



Phospholipase D1 in der Inflammation im kardio- vaskulären System

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Meike Klier

aus Oberhausen

Düsseldorf, July 2017

aus der Klinik für Gefäß - und Endovaskular Chirurgie
(ehemals Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin)
des Universitätsklinikums Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich – Heine - Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Margitta Elvers
Korreferent: Prof. Dr. Holger Gohlke
Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2017

...meiner Familie...

*(und all diejenigen, die mich in dieser Zeit
ertragen haben)*

„Wenn sie nur kann,
wird die Natur dich dreist belügen.“

Charles Darwin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung	VI
Summary	VII
1. Einleitung	- 1 -
1.1 Grundlagen: Bedeutung von Herz - Kreislauferkrankungen.....	- 1 -
1.2 Zelluläre Mechanismen nach akuter myokardialer Ischämie (AMI).....	- 3 -
1.3 Primäre und sekundäre Hämostase; Thrombusbildung	- 7 -
1.3.1 Thrombozytenaktivierung und ihre Rolle in der Inflammation	- 9 -
1.4 Die Phospholipasen (PLD).....	- 12 -
1.4.1 PLD1 in der GPIb – anhängigen Thrombozytenaktivierung.....	- 14 -
1.4.2 Rolle von PLD1 in der Inflammation	- 15 -
1.5 Einfluss von Thrombozyten auf den Myokardinfarkt	- 17 -
1.5.1 Einfluss von PLD1 auf den Myokardinfarkt.....	- 18 -
Zielsetzung	- 20 -
2. Material	- 21 -
2.1 Gebrauchsartikel.....	- 21 -
2.2 Geräte.....	- 22 -
2.3 Chemikalien, Puffer, Lösungen	- 24 -
2.3 Zellkulturmedien.....	- 29 -

2.4 Antikörper	- 30 -
2.5 Kits.....	- 32 -
2.6 Primer	- 33 -
2.7 Software.....	- 34 -
3. Methoden	- 35 -
3.1 Tierexperimentelle Versuche	- 35 -
3.1.1 Versuchstiere.....	- 35 -
3.1.2 Generierung von Knochenmarkschimären	- 36 -
3.1.3 Induktion einer Ischämie / Reperfusion am Modellorganismus Maus mit verschiedenen OperationsModellen	- 38 -
3.1.4 Ligatur der <i>arteria carotis</i>	- 43 -
3.1.5 Ligatur der <i>vena cava inferior (IVC)</i>	- 43 -
3.2 Zellkulturtechnik.....	- 45 -
3.2.1 Kultivierung von MHEC5 – T Zellen.....	- 45 -
3.2.2 Isolierung und Kultivierung embryonaler Mausfibroblasten (MEFs).....	- 45 -
3.2.3 Statische Adhäsion von MEFs.....	- 46 -
3.3. Zellbiologische Methoden	- 47 -
3.3.1 Thrombozyten - Isolierung aus murinem Blut	- 47 -
3.3.2 „ <i>Spreading</i> “ von murinen Thrombozyten	- 48 -
3.3.3 Adhäsionsstudien mit dem Flusskammer – System	- 48 -

3.3.4 Die Durchflusszytometrie.....	- 50 -
3.4 Proteinbiochemische Analysen.....	- 54 -
3.4.2 Das Western - Blot – System.....	- 54 -
3.4.3 Ko - Immunpräzipitation von PLD1 und SRC.....	- 58 -
3.4.4 ELISA – Assay.....	- 59 -
3.5 Molekularbiologische Verfahren.....	- 62 -
3.5.1 Genotypisierung.....	- 62 -
3.5.2 qRT – PCR.....	- 64 -
3.6 Histologische Verfahren.....	- 70 -
3.6.1 Fixierung von Mausherzen in Paraffin.....	- 70 -
3.6.2 Die Gomori - Trichrom – Färbung.....	- 71 -
3.6.3 Die Hämalaun - Eosin (HE) – Färbung.....	- 72 -
3.6.4 Immunhistochemie über das DAB – System.....	- 73 -
3.6.5 Die Sirius – Rot – Färbung.....	- 75 -
3.6.6 Die TTC / Evans Blue – Färbung.....	- 76 -
3.5 Statistische Datenanalyse.....	- 77 -
4. Ergebnisse.....	- 78 -
4.1 Einfluss von Phospholipase D1 auf die myokardiale Ischämie / Reperfusion.....	- 78 -
4.1.1 Analysen von PLD1 – Knochenmarkschimären post AMI.....	- 78 -

4.1.2 Einfluss der Hemmung der enzymatischen Aktivität von PLD1/PLD2 durch den PLD Inhibitor FIPI auf die zellulären Prozesse nach AMI	- 94 -
4.2 Einfluss von Phospholipase D1 in der Thrombozyten – vermittelten Inflammation	- 108 -
4.2.1 Signifikant reduzierte Adhäsion von Thrombozyten auf entzündlich - stimulierten Endothelzellen unter hohen Scherraten	- 108 -
4.2.2 Unveränderte zytoskelettale Reorganisation bei <i>Pld1^{-/-}</i> - Thrombozyten.....	- 114 -
4.2.3 <i>Pld1^{-/-}</i> - Thrombozyten induzieren veränderte chemotaktische und adhäsive Eigenschaften von Endothelzellen	- 120 -
4.2.4 Reduzierte Phosphorylierung von SRC und PLCy2 nach Botrocetin / vWF Stimulation bei <i>Pld1^{-/-}</i> -Thrombozyten	- 123 -
4.2.5 Reduzierte Adhäsion von Thrombozyten an entzündlichem Endothel <i>in vivo</i>	- 127 -
4.2.6 Reduzierte Adhäsion von PLD1 – defizienten Leukozyten unter entzündlichen Bedingungen	- 129 -
5. Diskussion	- 133 -
5.1 PLD1 der Blutzellen hat keine Bedeutung für die Herzfunktion nach akutem Myokardinfarkt.....	- 134 -
5.1.1 PLD1 – Defizienz der Blutzellen führt nicht zu einer verminderten Herzfunktion und vergrößertem Infarktgebiet 21 Tage post AMI	- 134 -
5.1.2 Die myokardiale Ischämie hat keine Auswirkung auf die Aktivierung der Thrombozyten von PLD1 – knochenmarkschimären Tieren.....	- 135 -
5.1.3 Einfluss der PLD1 in Blutzellen auf die TNF – α – vermittelte inflammatorische Antwort nach Ischämie / Reperfusion im Myokard. -	- 137 -

5.1.4. Ausblick	- 141 -
5.2 Pharmakologische Inhibition der PA – Generierung hat keinen Einfluss auf die Herzfunktion und Narbenbildung post AMI.....	- 142 -
5.2.1 Die Hemmung der PA - Generierung führt nicht zu einer verminderten Herzfunktion und vergrößertem Infarktgebiet 21 Tage post AMI	- 143 -
5.2.2 Die Hemmung der PA -Generierung hat keine Auswirkung auf die Aktivierung der Thrombozyten post AMI.....	- 144 -
5.2.3 Hemmung der PA – Generierung führt zu einer reduzierten Migration inflammatorischer Zellen post AMI	- 145 -
5.2.4 Ausblick	- 149 -
5.3 PLD1 ist ein Regulator in der Thrombozyten - vermittelten Inflammation.....	- 150 -
5.3.1 PLD1 ist verantwortlich für die stabile Thrombozyten – und Leukozytenadhäsion auf entzündlichem Endothel.....	- 150 -
5.3.2 Veränderte Thrombusbildung unter PLD1 – Defizienz ist nicht auf einen thrombozytären zytoskelettalen Defekt zurückzuführen.....	- 153 -
5.3.3 PLD1 reguliert die Phosphorylierung von Src im GPIb – Signalweg von Thrombozyten	- 153 -
5.3.4 Ausblick	- 154 -
6. Anhang	- 156 -
6.1 Literaturverzeichnis	- 156 -
6.2 Abbildungsverzeichnis	- 165 -
6.3 Tabellenverzeichnis	- 169 -
6.4 Publikationen und Kongressbeiträge	- 171 -

6.5 Danksagung..... - 174 -

Eidesstattliche Erklärung - 175 -

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

#	Bestellnummer
%	Prozent
Δ	<i>delta</i>
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{g} / \text{ml}$	Mikrogramm / Milliliter
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
<i>A. dest</i>	<i>aqua destillata</i>
AAR	Infarktgebiet (engl. <i>area of risc</i>)
AK	Antikörper
Botro.	Botrocetin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
Ca^{2+}	Kalzium
cDNA	komplementäre DNS (engl. <i>complementary DNA</i>)
cm	Zentimeter
CO	Herzauswurfvolumen (engl. <i>cardiac output</i>)
CRP	C - reaktives Protein
CTH	Zentrum für Thrombose und Hämostase
d	Tag (engl. <i>day</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
E	embryonales Entwicklungsstadium (in Tagen)
EC	Endothelzellen (engl. <i>endothelia cells</i>)
EDTA	Ethylendiamin - tetraacetat
EDV	enddiastolisches Volumen

Abkürzungsverzeichnis

EF	linksventrikuläres Auswurfvolumen (engl. <i>ejection fraction</i>)
EKG	Echokardiographie
ELISA	engl. <i>Enzyme - linked Immunosorbent Assay</i>
ESV	endsystolisches Volumen
etc	<i>et cetera</i>
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zell – Sortierer (engl. <i>fluorescence - activated cell scanning / sorting</i>)
FCS	fötale Kälber - Serum (engl. <i>fetal calw - serum</i>)
FELASA	<i>Federation for Laboratory Animal Science Associations</i>
FIPI	5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide
FITC	engl. <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FS	Verkürzungsfraction (engl. <i>fractional shortening</i>)
FSC	<i>Forward scatter</i> in der Durchflusszyometrie
g	Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung; Einheit für Zentrifugationsschritte
g / L	Gramm / Liter
GAPDH	Glycerinaldehyd – 3 – phosphate - Dehydrogenase
GPIb	Glykoprotein Ib
GPVI	Glykoprotein VI
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
i.p.	intraperitoneal
IgG	Immunglobulin G
IGPAL	Octylphenoxyethoxyethanol
IL – 6	Interleukin – 6
IL- 1 β	Interleukin - 1 β
INF	Infarkt
init.	initial

Abkürzungsverzeichnis

IP	Immunpräzipitation
IVC	untere Hohlvene (<i>inferior vena cava</i>)
kDa	Kilodalton
KMZ	Knochenmarkszellen
konst.	konstitutiv
L	Liter
LAD	Koronararterie (engl. <i>left anterior descending</i>)
LV	linker Ventrikel
LVAWd	linksventrikuläre anteriore Wanddicke in der Diastole (engl. <i>left ventricular (LV) anterior wall end - diastolic thickness</i>)
LVAWs	linksventrikuläre anteriore Wanddicke in der Systole (engl. <i>left ventricular (LV) anterior wall end - systolic thickness</i>)
LVPWd	linksventrikuläre posteriore Wanddicke in der Diastole (engl. <i>left ventricular posterior wall end - diastolic thickness</i>)
LVPWs	linksventrikuläre posteriore Wanddicke in der Systole (engl. <i>left ventricular posterior wall end - systolic thickness</i>)
mA	Milliamper
MEFs	embryonale Mausfibroblasten (engl. <i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
MFI	gemittelte Fluoreszenzintensität (engl. <i>mean of fluorescence intensity</i>)
MHEC5-T	Mausherz - Endothelzellen (engl. <i>mouse heart endothelial cells 5 - transformed</i>)
Min	Minuten
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mol / L	Mol / Liter
MW	Mittelwert
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid

Abkürzungsverzeichnis

NaOH	Natronlauge
NEAA	Nicht - essentielle Aminosäuren (engl. <i>Non - essential amino acids</i>)
ng	Nanogramm
OP	Operation
p	phosphoryliert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pg / ml	Pikogramm/Milliliter
PI	Proteinase - Inhibitor
PLD1	Phospholipase D 1
PPP	Thrombozyten armes Plasma (engl. <i>platelet poor plasma</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT - PCR	quantitative Real – Time PCR (engl. <i>quantitative real – time PCR</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
s. u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sek	Sekunden
SEM	Fehlerindikator (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SSC	<i>Side scatter</i> in der Durchflusszytometrie
SV	Schlagvolumen
T	Thrombin
Thr	Thrombozyten
TNF - α	Tumornekrosefaktor - α
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
U / ml	Units / Milliliter
u. a.	unter anderem
ü/N	über Nacht

Abkürzungsverzeichnis

UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
vWF	von – Willebrand - Faktor
WHO	Weltgesundheitsorganistaion (engl. <i>World Health Organization</i>)
wt	Wildtyp
s. c.	subkutan (lat. <i>subcutan</i>)
z. B.	zum Beispiel
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf
α	<i>alpha</i>
β	<i>beta</i>
u.	und

Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt ist laut der WHO eine der Haupttodesursachen Deutschlands und der westlichen Zivilisation.

Der Einfluss der PLDs, auf die inflammatorische Antwort verschiedener Krankheiten, sowie eine erhöhte PLD – Aktivität im Herzen post AMI wurde in mehreren Studien dargelegt. In *Pld1*^{-/-} - Mäusen wurde gezeigt, dass diese Tiere einerseits vor arterieller Thrombose, durch einen GPIIb/IIIa – abhängigen $\alpha_{IIb}\beta_3$ – Integrindefekt, geschützt sind; andererseits post AMI einen vergrößerten Infarktbereich, resultierend aus einer TNF – α abhängigen reduzierten inflammatorischen Antwort, aufweisen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der PLD1 auf die Reparatur und das *Remodelling*, sowie eventuelle redundante Funktionen der PLD auf diese Prozesse post AMI zu analysieren. Des Weiteren sollte der Einfluss der PLD1 auf die Thrombozyten – vermittelte Inflammation untersucht werden.

In dieser Arbeit konnte anhand von PLD1 – Knochenmarkschimären gezeigt werden, dass die PLD1 - Defizienz der Blutzellen zwar zu einer reduzierten inflammatorischen Antwort, jedoch nicht zu einer Veränderung der Infarktgröße und der Narbenqualität führt. Die pharmakologische Inhibierung der PA - Generierung durch den PLD – Inhibitor FIPI zeigte keine Auswirkungen auf die Infarktgröße post AMI, führte jedoch ebenfalls zu einer reduzierten Migration der Immunzellen in das infarzierte Gewebe.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Phänotyp post AMI der *Pld1*^{-/-} - Tiere vermutlich aus einem Defekt in der Narbenbildung oder aber aus einem kumulativen Effekt aus einer reduzierten inflammatorischen Antwort und einer veränderten Narbenbildung resultiert. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die TNF – α – Expression von der enzymatischen Aktivität der PLD1 unabhängig ist und PLD1 vermutlich noch andere Funktionen hat. Weiterführend wurde gezeigt, dass PLD1 wichtig in der GPIIb – vWF - vermittelten Thrombozytenaktivierung und in der Thrombozyten – vermittelten Inflammation ist.

Summary

According to the WHO publication acute myocardial infarction (AMI) is still the leading cause of death in Germany and western countries.

The influence of PLD to the inflammatory response in different diseases, as well as enhanced PLD – activity in the heart post AMI was demonstrated in several publications, recently. In *Pld1^{-/-}* - mice it was shown, that these mice were protected from arterial thrombosis through a GPIb – dependent $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ – integrin defect on the one hand, but on the other, they showed an increased infarct size, resulting from TNF – α – dependent reduced inflammatory response.

Aim of this study was, to analyze the influence of PLD1 to the repair and *Remodelling* processes, as well as a potential redundant function in these processes of PLD post AMI. Furthermore the influence of PLD1 to platelet – mediated inflammation had to be analyzed.

In this study, with PLD1 bone marrow chimera it was shown, that PLD1 - deficiency of bloodcells lead to a reduced inflammatory response, but not to alteration of the infarct size or of the scar's quality. The pharmacological inhibition of PA – generation by the PLD – inhibitor FIPI did not show an effect on the infarct size, but resulted in reduced migration of immune cells to the infarct borderzone, also.

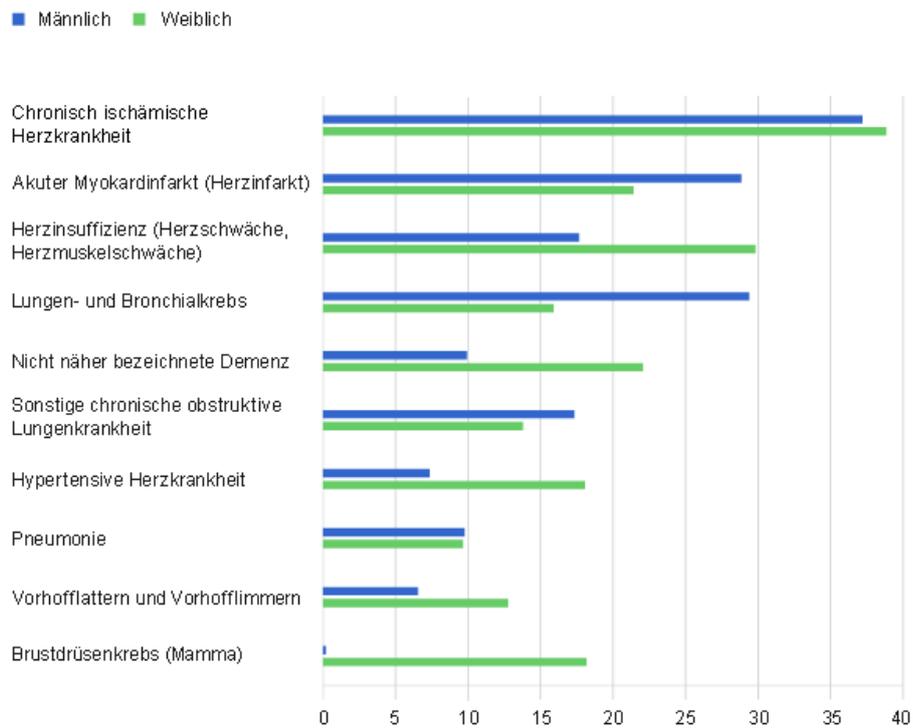
In conclusion in this study it was determined, that the phenotype of *Pld1^{-/-}* - mice post AMI is a result of a defect in scar formation or of a cumulative effect of a reduced inflammatory response and alterations in scar formation. Moreover it was shown, that TNF – α – expression is independent from enzymatic activity of PLD1 and that PLD1 probably has got other functions. Further it was shown, that PLD1 is important for the GPIb - vWF – mediated platelet's activation during platelet – mediated inflammation.

1. Einleitung

1.1 Grundlagen: Bedeutung von Herz - Kreislaferkrankungen

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) veröffentlicht in regelmäßigen Abständen Rankinglisten der häufigsten Todesursachen. Laut einer Veröffentlichung in Form eines Faktenblatts des Regionalbüros für Europa der Weltgesundheitsorganisation 2013 wurden ca. 80 % aller Todesfälle in der europäischen Region durch nicht - übertragbare Krankheiten wie Herz – Kreislauf – Erkrankungen, Krebs und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung verursacht. Die häufigste Ursache in dieser Region waren hierbei Herz – Kreislauf - Erkrankungen wie z. B. der ischämische Herzinfarkt oder der Schlaganfall mit 50 % Beteiligung an der Gesamtanzahl. Noch deutlicher zeigt sich der Anteil an Herz – Kreislauf – Erkrankungen im weltweiten Vergleich: Unter 56.4 Millionen Todesfällen 2015 starben 8.76 Millionen Menschen an den Folgen ischämischer Herzerkrankungen, was Platz 1 der internationalen Todesursachenrangliste ausmacht (WHO.int). Im gleichen Jahr starben ca. 50 % der Menschen mit kardiovaskulären Krankheiten an einem ischämischen Herzinfarkt [1]. Auch in Deutschland ist die chronisch, ischämische Herzkrankheit, gefolgt vom akuten Myokardinfarkt Todesursache Nummer 1 (Abb. 1).

Häufigste Todesursachen 2015
in Tsd.



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017

Abbildung 1: Häufigste Todesursache in Deutschland 2015. 2015 war die häufigste Todesursache die chronisch ischämische Herzkrankheit, gefolgt vom Herzinfarkt, Todesursache Nummer 1 in Deutschland sowohl bei der männlichen als auch bei der weiblichen Bevölkerung (Destatis).

1.2 Zelluläre Mechanismen nach akuter myokardialer Ischämie (AMI)

Ein Herzinfarkt kann z. B. durch Minderdurchblutung eines Herzkranzgefäßes erfolgen, wodurch eine arteriosklerotische Gefäßveränderung begleitet durch eine Thrombusbildung im Gefäß entsteht. Die dadurch entstandene Durchblutungsstörung führt zu einem Absterben im Myokard [1]. Die Prozesse, welche nach dem Myokardinfarkt stattfinden, können in drei Phasen unterteilt werden: die inflammatorische, die proliferative und die Heilungsphase. Die Dauer dieser Phasen ist bei Mensch und Nager unterschiedlich. Beim Menschen ist die Dauer der inflammatorischen Phase 1 Stunde - 4 Tage, die proliferative Phase dauert 4 - 14 Tage und die Dauer der Heilungsphase erstreckt sich auf bis zu 2 Monate. Bei den Nagern ist die Heilungsphase nach ca. 28 Tage bereits abgeschlossen. Auch die inflammatorische (1 – 48 Stunden) und die proliferative Phase (28 h – 5 Tage) sind zudem verkürzt [2, 3].

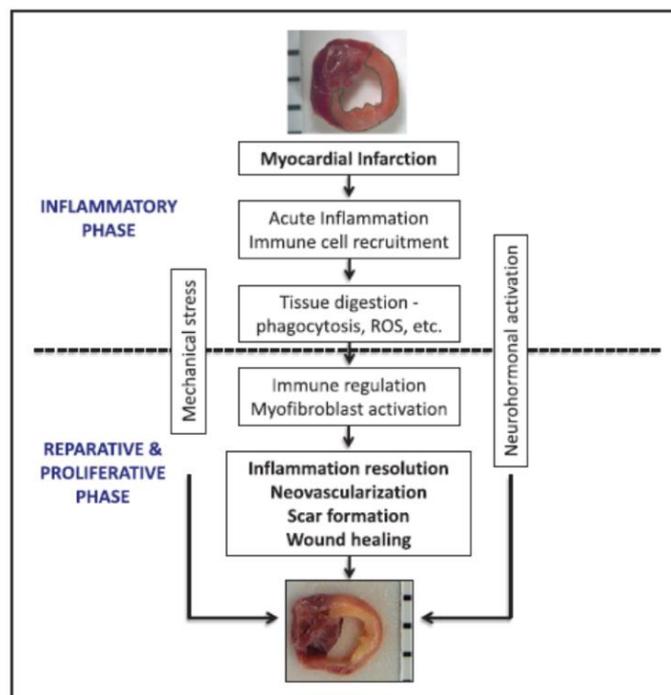


Abbildung 2: Schaubild der inflammatorischen und proliferativen Phase nach Herzinfarkt. Die Reparaturmechanismen nach Herzinfarkt in der Maus können u. a. in die inflammatorische

Phase, in welcher verschiedene Immunzellen rekrutiert werden und die Reparaturphase, in der die Proliferation von Myofibroblasten erfolgt, Kollagen synthetisiert wird und die Narbe entsteht unterteilt werden. Prabhu *et al.* 2016 [4]

Die Abfolge der Reparaturmechanismen unterliegt einer komplexen Serie von Ereignissen, welche durch eine Entzündungsreaktion initiiert werden.

In Mäusen beginnt die inflammatorische Phase mit der Einwanderung von Immunzellen, die, durch die Ischämie beschädigte Zellen und extrazelluläre Matrix, beseitigen und dauert ca. 1 bis 48 Stunden. Durch die auftretende Hypoxie nach kardialer Ischämie kommt es zu einem Absterben der Kardiomyozyten und zur Aktivierung von TLR – vermittelten Signalwegen, was wiederum die Expression von Zyto – und Chemokinen, wie IL – 6 und TNF – α , sowie die Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen fördert. Als Folge hierauf kommt es zu einer vermehrten Einwanderung von Neutrophilen in das infarzierte Gewebe, die durch die Freisetzung von proteolytischen Enzymen die kardiale Matrix degradieren. Auch früh eingewanderte Monozyten beseitigen abgestorbene Zellen. Zu einem etwas späteren Zeitpunkt eingewanderte Monozyten mildern die Entzündungsreaktion und die Sekretion von TGF – β und IL – 10 bringt die Entzündungsreaktion zum vollständigen Erliegen [2, 3].

Bereits 1983 wurde gezeigt, dass die Größe des Gewebeschadens nach myokardialer Ischämie von der Einwanderung von Neutrophilen abhängig ist. Dies zeigte u. a. ein Experiment mit Hunden, bei denen die Neutrophilen depletiert und eine Ischämie / Reperfusion induziert wurde. Tiere ohne Neutrophile zeigten eine signifikant erhöhte Infarktgröße im Vergleich zu Kontrolltieren [5]. In den ersten 24 h nach einer kardialen Ischämie werden durch inflammatorische Signale Neutrophile in das Infarktgebiet rekrutiert, gefolgt von der Einwanderung der Monozyten [6]. Diese Neutrophilen spielen eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von toten kardialen Myozyten und sekretieren weitere Mediatoren für die Rekrutierung der Immunzellen [7]. In einer *ICAM – 1*^{-/-} - Mauslinie wurde zusätzlich gezeigt, dass die Infarktgröße reduziert war. Da ICAM – 1 der primäre Ligand von Mac – 1 ist, lässt dieses Ergebnis auf eine ICAM – 1 - abhängige Neutrophilen – Kardiomyozyten – Adhäsion schließen [8].

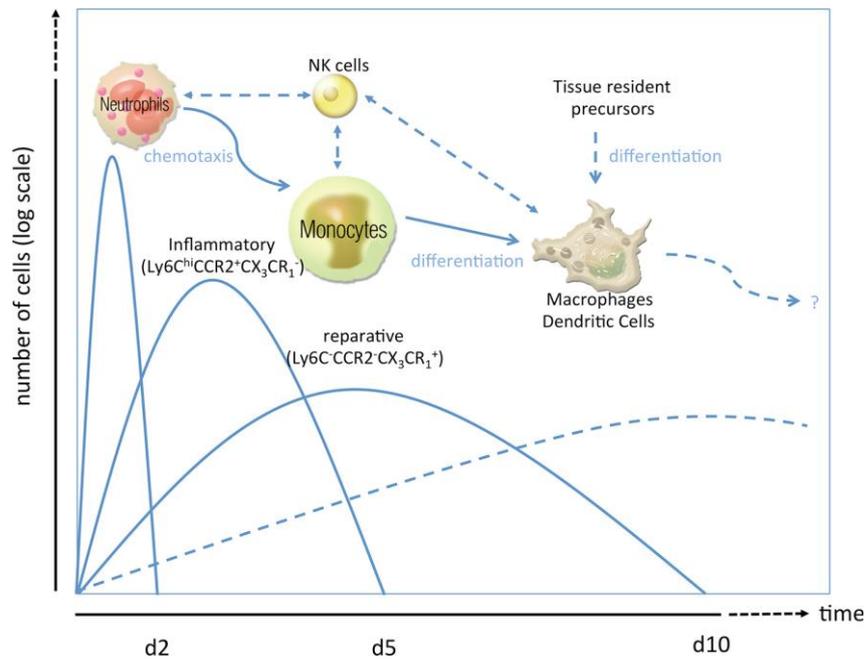


Abbildung 3: Phasen der inflammatorischen Antwort nach Myokardinfarkt. Nach der myokardialen Ischämie sind neutrophile Granulozyten die ersten Zellen, welche in das Infarktgebiet einwandern, gefolgt von Monozyten, welche sich bei der Einwanderung ins Gewebe in Makrophagen differenzieren. Diese Zellen sind wichtig für das *Remodelling* nach Ischämie und die Narbenbildung. Knorr et al. 2014 [42]

In der proliferativen Phase wird nach der Beseitigung von toten Zellen, die Entzündungsreaktion vollständig unterdrückt. Dieser Schritt ist wichtig, um weiteren Schaden am Myokard zu verhindern. Neben der Sekretion von IL – 10 findet auch die Ausschüttung von TIMP – 1 (engl. *TIMP metalloproteinase inhibitor - 1*) statt. Durch diesen Inhibitor werden Metalloproteinasen am weiteren Abbau der kardialen Matrix verhindert. Gleichzeitig werden Matrixbestandteile wie Kollagen von durch TGF – β aktivierte Myofibroblasten synthetisiert. Außerdem werden matrixzelluläre Proteine wie z. B. Thrombospondin – 1 und Periostin exprimiert, welche im infarzierten Gewebe eine vermittelnde Funktion zwischen den Zellen haben und typisch für die proliferative Phase sind. Sie werden im gesunden Herzen nicht synthetisiert [2, 3].

Es folgt die Heilungsphase, in welcher es hauptsächlich zur Narbenbildung kommt. Schon in der proliferativen Phase fand die Weiterentwicklung von Fib-

roblasten in Myofibroblasten statt. Dieser Zelltyp ist mit seiner Eigenschaft als Kollagenfaser – produzierende Zelle hauptsächlich an der Narbenbildung beteiligt [9, 10] und ist daher auch der Zelltyp, welcher vorwiegend das Narbengewebe ausmacht. Diese Myofibroblasten sind jedoch nur sehr begrenzt kontraktionsfähig, führen so durch die Narbenbildung zu einer Art „Versteifung“ und schließlich zu einer Dysfunktion des Herzens [9]. Erste therapeutische Ansätze diese Fibrose zu vermindern sind zwar gegeben, erweisen sich jedoch als mangelhaft das *Remodelling* nach myokardialer Ischämie (engl. *post acute myocardial infarction*, post AMI) positiv zu verändern [11]. Das von den Myofibroblasten produzierte Kollagen und weitere Matrixbestandteile wie z. B. Hyaluronsäure werden in dieser Phase durch Enzyme weiter vernetzt, sodass eine stabile Narbe entsteht. Auch findet in dieser Phase Apoptose der myokardialen Zellen statt. Hierdurch wird die Narbe zu einem zellarmen Gewebe und ist nur sehr wenig metabolisch aktiv [2, 3].

1.3 Primäre und sekundäre Hämostase; Thrombusbildung

In einem Organismus wird die Gesamtheit aller Prozesse, die an der Blutstillung beteiligt sind „Hämostase“ genannt. Sie wird in zwei Phasen unterteilt, die *primäre* und *sekundäre Hämostase*, wobei der Übergang dieser Phasen fließend ist. Innerhalb dieser Phasen sind es hauptsächlich die Thrombozyten, welche zusammen mit anderen Blutzellen die Blutstillung ermöglichen.

Thrombozyten sind kleine zellkernlose, im Knochenmark produzierte Zellen, die sich im Blutstrom befinden und maßgeblich an der Thrombusbildung beteiligt. Ihre Aufgabe ist es u. a. im Falle einer Gefäßverletzung schnell an der verletzen Endothelwand zu adhären, zu aggregieren und schließlich einen Thrombus zu formen. Dabei spielen sie eine zentrale Rolle in der primären Hämostase und verhindern Blutungskomplikationen in Form von z. B. hohem Blutverlust [6]. Dieses protektive System unterliegt einer strengen Balance und kann bei Fehleinstellung schnell ins Gegenteil umschlagen. Eine aus dem Gleichgewicht geratene Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung könnte dann in einem vaskulären Verschluss und letztendlich in einem Myokardinfarkt enden [7].

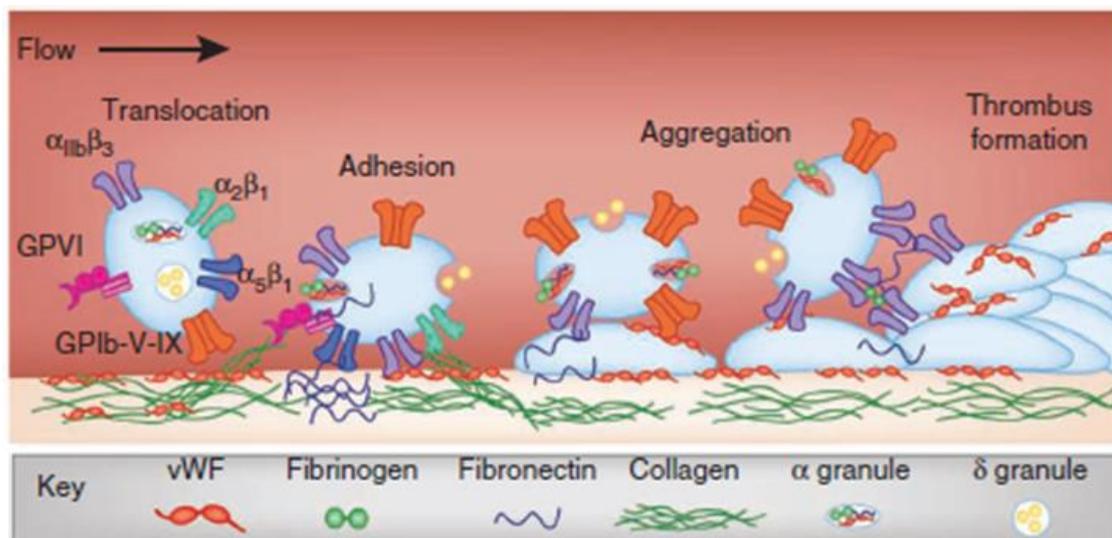


Abbildung 4: Schematische Darstellung der primären Hämostase. Durch die Bindung von vWF und GPIb kommt es zu einer ersten transienten Bindung des Thrombozyten am verletzten Endothel. Dies führt zu einer Aktivierung des $\alpha_{1b}\beta_3$ -Integrins und somit zu einer stabilen Adhäsion. Hierdurch wird die Bindung von GPIIb/IIIa an Kollagen der Gefäßwand ermöglicht,

wodurch der Thrombozyt aktiviert wird. Durch die Aggregatbildung der Thrombozyten über Integrine, die an Fibrinogen binden, wird ein weißer Plug gebildet. Jackson *et. al.*, modifiziert [12]

Im Falle einer Gefäßwandverletzung werden Signale freigesetzt, die die Thrombozyte aktivieren und ihre Adhäsion beginnt. An der Adhäsion der Thrombozyten, in der primären Hämostase, sind verschiedene Rezeptoren auf ihrer Oberfläche beteiligt: Unter hoher Scherrate kann der nur auf Thrombozyten exprimierte GP (Glykoprotein) Ib – Rezeptor am, vom Endothel aus sog. Weibel-Palade – Körperchen (engl. *Weibel - Palade bodies*) sekretierten, vWF (von – Willebrand - Faktor) binden [13, 14]. Diese Bindung ist jedoch nicht stabil und unterliegt einer schnellen „On – Off“ - Wechselwirkung, um die Thrombozyten der verletzten Gefäßwand näher zu bringen [15]. Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt über ein weiteres membranständiges Glykoprotein – GPVI, welches in der Lage ist, an Kollagen zu binden. Kollagen ist Teil der subendothelialen Matrix, welcher nur im Falle einer Verletzung an die Oberfläche des Endothels gerät. Nur dann kann GPVI an das Kollagen binden und die Thrombozytenadhäsion wird initiiert [16]. Auch verschiedene Integrine spielen bei der Bindung des Thrombozyten ans Endothel eine wichtige Rolle. Das thrombozytäre $\alpha_2\beta_1$ – Integrin bindet ebenfalls ans Kollagen und das $\alpha_5\beta_1$ – Integrin bindet ans endotheliale Fibronectin. Die stabile Adhäsion der Thrombozyten bewirkt die Aktivierung eines weiteren wichtigen Integrins – $\alpha_{IIb}\beta_3$, welches ebenfalls mit den Adhäsionsproteinen vWF [17], Fibrinogen [18] und Fibronectin [19] interagiert. Zusammen mit weiteren Thrombozyten wird so ein erster sog. „weißer Plug“ für den Verschluss der Gefäßverletzung geformt. Dieser thrombozyten - reiche Thrombus ist für einen schnellen Verschluss und damit einer schnellen Blutstillung geeignet, jedoch sehr instabil und kann sich leicht wieder von der Gefäßwand lösen [12] (Abb. 4).

Auf die Bildung des weißen Plugs folgt die sekundäre Hämostase. Hierbei wird eine Koagulationskaskade in Gang gesetzt, bei der durch proteolytische Spaltung Thrombin aus Prothrombin generiert wird. Es wird zwischen dem intrinsischen, an der Oberfläche der Thrombozyten, und dem extrinsischen, durch *Tissue Factor* (TF) des Endothels, Signalweg zur Aktivierung der Thrombozyten

unterschieden. Beide Signalwege werden über verschiedene Gerinnungsfaktoren wie Faktor VIII oder Faktor X reguliert und führen zur Generierung von Thrombin. Thrombin fördert dann die Bildung von Fibrin, welches bei der Degradierung von Fibrinogen entsteht und sich wie ein Netz auf den weißen Pluq legt. In dieses Netz werden weitere Thrombozyten und rote Blutkörperchen, die Erythrozyten, eingelagert und formen so den eigentlichen stabilen Thrombus, auch *roter Thrombus* genannt [20].

1.3.1 Thrombozytenaktivierung und ihre Rolle in der Inflammation

Im Gefäßsystem ist die Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen von höchster Bedeutung, um bei einer Läsion des Endothels einen sofortigen Verschluss der Verletzung hervorzurufen. Die Thrombozyten können mit verschiedenen Rezeptoren an den aktivierten Endothelzellen binden und die Rekrutierung weiterer Blutzellen, wie z. B. der Leukozyten, regulieren. Die Adhäsion von Makrophagen und Neutrophilen wird so durch adhärente und aktivierte Thrombozyten während einer Inflammation verstärkt [21, 22].

Hierbei wirken Thrombozyten nicht nur verstärkend auf die Adhäsion von Immunzellen, sondern initiieren auch die Stimulation des Endotheliums. Der aktivierte Thrombozyt sekretiert dafür u. a. Adhäsionsproteine wie Fibrinogen, vWF oder P - Selektin, aber auch verschiedene Zytokine wie z. B. IL (Interleukin) - 1 β und CD40L. Als inflammatorische Antwort hierauf regulieren die Endothelzellen die Expression ihrer Adhäsionsmoleküle wie VCAM (engl. *vascular cell - adhesion molecule*) – 1 und ICAM (engl. *intercellular adhesion molecule*) – 1, aber auch CD40L hoch (Abb. 5) [23].

IL - 1 β , ein hauptsächlich von Monozyten exprimiertes Zytokin, wird, wie bereits erwähnt, auch von aktivierten Thrombozyten produziert und spielt eine wichtige Rolle in der Thrombozyten – vermittelten Aktivierung von Endothelzellen [24, 25]. So wurde nachgewiesen, dass Thrombin – aktivierte Thrombozyten in einer Koinkubation mit Endothelzellen die endotheliale Sekretion von weiteren Zyto-

kinen wie IL - 6 und IL – 8 fördern [25]. Weiterhin führt die thrombozytäre IL - 1 β Sekretion zur Hochregulation der endothelialen Adhäsionsmoleküle wie z. B. ICAM – 1.

Zusammenfassend führen diese Mechanismen zu einer verstärkten thombozyten - vermittelten Neutrophilen und Monozytenadhäsion auf den Endothelzellen und insgesamt zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort [23].

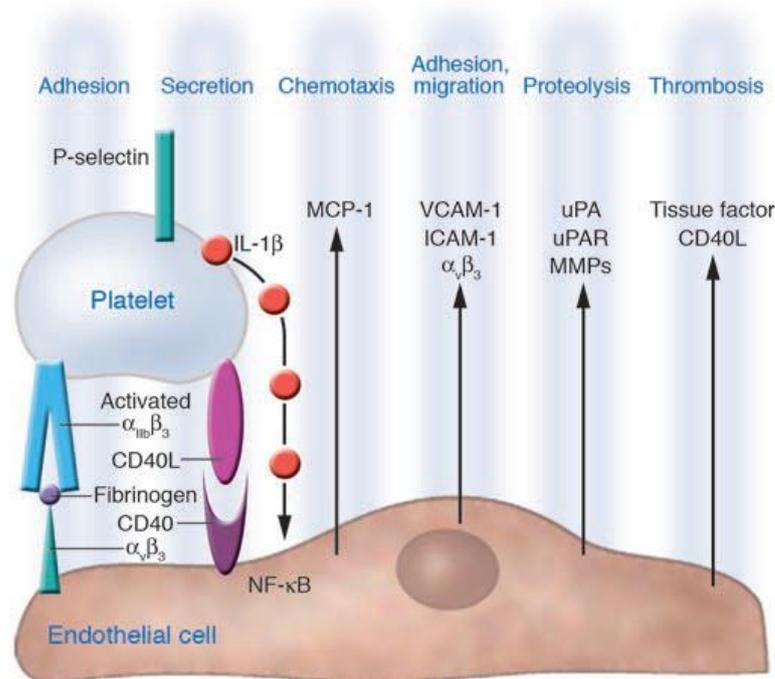


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Auswirkung von Thrombozytenadhäsion auf Endothelzellen. Aktivierte Thrombozyten sekretieren P - Selektin, CD40L, Fibrinogen oder auch IL - 1 β und fördern so die Hochregulation von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie ICAM – 1 oder VCAM – 1. Die Adhäsion von Monozyten und Neutrophilen wird dadurch verstärkt. Gawaz *et al.* 2005 [23]

Der ausschließlich auf Thrombozyten exprimierte Glykoprotein (GP) Ib – Rezeptor spielt bei der Adhäsion von Thrombozyten unter hohen Scherraten eine führende Rolle. Er vermittelt die Interaktion zwischen auf Kollagen exprimierten vWF und Thrombozyten und ist somit Teil des Adhäsionsprozesses. Dieser thrombozytäre GPIb – Rezeptor ist jedoch auch an der inflammatorischen Antwort beteiligt. Aktivierte oder adhärenente Thrombozyten können über diesen Re-

zeptor mit dem Mac – 1 – Rezeptor von Monozyten interagieren und die Rekrutierung von Monozyten zur Inflammation regulieren. Während dieses Prozesses stimulieren die Thrombozyten die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch Monozyten, die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und induzieren die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen [23].

Die aktivierten oder adhärenen Thrombozyten interagieren über verschiedene Rezeptoren mit den Monozyten und fördern so ihre Adhäsion. Das thrombozytäre $\alpha_{IIb}\beta_3$ - Integrin oder aber auch der GPIb - Rezeptor sind in der Lage an das monozytäre Mac – 1 zu binden, die Monozytenadhäsion zu initiieren und die inflammatorische Antwort zu fördern. Die Bedeutung von Mac – 1 für die inflammatorische Antwort, wurde beispielsweise in einem murinen Sepsis - Modell nachgewiesen. Hier führte Mac - 1 – Defizienz nach Ligatur des *Caecums* zu einer erhöhten proinflammatorische Antwort, einer höheren Sterberate und einer erhöhten Apoptose in der Milz [26].

Eine vermehrte Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten konnte auch nach myokardialer Ischämie gezeigt werden. Hierbei wurde zwischen den verschiedenen Immunzellen Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten differenziert und festgestellt, dass besonders die Aggregatbildung von Thrombozyten und Monozyten in der akuten Phase post AMI signifikant erhöht war [27]. Daher wird derzeit davon ausgegangen, dass Thrombozyten die inflammatorische Antwort nach Myokardinfarkt beeinflussen.

1.4 Die Phospholipasen (PLD)

Die Phospholipase D (PLD) gehört zur Gruppe der Phospholipasen, die den Abbau von Phosphoglyzeriden in Phosphatsäure (engl. *Phosphatidic acid*, PA) katalysiert. PA selbst ist ein wichtiger „second messenger“ in vielen zellulären Prozessen [28]. PLD wird von unterschiedlichen Organismen wie Bakterien, Pflanzen, Insekten und Säugern exprimiert und spielt innerhalb dieser Organismen eine große Rolle in der Zellmigration [29] und Chemotaxis [30].

Die Phospholipase D unterscheidet sich in zwei Isoformen – PLD1 und PLD2. Beide Isoformen werden allgemein von Säugetierzellen und auch Thrombozyten exprimiert [31], wo sie eine wichtige Rolle in der Integrin – vermittelten Zelladhäsion spielen [32]. Thrombozyten und Leukozyten exprimieren jeweils beide Isoformen von PLD. Oude Weernink *et al.* zeigten in einer Übersichtsarbeit die Regulation und zelluläre Bedeutung von Phospholipase D (Abb. 6), wobei die Regulation zwischen den beiden Isoformen unterschieden wurde. So kann die PLD1 u. a. von Mitgliedern der Rho – Familie (RhoA, Rac1), durch Arf1 (engl. *ADP – ribosylation factor – 1*), PKC (Proteinase K) oder durch PIP₂ (Phosphatidylinositol – 4, 5 - bisphosphate) aktiviert werden. PLD2 hingegen kann durch diese Signalkaskade nur marginal aktiviert werden, weist jedoch eine höhere Basalaktivität auf. Beide Isoformen katalysieren die Umsetzung von Phosphoglyzeriden zu PA, welche dann als „second messenger“ aktiv ist und Auswirkung auf z. B. die Zelladhäsion oder die zytoskelettale Reorganisation hat [28].

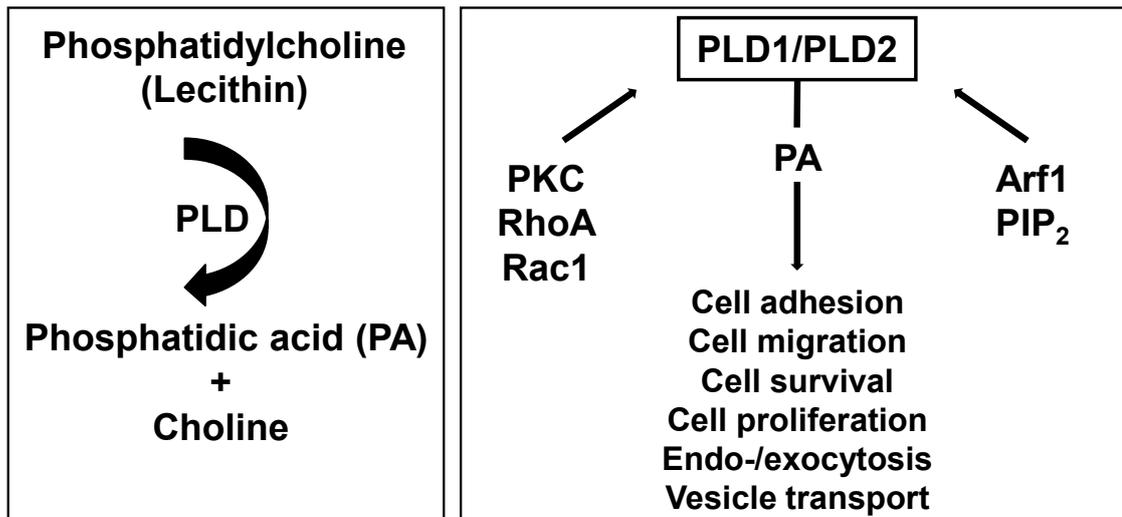


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Regulation und zelluläre Bedeutung der Phospholipase D. PLD kann durch Mitglieder der Rho – Familie (RhoA, Rac1) oder durch Arf1 und PIP₂ aktiviert werden. Dies resultiert in der Generierung von PA, welche als „second messenger“ aktiv ist und verschiedene intrazelluläre Prozesse reguliert. Oude Weernink *et al.* 2007, modifiziert [28]

Die Generierung von PA durch die enzymatische Reaktion der Phospholipase D kann durch die Verwendung von primären Alkoholen, z. B. 1 – Butanol, inhibiert werden. Dieser Effekt wurde in vielen Studien für die Analyse von PLD – abhängigen Prozessen genutzt, um die Auswirkungen von fehlender PA zu analysieren [28, 33]. Leider führte die Verwendung von primären Alkoholen auch zu PLD - unabhängigen Ergebnissen und die Bildung von PA wurde nicht immer vollständig inhibiert [33, 34].

Su *et al.* beschrieben in einer im Jahr 2009 veröffentlichten Studie einen neuen, spezifischeren *in vivo* PLD - Inhibitor - FIPI (5 – Fluoro – 2 - indolyl des – chlorhalopemide) -, welcher sowohl PLD1 als auch PLD2 inhibiert. In dieser Studie wurde nachgewiesen, dass FIPI die PLD – Regulation der zytoskelettalen Reorganisation durch F – Aktin, zellmorphologische Oberflächenvergrößerung (engl. *Spreading*) und die Chemotaxis inhibiert. Daher wurde postuliert, dass

FIPI als Therapieoption in der Behandlung von Autoimmunkrankheiten und Krebs Verwendung finden könnte [33].

Die Anwendung dieses PLD – Inhibitors beeinflusst ebenfalls die Aktivierung von Thrombozyten. *In vitro* Studien zeigen, dass FIPI zu einer reduzierten $\alpha_{IIb}\beta_3$ – Integrinaktivierung sowie zu einer reduzierten P – Selektin – Exposition nach Thrombin - Stimulation führt. Auch die Ausschüttung von vWF durch Thrombin – aktivierte Thrombozyten war verringert. In einem murinen Modell des Schlaganfalls wurde zudem gezeigt, dass die Behandlung mit FIPI zu einer reduzierten Infarktgröße führte, ohne die Hämostase der Tiere zu verändern. Die Autoren folgerten aus diesen Resultaten, dass die pharmakologische Inhibition von PLD vor arterieller Thrombose und Schlaganfall schützt, ohne einen negativen Einfluss auf die Hämostase zu bewirken [35].

Dieser pharmakologische Inhibitor für PLD wurde auch in der vorliegenden Arbeit verwendet.

1.4.1 PLD1 in der GPIb – abhängigen Thrombozytenaktivierung

Der Einfluss der PLD1 auf die GPIb – abhängige Thrombozytenaktivierung wurde in mehreren Studien bereits nachgewiesen:

In Mäusen, denen beide Isoformen der PLD, PLD1 und PLD2, fehlen, wurde gezeigt, dass die Thrombozyten dieser Tiere nach Stimulation mit Thrombin und PAR4 (engl. *platelet protease - activated receptor 4*) einen Defekt in der P – Selektin – Exposition und in der $\alpha_{IIb}\beta_3$ – Integrinaktivierung aufweisen, im Gegensatz zu den Thrombozyten ausschließlich PLD2 – defizienter Tiere. Zudem zeigten *Pld1^{-/-} / Pld2^{-/-}* - Mäuse eine verlängerte Okklusionszeit nach einer Gefäßverletzung der mesenterialen Arteriolen mit FeCl₃. Dieser Defekt konnte bei PLD2 – defizienten Tieren ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigten PLD – defiziente Tiere eine verringerte Infarktgröße nach ischämisch – bedingten Schlaganfall. Diese Daten weisen nicht nur auf eine redundante Funktion beider Isoformen hin, sondern auch auf den Einfluss der PLD1 auf die GPIb – abhängige Thrombozytenaktivierung [36].

Auch die pharmakologische Inhibition der PLD – Aktivität mit dem PLD – Inhibitor FIPI schützte Mäuse vor okklusiver Thrombenbildung und ischämischem Schlaganfall. Die Ergebnisse dieser Studie waren mit den Ergebnissen der Analysen *Pld1^{-/-} / Pld2^{-/-}* - Mäusen vergleichbar. Nach der Stimulation mit Thrombin wiesen FIPI – behandelte Thrombozyten ebenfalls eine reduzierte Integrinaktivität, sowie eine verminderte P – Selektin – Exposition auf. Auch hier war die Okklusionszeit nach FeCl₃ – Verletzung der mesenterialen Arteriolen in FIPI – behandelten Tieren verlängert und die Infarktgröße nach ischämischem Schlaganfall reduziert [35].

Elvers *et al.* zeigten 2010, dass PLD1 – defiziente Mäuse vor arterieller Thrombose geschützt sind. Die Stimulation von *Pld1^{-/-}* - Thrombozyten mit klassischen Agonisten wie CRP (engl. *collagen related peptide*) und PAR - 4 zeigte einen Defekt in der α IIb β 3 – Integrinaktivierung. Die Adhäsion von *Pld1^{-/-}* - Thrombozyten war zudem unter hoher Scherrate auf einer vWF – Matrix reduziert. Somit wurde nachgewiesen, dass ein Defekt in der Thrombusbildung auf einem GPIb – abhängigen α IIb β 3 – Integrinaktivierungsdefekt unter hohen Scherraten im vaskulären System beruht. Dieser Integrindefekt führt hierbei zu einer vWF – abhängigen, reduzierten Adhäsion von Thrombozyten und zu einer verringerten Thrombusbildung auf Kollagen. Zudem führte dieser Defekt zu einer verringerten Infarktgröße nach ischämisch – bedingtem Schlaganfall in PLD1 – defizienten Mäusen. Dies ließ den Schluss zu, dass PLD1 – Defizienz vor ischämischen Erkrankungen schützt [32].

1.4.2 Rolle von PLD1 in der Inflammation

Verschiedenen Studien der letzten Jahre zeigen, dass PLD1 in unterschiedlichen Erkrankungen, die mit einer Inflammation einhergehen, eine Rolle spielt und dass innerhalb dieser inflammatorischen oder Autoimmunkrankheiten die Expression von PLD1 erhöht ist [37-41]. Dies führt zu der Annahme, dass PLD1 in verschiedenen inflammatorischen Krankheiten eine große Rolle spielen könnte.

So wurde in einem Modell der akuten Pancreatitis gezeigt, dass nicht nur in der nekrotisierenden Pancreas selbst, sondern in Zellen der Blutperipherie (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) die Expression von PLD1 erhöht ist [37].

Eine entartete Hochregulation von PLD1 führte auch in einem murinen Modell der IL - 1 β - induzierten chronischen Arthritis zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes. Das proinflammatorische Zytokin IL - 1 β fördert die Bindung von NF - κ B an den PLD1 - Promoter und fördert so die Expression von PLD1. Eine Inhibierung von PLD1 führt zu einer signifikanten Reduzierung der IL - 1 β - induzierten Expression von weiteren proinflammatorischen Mediatoren. Resultierend aus dieser Studie ging hervor, dass eine selektive Inhibition von PLD1 zu einer reduzierten inflammatorischen Antwort und somit, zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes bei chronischer Arthritis führen könnte [37].

In einem weiteren murinen Mausmodell für TNF - α induzierte Peritonitis wurde gezeigt, dass eine Inhibition von PLD1 zu einer verringerten TNF - α - abhängigen inflammatorischen Antwort führt. Dies zeigte sich in einem geringeren Anstieg der Temperatur und einem reduziertem Serumspiegel an Zytokinen wie z. B. IL - 6. Auch die Einwanderung von Neutrophilen und Monozyten war in diesem Inflamationsmodell reduziert [40].

Der Einfluss von PLD1 wurde auch im Myokardinfarkt nach Ischämie / Reperfusion untersucht. Hier wurde gezeigt, dass eine reduzierte inflammatorische Antwort, u. a. gemessen an einem verringerten TNF - α Plasmaspiegel in PLD1 - defizienten Mäusen zu einem vergrößertem Infarktgebiet in diesen Tieren führte [42].

1.5 Einfluss von Thrombozyten auf den Myokardinfarkt

Thrombozytäres P – Selektin spielt eine wichtige Rolle in der Aggregation von Thrombozyten bei einer Verletzung des vaskulären Endothels. Bei nicht - aktivierten Thrombozyten ist es in den α – Granula der Thrombozyten gespeichert und wird bei Aktivierung durch Ausstülpung der inneren Granulamembran an der Thrombozytenmembran an die Thrombozytenoberfläche gebracht. Hier kann es z. B. an den auf Neutrophilen exprimierten Liganden PSGL - 1 (engl. *P-selectin glycoprotein ligand - 1*) binden [43].

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass nach Ischämie / Reperfusion des Herzens, der Leber und der Niere vermehrt T – Lymphozyten, Monozyten und auch Thrombozyten in die Organe einwandern [44-48]. Speziell für den Herzinfarkt konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten frühzeitig zusammen mit Leukozyten ins Infarktgebiet migrieren. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass Thrombozyten durch die Reperfusion des ischämischen Myokards aktiviert werden und den Schaden nach Ischämie / Reperfusion vergrößern [49].

In einer P – Selektin – defizienten Mauslinie wurde der Einfluss der Thrombozyten weitergehend charakterisiert. Hier wurde 24 h nach Ischämie / Reperfusion festgestellt, dass es durch das Fehlen von P – Selektin zu einer verkleinerten Infarktgröße in diesen Tieren kommt. Als zusätzliche Kontrolle wurden wildtypische Mäuse (C57BL/6) nach Infarkt mit Thrombozyten – armen Plasma (engl. *Platelet poor plasma*, PPP) oder mit aktivierten Thrombozyten – reichem Plasma (engl. *platelet rich plasma*, PRP) von wildtypischen oder P – Selektin – defizienten Mäusen behandelt. Hierbei zeigte sich, dass die Infarktgröße nach Behandlung mit PRP aus wildtypischen Mäusen bis zu 4fach erhöht war im Gegensatz zur Behandlung mit PPP [49].

Diese Ergebnisse weisen eindeutig auf einen signifikanten Einfluss von Thrombozyten auf die zellulären Prozessen post AMI hin.

1.5.1 Einfluss von PLD1 auf den Myokardinfarkt

Bereits 1992 publizierten Moraru *et al.*, dass die PLD – Aktivität in Herzen nach myokardialer Ischämie signifikant erhöht war und eine Stimulation der PLD – Aktivität zu einer Verbesserung der Herzfunktion post AMI führte [32]. Nach Ligatur der LAD (engl. *left anterior descending*) konnte zusätzlich eine erhöhte PLD1 – Aktivität im gesunden Gewebe des linken Ventrikels nachgewiesen werden, wobei die Expression von PLD1 im Narbengewebe nicht detektierbar war [50].

Weiterhin wurde gezeigt, dass unter PLD1 - Defizienz Mäuse 28 Tage nach myokardialer Ischämie eine erhöhte Infarktgröße und eine verminderte linksventrikuläre Herzfunktion aufweisen. 24 h nach Ischämie / Reperfusion zeigte sich kein Unterschied in der Infarktgröße im Vergleich zwischen *Pld1^{+/-}*- und *Pld1^{-/-}*- Mäusen. Es wurde jedoch eine reduzierte Zellmigration in den Infarktbereich und eine veränderte Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen nachgewiesen. Ursache für die reduzierte Migration von Leukozyten in das infarzierte Gewebe ist ein reduzierter TNF – α im Plasmaspiegel in *Pld1^{-/-}*- Tieren [42].

Auf einen inflammatorischen Stimulus hin können sich Fibroblasten in Myofibroblasten differenzieren und somit Einfluss auf die inflammatorische Antwort nehmen. Sie migrieren in Richtung der Inflammation, setzen dort Zytokine frei und fördern so die inflammatorische Antwort [51]. Die Verteilung und Anzahl der Myofibroblasten im Infarktgebiet spielt hierbei eine essentielle Rolle. Zu wenige oder excessive viele Myofibroblasten im gesunden Herzgewebe führen durch z. B. einer reaktiven Fibrose zu einer weniger stabilen, dafür jedoch vergrößerten Narbe [52]. Die reduzierte inflammatorische Antwort in *Pld1^{-/-}*- Mäusen hatte zudem eine reduzierte Ausdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten und eine vergrößerte Infarktgröße nach myokardialer Ischämie zur Folge [42].

Der „*transforming growth factor beta*“ (TGF – β) ist für die Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten verantwortlich, welche die extrazelluläre Kolla-

gensynthese und damit die Wundheilung fördern. In PLD1 – defizienten Tieren ist die Ausdifferenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten nach myokardialer Ischämie reduziert. Des Weiteren zeigt sich in den Tieren ein reduzierter TGF – β – Plasmaspiegel der Tiere 3 Tage post AMI [42].

Pld1^{-/-} - Mäuse weisen einen verringerten TNF – α – Plasmaspiegel 24 h nach myokardialer Ischämie auf. Weitere *in vitro* Analysen zeigten, dass PLD – defiziente Makrophagen nach der Stimulation mit LPS eine signifikant reduzierte TNF – α Sekretion aufweisen [42].

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass eine erhöhte Expression von PLD1 zu einer verbesserten kardialen Funktion nach myokardialer Ischämie führen und PLD1 so eine kardioprotektive Wirkung haben könnte.

Zielsetzung

Es konnte gezeigt werden, dass PLD1 – defiziente Mäuse auf der einen Seite, durch einen GPIIb – abhängigen $\alpha_{IIb}\beta_3$ – Integrindefekt, vor arterieller Thrombose geschützt sind. Auf der anderen Seite zeigten *Pld1*^{-/-} - Tiere eine erhöhte Infarktgröße nach myokardialer Ischämie, die auf einer reduzierten inflammatorischen Antwort beruht.

Daher ist Ziel dieser Arbeit, die Funktion und Regulation von PLD in der akuten und subakuten Phase post AMI und deren Bedeutung für nachfolgende Adaptionsprozesse, die die Herzfunktion langfristig beeinflussen, zu analysieren.

Hierzu soll zunächst der Einfluss der PLD1 der Blutzellen auf die Mechanismen nach myokardialer Ischämie mit Hilfe von PLD1 – Knochenmarkchimären analysiert werden.

Weitere Untersuchungen zur Inhibition von Phospholipasen könnten Hinweise auf redundante Funktionen der PLD – Isoformen nach myokardialer Ischämie geben. Daher sollten zusätzlich mit dem PLD – Inhibitor FIPI behandelte Mäuse post AMI untersucht werden.

Des Weiteren soll die Bedeutung der PLD für die Thrombozyten – vermittelten inflammatorischen Prozesse entschlüsselt werden, um ein detailliertes Verständnis der Rolle von Phospholipasen für die Inflammation und das *Remodelling* post AMI zu liefern.

2. Material

2.1 Gebrauchsartikel

Tabelle 2: Gebrauchsartikel

1 ml Spritze	Braun, # 9166017V
20 ml Spritze	Braun, # 4606205V
27 G Kanüle	Sterican 100, Braun, # 3200120
4 / 0 Seide	Ethicon, # 521850
50 ml Falkons	Corning Science Mexico, # 352070
96 - Well Platte	Sarstedt, #83.3924.300
Deckgläser	Engelbrecht Medizin - und Labortechnik GmbH, #k12460
ELISA Platten	Clear flat bottom, Corning, # 11814042
FACS - Röhrchen	Sarstedt, #55.1579
Microkapillare 100 µl	VWR, # 612-2650
Multipette	Eppendorf, # 4982000012
Objektträger	Marienfeld, # 1000612
Prolene - Faden	Ethicon, # 8695H
PVDF - Membran	Nitrocellulose Blotting Membran, GE Healthcare, # G9988699
Reaktionsgefäße	Safe Seal, Sarstedt, # 72.706
Skalpell	Neolab, # 11566
Zellkulturflasche (250 ml)	Greiner, # 658175
Zellkulturflasche (50 ml)	Greiner, #690175

2.2 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Automatischer Hämatologie-Analysator	KX-21N; Sysmex
Binokular	Nikon SMZ25 Lichtquelle: Digital Slight DS-U3, Nikon
Blotkammer	Perfekt blue Semi Dray Elektroblotter; PeqLab
CO ₂ -Inkubator	CO ₂ -Inkubator C150; Binder
Cycler	Mastercycler nexus gradient; Eppendorf
Durchflusszytometer	FACS Calibur; Becton Dickinson
ELISA Reader	Easyreader; Sunrise Tecan
Flussskammer	Maastrich Instruments
Gamma - Bestrahlungsgerät	Biobeam GM 2000, Gamma Service Medical
Glomax (Plattenreader)	GloMax®-Multi Detection System; Promega
Imager	Chemi Doc XRS; Bio Rad
Inkubator	D06059 Modell 300; Memmert
Laufkammer	Vertikale Doppelgelsysteme; PeqLab
Microtom	Microtom Heidelberg GmbH; D-6900 Heidelberg, Typ 400, FabrNr 299, #HM400
Mikroskop(e)	Axioskop; Zeiss Objektive: Achroplan (40x) Plan-Neofluar (20x) Kamera: AxioCam 105 color Axio Observer – Inverses Mikroskop; Zeiss Objektive: Plan Apochromat (100x) LD Plan-Neofluor (40x) Kamera: AxioCam MRm; Zeiss AxioCam 502 color; Zeiss

	Lichtquelle: HXP120C; Kübler DM2500MH; Leica Objektiv: W 20x/0,5
Neubauerkammer	LaborOptik, 0.1 mm Tiefe, 0.0025 mm ²
pH-Meter	pH526; WTW
Photometer	BioPhotometer; Eppendorf
Pumpe (Flusskammer)	KDS-100-CE; KD Scientific
Sterilbank	BSB 3A; Gelaire Flow Laboratories
Stickstoffbehälter	MACH SM-43; MVE Cryogenics
Stromquelle	PowerPac Universal; Bio Rad
Ultraschallgerät & Schallkopf	Vevo2100 bzw. Vevo 3100, VisualSonics Inc.
Waage(n)	DKD-K-100502; Sartorius AE166; Mettler
Wasserbad	GFL 1052; GFL
Zentrifuge(n)	Centrifuge 5424R; Eppendorf Laborfuge 400; Heraeus Zentrifuge 2-16P; Sigma

2.3 Chemikalien, Puffer, Lösungen

Tabelle 4: Chemikalien, Puffer, Lösungen

4 x Sammelgel-Puffer	6.05 g Trisbase (Sigma, # SLBN9543V) 100 ml <i>A.dest</i> 0.4 g SDS (Roth, # 2326.1) pH = 6,8
4 x Trenngelpuffer	91 g Trisbase 500 ml <i>A. dest</i> 2 g SDS (Roth, # 2326.1) pH = 8,8
5 x TGE - Laufpuffer	15.1 g Trisbase 72 g Glycin (Sigma, # G8898-500G) 25 ml 20 % SDS (Roth, # 2326.1) 1000 ml <i>A. dest</i> pH = 8,3 (auf 1 x mit <i>A. dest</i> verdünnen zur Anwendung)
6 x Lämmli-Puffer	7 ml 4 x Tris / HCL / SDS; pH 6,8 3 ml Glycin (Sigma, # G8898-500G) 1 g SDS (Roth, # 2326.1) 0.93 g DTT (Sigma, # D0632-5g) 1.2 g Bromphenolblau (VWR, # 1.081.220.005)
Accutase	PAA, # L11-007
ACD-Puffer	85 mM Tri-Sodiumcitratdihydrate 71 mM Citronensäure 2 % Glukose pH 4.69
Acridine Orange	Sigma, # 318337
Aggarose	Sigma, # A9539-250G

Apyrase 500U	Sigma, # A7646
Botrocetin	Snake venom from Bothrops jararaca, Sigma, # V5625-100MG
Bouin's Lösung	Sigma, # HT10132-1l
BSA	Sigma, # A7906
Celestineblau - Lösung	2.5g Ammoniumeisen-III-Sulfat in 50 ml <i>A. dest</i> lösen (eventl bei 60°C erwärmen) 0.25 g Celestineblau dazugeben Gemisch 30 min kochen lassen und filtrieren 7 ml Glycerin dazugeben
Citratpuffer	41 ml 0.1 M tri-Na-Citrat 9 ml 0.1 M Citronensäure 450 ml <i>A. dest</i> pH 6.0
CRP	University of Cambridge, UK
DAB - Lösung	Liquid DAB + Substrate Chromogen System, DAKO, # K3467
DMEM - Medium	Life Technologies, # 41965062
DMSO	Dimethylsulfatoxid, Sigma, # D2650
DNaseI recombinant RNAse - free	Roche, # 04716728001
Erythrozyten - Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid, Stemcell Technologies, # 7800 10 mM KHCO ₃ (Kaliumhydrogencarbonat, Sigma, # 237205) 0.1 mM EDTA pH 7.2 – 7.4
Essigsäure	Sigma, # 320099-500ML
Evans blue - Lösung	AppliChem, # A4388,0025
FCS (Fötales Kälberserum;	Life Technologies, # 16010159

engl. <i>fetal calf serum</i>)	
Fibrinogen	Sigma, # F3879-250MG
Fibronektin	AG Prof. Dr. Scharf, UKD
FIPI	Sigma, # F5807
Formaldehyd	Sigma, # 47608
Gentamycin	Life Technologies, # 11140050
Gomori Lösung	0.6 g Chromotrope 2R (Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co, # 1B259) 0.3 g Anilinblau (Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co, 1B501 Anilinblau, # 42755) 1 ml Essigsäure (Roth, # 37385) 0.8 g Wolframatophosphorsäure - Hydrat (Merck, #1.00583) 100 ml <i>A. dest</i>
Heparin Natrium 2500	Ratiopharm, # 002304
IP-Puffer	15 mM Tris - Hydrochlorid 155 mM NaCL (Fresenius Kabi, # 15HM229B1) 1 mM EDTA (Sigma, # E9884) 0.005% NaN ₃ 1 L <i>A. dest</i>
Isofluran	Pirmala critical care
Ketamin	Ketaset 100 mg / ml; Zoetis; # 21283
Kollagen	Kollagenreagens Horm, Takeda, # 3408075
L-Glutamin	Life Technologies, # 25030024
Lysepuffer (für murine Thrombozyten)	IP - Puffer 1 % IGPAL (Sigma, # MKBJ62266V) 1 x PI (Roche, # 04693124001)
MidoriGreen	Biozym, # 617004
Molekulargewichtsmarker	4 µl Precision Plus Protein Western C-

	Standard Sample (Biorad; # 161-0376) 1 µl Precision Plus Protein Dual Color (Bio-rad, # 161-0374)
NaCL - Lösung	Fresenius Kabi, # 15HM229B1
NEAA (Non-essential amino acids)	Life Technologies, # 11140050
Neomycin	Sigma, # N1142
PBS	Sigma, # D8537
Penicillin / Streptomycin	Life Technologies, # 15140122
PGI ₂ (Prostaglandin I ₂)	Calbiochem, # 538925
Picro – Siriusrot - Lösung	Morphisto, # 13422.00250
Ponceau-Lösung	Sigma, # P7170-1L
Protein- G Sepharose	Glutathion Sepharose, VWR, # 17-07566-01
Proteinase-Inhibitor	cOmplete Tablets Mini Easypack, Roche; # 04693124001
Rhodamin	Life Technologies, # R415
Roti Histokitt	Roth, # 6638.1
Roti Histol	Roth, # 6640.4
Streptactin	Precision Protein Streptactin-HRP, BioRad; # 161-0380
T - PBS	0.05 % Tween20 in PBS
TAE - Puffer	242 g Trisbase 57.1 ml Salzsäure 100 ml 0.5 EDTA pH = 8
Thrombin	Roche, # 10602400001
TNF - α	Recombinant Human TNF – α, Peprotech , # 300-01A
Trypanblau	Sigma, # RNBD1064
Trypsin - EDTA (0.05 %)	Life Technologies, # 25300062
Tween20	VWR, # 8.221.840.500

Tyrode - Puffer (Stock 20 x)	2.73 M Natriumchlorid 53.6 mM Kaliumchlorid 238 mM Natriumhydrogencarbonat 8 mM Dinatriumhydrogen-phosphat 0.5 M Hepes (Roth, #9105.2) 1 x Stock 20x
Tyrode – Puffer (1 x, zur Anwendung)	18 x A. dest 0.1 M MgCl ₂ (Magnesiumchlorid, Roth, # KK36.1) 10 % Glukose 10 % BSA (Sigma, # A7906-50MG) 0.1 M CaCl ₂ pH = 7,35
Ultraschallgel	Aquasonic 100 Gel, Parker Laboratories
vWF	Willfact, LFB, # 15L12225
Waschpuffer	R&D Systems, # 895126
Wasserstoffperoxid	Merck, # 1.08597.1000
Weigerts Eisen Hämatoxylin	Dr. K. Hollborn & Söhne Hämatoxylinlösung nach Weigert Weigert I (A), # 008663 Eisen (III) - chloridlösung nach Weigert B (II), # 0111
Xylazin 2 %	Xylazinhydrochlorid; Serumwerk Bernburg
Ziegenserum	Bio & Sell, # ZIE.SE.0100
β - Mercaptoethanol	Roth, # 4227.1

2.4 Zellkulturmedien

Tabelle 5: Zellkulturmedien

MEFs	10 % FCS (Life technologies, # 16010159) 1 % Penicillin / Streptomycin (Life Technologies, #15140122) 1 % NEAA (Life Technologies, # 11140050) 0.2 % Gentamycin (Life Technologies, # 15750037) in DMEM-Medium (Life Technologies, # 41965062)
MHEC5-T	10 % FCS (Life technologies, # 16010159) 1 % Penicillin/Streptomycin (Life Technologies, #15140122) 1 % L-Glutamin (Life Technologies, # 25030024) in DMEM-Medium (Life Technologies, # 41965062)

2.5 Antikörper

Tabelle 6: Antikörper für Flusskammer

<i>DyLight488 - conjugated anti - mouse GPIIb/IIIa derivative antibody</i>	Emfret, # 35503
--	-----------------

Tabelle 7: Antikörper für Western – Blot

Primärantikörper	
<i>Polyclonal rabbit anti human von – Willebrand - Factor</i>	DAKO, # A0082
<i>Polyclonal Phospho - SRC Family (try416) antibody Rabbit anti mouse</i>	Cell Signaling; # 2101S
<i>Phospha-PLCγ2 (Tyr759) antibody Rabbit anti mouse</i>	Cell Signaling; # 3874S
<i>Rabbit anti mouse PLD1</i>	Cell Signaling, # 3832S
<i>SRC (36D10) rabbit m Ab</i>	Cell Signaling, # 2109S
Sekundärantikörper	
<i>ECL Anti Rabbit IgG horseradish Peroxidase linked F(ab) 2 fragment</i>	GE Healthcare, # NA9340V

Tabelle 8: Antikörper für Durchflusszytometrie

<i>Fibrinogen Alexa 488</i>	Life Technologies, # F13191
<i>Hamster anti mouse CD45 (Icam) - FITC</i>	BD Pharmingen; # 553252
<i>P - Selectin (CD62P) - FITC</i>	Emfret, # M130-1
<i>Rat anti mouse CD106 (Vcam) - PE</i>	BD Pharmingen, # 561613
<i>Rat anti mouse CD62E (E-Selectin) - PE</i>	BD Pharmingen, # 550290

Tabelle 9: Antikörper für Immunpräzipitation

<i>Rabbit anti mouse PLD1</i>	Cell Signaling, # 3832S
<i>Rabbit (Da1E) mAb IgGXP Isotyp Control</i>	Cell Signaling, # 3900S

Tabelle 10: Antikörper für DAB - basierte Immunhistologie

<i>Rat anti mouse Ly6G</i>	BD Pharmingen, # 551459
<i>Cleaved Caspase 3</i>	Cell Signaling, # 9661S
<i>Goat pAb to rat IgG (HRP)</i>	Abcam, # ab97057
<i>Rat anti mouse CD107b (Mac3)</i>	BD Pharmingen, # 550292

2.6 Kits

Tabelle 11: Kits

Entwicklerlösung für Western - Blot System	Clarity Western ECL Substrate; Bio-Rad; # 170-5060
LSAB2 System - HRP	DAKO, # K0609
Liquid DAB + Substrate Chromogen System	DAKO, # K3467
KAPA – Mouse - Genotyping Hot Start Kit	PeqLab, # 07-KK7352-01
DuoSet Mouse IL - 1 β /IL - 1F2 ELISA	R&D Systems, # DY401
DuoSet Mouse IL - 6 ELISA	R&D Systems, # DY406
ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System	Promega, # Z6010
In PromII Reverse transcription System	Promega, # A3800

2.7 Primer

Tabelle 12: Primersequenzen

PLD1-047 WT for	'GAAAGGGATAGGAAAGTCCAGG'
PLD1-049 KO for	'GGGTGGAAAGAGAACCCATAG'
PLD1 rev	'GGAGCCCAATAGGTAGAGTG'
GAPDH for	'GGTGAAGGCGGTGTGAACG'
GAPDH rev	'CTCGCTCCTGGAAGATGGTG'
TNF – α for	'GCCCCACTCTGACCCCTTT'
TNF – α rev	'GGGGCTGGCTCTGTGAGGAA'
IL – 6 for	'ACTCGGCAAACCTAGTGCGTTATG'
IL – 6 rev	'ACATTCCAAGAAACCATCTGGCTAG'
BAX for	'TGAAGACAGGGGCCTTTTTG'
BAX rev	'AATTCGCCGGAGACACTCG'
Bcl – 2 for	'ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA'
Bcl – 2 rev	'CATGCTGGGGCCATATAGTT'
Bcl – xl for	'GACAAGGAGATGCAGGTATTGG'
Bcl –xl rev	'TCCCGTAGAGACCACAAAAGT'

2.8 Software

Tabelle 13: Software

Imager	Quantity One Software
ELISA Reader	Magellan
Mikroskop(e)	ZEN 2 (blue edition); Zeiss
PC	Office 2010; Microsoft
Binokular	NIS-Elements BR4, Nikon

3. Methoden

3.1 Tierexperimentelle Versuche

3.1.1 Versuchstiere

Für die Analysen des Einflusses von PLD1 auf die Inflammation wurden Mäuse mit konstitutiv inaktiviertem PLD1 verwendet. Die Generierung dieser Mäuse wurde von Dall'Armi *et al.* [53] beschrieben. Diese PLD1 - konst. Mauslinie wurde in der universitätsinternen „Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT)“ der Universität Düsseldorf durch die Einkreuzung einer C57BL/6J - Mauslinie (Janvier) vollständig zurückgekreuzt und durch Inzucht speziell für tierexperimentelle Arbeiten aufgezogen. Hierbei entstanden Mäuse mit dem Genotyp $Pld1^{+/+}$ und $Pld1^{-/-}$. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte über PCR. Als Kontrolltiere wurden Geschwister dieser Linie und von Janvier erworbene C57BL/6J - Tiere verwendet.

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden nach Richtlinien der FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*) und dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von ortszuständigen Tierschutzbeauftragten der ZETT überprüft. Die Tötung der Tiere erfolgte über zervikale Dislokation oder nach erfolgreicher Anästhesie mit Ketamin [100 mg / kg] / Xylazin [10 mg / kg] über die Öffnung des Thorax und die Spülung des Herzens.

Für die Analysen in dieser Arbeit wurden folgende Versuchstiergruppen verwendet:

Tabelle 14: Versuchstiergruppen

Versuchsgruppe	Versuchstiere	Zweck	Versuchsmodell
<i>Pld1</i> konst.	<i>Pld1</i> ^{+/+} + <i>Pld1</i> ^{-/-}	Einfluss von PLD1 auf die thrombozytenvermittelte Inflammation	Standardlaboranalysen wie FACS, Western – Blot, Flusskammer etc.
PLD1 - Knochenmarkschimären	C57BL/6J + <i>Pld1</i> ^{+/+} - KMZ (Spender <i>Pld1</i> ^{+/+} Empfänger <i>Pld1</i> ^{+/+}) C57BL/6J + <i>Pld1</i> ^{-/-} - KMZ (Spender <i>Pld1</i> ^{-/-} Empfänger <i>Pld1</i> ^{+/+})	Einfluss der PLD1 von Blutzellen auf die myokardiale Ischämie	Induktion einer Ischämie / Reperfusion durch das „closed – chest“ Modell mit 60 Min Ischämie
C57BL/6J behandelt	C57BL/6J + DMSO C57BL/6J + FIPI	Inhibition beider PLD Isoformen und damit Hemmung der PA – Generierung	Induktion einer Ischämie / Reperfusion durch das „open – chest“ Modell mit 45 Min Ischämie

3.1.2 Generierung von Knochenmarkschimären

Um den Einfluss von Blutzellen, wie Thrombozyten und verschiedene Immunzellen, unter Berücksichtigung des Vorhandenseins von PLD1, auf die myokar-

diale Ischämie zu untersuchen, wurden PLD1 - Knochenmarkschimären generiert.

Hierzu wurden mit der Genehmigung des Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV, AZ 84-02.04.2013.A210) knochenmarkschimäre Mäuse erzeugt, deren vom Knochenmark gebildete, zirkulierende Blutzellen im Gegensatz zu den parenchymatischen Zellen, kein PLD1 mehr bildeten.

Durch eine subletale Bestrahlung von 12 Wochen alten, männlichen C57BL/6J - Mäusen (Janvier) mit 10 Gray über 3.32 Min mit dem Gamma – Bestrahlungsgerät Biobeam GM 2000 (Gamma Service Medical) wurde das körpereigene Knochenmark zerstört.

Die Spenderknochenmarkszellen wurden aus Femur und Tibia vom *Pld1^{+/+}* - und *Pld1^{-/-}* - Tieren isoliert. Nach zervikaler Dislokation der Spendertiere wurden hierzu die Hinterbeine der Spendermaus vom Gewebe befreit, aus der Hüftverankerung gelöst und die beiden Hinterbeinknochen am distalen und proximalen Ende kurz hinter den Gelenken abgeschnitten. Das Knochenmark wurde mit einer 20 ml Spritze und 27 G Kanüle mit gekühltem PBS durch einen Nylonfilter in ein Reaktionsgefäß gespült und für 10 Min bei 500 g runterzentrifugiert. Es folgte eine Lyse der verbliebenen Erythrozyten mit 1 ml Erythrozytenlyse - Puffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA; pH = 7.2 - 7.4) für 5 Min auf Eis. Die Suspension wurde nochmals bei 500 g für 10 Min runterzentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 150 µl PBS resuspendiert und bis zur Applikation in die Empfängertiere über den retrobulbären Venenplexus auf Eis gestellt. Pro Empfängermaus wurde das Knochenmark eines Spenderhinterbeins verwendet mit mindestens einer Anzahl von 5×10^6 Knochenmarkszellen. Als Applikationsvolumen wurden 150 µl Zellsuspension festgesetzt. Die Auszählung der Knochenmarkszellen erfolgte mithilfe einer Neubauerkammer, bei der eine [1 : 200] fache Verdünnung der Knochenmarks-suspension in PBS verdünnt und die Zellen mit Trypanblau angefärbt wurden. Anschließend wurde für ca. 2 Wochen darauf geachtet, die Tiere unter möglichst sterilen Bedingungen zu versorgen, da in diesem Zeitraum die Gefahr von Infektionen bestand. Zusätzlich wurde das Trinkwasser der Tiere während des genannten Zeitraums

mit dem Breitband - Antibiotikum Neomycin, nach Angaben des Herstellers (Sigma), versetzt.

Nach einer Rekonvaleszenzzeit von 6 – 8 Wochen wurde der Erfolg der Knochenmarkschimärengenerierung mittels Blutgenotypisierung, wie unter Punkt 3.5.1.2 beschrieben, überprüft.

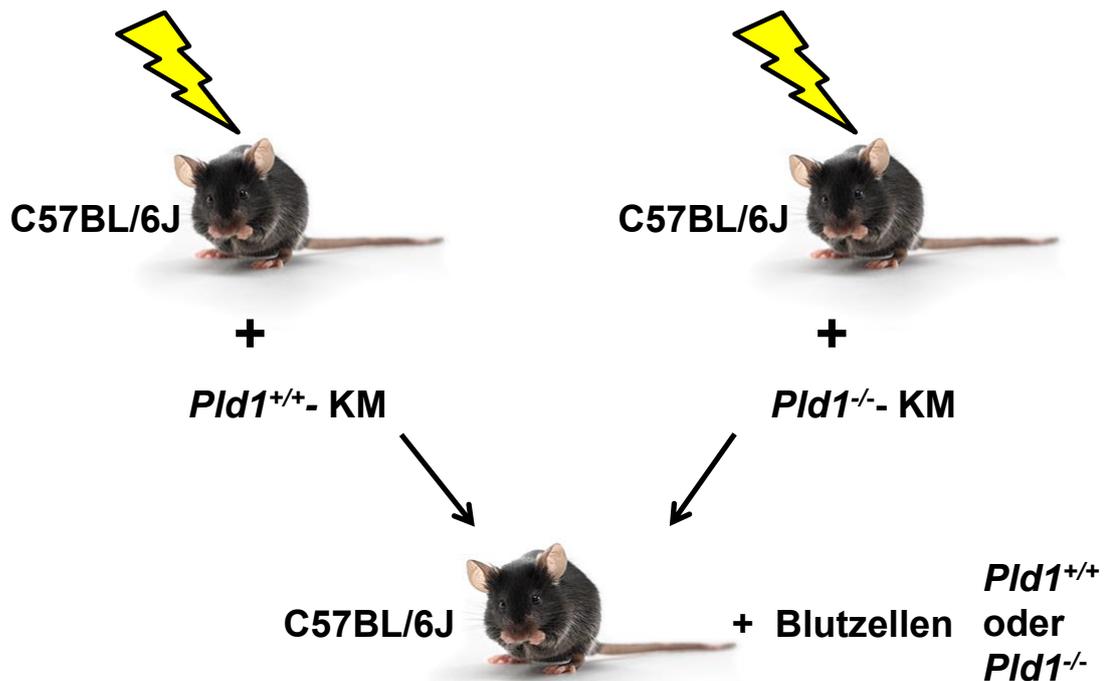


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung von Knochenmarkschimären. Mit Gammastrahlen behandelte C57BL/6J - Empfängermäuse erhielten Knochenmarkszellen von $Pld1^{+/+}$ oder $Pld1^{-/-}$ - Spendertieren.

3.1.3 Induktion einer Ischämie / Reperfusion am Modellorganismus Maus mit verschiedenen Operationsmodellen

Für den Tierversuch der myokardialen Ischämie / Reperfusion (AZ 84-02.04.2013.A486, genehmigt durch das LANUV) und der Nachbehandlung mit 4 % DMSO bzw. FIPI (5 – Fluoro – 2 – indolyl des - chlorhalopemide, 3 mg / kg

Körpergewicht, Sigma) wurden männliche C57BL/6J - Mäuse im Alter von 10 - 12 Wochen und mit einem Gewicht von ca. 25 g verwendet.

Im gleichen Tierversuch betrug das Alter der Knochenmarkschimären, bedingt durch die vorherige Bestrahlung und Rekonvaleszenz, 20 - 21 Wochen.

Alle Tiere bekamen Wasser und Standard - Labortierfutter *ad libitum*.

Die Induktion der Ischämie / Reperfusion, die Nachsorge und auch die zu verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Echokardiographien, sowie die Infarktplanimetrie über TTC – Färbung, wurden von speziell ausgebildeten und zugelassenen Mitgliedern des SFB 1116 („Serviceprojekt“) durchgeführt und ausgewertet. Die statistische Auswertung zu diesen gewonnenen Daten erfolgte durch den Experimentator.

3.1.3.1 Das „closed – chest“ – Modell zur Induktion der Ischämie / Reperfusion an knochenmarkschimären Tieren

Die Induktion der Ischämie erfolgt in diesem Versuchsaufbau bei geschlossenem Thorax und wurde bei den zuvor generierten Knochenmarkschimären angewandt. 3 – 5 Tage vor der Ischämie wurde zunächst die Ligatur am geöffneten Thorax angelegt (Prä – OP). Nach erfolgreicher Narkose mit Ketamin (90 mg / kg Körpergewicht) und Xylazin (15 mg / kg Körpergewicht) wurde die linke Thoraxhälfte vom Fell befreit, die Maus vorsichtig tracheal intubiert und an eine Beatmungsmaschine angeschlossen. Um eine konstante Körpertemperatur während des Eingriffs zu gewährleisten, wurde die Maus auf einer 37 °C warmen Wärmematte platziert und fixiert. Beatmet wurde das Versuchstier mit angereicherter Raumluft (2/3 Raumluft, 1/3 100 % Sauerstoff), einem Atemzugsvolumen (Tidalvolumen) von 200 µl bei einer Beatmungsfrequenz von 140 Atemzüge / Min und 2 % Isofluran (Forene, Abbott GmbH). Neben dem Brustbein (parasternal) wurde die Haut der Maus ca. 1 cm geöffnet und eine Thorakotomie im 3. Intercostalraum durchgeführt. Das Herz wurde frei präpariert und mithilfe eines 0.1 cm dicken Polyethylen – Rings (PE - 10) wurde eine lockere Schlaufe um die linke Koronararterie (LAD) mit einem 7 – 0 Prolene – Faden

(Ethicon) gelegt. Um zu überprüfen, ob die Ligatur an der korrekten Stelle erfolgen würde, wurde die Schlaufe kurz zusammengezogen, was ein kurzzeitiges Ablassen des Apex bei korrekter Lage des Fadens zur Folge hatte. Es folgte der Thoraxverschluss mit 4/0 Seide (Ethicon), wobei die Prolenefäden beidseitig neben dem Verschlussknoten nach Außen geführt wurden. Weiter wurden sie durch die Muskelschicht (*M. pectoralis major*) geführt, welche daraufhin ebenfalls verschlossen wurde. Die Fäden wurden miteinander verknotet und in einer präparierten Hauttasche platziert. Zum Schluss wurde auch die Haut verschlossen, die Isoflurannarkose abgeschaltet, die Maus noch einige Minuten weiter beatmet und nach Überprüfung der wieder vorhandenen Reflexe extubiert. Postoperativ wurden die Tiere für 5 Tage beobachtet, wobei alle 8 Stunden Buprenorphin (0.05 – 0.1 mg / kg, s. c.) zu Schmerzstillung gegeben wurde.

Die Induktion der Ischämie erfolgt bei geschlossenem Thorax. Nach einer einleitenden Narkose mit Isofluran (3 % Isofluran, 1/3 100 % Sauerstoff, 2/3 Raumluft) in einer Narkosekammer, wurde das Versuchstier auf einer Wärmematte fixiert und weiter mittels einer Maske (1/3 100% Sauerstoff, 2/3 Raumluft, 2% Isofluran) narkotisiert. Das Tier wurde zur Kontrolle der Narkose und der Induktion der Ischämie an ein EKG – Gerät angeschlossen. Die Prolenefäden wurden aus der Hauttasche herauspräpariert und vorsichtig an Magnethaltern befestigt, ohne eine vorzeitige Ischämie auszulösen. Es folgte eine kontrollierte Einleitung der Ischämie durch Zug an den Fäden, bis eine ST – Streckenhebung im EKG zu beobachten war. Nach einer Aufrechterhaltung der Ischämie über 60 Min wurden die Fäden durchtrennt und die Maus postoperativ versorgt. In den nächsten 24 h nach dem Eingriff wurden die Tiere beobachtet und alle 8 Stunden mit Buprenorphin (0.05 – 0.1 mg / kg, s.c.) zur Schmerzstillung behandelt.

3.1.3.2 Das „open – chest“ – Modell zur Induktion der Ischämie / Reperfusion an FIPI – bzw. DMSO behandelten Tieren

Die Induktion der Ischämie / Reperfusion durch das „open – chest“ – Modell wurde an ca. 10 - 12 Wochen alten, männlichen C57BL/6J (Janvier) am geöffneten Thorax durchgeführt.

Die Narkose des Versuchstieres erfolgte intraperitoneal über Ketamin (90 mg / kg Körpergewicht) und Rompun (15 mg / kg Körpergewicht). Nach erfolgreicher Anästhesie wurde die Maus auf dem Rücken liegend einem auf erwärmten Operationstisch fixiert und intubiert. Die Beatmung erfolgte mit Sauerstoff angereicherter Raumluft (O₂ 40 %), sowie 2 % Vol. Isofluran. Mit einer Analsonde wurde die Körpertemperatur überwacht, dokumentiert und zwischen 36 – 38 °C gehalten. Die Haut der Maus am Thorax wurde desinfiziert und EKG – Sonden wurden zur Kontrolle während der OP angebracht. Danach wurde der Thorax mittels lateraler Thorakotomie im 4. Interkostalraum geöffnet und das Herz unter Verwendung eines Operationsmikroskops etwas freipräpariert. Es folgte das sog. „Anschlingen“ der proximalen linken Koronararterie mit einem 6/0 Prolene - Faden. Danach wurde die linke proximale Koronararterie mit einem 0.3 cm langen Polyethylen – Schlauchstück reversible abgebunden, bis zu einem kurzen Erblassen des distalen gelegenen Myokards. Dieser Schritt kontrollierte die korrekte Position der Schlinge für die folgende Ischämie. Die daraufhin induzierte Ischämie wurde für 45 Min aufrechterhalten, wobei eine ständige Kontrolle der Narkose mit Isofluran über das EKG erfolgte. Nach Ablauf der Ischämiezeit wurde der Prolene – Faden entfernt und der Thorax verschlossen. Die Narkose mit Isofluran wurde beendet, die Maus jedoch noch so lange weiter beatmet, bis ihre Reflexe wieder vorhanden waren. Danach wurde sie extubiert und bis zur Erholung warm gehalten. Die postoperative Beobachtung der Tiere erfolgte über 5 Tage mit der Gabe von Buprenorphin (0.05 – 0.1 mg / kg, s. c.) alle 8 Stunden zur Schmerzstillung über den kompletten Zeitraum mit intensiver Beobachtung der Tiere.

Unmittelbar nach der Ischämie erfolgte eine tägliche Applikation von 3 mg / kg FIPI / PBS i. p. über einen Zeitraum von 0 h bis zu 21 Tagen post AMI. Als Kontrollsubstanz wurde den Kontrolltieren 4 % DMSO / PBS injiziert.

3.1.3.3 Echokardiographie

Mit der Echokardiographie kann eine bildgebende, nicht – invasive, linksventrikuläre Funktionsanalyse des Herzens durch Ultraschall stattfinden. Die Bildgebung des Herzens erfolgt hierbei durch ein hochauflösendes Ultraschallgerät mit 18 – 38 MHz Schallkopf (Vevo2100 bzw. Vevo 3100, VisualSonics Inc.). Das Versuchstier wurde hierzu mit Isofluran über eine Narkosemaske, wie bereits beschrieben, narkotisiert und auf einem beheizten Elektroden – Kontakt – Pad, welches kontinuierlich die Herz – und Atemfrequenz sowie ein EKG aufzeichnete, fixiert. Durch rektale Temperaturmessung wurde die konstante Körpertemperatur kontrolliert und aufgezeichnet. Um eine Beeinflussung der Isoflurannarkose auf den ischämischen Infarkt auszuschließen, wurde spätestens 24h vor der Prä – OP, bzw. vor der Anwendung des „*open – chest* - Modells“ und frühestens 24 h nach Ischämie ein EKG durchgeführt. Für die echokardiographische Messung wurde der komplette Thorax des Tieres vom Fell befreit und ein bildverbesserndes Gel (Aquasonic 100 Gel, Parker Laboratories) aufgetragen. Im EKG wurde die Lange - sowie die Kurze – Achse des linken Ventrikels dargestellt. Hieraus konnte das end - (ESV) und das diastolische (EDV) Volumen, das linksventrikuläre Auswurfvolumen (EF), das Schlagvolumen (SV), das Herzauswurfvolumen (CO) und zusätzlich über Aufnahmen im M - Mode die Verkürzungsfraction (engl. *fractional shortening* (FS)), sowie verschiedenen Wanddicken (LVAWd, LVAWs, LVPWd, LVPWs) bestimmt werden. Die Daten wurden dann für jeden gemessenen Parameter erfasst und vom Experimentator statistisch ausgewertet.

3.1.4 Ligatur der *arteria carotis*

Um den Einfluss der endothelialen Inflammation auf die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten *in vivo* zu untersuchen, wurde eine Ligatur der *a. carotis* (Halsschlagader), wie in *Gowert et al., 2014 [54]* beschrieben, durchgeführt. Die Mäuse wurden mit Medetomidine, Midazolam und Fentanyl anästhesiert und ein Polyethylen - Katheter wurde in die rechte Jugularvene implantiert. Vor dem Experiment wurden Thrombozyten ($8 \times 10^6 / 150 \mu\text{l}$) von Spendertieren mit Rhodamine 6G (0.2 mg / ml; Sigma) und Leukozyten mit Acridine Orange (2 mg / kg Körpergewicht, Sigma) direkt ohne Präinkubationszeit markiert und intravenös injiziert. Die Halsschlagader wurde freipräpariert und, um eine vaskuläre Verletzung hervorzurufen, für 5 Min stark ligiert. Vor und nach der vaskulären Verletzung wurde die Adhäsion der Fluoreszenz - markierten Thrombozyten und Leukozyten über intravitale Fluoreszenzmikroskopie mit *in vivo* Videoaufnahmen über ein Leica Mikroskop (206 water immersion objective, W 206 / 0.5; Leica DM2500MH) visualisiert. Die Auszählung der adhärenenten Blutzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde manuell bestimmt. Die Ligatur und die Visualisierung der adhärenenten Blutzellen wurde freundlicherweise von der Tierärztin der AG, Frau Sarah Nina Gowert durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Experimentator.

3.1.5 Ligatur der *vena cava inferior (IVC)*

Als ein zusätzliches inflammatorisch - venöses Modell, wurde hier ein *in vivo* Modell für die venöse Thrombose nach Flussunterbrechung durch eine Ligatur der *vena cava inferior (IVC)* gewählt. Diese Operation und auch die statistische Auswertung wurden freundlicherweise von dem Veterinärmediziner Dr. Sven Jäckle des Zentrums für Thrombose und Hämostase (CTH) in Mainz durchge-

führt. Das Modell der venösen Thrombose wurde bereits ausführlich von von Brühl *et. al.*, 2012 [55] beschrieben.

Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (BX51WI; Olympus) wurden isolierte Thrombozyten mit Rhodamin B (20 µg / ml; Invitrogen Life Technologies GmbH) markiert. Über einen Jugularvenenkatheter aus Polyethylen (0.28 mm ID, 0.61 mm OD; Smiths Medical) wurde die DCF - markierte Thrombozytensuspension mit einer finalen Konzentration von 15×10^4 Thr / µl in einem Endvolumen von 250 µl intravenös injiziert. Die Leukozyten wurden *in vivo* mit Acridine Orange (50 µg / µl; 100 µl / Maus; Sigma Aldrich) markiert. Die Adhäsion der Blutzellen wurde über „High - Speed Fluoreszenzmikroskopie“ visualisiert.

Hierzu wurde eine Maus über intraperitoneale Injektion von Midazolam, Medetomidin und Fentanyl (5, 0.5, 0.05 mg / kg Körpergewicht) anästhesiert und auf einer Wärmematte (Foehr Medical Instruments) platziert, um die Körpertemperatur von 37 °C während der Operation zu halten. Für diese Art Mikroskopie wurde eine mediane Laparotomie (Bauchdeckenschnitt) an einer anästhesierten Maus durchgeführt und die *vena cava inferior* („untere Hohlvene“) vorsichtig, um ein vorzeitiges Trauma des Gefäßes zu vermeiden, freipräpariert. Ein Platzhalter wurde an die Außenseite der IVC gebracht und eine permanente Ligatur wurde direkt unterhalb der linken Nierenvene platziert. Anschließend wurde der Faden entfernt, um eine vollständige Okklusion der Vene zu vermeiden. Die Adhäsion der Thrombozyten und Leukozyten an der verletzten Gefäßwand wurde durch intravitale Mikroskopie dokumentiert.

3.2 Zellkulturtechnik

3.2.1 Kultivierung von MHEC5 – T Zellen

Um den gegenseitigen Einfluss von Endothelzellen und Thrombozyten unter inflammatorischen Bedingungen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Mausherz - Endothelzellen (engl. *mouse heart endothelial cell clone 5 transformed*; MHEC5 – T; von H. Langer, Deutsches Herzkompetenzzentrum am Universitätsklinikum Tübingen) repräsentativ verwendet. Die Zellen wurden hierzu in DMEM - Medium, welches mit 10 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 % L - Glutamin versetzt wurde, bei 37 °C und 5 % CO₂ – Sättigung im Brutschrank (Mettler) kultiviert. Zum Ablösen und dem darauffolgenden Passagieren der Zellen wurde 0.05 % Trypsin - EDTA verwendet.

3.2.2 Isolierung und Kultivierung embryonaler Mausfibroblasten (MEFs)

Zur Gewinnung einer Primärzellkulturlinie, wurden aus murinen Embryonen Fibroblasten (engl. *mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) isoliert. Hierzu wurden Embryonen im Stadium E 12 - 14 aus den Uteri von Muttermäusen präpariert. Nach dem Entfernen von Kopf und Organen wurde das verbliebene Gewebe manuell mit einem Skalpell in 0.05 % Trypsin-EDTA pro Embryo zerkleinert und durch dreimaliges Inkubieren für 5 Min bei 37 °C und anschließend auf - und abpipettieren verdaut. Die so entstandene homogene Zellsuspension wurde in 10 ml Zellkulturmedium (DMEM, 10 % FCS, 1 % Penicillin / Streptomycin, 1 % NEAA, 0.2 % Gentamycin) in einer T25 -Zellkulturflasche (Greiner) aufgenommen und bei 37 °C und 5 % CO₂ –Sättigung im Brutschrank (Mettler) inkubiert. Bei ca. 80 %iger Konfluenz wurden die Zellen mit 0.05 % Trypsin - EDTA abgelöst und passagiert oder in FCS + 10 % DMSO in Flüssigstickstoff zur Lagerung weggefroren.

3.2.3 Statische Adhäsion von MEFs

Um den potentiellen Einfluss des *Pld1*^{-/-} - Genotyps auf das Adhäsionsverhalten von Zellen zu untersuchen, wurden hier MEFs (2×10^4 / Well) in 96 – Well – Platten für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Wells wurden zuvor mit den Matrixen Kollagen (200 µg / ml, Horm), Fibrinogen (1 mg / ml, Sigma) oder Fibronectin (200 µg / ml, Uniklinikum Düsseldorf), welche repräsentativ für eine verletzte Gefäßwand sind, beschichtet und unspezifische Bindungsstellen mit 1 % BSA / PBS bei RT geblockt. Pro Well wurde die gemittelte Gesamtzellzahl an fünf Bilder ausgezählt.

3.3. Zellbiologische Methoden

3.3.1 Thrombozyten - Isolierung aus murinem Blut

Von Isofluran anästhesierten Spendermäusen wurde Blut über Punktierung des retrobulbären Venenplexus mit einer Mikrokapillare (VWR) entnommen. Für Anti - Agglutination wurde das Blut sofort in Reaktionsgefäßen, in denen 300 µl Heparin (20 U / ml, Ratiopharm) vorgelegt war, aufgefangen. Die Isolierung der Thrombozyten erfolgte über verschiedene Zentrifugationsschritte. Zunächst wurde das heparinisierte Vollblut für 5 Min bei 250 g zentrifugiert, wobei eine Phasentrennung der einzelnen Blutbestandteile erfolgte. Die obere milchige Phase wurde zusammen mit einem geringen Teil der unteren Erythrozyten-Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und abermals für 5 Min bei 50 g zentrifugiert. Das so entstandene Thrombozyten - reiche Plasma (engl. *platelet - rich plasma*, PRP, obere Phase) wurde ohne Erythrozyten in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Unterstand wurde in 200 µl Tyrode resuspendiert, abermals für 5 Min bei 50 g zentrifugiert und der neu entstandene Überstand dem zuvor entnommenen PRP zugefügt. Um eine Präaktivierung der Thrombozyten während der weiteren Isolierung zu verhindern, wurde der Zellsuspension Apyrase (0.02 U / ml, Sigma) und PGI₂ (0.5 µM, Calbiochem) zugesetzt. Nach der vollständigen Isolierung der Thrombozyten über eine weitere Zentrifugation des PRPs für 5 Min bei 650 g und einem bei gleicher Zentrifugation folgendem Waschschrift in 1 ml Tyrode, wurden die Thrombozyten in Tyrode - Puffer mit Ca²⁺ (2.73 M NaCl, 53.6 mM KCl, 238 mM Na₂HCO₃, 8 mM Na₂HPO₄, 0.5 M Hepes, 0.1 M MgCl₂, 10% Glukose, 10% BSA, 0.1M CaCl, pH 7.35) resuspendiert. Die Thrombozytenanzahl wurde in einer [1:10] - Verdünnung in PBS mit einem automatischen Hämatologie – Analysator (Sysmex - KX21N, Sysmex Corporation) bestimmt.

3.3.2 Spreading von murinen Thrombozyten

Die morphologische Oberflächenvergrößerung von Thrombozyten nach ihrer Aktivierung wird im Englischen *Spreading* genannt und ist in drei Stadien zu unterscheiden: nicht aktivierte Thrombozyten, Filopodien – und Lamellipodienbildung, wobei der Übergang zwischen diesen Stadien fließend ist. Für das *Spreading* - Experiment wurden vollständig isolierte und gewaschene Thrombozyten ($8 \times 10^4 / \mu\text{l}$) ruhend oder nach der Stimulierung mit Thrombin (0.1 U / ml, Roche) auf einem mit Fibrinogen (0.2 mg / ml) beschichteten Deckglas (24 mm / 60 mm) für 20 und 60 Min bei RT inkubiert. Um unspezifische Bindungen der Thrombozyten am Fibrinogen zu vermeiden, wurden die Bindungsstellen mit 1 % BSA / PBS für 1 h bei 37 °C zuvor geblockt. Nach der Inkubationszeit wurde das Deckglas vorsichtig mit PBS gespült, um nicht adhärente Thrombozyten zu entfernen. Es folgte die sofortige mikroskopische Dokumentation bei 1000facher Vergrößerung. Die unterschiedlichen Status der Thrombozyten wurden manuell auf fünf Bildern pro Ansatz ausgezählt und prozentual zur Gesamtzellzahl verrechnet.

3.3.3 Adhäsionsstudien mit dem Flusskammer – System

Bei der klassischen Flusskammer handelt es sich um ein Experiment unter Flussbedingungen, bei dem die physiologische Situation im Gefäßsystem imitiert wird. Die unterschiedlichen Scherkräfte, welche in einem Gefäßsystem herrschen, können so, im Gegensatz zu Versuchen unter statischen Bedingungen, mit in den Versuchsaufbau einbezogen werden, sodass die physiologischen Bedingungen authentischer sind.

Im Aufbau enthalten ist ein z. B. mit Kollagen beschichtetes Deckgläschen (24 x 60 mm) hierbei repräsentativ für die extrazelluläre Matrix, welche bei einer Verletzung der Gefäßwand die Aggregation der Blutbestandteile induziert. Durch

dieses System kann so das Adhäsionsverhalten der Blutbestandteile und die Thrombenbildung außerhalb eines Organismus beobachtet werden. Das Blut oder sich in Lösung befindliche isolierte Bestandteile des Blutes, fließen hierbei durch eine Objektträgerkammer (50 μm x 5 mm), welche den Hauptbestandteil des Versuchsaufbaus ausmacht. Diese Objektträgerkammer wird in einen Aluminiumblock, welcher für die Dokumentation mit einem inversen Mikroskop eine Aussparung besitzt, eingespannt. Durch diese Aussparung hindurch kann das fließende Blut beobachtet und das Adhäsionsverhalten der Blutzellen zur späteren Auswertung dokumentiert werden.

Eine Variante der standardisierten Flusskammer ist die „dynamische Flusskammer“ bei der das Deckglas nicht nur mit einer einzigen Substanz, sondern mit lebenden Zellen beschichtet wird. Hierzu wurden, wie zuvor beschrieben, MHEC5 - T - Zellen kultiviert und auf einem mit Fibrinogen (0.5 mg / ml, Sigma, 30 Min / 37 °C) beschichteten Deckglas ü/N bei 37 °C ausgesät (2×10^5 / ml). Die so entstandene konfluente, einschichtige Zelllage wurde mit TNF - α (100 ng / ml, Peprotech) ü/N bei 37 °C entzündlich stimuliert. Das beschichtete Deckglas wurde in die Flusskammer eingespannt und dabei entstandene Luftblasen sowie das Zellkulturmedium wurden mit Tyrode - Puffer vorsichtig aus dem System gespült. Thrombozyten von murinem, heparinisierendem Vollblut wurden mit einem fluoreszierenden Antikörper (*DyLight488 - conjugated anti -mouse GPIIb/IIIa derivative antibody*, 1 μg / ml, Emfret) für 5 Min bei 37 °C vorinkubiert und somit zur verbesserten Visualisierung des Adhäsionsverhaltens markiert. In Ansätzen für den späteren Vergleich, ob es Änderungen im Adhäsionsverhalten von Thrombozyten gibt, bei denen beide Isoformen der PLD blockiert sind, wurden vor Markierung, die Thrombozyten des Vollbluts mit FIPI (5 - Fluoro - 2 - indolyl des - chlorohalopemide, 1 μM , Sigma) für 15 Min bei 37 °C inkubiert. Das für beide Scherraten (1700s^{-1} , 150sec^{-1}) benötigte Gesamtvolumen von 1 ml, setzte sich aus ca. 700 μl Blut und 300 μl Heparin (20 U / ml), um vorzeitige Gerinnung zu vermeiden, zusammen. Das Blut wurde aus einer 1 ml Spritze mit Spardorn über eine pulsfreie Pumpe (KD Scientific) unter o.g. Scherraten in das System der Flusskammer gepumpt. Ab Ankunft des Blutes in der Flusskammer wurde der Durchlauf für 5 Min zugelassen. Unmittelbar nach Ablauf der Zeit,

werden fünf Bilder bei 400facher Vergrößerung zur Auswertung der Thrombenfläche über die Carl Zeiss Software „Zen.Ink“ festgehalten. Bei der Auswertung wird der prozentuale Anteil der von Thromben bedeckten Fläche zur Gesamtfläche des Bildes in Relation gestellt. Zusätzlich können über die gemittelte Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf die dreidimensionale Struktur der Thromben gezogen und verglichen werden.

3.3.4 Die Durchflusszytometrie

Im Allgemeinen basiert die Durchflusszytometrie auf der Vermessung von Zellen bezüglich ihrer Größe (engl. *forward scatter*, FSC), ihrer Granularität (engl. *side scatter*, SSC) und ihrer Fluoreszenzmarkierung. Die sich in einer Lösung befinden Zellen fließen vereinzelt durch eine so genannte Flusszelle und werden mit einem Laser bestrahlt. Dabei wird je nach Größe, Zytoplasma - Zusammensetzung oder Oberflächenstruktur ein zelltypspezifisches Streulicht erzeugt. Mithilfe einer gerätspezifischen Software können anhand dieses Streulichts die einzelnen Zellsuspensionsbestandteile im Streulicht (engl. dot plot) – Diagramm dargestellt werden, wobei jeder Punkt einem gemessenen Ergebnis entspricht. Auch kann so die Suspension in ihre einzelnen Bausteine sortiert und damit Zellpopulationen isoliert werden. Zudem ist es möglich weitere Parameter, wie die Anzahl eines Zelltyps innerhalb der Zellsuspension, zu bestimmen.

Eine Erweiterung der einfachen Durchflusszytometrie ist die Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie, bei der mithilfe von Fluoreszenz - markierten Antikörper z. B. Oberflächenproteine nicht nur detektiert, sondern auch quantifiziert werden können, was allgemein auch unter dem Begriff „FACS“ (engl. *fluorescence - activated cell scanning / sorting*) – Analyse bekannt ist. Durch die Verwendung von verschiedenfarbigen Lasern und Filtern kann so der Informationsgehalt einer Messung weiter erhöht werden.

3.3.4.1 Analyse endothelialer Adhäsionsmoleküle

Um den Einfluss aktivierter Thrombozyten auf das Gefäßendothel zu untersuchen, wurden, wie zuvor beschrieben, MHEC5 – T – Zellen (1×10^5 / Well) kultiviert und für den Versuchsaufbau in, mit Fibrinogen (0.5 mg / ml; 1 h / 37 °C) beschichteten 96 – Well – Platten, bei 37 °C ü/N ausgesät. Die konfluenten MHEC – Zellen wurden über Zentrifugation (5 Min / 600 g) in engen Kontakt mit Thrombin – (0.1 U / ml, 0.02 U / ml, Roche), CRP – (5 µg / ml, University of Cambridge, Dep of Biochemistry), Botrocetin (2 µg / ml, *snake venom from Bothrops jararaca*; Sigma) oder Botrocetin / vWF (2 / 10 µg / ml, Willfact, LFB) stimulierten Thrombozyten (1×10^8 / Well) gebracht. Die Thrombozyten wurden zuvor, wie bereits beschrieben, aus heparinisierem Blut isoliert. Um eine Aktivierung der Endothelzellen durch das Thrombin auszuschließen, wurden die Thrombin – stimulierten Thrombozyten nochmals bei 650 g für 2 Min runterzentrifugiert, neu in Tyrode aufgenommen und erst dann auf die Endothelzellen gebracht. Als Positivkontrolle dienten ausschließlich mit TNF – α (100 ng / ml; 37 °C / ü/N; Peprotech) stimulierte Endothelzellen. Nach einer Koinkubation von 3.5 h bei 37 °C wurden die Thrombozyten von den Endothelzellen entfernt, die Endothelzellen dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen und dann für 20 Min bei RT mit 50 µl Accutase abgelöst. In FACS – Röhren (Sarstedt) wurden für die Analyse der endothelialen Adhäsionsmoleküle E – Selektin (Endothel – Selektin; CD62E), ICAM – 1 (engl. *Intercellular Adhesion Molecule 1*, CD54, 10 µl), VCAM – 1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*; CD106; 10 µl) und P – Selektin (Thrombozyten – Selektin; CD62P; 5 µl) entweder FITC oder PE markierte monoklonale Antikörper (PE – CD62E, PE – CD106, FITC – CD54, BD; FITC – CD62P, Emfret) vorgelegt. Nach einer Inkubationszeit der Antikörper mit der Endothelzellen – Suspension von 15 Min bei RT (ICAM, VCAM) bzw. von 7 Min bei 37 °C und anschließenden 7 Min bei RT (P – Selektin, E – Selektin) wurde die Rezeptor – Antikörper – Bindungszeit mit 400 µl PBS gestoppt und die ECs durchflusszytometrisch analysiert. Der MFI (engl. *mean of fluorescence intensity*), die gemittelte Intensität der Fluoreszenz, diente hierbei als Parameter für den Vergleich zwischen den unterschiedlichen Ansätzen.

3.3.4.2 Analyse der thrombozytären Integrin - Aktivität

Durch die Koinkubation von Endothelzellen und Thrombozyten, sollte auch die Auswirkung von entzündlich - stimulierten Endothelzellen auf die Thrombozytenaktivierung analysiert werden. Hierzu wurde indirekt die Integrin -Aktivität der Thrombozyten durch Fibrinogen - Bindung (Fibrinogen Alexa 488, Life Technologies; 2 µl) durchflusszytometrisch bestimmt. MHEC5 - T Zellen wurden wie unter 3.2.1.1 beschrieben mit TNF - α stimuliert und mit unstimulierten Thrombozyten (100×10^6 Thr / 100 µl Tyrode / Ansatz), die aus ACD - Puffer verdünntem Blut isoliert wurden, über Zentrifugation in Kontakt gebracht. Die Thrombozyten - Suspension wurde durch dreimaliges Waschen mit Tyrode von den Endothelzellen abpipetiert, für 2 Min bei 650 g runterzentrifugiert und in 100 µl Tyrode + Ca^{2+} resuspendiert. Pro durchflusszytometrischer Messung wurden 50 µl Thrombozytensuspension eines Ansatzes mit 2 µl Antikörper für 15 Min bei 37 °C inkubiert und die Inkubationszeit mit 400 µl PBS abgestoppt. Danach wurde der MFI der Fibrinogen - Bindung bestimmt und zum Vergleich zwischen den Proben herangezogen.

3.3.4.3 Messung der Thrombozyten – Immunzellen - Aggregatbildung

Um mehr über die Interaktion von Thrombozyten und Immunzellen während der Inflammation zu erfahren, wurde vor der Ischämie, 24 h und 72 h nach Ischämie / Reperfusion die Aggregatbildung dieser beiden Blutzelltypen durchflusszytometrisch bestimmt. Das in Heparin aufgenommene Blut (ca. 4 Tropfen) wurde zweimal über Zentrifugation (5 Min / 650 g) mit Tyrode – Puffer gewaschen. Nach der dritten Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, wobei darauf geachtet werden musste, dass noch ein wenig Puffer auf der Erythrozytenphase verblieb, da sich hier die Aggregate angesammelt hatten. Das Pellet wurde vorsichtig im verbliebenen Puffer resuspendiert und 25 µl der Zellsuspension wurden für die FACS - Analyse verwendet. Durch Fluoreszenzantikör-

per wurden Thrombozyten (*PE anti mouse GPIIb*, Emfret), Neutrophile (*APC anti mouse Ly6G*, Biolegend) und Leukozyten (*APC anti mouse CD45*, BD Bioscience) markiert. Im Durchflusszytometer wurden die Messparameter so eingestellt, dass nach einer Gesamtzahl von 3×10^5 Ereignissen nur doppelt-positive Ereignisse ausgewertet wurden. Hierzu wurde zunächst das Signal der Neutrophilen bzw. Leukozyten erfasst. Mit einem weiteren Filter wurde innerhalb dieses Signals zusätzlich das Thrombozytensignal erfasst. Zur Auswertung wurde der MFI des Leukozyten – bzw. Neutrophilensignals doppelt – positiver Zellen erfasst.

3.4 Proteinbiochemische Analysen

3.4.1 Das Western - Blot – System

Mit dem Western – Blot - System werden Proteine eines Lysates elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt, auf eine Membran transferiert (der sog. „Western-Blot“) und schließlich über eine Antikörperreaktion nachgewiesen.

Zunächst werden Lysate von Zellen, Geweben, etc. hergestellt und die Proteine elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt. Hier wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Page (Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamid-gelelektrophorese, engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel*) nach Laemmli (1970) angewendet. Für die Auftrennung der Proteine wird ein Polyacrylamidgel, bestehend aus einem Trenn – (10 %) und einem Sammelgel (5 %), die sich in Porengröße und pH - Wert unterscheiden, in einer Gelelektrophoresekammer gegossen. Nach ausreichender Auspolymerisierung des Gels wurde in die Kammer ein 1 x TGE – Laufpuffer eingefüllt und das Gel, mit den zuvor für 5 Min bei 95 °C in 1 x Laemmli - Puffer aufgekochten Proben, beladen. Dieser Laemmli - Puffer besteht unter anderem aus SDS und DTT (Dithiothreitol), welches die Proteine durch Reduktion der Disulfidbrücken linearisiert. Zusätzlich wurde ein Molekulargewichtsmarker (Biorad) auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Trenn - und Sammelgels

Bestandteile	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
4 × Sammelgel-Puffer pH = 6.8	-	1.25 ml
4 × Trenngel-Puffer pH = 8.8	3.75 ml	-
dest. Wasser	7.25 ml	3.05 ml
Acrylamid 30 %	4 ml	650 µl

APS 10 %	100 μ l	25 μ l
TEMED	100 μ l	5 μ l

Da die Proteine durch das anionische SDS gleichmäßig negativ beladen waren, migrierten sie nach der Anlegung einer Spannung von 25 mA mit einer Geschwindigkeit gemäß ihrer Größe zur Anode durch das Gel, wobei sie sich erst auf einer Höhe im Sammelgel konzentrierten, um dann im Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt zu werden. Im Trenngel bildete sich durch das im Laemmli - Puffer enthaltene Bromphenolblau eine sog. „Lauffront“, welche das untere Ende der Laufspur der Proteine kennzeichnete. Sobald die Lauffront aus der Elektrophoresekammer herausgelaufen war, wurde der Lauf gestoppt.

Danach folgte der eigentliche „Western - Blot“, in diesem Fall das sog. „*Semi-Dry – Western – Blot*“ Verfahren. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf eine Trägermembran übertragen („geblottet“). Hierzu wurde das Gel in ein System aus Filterpapieren und verschiedenen Puffern gebracht. Die Reihenfolge und Anzahl der Filterpapiere innerhalb eines Blots folgte einer bestimmten Anordnung (s. Abb. 8).

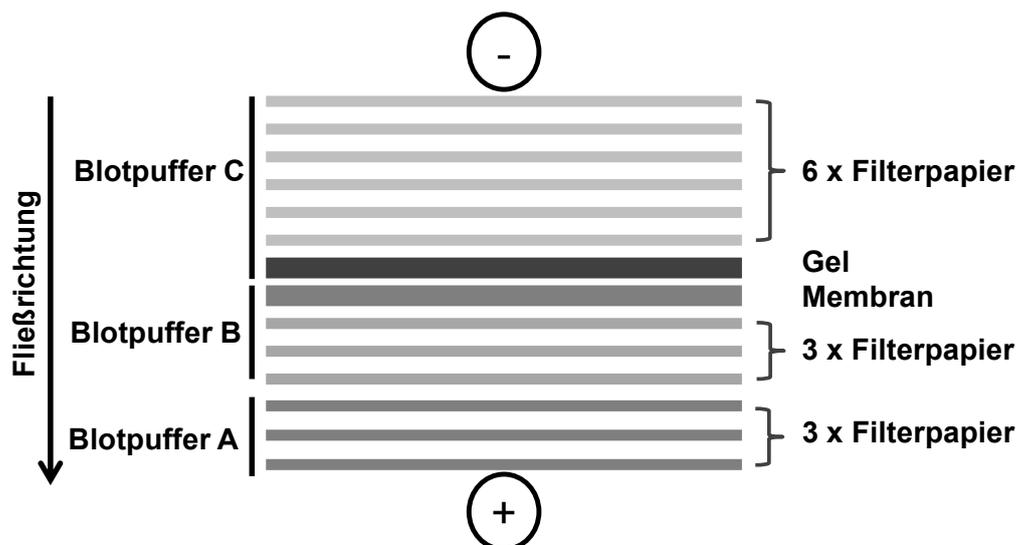


Abbildung 8: Aufbau eines Blots innerhalb des Western – Blot – Verfahrens. Das Gel wird in Blotpuffer C äquilibriert, die Membran für ca. 15 Sek im Blotpuffer B aktiviert und die Filter-

papiere in entsprechenden Blotpuffern befeuchtet. Es folgt der Aufbau entgegen der Fließrichtung von Anode zur Kathode.

Tabelle 16: Blotpuffer - Zusammensetzung

Bestandteile	Blotpuffer A	Blotpuffer B	Blotpuffer C
Tris	18,15 g	1,515	-
Aminocarbonsäure	-	-	2,6 g
MeOH	100 ml	100 ml	100 ml
A.dest	400 ml	400 ml	400 ml
pH-Wert	10,4	10,4	-

Durch eine senkrecht angelegte Spannung von 70 mA pro Gel in der Blotkammer, migrierten die negativ geladenen Proteine Richtung Anode und blieben auf einer Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen haften, sodass das Laufmuster der aufgetrennten Proteine exakt auf die Membran übertragen wurde.

Um den korrekten Transfer der Proteine auf die Membran zu kontrollieren, wurde die Membran mit einer Ponceau – Lösung (Sigma) für ca. 2 Min angefärbt und die überschüssige Ponceau - Lösung mit *A. dest*, bis klare Banden sichtbar wurden, abgespült. Nach visueller Kontrolle, wurde die Membran wieder mit NaOH - Lösung entfärbt und kurz mit *A. dest* gespült.

Die spezifische Visualisierung eines bestimmten Proteins wurde mittels einer Antikörperfärbung erreicht. Je nach Antikörper wurde das vorgeschlagene Protokoll des Datenblatts des Herstellers verwendet. Allgemein wurden unspezifische Bindungsstellen mit einer übersättigten Proteinlösung für 1 h bei RT abgeblockt und anschließend mit einem entsprechenden Primärantikörper bei 4 °C ü/N auf einem Rollmischer inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimalig gewaschen und dann für ca. 1 h bei RT mit einem Gemisch aus Sekundärantikörper und StrepTactin - HRP [1 : 2500] inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran gewaschen und mit einer ECL - Entwicklerlösung, bestehend aus einer Peroxidaselösung und Luminol (Bio Rad), für 5 Min bei RT inkubiert. Das sich in der Entwicklerlösung befindliche Luminol reagierte mit der

am Sekundärantikörper gebundenen, katalytisch wirkenden Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*; HRP), was zu einer Chemilumineszenzreaktion unter Emmission von bläulichem Licht führte. Die Visualisierung des gebundenen Antikörpers und somit der indirekte Nachweis eines Proteins, fand mit einem Chemiluminescence Imager System (Bio Rad) statt.

3.4.1.1 Nachweis von SRC - und PLC γ 2 – Phosphorylierung

Um die Phosphorylierung von SRC und PLC γ 2 nach Aktivierung des GPVI - bzw. GPIb - Signalwegs in Thrombozyten nachzuweisen, wurden Thrombozyten mit CRP (20 μ g / ml) oder Botrocetin (2 μ g / ml) unterschiedlich lang stimuliert, lysiert (15 mM HCL, 155 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.005 % NaN₃, 1 % IG-PAL, 1 x PI), über Gelelektrophorese separiert und auf eine Nitrocellulosemembran (GE Healthcare) transferiert. Da Botrocetin nur in Kombination mit vWF zu einer Stimulation führt, wurden für diese Ansätze 96 – Well- Platten mit vWF- Antikörper (*Polyclonal rabbit anti human von – Willebrand - Factor*, DAKO, 1 h / 37°C) gecoated und dann mit murinem Plasma für 2 h bei 37 °C inkubiert. Der Antikörper band den im Plasma enthaltenen vWF, sodass eine vWF – Matrix entstand. Nach dem Blotten wurde die Membran mit 5 % Milchpulver / PBS - T (PBS mit 0.1% Tween 20) geblockt und mit den Primärantikörpern, gerichtet gegen die phosphorylierte Isoform von SRC bzw. PLC γ 2 (*Polyclonal Phospho - SRC Family (try416) antibody Rabbit anti mouse*, Cell Signaling; *Phospho - PLC γ 2 (Tyr759) antibody Rabbit anti mouse*, Cell Signaling) ü/N bei 4 °C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Membran mit PBS - T, wurde die Membran mit einem entsprechendem HRP - markiertem Sekundärantikörper (*ECL Anti Rabbit IgG horseradish Peroxidase linked F(ab) 2 fragment*, GE Healthcare) für ca. 1 h bei RT inkubiert. Die Visualisierung erfolgte wie unter Punkt 3.4.1 beschrieben.

3.4.2 Ko - Immunpräzipitation von PLD1 und SRC

Bei der Immunpräzipitation (IP) handelt es sich um eine molekularbiologische *in vitro* Methode, mit der potentielle Interaktionspartner von Proteinen identifiziert werden können. Dieses Verfahren ermöglicht es, mithilfe eines Antikörpers ein Antigen und dessen Interaktionspartner aus einem Proteinlysate heraus zu präzipitieren. Der Antikörper wird danach mit seinen Bindungspartnern an Agarose - oder Sepharose - Kügelchen gebunden und kann so vom Proteingemisch separiert werden. Durch Hitzeeinfluss wird der Antikörper wieder von den Kügelchen gelöst und der Nachweise des präzipitierten Bindeproteins bzw. seiner assoziierten Proteine kann z. B. über einen Western - Blot detektiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Thrombozyten aus heparinisiertem Blut standardmäßig isoliert, die Thrombozyten von drei Mäusen vereint (1×10^9), bei 650 g für 5 Min runterzentrifugiert, das Thrombozytenpellet in 150 μ l Tyrode - Puffer resuspendiert und in der gleichen Menge Lysepuffer für 45 Min bei 4 °C rollend lysiert. Das Thrombozytenlysate wurde bei 4 °C und 14000 rpm für 5 Min runterzentrifugiert und der Überstand (300 μ l) mit einem Bindeantikörper, gerichtet gegen PLD1 (*Rabbit anti mouse PLD1*, Cell Signaling) in einem Verhältnis von [1 : 50] für 1 h bei 4 °C rollend inkubiert. Um die mögliche Unspezifität des Bindeantikörpers zu kontrollieren, wurde zusätzlich ein Ansatz mit einer Isotypenkontrolle (*Rabbit (Da1E) mAb IgGXP Isotyp Control*, Cell Signaling) hergestellt. Da die Protein G - Sepharose (GE Healthcare) in 70 % EtOH aufbewahrt wird, musste sie vor der Verwendung mit IP - Puffer gewaschen werden. Pro Ansatz wurden hierzu 50 μ l der Sepharose mit 1 ml IP - Puffer dreimalig über Zentrifugation bei 4 °C und 14000 rpm für 1 Min gewaschen und der Überstand entfernt. Die Zelllysate - Antikörper - Suspension wurde in die vorbereitete Sepharose überführt und die Proteinfällung erfolgte ü/N rotierend bei 4 °C. Am Folgetag wurde die Suspension bei 4 °C für 5 min bei 14000 rpm runterzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Unterstand wurde einmalig mit 1 ml 10 % IGPAL / IP - Puffer und zweimalig mit 1 ml IP - Puffer über Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 5 Min gewaschen und der Überstand verworfen. Die

Trennung des präzipitierten Proteinkomplexes von der Sepharose erfolgte über ein 5 minütiges Erhitzen der Proben bei 95 °C in 50 µl 2 x Lämmli - Puffer + 5 % β - Mercaptoethanol. Die Detektion des Binde (PLD1) – und des möglichen Interaktionsproteins (SRC) erfolgte über das wie zuvor beschriebene Western – Blot - Verfahren mit geeigneten Primär - (*Rabbit anti mouse PLD1*, Cell Signaling; *SRC (36D10) rabbit m Ab*, Cell Signaling) und Sekundärantikörpern (*ECL Anti Rabbit IgG horseradish Peroxidase linked F(ab) 2 fragment*, GE Healthcare).

3.4.3 ELISA – Assay

Zum Nachweis oder zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen in einer Lösung wird oftmals das ELISA (engl. *Enzyme - linked Immunosorbent Assay*) – Verfahren angewendet. Es handelt sich hierbei um ein antikörperbasiertes Verfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Hierbei bindet ein Enzym – markierter Antikörper an sein entsprechendes Antigen. Ein Substrat wird von diesem Enzym umgesetzt, was einen Farbumschlag der Lösung zur Folge hat. Die Signalstärke dieses Farbumschlages kann mit einem Photometer detektiert und mit einer speziellen Software verrechnet werden, sodass der Nachweis und die Quantifizierung eines Proteins indirekt ermittelt werden kann.

In dieser Arbeit wurde die Variante des Sandwich – ELISAs, basierend auf den DuoSet ELISA Kits der Firma R&D Systems nach ein und demselben Protokoll, jedoch mit wechselnden Antikörpern, genutzt. Bei dieser Form des ELISAs werden zwei Antikörper für den Nachweis verwendet, die an unterschiedliche Bindungsstellen des gleichen Epitops binden. Der Nachweis erfolgt in 96 – Well – Platten (Sarstedt). Für alle Pipettierschritte sollte stets eine Multipette (Eppendorf) verwendet werden, um unnötige Zeitverzögerungen und Pipettierfehler zu vermeiden. Zunächst wurde mit 50 µl eines Erst (engl. *Capture*) – Antikörpers / PBS der Boden einer 96 - Platte ü/N bei RT beschichtet. Am Folgetag wurde die Lösung ausgekippt und die Platte mehrfach kopfüber auf einem Pa-

piertuch vorsichtig ausgeklopft, bis keine Flüssigkeit mehr auf dem Tuch zu sehen war. Dieser „Trocknungsvorgang“ wurde nach jedem Wasch - und Inkubationsschritt wiederholt, damit es zu keiner Bindungsstörung während der Folgeinkubation kommt. Mit 150 µl einer übersättigten Proteinlösung (1 % BSA / PBS) wurden unspezifische Bindungsstellen für 1 h / RT abgeblockt. Nach dreimaligem Waschen der Wells mit 150 µl Waschpuffer (R&D Systems), wird ein Proteinstandard, auch Standardreihe genannt, zur Doppelwertbestimmung und die zu analysierende Probe mit je 50 µl pro Well aufgetragen. Mit der Standardreihe wird softwarebasierend bei der finalen Messung eine Standardkurve erstellt, mit welcher die Quantifizierung eines Proteins ermittelt werden kann. Die Präparation des Standards erfolgte stets nach Empfehlung des Datenblattes des jeweiligen antikörperspezifischen Kits. Während der Inkubation von 2 h bei RT band das nachzuweisende Antigen aus der Probe an den *Capture* – Antikörper. Nach der Inkubation wurde die Platte abermals dreimalig mit Waschpuffer gewaschen, um nichtgebundenes Probenmaterial zu entfernen. Pro Well wurden 50 µl eines biotinylierten Zweit (engl. *Detection*) – Antikörpers / 1 % BSA / PBS aufgetragen, welcher sich an eine andere Bindestelle ans Epitop als der Erst – Antikörper band. Der Name Sandwich – ELISA leitet sich von diesem nun entstanden Antikörper – Antigen – Antikörper - Komplex ab. Auch überschüssige Zweit – Antikörper - Lösung wurde durch wiederholtes Waschen mit 150 µl Waschpuffer entfernt. Danach wurden 50 µl einer Streptavidin – HRP / 1 % BSA / PBS – Lösung auf die Wells für 20 Min bei RT unter Lichtausschluss gebracht. Anschließend wurde mit einem Chromogen in Form von 50 µl Substrat – Lösung für 20 Min bei RT im Dunkeln inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde das Chromogen von der HRP gespalten, was sich in einem blauen Farbumschlag zeigte. Die Reaktion wurde mit 25 µl Stop – Solution, welche eine pH – Wert – Änderung bedingt, beendet und es fand ein erneuter Farbumschlag (gelb) statt. Die Messung der Proben wurde mithilfe eines ELISA – Readers (Tecan) und der Absorption bei 450 nm durchgeführt.

3.4.3.1 Endotheliale IL – 6 Sekretion nach Thrombozytenstimulation

Wie bereits unter 3.2.1.1 beschrieben, wurde die Auswirkung von aktivierten Thrombozyten auf Endothelzellen analysiert. Hierzu wurden Endothelzellen in Koinkubation mit aktivierten Thrombozyten für 3.5 h gebracht, der Überstand nach der Inkubationszeit abgenommen und bei 600 g für 5 Min runterzentrifugiert. Die IL – 6 Konzentration in diesem Überstand wurde mit einem IL – 6 ELISA Kit (*DuoSet Mouse IL-6 ELISA*, R&D Systems) ermittelt.

3.4.3.2 TGF – β – Plasmaspiegel der Knochenmarkchimären

Um den Gehalt der Plasmazytokines TGF – β im Plasma von knochenmarkschimären Tieren zu bestimmen, wurde PPP dieser Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten (4 h, 24 h, 3 d, 21 d) nach myokardialer Ischämie / Reperfusion isoliert und über einen Sandwich – ELISA - Assay gemessen. Unter der Verwendung des Kits von R&D Systems (*mouse TGF - β DuoSet ELISA*, #DY1679-05) wurde die Messung nach vorgeschlagener Anwendung des Herstellers durchgeführt.

3.4.3.3 IL – 1 β - Plasmaspiegel DMSO / FIPI – behandelte Tiere

Für die Konzentrationsbestimmung von IL – 1 β im Plasma von DMSO / FIPI behandelte Tiere 24 h nach Ischämie / Reperfusion wurde der DuoSet Mouse IL-1 β /IL-1F2 ELISA (R&D Systems) verwendet. Hierzu war bei der Präparation des Plasmas, welches als „Nebenprodukt“ bei der Isolierung von Thrombozyten entsteht, darauf zu achten, dass das Plasma nicht zusätzlich durch Tyrode - Puffer verdünnt wird. Daher wurde bei der Thrombozytenisolierung auf die erneute Resuspendierung des Erythrozyten – Pellets in 200 μ l Tyrode verzichtet und das PRP nur einmal abgenommen, bei 650 g für 5 Min runterzentrifugiert und das so entstandene PPP für die Analyse verwendet.

3.5 Molekularbiologische Verfahren

3.5.1 Genotypisierung

Bei einer Genotypisierung handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, mit welcher der Genotyp über eine PCR z. B. von einem Versuchstier ermittelt werden kann. Für diese Methode sind drei Schritte erforderlich: 1. DNA - Extraktion aus Geweben bzw., Zellen 2. Vervielfältigung der DNA mittels PCR 3. Nachweis des amplifizierten Gens über Gelelektrophorese.

3.5.1.1 Genotypisierung über Ohrstanzen – Biopsien

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Genotypisierung unter Beachtung des Protokolls des „*KAPA – Mouse - Genotyping Hot Start Kit*“ der Firma PeqLab. Die PLD1 konst. - Versuchstiere wurden mittels Ohrstanzen gekennzeichnet und die dabei entstandenen Biopsien wurden für die Genotypisierung verwendet.

Für die DNA – Extraktion wurden die Ohrstanzen in einem Puffer – Enzymgemisch für 10 Min bei 75 °C aufgeköcht und die Zellen lysiert. Das Enzym wurde anschließend über Hitzeeinwirkung für 9 Min bei 95 °C inaktiviert. Nicht lysierte Bestandteile wurden aus dem Lysat über Zentrifugation für 90 Sek. bei 14000 rpm entfernt und der Überstand (DNA – Extrakt) in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Für die folgende PCR sind in Tabelle 18 alle benötigten Reagenzien und ihre entsprechenden Volumina für einen 25 µl Ansatz pro Probe aufgeführt. Für die Amplifizierung von Pld1 wurden folgende Primer - Sequenzen verwendet:

Tabelle 17: Primersequenzen für *Pld1* - Genotypisierung

PLD1 - 047 WT for	'GAAAGGGATAGGAAAGTCCAGG'
PLD1 - 049 KO for	'GGGTGGAAAGAGAACCCATAG'
PLD1 rev	'GGAGCCCAATAGGTAGAGTG'

Die PCR – Ansätze wurden nach folgendem Protokoll im Thermocycler (Eppendorf) inkubiert:

1. Init. Denaturation	95 °C	3 Min	32 Zyklen
2. Denaturation	95 °C	15 Sek	
3. Annealing	58 °C	15 Sek	
4. Elongation	72 °C	15 Sek	
5. finale Elongation	72 °C	3 Min	
6. Storage	4°C	for ever	

Die hierbei entstandenen Produkte sind für *Pld1* – wt 450 bp und für *Pld1* – ko 458 bp groß und wurden in einer Gelelektrophorese mit einem 1 % Agarosegel / TAE - Puffer unter Verwendung von Midori Green (Biozym) nachgewiesen.

Tabelle 18: Zusammensetzung eines PCR – Ansatzes pro Probe

DNase freies Wasser	7.75 µl
Primer WT for	1.25 µl
Primer KO for	1.25 µl
Primer rev	1.25 µl
KAPA - Mix	12.5 µl
DNA - Extrakt	1 µl

3.5.1.2 Blut – Genotypisierung der Knochenmarkschimären

Um den Erfolg der Generierung von Knochenmarkschimären und den verbliebenen Anteil an Heterozygotie der Blutzellen zu überprüfen, wurde eine Genotypisierung über die Blutzellen durchgeführt. Hierzu wurde aus 200 µl heparini-

siertem Blut mithilfe des „ReliaPrep Blood gDNA Miniprep System“ – Kit (Promega) DNA nach empfohlenem Protokoll extrahiert und für die PCR eine definierte Menge an DNA (60 ng / µl) verwendet. Das weiterführende Protokoll wurde wie unter 3.3.1.1 beschrieben angewendet.

3.5.2 qRT – PCR

Bei der quantitative Echtzeit - PCR (qRT – PCR; engl. *real - time quantitative PCR*) kann mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen die Amplifizierung von PCR – Produkten in Echtzeit dokumentiert und so eine quantitative Aussage über spezifische Transkripte getroffen werden. Für die Durchführung sind drei Schritte notwendig: 1. Isolierung von RNA; 2. Synthese von cDNA; 3. Syber Green basierte qRT – PCR.

3.5.2.1 Isolierung von RNA aus murinen Herzlysaten

Für die Isolierung der RNA aus murinen Herzen wurde in dieser Arbeit das ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System Kit (Promega) mit dem empfohlenen modifizierten Protokoll für nicht fibröses Gewebe verwendet.

Die Herzen wurden wie bereits beschrieben, gespült und dem Tier entnommen. Für die Analysen wurde der linke Ventrikel verwendet, da nur dieser Teil des Herzens vom Ischämieschaden betroffen war. Der LV wurde gewogen und manuell unter Verwendung eines Mörsers und Flüssigstickstoff pulverisiert ohne dass es zum Auftauen des Gewebes kam. Unverzüglich wurde das Pulver in den zuvor präparierten Lysepuffer überführt. Da das Protokoll des Kits nur eine Masse von bis zu 20 mg berücksichtigt, wurden hier die Volumina an das Gewicht des LV angeglichen, was im Durchschnitt die Verwendung eines 6fachen Volumens bedeutete. Für die Lyse wurde das Gewebe – Lysepuffer – Gemisch 7 – 10 mal auf – und abpipettiert, die Hälfte des Volumens abgenommen und für eventuelle Isolierungswiederholungen bei – 80 °C weggefroren. Zum ver-

bliebenen Lysat wurde ein angepasstes Volumen an RDB – Puffer zugegeben und für mind. 10 Sek. gevortext. Es folgte eine 1 minütige Inkubation bei RT. Die nun lysierten Proben wurden 3 Min bei 14000 g herunterzentrifugiert, um nicht lysiertes Material zu entfernen. Der Überstand wurde mit einem angepassten Volumen Isopropanol zur Waschung des Lysats durch 2 – 3maliges Invertieren gewaschen. Danach folgte die Isolierung der RNA über ein Säulen – System: 700 µl des gereinigten Lysats wurde auf die Säule gegeben und 1 Min bei 14000 g zentrifugiert. Mit 500 µl RNA Wash Solution wurde die RNA für 30 Sek bei 14000 g gewaschen. Danach wurden 30 µl eines *DNase incubation Mix* auf die Säule gegeben und für 15 Min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 200 µl Column Wash Solution für 15 Sek. bei 14000 g gereinigt und die gebundenen RNA zweimalig mit 500 µl RNA Wash Solution bei 14000 g für 30 Sek bzw. 2 Min gewaschen. Die so isolierte RNA wurde in 20 µl RNase freiem Wasser über eine Zentrifugation bei 14000 g über 1 Min aufgenommen und ihre Menge und Reinheit in einer [1:10] Verdünnung in RNase freiem Wasser photometrisch bestimmt. Das Eluat wurde bei - 80 °C aufbewahrt.

3.5.2.2 Synthese von cDNA

Für die cDNA – Synthese über reverse Transkription wurde das *In PromII Reverse transcription System Kit* (Promega) verwendet.

Zunächst erfolgte ein DNase – Verdau unter Zuhilfenahme von *DNaseI recombinant; RNase - free* (Roche). Hierzu wurden 0.4 µg RNA eingesetzt. Die benötigte Menge RNA – Eluat wurde berechnet und mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 18 µl gebracht. Dieser RNA – Ansatz wurde mit 2 µl DNaseI (Roche) versetzt und im Thermocycler (Eppendorf) für 30 Min bei 37°C erwärmt und für 10 Min bei 75 °C erhitzt, um die Aktivität der DNase zu inaktivieren.

Es folgte die cDNA – Synthese. Die 20 µl des RNA – Ansatzes wurden mit 2 µl Primer (Oligo(dT)) versetzt. Pro Probenansatz wurden 9 µl eines Mastermixes angesetzt, dessen Reagenzien im Kit enthalten waren:

Tabelle 19: Mastermixzusammensetzung für cDNA – Synthese pro Ansatz

ImProm-II 5x Reaction Buffer	4 µl
MgCl ₂ (7 mM)	2.5 µl
dNTP Mix (0,5mM je dNTP)	1 µl
Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	0.5 µl
ImProm-II Reverse Transcriptase	1 µl

Die cDNA – Synthese erfolgte im Thermocycler mit folgendem Programm:

Tabelle 20: Thermocycler – Programm für cDNA - Synthese

Annealing	25 °C, 5 Min
Extension	42 °C, 60 Min
Inaktivierung der reversen Transkriptase	72 °C, 15 Min

3.5.2.3 Syber Green basierte qRT – PCR

Für die Analyse der RNA aus linksventrikulären Lysaten wurde hier eine auf der Verwendung von Syber Green basierende qRT - PCR (quantitative Echtzeit – PCR, engl. real-time quantitative PCR) durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Herzentnahme wurden Gene exprimiert, welche im vorhergegangenen Schritt über reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurden. So ist es möglich über die Verwendung spezifischer Primer diese Gene im Speziellen zu betrachten. Als Referenz zum Vergleich der Proben untereinander, wurden sog. „*house keeping gens*“, in diesem Fall GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), ebenfalls amplifiziert. Von diesen Referenzgenen wird ausgegangen, dass sie konstant in einer Zelle exprimiert werden und daher zum Abgleich herangezogen werden können. Die Detektion der PCR – Produkte findet hierbei über sequenzenunspezifische Fluoreszenzsignale (Syber Green) statt,

welche mittels des Detektionsgeräts ViiA7 (Applied Bioscience) erfasst werden können. Während der PCR findet eine Zunahme der Amplifikate statt und somit proportional ihre Fluoreszenzintensität, was bei dieser Methode in Echtzeit dokumentiert wird.

Für die zu analysierenden RNA – Proben wurden hier Dublettmessungen pro Ziel – und Referenzgen durchgeführt. Pro Ansatz wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl verwendet mit einer Probeneinwaage von 2 µl cDNA und 18 µl eines Mastermixes. Der Mastermix setzte sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

Tabelle 21: Zusammensetzung des Mastermixes für qRT – PCR pro Ansatz

Fast Cyber Green Master Mix	10 µl
<i>A. dest</i>	6 µl
Primer for	1 µl
Primer rev	1 µl

Tabelle 22: Primersequenzen für qRT - PCR

GAPDH for	'GGTGAAGGCGGTGTGAACG'
GAPDH rev	'CTCGCTCCTGGAAGATGGTG'
TNF – α for	'GCCCCACTCTGACCCCTTT'
TNF – α rev	'GGGGCTGGCTCTGTGAGGAA'
IL – 6 for	'ACTCGGCAAACCTAGTGCGTTATG'
IL – 6 rev	ACATTCCAAGAAACCATCTGGCTAG
BAX for	'TGAAGACAGGGGCCTttTTG'
BAX rev	'AATTCGCCGGAGACACTCG'
Bcl – 2 for	'ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA'
Bcl – 2 rev	'CATGCTGGGGCCATATAGTT'
Bcl – xl for	'GACAAGGAGATGCAGGTATTGG'
Bcl –xl rev	'TCCCGTAGAGACCACAAAAGT'

Die PCR wurde für die unterschiedlichen Zielgene unter folgenden Programmen durchgeführt:

Tabelle 23: Programm der qRT – PCR

Zielgen	GAPDH	TNF - α	IL - 6	BAX	Bcl - 2	Bcl - xl
Zyklen	35	35	35	35	35	35
Denaturierung (°C)	2 Min / 90 °C					
Primer Annealing (°C)	62 / 58	62	62	62	58	58
Elongation (°C)	10 sec / 95 °C	10 sec / 95 °C	10 sec / 95 °C			

Die Auswertung der qRT – PCR erfolgte über den gemessenen CT - Wert (Schwellenwert, engl. *cycle threshold*) des Ziel – bzw. Referenzgens einer Probe. Dieser Wert gibt den Beginn des exponentiellen Wachstums einer Amplifizierung an, d. h. er beschreibt den Zeitpunkt in einer exponentiellen Kurve, an welcher die gemessene Fluoreszenz den Hintergrundwert übersteigt. Während der PCR wird die cDNA denaturiert und liegt in Einzelsträngen vor, an die das Syber Green nicht oder nur basal binden kann. Zu diesem Zeitpunkt ist die Fluoreszenzintensität oder Hintergrundfluoreszenz sehr gering. Da sich der Farbstoff gut an Doppelsträngen anlagert, erhöht sich die Fluoreszenzintensität stetig mit der Amplifizierung weiterer PCR – Produkte. Dies bedeutet, dass je weniger cDNA des Zielgens in der Probe vorhanden war, umso höher ist ihr CT – Wert, da hier der Zeitpunkt des exponentiellen Wachstums zu einem späteren Zeitpunkt erreicht wird.

Der Vergleich der Proben untereinander geschah über den $2^{\Delta\Delta CT}$ – Wert, bei dem der Abgleich des Referenzgens mit einbezogen wurde. Dieser Wert gibt den relativen Expressionsunterschied im Vergleich von Probengruppen an. Er wird wie folgt berechnet:

Sowohl vom Ziel – als auch vom Referenzgen wird der Mittelwert der CT-Dubletts gezogen. Durch die Subtraktion des CT - MW des Referenzgens vom CT - MW des Zielgens innerhalb einer Probe, wurde der sog. Δ CT erhalten. Unter der Annahme, dass mehrere Probengruppen, bestehend aus mehreren Einzelproben miteinander verglichen werden sollen, wurde danach der MW der Δ CTs der Referenzgruppe gebildet. Dieser MW - Δ CT - Referenzgruppe wurde dann von den Einzel - Δ CTs innerhalb der Zielgruppe und auch innerhalb der Referenzgruppe subtrahiert, wodurch der $\Delta\Delta$ CT erhalten wurde. Aus diesem $\Delta\Delta$ CT – Wert wurde die zweifach - negative Potenz ($2^{-\Delta\Delta$ CT – Wert) gezogen. Mit diesem Wert ließen sich die verschiedenen Zielgene (TNF – α , IL-6, Bax, Bcl - xl, Bcl – 2) der mit FIPI bzw. DMSO behandelten C57BL/6J - Tiere 24 h nach Ischämie / Reperfusion miteinander vergleichen.

3.6 Histologische Verfahren

3.6.1 Fixierung von Mausherzen in Paraffin

Für histologische Analysen wurden infarzierte Herzen nach unterschiedlichen Rekonvaleszenzzeiten (24 h, 21 d) in Paraffin eingebettet. Die Tötung der Tiere geschah nach erfolgreicher Anästhesie mit Ketamin [100 mg / kg] / Xylazin [10 mg / kg] über die Öffnung des Thorax und die Spülung des Herzens mit ca. 4 ml gekühlter Heparinlösung (20 U / ml in PBS, Roche), um eine Aggregation des Blutes im Gewebe zu verhindern. Die Heparinlösung wurde in die *Apex cordis* des linken Ventrikels des noch schlagenden Herzens appliziert und um einen Durchfluss zu versichern, wurde der rechte Herzvorhof geöffnet. Das Herz wurde entnommen, kurz in gekühltem PBS gewaschen, die Vorhöfe entfernt und für mindestens 24 h in 4 % PFA fixiert. Nach der Fixierung wurden die Organe kurz in fließendem Leitungswasser gewaschen, in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und für 12 h in Rotihistol inkubiert. Danach wurden sie für 6 h in flüssiges Paraffin (Roth) gegeben und schließlich eingebettet.

Nach einer Aushärtung des Paraffins für mindestens 24 h bei 4 °C, wurden die Herzen in 5 µm Schnitte mit einem Microtom (Heidelberg GmbH), beginnend mit der Herzspitze, geschnitten. Um eine Vergleichbarkeit in der Histologie zu schaffen, wurden die Herzen in Ebenen unterteilt, wobei je 20 Schnitte auf Objektträger (Marienfeld) aufgezogen und 30 Schnitte verworfen wurden. Jedes Herz wurde so in ca. 10 Ebenen unterteilt. Die Schnitte wurden zusätzlich durch eine Inkubation von 30 Min bei 50 °C am Objektträger hitzefixiert.

Für die folgenden histologischen Färbungen wurden die Schnitte vor der Färbung über eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und nach der Färbung über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, um schließlich mit Histokitt blasenfrei unter einem Deckglas konserviert zu werden („eindeckeln“).

Tabelle 24: Alkoholreihen

absteigende Alkoholreihe		aufsteigende Alkoholreihe	
10 – 15 Min	Roti Histol	2 Min	70 % EtOH
2 Min	100 % EtOH	2 Min (2 x)	96 % EtOH
2 Min (2 x)	96 % EtOH	2 Min	100 % EtOH
2 Min	70 % EtOH	5 – 10 Min	Roti Histol

3.6.2 Die Gomori - Trichrom – Färbung

Die Gomori – Trichrom – Färbung ist eine histologische Übersichtsfärbungsmethode, mit welcher unterschiedliche Gewebestrukturen innerhalb eines histologisch präpariertem Gewebeschnitts kenntlich gemacht werden können. Sie kann u. a. dazu dienen, Bindegewebseinlagerungen wie Kollagen, Hauptbestandteil einer Narbe, sichtbar zu machen. In dieser Arbeit wurde sie dazu verwendet, die Infarktgröße in Mausherzen 21 Tage nach Ischämie/ Reperfusion zu bestimmen.

Hierzu wurden die Herzen wie unter 3.4.1 beschrieben präpariert. Um eine prozentuale Durchschnittsgröße des Infarktes zu erlangen, wurde aus jeder Ebene des Herzens ein Schnitt für die Färbung verwendet. Die Schnitte wurden zweimal für 15 Min in RotiHistol (Roth) vom Paraffin befreit und in einer absteigenden Alkoholreihe entwässert. Es folgte eine Inkubation in 56 °C warmer Bouin´s Lösung (Sigma) für 15 Min mit anschließendem Waschen unter fließendem Leistungswasser für 5 Min. Danach wurden die Schnitte für 5 Min in Weigerts Eisen Hämatoxylin Lösung (Dr. K. Hollborn & Söhne) inkubiert und abermals für 5 min unter fließendem Leistungswasser gespült. Die Präparate wurden dann für 25 Min in Gomori – Lösung (0.6 g Chromotrope, 0.3 g Anilinblau, 1 % Essigsäure, 0.8 g Wolframatophosphorsäure-Hydrat) inkubiert und zweimal für 2 Min in einer 0.5 % Essigsäure - Lösung (in *A. dest*) von der überschüssigen Gomori - Lösung befreit. Die Fixierung der Färbung erfolgte in einer aufsteigenden Al-

koholreihe mit anschließender zweimaliger Inkubation für 5 Min in RotiHistol (Roth) und der Versiegelung in Roti – Histokitt (Roth). In der Dokumentation mit einem Binokular (Nikon SMZ25) zeigten sich die Muskelfasern rot, die Nucleoli blau - schwarz und das Narbengewebe, der Infarkt, blau. Für die Auswertung wurde pro Ebene 1 Schnitt angefärbt, der Infarktbereich in Relation zum linken Ventrikel pro Ebene gesetzt und der Mittelwert gebildet.

3.6.3 Die Hämalaun - Eosin (HE) – Färbung

Die Hämalaun - Eosin (HE) – Färbung ist eine standardisierte Methode zur Übersichtsfärbung von histologischen Schnittpräparaten. Sie besteht aus zwei Farbstoffen die unterschiedlich mit den Gewebestandteilen reagieren. Das basische Hämalaun reagiert mit Elementen welche sauer sind, färbt diese blau und wird vorzugsweise für die Markierung von Zellkernen verwendet. Das Eosin reagiert mit basischem Material, wozu z. B. Zytoplasmaproteine und Kollagen gehören und färbt dieses rot an. Morphologische Veränderungen im Gewebe können so mikroskopisch erfasst werden.

Mithilfe dieser Färbung konnte hier die Einwanderung von Zellen an der Infarktgrenze im Herzen analysiert werden. Die Paraffin - Herzschnitte wurden entparaffinisiert, für 10 Min in Hämalaun – Lösung (Hersteller) inkubiert und kurz mit Leitungswasser gewaschen. Es folgte eine 60 Sek. Inkubation in 1 % HCL / 70 % EtOH und eine 10 minütige Inkubation in fließendem Leitungswasser. Danach kamen die Schnitte für 20 Sek. in 1 % Eosin – Lösung, wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und in Histokitt (Roth) versiegelt. Die Auszählung der immigrierten Zellen an der Infarktgrenze erfolgte manuell an 5 Bildern pro Schnitt.

3.6.4 Immunhistochemie über das DAB – System

Nach der Auszählung der immigrierten Zellen in das infarzierte Gewebe sollte die Infiltration von inflammatorischen Zellen spezifiziert und eine mögliche Veränderung in der Apoptose, über den Nachweise aktivierter Caspase - 3 analysiert werden. Hierzu wurde eine immunhistologische Antikörperfärbung, basierend auf einem DAB (Diaminobenzidin) – Färbesystem, durchgeführt. Das DAB – basierte Prinzip für die Färbung der Immunzellen als auch für den Nachweis aktivierter Caspase – 3 gestaltete sich gleich, wobei die zugrunde liegenden Protokolle im Detail voneinander abweichen.

In beiden Protokollen wurden die Herzschnitte zunächst über eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und dreimalig für 5 Min in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte in Citratpuffer (0.1 M Na - Citrat; 0.1M Citronensäure, A. dest, pH 6.0) in der Mikrowelle für 25 Min aufgekocht. Durch die Fixierung mit Paraformaldehyd sind Vernetzungen entstanden, welche die Antigene auf den Schnitten für die Primärantikörperbindung blockieren. Diese Blockade wurde durch die Hitze und den Citratpuffer wieder von den Epitopen gelöst. Nach dem Aufkochen und einem 25 minütigem Abkühlen im Citratpuffer, wurden die Schnitte wieder mit PBS gewaschen.

3.6.4.1 Immunhistochemie der Immunzellen

Für die Antikörperfärbung der Immunzellen wurden die Schnitte für 1 h bei RT mit übersättigter Blockierlösung (10 % 10 x TBS, 10 % FCS, 1 % BSA in A. dest), zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen, inkubiert. Es folgte eine ü/N Inkubation der Schnitte bei 4 °C mit dem spezifischen Primärantikörper in 1 % BSA / PBS (s. Tabelle 24). Nach einem erneuten Waschen der Schnitte wurde die endogene Peroxidase über eine 5 minütige Inkubation mit 3 % H₂O₂ / PBS gehemmt. Die Schnitte wurden wieder gewaschen und mit einem HRP

(engl. *horseradish peroxidase*) - markiertem Sekundärantikörper / PBS (s. Tabelle 25) für 1 h bei RT inkubiert.

Tabelle 25: Antikörper für Immunhistochemie der Immunzellen

1. AK	2. AK	Zielzelltyp
Rat anti mouse Ly6G BD Pharmingen, # 551459 [1:50]	Goat pAb to rat IgG (HRP), Abcam, # ab97057 [1:200]	Neutrophile
Rat anti mouse CD107b (Mac3) BD Pharmingen, # 550292 [1:50]	Goat pAb to rat IgG (HRP), Abcam, # ab97057 [1:200]	Monozyten

Nach wiederholtem Waschen mit PBS und einer 10 minütigen Inkubation mit 0.05 % T - PBS wurden die Schnitte mit der DAB – Lösung (DAKO) für 7 Min inkubiert, wobei die DAB –Lösung von der Peroxidase des Sekundärantikörpers oxidiert wurde und ein bräunlicher Farbumschlag auf den Schnitten zu sehen war. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit T - PBS, wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt, um die Zellkerne zu markieren. Die Konservierung der Präparate erfolgte über eine entwässernde aufsteigende Alkoholreihe und dem Fixieren in Histokitt (Roth).

3.6.4.2 Immunhistochemie für aktivierte Caspase – 3

Für den Nachweis von aktivierter Caspase – 3 wurde die Hemmung der endogenen Peroxidase vor dem Blockierungsschritt durchgeführt. Es wurde ebenfalls mit 3 % H₂O₂ über 15 Min gehemmt, mit T - PBS gewaschen und für 30 Min blockiert (5 % Ziegenserum, 5 % BSA / PBS). Die Primärantikörperinkubation (*Cleaved Caspase 3*; # 9661S; CellSignalling, [1:50]) erfolgt für 1 h bei RT

in 1 % BSA / PBS. Alle weiteren Substanzen wurden aus einem Kit (LSAB2 System – HRP, DAKO) entsprechend dem empfohlenen Protokoll verwendet. Der Sekundärantikörper wurde für 30 Min auf die Präparate gegeben und ungebundener Antikörper nach der Inkubation mit T - PBS heruntergewaschen. Die Präparate wurden für 45 Min bei RT mit Streptavidin – HRP inkubiert und dreimalig mit T - PBS gewaschen. Auch in diesem Protokoll wurde eine DAB – Lösung (5 Min / RT, DAKO) für die bräunliche Farbreaktion verwendet, eine Gegenfärbung mit Hämalun (3 Min / RT) durchgeführt und die Präparate wie bereits beschrieben konserviert.

3.6.5 Die Sirius – Rot – Färbung

Bei der Sirius – Rot - Färbung handelt es sich um eine histologische Färbetechnik, mit welcher Kollagen im Gewebe sichtbar gemacht werden kann. Nach der Färbung erscheint das Kollagen im Gewebe bei Durchlichtmikroskopie rot und das restliche Gewebe, wie Muskelfasern und Zytoplasma, gelblich. Diese Färbung kann z. B. dazu verwendet werden, die Narbengröße und Qualität / Beschaffenheit nach myokardialer Ischämie zu bestimmen. Die in der Narbe enthaltenen unterschiedlichen Kollagentypen I (dicke Fasern) und II (dünne Fasern) erscheinen durch Polarisationsmikroskopie in einem orangen bzw. grünlichen Farbton.

Mit dieser Färbung wurde die Narbenbildung der Knochenmarkschimären 21 Tage nach Ischämie / Reperfusion näher analysiert. Hierzu wurden die Paraffinherzschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe endparaffiniert, dreimalig für 5 Min mit PBS gewaschen und für 1 Min in *A. dest* inkubiert. Danach folgte eine erste Färbung mit Celestineblau – Lösung für 7 Min bei RT. Überschüssige Färbelösung wurde durch zweimaliges Eintauchen der Herzschnitte in 1 % HCL / *A. dest* entfernt und die Schnitte für 5 Min in Leitungswasser „gebläut“. Danach folgte die zweite Färbung mit Picro – Sirius – Rot – Lösung (Morphisto) für

15 – 30 Min im Dunkeln. Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Herzschnitte wieder entwässert und blasenfrei in Histokitt (Roth) eingedeckelt.

3.6.6 Die TTC / Evans Blue – Färbung

Um die myokardiale Infarktgröße 24 h nach Ischämie / Reperfusion zu bestimmen, wurde in dieser Arbeit die „TTC (2, 3, 5 - Triphenyltetrazoliumchlorid) – Evans Blue - Färbemethode“ angewandt, wie sie bereits ausführlich von Rassaf *et al.*, 2014 [56] beschrieben wurde. Die Färbung und auch die Planimetrie übernahm das bereits oben genannte „Serviceprojekt“ des SFB 1116. Die statistische Auswertung oblag dem Experimentator.

Für die Infarktplanimetrie mit dieser Färbung wurden, nach einer Reperusionszeit von 24 h, die Tiere in tiefe Narkose mit Ketamin (90 mg / kg) und Xylazin (15 mg / kg) i. p. gelegt. Zusätzlich um Agglutination zu vermeiden, wurde den Tieren 1000 IE Heparin (Ratiopharm) injiziert. Das Herz wurde entnommen, mit 0.9 %iger NaCl - Lösung gespült, die Koronararterie wieder abgebunden und 1.5 ml einer 1 %igen Evans Blue – Lösung in die LAD appliziert. Danach wurde das Herz mit NaCl - Lösung gewaschen, gewogen und für 1 h bei – 20 °C gefroren. Das gefrorene Herz wurde in 1 – 1.5 mm dünne Scheiben von der Apex an geschnitten, wobei 6 – 7 Herzschnitte entstanden. Auch von diesen Schnitten wurde das Gewicht bestimmt. Anschließend wurden die Herzscheiben für 5 Min bei 37 °C in 1 % TTC – Lösung inkubiert. Durch die Färbung waren verschiedene Bereiche im Infarktgebiet zu unterscheiden: Gesundes Gewebe wurde blau angefärbt, Gewebe, welches von der Ischämie betroffen war aber noch lebende Zellen enthielt, färbte sich rot (AAR, engl. *area at risk*) und das Infarktgebiet (INF) war durch eine weißliche Färbung zu detektieren.

Die Massen der verschiedenen Bereiche wurden prozentual in Relation zum Gesamtgewicht des linken Ventrikels (LV) gesetzt.

3.7 Statistische Datenanalyse

Die Anzahl der analysierten Individuen bezeichnet n . Alle Diagramme zeigen jeweils den Mittelwert (MW) zum Parameter der Y - Achse. Für den Fehlerindikator in den Diagrammen wurde stets der $\text{mean} \pm \text{SEM}$ (engl. standard error of mean) angegeben. Signifikanzen, die überprüfen sollten, ob sich in zwei zu vergleichenden Matrizen zweier Gruppen systematische Unterschiede feststellen lassen, wurden durch den studentischen TTest 2.2 oder 1.2 ermittelt. Sie wurden in folgende Kategorien eingeteilt: $p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.001$ *

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss von Phospholipase D1 auf die myokardiale Ischämie / Reperfusion

Aus vorhergegangenen Studien ist bekannt, dass aktivierte Thrombozyten einen wesentlichen Einfluss auf die myokardiale Ischämie / Reperfusion haben und dass das aus Thrombozyten stammende P – Selektin innerhalb dieses Prozesses einen kritischen Faktor darstellt [49].

Des Weiteren konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass die PLD1 - Defizienz zu multiplen Effekten post AMI führt [42]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sowie die beteiligten Faktoren und Regulatoren der PLD1 - vermittelten Prozesse sind jedoch völlig unklar.

4.1.1 Analysen von PLD1 – Knochenmarkschimären post AMI

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst mechanistische Untersuchungen zur Bedeutung von PLD1 für die Immunzellaktivierung und Entzündungsreaktion durchgeführt. Hierzu wurden knochenmarkschimäre Tiere aus C57BL/6J – Empfängertieren und *Pld1* – Knochenmarksspendertieren generiert und die Ischämie / Reperfusion über das „close chest“ – Modell induziert. Kontrolltiere (C57BL/6J) erhielten Knochenmark von *Pld1*^{+/+} - Tieren. Die im Knochenmark gebildeten, zirkulierenden Blutzellen von Empfängertieren, die *Pld1*^{-/-} - Knochenmarkszellen empfangen hatten, bildeten so, im Gegensatz zu den parenchymatischen Zellen, kein PLD1 mehr.

4.1.1.1 Kontrolle der PLD1- Defizienz in Knochenmarkschimären

Um zu kontrollieren, ob die Generierung der Knochenmarkschimären erfolgreich war, wurde den Empfängertieren 6 – 8 Wochen nach Rekonvaleszenzzeit Blut entnommen und Chimerismus in den Blutzellen über Genotypisierung bestimmt. Im Durchschnitt war hier nur ein geringfügig verbliebener Anteil von *Pld1*^{+/+} - Blutzellen in *Pld1*^{-/-} - KM – Chimären zu verzeichnen (Abb. 9).

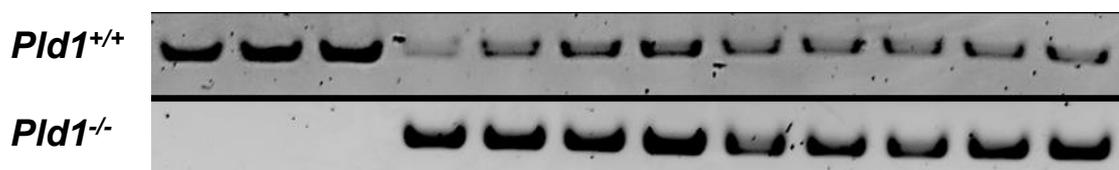


Abbildung 9: Exemplarisches Gelbild der Blutzellen – Genotypisierung. Ca. 6 Wochen nach Empfang der Knochenmarkszellenspende wurde den Tieren Blut entnommen und eine Genotypisierung der Blutzellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass der Transfer positiv war. n = 3 / 9

Die Generierung von knochenmarkschimären Tieren war somit erfolgreich und die Tiere wurden in den nachfolgenden Experimenten verwendet. Um einen Einfluss des Knochenmarkstransfers auf die myokardiale Ischämie zu untersuchen, wurde die Anzahl der unterschiedlichen Blutzellen zu mehreren Zeitpunkten gemessen, um auszuschließen, dass ein potentieller Phänotyp in der Analyse der myokardialen Ischämie / Reperfusion auf eine Abweichung der Blutzellen, z. B. auf eine Erhöhung der Leukozytenzahl, zurückzuführen ist. Zusätzlich diente dieser Schritt der generellen Überprüfung der Blutzellzahl nach Bestrahlung und erfolgtem Knochenmarktransfer. Im Vergleich zwischen den Genotypen ließen sich keine Unterschiede in der Anzahl der unterschiedlichen Blutzelltypen, wie Leukozyten (Abb. 10 A), Erythrozyten (Abb. 10 B) und Thrombozyten (Abb. 10 C) zu verschiedenen Zeitpunkten feststellen. Im Hinblick auf den zu analysierenden Einfluss der Thrombozyten auf die AMI, ist zusätzlich festzuhalten, dass die Anzahl der Thrombozyten 6 Wochen nach Bestrahlung vergleich-

bar mit der Anzahl der Thrombozyten von Tieren ohne Bestrahlung war (Abb. 10 C).

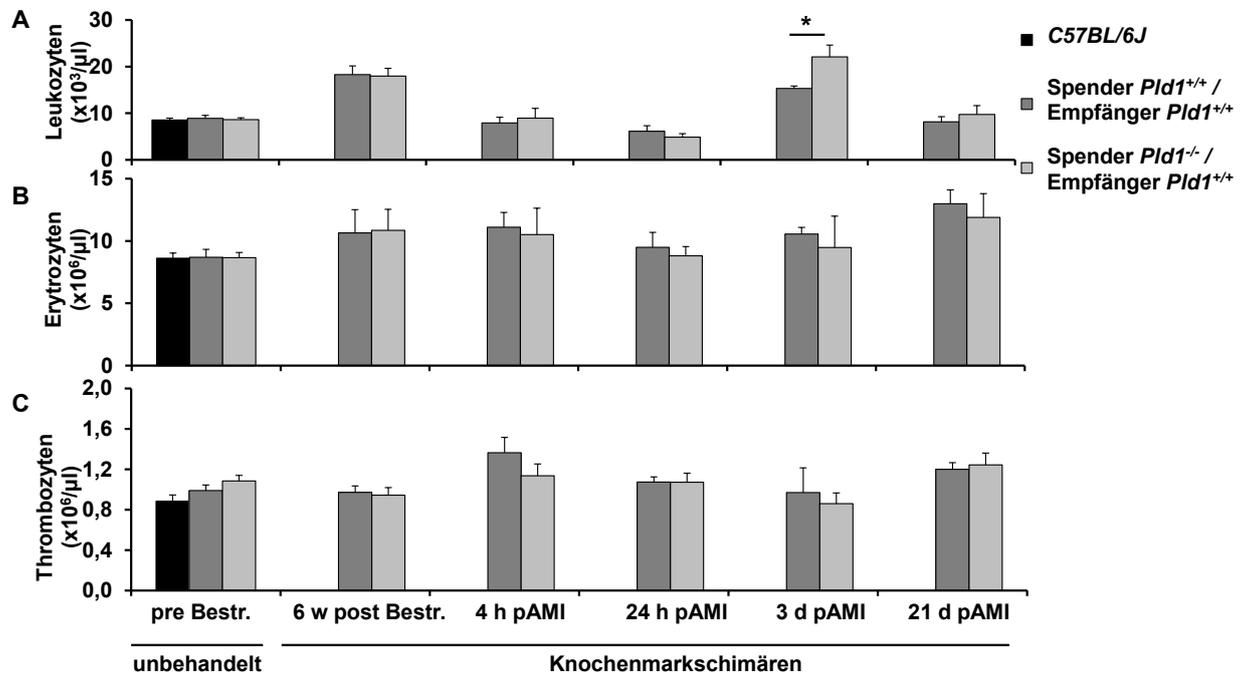


Abbildung 10: Bestimmung der Zellzahl der unterschiedlichen Blutzelltypen. Zu den unterschiedlichen Zeitpunkten während des Experimentalzeitraums ließen sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen in Bezug auf die Anzahl von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten im Blut feststellen. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; $n = 6 - 18$; * $p < 0.05$

4.1.1.2 Analyse der Thrombozytenaktivität bei knochenmarkschimären Tieren post AMI

Da bekannt ist, dass aktivierte Thrombozyten und insbesondere das thrombozytäre P - Selektin Einfluss auf die Infarktgröße post AMI haben [49], wurden hier die Thrombozyten zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Ischämie / Reperfusion (4 h; 24 h post AMI) mit klassischen Agonisten aktiviert und die P - Selektin - Expression (P - Selektin - FITC) bzw. die Integrinaktivierung (JonA - PE) durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrolle wurden zusätzlich Thrombozyten aus *Pld1*^{+/+} - und *Pld1*^{-/-} - konstitutiven Mäusen ohne vorherige Ischämie / Reperfusion in die Messung mit einbezogen. Sowohl bei der P - Selektin

– Expression als auch bei der Integrinaktivierung führte die Ischämie / Reperfusion nicht zu einer Prä - Aktivierung der Thrombozyten vor und nach AMI (Abb. 11 A + B, ruhend; Abb. 12 A + B, ruhend). Im Vergleich der beiden Genotypen war die P – Selektin – Expression nach Aktivierung mit den unterschiedlichen Agonisten zu beiden Zeitpunkten (4 h, 24 h) vergleichbar (Abb. 11 A + B). Auffällig war jedoch, dass die P – Selektin – Expression nach hohen CRP und Thrombinkonzentrationen 4 h post AMI deutlich erhöht war im Vergleich zu den Werten 24 h post AMI (Abb. 11 A + B).

Des Weiteren verlief die P – Selektin – Expression nicht streng linear zur Agonistenkonzentration 4 h post AMI (Abb. 11 A). 24 h post AMI war dieser Effekt wieder aufgehoben und die Expression verlief gleichmäßig zur Agonistenkonzentration (Abb. 11 B).

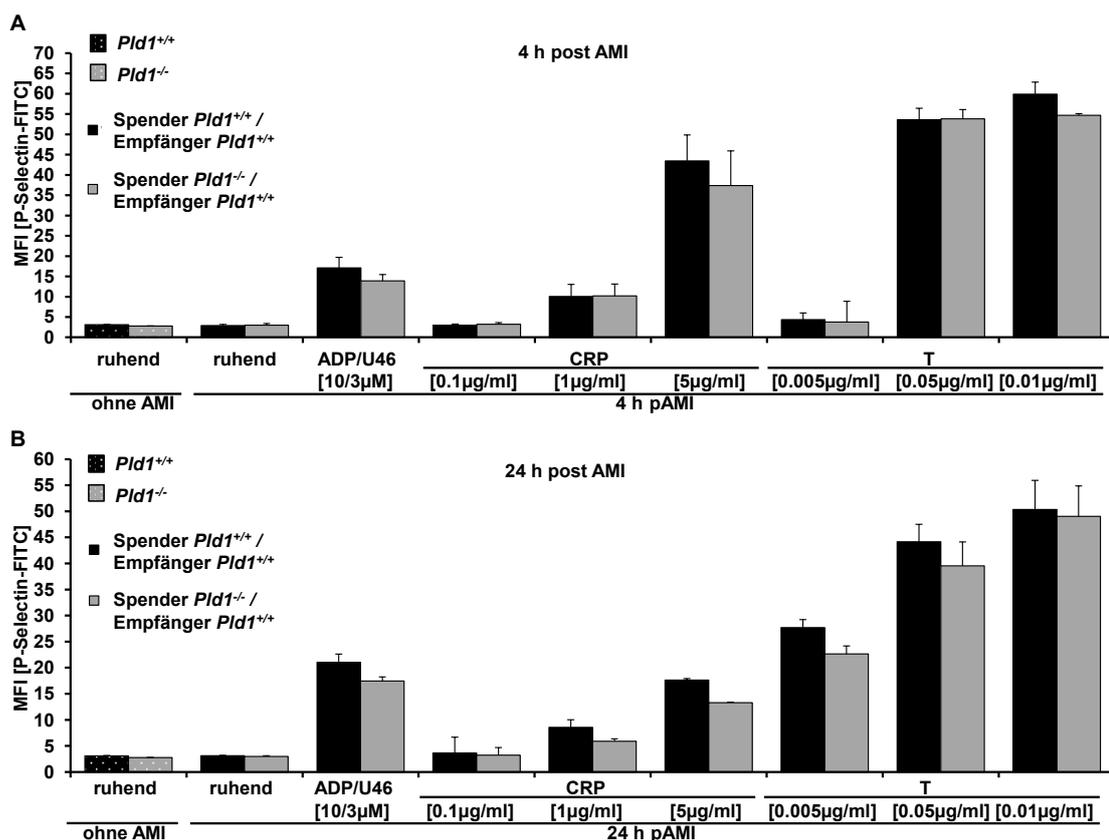


Abbildung 11: Bestimmung der P-Selektin Exposition auf der Thrombozytenoberfläche durch FACS 4 und 24 h post AMI. Thrombozyten wurden 4 und 24 h nach Ischämie / Reperfusion mit unterschiedlichen Agonisten aktiviert und die P – Selektin - Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 6

Auch die Integrinaktivierung zeigte unter gleichen Bedingungen keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 12 A + B). Ähnlich wie bei der P – Selektin – Expression verlief die Integrinaktivierung 4 h post AMI jedoch nicht stetig linear zur Agonistenkonzentration (Abb. 12 A), wobei auch dieser Effekt nach 24 h nicht mehr zu beobachten war (Abb. 12 B). Des Weiteren konnte eine Erhöhung der Agonisten - induzierten Integrinaktivierung insbesondere nach Stimulation mit hohen CRP Konzentrationen 4 h post AMI detektiert werden (Abb. 12 A). Im Gegensatz zu Elvers und Kollegen [32] zeigte sich 4 h und 24 h post AMI jedoch kein Integrindefekt in PLD1 - defizienten Thrombozyten.

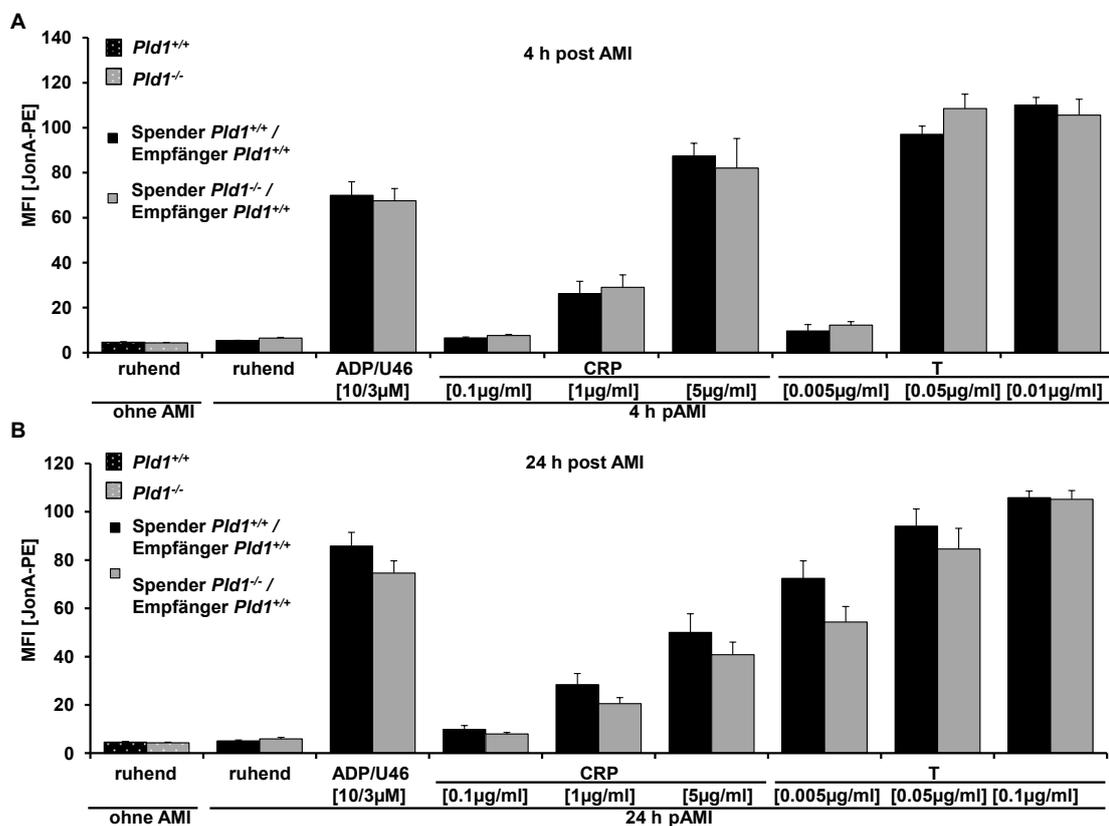


Abbildung 12: Bestimmung der Integrinaktivierung auf der Thrombozytenoberfläche durch FACS 4 und 24 h post AMI. Thrombozyten wurden 4 und 24 h nach Ischämie / Reperfusion mit unterschiedlichen Agonisten aktiviert und ihre Integrinaktivität durchflusszytometrisch bestimmt. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 6

Zu späteren Zeitpunkten (3 d u. 21 d post AMI) wurden die Aktivitätsmessungen für P – Selektin wiederholt. Diese zeigten eine signifikant reduzierte P – Selektin – Expression nach Stimulation mit CRP [1 u. 0.1 $\mu\text{g} / \text{ml}$] auf der Thrombozytenoberfläche *Pld1*^{-/-} - KM - Chimären Tieren 21 d post AMI (Abb. 13 A + B). Diese Reduzierung war abhängig von der Konzentration des Agonisten, da der Effekt nur in niedrigen und mittleren CRP Konzentrationen detektiert werden konnte (Abb. 13 B).

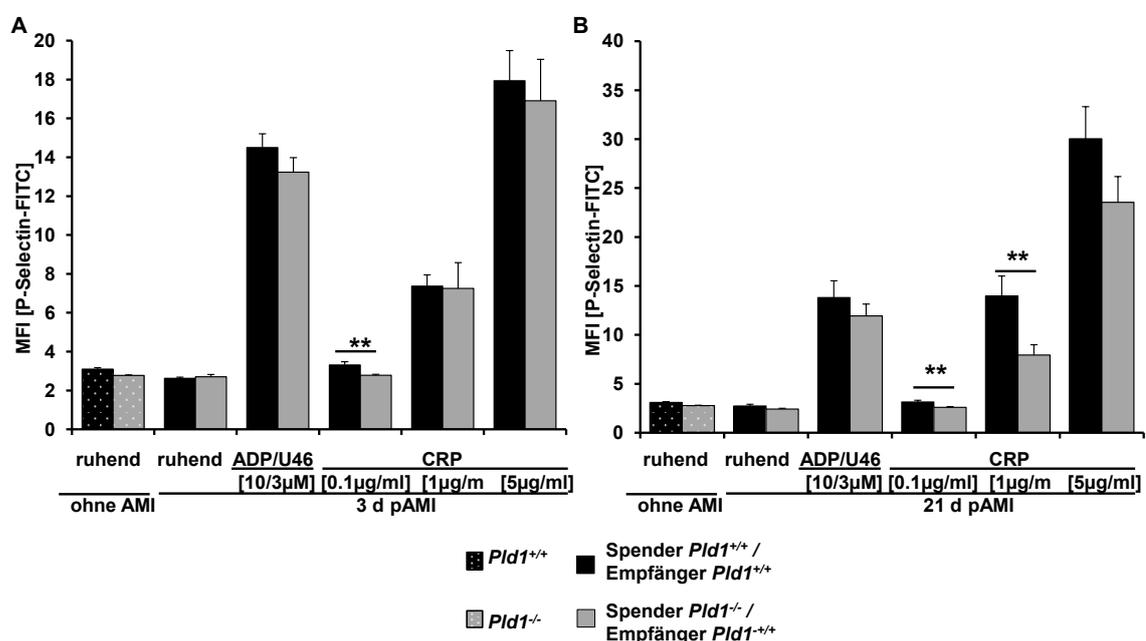
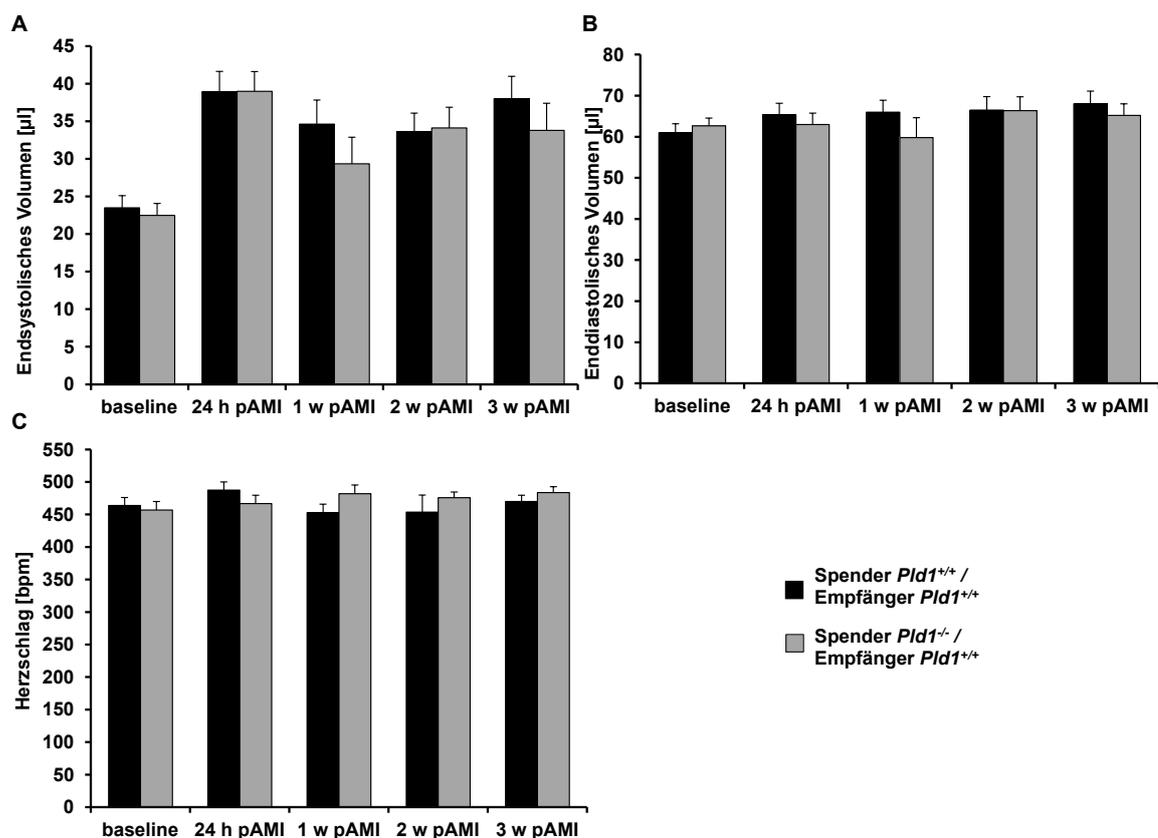


Abbildung 13: Reduzierte P – Selektin – Expression bei *Pld1*^{-/-} - KM - Chimären nach CRP – Aktivierung. Thrombozyten wurden 3 und 21 d nach Ischämie / Reperfusion mit unterschiedlichen Agonisten aktiviert und die P – Selektin - Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 5 – 9; ** P < 0.01.

4.1.1.3 Einfluss von PLD1 der Blutzellen auf die Herzfunktion post AMI in Knochenmarkschimären

28 Tage nach Ischämie / Reperfusion führt eine konstitutive PLD1 – Defizienz u. a. zu einer verminderten linksventrikulären Herzfunktion [42]. Zur Analyse, ob die PLD1 in Blutzellen die Herzfunktion post AMI beeinflusst, wurden über einen

Zeitraum von 21 Tagen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vor (baseline) und nach (24 h, 1 w, 2 w, 3 w post AMI) Ischämie / Reperfusion Echokardiographien von knochenmarkschimären Tieren durchgeführt. Die echokardiographische Auswertung 24 h nach myokardialer Ischämie zeigte, wie nach AMI zu erwarten, in beiden Genotypen einen vergleichbaren Anstieg im endsystolischen Volumen (Abb. 14 A) und einen Abfall in der Ejektionsfraktion (Abb. 14 D), im Schlagvolumen (Abb. 14 E), im Herzauswurfvolumen (Abb. 14 F) und in der Verkürzungsfraktion (engl. *fractional shortening*) (Abb. 14 G) im Vergleich zur Baseline – Messung. Der AMI hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die unterschiedlichen Wanddicken im Myokard (Abb. 14 H – K). In den weiteren Zeitpunkten post AMI (1 w, 2 w, 3 w post AMI) wurden keine Unterschiede im Vergleich der beiden Genotypen zu den unterschiedlichen Parameter festgestellt (Abb. 14 A – K).



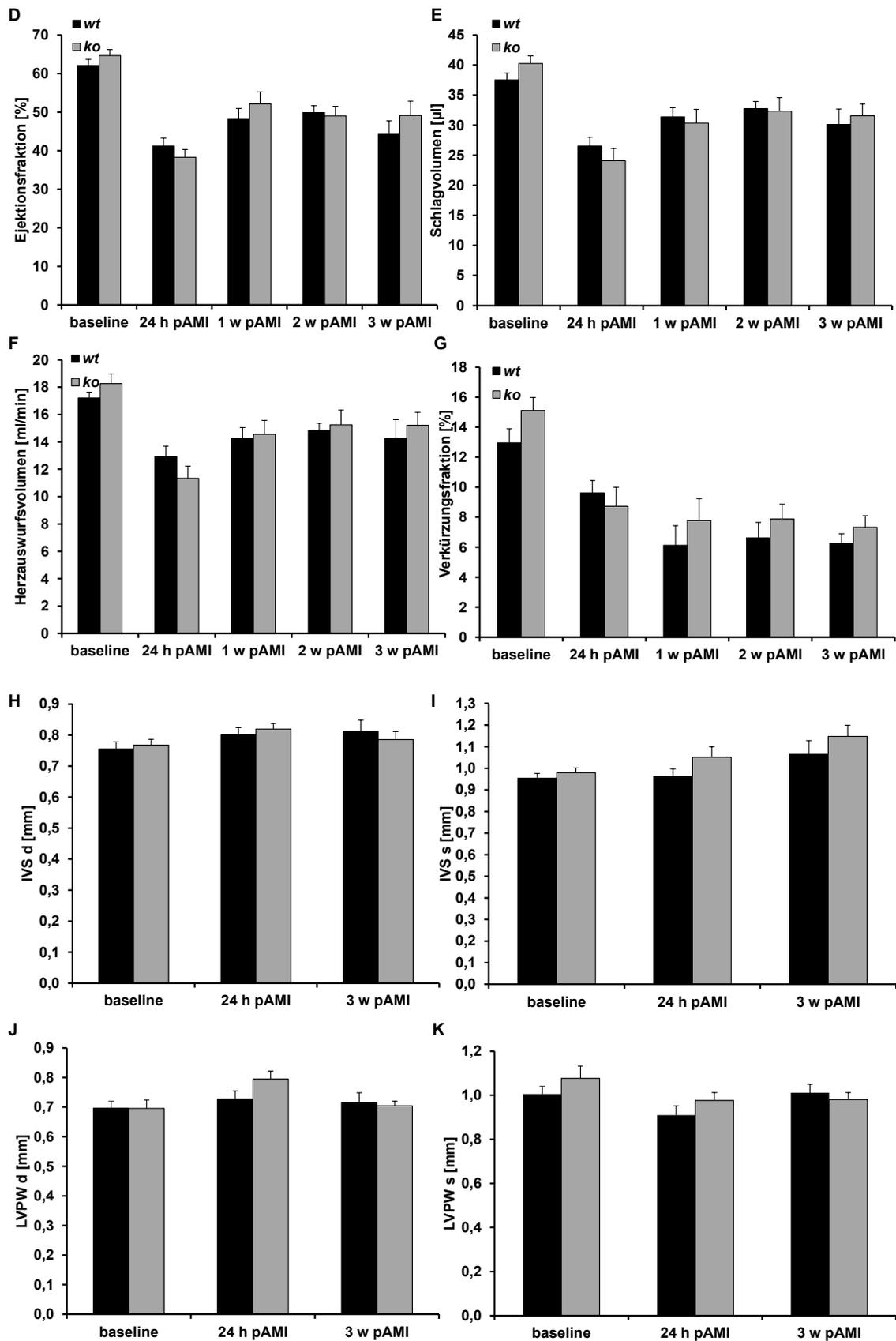


Abbildung 14: Verschiedene Parameter zur echokardiographischen Auswertung der KM – Chimären. Unterschiedliche Parameter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ischämie / Reperfusion gemessen. Zwischen den Genotypen zeigten sich keine Unterschiede in den verschiedenen Parameter. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 8 – 21

Zusammengefasst zeigte die blutzellspezifische PLD1 – Defizienz in den KM – Chimären keinen Einfluss auf die echokardiographischen Parameter nach myokardialer Ischämie im Vergleich zu den Kontrolltieren.

4.1.1.4 Einfluss von PLD1 bei knochenmarkschimären Tieren auf die inflammatorische Antwort post AMI

Da bei konstitutiven *Pld1*^{-/-} - Mäusen ein erniedrigter TNF- α - und TGF – β – Plasmaspiegel, sowie eine reduzierte Einwanderung von Immunzellen, detektiert wurde, habe ich in der vorliegenden Arbeit den Einfluss von PLD1 auf die inflammatorische Antwort nach AMI näher analysiert [42].

Des Weiteren ist bekannt, dass eine antithrombozytäre Therapie die proinflammatorischen Mediatoren und Zelltypen, die im Prozess der Ischämie / Reperfusion eine Rolle spielen, beeinflusst [57].

So führt z. B. die Behandlung mit Clopidogrel zu einer reduzierten Thrombozyten – Leukozyten – Aggregatbildung im Serum von Patienten mit atherothrombotischen Erkrankungen [58]. Aufgrund der bekannten Aktivierungsdefekte von PLD1 - defizienten Thrombozyten in der arteriellen Thrombose wurde daher im Plasma der KM – Chimären die Leukozyten – bzw. Neutrophilen / Thrombozyten – Aggregatbildung über FACS – Analysen bestimmt (Abb. 15). Dabei konnte ein Anstieg der Thrombozyten – Leukozyten - Aggregate 4 h post AMI in den Kontrolltieren ermittelt werden. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Leukozyten – Thrombozyten - Aggregate bei *Pld1*^{-/-} - Knochenmarkschimären Tieren. Im Vergleich der Genotypen zeigte sich jedoch nur ein Unterschied in der Anzahl der Aggregate im Trend, dieser war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 15 A).

Die Neutrophilen / Thrombozyten – Aggregatbildung war bei den *Pld1* – defizienten Chimären erhöht, erreichte jedoch keine signifikante Steigerung zum Basalwert. Des Weiteren zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu *Pld1*^{+/+} - Chimären 4 h post AMI (Abb. 15 B). Zudem konnte in den Kontrolltieren keine Erhöhung der Thrombozyten - Neutrophilen – Aggregate zwischen Basal und 4 h post AMI detektiert werden (Abb. 15 B).

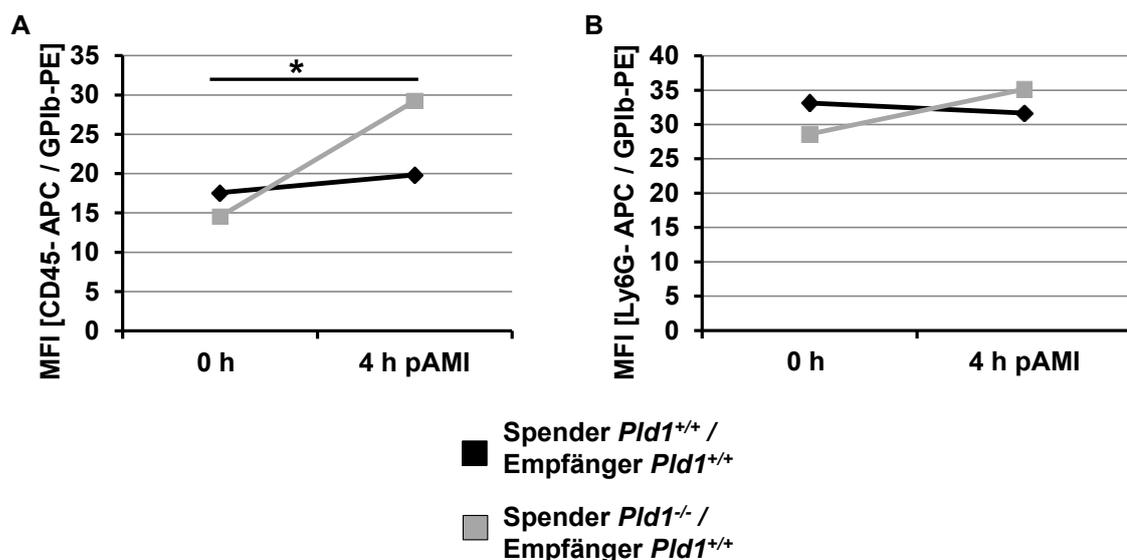


Abbildung 15: Leukozyten / bzw. Neutrophilen / Thrombozyten – Aggregatbildung 4 h post AMI. Über FACS – Analysen wurde die Immunzellen – Thrombozyten – Aggregate im Plasma von *Pld1* – KM- Chimären 4 h post AMI gemessen. Zwischen den Genotypen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. n = 6 – 10 ; * P < 0.05

In konstitutiven *Pld1*^{-/-} - Tieren zeigte sich eine verminderte Einwanderung von Immunzellen in das Infarktgebiet [42]. Die Analyse von Knochenmarkschimären Tieren ergab, dass auch bei diesen Tieren die Einwanderung von Zellen in das Infarktgebiet 24 h post AMI im Vergleich zu den Kontrolltieren reduziert war (Abb. 16).

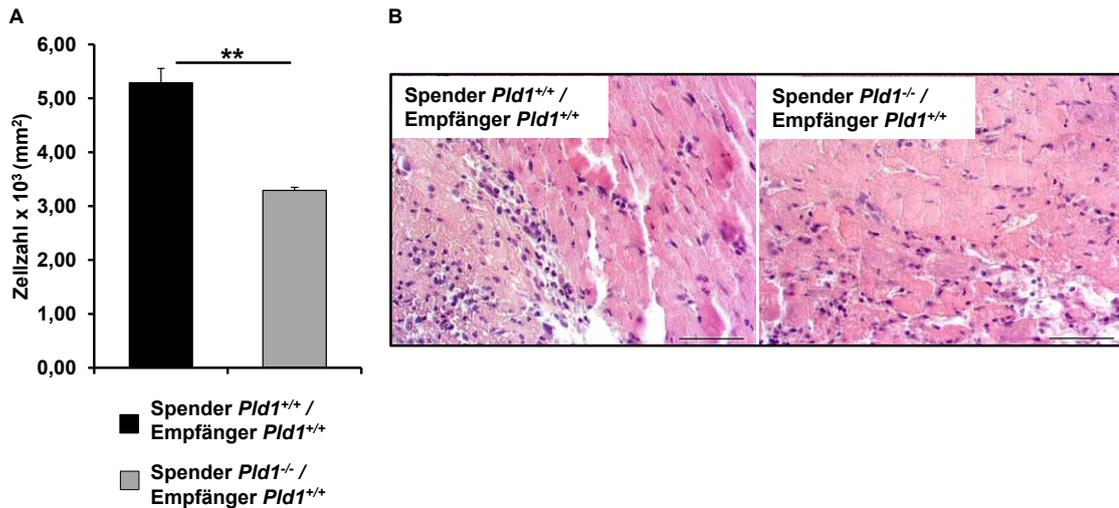


Abbildung 16: Reduzierte Einwanderung von Immunzellen bei PLD1 – defizienten Chimären. Mit Hilfe einer HE – Färbung konnte die Zelleinwanderung 24 h nach myokardialer Ischämie analysiert werden. Statistische Auswertung (A) und repräsentative Bilder (B). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 3; ** P < 0.01.

Das Zytokin TGF – β stimuliert die Kollagensynthese und beeinflusst das *Remodelling* nach myokardialer Ischämie [52]. In konstitutiven *Pld1*^{-/-} - Tieren zeigte sich eine verminderte Sekretion von TGF – β , die vermutlich für die veränderte Narbenbildung und für das erhöhte Infarktgebiet 28 Tage post AMI in diesen Tieren verantwortlich ist [38]. Aufgrund der reduzierten Zelleinwanderung (Abb. 16), wurde der Einfluss von PLD1 auf die Sekretion des Zytokines TGF - β im Plasma der KM – Chimären weiter analysiert. Auch im Plasma von *Pld1*^{-/-} - KM – Chimären war eine signifikant reduzierte Sekretion von TGF – β 3 und 21 d post AMI im Vergleich zum Plasma der *Pld1*^{+/+} - KM – Chimären messenbar (Abb. 17).

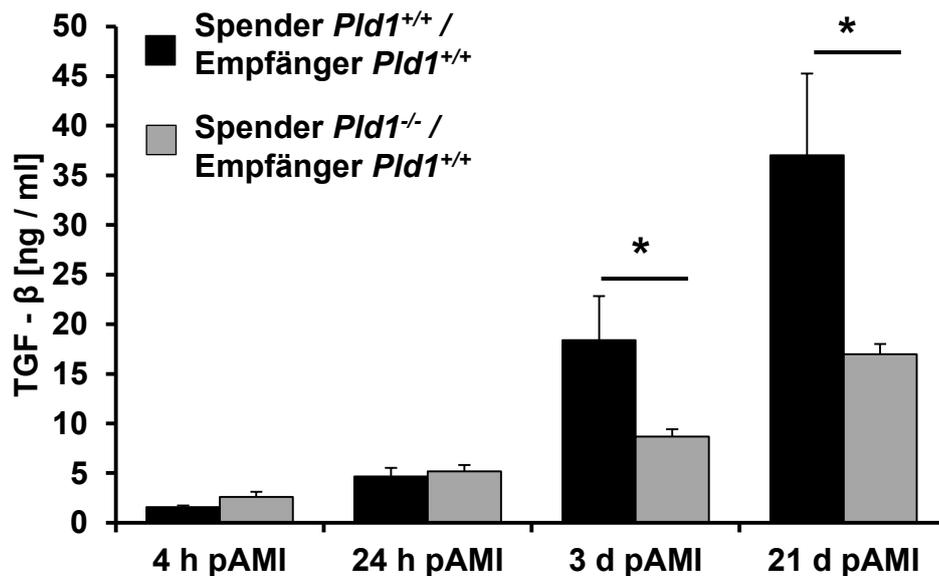


Abbildung 17: ELISA – Analyse des Plasmazytokines TGF – β . Keine signifikanten Unterschiede im Plasma von PLD1 – Chimären 24 h und 3 d post AMI. Signifikante Reduzierung von TGF – β nach 3 und 21 Tagen post AMI bei *PLD1*^{-/-} - KM – Chimären im Vergleich zu den Kontrolltieren. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 8; * P < 0.05.

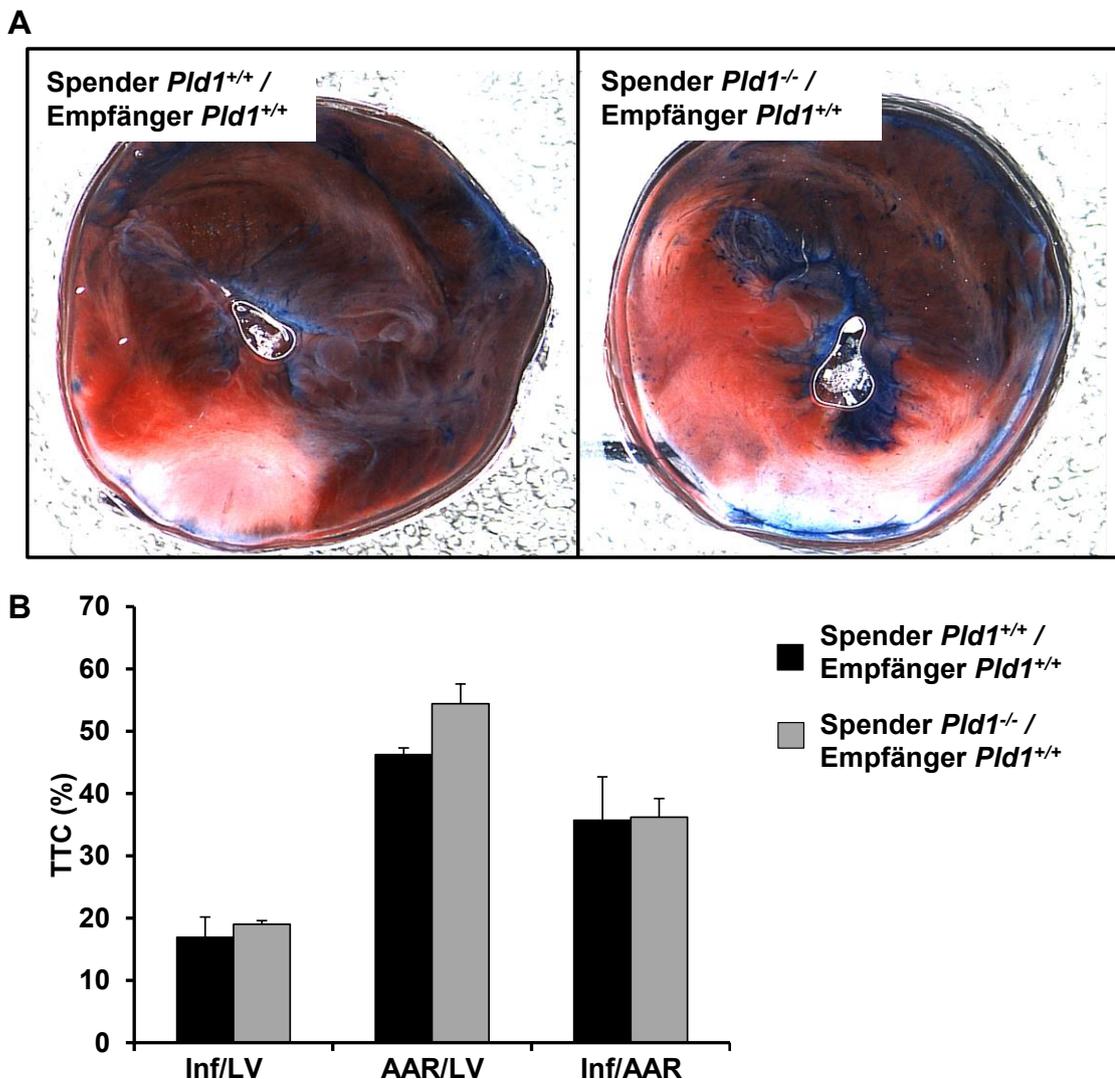
4.1.1.5 Einfluss von PLD1 bei knochenmarkschimären Tieren auf den Infarktphänotyp post AMI

Schöneberger *et al.* zeigten, dass das Fehlen von PLD1 im gesamten Organismus konstitutiver *Pld1*^{-/-} - Mäuse zu einer erhöhten Infarktgröße 21 d post AMI führt [42]. Die PLD1 - vermittelten zellulären Prozesse, die für die vergrößerten Infarktregionen verantwortlich sind, sind jedoch nicht bekannt. Daher wurde in knochenmarkschimären Tieren untersucht, ob die PLD1 in den Blutzellen die Infarktgröße und Narbenqualität nach Ischämie / Reperfusion beeinflusst. Hierzu wurden Herzschnitte 24 h post AMI mit TTC - Lösung und 21 d post AMI mit Gomori – Lösung gefärbt, um die Infarktgröße zu bestimmen.

Bei der TTC - Färbung konnten die verschiedenen Bereiche des Infarkts angefärbt und in Relation zueinander gesetzt werden. Die Bereiche konnten durch verschiedene Farbgebungen unterschieden werden: gesundes Gewebe wurde blau angefärbt, Gewebe, welches von der Ischämie betroffen war aber noch

lebende Zellen enthielt, färbte sich rot (engl. *area at risk*, AAR) und das Infarktgebiet (INF) war durch eine weißliche Färbung zu detektieren (Abb. 18 A). 24 h post AMI zeigte sich, dass es keine signifikanten Unterschiede der Infarktgröße zwischen den Genotypen der KM - Chimären gab (Abb. 18 B).

Auch 21 d nach Ischämie / Reperfusion war die Infarktgröße, in der Relation des Infarktgebietes und der AAR, der Tiere, die Knochenmark von PLD1 - defizienten Tieren erhielten, vergleichbar mit den Tieren, die Knochenmark von *Pld1* - Wildtyp Tieren erhielten (Abb. 18 C + D).



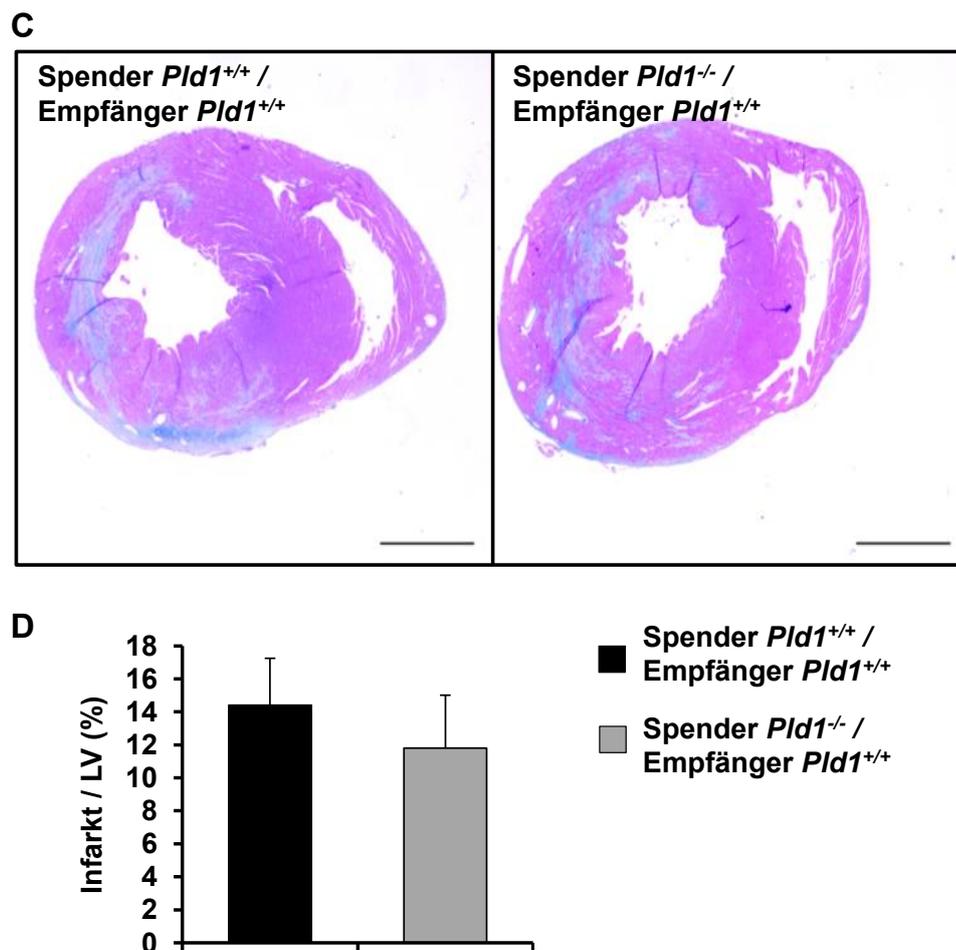


Abbildung 18: Analyse der Infarktgröße post AMI. 24 h post AMI wurde die Infarktgröße über eine TTC - Färbung erfasst, wobei keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden. Statistische Analyse (A) und repräsentative Bilder (B). Auch nach 21 Tagen fand sich mit Hilfe der Gomori – Färbung kein signifikanter Unterschied in der Infarktgröße. Statistische Analyse (C) und repräsentative Bilder (D). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 7 (A + B), n = 5 (C +D)

Die PLD1 – Defizienz der Blutzellen führte in den KM – Chimären somit zu keiner Veränderung des Infarktgebietes.

Aufgrund des reduzierten TGF – β Plasmalevels der PLD1 – KM - Chimären, folgte eine nähere Analyse des Kollagens in der Infarkt Narbe. Hierbei wurde die Qualität des Kollagens anhand der Bestimmung von dichten (rötlich) und feinen (grün) Kollagenfibrillen über eine Siriusrot – Färbung untersucht. Im Vergleich der Knochenmarkchimären fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der beiden Kollagentypen (Abb. 19 A + B). Über die Siriusrot –

Färbung konnte auch interstitielles Kollagen im Infarktgebiet näher analysiert werden. Die prozentuale Auswertung an interstitiellem Kollagen ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der Knochenmarkschimären (Abb. 19 C + D).

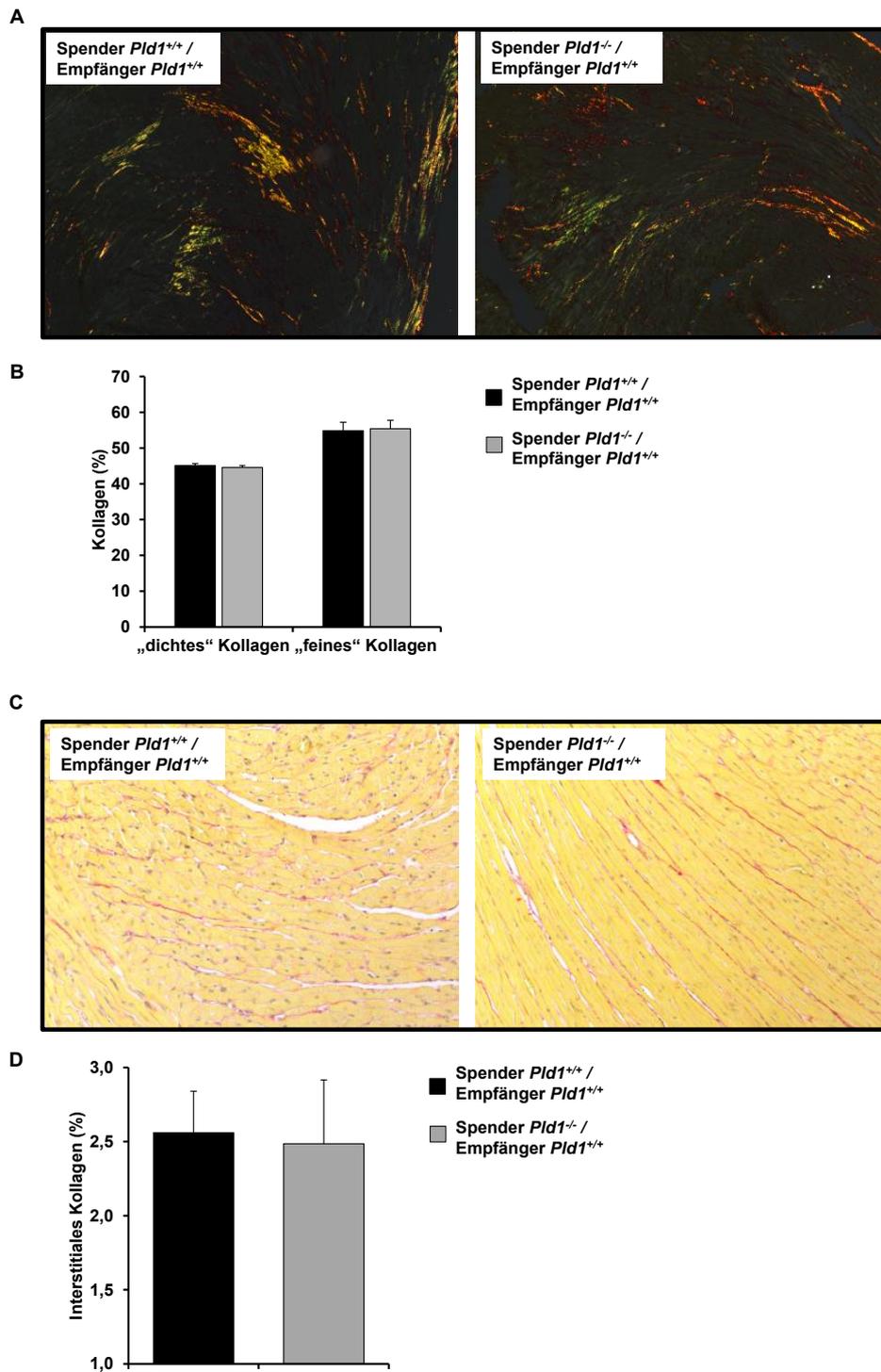


Abbildung 19: Analyse der Narbenqualität 21 d post AMI. Über Mikroskopie mit polarisiertem Licht konnten die unterschiedlich dichten Fibrillen des Kollagens der Narbe sichtbar ge-

macht und prozentual bestimmt werden. Zwischen den Knochenmarkschimären gab es keinen Unterschied in der Ausprägung von dichten (rot) oder feinen (grünlich – gelb) Kollagenfibrillen. Repräsentative Bilder **(A)** und statistische Analyse **(B)**. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Ausbildung von interstitiellem Kollagen. Repräsentative Bilder **(C)** und statistische Analyse **(D)**. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; $n = 5$

Zusammenfassend konnte demnach kein Unterschied in der Qualität der Narbe 21 d nach Ischämie / Reperfusion über die Analyse des Kollagens festgestellt werden.

Als zusätzliche Kontrolle zur Qualität des Kollagens wurde eine α – SMA – Immunfärbung an den kardialen Myofibroblasten der Herzschnitte durchgeführt, da Kollagen das Hauptprodukt der Fibroblastenaktivität darstellt. Analog der Ergebnisse der Kollagenfärbung, war hier ebenfalls kein quantitativer Unterschied in der Anzahl α - SMA – positiver Fibroblasten 21 d post AMI im Vergleich der PLD1 – KM – Chimären zu detektieren (Abb. 20 A + B).

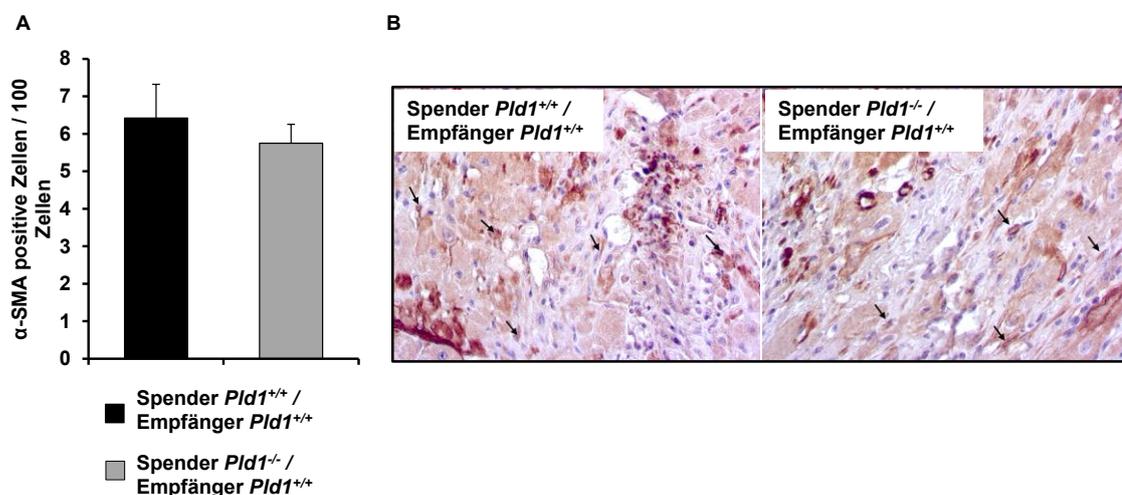


Abbildung 20: α – SMA – Immunfärbung myokardialer Fibroblasten 21 d post AMI. Kein Unterschied in der Anzahl α – SMA –positiver Zellen in den Herzschnitten von PLD1 – KM – Chimären. Repräsentative Bilder **(A)** und statistische Auswertung **(B)**. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; $n = 5$

Zusammenfassend kann in der Analyse der PLD1 – KM – Chimären festgehalten werden, dass trotz einer reduzierten Zelleinwanderung in den Infarktbereich

24 h post AMI, eines reduzierten TGF – β Plasmaspiegels und einer verminderten Thrombozytenaktivierung nach CRP – Stimulus während der *Remodelling* - Phase (3 – 21 d post AMI), keine Veränderung in der Infarktgröße und der Qualität der Narbe bei PLD1 – defizienten - im Vergleich zu *Pld1*^{+/+} - KM – Chimären detektiert werden konnte.

4.1.2 Einfluss der Hemmung der enzymatischen Aktivität von PLD1 / PLD2 durch den PLD Inhibitor FIPI auf die zellulären Prozesse nach AMI

Es wurde gezeigt, dass Mäusen, denen das Enzym PLD1 oder aber beide Isoformen der Phospholipase (D1 & D2) fehlen, vor arterieller Thrombose und ischämischen Schlaganfall geschützt sind, wobei die Hämostase dieser Tiere nicht beeinträchtigt war. Die pharmakologische Inhibition mit dem PLD - Inhibitor FIPI führte bei Mäusen zu einer Inhibition der PLD – Aktivität. Aus dieser Blockade resultierte u. a. eine reduzierte Integrinaktivität der Thrombozyten und ein protektiver Effekt von PLD im Mausmodell des Schlaganfalls, nachgewiesen über eine kleinere Infarktgröße 24 h nach dem Verschluss der mittleren Zerebralarterie [35].

Um nun den Effekt der Hemmung von PLD1/2 durch FIPI auf den Infarkt nach myokardialer Ischämie zu untersuchen, wurden C57BL/6J - Mäuse über einen Zeitraum von maximal 21 Tagen mit einer täglichen Dosis FIPI (3 mg / kg) nach einer, über das „*open - chest*“ - Modell induzierten Ischämie / Reperfusion behandelt. Der PLD – Inhibitor wurde zuvor gemäß den Angaben des Herstellers in DMSO resuspendiert und in PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Kontrolltiere erhielten entsprechend eine Lösung von 4 % DMSO / PBS jedoch ohne den PLD – Inhibitor FIPI.

4.1.2.1 Analyse der Thrombozytenaktivität post AMI

Da beschrieben wurde, dass mit FIPI behandelte Thrombozyten *in vitro* eine reduzierte Integrinaktivität aufweisen [35], wurde in dieser Arbeit 24 h und 21 d nach AMI die Thrombozytenaktivität durchflusszytometrisch über die P – Selektin - Expression und die Fibrinogenbindung nach zusätzlicher Aktivierung mit klassischen Agonisten bestimmt (Abb. 21). Zunächst ist hierbei festzuhalten, dass die Ischämie / Reperfusion nicht zu einer Präaktivierung der Thrombozyten im Hinblick auf die P - Selektin – Expression in beiden Gruppen geführt hat (Abb. 21 A + B, ruhend). 24 h nach Ischämie / Reperfusion wurde jedoch eine signifikant erhöhte P – Selektin - Expression in den Thrombozyten FIPI – behandelter Tiere nach Aktivierung mit ADP / U46 und CRP detektiert (Abb. 21 A). Dieser Effekt war 21 d post AMI nicht mehr nachweisbar (Abb. 21 B). Die Aktivierung mit den Agonisten Thrombin und PAR4 zeigte keinen Unterschied in der P – Selektin – Expression der Thrombozyten FIPI - behandelter Tiere, im Vergleich zu DMSO – behandelter Mäuse 24 h (Abb. 21 A) und 21 d (Abb. 21 B) nach Ischämie / Reperfusion.

Die Integrinaktivität wurde über die Bindung von markiertem Fibrinogen an aktivierte Thrombozyten durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 21 C + D). Die Ischämie / Reperfusion führte auch hier nicht zu einer Präaktivierung der Thrombozyten (Abb. 21 C + D, ruhend). Weiterführend zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich der Integrinaktivität nach unterschiedlicher Aktivierung der Thrombozyten DMSO – und FIPI – behandelter Tiere 24 h (Abb. 10 C) und 21 d post AMI (Abb. 21 D).

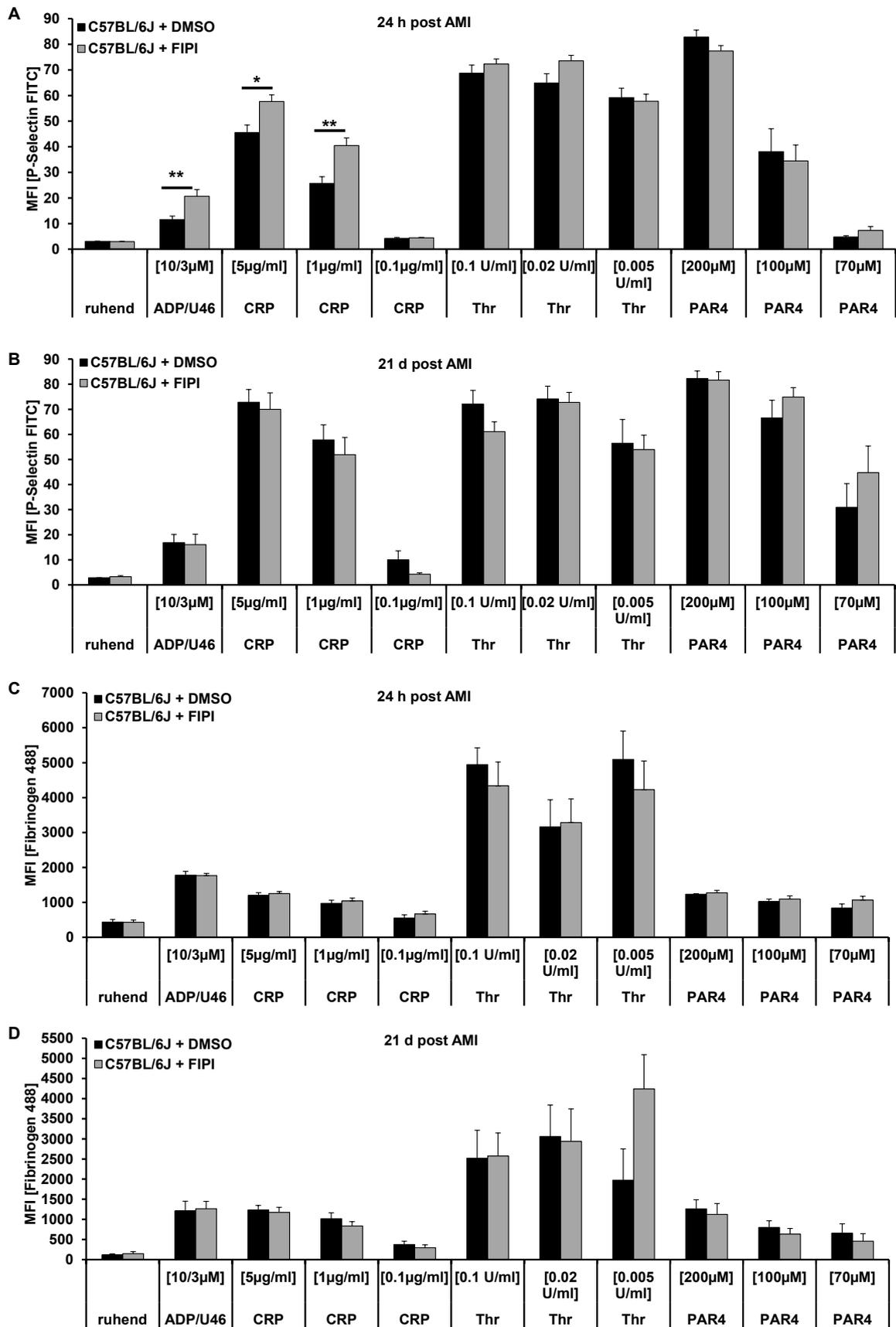
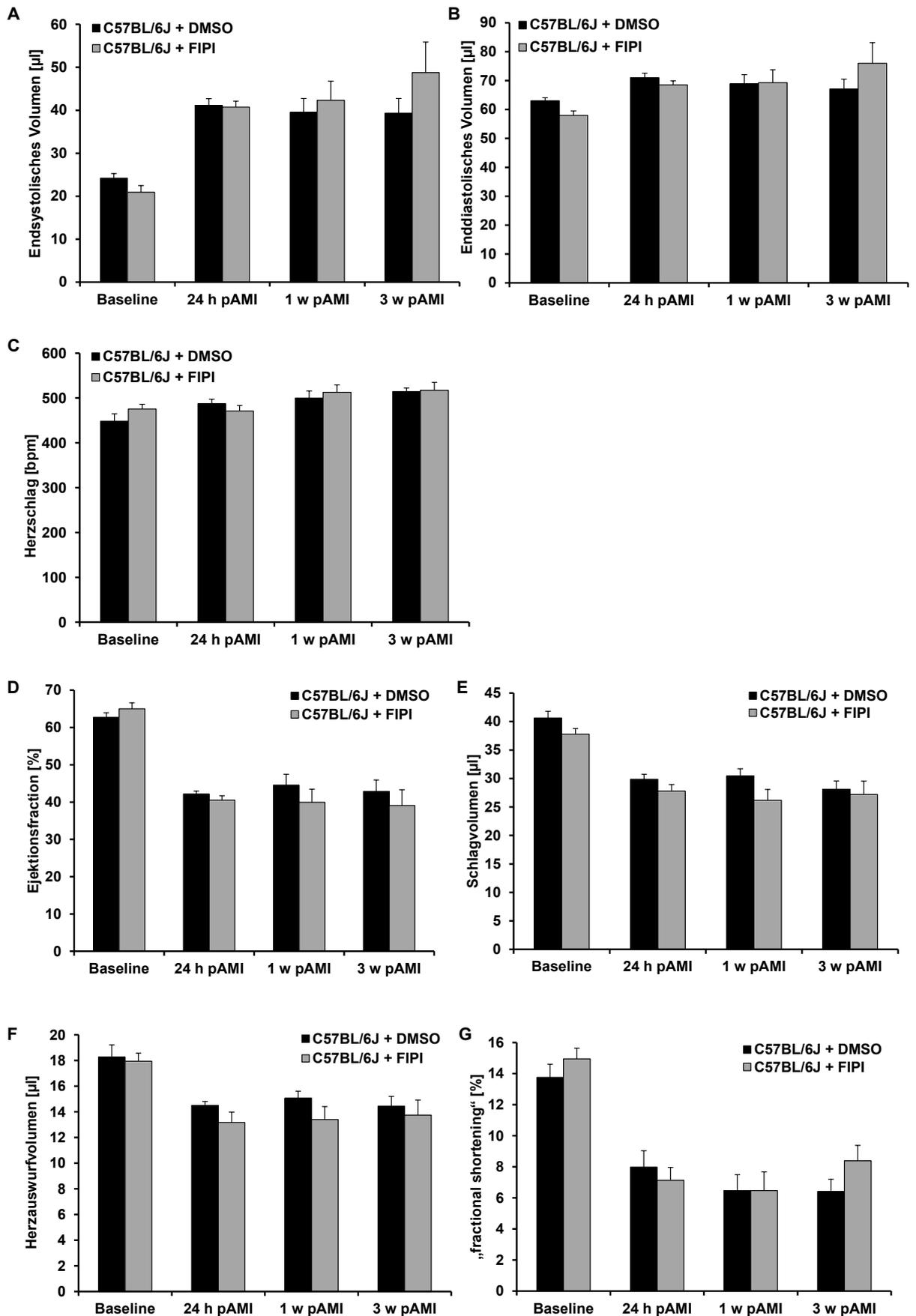


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analysen der Thrombozytenaktivierung durch Bestimmung der Exposition von P –Selektin und der Integrinaktivität. Thrombozyten wurden 24 h und 21 d nach Ischämie / Reperfusion mit unterschiedlichen Agonisten aktiviert. 24 h post AMI wurde eine erhöhte P –Selektin Exposition bei FIPI behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren nach Aktivierung mit CRP und ADP / U46 detektiert (**A**). Keine weiteren Unterschiede in der P – Selektin - Expression 24 h (**A**) und 21 D (**B**) und keine Unterschiede in der Integrinaktivierung 24 h (**C**) und 21 d (**D**) post AMI FIPI – behandelter Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 5 – 11; * P < 0.05, ** P < 0.01

4.1.2.2 Analyse der Herzfunktion FIPI – behandelte C57BL/6J - Tiere post AMI

PLD1 - defiziente Tiere zeigen nach Ischämie / Reperfusion eine beeinträchtigte Herzfunktion einhergehend mit einem vergrößerten Infarktgebiet 28 d post AMI [42]. Daher, und um zu kontrollieren ob die Induktion eines Herzinfarkts durch die Ischämie / Reperfusion erfolgreich war, wurden die Tiere vor, 24 h, 1 w und 3 w post AMI echokardiographisch untersucht (Abb. 22 A – K). In beiden Untersuchungsgruppen zeigte sich ein Anstieg im endsystolischen Volumen (Abb. 22 A), ein Abfall der Ejektionsfraktion (Abb. 22 D), ein Abfall des Schlagvolumens (Abb. 22 E) und des Herzauswurfvolumens (Abb. 22 F) und eine Erniedrigung der Verkürzungsfraktion (Abb. 22 G). Zusammengefasst weisen diesen Parameter auf eine erfolgreiche Induktion der myokardialen Ischämie in beiden zu untersuchenden Tiergruppen hin. Im Vergleich zwischen DMSO – und FIPI – behandelte Tiere ließen sich zu keinem Zeitpunkt innerhalb der gemessenen Parameter Unterschiede feststellen (Abb. 22 A – K).



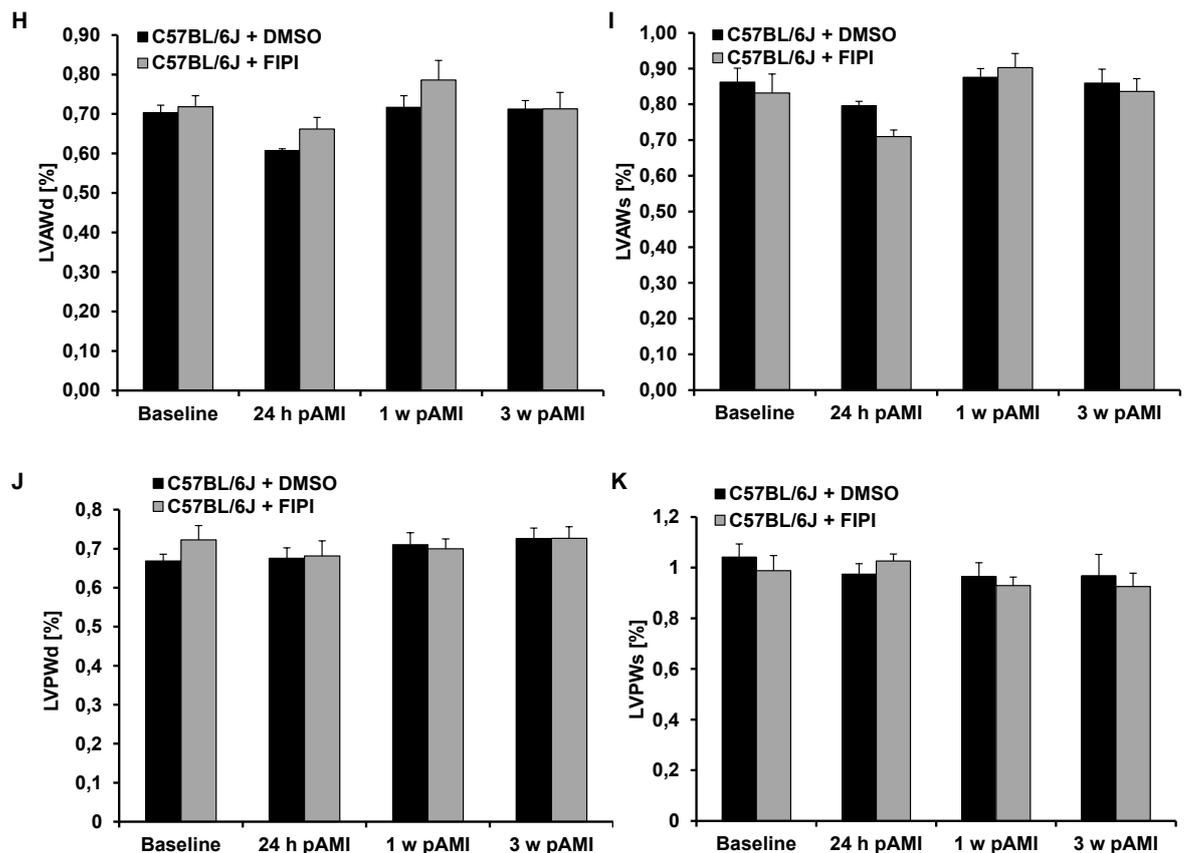


Abbildung 22: Echokardiographische Auswertung FIPI behandelter C57BL/6J – Tiere post AMI. Klassische Parameter für die Herzfunktion wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 1 w, 3 w) nach Ischämie / Reperfusion gemessen. FIPI – behandelte C57BL/6J – Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren keine Unterschiede in den verschiedenen Parameter. Fehlerindikatoren zeigen den ± SEM; n = 8 – 21

Die echokardiographische Auswertung zeigte somit keine Unterschiede in der Herzfunktion nach pharmakologischer Inhibition der PLD – Aktivität im Vergleich zu Kontrolltieren, die mit DMSO behandelt wurden.

4.1.2.3 Einfluss von FIPI auf die inflammatorische Antwort post AMI

Der Einfluss der pharmakologischen Inhibition von PLD auf die inflammatorischen Prozesse nach myokardialer Ischämie wurde zunächst durch Charakterisierung der Leukozyten / - bzw. Neutrophilen / Thrombozyten - Aggregatbildung über FACS – Analysen bestimmt (Abb. 23). 24 h nach Ischämieinduktion wurde

ein Anstieg in der Leukozyten / Thrombozyten – Aggregatbildung in beiden Untersuchungsgruppen festgestellt. Nach einem zum Basalwert signifikanten Anstieg der Aggregate 24 h post AMI ging die Anzahl der Aggregate 72 h post AMI wieder zurück. Im Vergleich der FIPI - behandelten Tiere zeigten sich keine signifikanten Änderungen zur DMSO - Kontrollgruppe 24 h post AMI (Abb. 23 A). Bei der Neutrophilen / Thrombozyten – Aggregatbildung kam es nach Ischämieinduktion ebenfalls zu einem Anstieg der Aggregate nach 24 h und einem Abfall nach 72 h. Dieser Verlauf zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Abb. 23 B).

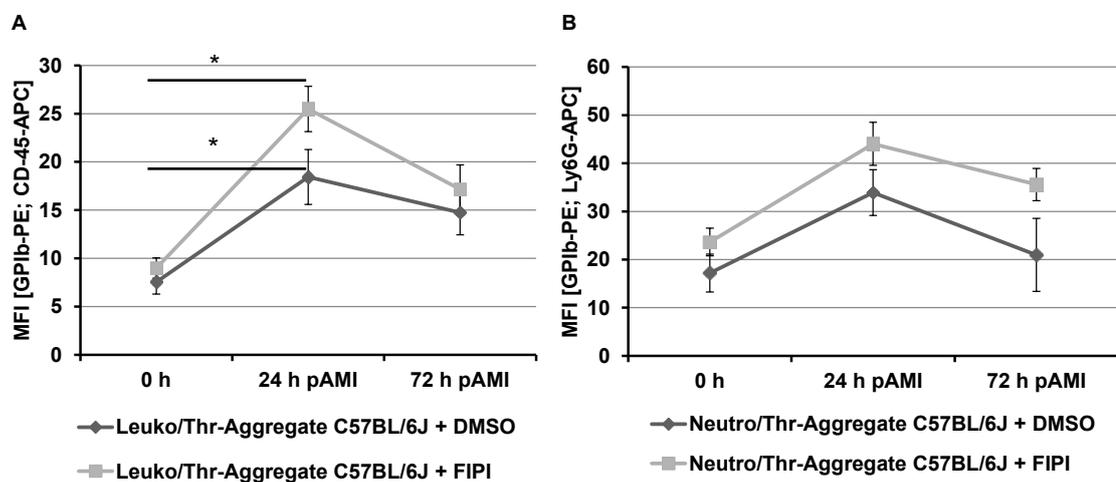


Abbildung 23: FACS – Analyse der Immunzellen / Thrombozytenaggregatbildung in der akuten Phase post AMI. Keine Unterschiede in der Leukozyten (A) – bzw. Neutrophilen / Thrombozyten (B) – Aggregatbildung im Vergleich FIPI – und DMSO – behandelter C57BL/6J – Mäusen zu keinem erfassten Zeitpunkt nach Ischämie / Reperfusion. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 5 – 18; * P < 0.05

Sowohl im konstitutiven *Pld1^{-/-}* - Tier [42] als auch in *Pld1^{-/-}* - KM – Chimären, zeigte sich im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle eine verminderte Einwanderung von Zellen in das Infarktgebiet 24 h nach Ischämie / Reperfusion. Daher wurde die Zellwanderung 24 h post AMI auch in den FIPI - behandelten Tieren näher analysiert. Die Einwanderung von Zellen in das Infarktgebiet war 24 h nach myokardialer Ischämie in FIPI – behandelten Tieren im Vergleich zu den

Kontrolltieren signifikant reduziert (Abb. 24 A + B). Eine spezifischere Analyse der migrierten Zellen zeigte, dass 24 h nach Ischämie signifikant weniger Neutrophile in das Infarktgebiet FIPI - behandelter Mäuse einwanderten im Vergleich zu DMSO – behandelten Tieren (Abb. 24 C + D). Auch die Einwanderung von Monozyten zeigte bei FIPI – behandelten Tieren eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 24 E + F).

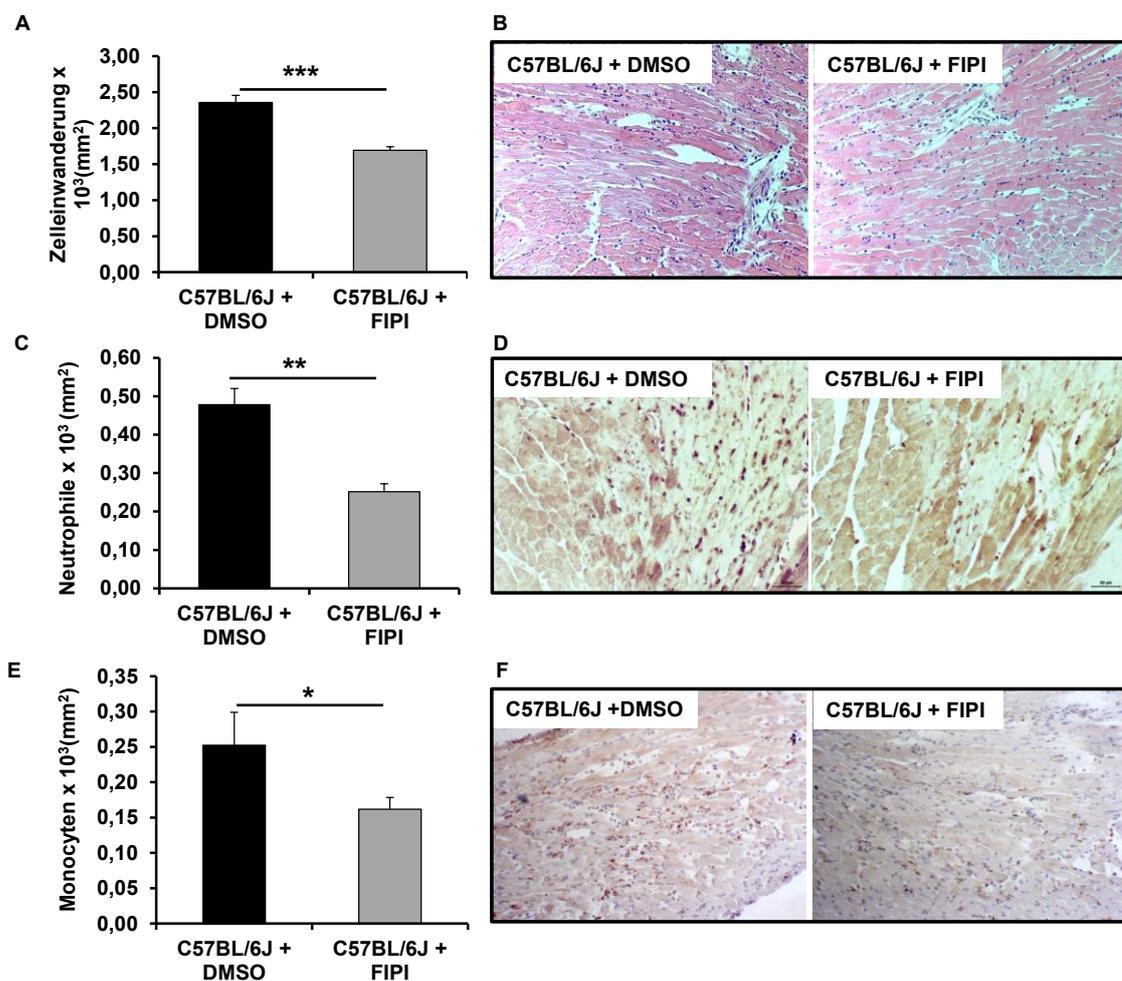


Abbildung 24: Einwanderung von inflammatorischen Zellen in das Infarktgebiet 24 h post AMI. Sowohl die gesamte Zelleinwanderung (**A + B**) als auch die zelltypspezifische Einwanderung von Neutrophilen (**C + D**) und Monozyten (**E + F**) zeigte sich bei FIPI – behandelten Tieren signifikant reduziert im Vergleich zu DMSO – behandelten Tieren. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 5; * P < 0.05, ** P < 0.01; *** P < 0.001

Neutrophile exprimieren auf ihrer Oberfläche das Integrin Mac – 1, welches für die Adhäsion der Zelle und ihre Migration ins Gewebe von Bedeutung ist [59]. Im Gefäßsystem wird nach einem inflammatorischen Impuls der Endothelzellen die Adhäsion von Neutrophilen über Mac – 1 verstärkt. Das Mac - 1 der adhärenen Neutrophilen kann mit dem GPIb - Rezeptor von Thrombozyten interagieren, was bei einem aus dem Gleichgewicht geratenen System zur Thrombose führen kann [60].

Da die Einwanderung von Neutrophilen 24 h post AMI in FIPI - behandelten Tieren reduziert war (Abb. 24 C + D), wurde hier 24 h post AMI die Mac – 1 – Expression durchflusszytometrisch bestimmt. 24h nach Ischämie / Reperfusion konnte keine Hochregulierung der Mac – 1 – Expression über die Durchflusszytometrie im Vergleich zur Mac – 1 - Expression unbehandelter Tiere ohne Myokardinfarkt festgestellt werden. Auch im Vergleich der Untersuchungsgruppen FIPI – und DMSO – behandelte Tiere konnte 24 h post AMI kein Unterschied in der Mac – 1 – Expression gemessen werden (Abb. 25).

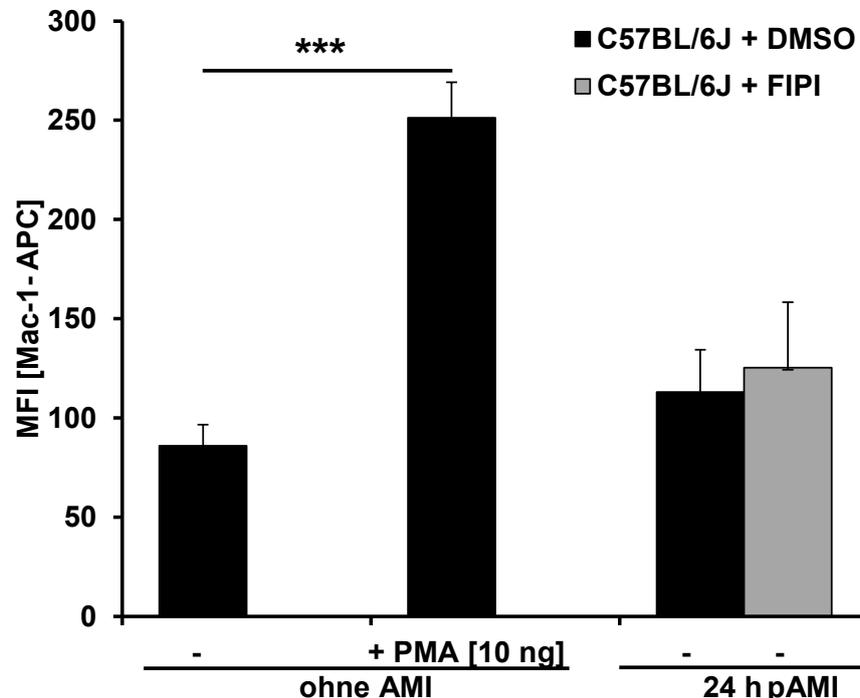


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse der Neutrophilen Mac – 1 – Expression 24 h post AMI. Im Vergleich von FIPI – bzw. DMSO – behandelte Tiere konnte kein Unter-

schied in der Mac – 1 – Expression 24 h nach Ischämie / Reperfusion festgestellt werden. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 9 - 10; *** P < 0.001

Die PLD1 - konstitutiv defizienten Mäuse zeigten eine reduzierte Einwanderung von Immunzellen und einen geringeren TNF – α – Plasmaspiegel 24 h post AMI, sowie eine erhöhte Infarktgröße 28 d post AMI [42]. TNF – α gehört zu den akute - Phase – Zytokinen, wird hauptsächlich von Macrophagen ausgeschüttet und spielt eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen unterschiedlicher Erkrankungen [37-41].

Da auch hier die Einwanderung von Neutrophilen in das Infarktgebiet bei FIPI – behandelten Tieren reduziert war (Abb. 24 C + D), wurde die Expression von TNF – α in dieser Untersuchungsreihe genauer analysiert. Die Expression in FIPI – behandelten Tieren unterschied sich im Vergleich zu den Kontrolltieren 24 h post AMI in der Analyse über quantitative Realtime – PCR nicht (Abb. 26 A). Ein weiteres von Makrophagen und auch Fibroblasten ausgeschüttetes Zytokin ist IL – 1, welches sich aus den zwei Untereinheiten IL - 1 α und IL - 1 β zusammensetzt. Im Plasma von FIPI – behandelten Mäusen 24 h nach Ischämie / Reperfusion war kein Unterschied der IL - 1 β – Sekretion im Vergleich zu den Kontrolltieren zu detektieren (Abb. 26 B).

Die Analyse eines weiteren Zytokins – IL – 6 - zeigte, dass die IL - 6 – Expression 24 h nach myokardialer Ischämie in den Untersuchungsgruppen vergleichbar war (Abb. 26 C).

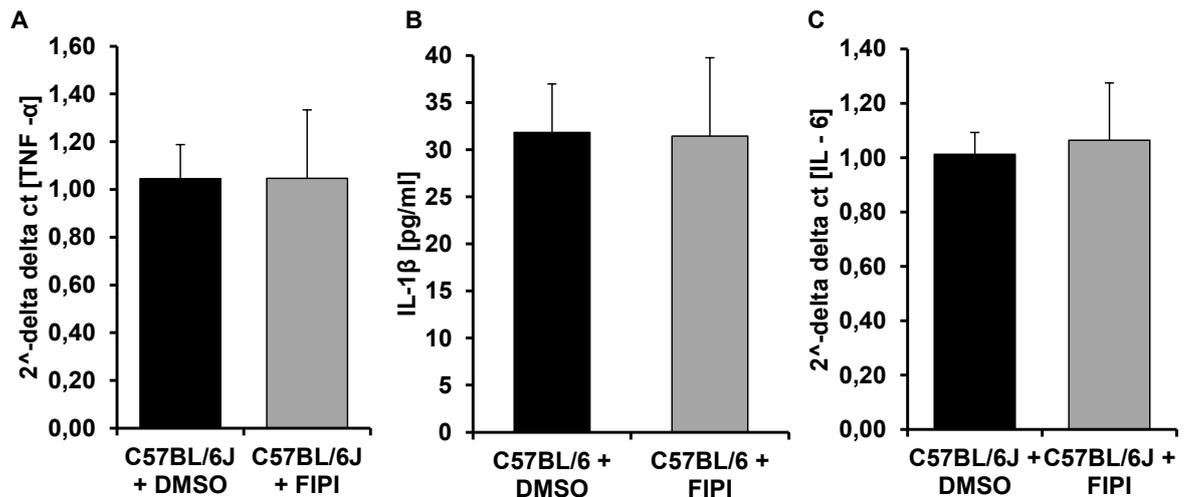


Abbildung 26: Analyse der akuten – Phasen - Zytokine 24 h post AMI. Im Vergleich der Expression der pro - inflammatorischen Zytokine TNF – α (**A**, qRT - PCR) und IL - 1β (**B**, ELISA) war kein Unterschied im Vergleich zwischen FIPI – und DMSO – behandelte Tiere messbar. Auch die Expression von IL – 6 (**C**, qRT -PCR) war in beiden Gruppen vergleichbar. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 5 (**A + C**), n = 14-16 (**B**)

4.1.2.4 Einfluss der PLD – Inhibition durch FIPI auf die Infarktgröße nach myokardialer Ischämie und Reperfusion

Pld1^{-/-} - defiziente Tieren weisen 28 d nach Ischämie / Reperfusion eine signifikant erhöhte Infarktgröße auf [42]. Auch hier wurde der Einfluss der pharmakologischen Inhibition von PLD auf die Infarktgröße 24 h und 21 d nach myokardialer Ischämie bestimmt. Die Auswertung der Infarktgröße 24 h post AMI zeigte keinen Unterschied im Vergleich der FIPI – Tiere zu DMSO - Kontrolltieren (Abb. 27 A + B). Auch die Narbengröße war 21 d nach Ischämie / Reperfusion in den Untersuchungsgruppen vergleichbar (Abb. 27 C + D).

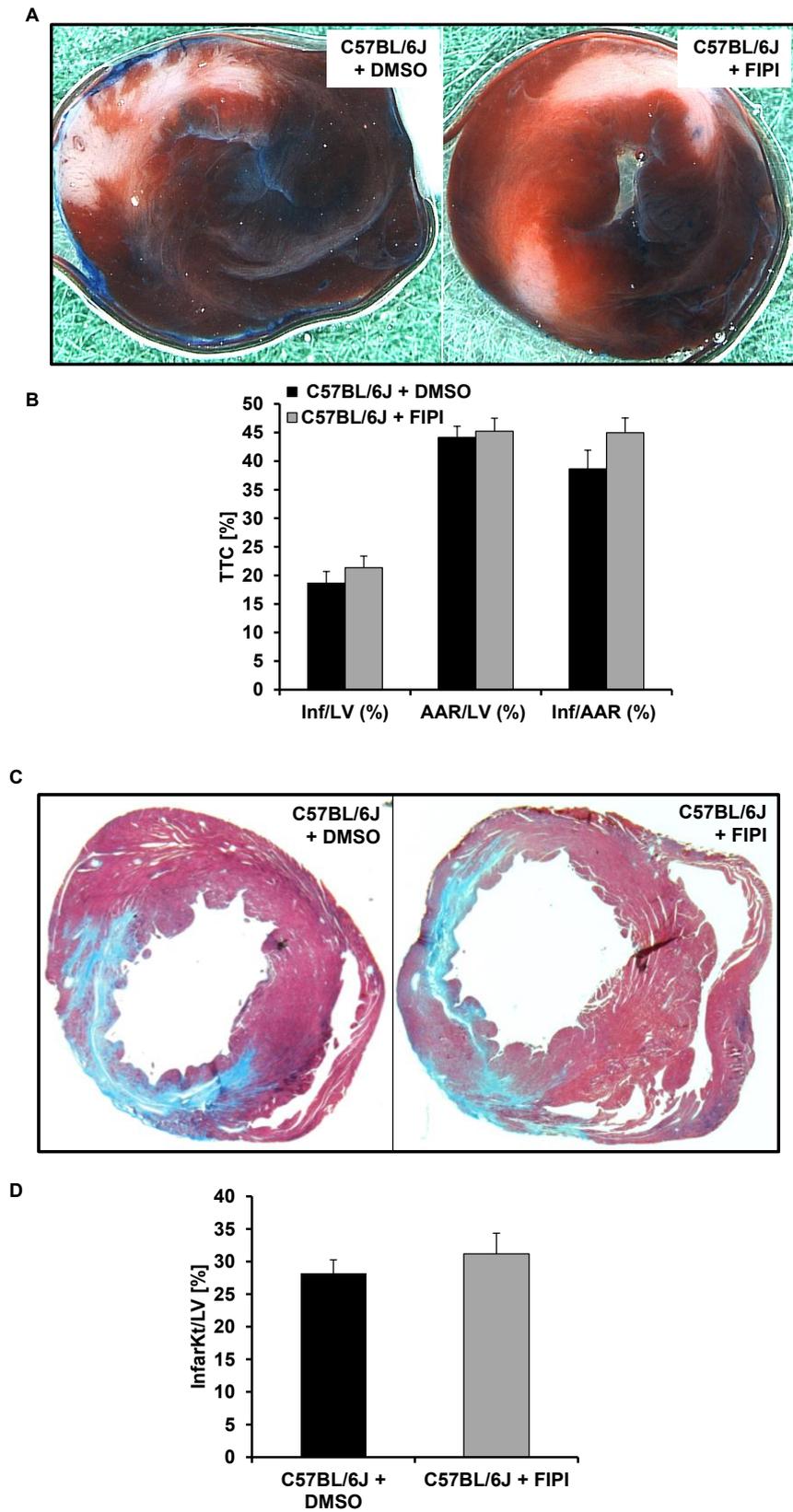


Abbildung 27: Analyse der Infarktgröße nach myokardialer Ischämie FIPI – behandelte Tiere. 24h post AMI wurde die Infarktgröße bzw. die „Area of risk“ von FIPI – bzw. DMSO –

behandelter Tiere bestimmt und kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen detektiert. Repräsentative Bilder der TTC – Färbung **(A)** und statistische Analyse **(B)**. Die im Infarktgebiet entstandene Narbe wurde mittels Gomori – Färbung 21 d post AMI detektiert (blau). Auch hier wurde im Vergleich der Gruppen kein Unterschied detektiert. Repräsentative Bilder der Gomori – Färbung **(C)** und statistische Analyse **(D)**. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 11-13 **(A + C)**, n = 6 **(C + D)**

Die pharmakologische Inhibition von PLD hat somit keine Auswirkung auf die Infarktgröße nach myokardialer Ischämie.

4.1.2.5 Einfluss von FIPI auf die Apoptose von Zellen im Myokard post AMI

PLD1 – konstitutiv defiziente Tieren weisen 24 h nach Ischämie / Reperfusion ein geringeren TNF – α – Plasmaspiegel auf als PLD1 – wildtypische Tiere und zeigen eine größere Infarktnarbe 21 d post AMI [42]. Die pharmakologische Inhibition von PLD führte zu keiner Veränderung des TNF – α – Plasmaspiegels und auch nicht zu einer Veränderung der Infarktgröße. Um jedoch auszuschließen, dass die pharmakologische Inhibition von PLD einen Einfluss auf die Apoptose nach myokardialer Ischämie hat, wurden verschiedene Apoptose - Marker in FIPI – behandelten Tieren analysiert. Die Bindung von TNF – α an den TNF - Rezeptor einer Zelle führt zur Aktivierung unterschiedlicher Caspasen, wie z. B. der Caspase – 3 [61]. Daher wurde hier Caspase – 3 im Infarktgebiet 24 h nach Ischämie / Reperfusion immunhistologische bestimmt. Die Anzahl Caspase – 3 positiver Zellen unterschied sich im Vergleich von FIPI – und DMSO – behandelten Tiere nicht (Abb. 28 A).

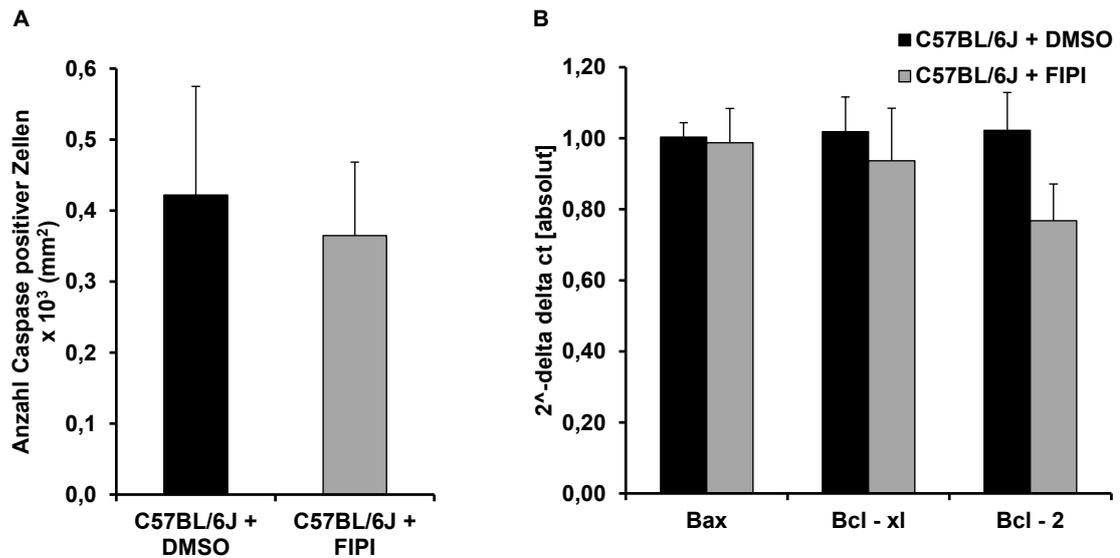


Abbildung 28: Analyse der Apoptose bei FIPI – behandelten Tieren 24 h post AMI. Immunhistologische Bestimmung der aktivierten Caspase – 3 im linken Ventrikel 24 h post AMI. Zwischen FIPI – behandelten und Kontrolltieren konnte kein Unterschied in der Anzahl Caspase – positiver Zellen detektiert werden (**A**). Über eine qRT- PCR wurde die Expression verschiedener Apoptosemarker, wie Bax (pro – apoptotisch) und Bcl – xl bzw. Bcl – 2 (anti - apoptotisch) analysiert. Es wurde in den drei genannten Markern kein Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen festgestellt (**B**). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 5

Weiterführend wurde die Expression des pro – inflammatorischen Proteins Bax und der anti – inflammatorisch wirkenden Proteine Bcl - xl und Bcl – 2 durch qRT – PCR 24 h post AMI analysiert. Im Vergleich von FIPI – und DMSO – behandelte Tiere fand sich kein Unterschied in der Expression dieser Proteine (Abb. 28 B). Somit zeigte die pharmakologische Inhibition von PLD keine Auswirkung auf die Apoptose im Myokard 24 h nach Ischämie / Reperfusion.

4.2 Einfluss von Phospholipase D1 in der Thrombozyten – vermittelten Inflammation

4.2.1 Signifikant reduzierte Adhäsion von Thrombozyten auf entzündlich - stimulierten Endothelzellen unter hohen Scherraten

Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass *Pld1*^{-/-} - Mäuse vor arterieller Thrombose geschützt sind. Sie zeigen eine beeinträchtigte $\alpha_{IIb}\beta_3$ – Integrinaktivierung, in Verbindung mit einer reduzierten GPIb – abhängigen Thrombusbildung unter hohen Scherraten [32].

In dieser Arbeit sollte u. a. der Einfluss von PLD1 auf die Thrombozyten - vermittelte Inflammation analysiert werden. Unter diesem Aspekt wurde zunächst analysiert, ob ein defekter GPIb – $\alpha_{IIb}\beta_3$ – Integrin - abhängiger Signalweg unter PLD1 – Defizienz die Thrombozyten – vermittelte Inflammation beeinflusst.

Hierzu wurde die Adhäsion von PLD1 - defizienten Thrombozyten auf Tumor - Nekrose – Faktor – α (TNF – α) stimulierten Endothelzellen unter Flussbedingungen untersucht. Des Weiteren wurde der PLD – Inhibitor FIPI verwendet, um zum einen die Abhängigkeit der enzymatischen PLD - Aktivität in diesen Prozessen, sowie zum anderen, um den Einfluss beider PLD - Isoformen zu analysieren, da FIPI die enzymatische Aktivität von PLD1 und PLD2 hemmt. Bei einer niedrigen Scherrate (150 sek^{-1}), wie sie z. B. in Venen oder großen Arterien zu finden ist, war kein Unterschied in der Adhäsion der Thrombozyten festzustellen (Abb. 29).

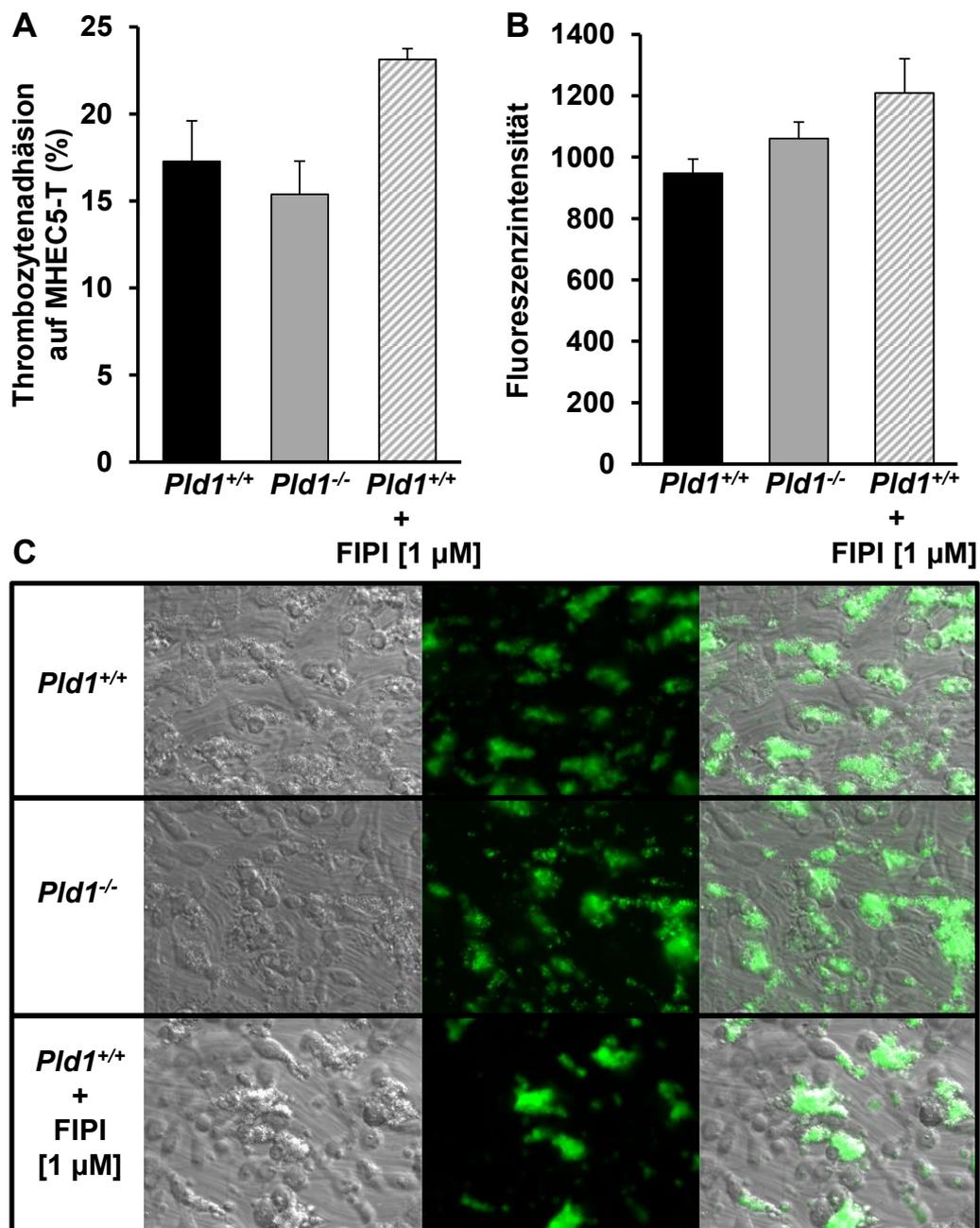


Abbildung 29: Unveränderte Adhäsion von Thrombozyten auf TNF – α stimulierten EC unter niedriger Scherrate (150 sek^{-1}). ECs wurden mit TNF – α stimuliert und Vollblut von PLD1 – defizienten Tieren wurde mit einer Scherrate von 150 sek^{-1} über die Endothelzellen *ex vivo* laufen gelassen. Die Thrombozytenadhäsion (**A**) und die Fluoreszenzintensität der adherenten Thrombozyten (**B**) zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Repräsentative Bilder adherenter Thrombozyten (**C**). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 5

Im Gegensatz hierzu war bei einer hohen Scherrate (1700 sek^{-1}), die bereits eine GPIb – abhängige $\alpha_{IIb}\beta_3$ – Integrin – Aktivierung zur Adhäsion von Thrombozyten erfordert, eine signifikante Reduzierung der Thrombozytenadhäsion unter PLD1 – Defizienz und nach PLD – Inhibition zu messen (Abb. 30).

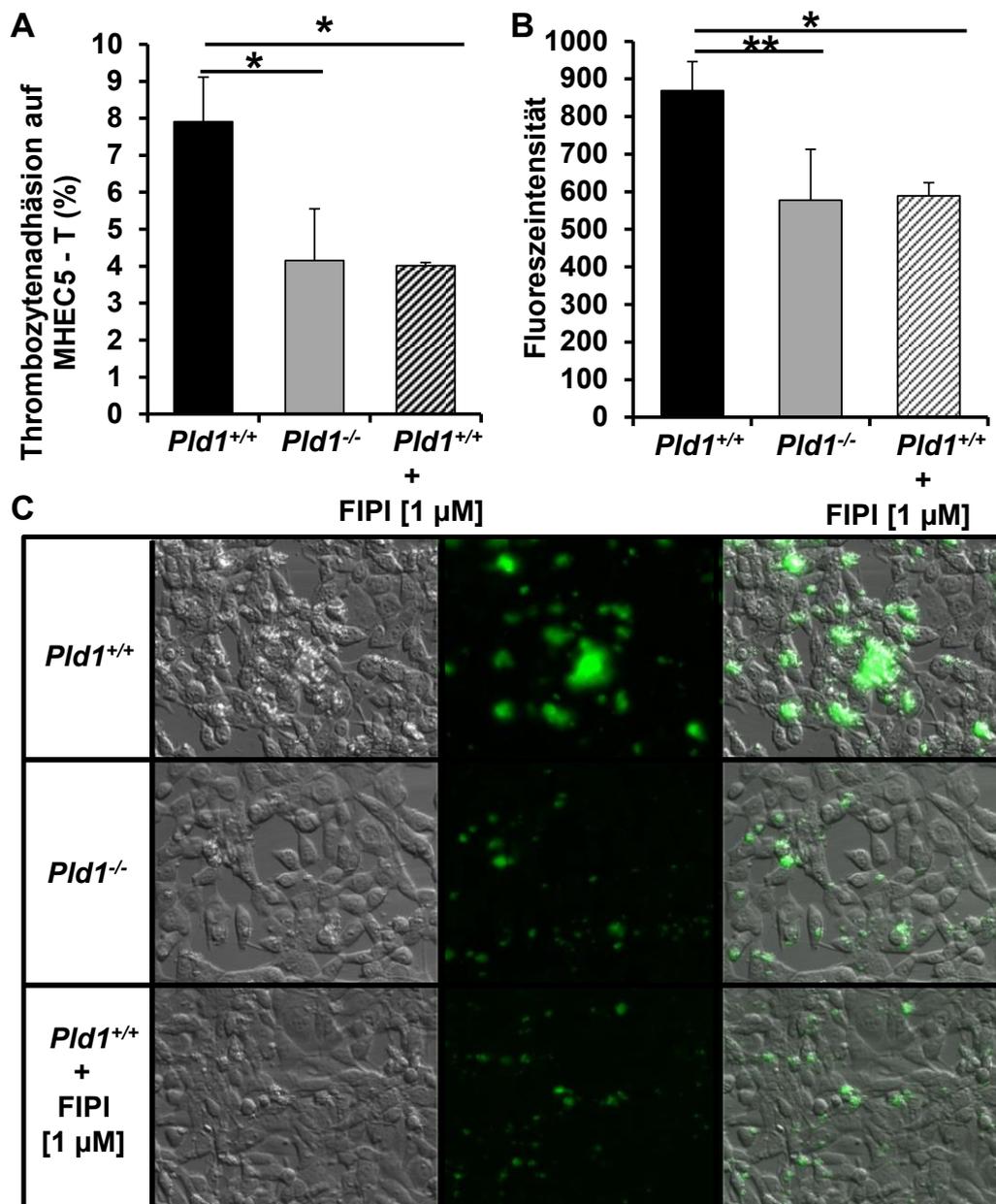


Abbildung 30: Signifikant reduzierte Thrombozytenadhäsion auf TNF – α stimulierten Endothelzellen unter hoher Scherrate (1700 sek^{-1}). ECs wurden mit TNF – α stimuliert und

Vollblut aus PLD1 – defizienten Tieren wurde mit einer Scherrate von 1700 sek^{-1} über die Endothelzellen *ex vivo* laufen gelassen. Die Thrombozytenadhäsion **(A)** und die Fluoreszenzintensität der adhärenen Thrombozyten **(B)** zeigten eine signifikante Reduzierung unter PLD1 - Defizienz. Repräsentative Bilder adhärenter Thrombozyten **(C)**. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; $n = 5$ * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Wie Abb. 30 zeigt, führte die Inkubation der Thrombozyten mit dem PLD - Inhibitor FIPI nicht zu einer gesteigerten Reduzierung der Thrombozytenadhäsion im Vergleich zur Adhäsion PLD1 - defizienter Thrombozyten trotz Hemmung beider Isoformen.

Eine nachfolgende Analyse der Adhäsion von PLD2 – defizienten Thrombozyten ergab keinen Unterschied in der Adhäsion auf entzündlichem Endothel unter hohen Scherraten im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 31).

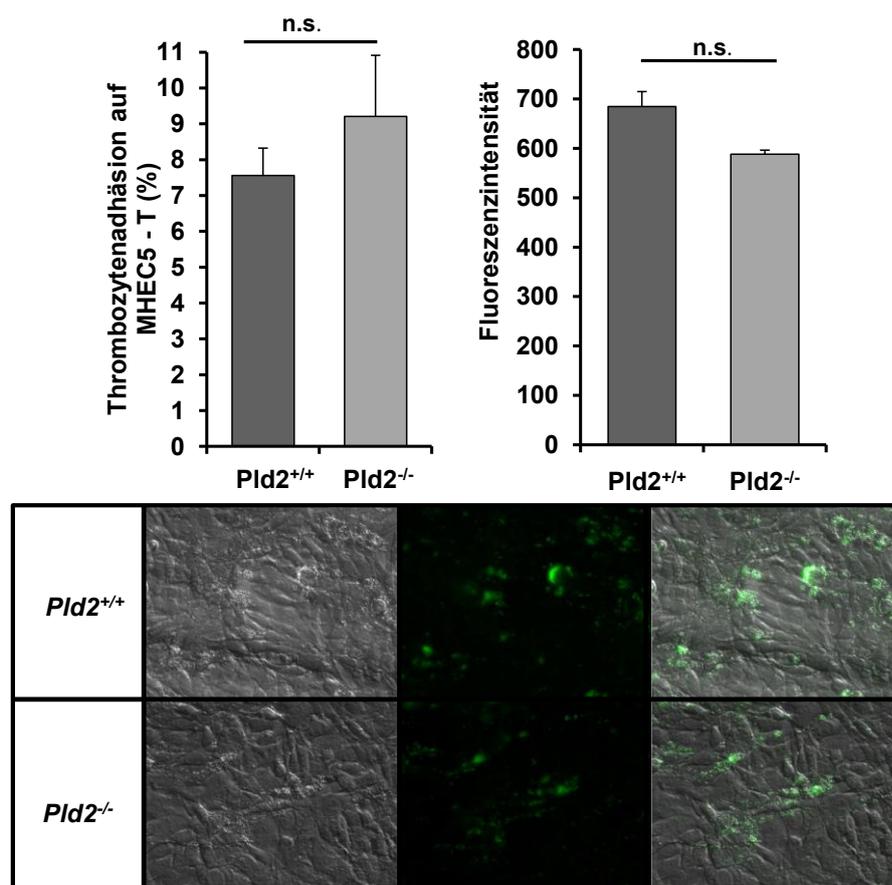


Abbildung 31: Keine Veränderung in der Adhäsion von Thrombozyten auf entzündlichem Endothel unter hoher Scherrate (1700 sek^{-1}). In der dynamischen Flusskammer mit entzünd-

lich stimulierten ECs zeigte PLD2 – Defizienz keine Unterschiede im Adhäsionsverhalten. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 5

Die Exposition von CD40L aktivierter Thrombozyten leitet die inflammatorische Antwort von Endothelzellen über das $\alpha_{IIb}\beta_3$ – Integrin ein [62]. Daher wurden hier PLD1 - defiziente Thrombozyten mit unterschiedlichen Agonisten aktiviert und die CD40L – Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten gemessen. In der Durchflusszytometrie zeigte sich eine nur im Trend reduzierte CD40L – Expression nach der Aktivierung mit Thrombin (0.1 U / ml), jedoch eine signifikante Reduzierung von CD40L auf der Thrombozytenoberfläche nach CRP (0.5 μ g / ml) – Aktivierung. Um den Einfluss des GPIb – Signalwegs in diesem Zusammenhang zu analysieren, wurden die Thrombozyten zusätzlich mit Botrocetin / vWF aktiviert, da Botrocetin die Bindung von vWF an GPIb, die sonst nur scheratenabhängig erfolgt, unter statischen Bedingungen zu erzwingen. Die Stimulation mit Botrocetin / vWF resultierte in einer signifikanten Reduzierung der CD40L – Expression auf der Oberfläche von PLD1 – defizienten Thrombozyten (Abb. 32).

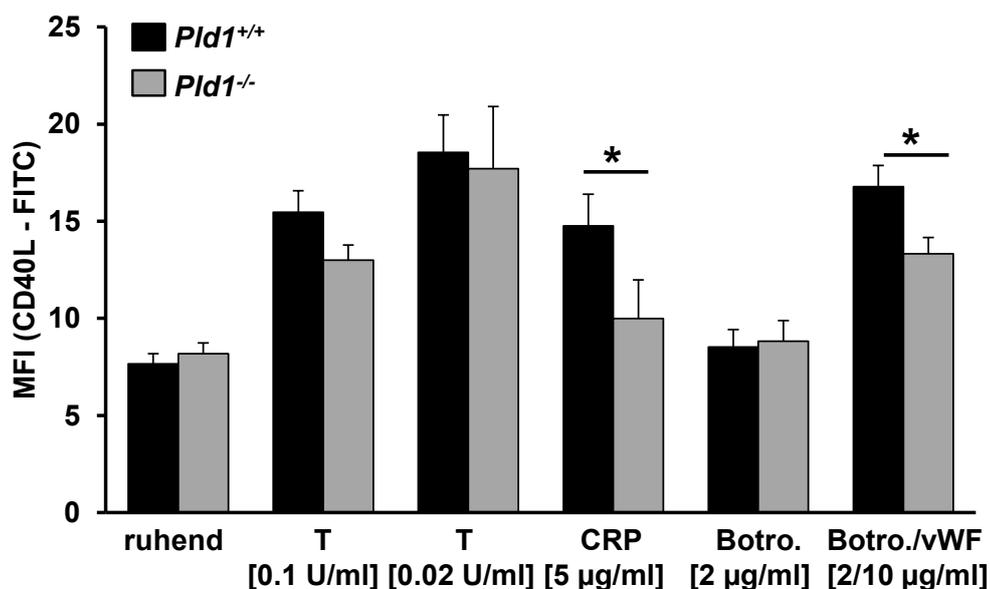


Abbildung 32: Reduzierte CD40L – Expression auf der Oberfläche von *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten nach Aktivierung mit CRP und Botrocetin / vWF. Thrombozyten wurden mit unter-

schiedlichen Agonisten aktiviert und die CD40L – Expression auf ihrer Oberfläche durchflusszytometrisch bestimmt. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 8; * p<0.05.

Da PLD1 als Regulator der GPIIb – abhängigen Integrinaktivität identifiziert werden konnte [32], wurde hier die thrombozytäre Integrinaktivität in Anwesenheit von entzündlich stimulierten Endothelzellen untersucht. Es zeigte sich eine signifikant reduzierte Integrinaktivität der PLD1 - defizienten Thrombozyten unter diesen Bedingungen (Abb. 33).

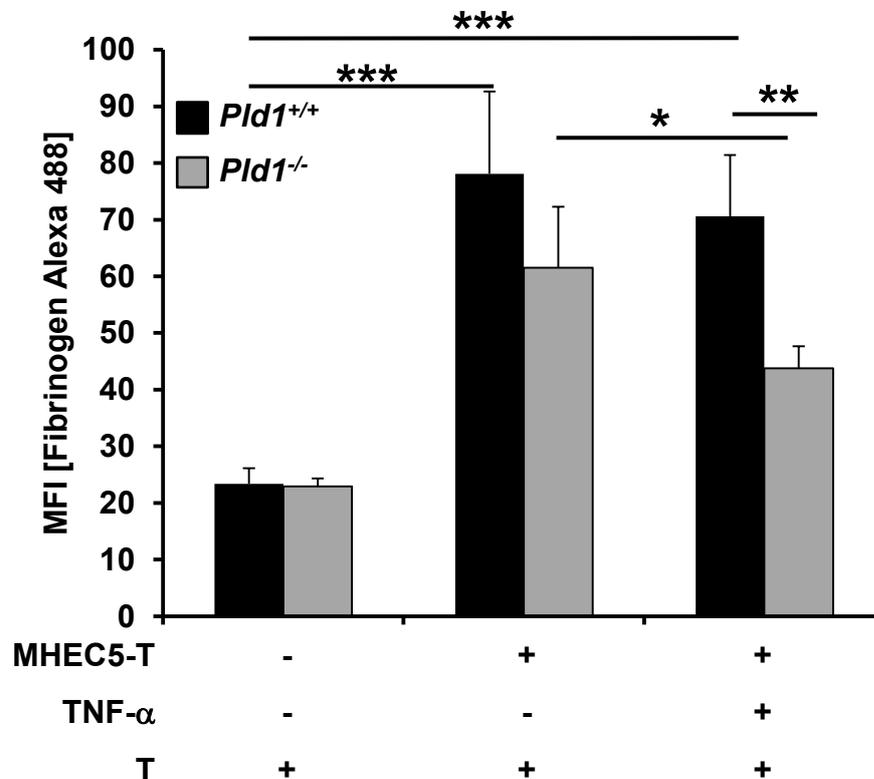


Abbildung 33: Signifikante Reduzierung der Integrinaktivität PLD1 – defizienter Thrombozyten nach Aktivierung mit TNF – α stimulierten Endothelzellen. Endothelzellen wurden mit TNF - α stimuliert und mit isolierten Thrombozyten ko - inkubiert. Die Integrinaktivität wurde über die thrombozytäre Fibrinogenbindung durchflusszytometrisch bestimmt. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 10; * p<0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

4.2.2 Unveränderte zytoskelettale Reorganisation bei *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten

PLD1 – defiziente Mäuse sind über einen GPIIb – abhängigen Integrindefekt vor arterieller Thrombose *ex vivo* geschützt [32]. Zusätzlich wurde in einer weiteren Studie gezeigt, dass PLD1 – defiziente Makrophagen eine veränderte zytoskelettale Reorganisation zeigen, mit welcher eine Verringerung der Eigenschaft zur Phagozytose dieser Zellen einhergeht [63]. Um einen generellen Defekt in der zytoskelettalen Reorganisation nach Aktivierung von PLD1 – defizienten Thrombozyten, sowie einen Einfluss auf die Thrombusbildung durch Veränderung des Zytoskeletts durch PLD1 zu untersuchen, wurde hier, die morphologische Oberflächenvergrößerung durch Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien von Thrombozyten, das sog. *Spreading*, genauer analysiert. Zusätzlich wurde die Adhäsion von Thrombozyten und MEFs (engl. *mouse embryonic fibroblasts*) in die Auswertung mit einbezogen. Auf einer Fibrinogenmatrix wurden keine Unterschiede in der Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien im ruhenden wie im Thrombin – aktiviertem Zustand der PLD1 – defizienten Thrombozyten nach unterschiedlichen Adhäsionszeitpunkten festgestellt (Abb. 34).

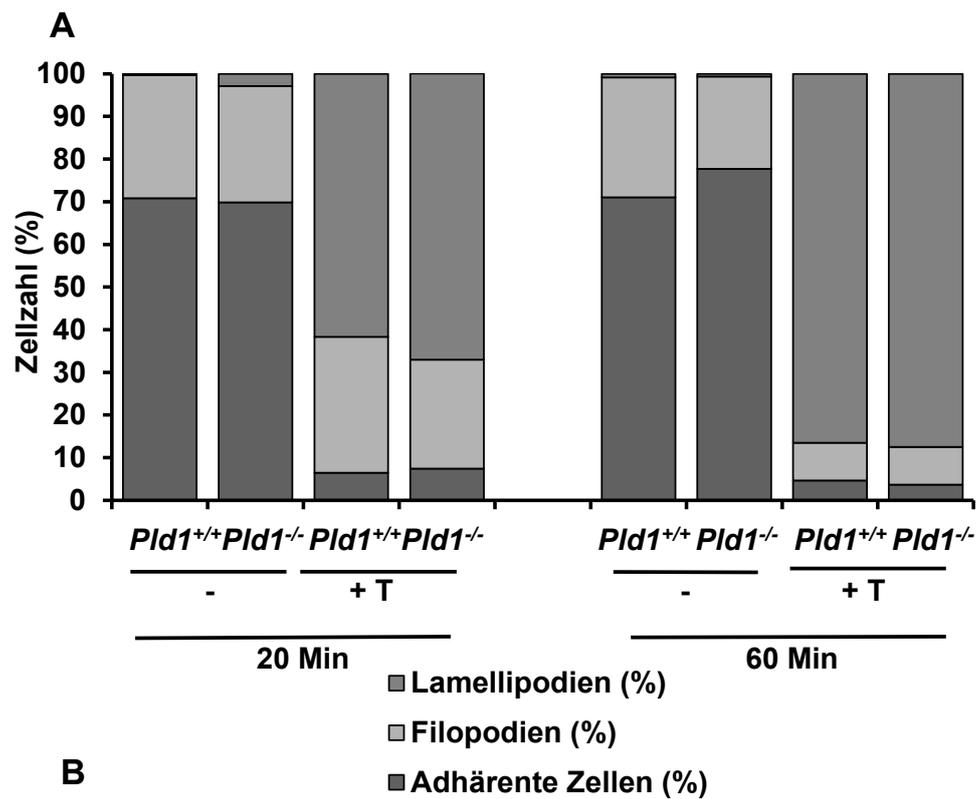
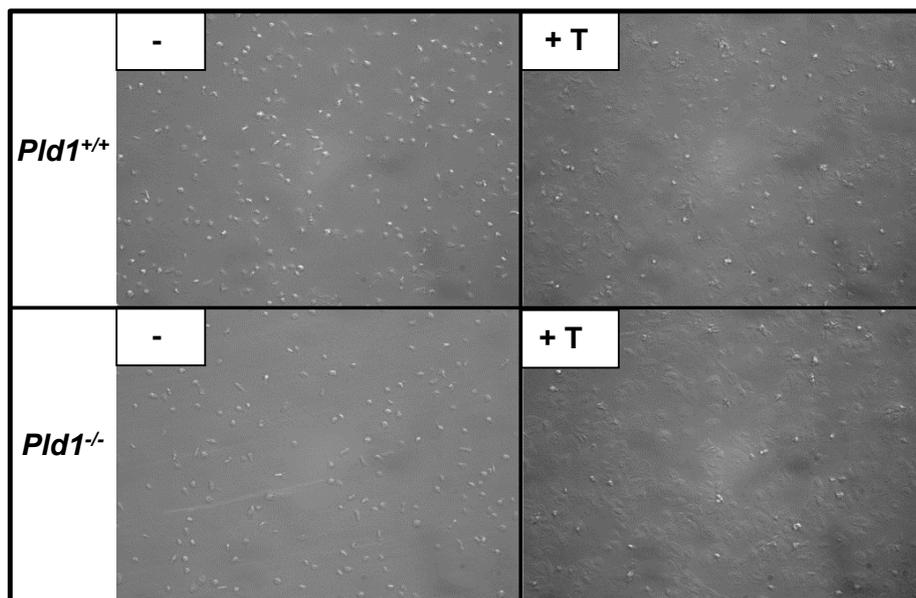
**B**

Abbildung 34: Keine signifikanten Unterschiede im *Spreading* von PLD1 – defizienten Thrombozyten auf Fibrinogen. Ruhende und Thrombin – aktivierte Thrombozyten wurden auf einer Fibrinogenmatrix über 20 bzw. 60 Min inkubiert und so das sog. *Spreading* induziert. Danach wurden die Zellen je nach Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien sowie nur adhärenzte Thrombozyten ausgezählt (A). Repräsentative Bilder nach 60 Min *Spreading* (B). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 3

Des Weiteren wurden keine Unterschiede im Adhäsionsverhalten von *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten im Vergleich zu *Pld1*^{+/+} - Thrombozyten auf Fibrinogen detektiert (Abb. 35 A). Als zusätzliche Kontrolle wurden MEFs auf unterschiedlichen, extrazellulären Matrixproteinen, wie sie in der Gefäßwand zu finden sind, gegeben und ihr Adhäsionsverhalten analysiert. Auch hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsion von *Pld1*^{-/-} - und *Pld1*^{+/+} - MEFs auf Kollagen, Fibrinogen oder Fibronectin (Abb. 35 B).

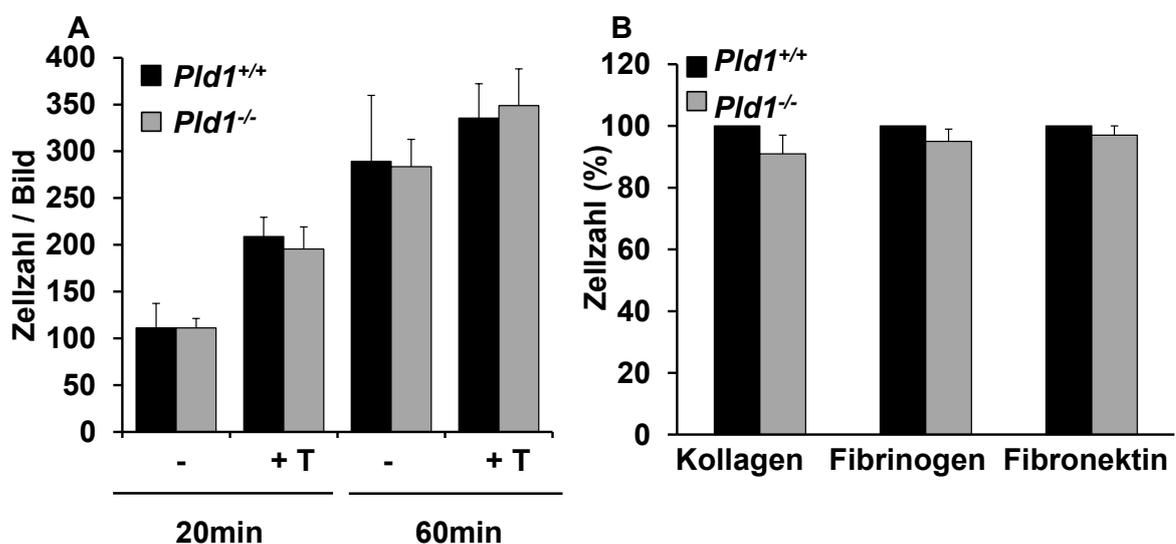
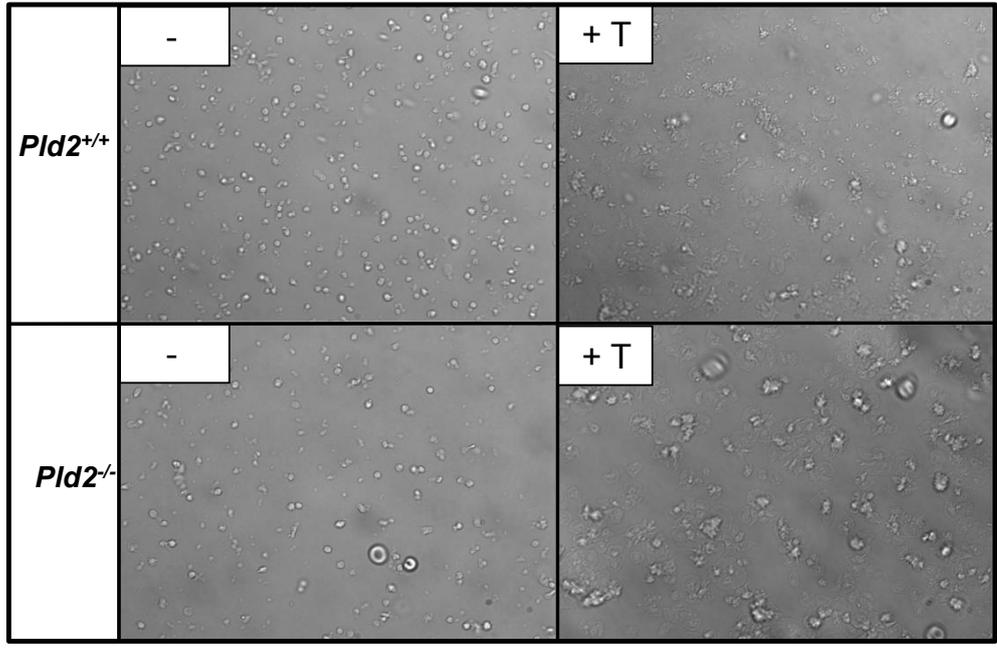
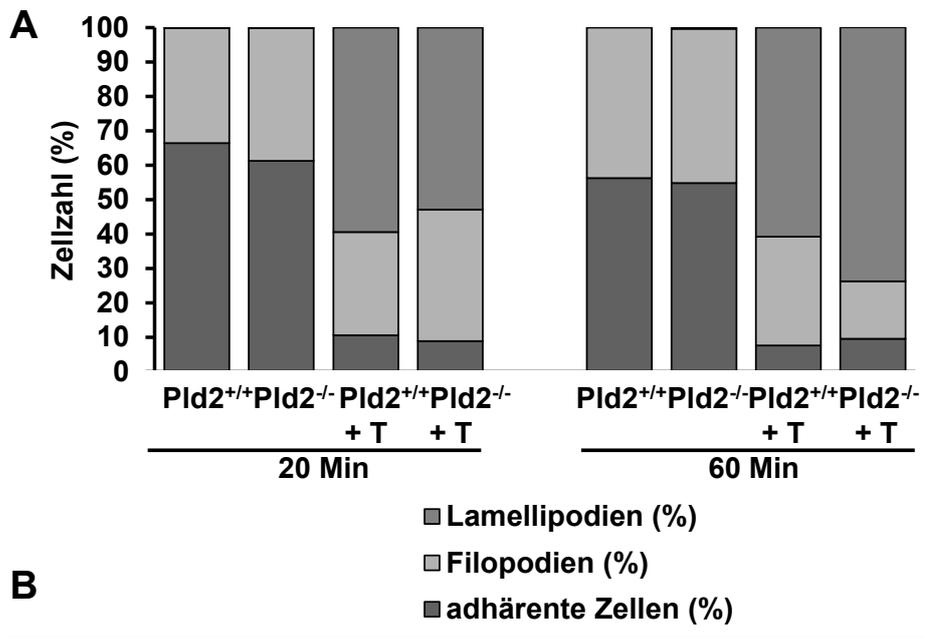


Abbildung 35: Adhäsion von Thrombozyten und MEFs. Keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsion von ruhenden oder Thrombin - aktivierten Thrombozyten auf Fibrinogen (A). Auch die MEFs zeigten keine Unterschiede im Adhäsionsverhalten auf verschiedenen Matrices (B). Fehlerindikatoren zeigen die \pm SD n = 5 (A); den \pm SEM n = 3 (B)

Diese Daten zeigen, dass es keine Unterschiede in der zytoskelettalen Reorganisation von *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten gibt.

Die Ergebnisse mit PLD2 – defizienten Thrombozyten zeigten keinen Einfluss von PLD2 auf die zytoskelettale Reorganisation. Des Weiteren konnten keine Unterschiede in der Adhäsion von *Pld2*^{-/-} - im Vergleich zu *Pld2*^{+/+} - Thrombozyten detektiert werden (Abb. 36 A + B). Auch die Adhäsion von PLD2 – defizienten MEFs auf verschiedenen Matrixproteinen zeigte keinen Adhäsionsdefekt (Abb. 36 C + D).



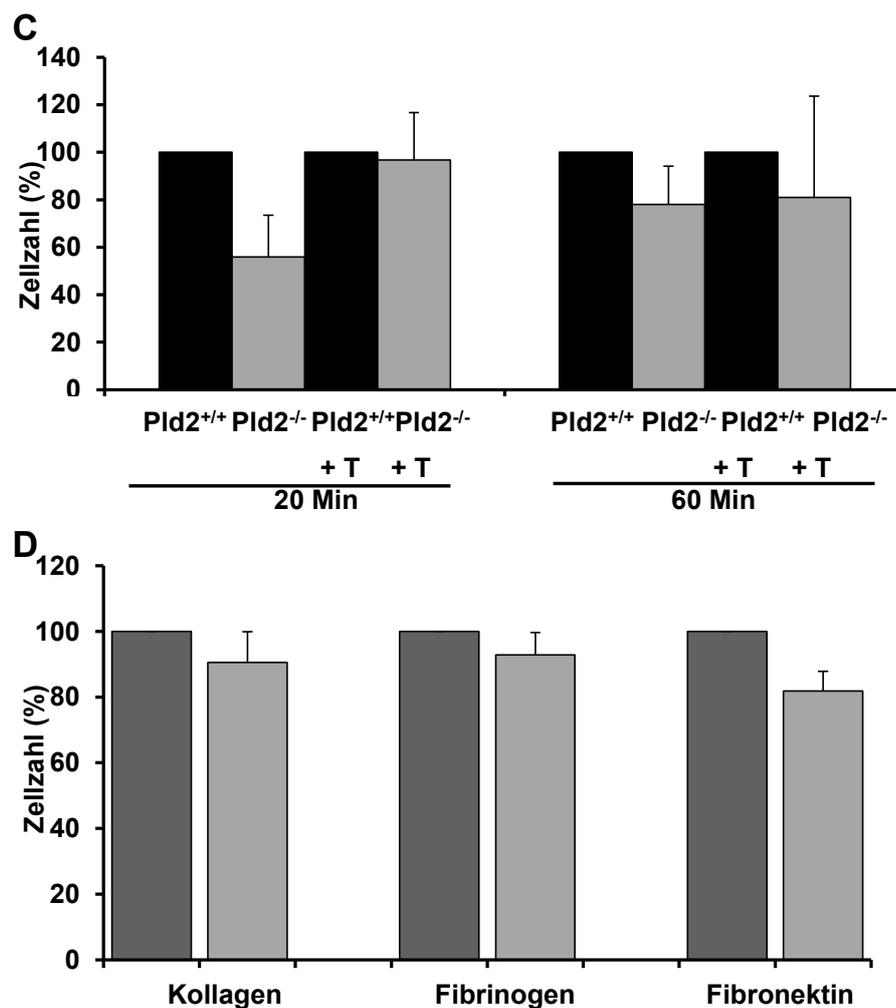


Abbildung 36: Spreading und Adhäsion von Thrombozyten. Ruhende und Thrombin – aktivierte Thrombozyten wurden auf einer Fibrinogenmatrix über 20 bzw. 60 Min spreaden gelassen und nach Status ausgezählt (A). Repräsentative Bilder nach 60 Min Spreading (B). Keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsion von ruhenden oder Thrombin - aktivierten Thrombozyten auf Fibrinogen im Vergleich der Genotypen (C). Auch in der Kontrollzelllinie Mef2 zeigen sich keine Auffälligkeiten im Adhäsionsverhalten auf verschiedenen Matrixen (D). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 3

Da die Adhäsion von Thrombozyten und die folgende Ausprägung von Lamellipodien auf vWF und damit die Abwesenheit von Kollagen ein ausschließlich GPIb – und $\alpha_{IIb}\beta_3$ – abhängiger Prozess ist [64], wurden hier Thrombozyten auf einer vWF – Matrix inkubiert. Die Adhäsion sowie die Lamellipodienbildung war bei PLD1 – defizienten Thrombozyten 3 Min nach Adhäsionsbeginn signifikant erniedrigt. Hierzu muss erwähnt werden, dass eine vollständige Ausprägung

der typischen Lamellipodienstruktur, wie sie auf Fibrinogenmatrix beobachtet werden kann, auf einer vWF – Matrix nicht erfolgt. Thrombozyten die auf vWF adhären und dadurch aktiviert werden, bilden lamellipodienartige Strukturen mit gezackten Rändern, sowie kleine knotige Strukturen auf ihrer Peripherie aus [64]. Nach einer Inkubation von 20 Min konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen detektiert werden (Abb. 37 A). Ähnliche Ergebnisse waren auch in der Analyse der Adhäsion auf vWF zu beobachten. Die Adhäsion der PLD1 – defizienten Thrombozyten war im Vergleich zu *Pld1*^{+/+} - Thrombozyten nach 3 Min signifikant erniedrigt. Nach 20 Min konnten keine Unterschiede im Adhäsionsverhalten detektiert werden (Abb. 37 B).

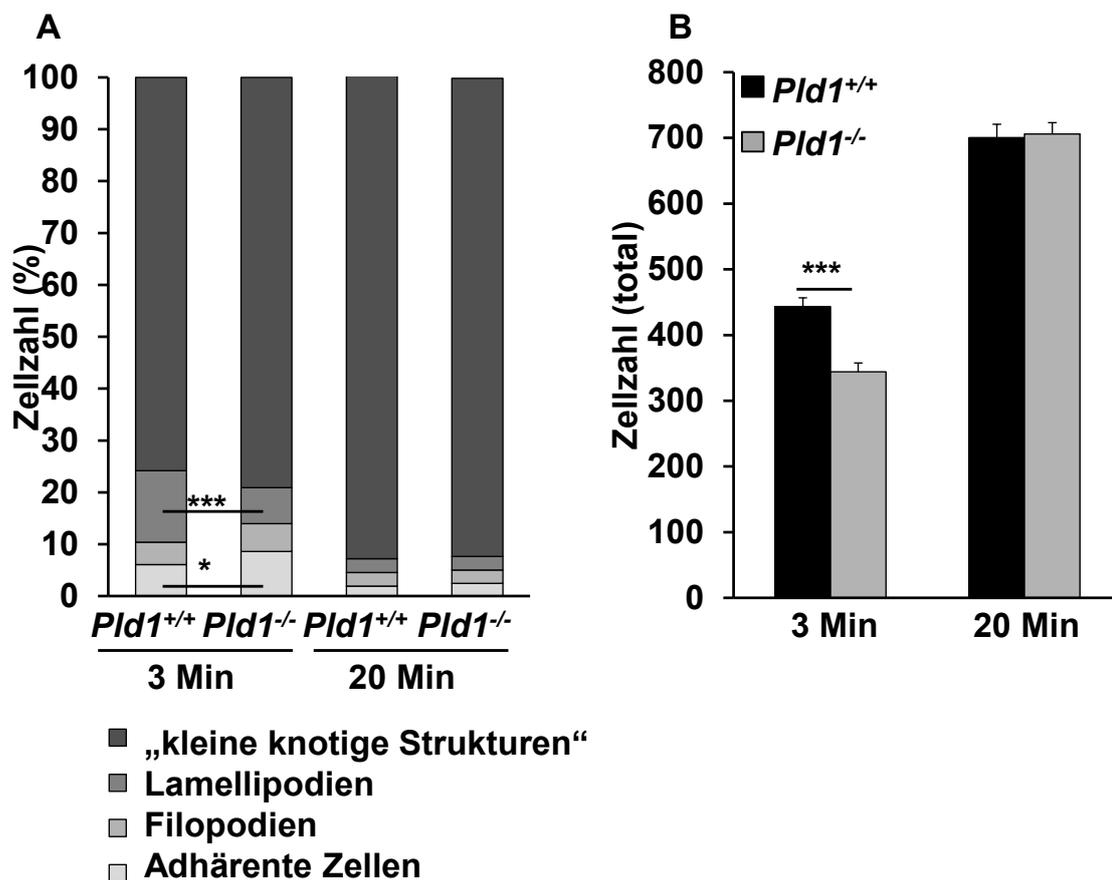


Abbildung 37: Adhäsion und *Spreading* von Thrombozyten auf einer vWF - Matrix. Nach einer Inkubation von 3 Min auf einer vWF – Matrix zeigte sich eine signifikante Reduktion der Adhäsion und der Ausbildung von Lamellipodien von *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten im Vergleich zu Kontrollzellen. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 3; * p<0.05, *** P < 0.001.

Diese Daten weisen darauf hin, dass Defekte im GPIb – Signalweg und der GPIb – abhängigen Integrinaktivierung, die für eine Adhäsion unter hohen Scherraten wichtig sind, für die reduzierte Adhäsion von *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten auf entzündlich stimulierten Endothelzellen unter Flussbedingungen verantwortlich sind.

4.2.3 *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten induzieren veränderte chemotaktische und adhäsive Eigenschaften von Endothelzellen

Während eines inflammatorischen Prozesses oder einer Verletzung der Gefäßwand, ist das Zusammenspiel und die Signalgebung von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen essentiell für die Adhäsion der Thrombozyten und die Rekrutierung von Leukozyten. So ist bekannt, dass die Exposition von CD40L auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten und die thrombozytäre Sekretion von IL – 1 wichtig für die Aktivierung von Endothelzellen ist, sodass es zur Sekretion von verschiedenen endothelialen Chemokinen, wie IL - 6 und IL – 8, sowie zur Hochregulierung von endothelialen Adhäsionsmolekülen kommt. Dies fördert die Rekrutierung von verschiedenen Immunzellen, wie z. B. Neutrophilen und Makrophagen, an die betroffene Stelle im Gefäß [24, 62].

Um den Einfluss und die Bedeutung von PLD1 in diesen Prozessen zu analysieren, wurden Endothelzellen (MHEC5 – T) mit unterschiedlich stimulierten Thrombozyten für 3.5 h koinkubiert und die Hochregulierung der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM – 1, VCAM – 1, E - Selektin und P - Selektin durchflusszytometrisch bestimmt. Die Hochregulierung der ICAM – 1 - Expression auf der Oberfläche der Endothelzellen war nach Koinkubation mit Thrombin (0.02 U / ml) – aktivierten *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten signifikant niedriger als nach Stimulation mit *Pld1*^{+/+} - Thrombozyten. Dieser Effekt zeigte sich dosisabhängig und war bei hoher Thrombin – Konzentration (0.1 U / ml) nicht mehr nachweisbar. Die Stimulation von Thrombozyten mit zeigte keinen Unterschied in der Exposition von endothelialelem ICAM – 1 (Abb. 38 A).

Die Expression von VCAM - 1 zeigte nach der Stimulation mit Thrombin (0.1 U / ml) - aktivierten Thrombozyten einen Anstieg in der VCAM – 1 Exposition. Ein Unterschied in der Hochregulation der VCAM – 1 - Exposition nach Stimulation mit *Pld1*^{+/+} - oder *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten wurde nicht detektiert (Abb. 38 B). Die Koinkubation der Endothelzellen mit aktivierten Thrombozyten zeigte keine Hochregulation der endothelialen E – Selektin – Exposition (Abb. 38 C). Auch bei der Expression von P – Selektin auf der Oberfläche der Endothelzellen zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Effekt nach Stimulation mit Thrombin – aktivierten Thrombozyten. Die Hochregulation von P – Selektin war signifikant niedriger nach Koinkubation mit *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten im Vergleich zur Stimulation mit *Pld1*^{+/+} - Thrombozyten (Abb. 38 D).

Auch bei dieser durchflusszytometrischen Analyse der endothelialen Adhäsionsmoleküle sollte der Einfluss von PLD1 auf die GPIb – abhängigen Prozesse untersucht werden. Daher wurden die Thrombozyten mit Botrocetin bzw. mit Botrocetin und vWF aktiviert [31, 65] und nach Koinkubation die Expression genannter endothelialer Adhäsionsmoleküle gemessen. Diese Stimulation hatte keinen signifikanten Effekt auf die Hochregulation der Adhäsionsmoleküle, im Vergleich zur Koinkubation mit ruhenden Thrombozyten (Abb. 38 A – D).

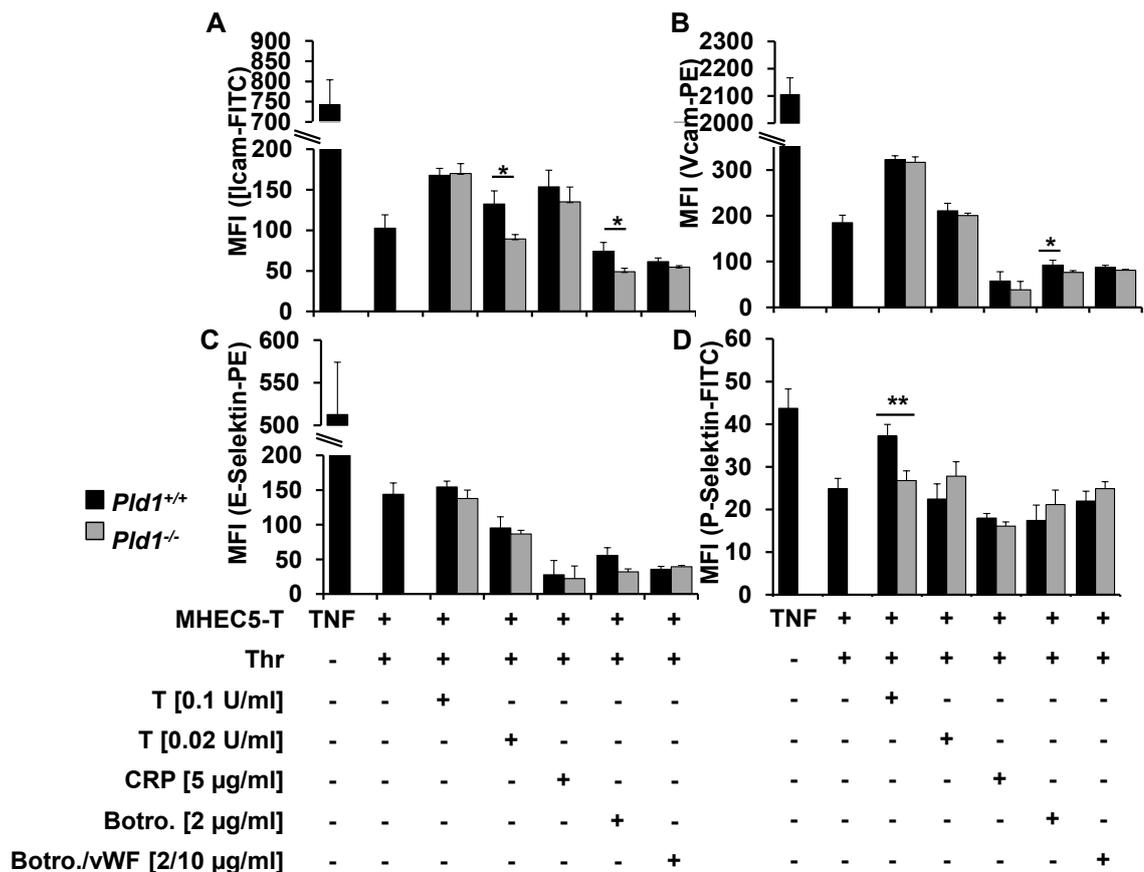


Abbildung 38: Einfluss aktivierter Thrombozyten auf die Regulation endothelialer Adhäsionsmoleküle. Es wurde die Thrombozyten – stimulierte Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM – 1 (A), VCAM – 1 (B), E – Selektin (C) und P – Selektin (D) durchflusszytometrisch bestimmt. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 3 – 15; * p<0.05, ** P < 0.01.

Um den Einfluss aktivierter Thrombozyten auf die endotheliale inflammatorische Antwort zu untersuchen, wurde IL - 6 [24] im Überstand von Endothelzellen, die mit aktivierten Thrombozyten inkubiert wurden über einen Sandwich – ELISA – Assay detektiert. Die Sekretion von endotheliale IL – 6 wird durch die thrombozytäre Sekretion von IL-1 β [23] und die Bindung von CD40 [62] an die Endothelzellen induziert. Auch bei der Sekretion von IL – 6 zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt nach Stimulation der Thrombozyten mit Thrombin. Die endotheliale IL - 6 Sekretion war signifikant erniedrigt nach der Stimulation von *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten, die mit einer Konzentration von 0.02 U / ml Thrombin aktiviert wurden. Eine Stimulation mit CRP – aktivierten Thrombozyten führte zu keiner Erhöhung der endothelialen IL – 6 Sekretion (Abb. 39).

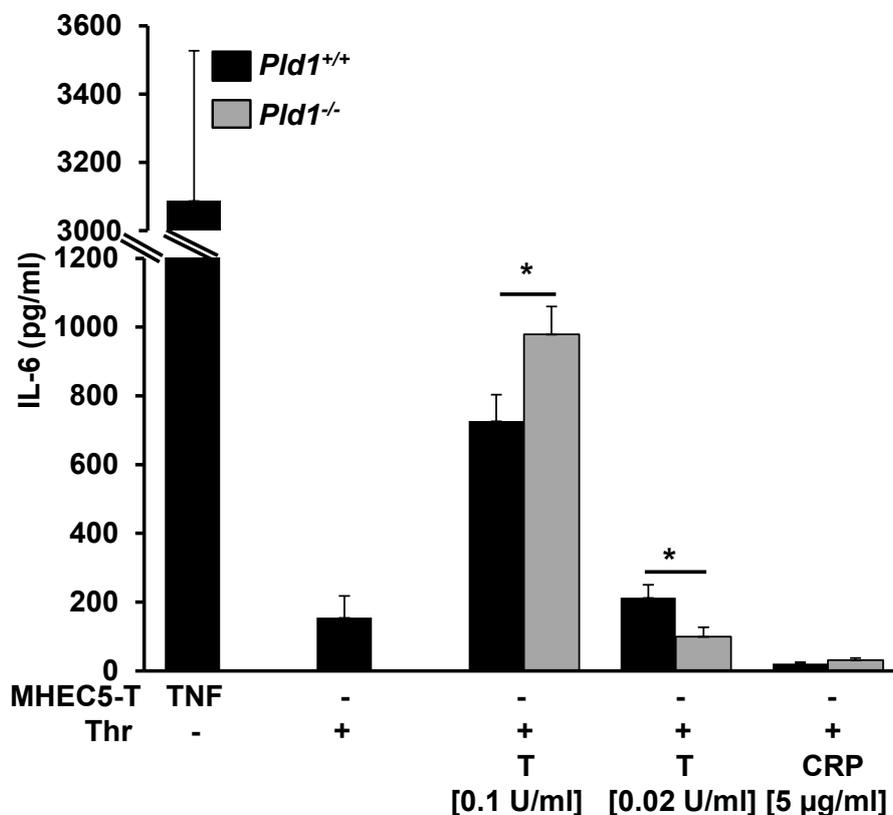


Abbildung 39: Bestimmung der IL- 6 Konzentration im Überstand von Endothelzellen nach Inkubation mit stimulierten Thrombozyten. Nach Ko – Inkubation von MHEC5 - T – Zellen und aktivierten Thrombozyten wurde die endotheliale Sekretion von IL – 6 über einen Sandwich – ELISA bestimmt. Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM; n = 3 – 15; * p<0.05.

4.2.4 Reduzierte Phosphorylierung von SRC und PLC γ 2 nach Botrocetin / vWF Stimulation bei *Pld1*^{-/-} -Thrombozyten

Um die PLD1 – vermittelten Effekte bei der GPIb – abhängigen Integrinaktivierung näher zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung von bekannten Zielproteinen innerhalb der GPIb – Signalkaskade analysiert.

Nach Stimulation von GPIb werden u. a. die Src – Kinase (Lyn) und PLC γ 2 phosphoryliert, die somit eine essentielle Rolle im vWF – GPIb – Signalweg und der Regulation der $\alpha_{IIb}\beta_3$ – Integrinaktivierung spielen [66]. Als Kontrolle wurde

der Kollagenrezeptor GPVI durch Inkubation der Thrombozyten mit CRP stimuliert.

Für die Stimulierung des GPIb – Signalweges wurden Thrombozyten mit einer vWF – Matrix inkubiert und mit Botrocetin stimuliert. Nach Stimulation des GPIb – Rezeptors durch Botrocetin / vWF konnte eine im Vergleich zum ruhenden Thrombozyten signifikante Phosphorylierung von Src (nach 30 Sek) und PLC γ 2 (nach 120 Sek) durch Western – Blot Analysen nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung von Src und PLC γ 2 war jedoch nach GPIb – Stimulation PLD1 – defizienter Thrombozyten reduziert (Abb. 40 A + B, oben). Des Weiteren konnte eine verzögerte Phosphorylierung von Src in *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten nach Stimulation mit CRP detektiert werden, denn eine maximale Phosphorylierung in *Pld1*^{+/+} - Thrombozyten zeigte sich bereits nach 30 Sek, in *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten jedoch erst nach 120 Sek (Abb. 40 A, unten). In PLD1 – defizienten Thrombozyten zeigte sich zudem eine reduzierte Phosphorylierung von PLC γ 2 nach Stimulation mit CRP im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 40 A + B, oben).

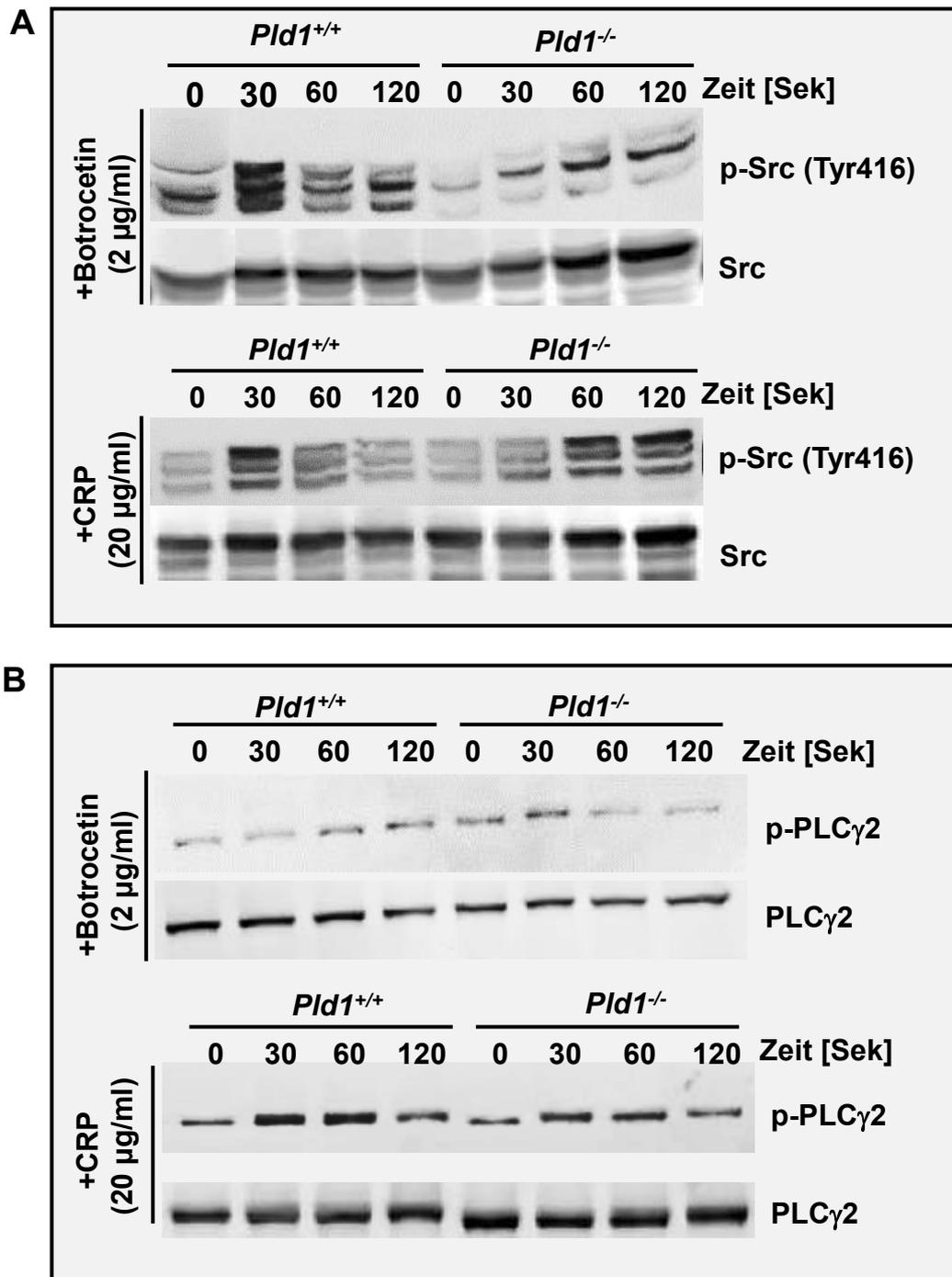


Abbildung 40: Western – Blot Analysen zur Bestimmung der Phosphorylierung von Src und PLCγ2 nach Stimulation mit GPIb und GPVI in Thrombozyten. Nach Stimulation von Thrombozyten mit CRP und Botrocetin wurde die Phosphorylierung von Src (**A**) und PLCγ2 (**B**) im Western – Blot nach unterschiedlichen Inkubationszeiten detektiert. n = 3

Da Src eine wichtige Rolle im GPIb – Signalweg spielt und die Phosphorylierung in PLD1 – defizienten Thrombozyten reduziert ist, sollten nachfolgende Untersuchungen zeigen, ob PLD1 über Src die GPIb – vermittelte Integrinaktivierung moduliert. Um eine mögliche Interaktion von PLD1 und Src im GPIb – Signalweg zu analysieren, wurden Immunpräzipitationsstudien mit Src und PLD1 durchgeführt und im Western – Blot nachgewiesen.

Wie Abb. 41 zeigt, konnte Src in Thrombozyten - Immunpräzipitaten nach Einsatz eines PLD1 - Antikörpers im Western – Blot nachgewiesen werden (Abb. 41 A). Dies lässt auf eine funktionelle Interaktion zwischen PLD1 und Src in der GPIb – abhängigen $\alpha_{IIb}\beta_3$ - Integrinaktivierung von Thrombozyten schließen.

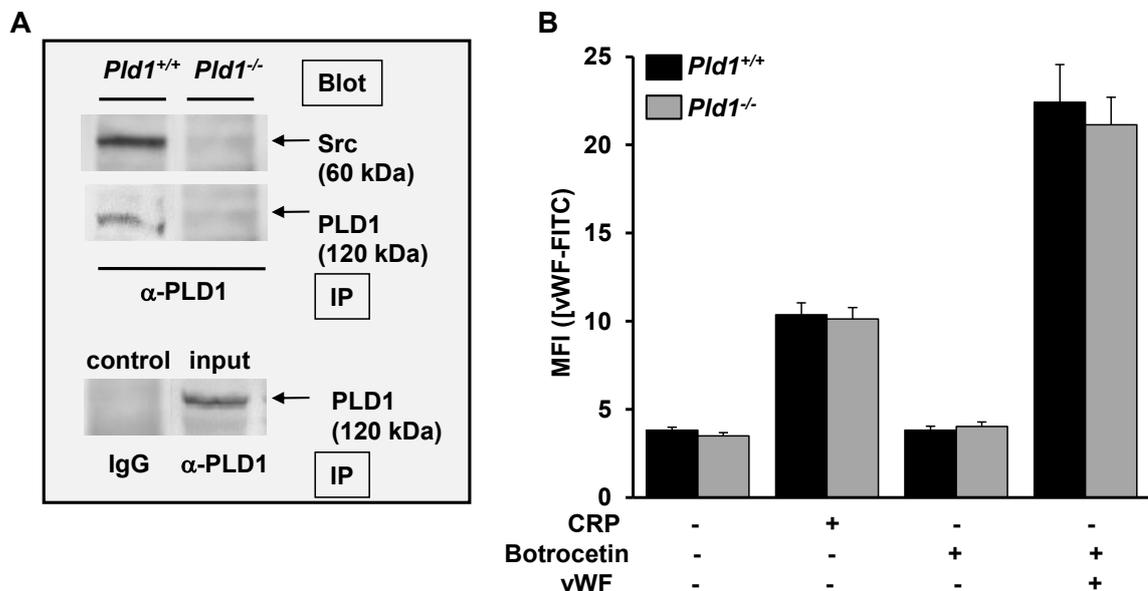


Abbildung 41: Immunpräzipitation mit PLD1 – Antikörper und Nachweis der Bindung von PLD1 und Src. In PLD1 – Immunpräzipitaten wurde über Western – Blot – Analyse Src detektiert (**A**). Nach Stimulation von GPVI und GPIb in Thrombozyten wurde mithilfe der Durchflusszytometrie die Bindung von vWF an aktivierte Thrombozyten gemessen (**B**). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM, n = 3 bzw. n = 8

Daher wurde anschließend differenziert, ob PLD1 nur den intrazellulären GPIb - Signalweg beeinflusst oder auch die Bindung von vWF an seinen Rezeptor GPIb. Hierzu wurde die vWF – Bindung an Thrombozyten nach Stimulation der

thrombozytären Rezeptoren GPIb und GPVI durchflusszytometrisch bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass durch das Fehlen von PLD1 die Bindung von vWF an GPIb nicht beeinträchtigt wird (Abb. 41 B).

4.2.5 Reduzierte Adhäsion von Thrombozyten an entzündlichem Endothel *in vivo*

Um die Bedeutung von PLD1 für die Thrombozyten – vermittelte Inflammation *in vivo* zu untersuchen, wurde eine Ligatur der *arteria carotis* (Halsschlagader) und der *vena cava inferior* (IVC) durchgeführt. Für die Visualisierung und Quantifizierung adhärenter Thrombozyten, wurden Thrombozyten von Spendertieren isoliert und mit Rhodamin Fluoreszenz - markiert, dem Empfängertier appliziert und die Adhäsion über *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Es wurde eine reduzierte Adhäsion PLD1 – defizienter Thrombozyten am Endothel zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Ligatur detektiert (Abb. 42). Dies zeigt, dass PLD1 die Thrombozytenadhäsion am entzündlich - stimulierten Endothel beeinflusst.

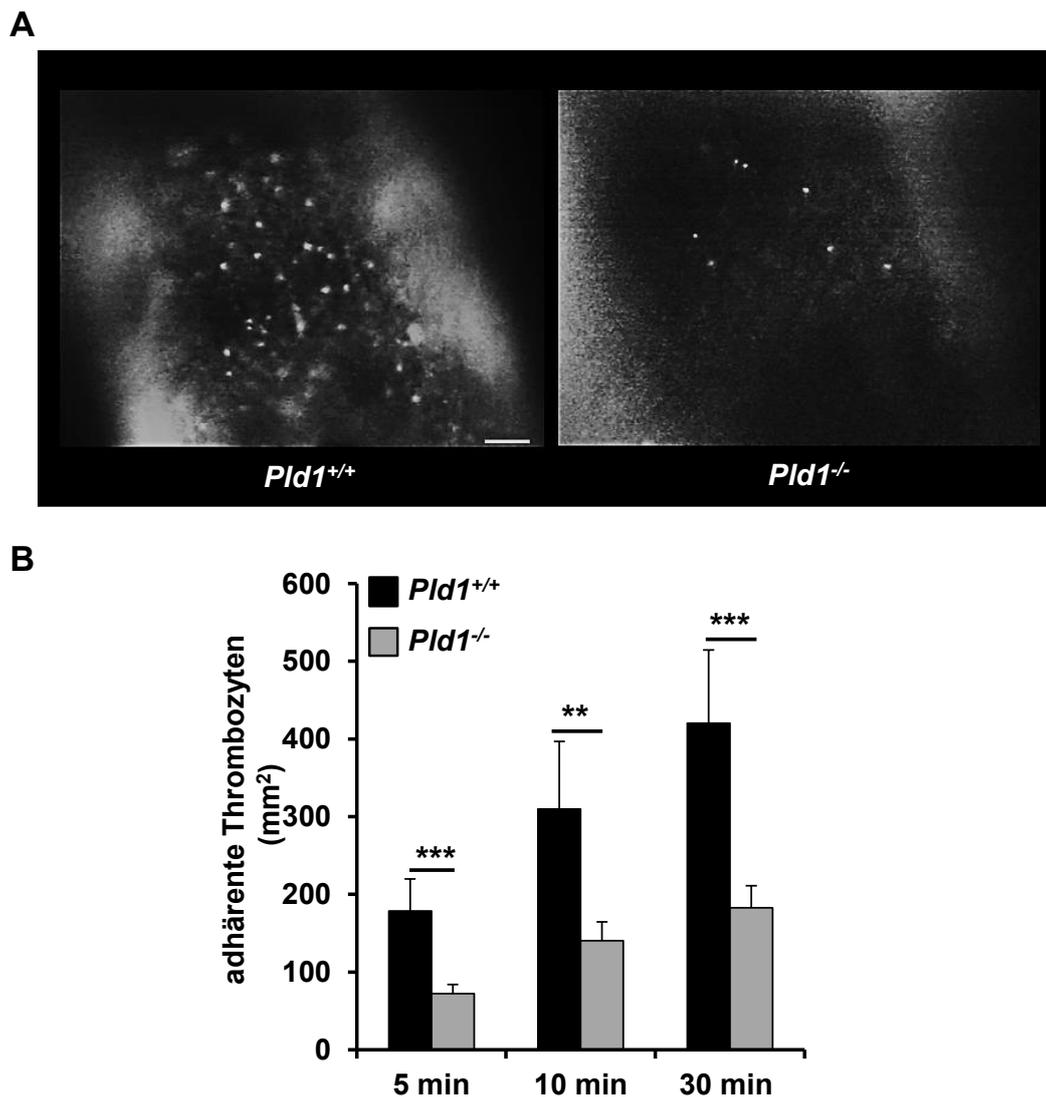


Abbildung 42: Adhäsion von Thrombozyten nach Ligatur der *Carotis communis*. Reduzierte Adhäsion von PLD1 – defizienten Thrombozyten nach Ligatur der Carotis. Repräsentative Bilder (**A**) und statistische Auswertung der Adhäsion (**B**). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM, $n = 5$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Zusätzlich wurde in einem weiteren inflammatorischen *in vivo* Modell die Ligatur der *Vena Cava* durchgeführt. Durch die permanente Ligatur kam es zu einer Einschränkung, jedoch nicht zu einem vollständigen Erliegen des Blutflusses, sodass die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten induziert wurde, nicht aber eine Okklusion des Gefäßes. Auch hier kam es zu einer reduzierten Adhäsion von PLD1 – defizienten Thrombozyten nach 120, 240 und 300 Min (Abb. 43).

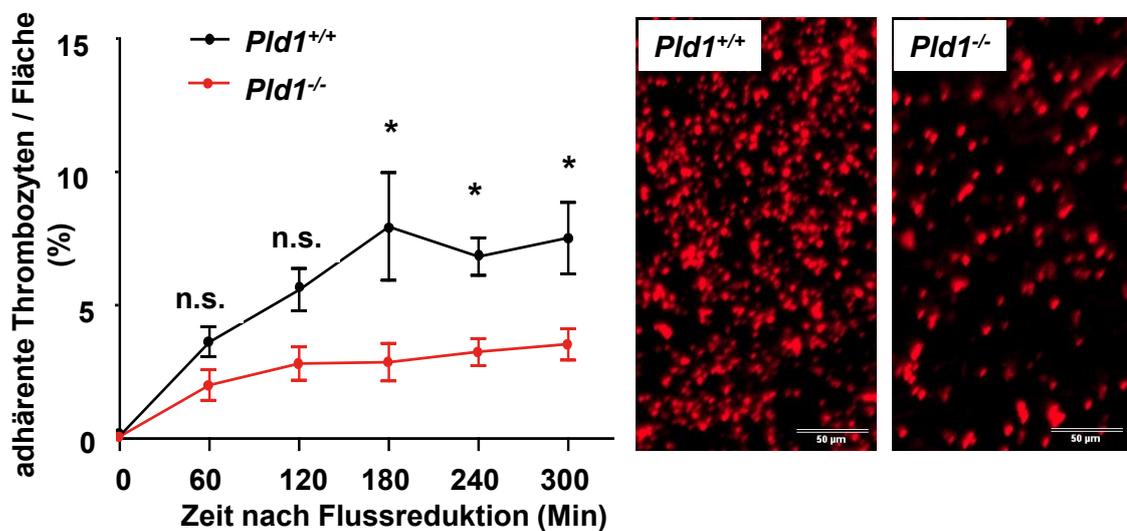


Abbildung 43: Adhärenz von Thrombozyten nach Ligatur der Vena Cava. Reduzierte Adhäsion von PLD1 – defizienten Thrombozyten am entzündlich stimuliertem Endothel nach Ligatur der Vena Cava. Statistische Auswertung der Adhäsion (A) mit dem ANOVA –Test und repräsentative Bilder (B). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM, $n = 8$, $*p < 0.05$

4.2.6 Reduzierte Adhäsion von PLD1 – defizienten Leukozyten unter entzündlichen Bedingungen

Um den Einfluss aktivierter Thrombozyten auf die Rekrutierung und Adhäsion von Leukozyten zu untersuchen, wurden zunächst *in vitro* isolierte Leukozyten über Kollagen – adhärenz und aktivierte Thrombozyten in der dynamischen Flusskammer unter hohen Scherraten (1700 sek^{-1}) perfundiert. Die transiente und stabile Adhäsion von Leukozyten an aktivierte Thrombozyten war signifikant reduziert, wenn PLD1 – defizienten Zellen verwendet wurden (Abb. 44 A + B).

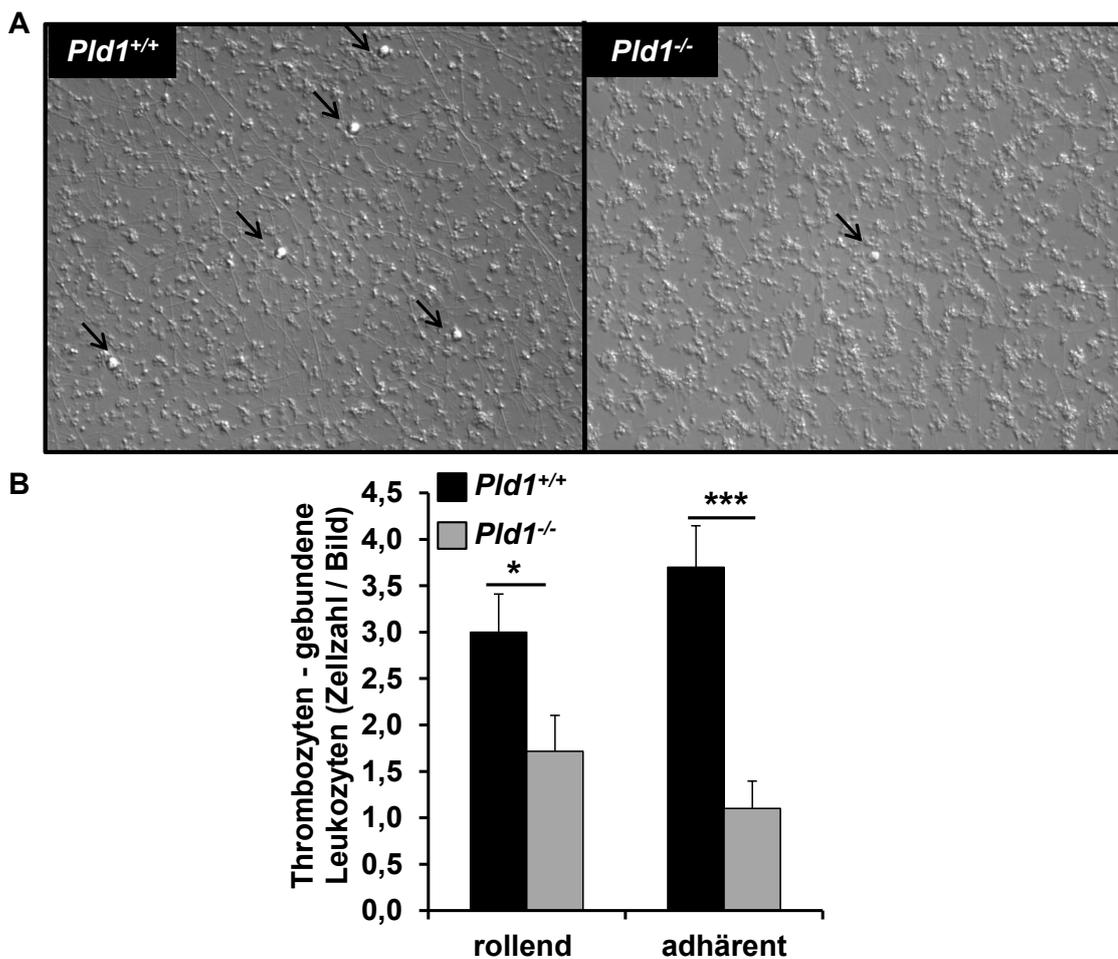


Abbildung 44: Reduzierte Adhäsion von PLD1 – defizienten Leukozyten auf Kollagen – aktivierten Thrombozyten. In der dynamischen Flusskammer zeigte sich unter hoher Scherrate (170 sek^{-1}) eine signifikant reduzierte Adhäsion von PLD1 – defizienten Leukozyten. Repräsentative Bilder (**A**) und statistische Auswertung (**B**). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM, $n = 5$, * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$

Auch diese *in vitro* Daten sollten mit entsprechenden *in vivo* Daten über die beiden Ligatur - Modelle verifiziert werden. Durch die Injektion von Acridine - Orange wurden die Leukozyten der Mäuse farblich markiert und konnten nach erfolgter Ligatur und der darauf folgenden Adhäsion am verletzten Endothel dokumentiert und quantifiziert werden (Abb. 45, Abb. 46).

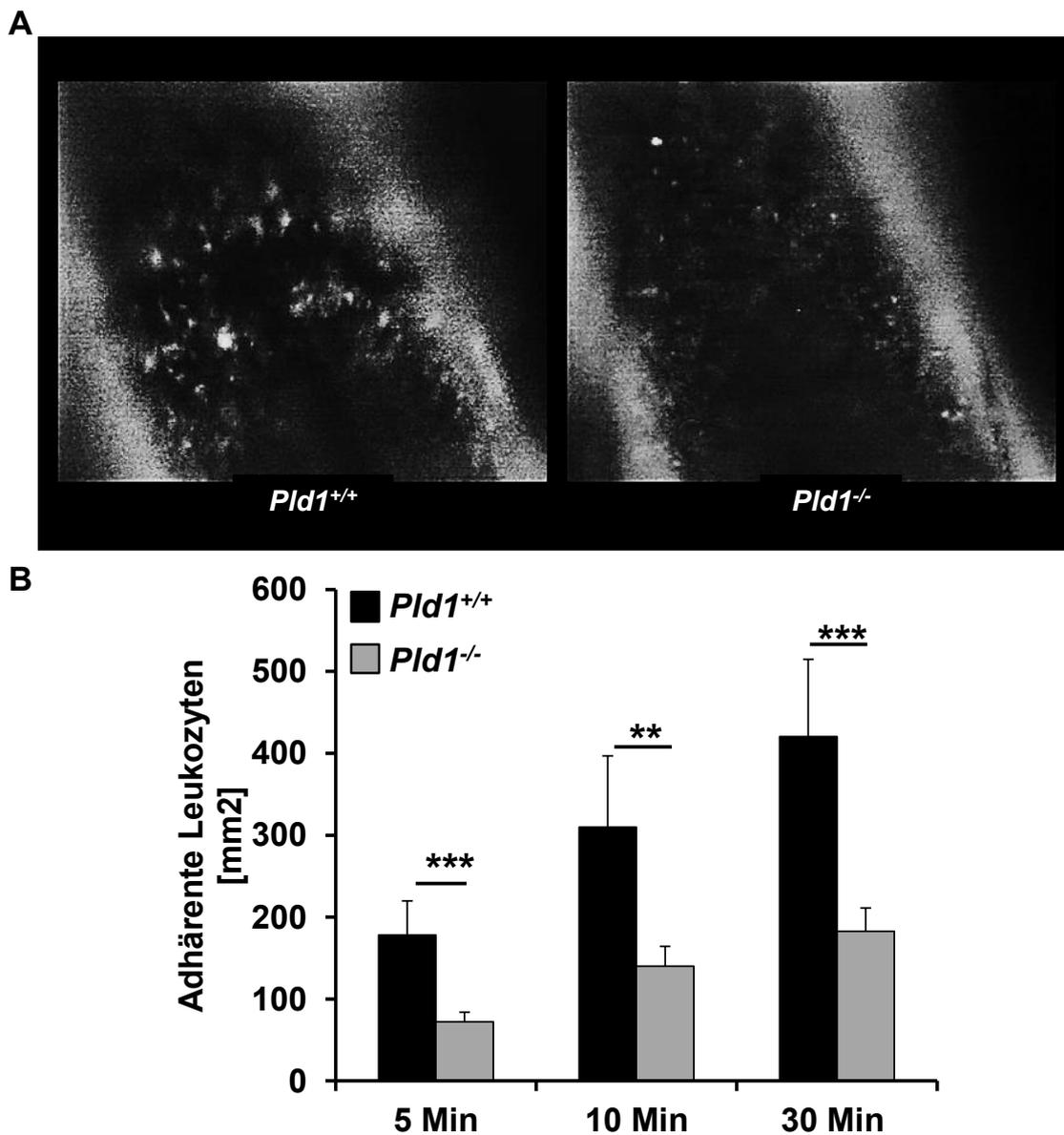


Abbildung 45: Adhäsion von Leukozyten nach Ligatur der Carotis. Reduzierte Adhäsion von PLD1 – defizienten Leukozyten nach Ligatur der Carotis. Repräsentative Bilder (A) und statistische Auswertung der Adhäsion (B). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM, $n = 5$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

In beiden Modellen zeigte sich eine reduzierte Adhäsion von Leukozyten in PLD1 - defizienten Tieren (Abb. 45 A + B; Abb. 46 A + B).

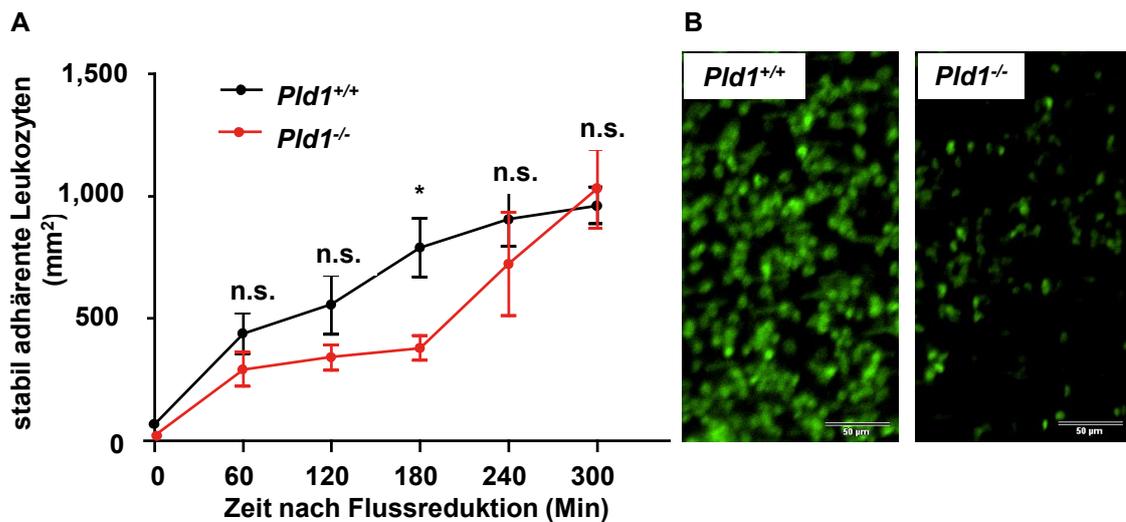


Abbildung 46: Adhäsion von Leukozyten nach Ligatur der Vena Cava. Reduzierte Adhäsion von PLD1 – defizienten Leukozyten am entzündlichen Endothel nach Ligatur der Vena Cava. Statistische Auswertung der Adhäsion (**A**) mit dem ANOVA –Test und repräsentative Bilder (**B**). Fehlerindikatoren zeigen den \pm SEM, $n = 8$, $*p < 0.05$

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass PLD1 eine signifikante Rolle bei der Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten am verletzten Endothel *in vivo* spielt.

5. Diskussion

2015 war die häufigste Todesursache in Deutschland die chronisch, ischämische Herzkrankheit, gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (Destatis). Daher ist die Erforschung dieser Krankheit und insbesondere der Prozesse, die zur Reparatur und zum *Remodelling* des geschädigten Gewebes führen von großer Bedeutung, um neue therapeutische Maßnahmen zur Behandlung zu entwickeln. Die durch Phospholipase degradierte Phosphatsäure ist ein wichtiger „*second messenger*“ in vielen zellulären Prozessen [28]. Studien haben nachgewiesen, dass insbesondere die Phospholipase D1 Einfluss auf inflammatorische Prozesse, wie z. B. den Myokardinfarkt hat [42]. Mit Hilfe von *in vitro* Versuchen und verschiedenen Mausmodellen konnte unter PLD1 - Defizienz ein Schutz vor arterieller Thrombose gezeigt werden [32]. Im Gegensatz dazu zeigten Studien mit *Pld1*^{-/-} - Mäusen, dass PLD1 protektiv nach akutem Myokardinfarkt ist, denn das konstitutive Fehlen von PLD1 führte zu einer Verschlechterung der Herzfunktion nach akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu Kontrolltieren [42]. Des Weiteren zeigen verschiedene Studien, dass neben Immunzellen auch Thrombozyten an der inflammatorischen Antwort nach einem ischämischen Myokardinfarkt beteiligt sind [49]. Daher war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von PLD1 auf die inflammatorische Antwort und die Narbenbildung nach ischämischen Myokardinfarkt näher zu untersuchen, einen möglichen therapeutischen Ansatz durch den PLD - Inhibitor FIPI zu charakterisieren, sowie den Einfluss der PLD1 auf die thrombozyten – vermittelte Inflammation zu analysieren.

5.1 PLD1 der Blutzellen hat keine Bedeutung für die Herzfunktion nach akutem Myokardinfarkt

Konstitutiv PLD1 - defiziente Mäuse zeigten 24 h nach ischämischem Myokardinfarkt eine verminderte Einwanderung von Immunzellen in den Infarktbereich und einen verringerten TNF – α - Plasmaspiegel. Dies führte nach 28 Tagen zu einer vergrößerten Infarktnarbe und verschlechterter Herzfunktion. Aufgrund dieser Daten wurde postuliert, dass PLD1 wichtig für die TNF – α vermittelte inflammatorische Antwort und die Narbenbildung nach Myokardinfarkt ist [42]. In seiner regulatorischen Funktion der Immunzellen ist TNF – α eines der wichtigsten akute – Phase - Zytokine in Entzündungsreaktionen und wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen (aktivierte Monozyten) synthetisiert [67]. Monozyten entstehen wie die thrombozytären Vorläuferzellen Megakaryozyten im Knochenmark. Um zu untersuchen, ob die verminderte Herzfunktion und erhöhte Infarktgröße in konstitutiven PLD1 - defizienten Mäusen abhängig ist von der Funktion des Proteins PLD1 der Blutzellen, wurden PLD1 - knochenmarkschimäre Mäuse generiert und im ischämischen Myokardinfarkt anhand des „*chlose – chest*“ – Modells analysiert. Hierbei sollte die Analyse der Zelltypen innerhalb dieses inflammatorischen Prozesses im Focus stehen, um zu klären, welcher Zelltyp maßgeblich an der PLD1 – vermittelten Protektion nach AMI beteiligt ist.

5.1.1 PLD1 – Defizienz der Blutzellen führt nicht zu einer verminderten Herzfunktion und vergrößertem Infarktgebiet 21 Tage post AMI

Die Auswertung der echokardiographischen Daten nach myokardialer Ischämie ergab, dass die zu erwartenden Veränderungen, wie ein Anstieg des endsystolischen Volumens oder ein Abfall der Ejektionsfraktion, des Schlagvolumens und der Verkürzungsfraktion nach Ischämie / Reperfusion [1] in beiden knochenmarkschimären Gruppen nachzuweisen waren. Der Vergleich der *Pld1*^{-/-} -

Knochenmarkschimären mit den Kontrolltieren erbrachte keinen Unterschied in den unterschiedlichen Herzvolumina (endyastolisches & endsystolisches Volumen, Schlagvolumen, Herzauswurfvolumen), der Ejektionfraktion und der Verkürzungsfraktion. Auch hatte der Myokardinfarkt keinen Einfluss auf mögliche Unterschiede in den Herzwanddicken (IVS d, IVS s, LVPW d, LVPW s). Die Analyse der Infarktgebiete bestätigte die echokardiographische Auswertung, da in beiden Gruppen ein Infarkt 24 h und 21 d post AMI histologisch nachzuweisen war. Auch hier erbrachte der Vergleich keinen Unterschied in den Infarktgrößen von *Pld1*^{-/-} - Knochenmarkschimären zu den Kontrolltieren, worauf die echokardiographischen Daten bereits hindeuteten.

Dies gab erste Hinweise darauf, dass der Phänotyp der PLD1 konstitutiv defizienten Tiere nach myokardialer Ischämie nicht oder nur bedingt von der Funktion der PLD1 in Blutzellen abhängig ist.

5.1.2 Die myokardiale Ischämie hat keine Auswirkung auf die Aktivierung der Thrombozyten von PLD1 – knochenmarkschimären Tieren

Xu *et al.* zeigten 2006, dass durch die Reperfusion des ischämischen Myokards die Thrombozyten aktiviert werden [68, 69] und den Schaden im Myokard nach Ischämie / Reperfusion vergrößern. In der gleichen Studie wurde zudem nachgewiesen, dass die Defizienz von P - Selektin im Modell der Ischämie / Reperfusion kardioprotektiv wirkt [49]. In diesem Zusammenhang wurde auch in der vorliegenden Arbeit die P – Selektin – Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten analysiert. Eine durch die Ischämie / Reperfusion ausgelöste Hochregulation der P – Selektin - Expression konnte im Vergleich der Thrombozyten vor und nach Ischämie / Reperfusion nicht festgestellt werden. Um einen generellen Aktivierungsdefekt nach Ischämie / Reperfusion auszuschließen, wurden die Thrombozyten *ex vivo* mit klassischen Agonisten wie Thrombin, CRP und ADP / U46 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ischämie / Reperfusion stimuliert. Hierbei wurde zu allen Zeitpunkten (4 h, 24 h, 3 d, 21 d) post AMI eine Hochregulation der P – Selektin - Expression festgestellt. Unterschie-

de zwischen den Genotypen der Knochenmarkschimären zeigten sich nur 21 Tage nach Ischämie / Reperfusion nach der Stimulation mit CRP. Hier zeigte sich die Hochregulation der P – Selektin – Expression konzentrationsabhängig signifikant reduziert in *Pld1^{-/-}* – Thrombozyten im Vergleich zu den Thrombozyten der Kontrollgruppe. Aufgrund der signifikant reduzierten Reaktion auf die Stimulation mit CRP wäre eine weitere Analyse des nur auf Thrombozyten exprimierten GP (Glycoprotein) VI - Rezeptors (Kollagen – Rezeptor) nach Ischämie / Reperfusion von Interesse, konnte aber aus zeitlichen Gründen in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden. Kollagen ist Teil der subendothelialen Matrix, welcher bei Verletzung der Gefäßwand freigesetzt wird und an welches der GPVI – Rezeptor der Thrombozyten zur Initiierung der Thrombozytenadhäsion binden kann [16]. Sowohl eine Humanstudie [70] als auch eine Studie an Mäusen zeigte GPVI als anti – thrombotischen Therapiepunkt im Myokardinfarkt, beispielsweise über die Applikation eines löslichen GPVI – Rezeptors, welches das Kollagen anstelle des naiven Rezeptors blockiert [71]. Zudem wurde gezeigt, dass die Inhibierung von GPVI zu einer signifikant reduzierten Infarktgröße nach Ischämie / Reperfusion führt [72].

Auffällig war jedoch, dass die P – Selektin – Expression nach hohen CRP - und Thrombinkonzentrationen 4 h post AMI deutlich erhöht war im Vergleich zu den Werten 24 h post AMI. Auch die Interginaktivierung zeigte sich nach Stimulation mit hoher CRP – Konzentration deutlich erhöht nach 4 h im Vergleich zu den Werten 24 h post AMI. Dies zeigt eine erhöhte Aktivierbarkeit der Thrombozyten post AMI, ohne dass der Myokardinfarkt selbst zu einer Prä – Aktivierung der Thrombozyten führte. Zusätzliche Ereignisse, wie beispielsweise eine Verletzung an der Gefäßwand, könnten zu weiteren thrombotischen Folgeerkrankungen führen und den Krankheitsverlauf des Myokardinfarktes weiter komplizieren und negativ beeinflussen.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass neben Mono – und Lymphozyten auch Thrombozyten nach Ischämie / Reperfusion ins Gewebe einwandern [44-48]. Voraussetzung für eine Migration der Zellen ist zunächst eine stabile Adhäsion der Thrombozyten am Endothel. In ihrem Fall dient hierzu das $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ - Integrin [17-19], dessen Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten der

Knochenmarkschimären ebenfalls nach Ischämie / Reperfusion gemessen wurde. Es wurde weder eine Aktivierung der Thrombozyten durch die Reperfusion, noch Unterschiede in der Integrin – Expression nach Aktivierung durch die klassischen Agonisten im Vergleich der Genotypen der Knochenmarkschimären festgestellt. Daher wurde auf eine weitere Analyse, z. B. der histologische Nachweis von Thrombozyten im Infarktgebiet verzichtet.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die thrombozytäre PLD1 keinen Einfluss auf den Myokardinfarkt nach Ischämie / Reperfusion hat.

5.1.3 Einfluss der PLD1 in Blutzellen auf die TNF – α – vermittelte inflammatorische Antwort nach Ischämie / Reperfusion im Myokard

Während bzw. kurz nach AMI finden inflammatorische Prozesse statt, die den Schaden am Myokard z. B. durch eine Ischämie / Reperfusion reduzieren sollen. Daher wurde auch hier die inflammatorische Antwort nach Ischämie / Reperfusion in PLD1 – Knochenmarkschimären analysiert. Die Beteiligung der Phospholipasen innerhalb dieser Prozesse ist hierzu nicht hinreichend bekannt. Ältere Studien zeigen jedoch, dass die Stimulation von PLD zu einer Verbesserung der kardialen Funktion nach Ischämie / Reperfusion führt [73]. 24 h nach myokardialer Ischämie / Reperfusion konnte bereits in unserer AG gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Erhöhung der Expression von PLD1 im linken Ventrikel wildtypischer Mäuse kommt. Die gleiche Studie zeigte ebenfalls, dass PLD1 - defiziente Mäuse ein erhöhtes Infarktgebiet aufweisen. Die zugrundeliegenden Mechanismen waren jedoch nicht bekannt. Erste Daten dieser Studie zeigten, dass PLD1 entscheidend für die TNF – α – vermittelte Inflammation und die TGF – β – vermittelte Narbenbildung im linken Ventrikel nach Ischämie / Reperfusion ist [42]. Wie bereits erwähnt, sind Monozyten, welche im Knochenmark entstehen und Makrophagen die Hauptproduzenten des Zytokins TNF – α [67], weshalb in dieser Arbeit PLD1 – Knochenmarkschimäre Tiere analysiert wurden. Mithilfe dieser Tiere sollte die Fragestellung geklärt werden,

ob eine reduzierte inflammatorische Antwort für die erhöhte Infarktgröße in *Pld1^{-/-}* - Mäusen post AMI verantwortlich ist.

Die Analyse der inflammatorischen Antwort post AMI in PLD1 – Knochenmarkschimären ergab Folgendes: a) die Infarktgröße war im Vergleich der Genotypen vergleichbar; b) in den *Pld1^{-/-}* - Chimären wurde eine verminderte Einwanderung von Zellen ins Infarktgebiet festgestellt; c) die Immunzellen / Thrombozyten – Aggregatbildung 4 h post AMI war nicht unterschiedlich im Vergleich der Genotypen; d) der TGF – β – Plasmaspiegel war nach 3 und 21 d post AMI in den *Pld1^{-/-}* - Chimären reduziert; e) die Proliferation der Fibroblasten in Myofibroblasten unterschied sich 21 d post AMI in den Genotypen nicht; f) die Qualität der Narbe war in den Chimärengruppen vergleichbar.

Der Einfluss des Zytokins TNF – α auf den Phänotyp des Myokardinfarkts ist in verschiedenen Studien kontrovers beschrieben: Bereits 1996 zeigten Krown *et al.*, dass TNF – α Apoptose in kardialen Myozyten induziert [74]. 2002 zeigten Maekawa *et al.* an einer *TNF – α ^{-/-}* - Mauslinie in einem Modell für den Myokardinfarkt, dass das Fehlen von TNF – α zu einer signifikanten Reduzierung der Neutrophileneinwanderung und zu einer verringerten Infarktgröße führte [75]. Schöneberger *et al.* zeigten, dass die Infarktgröße unter PLD1 – Defizienz vermutlich durch ein reduziertes TNF – α – Plasmalevel erhöht war [42]. Die Analyse der Infarktgrößen der PLD1 – Knochenmarkschimären ergab keinen Unterschied im Vergleich der Genotypen nach akuter (24 h post AMI) und chronischer Phase (21 d post AMI), was auf kompensatorische, PLD1 der Blutzellen – unabhängige inflammatorische und narbenbildende Mechanismen im Gewebe hinweisen könnte. Es ist bekannt, dass TNF – α die Expression proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle von Leukozyten und Endothelzellen fördert und den Extrazellulärmatrix - Metabolismus durch eine reduzierte Kollagensynthese und durch die Hochregulation der Aktivität von Metalloproteasen in kardialen Fibroblasten reguliert. Ein reduzierter TNF – α – Spiegel führt somit zu einer vermehrten Narbenbildung und einer verschlechterten Herzfunktion post AMI [76].

Die Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe ist wichtiger Bestandteil der inflammatorischen Antwort, auch nach myokardialer Ischämie. So wurde bereits in einem Hundemodell für den Myokardinfarkt gezeigt, dass nach Depletion der Neutrophilen der Infarkt vergrößert war [5]. Der Einwanderung von Neutrophilen folgt die Einwanderung von Monozyten [6], die nach ihrer Differenzierung zu Makrophagen die beiden Zytokine TNF – α und TGF – β sekretieren. Der Einfluss von PLD1 auf die Adhäsion und Migration von Zellen zeigten 2006 Schankar *et al.*. In ihrer Studie wurde nachgewiesen, dass die Inhibition von PLD1 zu einer reduzierten Adhäsion und Migration von Phagozyten führt [77]. Eine *in vitro* Studie an isolierten *Pld1*^{-/-} - Neutrophilen zeigte ebenfalls ein reduziertes Migrationspotential der Zellen [63]. Nach akutem Myokardinfarkt zeigten Schöneberger *et al.*, dass es durch PLD1 – Defizienz zu einer reduzierten Einwanderung von Makrophagen und Neutrophilen 24 h post AMI kommt [42]. Auch in den PLD1 - Knochenmarchimären führte PLD1 – Defizienz zu einer verminderten Einwanderung von Zellen in den Infarktbereich. Diese reduzierte Zelleinwanderung könnte auf einen Intergrindefekt der Neutrophilen zurückzuführen sein, welcher bei einer Studie zur PLD – vermittelten Aktivierung des Integrins Mac – 1 an humanen Neutrophilen nachgewiesen wurde [78]. Die Leukozytenrekrutierung nach einer Verletzung des Endothels ist u. a. abhängig von einer intakten Mac – 1 – GPIb - Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten [59]. Eine gestörte Interaktion zwischen Thrombozyten und Immunzellen konnte in der Blutperipherie in der Messung ihrer Aggregatbildung 4 h post AMI im Vergleich der Genotypen der Knochenmarkschimären nicht nachgewiesen werden. Somit könnte der Integrindefekt zwar keine Auswirkungen auf die Interaktion von Thrombozyten und Immunzellen, jedoch auf die Adhäsion und Einwanderung der Immunzellen ins Endothel haben.

Schöneberger *et al.* konnten in ihrer Studie nachweisen, dass PLD1 keine Auswirkung auf die Apoptose von Kardiomyocyten hat, da die Infarktgröße 24 h post AMI keinen Unterschied im Vergleich von *Pld1*^{+/+} - und *Pld1*^{-/-} - Mäusen zeigte. Die TNF – α – vermittelte inflammatorische Antwort war jedoch in PLD1 – defizienten Mäusen reduziert, was zu einer verminderten Aktivierung der Myofibroblasten, einer reduzierten Qualität des Kollagens in der Narbe und somit zu

einer verminderten Herzfunktion 28 d nach myokardialer Ischämie führte [42]. Da dieses Ergebnis Hinweise auf den Einfluss von PLD1 auf die Reparaturmechanismen während der Narbenbildung gibt, wurde auch in der vorliegenden Arbeit, trotz unveränderter Infarktgröße 28 d post AMI in den PLD1 – Knochenmarkschimären, die Narbenbildung und -qualität genauer analysiert. Hierbei zeigte sich, dass die Qualität des Kollagens der *Pld1*^{-/-} - Knochenmarkschimären vergleichbar zu dem der Kontrolltieren war und auch die Menge an interstitiellem Kollagen sich in beiden Gruppen 28 d post AMI nicht unterschied.

Schöneberger *et al.* zeigten einen reduzierten TGF – β – Plasmaspiegel und eine reduzierte Proliferation von Fibroblasten in Myofibroblasten, sowie eine erhöhte Ablagerung von interstitiellem Kollagen in PLD1 – defizienten Tieren 28 d post AMI [42]. Im Vergleich hierzu ergab die Analyse der PLD1 – Knochenmarkschimären einen verringerten TGF – β – Plasmaspiegel, jedoch keine Unterschiede in der Myofibroblastendifferenzierung, sowie in der Qualität des Kollagens der Narbe 21 d post AMI. Studien zeigen, dass TGF – β während eines Myokardinfarktes deutlich hochreguliert ist [79] und dass Makrophagen und Fibroblasten als Hauptproduzenten von TGF – β für diese Hochregulierung verantwortlich sind [79]. Außerdem stimuliert TGF – β die Proliferation von Fibroblasten in Myofibroblasten, die die Hauptproduzenten des Kollagens sind [79]. In zwei unterschiedlichen Studien zum Einfluss von TGF – β auf die Narbenbildung nach Myokardinfarkt wurde festgestellt, dass ein verminderter TGF – β – Plasmaspiegel nach der inflammatorischen Phase zu einer verringerten Kollageneinlagerung im Infarkt führte [79]. Diesen Daten zeigen sich kontrovers zu Analyse der Schöneberger – Studie, in welcher ein verringertes TGF – β Level zu einer verminderten Differenzierung der Fibroblasten und zu vermehrtem interstitiellem Kollagen unter PLD1 – Defizienz führte. Die Analyse der Knochenmarkschimären zeigte, dass PLD1 – Defizienz nur in Blutzellen zu einem verminderten TGF – β - Plasmaspiegel führte, die Myofibroblastenproliferation und die Kollagenqualität jedoch nicht verändert war. Daher gehen wir derzeit davon aus, dass die veränderte Narbenbildung in konstitutiven PLD1 - defizienten Mäusen durch einen Einfluss der PLD1 auf die Kollagensynthese bzw. auf die Funktion der Fibroblasten zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der PLD1 – Knochenmarkschimären vermuten, dass die erhöhte Infarktgröße der konstitutiven *Pld1*^{-/-} - Mäuse 21 d nach myokardialer Ischämie durch eine fehlerhafte Narbenbildung entstanden oder das Ergebnis einer reduzierten inflammatorischen Antwort und einer veränderten Narbenbildung ist.

5.1.4. Ausblick

Ausgehend von dieser Hypothese sollten weiterführende Analysen in einer kollagenspezifischen PLD1 – defizienten Maus nach myokardialer Ischämie durchgeführt werden, um den Einfluss der PLD1 auf die Fibroblasten und somit auf die Kollagensynthese genauer zu analysieren. Diese Mauslinie könnte beispielsweise durch die Verpaarung des Mausstammes „Tg(Col1a2-cre/ERT,-ALPP)7Cpd/J“ kurz „Col1a2-CreER“ von *The Jackson Laboratory* und des Mausstammes „C57BL/6J;129SvJ-TgH(Pld1flox/flox), kurz „PLD1flox“, generiert werden. Bei der Col1a2-CreER – Maus handelt es sich um eine transgene Mauslinie, in welcher durch die Applikation von Tamoxifen eine Cre – Rekombinase aktiviert wird. Diese Cre – Rekombinase kann an die flox - Kasette eines Zielgens, wie es beispielsweise in der transgenen PLD1flox – Mauslinie zu finden ist, binden und das Protein zelltypspezifisch, in diesem Fall Fibroblasten – spezifisch deletieren. Dies hätte, bei aktivierter Cre – Rekombinase, einen Mausstamm mit PLD1 – defizienten Fibroblasten zu Folge. So könnte die Kollagensynthese nach myokardialer Ischämie unter PLD1 – Defizienz genauer charakterisiert werden.

5.2 Pharmakologische Inhibition der PA – Generierung hat keinen Einfluss auf die Herzfunktion und Narbenbildung post AMI

Die durch Phospholipasen (PLD) generierte Phosphat Säure (PA) ist in vielen zellulären Prozessen ein wichtiger „*second messenger*“ [28]. In Wirbeltieren konnten die zwei ubiquitär exprimierten Isoformen PLD1 und PLD2 nachgewiesen werden [80, 81]. Beide Isoformen sind auch in Thrombozyten vorhanden, die nach ihrer Aktivierung z. B. durch Kollagen oder Thrombin eine gesteigerte PLD – Aktivität aufzeigten [82, 83]. Die Generierung von PA kann durch den PLD – Inhibitor FIPI pharmakologisch gehemmt werden [33]. In verschiedenen Zellstudien wurde die Wirksamkeit und Spezifität von FIPI auf die Hemmung der PA – Generierung bereits gezeigt [30, 33, 53, 63]. In einer Studie an Mäusen wurde dokumentiert, dass die Behandlung mit FIPI das Tumorwachstum und die Metastasierung effektiv verhindert, wie es bei PLD1 – Defizienz beobachtet wurde [84]. Analysen an einer *Pld1^{-/-} / Pld2^{-/-}* - Mauslinie zeigten, dass diese Mäuse vor arterieller Thrombose und ischämischen Schlaganfall geschützt sind, ohne Defekte in der Hämostase zu entwickeln [36]. Die therapeutische Wirkung von FIPI wurde ebenfalls in einem murinen Modell des ischämischen Schlaganfalls nachgewiesen. Hier führte die Anwendung von FIPI zu einer verringerten Infarktgröße, ohne die Hämostase der Tiere zu beeinflussen [35].

Dies führte zu der Frage, ob die enzymatische Aktivität der PLD, die Generierung von PA, auch für den Phänotyp in PLD1 – defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt verantwortlich sein könnte. Daher wurden C57BL/6J – Mäuse täglich mit dem PLD – Inhibitor FIPI nach einer, durch das „*open chest*“ Modell induzierten Ischämie / Reperfusion, behandelt, wobei die erste Applikation unmittelbar zu Beginn der Reperfusion stattfand. Der Kontrollgruppe wurde 4 % DMSO / PBS appliziert, da der lyophilisierte Inhibitor zunächst in DMSO gelöst und dann in PBS auf eine dosiswirksame Konzentration eingestellt wurde.

5.2.1 Die Hemmung der PA - Generierung führt nicht zu einer verminderten Herzfunktion und vergrößertem Infarktgebiet 21 Tage post AMI

Es wurde gezeigt, dass PLD1 – defiziente Mäuse oder Mäuse denen beiden Isoformen der PLD, PLD1 und PLD2, fehlen vor arterieller Thrombose oder einem ischämischen Schlaganfall geschützt sind [32]. Auch die pharmakologische Inhibierung der PLD – Aktivität mit FIPI führte zu einer reduzierten α – Granula – Ausschüttung und einer verminderten Integrinaktivität in FIPI - behandelten Thrombozyten. Dies führte zu einer reduzierten Thrombose und einer verringerten Infarktgröße im ischämischen Schlaganfall [35]. So konnte gezeigt werden, dass die PLD - Defizienz, sowie die pharmakologische Inhibierung der enzymatischen Aktivität von PLD im gleichen murinen Schlaganfallsmodell protektiv wirkt. Nach myokardialer Ischämie zeigten PLD1 – defiziente Mäuse jedoch ein vergrößertes Infarktgebiet [42]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die pharmakologische Inhibition der PA - Generierung nach myokardialer Ischämie keinen Einfluss auf die Infarktgröße 24 h und 21 d post AMI hat.

Die Auswertung der echokardiographischen Daten post AMI ergab, dass die zu erwartenden Veränderungen der Herzfunktionen, wie sie bereits unter Punkt 5.1.1 beschrieben wurden, sowohl in den FIPI – behandelten Tieren als auch in der Kontrollgruppe nachzuweisen waren. Das Ergebniss zur Infarktgröße wurde durch die echokardiographische Analyse der Tiere unterstützt, da auch hier gezeigt werden konnte, dass die PLD – Inhibition die Herzfunktion im Verlauf nach myokardialer Ischämie im Vergleich der FIPI – behandelten Tiere und den Kontrolltieren nicht beeinflusst. Die Auswertung der echokardiographischen Parameter zeigte, dass die Behandlung mit FIPI keinen Einfluss auf die erfassten Herzvolumina (endsystolisches und diastolisches Volumen, Schlagvolumen, Herzauswurfvolumen), die Ejektionfraktion, die Fraktionsverkürzung und die unterschiedlichen Herzwanddicken (LVAW d, LVAW s, LVPW d, LVPW s) hat.

Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass der vergrößerte Infarkt in PLD1 – defizienten Tieren nach ischämischem Myokardinfarkt unabhängig von der en-

zymatischen Aktivität der PLD ist und die pharmakologische Hemmung der PA – Generierung keinen Benefit auf die Infarktgröße hat.

5.2.2 Die Hemmung der PA -Generierung hat keine Auswirkung auf die Aktivierung der Thrombozyten post AMI

Ältere Studien zeigen, dass durch die Aktivierung von Thrombozyten die PLD – Isoformen PLD1 und PLD2 aktiviert werden. In *Pld1^{-/-} / Pld2^{-/-}* - Thrombozyten wurde gezeigt, dass eine Inhibierung beider Isoformen zu einem konzentrationsabhängigen Defekt in der P – Selektin - Expression, als Marker für α – Granula – Ausschüttung, und einer reduzierten Integrinaktivität nach Thrombin – Stimulation führt. In einer *Pld1^{-/-} / Pld2^{-/-}* – Mauslinie konnte zudem gezeigt werden, dass das Fehlen von PLD vor arterieller Thrombose schützt, ohne die Hämostase zu beeinträchtigen [36]. Der Schutz vor arterieller Thrombose wurde ebenfalls in einer PLD1 – defizienten Mauslinie gezeigt, in welcher dieser Schutz in einem Integrindefekt begründet lag [32].

Auch die pharmakologische Inhibierung der PLD – Aktivität durch FIPI führte zu vergleichbaren Ergebnissen in der Thrombozytenaktivität, wie eine reduzierte P- Selektin – Exposition und eine verringerte Integrinaktivität nach Thrombinstimulation, was auf eine spezifische PLD - Inhibitor von FIPI in Thrombozyten schließen lässt. Zudem zeigte die Studie von Stegner und Kollegen *in vivo*, dass die Behandlung von Mäusen mit FIPI zu einer reduzierten Thrombusbildung führt und FIPI somit antithrombotisch wirkt. So wurde postuliert, dass die pharmakologische Inhibierung der PA – Generierung ein vielversprechender Ansatz für eine neue antithrombotische Therapie ist [35].

Die Analyse der Thrombozyten FIPI – behandelte Mäuse nach myokardialer Ischämie konnte die zuvor beschriebenen Resultate nicht bestätigen. 24 h nach myokardialer Ischämie wurde zwar eine erhöhte P – Selektin – Expression nach der Stimulation mit CRP und ADP / U46 festgestellt; diese Hochregulation konnte trotz anhaltender Applikation von FIPI 21 d post AMI nicht mehr nachgewiesen werden. Eine Begründung hierzu könnte sein, dass es sich um ein metho-

disches Artefakt handelt, da während der Analyse die Charge beider Agonisten gewechselt wurde. Die Aktivierung der Thrombozyten mit weiteren klassischen Agonisten, wie Thrombin und PAR4 zeigte im Vergleich von FIPI und DMSO – behandelten Tieren keine Unterschiede 24 h und 21 d post AMI in der P – Selektin - Expression. In der Analyse der Integrinaktivität konnten zu keinem Zeitpunkt Alterierungen im Vergleich der Versuchsgruppen festgestellt werden. Dies zeigt, dass die pharmakologische Inhibition von PA die Thrombozytenaktivität innerhalb dieses Versuchsmodells der myokardialen Ischämie nicht beeinflusst.

5.2.3 Hemmung der PA – Generierung führt zu einer reduzierten Migration inflammatorischer Zellen post AMI

In PLD1 – defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass das Infarktgebiet nach myokardialer Ischämie vergrößert ist. Dieses Ergebnis resultierte aus einer verringerten inflammatorischen Antwort und aus einer defekten Narbenbildung. Die reduzierte inflammatorische Antwort in PLD1 – defizienten Tieren beruhte u. a. auf einem reduzierten TNF – α – Plasmaspiegel. *In vitro* Analysen an isolierten Monozyten zeigten ebenfalls, dass PLD1 die TNF – α – Expression und Ausschüttung moduliert [42]. Die pharmakologische Inhibition der PLD durch FIPI führte in der myokardialen Ischämie zu keiner Veränderung der Infarktgröße, sowie zu einer unveränderten Expression von TNF – α im linken Ventrikel 24 h post AMI. Diese Daten zeigen, dass die verminderte Einwanderung von inflammatorischen Zellen in FIPI - behandelten Tieren möglicherweise auf einen Integrindefekt der Zellen zurückzuführen ist, wie er bereits in der Literatur für andere Erkrankungsmodelle beschrieben wurde [78]. Zudem zeigen diese Daten, dass der reduzierte TNF – α – Plasmaspiegel PLD1 – defizienter Mäuse in diesem Inflammationsmodell PLD1 abhängig ist. Wie PLD1 die TNF – α - Expression während der Inflammation beeinflusst, wurde in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, da sich andere Mitarbeiter der AG mit diesem Thema beschäftigt haben.

Neben einer unveränderten Expression von TNF – α in FIPI – behandelten Tieren zeigten weitere Zytokinanalysen, dass die Expression von IL – 6 und die Ausschüttung von IL – 1 β durch die Applikation von FIPI im Vergleich zu den Kontrolltieren ebenfalls nicht verändert war. Die Rolle des TNF – α in der myokardialen Ischämie wurde bereits erläutert (s. Punkt 5.1.3). Eine Studie von Kobara *et al.* zeigte, dass die Antikörperapplikation gerichtet gegen den IL – 6 Rezeptor zu einer Verbesserung des linkventrikulären *Remodelling* durch eine reduzierte inflammatorische Antwort nach Myokardinfarkt führt [85]. Während eines inflammatorischen Prozesses ist TNF – α in der Lage, die Produktion von IL – 1 β zu induzieren [86]. Zudem wurde gezeigt, dass IL – 1 β in der frühen Phase nach Myokardinfarkt protektiv wirkt [87]. Die Behandlung der Tiere mit FIPI führte zu keiner Änderung des Zytokinlevel 24 h post AMI. Die Abhängigkeit von IL – 1 β und TNF – α , sowie der Einfluss von IL – 6 auf die inflammatorischen und *Remodelling* – Prozesse nach myokardialer Ischämie / Reperfusion könnte eine Erklärung für die unveränderte Infarktgröße FIPI – behandelter Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe sein. Die unveränderte TNF – α - Expression in FIPI – behandelten Tieren zeigt, dass die PLD1 – vermittelte Regulation der TNF – Expression von der enzymatischen Aktivität der PLD1 abhängig sein könnte. In FIPI – behandelten Tieren war die Migration von Monozyten und Leukozyten in das Infarktgebiet im Vergleich zu den Kontrolltieren 24 h post AMI reduziert. Der auf Thrombozyten exprimierte GPIIb – Rezeptor kann mit dem Integrin Mac – 1 der Leukozyten während eines inflammatorischen Stimulus interagieren [23]. Daher wurde die Mac- 1 – Expression 24 h nach myokardialer Ischämie durchflusszytometrisch bestimmt, mit dem Resultat, dass es keine Unterschiede der Mac – 1 - Expression auf den Monozyten FIPI - behandelter Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren gab. Weiterführend wurde in den FIPI – behandelten Mäusen die Thrombozyten / Immunzell - Aggregatbildung nach Ischämie / Reperfusion analysiert. In beiden Gruppen fand eine signifikante Hochregulation der Aggregatbildung 24 h post AMI statt. Ein Unterschied zwischen den FIPI – behandelten und den Kontrolltieren konnte jedoch nicht detektiert werden. Dies deutet daraufhin, dass PLD1 bzw. PA keinen Thrombozyten – vermittelten Einfluss auf die Rekrutierung und die Aktivierung von Immunzellen hat.

Erwartungsgemäß fiel die Aggregatbildung nach der inflammatorischen Phase wieder ab.

Die Bindung von Mac - 1 der Monozyten an den endothelialen Rezeptor ICAM – 1 ist wichtig für die Migration der Monozyten in das ischämische Gewebe [8]. Die Mac – 1 – Expression von Monozyten FIPI – behandelter Tiere zeigte 24 h post AMI keine Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Einwanderung von inflammatorischen Zellen in das Infarktgebiet war jedoch durch die Behandlung der Mäuse mit FIPI reduziert. Powner *et al.* zeigten einen PLD – vermittelten Integrindefekt des Mac – 1 in Neutrophilen [78]. Da die Mac – 1 - Expression in FIPI – behandelten Tieren keinen Unterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren ergab, erklärt dies jedoch nicht die reduzierte Einwanderung der Immunzellen nach myokardialer Ischämie. Zudem war die Thrombozyten – Immunzelle – Aggregatbildung durch die gehemmte PA, wie oben bereits beschrieben, nicht beeinflusst, was auf eine PLD1 / PA thrombozyten - unabhängige Aktivierung der Immunzellen schließen lässt. Da an einer Infiltration der Immunzellen ins Gewebe auch andere Integrine beteiligt sind, könnte hier ein anderer Defekt oder aber ein Rezeptordefekt der Endothelzellen dem Effekt zugrunde liegen. Ein entscheidender Prozess bei der Migration von Immunzellen während eines inflammatorischen Ereignisses ist die Interaktion zwischen dem LFA – 1 – Integrin und dem ICAM – 1 der Endothelzellen [88]. Eine weiterführende Analyse der Leukozyten – Integrine nach myokardialer Ischämie könnte zur Aufklärung der reduzierten Zelleinwanderung beitragen. Es wurde gezeigt, dass die Expression von Mac – 1 abhängig von der PLD – Aktivität und somit auch abhängig von der PA – Generierung ist [78]. Da in der vorliegenden Arbeit nach pharmakologischer Inhibition der PA – Generierung die Mac – 1 Expression unverändert ist, können die bereits publizierten Daten - zumindest in diesem inflammatorischen Erkrankungsmodell der myokardialen Ischämie - nicht bestätigt werden.

Die PLD1 – vermittelte reduzierte TNF – α – Expression führte in PLD1 - defizienten Tieren zu einer erhöhten Infarktgröße [42]. Um weiterhin zu untersuchen, ob dieser Phänotyp auf einer verminderten inflammatorischen Antwort beruht und nicht durch eine PLD – abhängige Apoptose induziert wurde, wurden auch

verschiedene Apoptosemarker in FIPI – behandelten Tieren nach Ischämie analysiert. Die Färbung Caspase 3 – positiver Zellen im Infarktgebiet 24 h post AMI zeigte hierbei keine Unterschiede in ihrer Anzahl im Vergleich von FIPI – behandelte Tiere zu den Kontrolltieren. Auch die Expression des pro - apoptotischen Gens *Bax* [89], sowie die Expression der anti - apoptotischen Gene *Bcl – xl* und *Bcl – 2* [90] zeigten keine Alterierung. Somit wird durch Hemmung der enzymatischen Aktivität von PLD das Überleben der Zellen, wie z. B. der Kardiomyozyten oder inflammatorischen Zellen, im Infarktgebiet nicht beeinflusst.

Zusammenfassend zeigen die publizierten Ergebnisse der Analyse des Einflusses von PLD1 auf die myokardiale Ischämie, dass PLD1 – Defizienz zu einer reduzierten Einwanderung von inflammatorischen Zellen, sowie zu einem erniedrigtem TNF – α – Plasmaspiegel und schlussendlich zu einem erhöhtem Infarktgebiet und einer verschlechterten Herzfunktion führt. Die pharmakologische Inhibition von PLD durch FIPI zeigte ebenfalls eine reduzierte Immunzellmigration, jedoch keine Auswirkung auf die TNF – α – Expression oder die Infarktgröße. Der Vergleich dieser beiden Untersuchungsgruppen deutet darauf hin, dass die Expression von TNF – α von der enzymatischen Aktivität der PLD1 unabhängig ist und Effekte auf den TNF – α – Plasmaspiegel durch andere Funktionen des PLD1 – Proteins hervorgerufen werden.

Weiterführend lässt dies darauf schließen, dass die PLD nicht nur enzymatische Eigenschaften hat, sondern eventuell auch an anderen Prozessen beteiligt ist, da eine gehemmte Generierung von PA keine Auswirkung auf den Infarkt zeigte. Hierzu wurde beispielsweise gezeigt, dass die PLD auch stabilisierende Eigenschaften auf Proteinkomplexe hat. Zusammen mit der Serine – Threonine – Kinase mTOR ist PLD in der Lage die HDM2 (engl. *p53 E3 ubiquitin ligase human double minute 2*), ein wichtiger Regulator des p53 – Tumorsuppressors, zu stabilisieren und so das durch p53 – vermittelte pro – apoptotische Signal zu blockieren und das Zellüberleben zu schützen [91].

5.2.4 Ausblick

Da festgestellt wurde, dass PLD1 – Defizienz zu einer Verschlechterung im Herzen nach myokardialer Ischämie führt und dieser Effekt PLD1 abhängig und nicht, wie in dieser Arbeit gezeigt, PA abhängig ist, könnte die Analyse einer PLD1 – überexprimierenden Maus zur Klärung, ob PLD1 kardioprotektiv – therapeutisch eingesetzt werden könnte, beitragen.

Ein wesentlicher Unterschied in der Durchführung der Infarktmodelle war, dass es sich bei der Studie von Thielmann *et al.* um ein ischämisches Schlaganfallsmodell gehandelt hat und dass hier die Tiere bereits 1 und 13 Stunden vor der Induktion der Ischämie mit FIPI behandelt wurden, was zu einer Verbesserung des Infarktes führte. Daher könnte die Behandlung von Mäusen bereits Stunden vor der LAD Ligatur auch im ischämischen Myokardinfarkt zu anderen Ergebnissen führen und sollte in nachfolgenden Studien untersucht werden.

5.3 PLD1 ist ein Regulator in der Thrombozyten - vermittelten Inflammation

Wie in verschiedenen Studien gezeigt wurde, haben Thrombozyten einen wesentlichen Einfluss auf Entzündungsreaktionen und die inflammatorische Antwort [23, 35, 36, 42, 92]. Die Entzündungsreaktion beruht auf einer Interaktion von Thrombozyten, Immunzellen (Leukozyten) und Endothelzellen. Diese Interaktion führt zu Aktivierungsprozessen, die die Rekrutierung und Einwanderung der Leukozyten in die Gefäßwand und somit zur Entzündung initiieren [23]. Auch nach myokardialer Ischämie konnte der Einfluss von Thrombozyten auf die inflammatorischen Prozesse bereits gezeigt werden [44-49].

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit, der Einfluss von PLD1 auf die Thrombozyten – Endothelzellen - Interaktion und die Thrombozyten – vermittelte Leukozyten Rekrutierung und Adhäsion während inflammatorischer Prozesse untersucht.

5.3.1 PLD1 ist verantwortlich für die stabile Thrombozyten – und Leukozytenadhäsion auf entzündlichem Endothel

In vitro zeigten *Pld1*^{-/-}- Thrombozyten unter hoher Scherrate eine signifikant reduzierte Adhäsion auf stimulierten Endothelzellen (MHEC5 - T). Im Gegensatz hierzu war die Thrombozytenadhäsion unter niedriger Scherrate nicht beeinträchtigt. Auch PLD1 – defiziente Leukozyten zeigten *in vitro* eine reduzierte Adhäsion an Kollagen – aktivierten Thrombozyten unter hoher Scherrate. Diese Daten zeigen, dass die PLD1 - vermittelten Effekte von Thrombozyten auf die Inflammation abhängig von der Scherrate sind, wie es bereits für die PLD1-vermittelten Prozesse bei der arteriellen Thrombose gezeigt werden konnte [32]. Die *in vitro* Daten konnten durch die Ergebnisse zweier *in vivo* Studien bestätigt werden. Nach einer Ligatur der Halsschlagader zeigten sowohl *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten als auch - Leukozyten eine deutlich verminderte Adhäsion an

der verletzten Gefäßwand. Nach der Ligatur der *vena cava* wurde ebenfalls eine verminderte Adhäsion von *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten und - Leukozyten am verletzten Endothel gezeigt. Diese Daten zeigen, dass PLD1 neben der GPIb - abhängigen Aktivierung von Integrinen und der Ausbildung stabiler Thromben unter hohen Scherraten von Bedeutung für die Rekrutierung und Adäsion von Thrombozyten und Leukozyten an der verletzten Gefäßwand wichtig ist.

Elvers *et al.* zeigten bereits, dass unter PLD1 - Defizienz eine reduzierte, GPIb - abhängige α IIb β 3 - Integrinaktivierung der Thrombozyten zu einem Schutz vor arterieller Thrombose führt [42]. Die Koinkubation isolierter Thrombozyten mit TNF - α - stimulierten Endothelzellen zeigte unter PLD1 - Defizienz ebenfalls eine reduzierte Integrinaktivität der Thrombozyten und demonstriert somit, dass auch unter inflammatorischen Bedingungen PLD1 in Thrombozyten wichtig für die Integrinaktivierung ist, wie es bereits in der Studie von Elvers *et al.* gezeigt werden konnte [32]. Zudem konnte eine thrombozytenvermittelte reduzierte inflammatorische Antwort der Endothelzellen nach Koinkubation von PLD1 - defizienten Thrombozyten und genetisch unveränderten Endothelzellen gezeigt werden. Die Hochregulation der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM - 1, VCAM und P - Selektin war unter thrombozytärer PLD1 - Defizienz nach der Koinkubation mit aktivierten Thrombozyten signifikant reduziert. Auch die endotheliale IL - 6 - Ausschüttung war nach Inkubation mit Thrombin - aktivierten Thrombozyten verringert. Dies zeigt eine deutlich Thrombozyten - vermittelte reduzierte, PLD1 - abhängige inflammatorische Antwort der Endothelzellen auf. Während einer Verletzung wird endotheliales Kollagen freigelegt, an welches der vWF bindet. Der thrombozytäre GPIb - Rezeptor bildet mit dem vWF einen Komplex, sodass die Adhäsion des Thrombozyten am Endothel erfolgen kann [93]. Studien zeigten, dass eine Inhibierung des vWF oder des α IIb β 3 - Integrins zu einer gehemmten Thrombozytenadhäsion auf Endothelzellen (HUVECs) führte [23]. McCarty *et al.* zeigten an isolierten Thrombozyten unter Verwendung von Botrocetin, welches die Bindung von vWF an den GPIb - Rezeptor unterstützt, dass es auf einer vWF - Matrix zu einer gestörten Ausbildung von Lamellipodien der Thrombozyten kommt. Dies zeigte, dass die Oberflächenvergrößerung von Thrombozyten nach ihrer Aktivierung über GPIb und

$\alpha_{Ib}\beta_3$ – Integrin vWF – vermittelt ist [64]. PLD1 – defiziente Thrombozyten weisen eine reduzierte Thrombozytenadhäsion und eine verminderte Lamellipodienformierung auf einer vWF – Matrix nach kurzer Inkubationszeit (3 Min) auf, was ebenfalls auf einen GPIb – abhängigen Adhäsionsdefekt dieser Thrombozyten hinweist.

Ein weiterer Faktor, der für die thrombozyten – vermittelte inflammatorische Antwort der Endothelzellen wichtig ist, ist der thrombozytäre CD40 – Ligand, (CD40L), welcher den Bindungspartner des endothelialen CD40 darstellt [62]. Nach der Stimulation mit CRP bzw. Botrocetin / vWF wiesen die *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten eine reduzierte CD40L – Expression auf ihrer Oberfläche auf. Daher gehen wir derzeit davon aus, dass eine Thrombozyten - vermittelte Aktivierung der Endothelzellen über CD40 - CD40L - Bindung an den hier gemessenen reduzierten chemotaktischen Eigenschaften der Endothelzellen beteiligt ist.

Das Mac – 1 – Integrin der Leukozyten kann an den thrombozytären GPIb – Rezeptor binden und fördert so die Neutrophilerekrutierung ans Endothel während inflammatorischer Prozesse [23]. Ein Mac – 1 – Defekt in PLD - Abhängigkeit konnte bereits in einer Studie nachgewiesen werden [78]. Wir vermuten daher, dass die reduzierte Adhäsion von Leukozyten auf Kollagen – aktivierten Thrombozyten auf dem GPIb – vermittelten Integrindefekt der PLD1 – defizienten Thrombozyten beruht, da es zu einer verminderten Bindung von GPIb an MAC – 1 während eines inflammatorischen Ereignisses kommt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die GPIb – abhängige Thrombozytenadhäsion nicht nur für die Adhäsion in Prozessen der arteriellen Thrombose, sondern auch für die Adhäsion unter inflammatorischen Bedingungen essentiell ist. Die in dieser Arbeit erhobenen *in vivo* Daten einer reduzierten Thrombozyten - und Leukozytenadhäsion an der ligierten *vena cava* und der *Carotis*, sowie die Thrombozyten – vermittelten Effekte auf die Aktivierung der Endothelzellen und die Rekrutierung und Adhäsion der Leukozyten zeigen, dass PLD1 sowohl in thrombotischen als auch in inflammatorischen Signalwegen eine essentielle Rolle spielt.

5.3.2 Veränderte Thrombusbildung unter PLD1 – Defizienz ist nicht auf einen thrombozytären zytoskelettalen Defekt zurückzuführen

Ali *et al.* zeigten, dass PLD1 die Reorganisation des Zytoskeletts während der Aktivierung von Phagozyten beeinflusst [63]. Zudem weisen *Pld1*^{-/-} - Mäuse unter hoher Scherrate eine reduzierte Thrombusbildung auf. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von PLD1 auf die Zytoskelett - Reorganisation untersucht.

Ein Adhäsions – oder *Spreading* – Defekt von *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien der Thrombozyten auf einer Fibrinogenmatrix, auch nach ihrer Aktivierung mit Thrombin, war unverändert im Vergleich von *Pld1*^{-/-} - und *Pld1*^{+/+} - Thrombozyten. Nur die Adhäsion von *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten auf einer vWF – Matrix zeigte eine signifikant reduzierte Adhäsion, sowie eine verminderte Lamellipodienbildung nach 3 Min Inkubationszeit und weist wiederum auf einen GPIb – vermittelten Effekt hin.

Diese Daten zeigen, dass die reduzierte Thrombozytenadhäsion auf Endothelzellen durch die defekte GPIb - vermittelte Integrinaktivierung hervorgerufen wird und nicht durch zytoskelettale Veränderungen, wie bereits unter 5.3.1 diskutiert wurde.

5.3.3 PLD1 reguliert die Phosphorylierung von Src im GPIb – Signalweg von Thrombozyten

Resultierend aus den in dieser Arbeit erhobenen Daten ergibt sich nun die Frage, wie PLD1 die GPIb – abhängige Integrinaktivierung der Thrombozyten beeinflusst. Der PLD1 - vermittelte Mechanismus wurde in den bisher veröffentlichten Studien nicht gezeigt. In meiner Arbeit konnte ich mehrfach zeigen, dass es einen direkten Einfluss von PLD1 auf den GPIb – Signalweg der Thrombozyten gibt, wie auch bereits von Elvers *et al.* nachgewiesen [32].

Zudem wurde gezeigt, dass die Tyrosin – Phosphorylierung der Src - Kinase (Lyn) und PLC γ 2 eine essentielle Rolle im vWF – GPIb – Signalweg zur $\alpha_{IIb}\beta_3$ – Integrinaktivierung spielt [66].

In dieser Arbeit konnte eine Interaktion von PLD1 und Src in Thrombozyten mittels Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Nachfolgende Src – Phosphorylierungsstudien zeigten zudem, dass es zu einer reduzierten GPIb – abhängigen Phosphorylierung der Src – Kinase unter PLD1 – Defizienz in den Thrombozyten kommt. Auch die Phosphorylierung von PLC γ 2, die im Signalweg der Src nachgeschaltet ist, war ebenfalls unter PLD1 – Defizienz nach GPIb – Stimulation reduziert. Einen generellen vWF - Bindungsdefekt zeigten die *Pld1*^{-/-} - Thrombozyten nicht. Aufgrund dieser Daten gehen wir derzeit davon aus, dass PLD1 die GPIb – Aktivierung ausschließlich intrazellulär beeinflusst. Zusätzlich führte PLD1 – Defizienz zu einer Kollagen – abhängigen verzögerten, Phosphorylierung von Src und PLC γ 2, die aber in ihrem Maximalwert nicht verändert war.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass PLD1 die Aktivierung des GPIb - Signalwegs über die Phosphorylierung von Src moduliert. Es wurde bereits gezeigt, dass c – Src als eine Kinase der PLD und PLD als ein Aktivator der c – Src fungiert [94]. Da PLD1 selbst keine Kinase ist, wird die Beeinflussung der Phosphorylierung von Src wahrscheinlich durch einen Protein – stabilisierenden Effekt der PLD1 erfolgen, wie er z. B. bei der Regulation von Tumorsuppressorproteinen bereits beschrieben wurde [91].

Zusammenfassend gehen wir daher derzeit davon aus, dass PLD1 über Src - Phosphorylierung die GPIb - abhängige Integrinaktivität in den Prozessen der arteriellen Thrombose und der Thrombozyten - vermittelten Inflammation moduliert.

5.3.4 Ausblick

Der Einfluss von PLD1 auf die Inflammation wurde bereits in mehreren Studien wie der Peritonitis [38] oder dem ischämischen Myokardinfarkt [42] nachgewie-

sen. Hierbei wurde gezeigt, dass PLD1 die TNF – α - vermittelte inflammatorische Antwort, sowie die Leukozytenmigration in das Infarktgebiet, bedingt [38, 42]. Der Einfluss von PLD1 in Blutzellen auf die TNF – α – vermittelte Inflammation in der myokardialen Ischämie wurde bereits in dieser Arbeit diskutiert (s. 5.1.3). Weiterführend wurde hier zudem gezeigt, dass PLD1 eine wichtige Rolle in der thrombozyten – vermittelten Inflammation spielt. Dies lässt schlussfolgern, dass die reduzierte inflammatorische Antwort in PLD1 – defizienten Mäusen nach myokardialer Ischämie – zumindest teilweise - auf einer gestörten Thrombozyten – vermittelten Inflammation beruht.

Durch eine gestörte Thrombusbildung sind *Pld1*^{-/-} - Mäuse vor einem zerebralen ischämischen Schaden geschützt [32]. Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten zum Einfluss von PLD1 in der Thrombozyten – vermittelten Inflammation, könnte dies darauf hindeuten, dass die Ausbildung des Myokardinfarktgebietes nach myokardialer Ischämie u. a. von der GPIb – vWF - vermittelten Thrombozytenadhäsion und Aktivierung beeinflusst wird. Da der ischämische Schlaganfall eine thrombo – inflammatorische Krankheit ist [95], könnte eine reduzierte thrombozyten – vermittelte Inflammation zu einer reduzierten Thrombusbildung führen und somit vor dieser Krankheit schützen.

In Zukunft sollte daher in einer Thrombozyten – spezifischen *Pld1*^{-/-} - Mauslinie die Auswirkung der PLD1 – Defizienz nur in Thrombozyten auf die Prozesse der Inflammation, der Narbenbildung und der Herzfunktion nach myokardialer Ischämie / Reperfusion untersucht werden.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1. Thygesen, K., et al., *Universal definition of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2007. 50(22): p. 2173-95.
2. Dobaczewski, M., C. Gonzalez-Quesada, and N.G. Frangogiannis, *The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2010. 48(3): p. 504-11.
3. Liehn, E.A., et al., *Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines*. J Am Coll Cardiol, 2011. 58(23): p. 2357-62.
4. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. Circ Res, 2016. 119(1): p. 91-112.
5. Romson, J.L., et al., *Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog*. Circulation, 1983. 67(5): p. 1016-23.
6. Knorr, M., T. Munzel, and P. Wenzel, *Interplay of NK cells and monocytes in vascular inflammation and myocardial infarction*. Front Physiol, 2014. 5: p. 295.
7. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. J Exp Med, 2007. 204(12): p. 3037-47.
8. Metzler, B., et al., *Mouse model of myocardial remodelling after ischemia: role of intercellular adhesion molecule-1*. Cardiovasc Res, 2001. 49(2): p. 399-407.
9. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. Circ Res, 2012. 110(1): p. 159-73.

10. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction*. *Circulation*, 2010. 121(22): p. 2437-45.
11. Zhang, Y., et al., *A new anti-fibrotic drug attenuates cardiac remodeling and systolic dysfunction following experimental myocardial infarction*. *Int J Cardiol*, 2013. 168(2): p. 1174-85.
12. Jackson, S.P., *Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly*. *Nat Med*, 2011. 17(11): p. 1423-36.
13. Ruggeri, Z.M., *The role of von Willebrand factor in thrombus formation*. *Thromb Res*, 2007. 120 Suppl 1: p. S5-9.
14. Castaman, G., A. Tassetto, and F. Rodeghiero, *Reduced von Willebrand factor survival in von Willebrand disease: pathophysiologic and clinical relevance*. *J Thromb Haemost*, 2009. 7 Suppl 1: p. 71-4.
15. Ruggeri, Z.M., *Structure and function of von Willebrand factor*. *Thromb Haemost*, 1999. 82(2): p. 576-84.
16. Kehrel, B., et al., *Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not*. *Blood*, 1998. 91(2): p. 491-9.
17. Ruggeri, Z.M., R. Bader, and L. de Marco, *Glanzmann thrombasthenia: deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. 79(19): p. 6038-41.
18. Bennett, J.S. and G. Vilaire, *Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine*. *J Clin Invest*, 1979. 64(5): p. 1393-401.
19. Ni, H., et al., *Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen*. *J Clin Invest*, 2000. 106(3): p. 385-92.
20. Gale, A.J., *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis*. *Toxicol Pathol*, 2011. 39(1): p. 273-80.
21. Kuckleburg, C.J., et al., *Endothelial cell-borne platelet bridges selectively recruit monocytes in human and mouse models of vascular inflammation*. *Cardiovasc Res*, 2011. 91(1): p. 134-41.

22. Yin, H., et al., *Role for platelet glycoprotein Ib-IX and effects of its inhibition in endotoxemia-induced thrombosis, thrombocytopenia, and mortality*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. 33(11): p. 2529-37.
23. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. *J Clin Invest*, 2005. 115(12): p. 3378-84.
24. Hawrylowicz, C.M., G.L. Howells, and M. Feldmann, *Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production*. *J Exp Med*, 1991. 174(4): p. 785-90.
25. Kaplanski, G., et al., *Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism*. *Blood*, 1994. 84(12): p. 4242-8.
26. Liu, J.R., et al., *The role of macrophage 1 antigen in polymicrobial sepsis*. *Shock*, 2014. 42(6): p. 532-9.
27. Liu, Y., et al., *Novel role of platelets in mediating inflammatory responses and ventricular rupture or remodeling following myocardial infarction*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. 31(4): p. 834-41.
28. Oude Weernink, P.A., M. Lopez de Jesus, and M. Schmidt, *Phospholipase D signaling: orchestration by PIP2 and small GTPases*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2007. 374(5-6): p. 399-411.
29. Knoepp, S.M., et al., *Effects of active and inactive phospholipase D2 on signal transduction, adhesion, migration, invasion, and metastasis in EL4 lymphoma cells*. *Mol Pharmacol*, 2008. 74(3): p. 574-84.
30. Nishikimi, A., et al., *Sequential regulation of DOCK2 dynamics by two phospholipids during neutrophil chemotaxis*. *Science*, 2009. 324(5925): p. 384-7.
31. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha*. *J Exp Med*, 1998. 187(3): p. 329-39.

32. Elvers, M., et al., *Impaired alpha(IIb)beta(3) integrin activation and shear-dependent thrombus formation in mice lacking phospholipase D1*. Sci Signal, 2010. 3(103): p. ra1.
33. Su, W., et al., *5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI), a phospholipase D pharmacological inhibitor that alters cell spreading and inhibits chemotaxis*. Mol Pharmacol, 2009. 75(3): p. 437-46.
34. Hughes, W.E., et al., *Phospholipase D1 regulates secretagogue-stimulated insulin release in pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 2004. 279(26): p. 27534-41.
35. Stegner, D., et al., *Pharmacological inhibition of phospholipase D protects mice from occlusive thrombus formation and ischemic stroke--brief report*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. 33(9): p. 2212-7.
36. Thielmann, I., et al., *Redundant functions of phospholipases D1 and D2 in platelet alpha-granule release*. J Thromb Haemost, 2012. 10(11): p. 2361-72.
37. Bluth, M., et al., *Use of gene expression profiles in cells of peripheral blood to identify new molecular markers of acute pancreatitis*. Arch Surg, 2008. 143(3): p. 227-33; discussion 233-4.
38. Sethu, S., P.N. Pushparaj, and A.J. Melendez, *Phospholipase D1 mediates TNFalpha-induced inflammation in a murine model of TNFalpha-induced peritonitis*. PLoS One, 2010. 5(5): p. e10506.
39. Lee, M.Y., et al., *Upregulation of phospholipase D in astrocytes in response to transient forebrain ischemia*. Glia, 2000. 30(3): p. 311-7.
40. Kang, D.W., et al., *Phospholipase D1 has a pivotal role in interleukin-1beta-driven chronic autoimmune arthritis through regulation of NF-kappaB, hypoxia-inducible factor 1alpha, and FoxO3a*. Mol Cell Biol, 2013. 33(14): p. 2760-72.
41. Jin, J.K., et al., *Phospholipase D1 is associated with amyloid precursor protein in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2007. 28(7): p. 1015-27.
42. Schonberger, T., et al., *Pivotal role of phospholipase D1 in tumor necrosis factor-alpha-mediated inflammation and scar formation after*

- myocardial ischemia and reperfusion in mice*. Am J Pathol, 2014. 184(9): p. 2450-64.
43. Lam, F.W., K.V. Vijayan, and R.E. Rumbaut, *Platelets and Their Interactions with Other Immune Cells*. Compr Physiol, 2015. 5(3): p. 1265-80.
 44. Burne, M.J., et al., *Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure*. J Clin Invest, 2001. 108(9): p. 1283-90.
 45. Massberg, S., et al., *Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo*. Blood, 1999. 94(11): p. 3829-38.
 46. Rabb, H., et al., *Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. 279(3): p. F525-31.
 47. Salter, J.W., et al., *Platelets modulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte recruitment in the mesenteric circulation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. 281(6): p. G1432-9.
 48. Zwacka, R.M., et al., *CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver*. J Clin Invest, 1997. 100(2): p. 279-89.
 49. Xu, Y., et al., *Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. 290(2): p. H692-9.
 50. Dent, M.R., et al., *Expression of phospholipase D isozymes in scar and viable tissue in congestive heart failure due to myocardial infarction*. J Cell Mol Med, 2004. 8(4): p. 526-36.
 51. Baum, J. and H.S. Duffy, *Fibroblasts and myofibroblasts: what are we talking about?* J Cardiovasc Pharmacol, 2011. 57(4): p. 376-9.
 52. Turner, N.A. and K.E. Porter, *Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2013. 6(1): p. 5.
 53. Dall'Armi, C., et al., *The phospholipase D1 pathway modulates macroautophagy*. Nat Commun, 2010. 1: p. 142.

54. Gowert, N.S., et al., *Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease*. PLoS One, 2014. 9(2): p. e90523.
55. von Bruhl, M.L., et al., *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. J Exp Med, 2012. 209(4): p. 819-35.
56. Rassaf, T., et al., *Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning*. Circ Res, 2014. 114(10): p. 1601-10.
57. Steffens, S., F. Montecucco, and F. Mach, *The inflammatory response as a target to reduce myocardial ischaemia and reperfusion injury*. Thromb Haemost, 2009. 102(2): p. 240-7.
58. Steinhubl, S.R., et al., *Clinical evidence for anti-inflammatory effects of antiplatelet therapy in patients with atherothrombotic disease*. Vasc Med, 2007. 12(2): p. 113-22.
59. Zago, A.C., et al., *The importance of the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet glycoprotein Ib-a for leukocyte recruitment by platelets and for the inflammatory response to vascular injury*. Arq Bras Cardiol, 2008. 90(1): p. 54-63.
60. Hirahashi, J., et al., *Mac-1 (CD11b/CD18) links inflammation and thrombosis after glomerular injury*. Circulation, 2009. 120(13): p. 1255-65.
61. Zhao, X., et al., *TNF-alpha stimulates caspase-3 activation and apoptotic cell death in primary septo-hippocampal cultures*. J Neurosci Res, 2001. 64(2): p. 121-31.
62. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. Nature, 1998. 391(6667): p. 591-4.
63. Ali, W.H., et al., *Deficiencies of the lipid-signaling enzymes phospholipase D1 and D2 alter cytoskeletal organization, macrophage phagocytosis, and cytokine-stimulated neutrophil recruitment*. PLoS One, 2013. 8(1): p. e55325.

64. McCarty, O.J., et al., *von Willebrand factor mediates platelet spreading through glycoprotein Ib and alpha(IIb)beta3 in the presence of botrocetin and ristocetin, respectively*. J Thromb Haemost, 2006. 4(6): p. 1367-78.
65. Lei, X., et al., *Anfibatide, a novel GPIb complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation in vitro and in vivo in murine models of thrombosis*. Thromb Haemost, 2014. 111(2): p. 279-89.
66. Ozaki, Y., K. Suzuki-Inoue, and O. Inoue, *Platelet receptors activated via multimerization: glycoprotein VI, GPIb-IX-V, and CLEC-2*. J Thromb Haemost, 2013. 11 Suppl 1: p. 330-9.
67. Parameswaran, N. and S. Patial, *Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2010. 20(2): p. 87-103.
68. Kupatt, C., et al., *c7E3Fab reduces postischemic leukocyte-thrombocyte interaction mediated by fibrinogen. Implications for myocardial reperfusion injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. 20(10): p. 2226-32.
69. Lefer, A.M., et al., *Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins*. Circulation, 1998. 98(13): p. 1322-8.
70. Velez, P., et al., *Alteration of platelet GPVI signaling in ST-elevation myocardial infarction patients demonstrated by a combination of proteomic, biochemical, and functional approaches*. Sci Rep, 2016. 6: p. 39603.
71. Massberg, S., et al., *Soluble glycoprotein VI dimer inhibits platelet adhesion and aggregation to the injured vessel wall in vivo*. FASEB J, 2004. 18(2): p. 397-9.
72. Pachel, C., et al., *Inhibition of Platelet GPVI Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. 36(4): p. 629-35.
73. Moraru, II, et al., *Phospholipase D signaling in ischemic heart*. Biochim Biophys Acta, 1992. 1139(1-2): p. 148-54.

74. Krown, K.A., et al., *Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death.* J Clin Invest, 1996. 98(12): p. 2854-65.
75. Maekawa, N., et al., *Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha.* J Am Coll Cardiol, 2002. 39(7): p. 1229-35.
76. Nah, D.Y. and M.Y. Rhee, *The inflammatory response and cardiac repair after myocardial infarction.* Korean Circ J, 2009. 39(10): p. 393-8.
77. Iyer, S.S., et al., *Phospholipase D1 regulates phagocyte adhesion.* J Immunol, 2006. 176(6): p. 3686-96.
78. Powner, D.J., et al., *Stable adhesion and migration of human neutrophils requires phospholipase D-mediated activation of the integrin CD11b/CD18.* Mol Immunol, 2007. 44(12): p. 3211-21.
79. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling.* Cardiovasc Res, 2007. 74(2): p. 184-95.
80. Hammond, S.M., et al., *Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family.* J Biol Chem, 1995. 270(50): p. 29640-3.
81. Kodaki, T. and S. Yamashita, *Cloning, expression, and characterization of a novel phospholipase D complementary DNA from rat brain.* J Biol Chem, 1997. 272(17): p. 11408-13.
82. Martinson, E.A., et al., *Platelet phospholipase D is activated by protein kinase C via an integrin alpha IIb beta 3-independent mechanism.* Biochem J, 1995. 310 (Pt 2): p. 623-8.
83. Vorland, M. and H. Holmsen, *Phospholipase D in human platelets: presence of isoenzymes and participation of autocrine stimulation during thrombin activation.* Platelets, 2008. 19(3): p. 211-24.
84. Chen, Q., et al., *Key roles for the lipid signaling enzyme phospholipase d1 in the tumor microenvironment during tumor angiogenesis and metastasis.* Sci Signal, 2012. 5(249): p. ra79.

85. Kobara, M., et al., *Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice*. Cardiovasc Res, 2010. 87(3): p. 424-30.
86. Taylor, P.C. and M. Feldmann, *Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2009. 5(10): p. 578-82.
87. Hwang, M.W., et al., *Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling*. J Am Coll Cardiol, 2001. 38(5): p. 1546-53.
88. Shaw, S.K., et al., *Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration*. J Exp Med, 2004. 200(12): p. 1571-80.
89. Pawlowski, J. and A.S. Kraft, *Bax-induced apoptotic cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(2): p. 529-31.
90. Okaro, A.C., et al., *The expression of antiapoptotic proteins Bcl-2, Bcl-X(L), and Mcl-1 in benign, dysplastic, and malignant biliary epithelium*. J Clin Pathol, 2001. 54(12): p. 927-32.
91. Lyo, D., L. Xu, and D.A. Foster, *Phospholipase D stabilizes HDM2 through an mTORC2/SGK1 pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. 396(2): p. 562-5.
92. Totani, L. and V. Evangelista, *Platelet-leukocyte interactions in cardiovascular disease and beyond*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. 30(12): p. 2357-61.
93. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. 8(11): p. 1227-34.
94. Ahn, B.H., et al., *Transmodulation between phospholipase D and c-Src enhances cell proliferation*. Mol Cell Biol, 2003. 23(9): p. 3103-15.
95. Denorme, F. and S.F. De Meyer, *The VWF-GPIIb axis in ischaemic stroke: lessons from animal models*. Thromb Haemost, 2016. 116(4): p. 597-604

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigste Todesursache in Deutschland 2015.	- 2 -
Abbildung 2: Schaubild der inflammatorischen und proliferativen Phase nach Herzinfarkt.	- 3 -
Abbildung 3: Phasen der inflammatorischen Antwort nach Myokardinfarkt.	- 5 -
Abbildung 4: Schematische Darstellung der primären Hämostase.	- 7 -
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Auswirkung von Thrombozytenadhäsion auf Endothelzellen.	- 10 -
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Regulation und zelluläre Bedeutung der Phospholipase D.	- 13 -
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Generierung von Knochenmarkschimären.	- 38 -
Abbildung 8: Aufbau eines Blots innerhalb des Western – Blot – Verfahrens.	- 55 -
Abbildung 9: Exemplarisches Gelbild der Blutzellen – Genotypisierung.	- 79 -
Abbildung 10: Bestimmung der Zellzahl der unterschiedlichen Blutzelltypen.	- 80 -
Abbildung 11: Bestimmung der P-Selektin Exposition auf der Thrombozytenoberfläche durch FACS 4 und 24 h post AMI.	- 81 -
Abbildung 12: Bestimmung der Integrinaktivierung auf der Thrombozytenoberfläche durch FACS 4 und 24 h post AMI.	- 82 -

Abbildung 13: Reduzierte P – Selektin – Expression bei $Pld^{-/-}$ - KM – Chimären nach CRP – Aktivierung.....	- 83 -
Abbildung 14: Verschiedene Parameter zur echokardiographischen Auswertung der KM – Chimären.	- 86 -
Abbildung 15: Leukozyten / bzw. Neutophilen / Thrombozyten – Aggregatbildung 4 h post AMI.....	- 87 -
Abbildung 16: Reduzierte Einwanderung von Immunzellen bei PLD1 – defizienten Chimären.	- 88 -
Abbildung 17: ELISA – Analyse des Plasmazytokines TGF – β	- 89 -
Abbildung 18: Analyse der Infarktgröße post AMI.	- 91 -
Abbildung 19: Analyse der Narbenqualität 21 d post AMI.	- 92 -
Abbildung 20: α – SMA – Immunfärbung myokardialer Fibroblasten 21 d post AMI.....	- 93 -
Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analysen der Thrombozyten-aktivierung durch Bestimmung der Exposition von P –Selektin und der Integrinaktivität.....	- 97 -
Abbildung 22: Echokardiographischen Auswertung FIPI behandelte C57BL/6J – Tiere post AMI.	- 99 -
Abbildung 23: FACS – Analyse der Immunzellen / Thrombozytenaggregatbildung in der akuten Phase post AMI.....	- 100 -
Abbildung 24: Einwanderung von inflammatorischen Zellen in das Infarktgebiet 24 h post AMI.	- 101 -
Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse der Neutrophilen Mac – 1 – Expression 24 h post AMI.	- 102 -
Abbildung 26: Analyse der akuten – Phasen - Zytokine 24 h post AMI. ...	- 104 -

Abbildung 27: Analyse der Infarktgröße nach myokardialer Ischämie FIPI – behandelte Tiere.....	- 105 -
Abbildung 28: Analyse der Apoptose bei FIPI – behandelten Tieren 24 h post AMI.....	- 107 -
Abbildung 29: Unveränderte Adhäsion von Thrombozyten auf TNF – α stimulierten EC unter niedriger Scherrate ($150^{\text{sek}^{-1}}$).....	- 109 -
Abbildung 30: Signifikant reduzierte Thrombozytenadhäsion auf TNF – α stimulierten Endothelzellen unter hoher Scherrate ($1700^{\text{sek}^{-1}}$).....	- 110 -
Abbildung 31: Keine Veränderung in der Adhäsion von Thrombozyten auf entzündlichem Endothel unter hoher Scherrate ($1700^{\text{sek}^{-1}}$).....	- 111 -
Abbildung 32: Reduzierte CD40L – Expression auf der Oberfläche von <i>Pld1</i> ^{-/-} - Thrombozyten nach Aktivierung mit CRP und Botrocetin / vWF....	- 112 -
Abbildung 33: Signifikante Reduzierung der Integrinaktivität <i>Pld1</i> – defizienter Thrombozyten nach Aktivierung mit TNF – α stimulierten Endothelzellen.....	- 113 -
Abbildung 34: Keine signifikanten Unterschiede im <i>Spreading</i> von <i>PLD1</i> – defizienten Thrombozyten auf Fibrinogen.....	- 115 -
Abbildung 35: Adhäsion von Thrombozyten und MEFs.....	- 116 -
Abbildung 36: <i>Spreading</i> und Adhäsion von Thrombozyten.....	- 118 -
Abbildung 37: Adhäsion und <i>Spreading</i> von Thrombozyten auf einer vWF - Matrix.....	- 119 -
Abbildung 38: Einfluss aktivierter Thrombozyten auf die Regulation endothelialer Adhäsionsmoleküle.....	- 122 -
Abbildung 39: Bestimmung der IL- 6 Konzentration im Überstand von Endothelzellen nach Inkubation mit stimulierten Thrombozyten.....	- 123 -

Abbildung 40: Western – Blot Analysen zur Bestimmung der Phosphorylierung von Src und PLC γ 2 nach Stimulation mit GPIb und GPVI in Thrombozyten. - 125 -

Abbildung 41: Immunpräzipitation mit PLD1 – Antikörper und Nachweis der Bindung von PLD1 und Src..... - 126 -

Abbildung 42: Adhäsion von Thrombozyten nach Ligatur der *Carotis communis*..... - 128 -

Abbildung 43: Adhärente Thrombozyten nach Ligatur der *Vena Cava*..... - 129 -

Abbildung 44: Reduzierte Adhäsion von PLD1 – defizienten Leukozyten auf Kollagen – aktivierten Thrombozyten. - 130 -

Abbildung 45: Adhäsion von Leukozyten nach Ligatur der Carotis. - 131 -

Abbildung 46: Adhäsion von Leukozyten nach Ligatur der *Vena Cava*.... - 132 -

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis	I
Tabelle 2: Gebrauchsartikel.....	- 21 -
Tabelle 3: Geräte.....	- 22 -
Tabelle 4: Chemikalien, Puffer, Lösungen.....	- 24 -
Tabelle 5: Zellkulturmedien	- 29 -
Tabelle 6: Antikörper für Flusskammer.....	- 30 -
Tabelle 7: Antikörper für Western – Blot.....	- 30 -
Tabelle 8: Antikörper für Durchflusszytometrie.....	- 30 -
Tabelle 9: Antikörper für Immunpräzipitation	- 31 -
Tabelle 10: Antikörper für DAB - basierte Immunhistologie	- 31 -
Tabelle 11: Kits.....	- 32 -
Tabelle 12: Primersequenzen.....	- 33 -
Tabelle 13: Software.....	- 34 -
Tabelle 14: Versuchstiergruppen.....	- 36 -
Tabelle 15: Zusammensetzung des Trenn - und Sammelgels	- 54 -
Tabelle 16: Blotpuffer - Zusammensetzung.....	- 56 -
Tabelle 17: Primersequenzen für <i>Pld1</i> - Genotypisierung	- 63 -
Tabelle 18: Zusammensetzung eines PCR – Ansatzes pro Probe.....	- 63 -

Tabelle 19: Mastermixzusammensetzung für cDNA – Synthese pro
Ansatz - 66 -

Tabelle 20: Thermocycler – Programm für cDNA - Synthese - 66 -

Tabelle 21: Zusammensetzung des Mastermixes für qRT – PCR pro
Ansatz - 67 -

Tabelle 22: Primersequenzen für qRT - PCR - 67 -

Tabelle 23: Programm der qRT – PCR..... - 68 -

Tabelle 24: Alkoholreihen - 71 -

Tabelle 25: Antikörper für Immunhistochemie der Immunzellen - 74 -

6.4 Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

- 07/2017 "Phospholipase D1 is important for the platelet-mediated inflammatory response"
Cell. Signal
M. Klier, N.S. Gowert, M. Elvers *et al.*
- 03/2017 "Reelin is responsible for APP and ApoER2 mediated platelet activation and thrombus formation under high shear conditions"
Sci. Signal.
submitted
Nina Sarah Gowert, Irena Krüger, **Meike Klier** *et al.*
- 02/2017 "Defective Platelet Activation and Bleeding Complications upon Cholestasis in Mice"
Cell Physiol Biochem
Nina Sarah Gowert, **Meike Klier** *et al.*
- 04/2016 "Oligophrenin1 protects mice against myocardial ischemia and reperfusion injury by modulating inflammation and myocardial apoptosis"
J.Cellsig
Christina Niermann, Simone Gorressen, **Meike Klier** *et al.*
- 12/2014 "Loss of Oligophrenin1 leads to uncontrolled Rho activation and increased thrombus formation in mice"
J Thromb Haemost.
A. Fotinos, **M. Klier** *et al.*
- 09/2014 "Pre-activated blood platelets and a pro-thrombotic phenotype in APP23 mice Modelling Alzheimer's disease"
Cell Signal
Jarre A, Gowert NS, Donner L, Münzer P, **Klier M** *et al.*

Vorträge

- 07/2017 "Phospholipase D1 regulates TNF - mediated protection against responses to LPS" ISTH, Berlin, Deutschland
- 02/2017 "Phospholipase D1 is a regulator of platelet-mediated inflammation", 61st Annual Meeting of the Society of Thrombosis and Hemostasis Research (GTH), Basel, Schweiz
- 10/2016 „Lipidmediators in acute phase after myocardial infarction: Studies on Phospholipase D“, 4. Retreat SFB 1116, Bergisch Gladbach, Deutschland
- 04/2016 "The flow chamber system: A basic-method in hemostaseology" Mini-Symposium „Methods in cardiovascular research“ SFB 1116, Bergisch Gladbach, Deutschland
- 10/2015 „Lipidmeditoren in der akuten Phase nach Myokardinfarkt. Untersuchungen zur Phospholipase D“, 2.Retreat SFB 1116, Bergisch Gladbach, Deutschland
- 04/2015 "Defective platelet activation and bleeding complication upon cholestasis in mice“, 81.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Mannheim, Deutschland
- 08/2014 "Role and importance of the neuronal protein Reelin in hemostasis and arterial thrombosis"; BMFZ-Meeting UKD, Düsseldorf, Germany
- 06/2014 "Reelin-Club" Meeting; UKD: Präsentation des Reelin-Projekts, Düsseldorf, Deutschland

Posterpräsentationen

07/2016 "Lipidmediators in the acute phase after myocardial infarction: studies on Phospholipase D", 1st International Symposium of SFB 1116, Düsseldorf, Germany

02/2015 "Defective platelet activation and bleeding complications upon cholestasis in mice", 59th Annual Meeting of The Society of Thrombosis and Hemostasis Research (GTH) 2015, Düsseldorf, Germany

Stipendien

04/2015 Reisestipendium: DGK 2015, Mannheim, Deutschland

Preise

02/2017 „Best oral presentation“; GTH; Basel, Schweiz

6.5 Danksagung

Zunächst geht mein Dank an Frau Prof. Dr. Margitta Elvers für die Vergabe meines Dissertationsthemas und die Möglichkeit, sie in ihrem Institut durchführen zu dürfen.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Holger Gohlke danken, welcher sich dazu bereit erklärt hat, als Zweitgutachter meiner Dissertation zu fungieren.

Danke auch an die Mitglieder der ZETT, insbesondere an Frau Dominique Kitzke und Frau Anja Leinweber – *Danke* an Euch, nicht nur für die Pflege unserer Tiere sonder speziell dafür, dass Ihr mir (und allen anderen Experimentatoren) so oft den den Arsch rettet habt!

Eine riesengroße Portion Dank schulde ich meinen Arbeitskollegen (nicht Freunden – ganz wichtig ;)) aus dem Institut ! Ein so großer Zusammenhalt ist denke ich, nicht mehr allzu häufig zu finden! Ich danke Euch für eure Unterstützung, eure Geduld, eure motivierenden Gespräche weiter zu machen, eure offenen Ohren für die kleinen und großen Probleme des alltäglichen Lebens und für die – trotz der ganzen Tränen - vielen Lacher der letzten Jahre! Ich danke Euch, dass ihr mich auf dieser Achterbahn der Emotionen begleitet habt!

Dieser Dank geht auch an die Leute, die uns in der Zwischenzeit verlassen haben!

Liebe Martina, - Perle und Mutti des Instituts – ohne Dich könnten wir nicht machen; danke dir!

Lieber Kevin, ich danke dir dafür, dass Du mich auf diesem Weg begleitet und mich fortwährend motiviert hast!

Am meisten zu danken habe ich jedoch, wie bereits in meiner Diplomarbeit auch, meiner Familie! Ihr könnt es euch zwar nicht aussuchen, aber *Danke*, dass ihr mich in dieser Zeit ertragen habt. *Danke* für Eure Motivation und nie endende Unterstützung! *Danke* Mama !

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige, fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ an der Heinrich – Heine - Universität Düsseldorf erstellt worden ist.

Alle Stellen, die aus anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entsprechend übernommen wurden, habe ich mit Quellenangaben kenntlich gemacht.

Düsseldorf im July

Meike Klier