

Aus der
Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Hubert Schelzig

Rolle und Bedeutung der Phospholipase D1 in
Inflammation und Sepsis

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Marc-André Urbahn
2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Margitta Elvers

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Sebastian Wesselborg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Urbahn, M. A.*, Kaup, S. C.*, Reusswig, F.*, Kruger, I., Spelleken, M., Jurk, K., Klier, M., Lang, P. A. & Elvers, M. 2018. Phospholipase D1 regulation of TNF-alpha protects against responses to LPS. *Sci Rep*, 8, 10006.

Klier M, Gorressen S, Urbahn MA, Barbosa D, Ouwens M, Fischer JW, Elvers M. Enzymatic Activity Is Not Required for Phospholipase D Mediated TNF- α Regulation and Myocardial Healing. *Front Physiol*. 2018 Nov 29;9:1698.

* gleichwertiger Beitrag der Autoren

Zusammenfassung

Die Sepsis ist eine schwere systemische Entzündungsreaktion als Komplikation einer unkontrollierten lokalen Infektion durch eindringende Mikroorganismen, innerhalb derer die gramnegativen Bakterien die häufigste Erregergruppe darstellen. Die Interaktion des bakteriellen Endotoxins Lipopolysaccharid mit dem Toll-like-Rezeptor 4 der Phagozyten stimuliert das Immunsystem des Wirtes zur Abwehr der eindringenden Pathogene. Hierbei kommt es über die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege zur Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α). Exzessive systemische TNF- α -Konzentrationen können über die Ausbildung eines sogenannten Zytokinsturms zur Ausbildung eines septischen Schocks sowie einer überschießenden Aktivierung des Gerinnungssystems, in Form einer disseminierten intravasalen Verbrauchskoagulopathie, führen. Die Folge sind Mikrozirkulationsstörungen sowie Organdysfunktion und letztlich das Multiorganversagen.

Die Phospholipase D1 (PLD1) ist ein Enzym, das die Spaltung von Phosphatidylcholin in Phosphatidsäure und Cholin katalysiert. PLD1 selbst sowie Phosphatidsäure als *second messenger* sind an der Steuerung verschiedenster Zellprozesse, u.a. Vesikeltransport, Signaltransduktion und Zellproliferation, beteiligt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von PLD1 auf die LPS-induzierte Inflammation und Sepsis untersucht. PLD1-defiziente Mäuse zeigten nach LPS-Applikation 50% reduzierte TNF- α -Serumspiegel, die durch eine reduzierte Genexpression von TNF- α bedingt ist. Der Verbrauch von Thrombozyten im Rahmen der disseminierten intravasalen Verbrauchskoagulopathie war vermindert. In der Folge zeigten *Pld1*^{-/-}-Tiere im septischen LPS-Schockmodell eine signifikant höhere Überlebensrate.

In vitro konnte eine veränderte Signaltransduktion in LPS-stimulierten embryonalen *Pld1*^{-/-}-Mausfibroblasten nachgewiesen werden. Hier konnte gezeigt werden, dass PLD1 die Phosphorylierung von ERK1/2 des MAP-Kinase-Weges moduliert und die Expression von TNF- α nach LPS-vermittelter Stimulation von TLR4 steuert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PLD1 eine wichtige Rolle in der experimentell durch LPS ausgelösten Inflammation und Sepsis spielt. PLD1 könnte daher ein pharmakologischer Angriffspunkt in der Therapie und Prävention der Sepsis, aber auch im Kontext chronisch-entzündlicher Systemerkrankungen sowie immunsuppressiver Therapien, darstellen.

Summary

Sepsis is a severe systemic inflammatory disorder caused by an uncontrolled local infection of invading microorganisms, within gramnegative bacteria are the most frequently pathogens. The interaction of bacterial endotoxin lipopolysaccharid and the toll-like-receptor 4 of phagocytes stimulates the defense of the immune system against invading pathogens. Due to activation of several intracellular signalling pathways the expression and release of proinflammatory cytokines, e.g. tumor necrose factor α (TNF- α), are increased. Excessive systemic TNF- α concentration leads to the development of a cytokine storm, a septic shock and a exuberant activation of coagulation. The consequences are disorder of microcirculation and organ failure resulting in multiorgan dysfunction.

Phospholipase D1 (PLD1) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of phosphatidylcholine (PC) to phosphatidic acid (PA) and choline. PLD1 itself and PA as second messenger are involved in many cellular processes, including vesicle trafficking, receptor signaling and cell proliferation.

In this study the role of PLD1 in LPS-induced inflammation and sepsis was analyzed. PLD1-deficient mice showed a 50% decreased TNF- α serum level after challenging with LPS, due to a reduced TNF- α gene expression. The consumption of platelets within the disseminated intravascular coagulopathy was decreased. Subsequently $Pld1^{-/-}$ -mice showed a significant improved survival rate in septic shock.

In vitro an altered signal transduction in LPS-stimulated embryonic $Pld1^{-/-}$ -mouse fibroblasts was verified. In detail, PLD1 modulates the phosphorylation of ERK1/2 of the MAP-Kinase-signaling pathway and thus regulates the expression of TNF- α after LPS induced stimulation of TLR4.

In summary, PLD1 plays a critical role in LPS-induced inflammation and sepsis. Thus, PLD1 might be a promising pharmacological target in prevention and therapy of sepsis.

Furthermore, PLD1 might be an important modulator of inflammatory response in different diseases with chronic inflammation and perhaps its inhibition could be used in immunosuppressive therapy.

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AP-1	Activator protein 1
AT III	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8
CR3	complement receptor 3
CRP	C-reaktives Protein
CTRL	Kontrollgruppe
DAG	Diacylglycerin
Dest.	Destilliert
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle Medium (Zellkulturmedium)
DIC	Disseminierte intravasale Verbrauchskoagulopathie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK1/2	Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FIPI	5-fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (PLD Inhibitor)
g	Gramm/g-Kraft

Abkürzungsverzeichnis

GCS	Glasgow coma scale
GTP	Guanosintriphosphat
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
ICAM2	Intercellular adhesion molecule 2
IKK	I κ B α -Kinase-Komplexes
IκBα	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 receptor (IL-1R) associated kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinases
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
mA	milliAmpère
MAP	Mittlerer arterieller Druck/ Mitogen-activated protein
MAPK	MAP-Kinase
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MD2	Lymphocyte antigen 96
MEF	Embryonaler Mausfibroblast
MEK	MAPK/ERK Kinase
mg	Milligramm
MKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmhg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88

NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
P38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PA	Phosphatidsäure
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI4P5K	Phosphatidylinositol-4-phosphat 5-kinase
Plid1/PLD1	Phospholipase D1
Plid2/PLD2	Phospholipase D2
PRR	Pattern Recognition Receptors
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
SAPK	stress-activated phospho-kinases
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
TAK1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TIRAP	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
TLR4	Toll-like-Receptor 4
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TRAF	TNF receptor associated factor

WB	Western Blot
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Sepsis und septischer Schock – Definition und Diagnostik	1
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Pathophysiologie	2
1.1.3 Lokale Infektion – LPS und CD14/TLR4-Rezeptor	2
1.1.4 MyD88-abhängige proinflammatorische Signalkaskade	3
1.1.5 Effektororgane und adaptive Immunantwort	5
1.1.6 TNF- α - und CXCL8-vermittelte Chemotaxis	7
1.1.7 Zytokin-induzierte Aktivierung der Hämostase	8
1.1.8 Ausbildung der Sepsis und des septischen Schocks.....	10
1.1.9 Disseminierte intravasale Verbrauchskoagulopathie und Multiorganversagen	12
1.1.10 Aktuelle Leitlinien-Therapie	14
1.2 Phospholipase D1.....	16
1.2.1 PLD1, FIPI und Hämostase	17
1.2.2 PLD1 und Entzündungsmediatoren	18
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Zellbiologische Methoden	20
2.1.1 Isolation von embryonalen Mausfibroblasten (MEF).....	20
2.1.2 Passagieren der Zellen.....	21
2.1.3 Zellzählung	22
2.1.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen	23
2.1.5 Stimulation der Zellen mit LPS	24
2.2 Tierexperimentelle Methoden	25
2.2.1 Mausmodell	25
2.2.2 Induktion von Inflammation und septischem Schock	25
2.2.3 Gewinnung und Aufbereitung von Blutproben	26

2.2.4 Organentnahme.....	27
2.3 Proteinchemische Methoden	27
2.3.1 Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA).....	27
2.3.2 SDS-Page und Western Blot	28
2.4 Molekularbiologische Methoden	30
2.4.1 RNA-Isolierung aus Organen.....	30
2.4.2 RNA-Konzentrationsbestimmung und cDNA-Synthese	31
2.4.3 Quantitative Echtzeit-PCR	32
2.5 Zählung der Thrombozyten.....	34
2.6 Statistische Auswertung	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Tierexperimentelle Untersuchungen	35
3.1.1 Zytokinspiegel im Serum nach LPS-Stimulation	35
3.1.2 TNF- α -Genexpression in der Leber	37
3.1.3 Überlebensrate im D-Galaktosamin/LPS-Sepsismodell.....	38
3.1.4 Überlebensrate im LPS-Sepsismodell	39
3.1.5 Disseminierte intravasale Verbrauchskoagulopathie	40
3.2 Zellbiologische Untersuchungen.....	41
3.2.1 TNF- α -Sekretion von MEFs nach LPS-Stimulation.....	42
3.2.2 TNF- α -Sekretion FIPI-vorbehandelter MEFs nach LPS-Stimulation.....	43
3.2.3 Untersuchungen des MAPK-Weges in MEFs nach LPS-Stimulation.....	45
4 Diskussion	47
4.1 Einfluss von PLD1 auf die LPS-induzierte Zytokinausschüttung	47
4.2 PLD1 verstärkt die TNF- α -Genexpression.....	48
4.3 PLD1 beeinflusst den MAPK-ERK1/2-Signalweg	49
4.4 Wirkung von FIPI auf PLD1 und die TNF- α -Sekretion	50
4.5 Outcome im septischen Schock bei PLD1-Defizienz.....	50
4.6 PLD1 und die disseminierte intravasale Verbrauchskoagulopathie	52
4.7 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse und Ausblick	53
5 Literaturverzeichnis	55
6 Danksagung	57

1 Einleitung

1.1 Sepsis und septischer Schock – Definition und Diagnostik

Bei der Sepsis handelt es sich um eine schwerwiegende Komplikation einer Infektionskrankheit, bei der es durch eine dysregulierte Immunreaktion zur lebensbedrohlichen Schädigung der wirtseigenen Organe und Gewebe kommt. [1] Die Diagnose der Sepsis wird nicht anhand eines einzelnen Parameters, sondern anhand mehrerer Kriterien gestellt. [2] Seit 2016 wird für die Diagnose der Sepsis der sogenannte *Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score* (SOFA) angewendet. [1] Dieser bewertet folgende Organfunktionen:

- Respiration (Horowitz-Koeffizient (paO_2/FiO_2))
- Gerinnung (Thrombozytenzahl)
- Leberfunktion (Bilirubin)
- Herz-Kreislauf-Funktion (MAP oder Gabe von Vasopressoren)
- ZNS (Glasgow coma scale)
- Nierenfunktion (Serumkreatinin oder Urinausscheidung)

Hierbei werden die Organfunktionen im Verlauf der Infektion beurteilt und mit 1 bis 4 Punkten bewertet. Wenn der Gesamtpunktwert um ≥ 2 Punkte ansteigt, gilt die Sepsis als wahrscheinlich. Der septische Schock beschreibt die stärkste Ausprägung der Sepsis, bei der es zu einer kardiovaskulären Instabilität mit resultierenden Gewebeischämien und schweren Organdysfunktionen kommt. Die Diagnose eines septischen Schocks wird durch die im Folgenden genannten Faktoren gestellt: [1]

Trotz adäquater Volumentherapie kommt es neben den Symptomen der Sepsis zu:

- Persistierender Hypotension mit der Notwendigkeit des Einsatzes von Vasopressoren, um den mittleren arteriellen Druck (MAP) über 70 mmHg zu halten und/oder
- einem Anstieg des Serumlaktatspiegels auf über 2 mmol/L. [1]

1.1.1 Epidemiologie

Die Gesamtinzidenz der Sepsis sowie des septischen Schocks in deutschen Krankenhäusern wird auf rund 154.000 Patienten pro Jahr geschätzt. Die Akutmortalität, ungeachtet des Schweregrades der Sepsis, liegt im Schnitt bei rund 39 % - beim septischen Schock sind es bis zu 55 %. [3] [4]

Jährlich sterben etwa 60.000 Menschen in Deutschland an den Folgen des Syndroms (168 Menschen/Tag). Neben der hohen Mortalität wird auch ein kontinuierlicher Anstieg der Inzidenz beobachtet, der auf den demographischen Wandel der Gesellschaft zurückgeführt wird. [5] Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der intensiven Forschung zur Verbesserung des *Outcomes* bei betroffenen Patienten.

1.1.2 Pathophysiologie

Der Sepsis liegt definitionsgemäß eine Infektion zugrunde, die durch Pathogene aller Art verursacht werden kann. [6] Entscheidend für die Ausbildung einer Sepsis ist die unkontrollierte, lokale Infektion, die durch systemisches Eindringen des Pathogens bzw. seiner Toxine zu einer potentiell lebensbedrohlichen Erkrankung wird. [7]

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit der Pathophysiologie der Sepsis bei Infektion mit gramnegativen Bakterien, innerhalb derer *E. coli* der häufigste Erreger ist. [8] Um die Pathophysiologie der Sepsis besser verstehen zu können, wird in den folgenden Abschnitten zunächst die Primärantwort des angeborenen Immunsystems auf eine lokale Infektion dargestellt, um im Anschluss zu erläutern, warum diese Mechanismen bei unkontrollierter Infektion zur Organdysfunktion führen können.

1.1.3 Lokale Infektion – LPS und CD14/TLR4-Rezeptor

Sobald gramnegative Bakterien die mechanischen Barrieren des Organismus überwunden haben, kommt es durch Kontakt mit den Zellen des angeborenen Immunsystems zu einer ersten Immunantwort. [6] Phagozyten, wie gewebsständige Makrophagen und dendritische Zellen, erkennen fremde Oberflächen- sowie Zellbestandteile des eingedrungenen Pathogens

(Pathogen-associated molecular pattern, PAMP) mithilfe dafür spezifischer Rezeptoren (Pattern recognition receptor, PRR). [6, 9] Durch Bindung des PAMP kommt es durch Aktivierung des Phagozyten zu einer veränderten Genexpression und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, die den ersten Schritt in der Induktion einer angeborenen Immunantwort, die auch die Grundlage für die Generierung einer adaptiven Immunantwort darstellt, zur Folge hat. [10]

Die PRR stellen eine heterogene Gruppe von membranständigen, zytoplasmatischen und endosomalen Rezeptoren dar. Die am besten untersuchten PRR gehören zur Toll-like-Rezeptor-Familie, von denen mehr als zehn Vertreter bislang beschrieben wurden. [11] Der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) ist ein membranständiger Rezeptor für die Erkennung des für gramnegative Bakterien wie *E. coli* spezifischen Endotoxins Lipopolysaccharid (LPS). Mithilfe der Kofaktoren *myeloid differentiation factor 2* (MD2) sowie *Cluster of differentiation 14* (CD14) kommt es bei Bindung des für gramnegative Bakterien charakteristischen LPS zur Dimerisierung des Rezeptors und damit zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade. Dies führt u.a. zur Aktivierung des sogenannten MyD88 (Myeloid-differentiation-primary-response-gene-88) -abhängigen Signalwegs. [9, 11]

1.1.4 MyD88-abhängige proinflammatorische Signalkaskade

Die LPS-induzierte Dimerisierung des TLR4 führt intrazellulär über das Adapterprotein MyD88 in Zusammenspiel mit dem *TIR-domain-containing-adaptor-protein* (TIRAP) zur Aktivierung eines intrazellulären Signalweges. Hierbei kommt es, wie in Abb. 1.1 schematisch dargestellt, zur nachfolgenden Phosphorylierung verschiedener Kinasen, u.a. *Interleukin-1R-associated-kinase-4* (IRAK4), *Interleukin-1R-associated-Kinase-1* (IRAK1), *Interleukin-1 receptor-associated kinase-like 2* (IRAK2) *Tumor-necrose-factor-receptor-associated-factor-6* (TRAF6) sowie *transforming growth factor-activating kinase 1* (TAK1). [12]

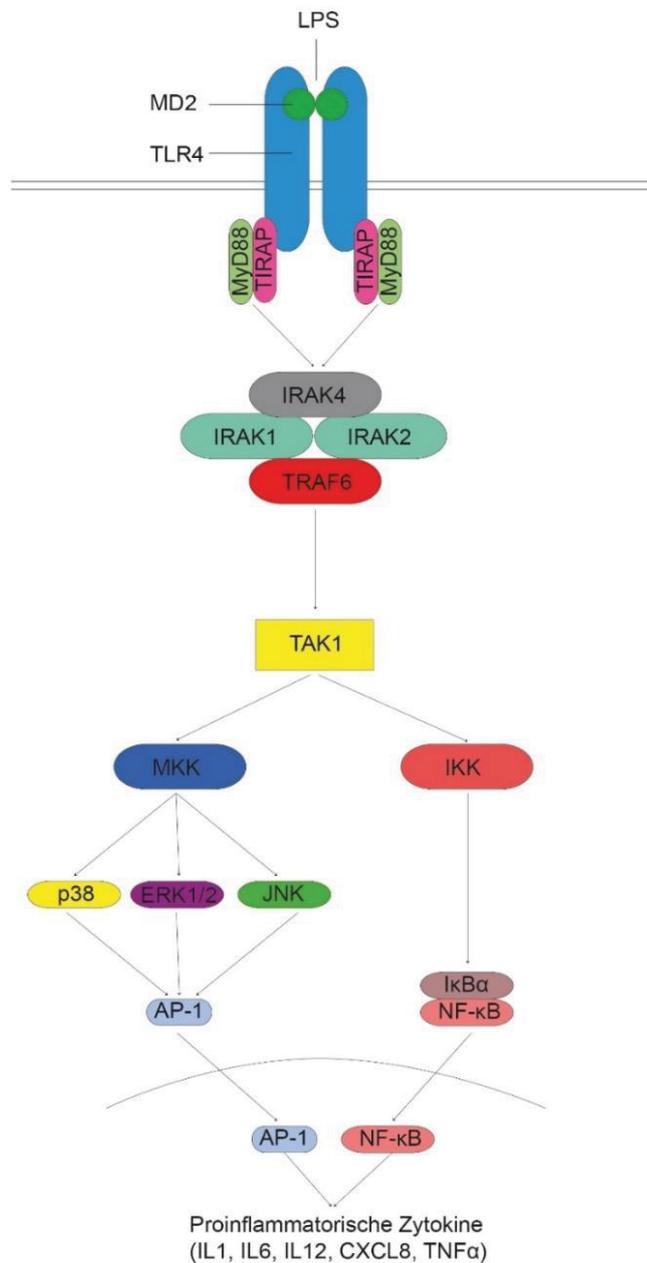


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der MyD88-abhängigen proinflammatorischen Signalkaskade nach Bindung von LPS an den TLR4-Rezeptor.

AP-1 activator protein-1, ERK1/2 Extracellular-signal Regulated Kinases 1/2 , IKK IκB kinase, IκBα nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor- alpha, IRAK1 IL-1R-associated-Kinase-1, IRAK2 Interleukin-1 receptor-associated kinase-like 2, IRAK4 IL-1R-associated-kinase-4, JNK c-Jun N-terminale Kinasen, LPS Lipopolysaccharid, MD2 myeloid differentiation factor 2, MKK MAP kinase kinase, MyD88 myeloid-differentiation-response-gene-88, NF-κB nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, p38 p38-mitogenaktivierte Proteinkinase, TAK1 transforming growth factor-activating kinase 1, TIRAP TIR-domain-containing-adapter-protein, TLR4 toll-like receptor 4, TRAF6 Tumor-necrose-factor-receptor-associated-factor-6.

Letztlich kann das durch Phosphorylierung von TAK1 ankommende Zellsignal in zwei Endstrecken weitergeleitet werden. Die Erste führt über eine Aktivierung des IKK-Komplexes durch Degradierung von I κ B α (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha) zur Freisetzung des gebundenen NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells). [12] Dieser wirkt nach Translokation in den Zellkern als Transkriptionsfaktor und führt zur erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL1), Interleukin-6 (IL6), Interleukin-12 (IL12) sowie des Chemokins CXCL8. [6]

TAK1 kann neben IKK auch den mitogen-activated-kinase-Signalweg (MAPK) aktivieren. Der MAPK-Weg wirkt über drei verschiedene Endstrecken; den p38-Weg, den c-Jun-N-terminale-Kinasen (JNK)-Weg und den ERK1/2-Weg. Durch die Aktivierung dieser Wege kommt es in stimulierten Phagozyten ebenfalls zu einer Erhöhung der Genexpression der oben genannten, proinflammatorischen Zytokine. Hierbei spielt unter anderem die Translokation von activator-protein-1 (AP-1) in den Nucleus eine zentrale Rolle. [12]

1.1.5 Effektororgane und adaptive Immunantwort

Die durch aktivierte Makrophagen freigesetzten proinflammatorischen Zytokine wirken nach Übertritt ins Blut an verschiedenen Organsystemen. (Abb. 1.2) Es kommt in der Leber durch TNF- α , IL1 sowie IL6 zur Produktion der Akute-Phase-Proteine C-Reaktives-Protein (CRP) und Mannose-bindendes Lektin (MBL), die – anders als die Immunglobuline der Plasmazellen – unspezifisch als Opsonine für eingedrungene Pathogene dienen. Daneben fungieren die Zytokine als Pyrogene und initiieren im Hypothalamus die Erhöhung der Körpertemperatur. Ein weiterer Effekt der proinflammatorischen Zytokine ist die Freisetzung großer Mengen von Leukozyten aus dem Knochenmark, insbesondere von neutrophilen Granulozyten, die zu einer messbaren Leukozytose führt. Dieser Vorgang dient der Mobilisierung von immunkompetenten Zellen an den Ort der Entzündung. [7]

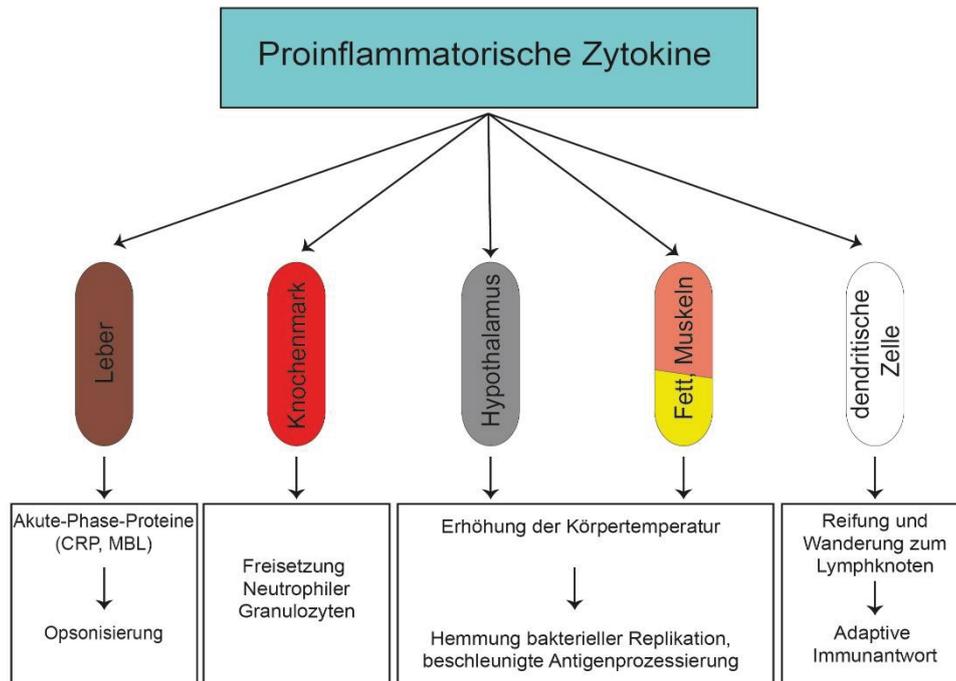


Abb. 1.2: Effekte der proinflammatorischen Zytokine auf verschiedene Effektororgane bzw. Zellen. CRP C-Reaktives Protein, MBL mannosebindendes Lektin

Quelle: in Anlehnung an Murphy, K.M., et al., Janeway - Immunologie. 7. Aufl. ed. 2009, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. S. 119

Neben der Ausschüttung der Zytokine kommt es durch TLR4-Aktivierung mit nachfolgender Signaltransduktion in naiven, dendritischen Zellen zu einer Reihe von Veränderungen. Dendritische Zellen filtern im Ruhezustand durch Makropinozytose die Umgebung zur Detektion von Antigenen. Nach Aktivierung durch LPS kommt es zur Beendigung dieses Vorgangs. Bei Stimulation durch sezerniertes $\text{TNF-}\alpha$ der Makrophagen bewegen sich Dendritische Zellen aktiv über die Lymphgefäße in Richtung des nächstgelegenen Lymphknotens. Währenddessen kommt es zur Expression der kostimulierenden Moleküle CD80 sowie CD86, die in die Membran der Zellen integriert werden. Diese sind obligat für die antigenpräsentierende Funktion mit nachfolgender Aktivierung der naiven CD4-T-Lymphozyten, deren Oberflächenprotein CD28 mit CD80/86

interagiert. Die Bindung von bakteriellen PAMP durch Zellen des angeborenen Immunsystems legt daher den Grundstein für die Induktion einer adaptiven Immunantwort. [10, 13]

1.1.6 TNF- α - und CXCL8-vermittelte Chemotaxis

Die von den Phagozyten sezernierten Zytokine initiieren eine lokale Entzündungsreaktion, um weitere Immunzellen, insbesondere Monozyten und neutrophile Granulozyten, zum Ort der Infektion zu locken. Die Freisetzung von TNF- α führt zur Aktivierung des Endothels der versorgenden Kapillaren. Es kommt zur Vasodilatation und damit verbunden zur Verlangsamung des Blutflusses sowie zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Die endothelialen Zellen integrieren Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, das in der Granula der Weibel-Palade-Körperchen gespeichert ist, sowie zeitlich verzögert E-Selektin in die luminalen Seite der Zellmembran. Durch Interaktion mit den oberflächlichen Sialyl-Lewis-Einheiten der Leukozyten kommt es zur sogenannten rollenden Adhäsion, wodurch die intravasale Bewegung der Leukozyten gebremst wird. TNF- α bewirkt darüber hinaus die Bildung der endothelialen Integrine ICAM-1 und ICAM-2. [7]

Das von Makrophagen sezernierte CXCL8 wird luminal an Proteoglykane der Endothelzellen gebunden und stimuliert nach Kontakt mit den rollenden Leukozyten deren Expression von LFA-1 sowie CR3. Infolge fester Bindung von leukozitärem LFA-1 und CR3 an endotheliale ICAM-1-Moleküle kommt es zum Durchtritt der Immunzellen durch das Endothel (Diapedese). Zeitgleich kommt es durch die entstehende, erhöhte Gefäßpermeabilität zum Austritt von intravasaler Flüssigkeit. Die Immunzellen wandern in der Folge entlang des CXCL8-Konzentrationsgradienten an den Ort der Entzündung, um dort ihre Aufgabe als Phagozyten zu entfalten und das eindringende Pathogen zu eliminieren. [7]

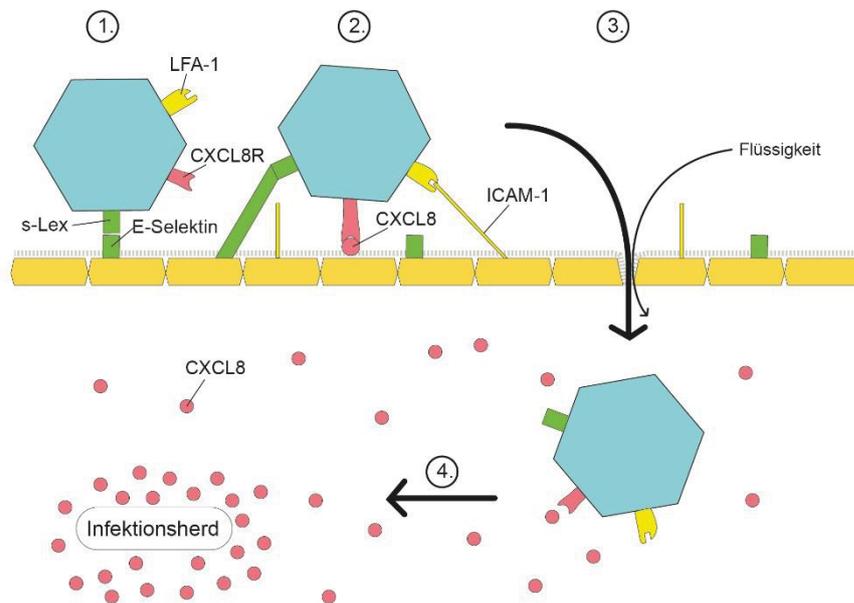


Abb. 1.3: Zytokin-vermittelte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten an den Ort der Entzündung. 1. Rollende Adhäsion durch Bindung von Sialyl-Lewis-Einheiten der Granulozyten an P-/E-Selektin des Endothels. 2. Durch Kontakt von CXCL8 mit spezifischen leukozytären Rezeptoren kommt es zur festen Bindung von Integrinen (wie zB. LFA-1) an endotheliale ICAM-1-Moleküle, deren Bildung durch sezerniertes TNF α der aktivierten Makrophagen stimuliert wird. 3. Diapedese der Leukozyten durch das Endothel sowie erhöhte Permeabilität der Gefäßwand mit Austritt von Flüssigkeit 4. Wanderung entlang des CXCL8-Gradienten an den Ort der Entzündung.

Quelle: in Anlehnung an Murphy, K.M., et al., Janeway - Immunologie. 7. Aufl. ed. 2009, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. S. 115

1.1.7 Zytokin-induzierte Aktivierung der Hämostase

Um die Infektion lokal zu begrenzen und eine systemische Ausbreitung über die Blutbahn zu verhindern, kommt es im Zuge der lokalen Entzündungsreaktion zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems. [14] Über die Bildung von Mikrothromben in den Kapillaren soll der Übertritt des Pathogens ins Gefäßsystem und die Dissemination über die Blutbahn verhindert werden. [7] Die Ausschüttung von TNF- α und IL1 β durch Gewebsmakrophagen führt sowohl in den aktivierten Endothelzellen als auch in den angelockten Monozyten zur Expression von *tissue factor* (TF). Die Komplexbildung von TF

mit dem Gerinnungsfaktor VII erzeugt durch Aktivierung der Gerinnungskaskade Thrombin. Dieses bewirkt neben einer Aktivierung von Thrombozyten die Bildung eines Fibrinnetzes und damit die Ausbildung eines stabilen, roten Thrombus. [15, 16]

Die Hämostase wird physiologisch durch verschiedene antikoagulatorische Systeme reguliert um eine unkontrollierte Blutgerinnung an z.B. unverletzten Stellen des Gefäßsystems zu verhindern. Die drei Hauptsysteme dieser Regulation sind das Protein-C-System, das Antithrombin (AT) sowie der tissue factor pathway inhibitor (TFPI). [16]

Das auf Endothelzellen exprimierte Thrombomodulin bindet aktiviertes Thrombin und führt zur Aktivierung von Protein C, das die Gerinnungsfaktoren Va sowie VIIIa inaktiviert und so seine antikoagulatorische Wirkung entfaltet. Hierzu benötigt Protein C den Co-faktor Protein S. Durch Einfluss von TNF- α und IL1 kommt es zum einen zur Verminderung von Thrombomodulin auf den Endothelzellen und zum anderen zur Reduktion des Proteins S. Beides resultiert in einer reduzierten Aktivität von Protein C und damit in einer reduzierten Antikoagulation. Im Rahmen einer Sepsis kommt es zudem zur überschießenden Aktivierung mit Verbrauch des Systems und schlussendlich zu dessen Zusammenbruch. [16]

Antithrombin III (AT III) entfaltet seine Wirkung über die Inhibierung von Thrombin und Faktor Xa. Physiologisch wird die Wirkung von AT durch endogene Glykosaminoglykane wie Heparan-Sulfat, das auf Endothelzellen exprimiert wird, verstärkt. Die Synthese von Glykosaminoglykanen wird durch Zytokine während einer akuten Inflammation gehemmt, was zur reduzierten, antikoagulatorischen Aktivität von AT III führt. Durch die beginnende Sepsis kommt es zudem zum Verbrauch von AT III durch die starke Thrombinämie und in der Folge zum Zusammenbruch des Systems. Verstärkt wird dieser Zustand durch reduzierte Neuproduktion bei Ischämie und resultierender Dysfunktion von Hepatozyten. [16]

Das dritte antikoagulatorische System zur Verminderung der Thrombinsynthese ist der tissue factor pathway inhibitor (TFPI). TFPI bindet den TF-FVIIa-Komplex und führt somit zu dessen Inaktivierung. Hierdurch kommt es zu reduzierter

Thrombingenerierung. Die genauen Mechanismen in der akuten Entzündung sind letztlich bislang unverstanden. Es gibt jedoch Hinweise auf einen starken Verbrauch in schwerer Entzündung bzw. Sepsis, was zum Ausfall dieses antikoagulatorischen Systems führt. [17]

1.1.8 Ausbildung der Sepsis und des septischen Schocks

Wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, ist die Voraussetzung für die Entstehung einer Sepsis die unkontrollierte, lokale Infektion. Nach Übertritt eines gramnegativen Keims oder seiner Toxine in die Blutbahn, im Sinne einer Bakteriämie bzw. Toxinämie, löst dies – analog zu den gewebständigen Makrophagen bei der lokalen Infektion – über die Bindung von LPS an den TLR4 der zirkulierenden Monozyten eine Immunantwort aus. Es kommt zu intravasaler Freisetzung großer Mengen proinflammatorischer Zytokine, wodurch weitere Immunzellen stimuliert und zur Sezernierung angeregt werden. Hierbei zeigt sich ein exponentieller Charakter dieser Immunantwort, der auch als *Zytokinsturm* bezeichnet wird. [18]

Durch hohe TNF- α -Serumspiegel kommt es zu diffuser, systemischer Aktivierung des Endothels mit Erhöhung der Gefäßpermeabilität, die wie in Abschnitt 1.1.7 beschrieben, bei lokaler Infektion der Vereinfachung der Extravasation der angelockten Immunzellen dienen soll. Generell geht dies mit Verlusten von Flüssigkeit in den Extravasalraum einher. Durch großflächige Endothelaktivierung kommt es daher zum Austritt von Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem, was man auch als *capillary leak* bezeichnet. [19] Klinisch zeigt sich der intravasale Flüssigkeitsverlust bei septischen Patienten durch Entstehung ausgeprägter, multilokulärer Ödeme sowie einer deutlich negativen Flüssigkeitsbilanz.

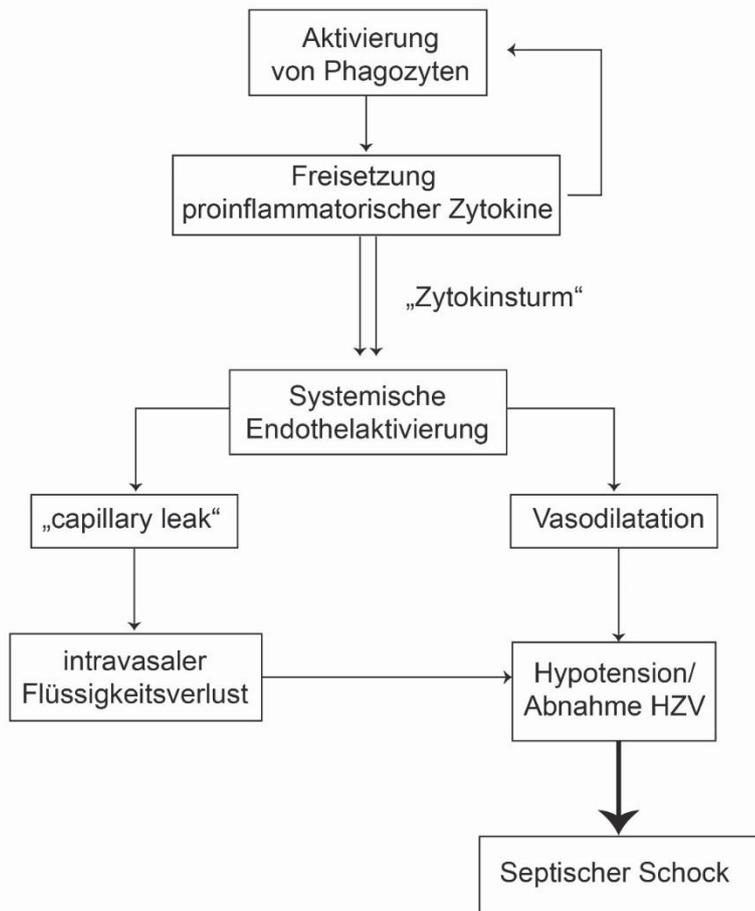


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Entstehung eines septischen Schocks. Die durch das LPS gramnegativer Bakterien stimulierte Phagozyten sezernieren Zytokine, die wiederum Phagozyten aktivieren. Dies führt zur Bildung eines sogenannten Zytokinsturms, der über die Endothelaktivierung und den intravasalen Flüssigkeitsverlust sowie die periphere Vasodilatation zur hämodynamischen Instabilität und zum septischen Schock führt.

Dies führt zur Hypovolämie-bedingten Abnahme des Herzzeitvolumens sowie zur Hypotension. Die Hypotension wird darüber hinaus durch die zytokin-induzierte, periphere Vasodilatation, die bei der lokalen Infektion der Verlangsamung des Blutflusses im infizierten Gewebe dient, weiter verstärkt. Die Veränderungen der Hämodynamik führen letztlich zur Entstehung eines septischen Schocks mit verminderter Perfusion peripherer Gewebe und Organe. [19] Durch Auftreten einer Gewebehypoxie und konsekutiver Ischämie kommt es zur Bildung von Laktat, das als diagnostischer Parameter für den

septischen Schock laborchemisch gemessen werden kann. [1] Unbehandelt führt dieser Zustand zum lebensbedrohlichen Gewebeuntergang.

1.1.9 Disseminierte intravasale Verbrauchskoagulopathie und Multiorganversagen

Der Gewebeuntergang wird durch eine schwerwiegende Gerinnungsstörung, der sogenannten disseminierten intravasalen Verbrauchskoagulopathie (DIC), die durch hohe Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine induziert wird, verstärkt. (Abb. 1.5) Durch zytokin-vermittelte Expression von TF in aktivierten Monozyten soll in lokalen Infektionen das Pathogen durch einen Thrombus an der Expansion über das Gefäßsystem gehindert werden. Große TNF- α -Serumspiegel führen zur diffusen Aktivierung von Monozyten und Endothelzellen und deren Bildung von TF. Entscheidend für die Entwicklung von Thromben ist jedoch darüber hinaus das Versagen der anti-koagulatorischen Kontrollmechanismen. [16]

Das Resultat aus dem Überwiegen der prokoagulatorischen Effekte ist die Bildung großer Mengen löslichen Fibrins. Durch Präzipitation von Fibrinpolymerern im Endstromgebiet des Gefäßsystems kommt es zu schweren Störungen der Mikrozirkulation, die in Kombination mit dem Versagen der adäquaten Gewebepfusion durch Gewebeuntergang den Motor des beginnenden Multiorganversagens darstellt. [16]

Durch die überschießende Aktivierung des Gerinnungssystems kommt es im Zuge der manifesten DIC zum Verbrauch großer Mengen von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten. Das Resultat ist eine im Verlauf erhöhte Blutungsneigung. Dies kann zu diffusen mikrovaskulären Blutungen in allen Geweben des Körpers führen. [16]

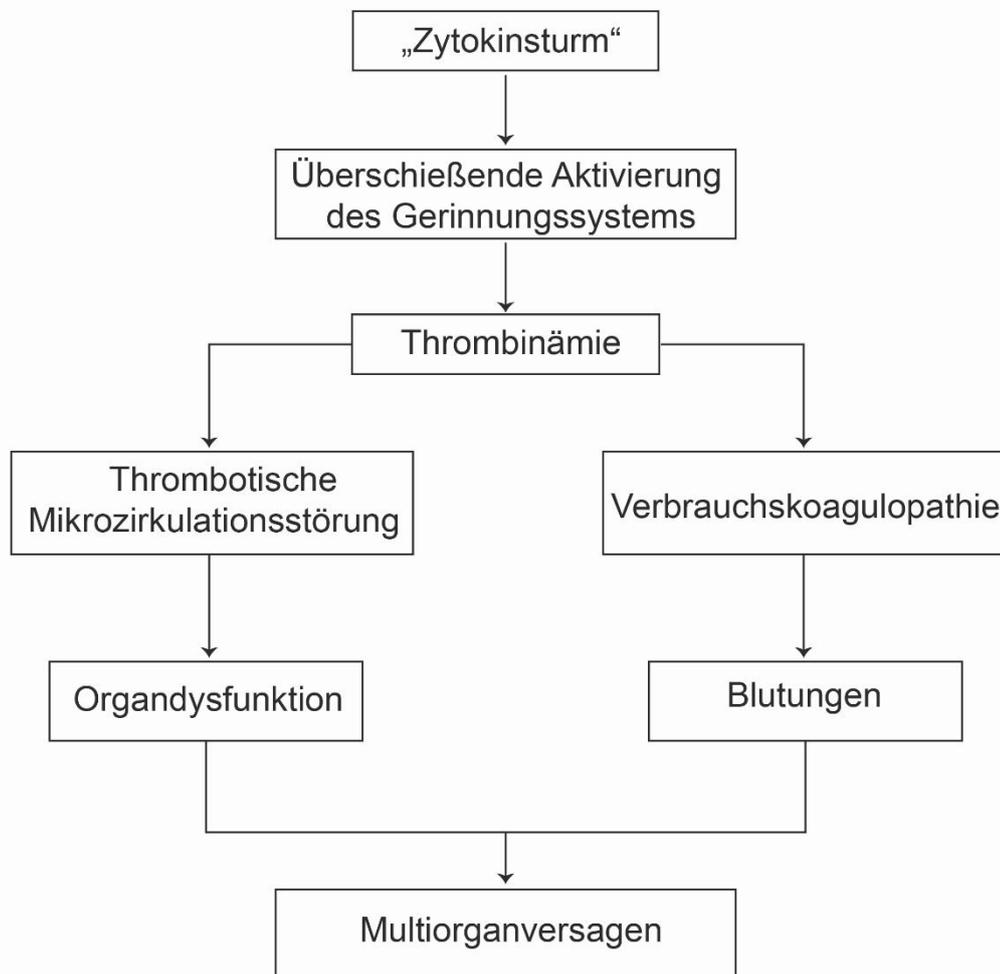


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Disseminierten, intravasalen Verbrauchskoagulopathie (DIC). Die durch den Zytokinsturm bedingte überschießende Aktivierung des Gerinnungssystems führt zu einem über die Thrombinämie zur Bildung großer Mengen Fibrinpolymere mit resultierender Mikrozirkulationsstörung. Zum anderen kommt es durch den Verbrauch zahlreicher Gerinnungsfaktoren zur erhöhten Blutungsneigung. Dies stellt die Grundlage des Sepsis-induzierten Multiorganversagens dar.

1.1.10 Aktuelle Leitlinien-Therapie

Die Therapie der Sepsis sollte unmittelbar nach Diagnosestellung beginnen, da jede Verzögerung zu einer signifikant erhöhten Letalität des Patienten führt. Grundsätzlich basiert die Therapie auf vier verschiedenen Säulen: der Fokussanierung, der antimikrobiellen Therapie, der supportiven und der adjunktiven Therapie. (Abb. 1.6) [20]

Die Fokussanierung dient der Eliminierung der Infektionsquelle, um die Ausbreitung der Pathogene sowie deren Toxine einzudämmen. Dies kann beispielsweise die Entfernung infizierten Fremdmaterials, die Spaltung und Ausräumung eines Abszesses, das operative Wunddebridement bis hin zu einer Amputation oder die Sanierung insuffizienter Anastomosen, z.B. bei Darmresektionen, sein. Nach Abnahme von Blutkulturen sollte unmittelbar nach Diagnosestellung mit der antimikrobiellen Therapie begonnen werden, die die zweite Säule der Sepsis-Therapie darstellt. [20]

Ein weiterer elementarer Baustein bildet die supportive Therapie mit der Kontrolle Sepsis-assoziiertes Dysfunktionen, wie z.B. Hypovolämie und Hypotension. Die hämodynamische Stabilisierung sollte durch eine adäquate Volumentherapie erfolgen, um eine Minderperfusion der Gewebe zu verhindern. Bei fortbestehender Hypotension, trotz Volumentherapie, kommen darüber hinaus Katecholamine zum Einsatz. Bei Entstehung eines Acute lung injury (ALI)/ acute distress respiratory syndrome (ARDS) oder akuten Nierenversagens muss eine maschinelle Beatmung sowie ein intermittierendes oder kontinuierliches Nierenersatzverfahren erwogen werden. [20]

Die letzte Säule stellt die adjunktive Therapie dar. Diese versucht in verschiedene Teilbereiche der Genese der Sepsis einzugreifen. Viele der adjunktiven Therapieansätze konnten bislang jedoch keinen positiven Effekt auf das *Outcome* in der Sepsis zeigen. Auch der zunächst positiv angenommene Effekt einer Immunmodulation durch intermittierende Gabe von Glucocorticosteroiden (z.B. 200-300 mg Hydrocortison/Tag) konnte durch eine internationale, multizentrische, randomisierte Studie (Corticosteroid therapy of septic shock, CORTICUS) widerlegt werden. [20]

Ebenso konnte der Versuch der Optimierung der dysregulierten Hämostase durch Gabe von rekombinantem aktiviertem Protein C nur bei bestimmten Subpopulationen eine leichte Verbesserung des Outcomes zeigen. Die Gabe von Antithrombin zeigt hingegen keinen therapeutischen Nutzen. [20]

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es trotz intensiver Forschung bislang an innovativen Therapiekonzepten mangelt und die Kausaltherapie auf Fokussanierung und antimikrobielle Therapie beschränkt ist.

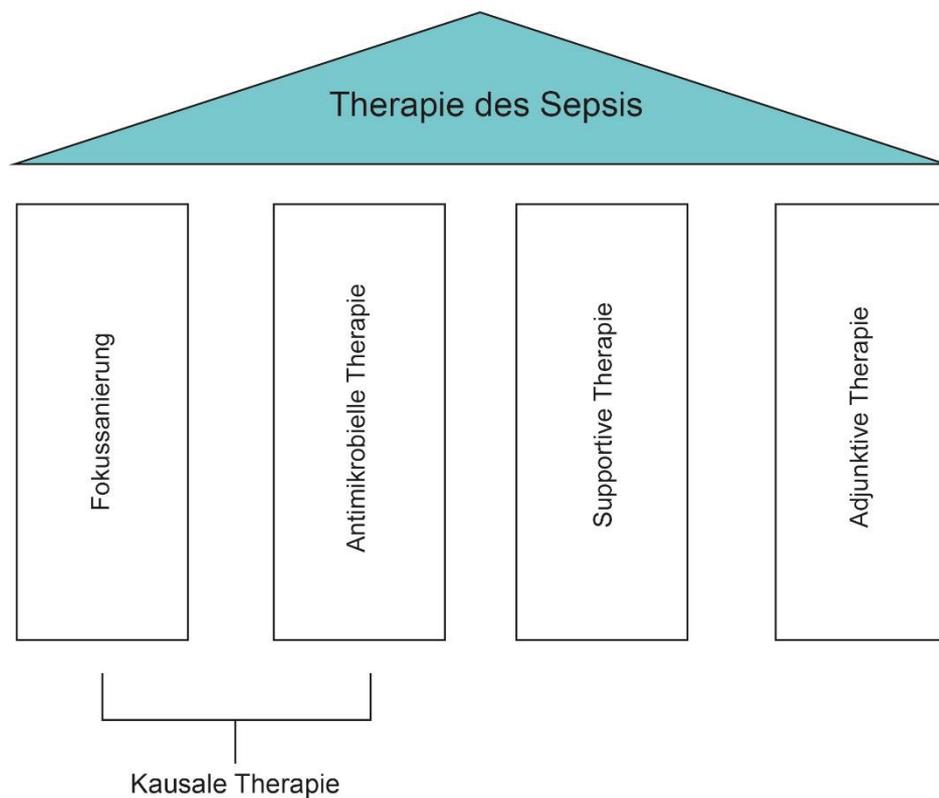


Abb. 1.6: Die vier Säulen der Sepsistherapie.

1.2 Phospholipase D1

Bei der Phospholipase D1 (PLD1) handelt es sich um eine ubiquitär exprimierte Phosphodiesterase aus der Familie der Phospholipasen. PLD1 katalysiert intrazellulär die Spaltung von Glyceropholipiden wie Phosphatidylcholin in Cholin und Phosphatidsäure (PA). PA ist ein sogenannter *lipid second messenger*. [21, 22]

Sowohl PLD1 selbst (über direkte Proteininteraktion) als auch sein katalytisches Produkt PA sind als Signalmoleküle an der Steuerung einer Vielzahl intrazellulärer Prozesse beteiligt, u.a. an Endo- sowie Exozytose, Organisation des Zytoskeletts, Zellproliferation und Zellmigration. Es konnte jedoch im Mausversuch gezeigt werden, dass ein PLD1-Verlust durch Genknockout keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigt. [23]

PLD1 und PA verfügen über ca. 50 bekannte Bindungspartner, über die sie ihre Wirkung entfalten. Hierzu zählen small GTPasen, Phosphoinositide, Proteinkinasen, Phosphatasen, Nucleotide (wie GTP, ATP, cAMP) und Strukturproteine. Signale, die zur Aktivierung von PLD1 oder zur Bildung von PA führen, werden integriert und über nicht vollständig geklärte Mechanismen weitergeleitet oder blockiert. Darüber hinaus sind PLD1 und PA über verschiedene Wege in der Lage, ankommende Signale durch Feedbackschleifen zu amplifizieren. (Abb. 1.7) [24]

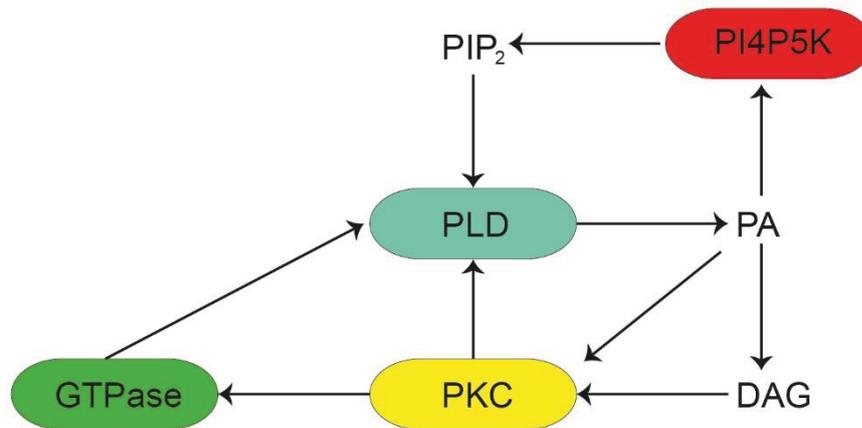


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des PLD-Signal-Netzwerks. PLD1 kann durch verschiedene Signalproteine bzw. -wege wie PI4P5K, PKC und GTPasen aktiviert werden. Darüber hinaus führt die Aktivierung der PLD1 über die Generierung von PA zur Aktivierung ebendieser im Sinne einer positiven Feedbackschleife.

Quelle: In Anlehnung an Jang, J.H., et al., Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog Lipid Res*, 2012. **51**(2): p. 71-81.

1.2.1 PLD1, FIPI und Hämostase

PLD1 hat eine regulatorische Funktion in der Hämostase. Der PLD1-Verlust führt experimentell bei hohen Scherkräften, wie sie in kleinen Arteriolen und stenosierten Gefäßen vorkommen, zu einer reduzierten Adhäsion von Thrombozyten sowie verminderter Stabilität von gebildeten Thromben *ex vivo* und *in vivo*. Elvers et al. konnten zeigen, dass dieser Effekt durch einen Aktivierungsdefekt des Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ begründet ist. [23]

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es bei PLD1-*Knockout*-Mäusen nach Induktion einer Lungenembolie durch intravenöse Applikation von Kollagen in Kombination mit Epinephrin zu einem deutlich verbesserten

Outcome im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt (93% vs. 40% Gesamtüberleben). [23]

Des Weiteren konnte in einem Schlaganfallmodell der Maus gezeigt werden, dass es in *Pld1*^{-/-}-Mäusen zu einem 80% kleineren Infarktareal nach transienter Okklusion der A. cerebri media kommt, ohne die Hämostase zu beeinträchtigen und ein erhöhtes Blutungsrisiko zu induzieren. Diese Beobachtung konnte bei präventiver, pharmakologischer Inhibierung von PLD1/PLD2 durch den unselektiven Inhibitor 5-fluoro-2-indolyl- des chlorhalopemid (FIPI) vor Induktion des Schlaganfalls bestätigt werden. Hierbei wirkt FIPI auf die enzymatische Aktivität von PLD1 und vermindert so die Bildung des second messengers PA, wie Stegner et al. in Thrombozyten zeigen konnten. [25]

1.2.2 PLD1 und Entzündungsmediatoren

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *in vitro* murine *Pld1*^{-/-}-Monozyten nach Stimulation mit LPS eine reduzierte Expression und Ausschüttung von TNF- α gegenüber der Kontrollgruppe zeigen. Darüber hinaus ist die durch LPS-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und die Translokation in den Nucleus in *Pld1*^{-/-}-Monozyten vermindert. Ferner führt die Abwesenheit von PLD1 zu einer verminderten Adhäsion muriner Monozyten an aktiviertes Endothel sowie zu einer reduzierten Chemotaxis. Im Herzinfarktmodell der Maus führen die reduzierte TNF- α -Expression und reduzierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung bei *Pld1*^{-/-}-Mäusen zu einer reduzierten Inflammation nach einem kardiovaskulären Ereignis, was möglicherweise durch ein vermindertes *Remodeling* mit einer eingeschränkteren Herzfunktion und einer vergrößerten Infarktzone einhergeht. [22]

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In der Sepsis spielt die Bildung großer Mengen TNF- α durch Zellen des angeborenen Immunsystems mit nachfolgender überschießender, dysregulierter Immunantwort eine zentrale Rolle. Die Folge ist eine Reihe lebensbedrohlicher Pathologien, die durch additive Wirkung über die Entwicklung eines septischen Schocks zu Ausbildung eines Multiorganversagens und zum Tod des Organismus führen können. Die bisher etablierte Kausaltherapie beschränkt sich auf die Fokussanierung und die antimikrobielle Therapie. Die hohe Prävalenz, steigende Inzidenz und hohe Letalitätsrate bei bislang limitierten Therapieoptionen erfordern intensive Forschung, um neue innovative Therapieansätze zu entwickeln.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Defizienz von PLD1 zu einer reduzierten Expression und Ausschüttung von TNF- α und damit zu einer verminderten Inflammation führt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, welchen Einfluss PLD1 auf den TNF- α -Serumspiegel, die Überlebensrate und die disseminierte intravasale Verbrauchskoagulopathie im Rahmen einer Sepsis hat und ob hierbei weitere Signalwege neben dem NF- κ B-Signalweg durch die PLD1 beeinflusst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Isolation von embryonalen Mausfibroblasten (MEF)

Materialien:

Trypsin-EDTA (Life Technologies Katalognr.: 25300054)

Petrischale (Sarstedt TC-Schale 100, Cell+)

Kulturmedium (Gibco® Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) + 10 % FCS + 1% NEAA, 1 % Penicillin/Streptomycin)

Zellkulturflaschen (Cellstar® Cell Culture Flasks, 50 ml, 25 cm², PS)/
(Cellstar® Cell Culture Flasks, 250 ml, 75 cm², PS)

Sterile Instrumente (Rasierklinge, Pinzette, Schere)

Prozedere:

Die embryonalen Mausfibroblasten wurden aus 12-13 Tage alten Embryonen gewonnen. Die Muttermäuse wurden durch Inhalation von Isofluran betäubt und im Anschluss durch zervikale Dislokation getötet. Durch einen median geführten Bauchschnitt wurde der Uterus herauspräpariert und in eine Petrischale mit PBS überführt. Die Embryonen wurden von Plazenta und Fruchtblase befreit und in einer weiteren mit PBS gefüllten Schale gesammelt. Es folgte die Dekapitation der Embryonen und die Entfernung der durch ihre dunkelrote Farbe erkennbaren thorakalen sowie abdominellen Organe. Die exenterierten Embryonen wurden anschließend in einer Petrischale mit 1 ml Trypsin je Embryo versetzt und mithilfe einer sterilen Rasierklinge zerkleinert. Die Gewebestückchen wurden mit einer Pipette in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Um das Gemisch zu homogenisieren erfolgte abwechselnd eine 5-minütige Inkubation bei 37° C und wiederholtes Auf- und Abpipettieren mittels Stabpipette. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde im Anschluss in 20 ml Kulturmedium aufgenommen, in eine T-25-Zellkulturflasche überführt und im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂

aufbewahrt. Durch Wechsel des Kulturmediums und vorsichtigem Spülen mit PBS konnten am Folgetag größere Gewebestücke und nicht adhärente Zellen aus der Kulturflasche entfernt werden. Die als Monolayer adhärent wachsenden MEFs wurden nach Erreichen von einer ca. 80-prozentigen Konfluenz, wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, abgelöst und in T-75-Kulturflaschen überführt.

2.1.2 Passagieren der Zellen

Materialien:

Trypsin-EDTA (Life Technologies Katalognr.: 25300054)

Zentrifugenröhrchen (Cellstar® Tubes, 15 ml)

Kulturmedium (Gibco© Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) + 10 % FCS + 1% NEAA, 1 % Penicillin/Streptomycin)

Zellkulturflaschen (Cellstar® Cell Culture Flasks, 250 ml, 75 cm², PS)

Prozedere:

Nach erreichter Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium aus der Flasche entfernt, die Zellen mit PBS gespült und je nach Flaschengröße mit 0,05%-Trypsin-EDTA-Lösung dünn beschichtet. Anschließend wurden die Flaschen für 5 bis 10 Minuten inkubiert bis sich makroskopisch der *Zelllayer* löste. Die Zellen wurden nun wiederholt mit einer Stabpipette auf- und abpipettiert, die verbliebenen, an der Flaschenwand haftenden Zellen, abgelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Durch eine Zentrifugation bei 1100 rpm bzw. 194 g über einen Zeitraum von 5 Minuten wurden die Zellen von der Trypsin-EDTA-Lösung getrennt. Der Überstand wurde verworfen und das *Zellpellet* in neuem Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde je nach Anforderung auf Kulturflaschen aufgeteilt bzw. verworfen, um den Zellbestand konstant zu halten.

2.1.3 Zellzählung

Materialien:

PBS (Biofroxx DPBS w/o Calcium and Magnesium, pH 7,3)

Trypan-Blau-Lösung

Neubauerkammer (LO Optik Labor Neubauer improved, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm²)

Prozedere:

Die Zellen wurden vor jedem Experiment gezählt, um eine Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen zu gewährleisten. Hierzu erfolgte zunächst die Lösung der Zellen von der Wand der Kulturflasche und Entfernung der Trypsin-EDTA-Lösung (siehe Abschnitt 2.1.2). Es folgte die Aufnahme des *Zellpellets* in 10 ml PBS. 10 µl der Zellsuspension wurden anschließend mit 10 µl Trypan-Blau in einem 1 ml Reaktionsgefäß vermischt. Es folgte die Auszählung der Zellen mittels Neubauerkammer in 10-facher Vergrößerung. Da die Kammer ein vordefiniertes Volumen besitzt, ließ sich mithilfe folgender Formel die Gesamtzahl der in der ursprünglichen Suspension enthaltenen Zellen bestimmen:

$$X = Z \times VF \times V \times 10^4$$

X: Gesamtzahl der Zellen in der ursprünglichen Suspension

Z: Summe der gezählten Zellen aller Quadranten / vier Quadranten

VF: Verdünnungsfaktor Trypanblau (1:1)

V: Volumen der ursprünglichen Suspension in ml

Im Anschluss wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1100 rpm bzw. 194 g vom PBS getrennt und in die für den Versuch vorgesehene Menge Kulturmedium (siehe Abschnitt 2.1.5) aufgenommen.

2.1.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Materialien:

Kryoröhrchen

FCS

DMSO (Sigma Life Science Dimethyl sulfoxide D4818)

Zellkulturflaschen (Cellstar® Cell Culture Flasks, 50 ml, 25 cm², PS)

Kulturmedium (Gibco© Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) + 10 % FCS + 1% NEAA, 1 % Penicillin/Streptomycin)

Prozedere:

In regelmäßigen Abständen wurden Zellen zur Sicherung der Zelllinie eingefroren und bei Bedarf rekultiviert. Hierzu wurden die Zellen, wie in den Abschnitten 2.1.2 und 2.1.3 beschrieben, abgelöst und gezählt. Ein aus 10⁶ Zellen bestehendes Zellpellet wurde in 1 ml FCS resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Es erfolgte die Hinzugabe von 100 µl Dimethyl sulfoxid (DMSO). Das Reaktionsgefäß wurde zunächst 12 Stunden bei -70° C und im Anschluss in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um die gefrorenen Zellen für weitere Experimente aufzutauen, erfolgte zunächst eine Erwärmung des Kryogefäßes für 2 Minuten im 37° C warmen Wasserbad. Die Zellen wurden im Anschluss ohne weitere Durchmischung zügig in eine T-25-Kulturflasche mit vorgewärmten Kulturmedium überführt. Um die letzten, im Kryogefäß zurückgebliebenen Zellen zu gewinnen, wurde dieses mit 1 ml FCS gespült und der so resuspendierte Zellrest in die Kulturflasche pipettiert. Diese wurde im Anschluss im Inkubator gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen auf ihre Viabilität und Adhärenz hin mithilfe eines Auflichtmikroskops untersucht.

2.1.5 Stimulation der Zellen mit LPS

Materialien:

Kulturmedium (Gibco© Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) + 10 % FCS + 1% NEAA, 1 % Penicillin/Streptomycin)

Mikrotiterplatten (Cellstar® 48 Well Culture Plate Cat.-No. 677180, Cellstar® 96 Well Culture Plate Cat.-No. 650180)

LPS (Sigma Life science Lipopolysaccharide L2630 / E. coli 0111:B4)

FIPI (Sigma Life science FIPO hydrochloride hydrate F5807)

Prozedere:

Die embryonalen Mausfibroblasten wurden zunächst nach dem in Abschnitt 2.1.3 beschriebenen Verfahren ausgezählt. Für die Zytokinmessung mittels ELISA erfolgte die Aufnahme von 10^5 Zellen in 100 μ l Kulturmedium.

Für SDS-PAGE und Western Blotting hingegen wurden 5×10^4 Zellen in 100 μ l Medium gewählt.

100 μ l der jeweiligen Suspension wurden pro Ansatz auf eine 96-well- (für ELISA-Untersuchungen) oder 48-well- (für die Western Blots) Mikrotiterplatte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurden für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mithilfe eines Auflichtmikroskops auf ihre Adhärenz und Viabilität hin untersucht. Es folgte die Stimulation der Zellen mit 1 μ g LPS/ml Kulturmedium und die erneute Inkubation.

Für die Untersuchungen des PLD-Inhibitors FIPI wurden die Proben 30 min vor LPS-Gabe mit einer FIPI-Konzentration von 1 μ M inkubiert.

Für die Zytokinmessungen folgte zu definierten Zeitpunkten die Überführung der Zellsuspensionen in ein Reaktionsgefäß sowie die Zentrifugation bei 1100 rpm und 194 g über eine Dauer von fünf Minuten. Die gewonnenen Überstände wurden in einem neuen Reaktionsgefäß bei -20° C bis zur Analyse zwischengelagert. Für die Western Blot-Untersuchung wurde wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben weiter verfahren.

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Mausmodell

Für das Mausmodell wurden *Pld1*^{-/-}-Mäuse sowie ihre *Pld1*^{+/+}-Wurfgeschwister verwendet. Es wurden für alle Experimente 8 bis 12 Wochen alte Tiere ungeachtet des Geschlechts 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.

Es wurden mit der Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV, 84-02.05.30.13.030) TLR4-Liganden zur Immunstimulation der Tiere verwendet. Darüber hinaus konnten mit einer weiteren Genehmigung (LANUV, 84-02.04.2013.A294) Versuche zur Induktion eines septischen Krankheitsbildes durchgeführt werden.

2.2.2 Induktion von Inflammation und septischem Schock

Materialien:

LPS (Sigma Life science Lipopolysaccharide L2630 / E. coli 0111:B4)

PBS (Biofrox DPBS w/o Calcium and Magnesium, pH 7,3)

Spritzen (BD Micro-Fine™ U-100 Insulin 0,5 ml, 0,33 mm (29G) x 12,7 mm)

Prozedere:

Die Induktion einer inflammatorischen Antwort erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von LPS (4 mg/kg KG gelöst in 200 µl PBS). Der septische Schock für die Überlebensuntersuchungen hingegen wurde durch zwei Modelle induziert. Das erste Sepsismodell wurde durch die intraperitoneale Injektion von 10 mg D-Galaktosamin (gelöst in 200 µl PBS) gefolgt von einer intravenösen LPS Injektion von 50 µg/kg KG LPS (gelöst in 150 µl PBS) induziert.

Das zweite Modell wurde durch eine alleinige intraperitoneale Gabe des LPS in höherer Dosierung (10 mg/kg KG LPS gelöst in 200 µl PBS) induziert.

Die Mäuse wurden in allen Versuchen über den gesamten Zeitraum der jeweiligen Experimente engmaschig beobachtet.

2.2.3 Gewinnung und Aufbereitung von Blutproben

Materialien:

Glaskapillare (Blaubrand® intramark Mikropipetten Ref. 708745)

Serum-Trenngel-Rörchen (BD Microtainer® SST™ Tubes Ref. 365951)

Reagiergefäße (Sarstedt Micro tube 1,5 ml Ref. 72.690.001)

Natrium-Citrat-Lösung (aus BD Vacutainer® Plus Blood Collection Tubes Ref. 364305)

Prozedere:

Für die Gewinnung von Blutproben wurden die Tiere zunächst durch Inhalation von Isofluran betäubt. Bei ausreichend tiefer Narkose wurde Blut mithilfe einer kurzen Glaskapillare aus dem retrobulbären Venenplexus gewonnen. Dieses wurde für die Serumuntersuchungen in einem Serum-Trenngel-Röhrchen aufgefangen. Nach 30-minütiger Agglutination folgte die Zentrifugation des Trenngelröhrchens bei 8000 g über 1,5 Minuten. Das aufgetrennte Serum wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20° C kurzfristig bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die Bestimmung der Thrombozytenzahl wurde analog der obigen Vorgehensweise Vollblut entnommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 100 µl Citrat-Lösung aufgefangen, um die Agglutination der Thrombozyten zu verhindern.

2.2.4 Organentnahme

Materialien:

Isofluran (Fa. Piramal Healthcare)

70%-iger Alkohol

Kryoröhrchen

Sterile Instrumente (Schere, Pinzette)

Prozedere:

Nach Betäubung durch Isofluran und Exitus letalis durch zervikale Dislokation wurden die Kadaver zunächst in 70% EtOH desinfiziert. Es folgte die Präparation des Abdomens zur Freilegung der Organe. Die Leber wurde reseziert und für die Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR (siehe Abschnitt 2.4.1) in einem Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung der Organe bei -70° C.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA)

Materialien:

ELISA-Kits (Duoset® ELISA Development System Mouse TNF- α Catalog number: DY410) / Duoset® ELISA Development System Mouse Interleukin-6 Catalog number: DY406

96-Well-Mikrotiterplatte

Photometer

Prozedere:

Um die Konzentrationen der Zytokine in den Serum- und Zellkulturproben zu bestimmen wurden sogenannte „Sandwich-ELISAs“ durchgeführt. Hierzu wurde sich streng an die Verfahrensanweisungen des verwendeten Kits gehalten. Das

Prinzip eines solchen ELISA beruht auf der spezifischen Antikörper-Antigen-Bindung. Zunächst wird eine 96-well Mikrotiterplatte mit einem für das gesuchte Protein (Antigen) spezifischen Antikörper, dem sogenannten *Capture Antibody* beschichtet. Anschließend wird die ggf. verdünnte Probe aufgebracht. Das gesuchte Protein bindet an den FAB-Teil des Antikörpers. Durch dreifaches Waschen der *Wells* werden im Anschluss unerwünschte Zell- und Lösungsbestandteile entfernt. Im weiteren Schritt erfolgt dann die Hinzugabe eines zweiten, für das Antigen spezifischen Antikörpers, der sogenannte *detection antibody*. Durch Bindung dieses Antikörpers entsteht im Folgenden ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex („Sandwich“). Alle nicht gebundenen Antikörper werden durch erneutes Waschen entfernt. Letztendlich erfolgt die Bindung eines Reporterenzym mittels weiteren Antikörpers an den Fc-Teil des zweiten Antikörpers. Für die Quantifizierung des spezifischen Proteins wird ein für das Reporterenzym spezifisches Substrat hinzugegeben. Anhand der umgesetzten Substratmenge und der verbundenen optischen Dichte können mittels Photometrie Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration gezogen werden. Als Referenz dient hierbei eine Standardreihe.

2.3.2 SDS-Page und Western Blot

Materialien:

IP Puffer (Tris-Hydrochlorid 15 mM, NaCl 155 mM, EDTA 1 mM, NaN₃ 0,005 %) + Proteaseinhibitor (1:5) + IPGAL (1:100)

Lämmli-Puffer (6x, 7 ml 4×Tris HCl/SDS pH 6,8, 3 ml Glycerin, 1 g SDS, 0,93 g DTT, 1,2 mg Bromphenolblau)

Trenngel 8% (3,75 ml Trenngelpuffer pH 8,8, 7,25 ml Aqua dest. 4 ml Acrylamid 30%, 100 µl APS 10%, 100 µl TEMED)

Sammelgel (1,25 ml Sammelgelpuffer pH 6,8, 3,05 ml Aqua dest., 650 µl Acrylamid 30%, 25 µl APS 10 %, 5 µl TEMED)

Proteinmarker (Biorad Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards Ref. 1610376, Biorad Precision Plus Protein™ Dual Color Standards Ref. 1610374)

Blockpuffer 5 % BSA in PBS-T (0,1 % von Tween20 in PBS)

Waschpuffer PBS-T (0,1 % von Tween20 in PBS)

Primäre Antikörper (Cell Signaling MAPK Family Sampler KIT Ref. 9926S, Cell signaling p-MAPK Family Sampler Kit Ref. 9910S)

Sekundärer Antikörper

Prozedere:

Um die Phosphorylierung der Signalproteine zu untersuchen wurden zunächst, wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, embryonale Mausfibroblasten mit LPS stimuliert. Das in den *Wells* der Mikrotiterplatten enthaltene Kulturmedium wurde mittels Pipette aufgenommen, sodass lediglich die vitalen, an der Wand adhärenen Zellen zurückblieben. Diese wurden mittels IP-Puffer mit Proteaseinhibitor/IPGAL gelöst und gleichzeitig lysiert. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und vorübergehend bei -70° C gelagert. Im Anschluss folgte die Hinzugabe des Lämmli-Puffers und die Erhitzung auf 95° C für fünf Minuten, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die enthaltenen Proteine nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurden zunächst Trenn- sowie Sammelgel in der Gelelektrophorese-Kammer polymerisiert. In die durch den einliegenden Kamm entstandenen Taschen wurden anschließend die Proben aufgetragen und die enthaltenen Proteine bei 25 mA 90 Minuten aufgetrennt. Als Referenz für die Molekülgröße wurden 6 μ l Precision Plus Protein-C-Marker und 2 μ l Precision Plus Protein Dual Color in einer randständigen Tasche aufgebracht.

Nach vollständiger Auftrennung wurden die Proteingele auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert („geblottet“). Das Gel sowie die Membran wurden zwischen Blotpuffer getränkte Filterpapiere gelegt und der Transfer durch Anlegen von Anode und Kathode bei 15 V über eine Stunde durchgeführt. Nach einstündigem Blockieren der Membran mit dem Blockpuffer erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper für das gesuchte Protein über Nacht bei 4° C auf einem Schüttler. Nach Entfernung der Antikörperlösung wurde die Membran

dreimalig mit dem Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper mit Streptavidin (gelöst in Blockpuffer) hinzugegeben. Es folgte die Inkubation bei Raumtemperatur und kontinuierlicher Bewegung für eine Dauer von 90 Minuten. Nach erneutem Waschen mit dem Waschpuffer konnte die Detektion erfolgen.

Hierzu wurde die ECL-Lösung gleichmäßig auf der Membran verteilt und nach 5-minütiger Inkubation die Lumineszenz in einer Dunkelkammer erfasst.

2.4 Molekularbiologische Methoden

Mithilfe der molekularbiologischen Methoden sollte die TNF- α Genexpression nach LPS-Stimulation in *Pld1*^{-/-} Mäusen und *Pld1*^{+/-}-Mäusen gemessen werden. Hierzu wurde aus der Leber der Versuchstiere die Gesamt-RNA isoliert. Um die gesuchte *messenger RNA* (mRNA) für TNF- α zu quantifizieren, musste im Anschluss zunächst *complementary DNA* (cDNA) aus der Gesamt-RNA synthetisiert werden. Aus dieser konnte dann mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) die gesuchte TNF- α -cDNA in beiden Gruppen miteinander verglichen werden.

2.4.1 RNA-Isolierung aus Organen

Materialien:

QUI Shredder KIT (Quiagen Ref. 79654)

RNeasy Mini Kit (Quiagen Ref. 74104)

Prozedere:

Zunächst wurden die bei -70°C tiefgefrorenen Organe in flüssigem Stickstoff gemörsert. Im Anschluss erfolgte die Überführung der Organfragmente in ein stickstoffgekühltes Reaktionsgefäß. Durch das „QUI Shredder Kit“ wurden im Folgenden die Gewebefragmente weiter zerkleinert, bevor mit dem „QUI RNeasy KIT“ durch mehrfaches Zentrifugieren und Waschen mit den

enthaltenen Pufferlösungen die RNA aus den Zellen isoliert wurde. Hierbei wurde sich streng an die Anweisungen des Herstellers gehalten. Die isolierte RNA wurde in 20 µl RNA-freiem Wasser aufgenommen.

2.4.2 RNA-Konzentrationsbestimmung und cDNA-Synthese

Materialien:

Aqua dest.

cDNA Kit (Promega Reverse Transcription System Ref. A3500)

Thermocycler (Fa. Eppendorf)

Prozedere:

Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten wurde zunächst jeweils die in den Lösungen enthaltene Gesamt-RNA gemessen. Dies erfolgte mithilfe eines Photometers. Die Proben wurden mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 1 µg RNA / 20 µg H₂O dest. verdünnt. Daraufhin wurden 18 µl dieses mRNA-Gemisches mit 2 µl DNase gemischt und über eine Dauer von 30 min bei 37° C inkubiert, um die Proben von kleinsten Resten an DNA zu befreien. Anschließend erfolgte eine zehninminütige Inkubation bei 75° C, um die DNase zu deaktivieren. Das Prinzip der Synthese der komplementären DNA beruht auf der Funktion der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Diese synthetisiert über einen RNA-DNA-Hybridstrang die komplementäre cDNA. Hierfür wurde ein Kit der Firma Promega verwendet. Für die cDNA Synthese fügt man der 20 µl mRNA-Lösung 2 µl des im Kit enthaltenen Primers (Oligo (dT)) hinzu.

<i>ImProm-II 5x Reaction Buffer</i>	4,0 µl
<i>MgCl₂ (7 mM)</i>	2,5 µl
<i>dNTP Mix (0,5mM je dNTP)</i>	1,0 µl
<i>Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor</i>	0,5 µl
<i>ImProm-II Reverse Transcriptase</i>	1,0 µl
Gesamt	9 µl

Der Mastermix (9 µl) und die Probe (22 µl) wurden zusammengefügt und die komplementäre DNA in einem Thermocycler durch folgendes Programm synthetisiert:

5 min bei 25° C Primerhybridisierung – Anlagerung der Primer an die RNA-Stränge

60 min bei 42° C Elongation – Synthese des komplementären DNA-Strangs

15 min bei 72° C Inaktivierung der Reversen Transkriptase

Die erzeugte cDNA wurde nach der Synthese bei -20° C gelagert und am Folgetag der qPCR zugeführt.

2.4.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Materialien:

Aqua dest.

Fast SYBR® Green Master Mix (Katalog-Nr.: 4385612)

Realtime PCR System 7500 Fast (Fa. Applied biosystems)

Primer (hergestellt durch Fa...)

Mikrotiterplatte für PCR (Fa. Eppendorf)

Prozedere:

Um die quantitative Echtzeit-PCR durchzuführen wurden je Ansatz 1 µl der cDNA-Probe mit 8 µl Aqua dest. sowie 10 µl „Fast SYBR Green Master Mix“ inkubiert. Für jede Probe wurden 6 Ansätze erzeugt: Jeweils drei Ansätze erhielten den Primer für die DNA des gesuchten TNF-α, die anderen den für das Gen der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), eines Enzyms aus dem Glucose-Stoffwechsel, das in diesem Fall als sogenanntes *housekeeping gene* verwendet wurde (siehe Tab. 1). Hierbei handelt es sich um ein in jeder Zelle konstant transkribiertes Gen, das als Referenz verwendet wird, um feinste Unterschiede in der Gesamtexpression der Zelle in der Auswertung zu neutralisieren. Die *Primer* wurden jeweils in der *forward* sowie *reverse* Variante mit einem durch das benutzte Kit vorgegeben Volumen von 0,5 µl hinzugefügt, sodass sich insgesamt ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Ansatz ergab, der auf die für PCR vorgesehene Mikrotiterplatte pipettiert wurde.

Primer	Richtung 5'→ 3'	Sequenz
TNFα	forward	GCCCCCACTCTGACCCCTTT
TNFα	reverse	GGGGCTGGCTCTGTGAGGAA
GAPDH	forward	GGTGAAGGCGGTGTGAACG
GAPDH	reverse	CTCGCTCCTGGAAGATGGTG

Tab. 1: **Basensequenz der verwendeten Primer**

Die Genexpression wurde mithilfe des »Realtime PCR System 7500 Fast« gemessen.

2.5 Zählung der Thrombozyten

Materialien:

Laborautomat (Sysmex KX-21)

Prozedere:

Für die Zählung der Thrombozyten wurde das Blut, wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, gewonnen und mithilfe einer Citrat-Lösung antikoaguliert. Da durch die Glaskapillare nur ungenaue Mengen von Blut gewonnen werden konnten, die Citratlösung in den Auffangröhrchen jedoch stets ein Volumen von 100 µl besaß, musste im Vorfeld der Messung der Verdünnungsgrad ermittelt werden. Dies geschah mittels Aufnahme in eine auf ein vorbestimmtes Volumen eingestellten Pipette. Die Thrombozytenzahl wurde durch einen Labor-Automaten der Firma Sysmex bestimmt. Das Ergebnis jeder Probe wurde mit der gemessenen Verdünnung verrechnet, um die tatsächliche Konzentration im Blut des Tieres zu ermitteln.

2.6 Statistische Auswertung

Alle Diagramme sowie statistischen Auswertung wurden mithilfe von Microsoft Excel 2016 vorgenommen. 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 t-Test und durch den Log-Rank Mantel-Cox Test ermittelt. Sie wurden in folgende Kategorien eingeteilt: $p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.001$ ***.

3 Ergebnisse

3.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

3.1.1 Zytokinspiegel im Serum nach LPS-Stimulation

Um die inflammatorische Antwort in Form einer Zytokinausschüttung nach Stimulation mit dem Endotoxin LPS zu untersuchen, wurden PLD1-defiziente Mäuse sowie Wildtypiere untersucht.

Um eine systemische Inflammation zu induzieren wurde den Mäusen 4 mg/kg KG LPS gelöst in PBS intraperitoneal injiziert. 0,5; 1,5; 3 und 5 Stunden nach Applikation wurden Blutproben gewonnen. Der einzelnen Maus wurden hierbei maximal zweimal Blut entnommen, sodass die Mäuse auf verschiedene Zeitpunkte verteilt wurden. Insgesamt wurden fünf Proben je Zeitpunkt und Gruppe untersucht (n=5). Nach Aufbereitung der Proben wurden die Zytokine TNF- α und IL6 mittels ELISA gemessen.

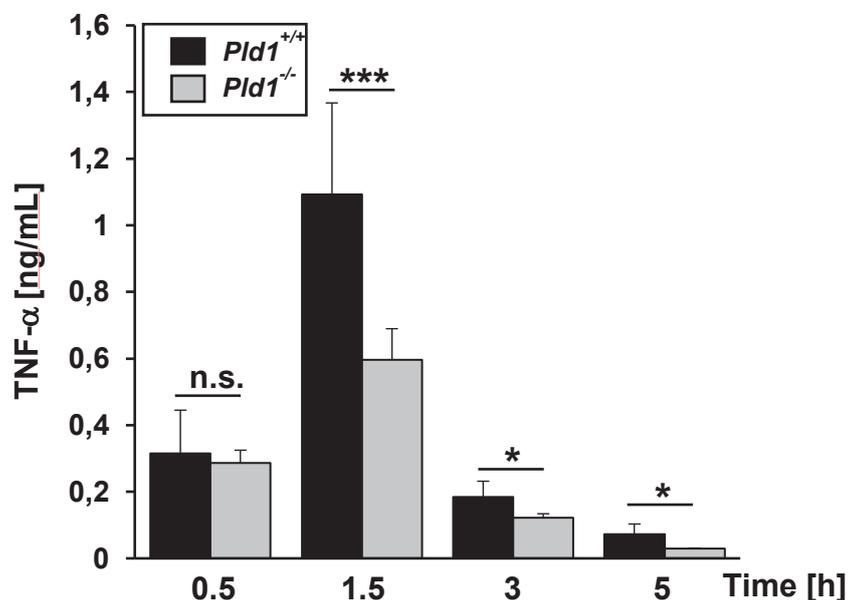


Abb. 3.1: Zeitlicher Verlauf des Serum-TNF- α bei *Pld1*^{+/+}- und *Pld1*^{-/-}-Mäusen nach intraperitonealer LPS-Injektion. Den Tieren wurden 4 mg/kg KG LPS intraperitoneal appliziert. Nach 0,5, 1,5, 3 und 5 Stunden wurden Serumproben entnommen und die Konzentration des TNF- α im Serum (in pg/ml) mittels ELISA bestimmt (n=5).

Der zeitliche Verlauf des TNF- α nach Induktion der Sepsis wird in Abb. 3.1 gezeigt. Eine Kontrolle von gesunden Tieren ergab keinen messbaren Basalspiegel vor der LPS-Injektion. Es lässt sich erkennen, dass die Zytokinspiegel nach den ersten 30 Minuten in beiden Gruppen nahezu identisch war ($314,9 \pm 130$ vs. $286,9 \pm 84$ pg/ml, $p=0,34$). Die höchste TNF- α -Konzentration im Serum wurde ca. 1,5 Stunden nach der LPS-Stimulation erreicht. Hier zeigten die *Pld1*^{-/-}-Mäuse ($595,9 \pm 209,3$ pg/ml) gegenüber den *Pld1*^{+/+}-Tieren ($1092,4 \pm 274,9$ pg/ml) eine Reduktion der Zytokinfreisetzung von ca. 45%. Der Unterschied war mit einem p-Wert von 0,006 signifikant. Die Messungen nach drei ($183,6 \pm 48$ vs. $121,3 \pm 28,5$ pg/ml, $p=0,04$) bzw. fünf Stunden ($72,9 \pm 30,4$ vs. $29,5 \pm 3,7$ pg/ml, $p=0,02$) ergaben ebenfalls einen signifikanten Unterschied, während die Messung nach 30 Minuten ($314,9 \pm 130$ vs. $286,9 \pm 84,5$ pg/ml, $p=0,34$) keine Signifikanz zeigte. [26]

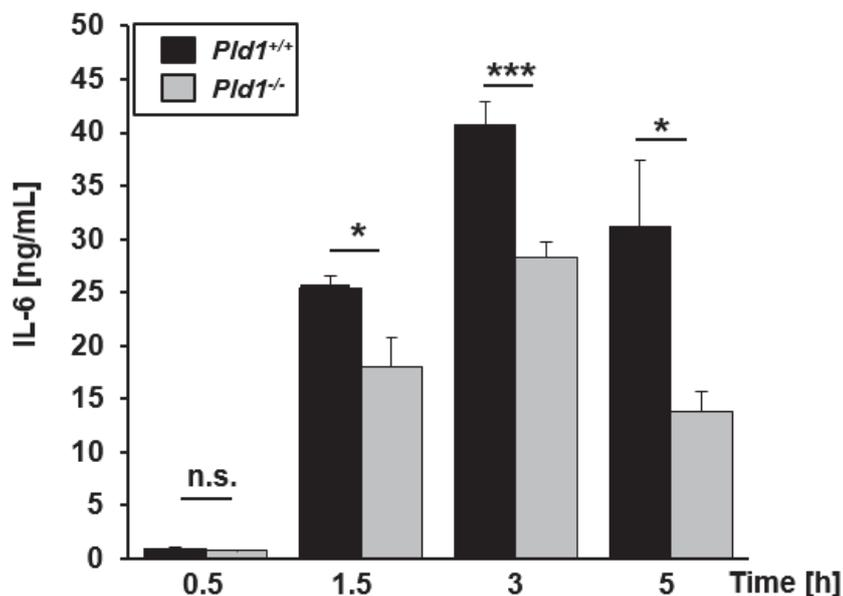


Abb. 3.2: Zeitlicher Verlauf des Serum-IL6 bei *Pld1*^{+/+}- und *Pld1*^{-/-}-Mäusen nach intraperitonealer LPS-Injektion. Den Tieren wurden 4 mg/kg KG LPS intraperitoneal appliziert. Nach 0,5, 1,5, 3 und 5 Stunden wurden Serumproben entnommen und die Konzentration des IL6 im Serum (in pg/ml) mittels ELISA bestimmt (n=5).

Die Abb. 3.2 zeigt den Verlauf der Serumkonzentration des IL6 nach Induktion der Sepsis. Eine erhöhte Basalkonzentration in unbehandelten Tieren konnte

ausgeschlossen werden. Analog der TNF- α -Spiegel zeigten auch die IL6-Spiegel einen kurvenhaften Verlauf, jedoch wurde hierbei das Konzentrationsmaximum erst nach ca. 3 Stunden erreicht. Im Vergleich zeigten die *Pld1*-defizienten Mäuse auch hier, mit Ausnahme des Messwertes nach 30 Minuten ($0,8 \pm 0,3$ vs. $0,7 \pm 0,2$ ng/ml, $p=0,24$), eine signifikante Reduktion ihrer Zytokinausschüttung gegenüber ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern. Sowohl nach 1,5 Stunden ($25,4 \pm 2,4$ vs. $18,0 \pm 6,1$ ng/ml, $p=0,4$) als auch nach 3 Stunden ($40,7 \pm 4,9$ vs. $28,3 \pm 3,0$ ng/ml, $p=0,004$) betrug diese ca. 30 %, nach 5 Stunden ($31,2 \pm 13,6$ vs. $13,8 \pm 4,3$ pg/ml, $p=0,02$) 55 %. [26]

3.1.2 TNF- α -Genexpression in der Leber

Mithilfe der Messung der TNF- α -Genexpression sollte geklärt werden, ob es sich bei den reduzierten Serum-Zytokin-Konzentrationen der *PLD1*-defizienten Gruppe nach Induktion der Sepsis um einen Genexpressionsdefekt oder um eine verminderte Exozytose von TNF- α handelt. Hierzu wurde die Leber der Tiere untersucht. Aus Lysaten dieser Organe wurde die Gesamt-RNA isoliert, komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert und diese nach ihrem TNF- α -Anteil mittels qPCR quantifiziert. (n=5)

Abb. 3.3 zeigt, dass die TNF- α -Genexpression in den Leberzellen der *Pld1*^{-/-}-Mäuse nach Induktion der Sepsis im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert ist. (Relative Expression: 1 Std. $23 \pm 0,7$ vs. $19 \pm 1,5$, $p=0,04$, 5 Std.: $18 \pm 3,8$ vs. $4,9 \pm 1,5$, $p=0,007$). [26]

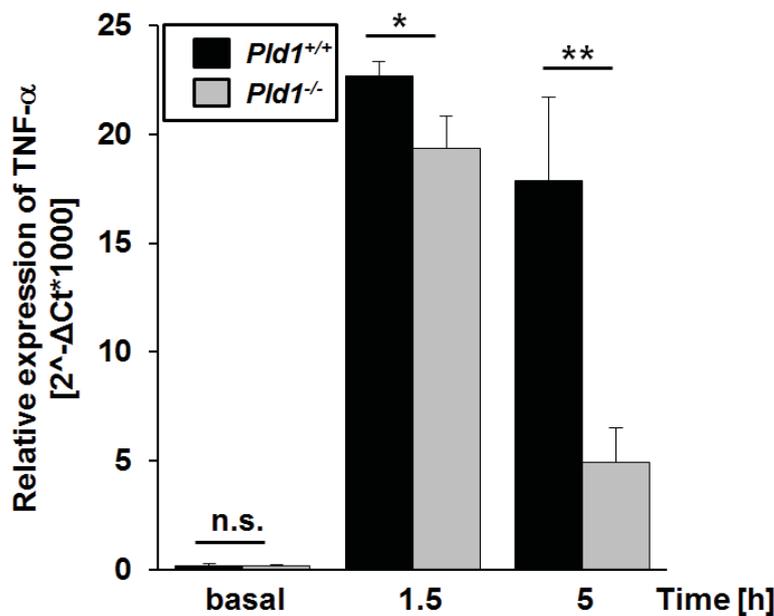


Abb. 3.3: TNF- α -Genexpression in der Leber bei *Pld1*^{+/+}- und *Pld1*^{-/-}-Mäusen nach intraperitonealer LPS-Injektion. Den Tieren wurden 4 mg/kg KG LPS intraperitoneal appliziert. Zu Beginn des Experiments, nach 1,5 und 5 Stunden wurden die Organe entnommen und TNF- α -mRNA relativ zum *Housekeeping-gene* GAPDH mittels qPCR gemessen (n=5).

3.1.3 Überlebensrate im D-Galaktosamin/LPS-Sepsismodell

Um zu prüfen, ob sich die reduzierte TNF- α -Konzentration im Serum protektiv auf das Gesamtüberleben im septischen Schockmodell auswirkt, wurden Überlebensversuche mithilfe zwei verschiedene Sepsismodellen durchgeführt. Der septische Schock wurde durch eine intraperitoneale Injektion von 10 mg D-Galaktosamin, gefolgt von einer intravenösen LPS-Injektion (50 μ g/kg KG) induziert. (*Pld1*^{-/-}-Tiere n=9, *Pld1*^{+/+}-Tiere n=10) Die Tiere wurden anschließend über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet.

Abb. 3.4 zeigt die Überlebenskurven nach Induktion des septischen Schocks. Es lässt sich erkennen, dass 40 % der Tiere in beiden Versuchsgruppen binnen der ersten acht Stunden starben. Jedoch zeigte sich, dass sich die PLD1-defizienten Tiere nach diesem Intervall stabilisierten, während hingegen in der Wildtyp-Gruppe noch zwei weitere Mäuse starben, sodass letztlich am Versuchsende 40% der *Pld1*^{+/+}- und 55 % der *Pld1*^{-/-}-Tiere überlebten.

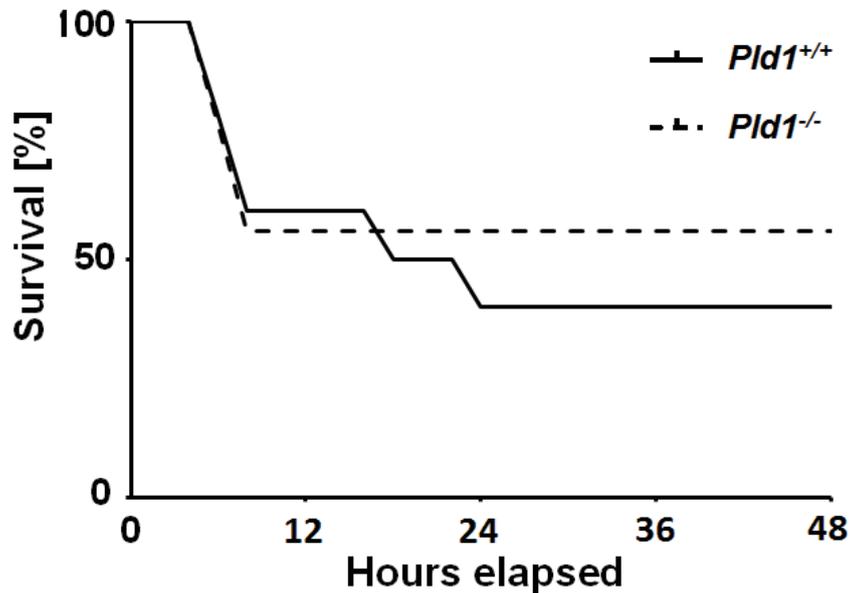


Abb. 3.4: Überlebenskurven der *Pld1*^{+/+}- und *Pld1*^{-/-}-Mäuse im D-Galaktosamin/LPS Sepsismodell. Den Tieren wurden zunächst 10 mg D-Galaktosamin intraperitoneal injiziert. Nach 10 Minuten erfolgte die intravenöse Applikation von 50 µg/kg KG LPS. Über einen Zeitraum von 48 Stunden wurde anschließend das Überleben der Tiere überwacht (*Pld1*^{+/+}-Mäuse n=10, *Pld1*^{-/-}-Mäuse n=9).

3.1.4 Überlebensrate im LPS-Sepsismodell

Neben dem D-Gal/LPS Modell wurde ein zweites Sepsismodell mit alleiniger intraperitonealer Gabe von LPS etabliert. Hierbei wurde der septische Schock durch eine höherdosierte LPS-Injektion (10mg/kg KG LPS) induziert (n=10 pro Gruppe). Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 100 Stunden beobachtet.

Abb. 3.5 zeigt die Überlebenskurven nach Induktion des septischen Schocks. Innerhalb der ersten 40 Stunden starben alle Mäuse mit PLD1-Wildtyp, während hingegen 40% der *Pld1*^{-/-}-Mäuse überlebten. (p=0,0332) [26]

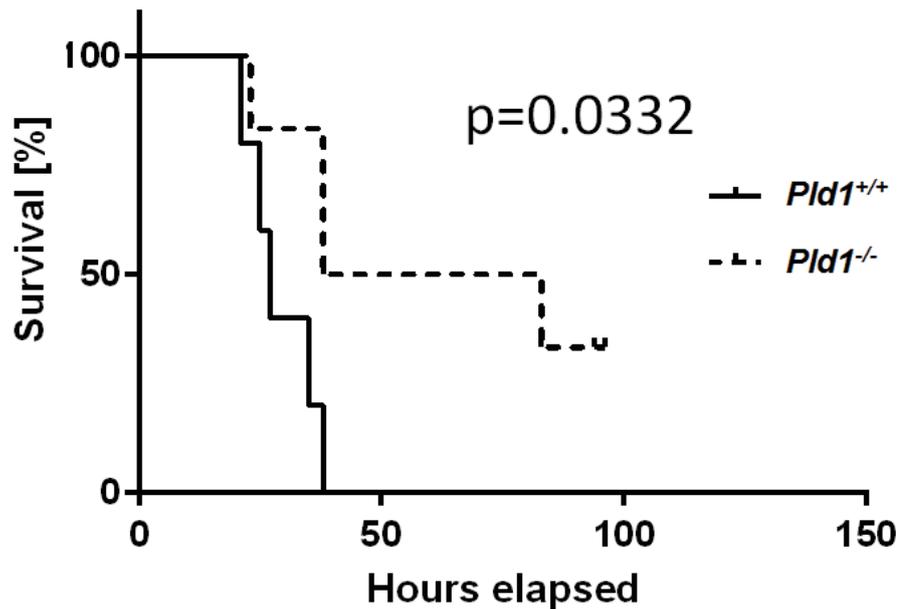


Abb. 3.5: Überlebenskurven der *Pld1*^{+/+}- und *Pld1*^{-/-}-Mäuse im LPS Sepsismodell. Den Tieren wurde 10 mg/kg KG LPS intraperitoneal injiziert. Über einen Zeitraum von 100 Stunden wurde anschließend das Überleben der Tiere überwacht (n=10).

3.1.5 Disseminierte intravasale Verbrauchskoagulopathie

Im Zuge der Akute-Phase-Reaktion in der Sepsis droht ein Ungleichgewicht in der Hämostase mit Entstehung einer disseminierten intravasalen Verbrauchskoagulopathie (DIC). Hierbei kommt es durch eine ubiquitär im Gefäßsystem vorkommende Gerinnungsaktivierung zum Verbrauch von Thrombozyten. Dies kann zu Mikrozirkulationsstörungen in der Gefäßperipherie mit drohender Ischämie und resultierender Organdysfunktion führen.

Daher wurden nach Induktion einer Sepsis mit 10 mg LPS/kg KG i.p. Messungen der Thrombozytenzahlen im Blut der Versuchstiere durchgeführt. Es wurden basal sowie nach 1, 3, 5 und 24 Stunden Proben entnommen (n=15 je Gruppe).

Die Basalkonzentration lag in *Pld1*^{+/+}-Tieren bei $965 \pm 81 \times 10^3$ Thr/ μ l und in *Pld1*^{-/-}-Tieren bei $924 \pm 41 \times 10^3$ Thr/ μ l (p=0,55)

Abb. 3.6 zeigt, dass es bei PLD1-defizienten Mäusen im Rahmen der DIC 5 sowie 24 Stunden nach Induktion der Sepsis zu einem reduzierten Verbrauch

von Thrombozyten gegenüber der Kontrollgruppe kam. (5 Std.: $467 \pm 47 \times 10^3$ Thr/ μ l vs. $616 \pm 58 \times 10^3$ Thr/ μ l, $p=0,04$; 24 Std.: $261 \pm 27 \times 10^3$ Thr/ μ l vs. $419 \pm 37 \times 10^3$ Thr/ μ l, $p<0,001$).

Die Messungen nach 1 und 3 Stunden nach Induktion der Sepsis zeigten keinen Unterschied. (1 Std.: $861 \pm 184 \times 10^3$ Thr/ μ l vs. $962 \pm 83 \times 10^3$ Thr/ μ l, $p=0,22$; 3 Std.: $615 \pm 57 \times 10^3$ Thr/ μ l vs. $648 \pm 43 \times 10^3$ Thr/ μ l, $p=0,64$). [26]

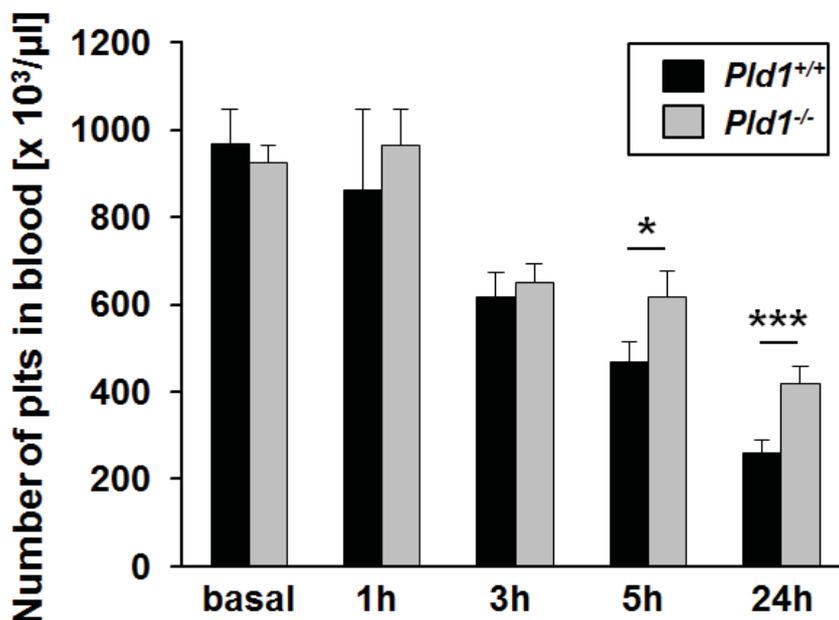


Abb. 3.6: Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenzahl im Blut bei *Pld1*^{+/+}- und *Pld1*^{-/-}-Mäusen im septischen Schock. Den Tieren wurden 10 mg/kg KG LPS intraperitoneal injiziert. Nach 1, 3, 5 und 24 Stunden wurden die Thrombozytenzahlen (1/ μ L) im Blut bestimmt (n=15).

3.2 Zellbiologische Untersuchungen

Um die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der reduzierten TNF- α -Genexpression zu untersuchen, wurden zellbiologische Experimente durchgeführt. Es wurde untersucht, ob neben NF- κ B auch der MAPK-Weg bei der TLR4-Signaltransduktion durch PLD1 beeinflusst wird. Hierzu wurden MEFs als Modellzelle gewählt, da sie sich problemlos aus Mausembryonen isolieren

lassen und eine kontinuierliche Proliferation aufweisen, sodass weiterer Verbrauch von Versuchstieren vermieden werden konnte.

3.2.1 TNF- α -Sekretion von MEFs nach LPS-Stimulation

Es wurden MEFs sowohl aus *Pld1*^{+/+}- als auch aus *Pld1*^{-/-}-Mausembryonen isoliert und kultiviert. Bei den Versuchen wurden 10⁵ Zellen je Ansatz verwendet. Die Zellen wurden mit 1 μ g/ml Kulturmedium LPS stimuliert. Nach 1, 2, 6 und 12 Stunden wurden die jeweiligen Überstände abgenommen und die TNF- α -Konzentration in diesen Proben mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Es wurden fünf Ansätze je Gruppe und Zeitpunkt untersucht (siehe Abb. 3.10).

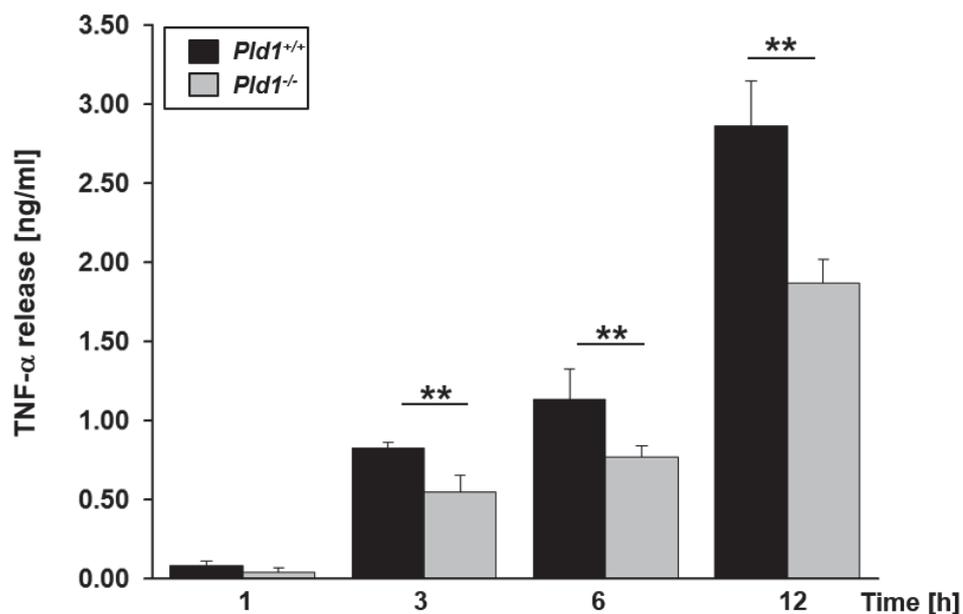


Abb. 3.7: Zeitlicher Verlauf der TNF- α -Konzentration im Überstand von *Pld1*^{+/+}- und *Pld1*^{-/-}-embryonalen Mausfibroblasten nach Stimulation mit LPS. 100.000 Zellen je Ansatz (n=5 je Zeitpunkt und Gruppe) wurden mit LPS stimuliert. Nach 1, 3, 6 und 12 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die TNF- α -Konzentration (in ng/ml) mittels ELISA bestimmt.

Abb. 3.7 zeigt die TNF- α -Spiegel in den Überständen. Die *Pld1*^{-/-}- Zellen zeigen im Vergleich zu den *Pld1*^{+/+}-Zellen bei gleicher Zellzahl und zugeführter Menge LPS eine reduzierte TNF- α -Sekretion. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren ab 3 Stunden nach Stimulation statistisch signifikant (1 Std.:

$0,082 \pm 0,027$ vs. $0,039 \pm 0,024$ ng/ml, $p=0,06$; 3 Std.: $0,82 \pm 0,03$ vs. $0,54 \pm 0,10$ ng/ml, $p=0,002$; 6 Std.: $1,13 \pm 0,18$ vs. $0,77 \pm 0,07$ ng/ml, $p=0,007$; 12 Std.: $2,85 \pm 0,28$ vs. $1,8 \pm 0,15$ ng/ml, $p=0,002$). [26]

3.2.2 TNF- α -Sekretion FIPI-vorbehandelter MEFs nach LPS-Stimulation

Zur Inhibierung der Lipase-Aktivität von PLD1 wurde FIPI, ein nicht-selektiver PLD1/PLD2 Inhibitor, verwendet. *Pld1*^{+/+}-embryonale Mausfibroblasten wurden hierzu 30 Minuten vor der LPS-Stimulation mit FIPI inkubiert. Die Kontrollgruppe erhielt DMSO. Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit 1 μ g/ml LPS. Nach 1, 2, 6, 12 und 24 Stunden wurden die TNF- α -Konzentration in den Überständen mittels ELISA bestimmt. Es wurden fünf Ansätze pro Gruppe und Zeitpunkt untersucht (n=5).

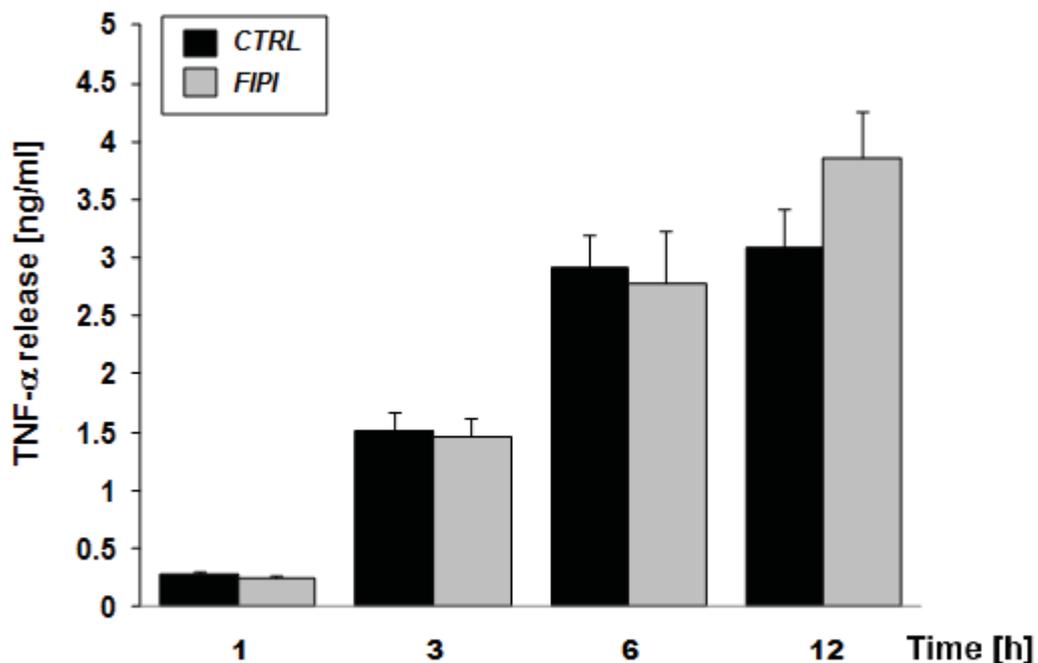


Abb. 3.8: Zeitlicher Verlauf der TNF- α -Konzentration im Überstand von FIPI-vorbehandelten *Pld1*^{+/+}-embryonalen Mausfibroblasten nach Stimulation mit LPS. Die Experimentalgruppe erhielt 1 μ M FIPI 30 Minuten vor Stimulation mit LPS. 100.000 Zellen je Ansatz (n=5 je Zeitpunkt und Gruppe) wurden mit LPS stimuliert. Nach 1, 3, 6 und 12 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die TNF- α -Konzentration (in ng/ml) mittels ELISA bestimmt.

Abb. 3.8 zeigt die TNF- α -Konzentrationen in den Überständen. Die FIPI-vorbehandelten *Pld1*^{+/+}-Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied in der TNF- α -Sekretion (Basal n.w., 1 Std.: $0,282 \pm 0,020$ vs. $0,250 \pm 0,019$ ng/ml, $p=0,05$; 3 Std.: $1,52 \pm 0,14$ vs. $1,46 \pm 0,15$ ng/ml, $p=0,63$; 6 Std.: $2,92 \pm 0,28$ vs. $2,79 \pm 0,46$ ng/ml, $p=0,65$; 12 Std.: $3,08 \pm 0,33$ vs. $3,59 \pm 0,41$ ng/ml, $p=0,14$).

Um zu überprüfen, ob es durch FIPI zu einer Veränderung der TNF- α -Sekretion durch *Off-target*-Phänomene u.a. durch Inhibition von PLD2 kommt, wurden *Pld1*^{-/-}-MEFs mit 1 μ M FIPI 30 Minuten vor Stimulation mit LPS inkubiert. Die beiden Kontrollgruppen erhielten analog DMSO.

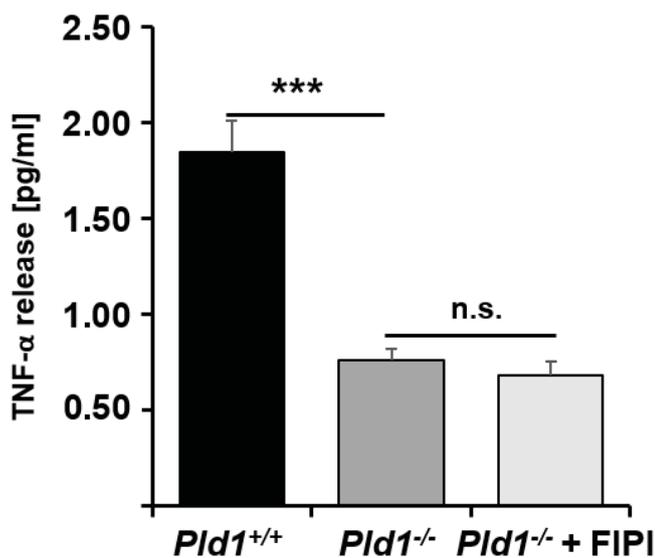


Abb. 3.9: TNF- α -Konzentration im Überstand von *Pld1*^{+/+}-MEFs sowie von vorbehandelten und unbehandelten *Pld1*^{-/-}-MEFs nach Stimulation mit LPS. Die vorbehandelten *Pld1*^{-/-}-MEFs wurden 30 Minuten vor LPS-Stimulation mit 1 μ M FIPI inkubiert. 100.000 Zellen je Ansatz ($n=5$ je Zeitpunkt und Gruppe) wurden mit 1 μ g/ml LPS stimuliert. Nach 12 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die TNF- α -Konzentration (in ng/ml) mittels ELISA bestimmt.

Abb. 3.9 zeigt den in Abschnitt 3.2.1 bereits gezeigten signifikanten Unterschied in der TNF- α -Konzentration im Überstand zwischen *Pld1*^{+/+}- und *Pld1*^{-/-}-MEFs 12 Stunden nach der Stimulation mit LPS. ($1,84 \pm 0,36$ vs. $0,757 \pm 0,144$ ng/ml, $p=0,001$). Zwischen FIPI-vorbehandelten und unbehandelten *Pld1*^{-/-}-MEFs

hingegen gab es keinen signifikanten Unterschied ($0,757 \pm 0,144$ ng/ml vs. $0,677 \pm 0,164$ ng/ml, $p=0,41$).

3.2.3 Untersuchungen des MAPK-Weges in MEFs nach LPS-Stimulation

In Abschnitt 3.2.1 konnte gezeigt werden, dass sich die MEFs aufgrund des reproduzierbaren Effektes der verminderten TNF- α -Ausschüttung als Modellzelle für die Untersuchungen des MAPK-Weges eignen.

Es wurden analog zur Voruntersuchung 10^5 *Pld1*^{+/+}- sowie *Pld1*^{-/-}-MEFs in 200 μ L Kulturmedium mit 1 μ g/ml LPS stimuliert (4 Ansätze je Gruppe). Nach 30-minütiger Inkubation wurde der Überstand verworfen, die verbleibenden Zellen lysiert und die Zellsignalproteine SAPK/JNK, p38 und ERK1/2 mittels SDS-PAGE und Western Blot auf ihre Phosphorylierung untersucht. Die Lysate pro Ansatz wurden gleichmäßig auf die Gele zur Untersuchung der phosphorylierten sowie nicht-phosphorylierten Proteine aufgeteilt.

Abb. 3.10 zeigt repräsentative Ausschnitte der Western Blots. Es lässt sich erkennen, dass es nach LPS-Stimulation in *Pld1*^{-/-}-MEFs zu einer Phosphorylierung von SAPK/JNK kommt, die sich jedoch von der Kontrollgruppe nicht unterscheidet.

Die Untersuchungen zur Phosphorylierung von p38 zeigen, dass es weder in der *Pld1*^{-/-}- noch in der Kontrollgruppe zu einer sichtbaren Veränderung kommt.

Hingegen konnte eine reduzierte Phosphorylierung von ERK1/2 in *Pld1*^{-/-}-MEFs nach Stimulation mit LPS im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. [26]

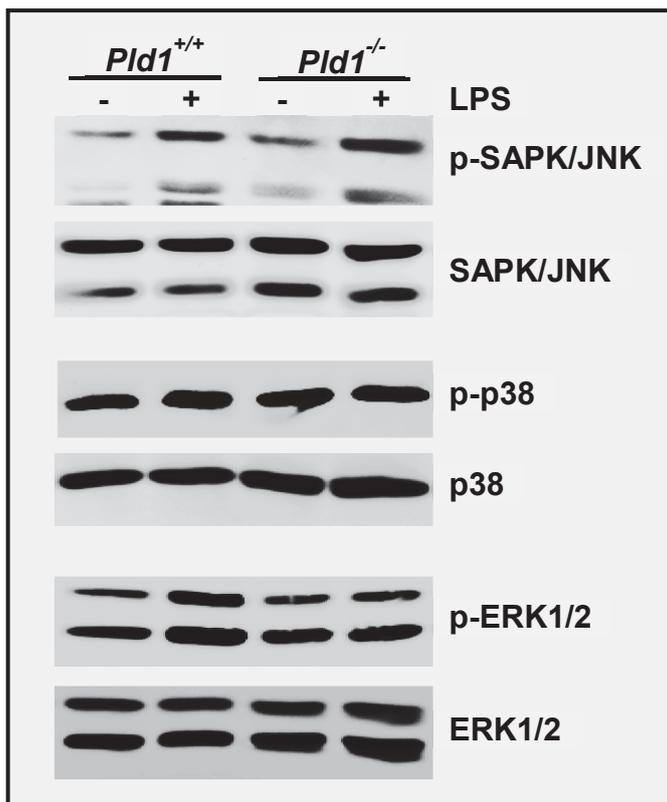


Abb. 3.10: Repräsentative Darstellung der Western Blots der Zellsignalproteine der MAP-Kinase-Familie (SAPK/JNK, p38 und ERK1/2) sowie deren Phosphorylierung. Es wurden 10^5 *Pld1*^{+/+}- und *Pld1*^{-/-}-MEFs mit LPS stimuliert und 30 Minuten inkubiert. Nach der Zellyse erfolgte die Durchführung der Western-Blots mit den jeweiligen Antikörpern.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von PLD1 auf die LPS-induzierte Zytokinausschüttung

Phagozyten, wie Monozyten bzw. deren gewebeständige Pendanten, die Makrophagen, sowie Dendritische Zellen, erkennen das in der Zellmembran der gramnegativen Bakterien vorkommende Endotoxin LPS mithilfe des TLR4. Durch Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade führt dies zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL1, IL6, IL12 sowie des Chemokins CXCL8. [27] Diese bilden die Grundlage einer primären Immunantwort und sind bei systemischer, unkontrollierter Infektion auch maßgeblich an der Ausbildung einer Sepsis und eines septischen Schocks beteiligt. Insbesondere TNF- α konnte als wichtiges Zytokin bei der Entstehung der Sepsis identifiziert werden. [28, 29]

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es in LPS-stimulierten Monozyten von *Pld1*^{-/-}-Mäusen zu einer reduzierten Ausschüttung sowie Expression von TNF- α gegenüber ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern kommt. [22] Oh und Kollegen konnten bereits 2014 einen Zusammenhang zwischen PLD1 und LPS-induzierter TNF- α -Expression *in vitro* zeigen. [30]

Um den Effekt der PLD1-Defizienz auf die TNF- α -Sekretion zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Versuche mit Induktion eines septischen Krankheitsmodells durch intraperitoneale Injektion von LPS durchgeführt. Es wurden Mäuse mit PLD1-*Genknockout* sowie deren Wildtyp-Wurfgeschwister verwendet. Der Effekt von PLD1 auf die Immunantwort wurde anhand der Serumspiegel von TNF- α und IL6 zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass PLD1-Defizienz zu einer signifikanten Reduktion des TNF- α -Serumspiegels führt. Das Konzentrations-*Peak*, das ca. 1,5 Stunden nach LPS-Injektion erreicht wird, ist bis zu 45% reduziert. Neben den TNF- α - sind auch die IL6-Spiegel im Serum der Mäuse reduziert. Der statistisch signifikante Unterschied liegt hierbei zwischen 35% und 55% zu den verschiedenen Messzeitpunkten.

Die Ergebnisse zeigen, dass PLD1 einen modulierenden Einfluss auf die Signaltransduktion bzw. die Sekretion von TNF- α des Immunsystems bei Kontakt mit dem gramnegativen Endotoxin LPS hat, sodass es zu einer reduzierten proinflammatorischen Zytokinantwort in PLD1-defizienten Tieren kommt.

4.2 PLD1 verstärkt die TNF- α -Genexpression

PLD1 ist durch Bildung von *second messengern* an einer Vielzahl intrazellulärer Prozesse beteiligt, u.a. an Endo- sowie Exozytose, Organisation des Zytoskeletts, Zellproliferation und Zellmigration. [23]

Die Arbeitsgruppe um Oh und Kollegen konnte in RAW 264.7 Zellen, einer murinen Makrophagen-Zelllinie, einen Zusammenhang zwischen PLD1 und der TNF- α -Expression zeigen. [30] In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte dieser Effekt bestätigt werden. Die reduzierte Sekretion von TNF- α wird durch eine Reduktion der Genexpression in LPS-stimulierten *Pld1*^{-/-}-Monozyten vermittelt. [22]

Die Leber ist durch ihre Zellen des mononukleären Phagozytensystems (Kupffer-Sternzellen) an der Abwehr und Phagozytose von Pathogenen und Zelltrümmern beteiligt. Diese gewebständige Immunzellen können neben der Phagozytose auch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α sezernieren, um eine primäre Immunantwort zu initiieren. [31]

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in Organlysaten der Leber von *Pld1*^{-/-}-Mäusen nach intraperitonealer LPS-Applikation zu einer signifikanten Reduktion der TNF- α -Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass PLD1, wie *in vitro* Experimenten gezeigt [22, 30], auch *in vivo* modulierend auf die TNF- α -Expression wirkt.

4.3 PLD1 beeinflusst den MAPK-ERK1/2-Signalweg

Die Bindung von LPS an den TLR4-Rezeptor von Monozyten und Makrophagen führt zur Genexpression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL6. Es konnte gezeigt werden, dass hierbei neben dem NF- κ B-Signalweg dem MEK-ERK1/2-Signalweg eine Schlüsselrolle zukommt. [32] [33] Sethu und Kollegen konnten zeigen, dass der PLD1-*Knockdown* durch siRNA zu einer reduzierten Phosphorylierung von ERK1/2 im TNF- α -*Signaling* führt. [34]

Um zu überprüfen, ob es auch im PLD1-*Knockoutmodell* nach Immunstimulation mit LPS zu einer veränderten ERK1/2 Phosphorylierung kommt, wurde ein Zellkulturmodell mit embryonalen Mausfibroblasten etabliert. Hierbei wurden die Zellen mit LPS *in vitro* stimuliert. Die signifikante Reduktion der TNF- α -Sekretion in *Pld1*^{-/-}-MEFs gegenüber den Zellen der Kontrollgruppe konnte auch hierbei gezeigt werden.

Die Untersuchungen demonstrieren, dass es in *Pld1*^{-/-}-MEFs zu einer verminderten Phosphorylierung des Signalproteins ERK1/2 im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt. Daher ist anzunehmen, dass PLD1 neben dem TNF- α -*Signaling* auch die LPS-TLR4-MAPK-ERK1/2-Signalkaskade beeinflusst.

Letztlich kann mit den hier gezeigten Experimenten jedoch nicht geklärt werden, ob PLD1 direkt auf ERK1/2 und/oder bereits *upstream* auf die MAPK-Signalkaskade wirkt. Hier werden weitere Versuchsreihen notwendig sein.

Die alternativen Endstrecken des MAPK-Weges, p38 und JNK/SAPK zeigen keine veränderte Phosphorylierung im Vergleich zu den Kontrollen und scheinen durch PLD1 nicht beeinflusst zu werden.

4.4 Wirkung von FIPI auf PLD1 und die TNF- α -Sekretion

Park et al. konnten im PLD2-Modell zeigen, dass neben der intrinsischen Lipase-Aktivität die PLD2 selbst auch Einfluss auf die Steuerung der Zellprozesse über die direkte Interaktion mit zellulären Proteinen nehmen kann. [35]

Um die Wirkungsweise von PLD1 auf die TLR4-MEK-ERK-TNF- α zu untersuchen, wurde ein Experiment mit *Pld1*^{+/-}-MEFs durchgeführt, die mit FIPI vor LPS-Stimulation vorbehandelt wurden.

Stegner et al. konnten zeigen, dass der PLD-Inhibitor FIPI die enzymatische Aktivität von PLD1 in Thrombozyten inhibiert. [25]

In der vorliegenden Arbeit bleibt ein Effekt von FIPI auf die TNF- α -Ausschüttung nach Stimulation mit LPS aus. Dies legt die Vermutung nahe, dass PLD1 auf die oben genannte Signalachse mittels einer direkten Proteininteraktion wirkt und diese unabhängig von der enzymatische Aktivität von PLD1 ist.

Da FIPI neben PLD1- auch die PLD2-Enzymaktivität hemmt, wurde ein Kontrollexperiment mit *Pld1*^{-/-}-MEFs durchgeführt, um etwaige *off-target*-Effekte auszuschließen. Es konnte gezeigt werden, dass die PLD1-defizienten Zellen unabhängig von der Inkubation mit FIPI eine signifikante Reduktion der TNF- α -Ausschüttung zeigen und ein Einfluss von PLD2 auf die Regulation von TNF- α somit nicht nachgewiesen werden konnte.

4.5 Outcome im septischen Schock bei PLD1-Defizienz

Nach unkontrollierter lokaler Infektion kann es durch Ausbreitung des Pathogens und resultierender dysregulierter Immunantwort zur Ausbildung einer Sepsis bzw. eines septischen Schocks kommen. Hohe TNF- α -Spiegel im Serum führen zur generalisierten Aktivierung des Gefäßendothels. Bei lokal begrenzter Infektion führt dies zur Verlangsamung des Blutflusses, Adhäsion und Diapedese von Immunzellen wie neutrophile Granulozyten. Bei systemischer Aktivierung jedoch fördert dies die Ausbildung von peripherer Vasodilatation, Hypovolämie durch das sogenannte *capillary leak* und

Hypotension mit konsekutiver Minderperfusion in der Endstrombahn. Hierbei korreliert die Menge des freigesetzten TNF- α mit dem Schweregrad der Sepsis. [19]

Pfeffer et al. konnten zeigen, dass fehlende TNF- α -Signaltransduktion durch Gen-Knockout des TNFR1-Rezeptors die Letalität im LPS-Sepsismodell verhindert. [36] Darüber hinaus führt eine Antagonisierung des TNF- α durch lösliche Antikörper zu einer ausbleibenden Letalität nach LPS-Applikation. [37] Des Weiteren führt reduziertes TNF- α -*Shedding*, wie McIlwain/Lang und Kollegen durch *Knockout* von iRHOM2, einem Regulator des TNF- α Converting Enzyms (TACE), zeigen konnten, durch reduzierte TNF- α -Serumspiegel zu einem signifikant verbesserter *Outcome* im LPS-Sepsismodell. [38]

Um den *Outcome* bei verminderten TNF- α -Serumspiegel durch PLD1-Defizienz im septischen Schock zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Sepsismodelle der Maus durchgeführt. Der Effekt des PLD1-*Genknockouts* auf die TNF- α -Sekretion konnte in beiden Modellen durch die TNF- α -Messung im Serum bestätigt werden.

Bei dem ersten Modell handelte es sich um ein hepatotoxisches Sepsismodell der Maus mit intraperitonealer Applikation von D-Galaktosamin (D-Gal) als Lebersensitizer sowie intravenösem LPS. D-Gal ist ein künstlicher Aminosucker, der die Sensitivität der Hepatozyten in Mäusen gegenüber Endotoxinen wie LPS um ein Vielfaches erhöht und damit zu einem Anstieg der die LPS-assoziierten Letalität führt. [39]

Die Überlebenskurven zeigen lediglich einen Trend in Richtung eines verbesserten *Outcomes* der PLD1-defizienten Gruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz. Dies kann in der Tatsache begründet sein, dass bereits geringe TNF- α -Konzentrationen in Kombination mit D-Galaktosamin einen letalen Ausgang herbeiführen, sodass die um 50% reduzierte TNF- α -Ausschüttung bei PLD1-Defizienz nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Daher etablierten wir ein zweites Sepsismodell, bei dem die Tiere alleinig hochdosiertes LPS intraperitoneal erhielten. Hier zeigte sich ein signifikant

verbesserten Outcome bei *Pld1*^{-/-}-Tieren. Nach 40 Stunden lebten noch 50% der *Pld1*^{-/-}-Tiere, bei den *Pld1*^{+/+}-Tieren starben alle Versuchstiere innerhalb des untersuchten Zeitraumes.

Dies legt den Schluss nahe, dass PLD1 über eine stärkere Sekretion von TNF- α zu einem reduzierten Gesamtüberleben im LPS-induzierten septischen Schock führt.

4.6 PLD1 und die disseminierte intravasale Verbrauchskoagulopathie

Der sogenannte Zytokinsturm in der Sepsis kann zu einer überschießenden Aktivierung der Hämostase im Sinne einer disseminierten intravasalen Verbrauchskoagulopathie führen. Hierbei spielt die Ausschüttung u.a. von TNF- α und dessen Wirkung auf das Endothel und angelockte Monozyten eine zentrale Rolle. In der Folge kommt es in diesen Zellen zur Expression von TF. Die Komplexbildung von TF mit Gerinnungsfaktor VII führt zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und Bildung von Thrombin. [15, 16]

Es kommt im weiteren Verlauf über Aktivierung der Thrombozyten sowie Bildung von Fibrinpolymere zu Mikrothromben in der Gefäßperipherie, die durch die resultierende Mikrozirkulationsstörung Grundlage für das Sepsis-induzierte Multiorganversagen darstellen. [16]

Um zu überprüfen, ob die reduzierten TNF- α -Spiegel durch PLD1-Genknockout in der Sepsis zu einem reduzierten Verbrauch von Thrombozyten führen, wurden die Thrombozyten im LPS-Sepsismodell der Maus im Verlauf gemessen.

Es kam in beiden Versuchsgruppen zu einem signifikanten Verbrauch von Thrombozyten nach Induktion des septischen Schocks. Darüber hinaus konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Experimental- und der Kontrollgruppe 5 sowie 24 Stunden nach Induktion der Sepsis gezeigt werden. Es ist denkbar, dass der reduzierte Verbrauch mit verminderter Mikrozirkulationsstörung sowie Organischämie einer der Gründe für den verbesserten Outcome im Sepsismodell bei den *Pld1*^{-/-}-Tieren darstellt.

4.7 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass PLD1 eine bedeutende Rolle in der Inflammation und Sepsis zukommt. PLD1-defiziente Mäuse zeigen im septischen Schock, ausgelöst durch das gramnegative Endotoxin LPS, einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber ihren wildtypischen Wurfgeschwistern.

Der Vorteil wäre durch die hier gezeigte signifikante Reduktion des sezernierten TNF- α sowie die reduzierten IL6-Serumspiegel zu erklären. Es konnte gezeigt werden, dass PLD1 die Genexpression von TNF- α moduliert.

Die Arbeit zeigt, dass PLD1 den LPS-TLR4-MAPK-ERK1/2-Signalweg beeinflusst. Ob sich die PLD1-Defizienz direkt auf das ERK1/2-Protein oder bereits *upstream* auswirkt, kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass PLD1 über einen Lipase-unabhängigen Mechanismus wirkt.

Die disseminierte intravasale Verbrauchskoagulopathie ist in PLD1-defizienten Tieren reduziert, was zum einen in den Vorarbeiten gezeigten Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierungsdefekt, aber auch durch die hier gezeigten reduzierten proinflammatorischen Zytokinspiegel begründet sein kann. Die daraus resultierende gestörte Thrombusbildung und verbesserte Mikrozirkulation in der Gefäßperipherie könnte Grundlage des verbesserten Gesamtüberlebens im Sepsismodell sein.

Die in dieser Arbeit gezeigten septischen Schockmodelle sind im Hinblick auf eine klinische Nutzbarkeit kritisch zu hinterfragen, da zum einen eine durch gramnegative Keime ausgelöste Sepsis nicht zu einem einmaligen, wie in dieser Arbeit simuliert, sondern kontinuierlichen Stimulus der Immunantwort führt. Darüber hinaus ist unklar inwieweit die reduzierten TNF- α - und IL6-Spiegel auch eine Abwehr der eindringenden vitalen Bakterien verhindern. Dies muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PLD1 aufgrund der reduzierten inflammatorischen Antwort auch in vielen anderen Bereichen der Medizin ein therapeutischer Ansatz darstellen könnte. Hier würden insbesondere chronisch-

entzündliche Systemerkrankungen wie u.a. rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa in Frage kommen, bei denen bereits im klinischen Alltag Infliximab, ein TNF- α -Antikörper, zum Einsatz kommt.

5 Literaturverzeichnis

1. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA, 2016. **315**(8): p. 801-10.
2. Werdan, K., et al., eds. *Sepsis und MODS*. 5., vollst. akt. Aufl. 2016 ed. 2016, Springer: Berlin, Heidelberg. S. 4.
3. Engel, C., et al., *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Medicine, 2007. **33**(4): p. 606-618.
4. Werdan, K., et al., eds. *Sepsis und MODS*. 5., vollst. akt. Aufl. 2016 ed. 2016, Springer: Berlin, Heidelberg. S. 11.
5. Marx, G., et al., *Die Intensivmedizin* 12., vollst. überarb., aktualisierte und erw. Aufl. ed. 2015, Berlin ; Heidelberg: Springer.
6. Werdan, K., et al., eds. *Sepsis und MODS*. 5., vollst. akt. Aufl. 2016 ed. 2016, Springer: Berlin, Heidelberg. S. 40-41.
7. Murphy, K.M., et al., *Janeway - Immunologie*. 7. Aufl. ed. 2009, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. S. 115-121.
8. Brunkhorst, F.M., et al., *Effect of empirical treatment with moxifloxacin and meropenem vs meropenem on sepsis-related organ dysfunction in patients with severe sepsis: a randomized trial*. Jama, 2012. **307**(22): p. 2390-9.
9. Rosadini, C.V. and J.C. Kagan, *Early innate immune responses to bacterial LPS*. Curr Opin Immunol, 2016. **44**: p. 14-19.
10. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
11. Akira, S., *Mammalian Toll-like receptors*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(1): p. 5-11.
12. Molteni, M., S. Gemma, and C. Rossetti, *The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation*. Mediators Inflamm, 2016. **2016**: p. 6978936.
13. Murphy, K.M., et al., *Janeway - Immunologie*. 7. Aufl. ed. 2009, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. S. 78.
14. Murphy, K.M., et al., *Janeway - Immunologie*. 7. Aufl. ed. 2009, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. S. 68-71.
15. Levi, M., *The coagulant response in sepsis and inflammation*. Hämostaseologie, 2010. **30**(1): p. 10-16.
16. Pötzsch, B. and K. Madlener, *Hämostaseologie*. 2., vollständig aktualisierte und erweiterte Auflage ed. SpringerLink : Bücher. 2010, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. S. 549-552.
17. Levi, M., E. de Jonge, and T. van der Poll, *Rationale for restoration of physiological anticoagulant pathways in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation*. Crit Care Med, 2001. **29**(7 Suppl): p. S90-4.
18. Werdan, K., et al., eds. *Sepsis und MODS*. 5., vollst. akt. Aufl. 2016 ed. 2016, Springer: Berlin, Heidelberg. S. 47-50.
19. Werdan, K., et al., eds. *Sepsis und MODS*. 5., vollst. akt. Aufl. 2016 ed. 2016, Springer: Berlin, Heidelberg. S. 102-103.
20. Reinhart, K., et al., *Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)*. 2010.
21. Brown, H.A., P.G. Thomas, and C.W. Lindsley, *Targeting phospholipase D in cancer, infection and neurodegenerative disorders*. Nat Rev Drug Discov, 2017.
22. 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.

23. 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.
24. Jang, J.H., et al., *Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners*. *Prog Lipid Res*, 2012. **51**(2): p. 71-81.
25. 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.
26. Urbahn, M.A., et al., *Phospholipase D1 regulation of TNF-alpha protects against responses to LPS*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 10006.
27. Murphy, K.M., et al., *Janeway - Immunologie*. 7. Aufl. ed. 2009, Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl. S. 107-109.
28. Beutler, B. and A. Cerami, *Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator*. *Annu Rev Biochem*, 1988. **57**: p. 505-18.
29. Beutler, B., I.W. Milsark, and A.C. Cerami, *Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin*. *Science*, 1985. **229**(4716): p. 869-71.
30. Oh, C.H., S.Y. Park, and J.S. Han, *Phospholipase D1 is required for lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression and production through S6K1/JNK/c-Jun pathway in Raw 264.7 cells*. *Cytokine*, 2014. **66**(1): p. 69-77.
31. Jenne, C.N. and P. Kubers, *Immune surveillance by the liver*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(10): p. 996-1006.
32. Villena, J. and H. Kitazawa, *Modulation of Intestinal TLR4-Inflammatory Signaling Pathways by Probiotic Microorganisms: Lessons Learned from Lactobacillus jensenii TL2937*. *Front Immunol*, 2014. **4**: p. 512.
33. Guha, M., et al., *Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression*. *Blood*, 2001. **98**(5): p. 1429-39.
34. 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.
35. Park, M.H., et al., *Phospholipase D2 promotes degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha independent of lipase activity*. *Exp Mol Med*, 2015. **47**: p. e196.
36. Pfeffer, K., et al., *Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 457-67.
37. Ashkenazi, A., et al., *Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoadhesin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(23): p. 10535-9.
38. McIlwain, D.R., et al., *iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against Listeria and responses to LPS*. *Science*, 2012. **335**(6065): p. 229-32.
39. Freudenberg, M.A., D. Keppler, and C. Galanos, *Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin*. *Infect Immun*, 1986. **51**(3): p. 891-5.

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Margitta Elvers, die mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt und mich über die gesamte Zeit erstklassig betreut hat. Ich bedanke mich für das offene Ohr sowie die Anregungen und Hilfestellungen bei aufkommenden Problemen. Unsere Besprechungen waren stets von konstruktiven Diskussionen und guter Stimmung begleitet.

Ich möchte mich darüber hinaus für die gute Einarbeitung und für alle wertvollen Ratschläge und die angenehme Atmosphäre im Labor bei Martina Spelleken, unserer Technischen Assistentin, herzlich bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Dr. Meike Klier, Dr. Lili Donner, Dr. Nina Gowert und Irena Krüger für die anregenden Diskussionen und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Ferner möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Philipp Lang für seine Hilfestellungen und seine tatkräftige Unterstützung bedanken.

Von Herzen danke ich meiner Familie, die mir in allen Fragen und Sorgen stets zur Seite gestanden hat und ohne deren Unterstützung das gesamte Projekt nicht möglich gewesen wäre.