rezirkulieren und werden somit von den Spenderorganen und anderem entzündlichen Gewebe ferngehalten. Wichtig dabei ist, dass die eingeschlossenen B- und T-Zellen aktiv bleiben und die humorale Immunantwort nicht gestört wird (Pinschewer, Ochsenbein et al. 2000).

Neben den immunmodulierenden Eigenschaften von FTY720 gibt es auch mehr und mehr Hinweise auf einen begleitenden positiven kardiovaskulären Effekt. So hat FTY720 beispielsweise einen deutlichen Einfluss auf die Funktion und Permeabilität von Endothelzellen (Sanchez, Estrada-Hernandez et al. 2003; Brinkmann, Cyster et al. 2004). Außerdem wurde eine S1P<sub>3</sub>-rezeptorabhängige vasodilatierende, durch die Stimulierung des Akt/eNOS/NO Signalweges ausgelöste Wirkung von FTY720 auf Mausearten beschrieben (Tölle, Levkau et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass S1P und FTY720 in den Zeit- und Konzentrationsreihen im Gegensatz zum Cyclosporin A keine Auswirkung auf die durch VSMCs produzierte ROS-Menge haben. Die einzige Ausnahme stellt das S1P in Konzentrationen über 10µg/ml dar, was wohl auf die Zelltoxizität der unphysiologisch hohen Dosen zurückzuführen ist.

Darüber hinaus konnte eine protektive Wirkung einzelner Lysophospholipide auf Cyclosporin A induzierten oxidativen Stress in VSMCs nachgewiesen werden. Sowohl das S1P als auch das FTY720 vermögen die durch Cyclosporin A ausgelöste Menge an ROS in VSMCs signifikant zu senken. Durch den kombinierten Einsatz von Cyclosporin A und einem S1P-Agonisten könnte es deshalb möglich sein, die ROS-vermittelten gefäß- und nephrotoxischen Eigenschaften des Cyclosporins zu mindern.

Wie aber lässt sich erklären, dass der S1P<sub>1</sub>-Rezeptoragonist SEW-2871 im Gegensatz zu S1P und FTY720 keinen hemmenden Einfluss auf die ROS-Produktion hat? Höchstwahrscheinlich ist

dies durch die unterschiedlichen Affinitäten zu den verschiedenen S1P-Rezeptorsubtypen zu erklären. Das S1P-Analogon FTY720 ist bereits als potentieller Agonist an den G-Protein gekoppelten Rezeptoren für S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> und S1P<sub>5</sub> identifiziert worden (Brinkmann, Davis et al. 2002). Die immunsuppressive Wirkung von FTY720 wird nach neuesten Studien hauptsächlich dem S1P<sub>1</sub>-Rezeptor zugeschrieben. So sind bei S1P<sub>1</sub>-defiziten Mäusen weder die Thymozyten in der Lage den Thymus noch die B- und T-Zellen befähigt, die peripheren Lymphknoten wieder zu verlassen (Matloubian, Lo et al. 2004). Dieser S1P<sub>1</sub>-Rezeptor scheint jedoch bei der in dieser Arbeit untersuchten Thematik eine untergeordnete Rolle zu spielen, weil der spezifische Rezeptoragonist SEW-2871 keinen signifikanten Einfluss auf die durch Cyclosporin A vermittelte ROS-Produktion in VSMCs gezeigt hat. Da der S1P<sub>4</sub>-Rezeptor größtenteils im lymphatischen und blutbildenden Gewebe sowie in der Lunge vorkommt (Graler, Bernhardt et al. 1998) und der S1P<sub>5</sub>-Rezeptor hauptsächlich in der Milz und in der weißen Substanz des ZNS zu finden ist (Hla, Lee et al. 2001), lässt sich vermuten, dass der Einfluss von S1P und FTY720-P auf die ROS-Produktion über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor reguliert wird. Für diese These sprechen auch die Ergebnisse der durchgeführten Versuche mit den spezifischen Rezeptorantagonisten VPC-23019, JTE-013 und CAY-10444. Der S1P<sub>1/3</sub>-Rezeptorantagonist VPC-23019 und der S1P<sub>3</sub>-Rezeptorantagonist JTE-013 vermochten beide die ROS-unterdrückende Wirkung von S1P und FTY720 signifikant zu hemmen. Das CAY-10444, ein Antagonist am S1P<sub>2</sub>-Rezeptor, hatte dagegen keinen hemmenden Einfluss.

Nachdem FTY720 seine Wirkung an Tiermodellen gezeigt hatte (Brinkmann, Pinschewer et al. 2001), wurden klinische Phase-I- und Phase-II-Studien durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass es bis auf vorübergehende asymptotische Bradykardien gut vertragen wurde (Skerjanec, Tedesco et al. 2005; Budde, Schutz et al. 2006). In einer weiteren Phase-II-Studie erbrachte die Kombination aus FTY720 und Cyclosporin A in der Unterdrückung von akuten Transplantatabstoßungen ähnlich gute Ergebnisse wie die Standardtherapie mit Cyclosporin A und dem Proliferationshemmer Mycophenolate mofetil (MMF) (Mulgaonkar, Tedesco et al. 2006). Darüber hinaus wurden keine Anzeichen für FTY720 induzierte Nebenwirkungen gefunden, wie sie typischerweise bei den gängigen immunsuppressiven Therapien vorkommen. Allerdings wurde bei einigen Patienten zu Therapiebeginn eine vorübergehende und reversible asymptotische Bradykardie beobachtet. Bei anderen Probanden trat eine dosisabhängige nicht progrediente Steigerung des Atemwegwiderstandes auf (Peng, Hassoun et al. 2004).

Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse wurden zwei große Phase-III-Studien initiiert. Die erste Studie konnte zwar durch Kombination von üblichen Cyclosporin A-Dosen und FTY720 gegenüber der Therapie mit Cyclosporin A und MMF einen vergleichbaren Effekt auf

die Unterdrückung von akuten renalen Abstoßungsreaktionen nachweisen, zeigte jedoch insgesamt keinen signifikanten Vorteil (Salvadori, Budde et al. 2006). Zudem wurden zwei erhebliche Nebenwirkungen von FTY720 bekannt. Im Vergleich zu MMF war zum einen eine reduzierte renale Funktion und zum anderen ein erhöhtes Auftreten von Makulaödemem auffällig (Salvadori, Budde et al. 2006). Die klinische Erprobung von FTY720 bei Nierentransplantationen wurde daraufhin eingestellt. Bis heute ist nicht klar, wie es zu der verminderten Kreatinin-Clearance bei den getesteten Patienten gekommen ist.

Auch wenn sich das FTY720 aufgrund des eingeschränkten Wirkungsgrades und der aufgetretenen Nebenwirkungen nicht durchsetzen konnte, ist das immunmodulierende Prinzip von FTY720 durch Pooling der Lymphozyten in den peripheren lymphatischen Organen weiterhin ein aussichtsreicher Ansatz für die Transplantationsmedizin. Möglicherweise lässt sich durch die Entwicklung von spezifischeren Agonisten am S1P-Rezeptor und dem besseren Verständnis der zugrunde liegenden Signalwege das Nebenwirkungsspektrum reduzieren. Besondere Aufmerksamkeit muss der Frage gelten, wie es zu der Abnahme der Kreatinin-Clearance gekommen ist. Die in dieser Arbeit beschriebenen möglichen gefäßprotektiven Eigenschaften von S1P und FTY720 gegenüber dem vasotoxischen Charakter von Cyclosporin A stellen einen weiteren wichtigen Schritt zum Verständnis der Wirkung der Lysophospholipide dar.

Die immunmodulierenden und kardiovaskulären Eigenschaften von S1P-Agonisten sind dabei nicht nur für die Transplantationsmedizin von Bedeutung. Ihre positiven Einflüsse auf die Arteriosklerose und andere chronisch entzündliche Erkrankungen zeigen das große Potential, welches in der weiteren Erforschung der Lysophospholipide und deren Rezeptoren steckt.

## 5. Zusammenfassung

Es ist allgemein anerkannt, dass das Immunsuppressivum Cyclosporin A eine gefäßtoxische Wirkung besitzt und beispielsweise durch oxidativen Stress eine ausgeprägte endotheliale Dysfunktion verursachen kann. Gerade diese Eigenschaft ist es, die für viele chronische Transplantatabstoßungen verantwortlich gemacht wird. Weiterhin konnte mehrfach deutlich gezeigt werden, dass Lysophospholipide wie Sphingosin-1-Phosphat (S1P) gefäßprotektive Funktionen besitzen, welche durch rezeptorvermittelte Vorgänge gesteuert werden. Daher stellt sich die Frage, ob bei nierentransplantierten Patienten durch eine Therapie mit lysophospholipid-basierten Immunmodulatoren eine Verbesserung der Transplantatfunktion erreicht werden kann. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Einflüsse des lysophospholipid-basierten Immunmodulators FTY720 auf die Cyclosporin A induzierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu untersuchen.

Aus diesem Grund sind *in vitro* verschiedene Experimente mit glatten Gefäßmuskelzellen thorakaler Aorten von Wistar-Kyoto-Ratten durchgeführt worden. Zur Messung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies ist ein fluoreszenztechnisches Verfahren verwendet worden, wobei mit Hilfe des Farbstoffes H<sub>2</sub>DCFDA und eines Fluorescence-Microplate-Readers die jeweilige Menge an ROS quantitativ erfasst worden ist.

So konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Cyclosporin A eine zeit- und dosisabhängige Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in den verwendeten glatten Gefäßmuskelzellen auslöst. Diese Eigenschaft zeigte sich in hohen Konzentrationen ebenfalls bei dem Lysophospholipid S1P, was sehr wahrscheinlich auf einen dosisabhängigen zelltoxischen Effekt zurückzuführen ist. Bei FTY720 trat dieser Effekt nicht auf.

Die Kombination der Lysophospholipide mit Cyclosporin A führte bei FTY720 zu einer dosisabhängigen Reduzierung der Cyclosporin A induzierten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies um bis zu 30%. Bei dem Sphingosin-1-Phosphat konnte dieser Effekt in mittleren Konzentrationen ebenfalls beobachtet werden.

Um die Abhängigkeit der beschriebenen Ergebnisse von den bekannten Subtypen des S1P-Rezeptors näher zu untersuchen, sind zusätzlich spezifische Rezeptorantagonisten verwendet worden.

Größten Einfluss auf die durch FTY720 und S1P verursachte Hemmung der Cyclosporin A induzierte Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies hat der spezifische S1P<sub>3</sub>-Rezeptorantagonist JTE-013 gezeigt. Durch Blockade dieses Rezeptors konnte der hemmende Einfluss von S1P und FTY720 auf die ROS-Produktion fast vollständig wieder aufgehoben werden. Weitere Experimente haben gezeigt, dass die S1P<sub>1</sub>- und die S1P<sub>2</sub>-Rezeptoren nur eine untergeordnete Rolle bei der Hemmung spielen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in der vorliegenden Arbeit *in vitro* der hemmende Einfluss von Sphingosin-1-Phosphat und des lysophospholipid-basierten Immunmodulators FTY720 auf die von Cyclosporin A induzierte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in glatten Gefäßmuskelzellen von Rattenaorten nachgewiesen werden konnte. Dieser Effekt wird offensichtlich über den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelt.

Welche Rolle diesen Erkenntnissen bei der Entwicklung neuer, nicht gefäßschädigender Medikamente für die Posttransplantationsphase zukommt, bleibt weiteren Arbeiten vorbehalten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alewijnse, A. E., S. L. Peters, et al. (2004). "Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate and other sphingomyelin metabolites." Br J Pharmacol **143**(6): 666-84.
- Barter, P. J., S. Nicholls, et al. (2004). "Antiinflammatory properties of HDL." Circ Res **95**(8): 764-72.
- Bischoff, A., P. Czyborra, et al. (2000). "Sphingosine-1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine constrict renal and mesenteric microvessels in vitro." Br J Pharmacol **130**(8): 1871-7.
- Bischoff, A., P. Czyborra, et al. (2000). "Sphingosine-1-phosphate reduces rat renal and mesenteric blood flow in vivo in a pertussis toxin-sensitive manner." Br J Pharmacol **130**(8): 1878-83.
- Blantz, R. C. and K. Munger (2002). "Role of nitric oxide in inflammatory conditions." Nephron **90**(4): 373-8.
- Bolli, R. (2001). "Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research." J Mol Cell Cardiol **33**(11): 1897-918.
- Brinkmann, V., J. G. Cyster, et al. (2004). "FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function." Am J Transplant **4**(7): 1019-25.
- Brinkmann, V., M. D. Davis, et al. (2002). "The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors." J Biol Chem **277**(24): 21453-7.
- Brinkmann, V., D. D. Pinschewer, et al. (2001). "FTY720: altered lymphocyte traffic results in allograft protection." Transplantation **72**(5): 764-9.
- Budde, K., M. Giessing, et al. (2006). "[Modern immunosuppression following renal transplantation. Standard or tailor made?]." Urologe A **45**(1): 9-17.
- Budde, K., M. Schutz, et al. (2006). "FTY720 (fingolimod) in renal transplantation." Clin Transplant **20 Suppl 17**: 17-24.
- Cathcart, R., E. Schwiers, et al. (1983). "Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay." Anal Biochem **134**(1): 111-6.

- Charo, I. F. and R. M. Ransohoff (2006). "The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation." N Engl J Med **354**(6): 610-21.
- Cockerill, G. W., T. Y. Huehns, et al. (2001). "Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation." Circulation **103**(1): 108-12.
- Crosby, A. J., K. W. Wahle, et al. (1996). "Modulation of glutathione peroxidase activity in human vascular endothelial cells by fatty acids and the cytokine interleukin-1 beta." Biochim Biophys Acta **1303**(3): 187-92.
- Ferguson, R. (2004). "FTY720 immunomodulation: optimism for improved transplant regimens." Transplant Proc **36**(2 Suppl): 549S-553S.
- Flechner, S. M., J. Feng, et al. (2005). "The effect of 2-gram versus 1-gram concentration controlled mycophenolate mofetil on renal transplant outcomes using sirolimus-based calcineurin inhibitor drug-free immunosuppression." Transplantation **79**(8): 926-34.
- Frei, U. (2008). Nierenersatztherapie in Deutschland - Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. Berlin, Druck: Juni 2008, QuaSi-Niere gGmbH, www.quasi-niere.de.
- Fukai, T., M. R. Siegfried, et al. (1999). "Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension." Circ Res **85**(1): 23-8.
- Good, N. E., G. D. Winget, et al. (1966). "Hydrogen ion buffers for biological research." Biochemistry **5**(2): 467-77.
- Graler, M. H., G. Bernhardt, et al. (1998). "EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue." Genomics **53**(2): 164-9.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, et al. (2000). "NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease." Circ Res **86**(5): 494-501.
- Halloran, P. F. (2004). "Immunosuppressive drugs for kidney transplantation." N Engl J Med **351**(26): 2715-29.
- Hansson, G. K. and P. Libby (2006). "The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **6**(7): 508-19.

- Hemmings, D. G. (2006). "Signal transduction underlying the vascular effects of sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **373**(1): 18-29.
- Hla, T., M. J. Lee, et al. (2001). "Lysophospholipids--receptor revelations." Science **294**(5548): 1875-8.
- Igarashi, J. and T. Michel (2000). "Agonist-modulated targeting of the EDG-1 receptor to plasmalemmal caveolae. eNOS activation by sphingosine 1-phosphate and the role of caveolin-1 in sphingolipid signal transduction." J Biol Chem **275**(41): 32363-70.
- Johns, D. G., H. Osborn, et al. (1997). "Ceramide: a novel cell signaling mechanism for vasodilation." Biochem Biophys Res Commun **237**(1): 95-7.
- Kappos, L., J. Antel, et al. (2006). "Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis." N Engl J Med **355**(11): 1124-40.
- Keul, P., M. Tölle, et al. (2007). "The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(3): 607-13.
- Kitamoto, S. and K. Egashira (2004). "Endothelial dysfunction and coronary atherosclerosis." Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord **4**(1): 13-22.
- Lassegue, B. and R. E. Clempus (2003). "Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **285**(2): R277-97.
- LeBel, C. P., H. Ischiropoulos, et al. (1992). "Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress." Chem Res Toxicol **5**(2): 227-31.
- Li, L., Y. Chu, et al. (2003). "Endothelin-1 stimulates arterial VCAM-1 expression via NADPH oxidase-derived superoxide in mineralocorticoid hypertension." Hypertension **42**(5): 997-1003.
- Linsel-Nitschke, P. and A. R. Tall (2005). "HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease." Nat Rev Drug Discov **4**(3): 193-205.
- Lyle, A. N. and K. K. Griendling (2006). "Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species." Physiology (Bethesda) **21**: 269-80.

- Matloubian, M., C. G. Lo, et al. (2004). "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1." Nature **427**(6972): 355-60.
- Mayer, G. and G. G. Persijn (2006). "Eurotransplant kidney allocation system (ETKAS): rationale and implementation." Nephrol Dial Transplant **21**(1): 2-3.
- Mazurais, D., P. Robert, et al. (2002). "Cell type-specific localization of human cardiac S1P receptors." J Histochem Cytochem **50**(5): 661-70.
- Meier-Kriesche, H. U., J. D. Schold, et al. (2004). "Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era." Am J Transplant **4**(3): 378-83.
- Melendez, A. J. (2008). "Sphingosine kinase signalling in immune cells: potential as novel therapeutic targets." Biochim Biophys Acta **1784**(1): 66-75.
- Michel, M. C., A. C. Mulders, et al. (2007). "Vascular effects of sphingolipids." Acta Paediatr Suppl **96**(455): 44-8.
- Mulgaonkar, S., H. Tedesco, et al. (2006). "FTY720/cyclosporine regimens in de novo renal transplantation: a 1-year dose-finding study." Am J Transplant **6**(8): 1848-57.
- NCEP (2002). "Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report." Circulation **106**(25): 3143-421.
- Pascual, M., T. Theruvath, et al. (2002). "Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation." N Engl J Med **346**(8): 580-90.
- Peng, X., P. M. Hassoun, et al. (2004). "Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury." Am J Respir Crit Care Med **169**(11): 1245-51.
- Pinschewer, D. D., A. F. Ochsenbein, et al. (2000). "FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory." J Immunol **164**(11): 5761-70.
- Pohlman, T. H. and J. M. Harlan (2000). "Adaptive responses of the endothelium to stress." J Surg Res **89**(1): 85-119.

- Rhee, S. G., S. W. Kang, et al. (1999). "A family of novel peroxidases, peroxiredoxins." Biofactors **10**(2-3): 207-9.
- Ridker, P. M., R. J. Glynn, et al. (1998). "C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction." Circulation **97**(20): 2007-11.
- Salvadori, M., K. Budde, et al. (2006). "FTY720 versus MMF with cyclosporine in de novo renal transplantation: a 1-year, randomized controlled trial in Europe and Australasia." Am J Transplant **6**(12): 2912-21.
- Sambrook (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, New York. **volume 3, Appendix B.12.**
- Sanchez, T., T. Estrada-Hernandez, et al. (2003). "Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability." J Biol Chem **278**(47): 47281-90.
- Shen, H. M., C. Y. Shi, et al. (1996). "Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1." Free Radic Biol Med **21**(2): 139-46.
- Skerjanec, A., H. Tedesco, et al. (2005). "FTY720, a novel immunomodulator in de novo kidney transplant patients: pharmacokinetics and exposure-response relationship." J Clin Pharmacol **45**(11): 1268-78.
- Spiegel, S. and S. Milstien (2002). "Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule." J Biol Chem **277**(29): 25851-4.
- Theilmeyer, G., C. Schmidt, et al. (2006). "High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor." Circulation **114**(13): 1403-9.
- Tölle, M., B. Levkau, et al. (2005). "Immunomodulator FTY720 Induces eNOS-dependent arterial vasodilatation via the lysophospholipid receptor S1P3." Circ Res **96**(8): 913-20.
- Tölle, M., A. Pawlak, et al. (2008). "HDL-associated lysosphingolipids inhibit NAD(P)H oxidase-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(8): 1542-8.
- Trapp, A. and M. Weis (2005). "The impact of immunosuppression on endothelial function." J Cardiovasc Pharmacol **45**(1): 81-7.

- Vanrenterghem, Y. (1998). "Role of acute rejection in chronic rejection." Transplant Proc **30**(4): 1210-1.
- Vincenti, F., R. Kirkman, et al. (1998). "Interleukin-2-receptor blockade with daclizumab to prevent acute rejection in renal transplantation. Daclizumab Triple Therapy Study Group." N Engl J Med **338**(3): 161-5.
- Visner, G. A., S. E. Chesrown, et al. (1992). "Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **188**(1): 453-62.
- Watterson, K. R., P. H. Ratz, et al. (2005). "The role of sphingosine-1-phosphate in smooth muscle contraction." Cell Signal **17**(3): 289-98.
- Weis, M., S. M. Wildhirt, et al. (2000). "Coronary vasomotor dysfunction in the cardiac allograft: impact of different immunosuppressive regimens." J Cardiovasc Pharmacol **36**(6): 776-84.
- Zhang, G., J. J. Contos, et al. (1999). "Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate." Gene **227**(1): 89-99.

**7. Danksagung**

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. med. Markus van der Giet dafür, dass er mich für seine Forschung begeisterte und mir als Doktorvater die Möglichkeit gab, dieses interessante und für die Nephrologie relevante Thema in seinem Arbeitskreis zu bearbeiten. Darüber hinaus danke ich für die Bereitstellung der Laborräume und Arbeitsmittel sowie die freundliche Hilfe in allen Situationen und die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Dr. med. Markus Tölle danke ich für die Betreuung während der Labortätigkeit und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Besonders möchte ich ihm danken für die verständnisvolle Förderung, die Bereitschaft Fragen geduldig zu beantworten und schwierige Probleme zu lösen. All dies hat zur guten und entspannten Atmosphäre in der Arbeitsgruppe beigetragen.

Besonders wichtig war und ist mir die Unterstützung meiner Familie, die mir den Rücken gestärkt und an mich geglaubt hat sowohl während meines Studiums als auch bei der Erstellung dieser Arbeit. Ich danke ganz besonders meiner Frau Nina Witte sowie meinen Eltern Gisela und Gunther Witte.

## **8. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## **Erklärung**

„Ich, Lukas Witte, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

*Einfluss des lysophospholipidbasierten Immunmodulators FTY720 auf die Cyclosporin A induzierte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in glatten Gefäßmuskelzellen*

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift