

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

Phospholipase D1 vermittelte Effekte auf die TNF- $\alpha$ -Expression  
und Sekretion in der gramnegativen Entzündung

Dissertation

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

vorgelegt von

Sonja Charlotte Ludwig (geb. Kaup)

2023

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Margitta Elvers

Zweitgutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

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.

\* gleichwertiger Beitrag der Autoren

# Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der Sepsis beschreibt eine systemische Reaktion auf eine Infektion, bei der eine dysregulierte Immunantwort zu potenziell lebensbedrohlichen Organschäden führt. Die Sepsis geht mit einer hohen Mortalität einher und wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als „*Global Health Priority*“ anerkannt.

Prinzipiell können alle Infektionen bei inadäquater Immunantwort einen septischen Verlauf nehmen. Häufigste Auslöser einer Sepsis sind bakterielle Infektionen, insbesondere durch *Staphylococcus aureus* oder *Escherichia coli*. Letzteres zählt zu den gramnegativen Bakterien, welche über das in ihrer Zellwand enthaltene Lipopolysaccharid (LPS) eine Sepsis provozieren können. Während einer Infektion mit gramnegativen Bakterien wird das LPS von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und aktiviert über die Bindung an Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) proinflammatorische Signalkaskaden. Hierdurch werden lösliche Entzündungsmediatoren wie Zytokine, insbesondere Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), verstärkt gebildet und freigesetzt, die als potenter Stimulus der angeborenen und adaptiven Immunantwort fungieren. Über hämatogene Verbreitung der Mediatoren und Pathogene wird aus einer lokalen Reaktion eine systemische, dysregulierte Immunreaktion. Hierbei fallen vermehrt zellschädigende Faktoren an und es kann zu Mikrozirkulationsstörungen und letztlich zum Multiorganversagen kommen.

Phospholipase D1 (PLD1) ist als Phospholipid-degradierendes Enzym an vielfältigen zellulären Mechanismen wie zum Beispiel zytoskelettaler Organisation oder Membrantransport beteiligt. Verschiedene Studien haben eine Beteiligung von PLD1 an immunologischen Prozessen beschrieben. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von PLD1 auf die LPS-induzierte Immunantwort im Maus- und Zellkulturmodell untersucht. Hierbei zeigten *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäuse nach LPS-Stimulation geringere TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel als *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäuse. Als mögliche Ursache zeigten sich im Rahmen dieser Arbeit Modulationen des *mitogen-activated protein kinase*-Signalwegs (MAPK-Signalwegs). Darüber hinaus war die Expression des Transkriptionsfaktors *Early growth response protein 1* (Egr-1), welcher multiple proinflammatorische Faktoren reguliert, in *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen nach LPS-Stimulation reduziert. Sowohl im Tier- als auch im Zellkulturmodell zeigten sich nach LPS-Stimulation bei PLD1-Defizienz geringere Konzentrationen von Apoptosemarkern. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten somit darauf hin, dass PLD1-Defizienz im Modell der gramnegativen Sepsis mit einem milderem Entzündungsverlauf und mit weniger Organschäden assoziiert ist.

Die pharmakologische Modulation von PLD1 könnte dementsprechend für die Therapie der gramnegativen Sepsis und möglicherweise auch für die Therapie chronischer Erkrankungen von Interesse sein.

## Summary

Sepsis describes a systemic reaction to an infection in which a dysregulated immune response leads to potentially life-threatening organ dysfunction. It is associated with high mortality and has been recognized as a "Global Health Priority" by the World Health Organization (WHO).

In general, all infections can evolve into sepsis through inadequate immune response. The most common triggers for sepsis are bacterial infections, particularly those caused by *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli*. The latter is one example for gram-negative bacteria that can provoke sepsis via lipopolysaccharide (LPS), present in the outer membrane of their cell wall.

During infections with gram-negative bacteria, LPS is recognized by cells of the innate immune system and activates pro-inflammatory signaling cascades via binding to Toll-like receptor 4 (TLR4). As a result, soluble inflammatory mediators such as cytokines, in particular tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), are produced and released. These mediators act as a potent stimulus for the innate and adaptive immune response. Via hematogenous spread of the mediators and pathogens, a local infection can cause a systemic, dysregulated immune reaction. Thus, cell-damaging factors accumulate and microcirculatory disorders can occur. This can lead to hypoxia and eventually to multi-organ failure.

As a phospholipid-degrading enzyme, phospholipase D1 (PLD1) is involved in a variety of cellular mechanisms such as cytoskeletal organization or membrane transport. Various studies have described an involvement of PLD1 in immunological processes. In this work, the influence of PLD1 on the LPS-induced immune response in a mouse and cell culture model was investigated. After LPS stimulation, *Pld1*<sup>-/-</sup>-mice showed lower TNF- $\alpha$  plasma levels than *Pld1*<sup>+/+</sup>-mice. As a possible cause, this work detected modulations of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. Furthermore, the expression of the transcription factor Early growth response protein 1 (Egr-1), which regulates multiple proinflammatory factors, was reduced in *Pld1*<sup>-/-</sup>-mice compared to *Pld1*<sup>+/+</sup>-mice after LPS stimulation. Moreover, PLD1 deficient animals and cell cultures showed lower concentrations of apoptosis markers after stimulation with LPS. This work thus indicates that PLD1 deficiency in the model of gram-negative sepsis is associated with a milder course of inflammation and less organ damage.

Accordingly, the pharmacological modulation of PLD1 could be of interest for the therapy of gram-negative sepsis and possibly also for the therapy of chronic diseases.

# Abkürzungsverzeichnis

#	Bestellnummer
%	Prozent
°C	Grad Celsius
<i>A. dest.</i>	destilliertes Wasser
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP-1	<i>activator protein 1</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
BSA	bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Ca.	Circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT-Wert	<i>cycle threshold</i>
DAG	Diacylglycerin
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i>
dl	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's Eagle Modified Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Egr-1	<i>Early Growth Response Protein 1</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal regulated kinase 1/2</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Association</i>
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
G	Gauge
g	Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPIb	Glykoprotein Ib
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde ( <i>hour</i> )
H <sub>2</sub> O	Wasser

HCL	Salzsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IgG	Immunglobulin-G
IKK	<i>I-<math>\kappa</math>B kinase</i>
IL	Interleukin
INF $\beta$	Interferon- $\beta$
IP	Immunpräzipitation
IRAK-4	Il-1 Rezeptor assoziierte Kinase-4
JNK	<i>C-Jun-N-terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
L	Liter
LANUV	Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LPA	Lysophosphatidsäure
LPP	<i>lipid phosphate phosphatase</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1	<i>Macrophage – 1 antigen</i>
MAL	<i>MyD88 adaptor like</i>
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAP3K	<i>mitogen-activated protein 3 kinase</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation factor 2</i>
MEFs	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MFI	mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MW	Mittelwert
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NEAA	<i>non-essential amino acids</i>
NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
nm	Nanometer

NO	Stickstoffmonoxid
PA	<i>phosphatidic acid</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PaO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	<i>Personal Computer</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potential des Wasserstoffs, lat. <i>pondus hydrogenii</i>
PLA1/2	Phospholipase A1/2
PLD	Phospholipase D
PMA	<i>phorbol-12 myristate 13 acetate</i>
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SARM	<i>sterile-<math>\alpha</math> and armadolli motif-containing protein</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SOFA	<i>Sepsis-related organ failure assessment</i>
T – PBS	Phosphat gepufferte Saline mit Tween™ 20
TAK1	<i>TGF-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TF	<i>Tissue Factor</i>
TFPI	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-related adaptor protein inducing interferon</i>
v.a.	vor allem
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf
$\mu$ l	Mikroliter

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Sepsis	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie	1
1.1.2	Pathomechanismus der Sepsis	3
1.1.2.1	Immunologische Prozesse in der gramnegativen Entzündung	3
1.1.2.2	Der Transkriptionsfaktor <i>Early Response Protein</i> (Egr-1)	6
1.1.2.3	Zytokine in der Sepsis	7
1.1.2.4	Neutrophile Granulozyten und ihre Doppelrolle in der Immunantwort	7
1.1.2.5	Aktivierung und Dysregulation des Gerinnungssystems in der Sepsis	9
1.1.2.6	Dysregulation der Immunantwort	10
1.1.3	Aktuelle Therapieansätze	11
1.2	Phospholipase D	12
1.2.1	Phospholipase D – Vorkommen und Funktion	12
1.2.2	Die Rolle von PLD1 in der Entzündung	13
1.3	Zielsetzung der Arbeit	14
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Material	16
2.1.1	Gebrauchsmaterial	16
2.1.2	Geräte	17
2.1.3	Chemikalien	18
2.1.4	Kits	21
2.1.5	Software	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Tierexperimentelle Versuche	22
2.2.1.1	LPS-vermitteltes <i>in vivo</i> Sepsismodell	22
2.2.1.2	Blutentnahme, Messung der Zellzahlen und Plasmagewinnung	22
2.2.1.3	Organentnahme – und Aufbereitung	23
2.2.1.4	Durchflusszytometrie zur Analyse von Zellaggregaten und Oberflächenmarkern	24
2.2.1.5	Messung der Transaminasen und der Laktatdehydrogenase zur Untersuchung einer insbesondere hepatischen Zellschädigung	25
2.2.1.6	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) zur Untersuchung der humoralen Immunantwort	26
2.2.1.7	Molekularbiologische Methoden – Quantitative Echtzeit-PCR	27
2.2.2	Histologische Untersuchungen	30
2.2.2.1	Hämalaun-Eosin-Färbung von Leber- und Lungengewebe	30
2.2.2.2	Immunhistochemische Caspase-Färbung	31
2.2.3	Zellkulturtechnik	32
2.2.3.1	Kultivierung von <i>mouse embryonic fibroblasts</i> (MEFs)	32
2.2.3.2	Bestimmung der Zellkonfluenz	33
2.2.3.3	Erstellung von Lysaten aus MEFs	34
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden	34
2.2.4.1	Western Blot	34
2.2.4.2	Caspase-Assay	36
2.2.5	Statistische Datenanalyse	37

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	PLD1 moduliert die TNF- $\alpha$ -Expression und Freisetzung in der LPS-induzierten Sepsis	38
3.1.1	PLD1 moduliert den TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel nach LPS-induzierter Inflammation	38
3.1.2	PLD1 moduliert die Phosphorylierung von MEK1/2 und die Protein-Expression von Egr-1	39
3.1.3	PLD1 führt nach LPS-Stimulation zu einer verstärkten relativen Expression von Egr-1 in Lebergewebe	41
3.2	PLD1 moduliert die zelluläre Immunantwort in der LPS-induzierten Entzündung	42
3.2.1	PLD1 beeinflusst die Leukozytenzahl im Blut nach LPS-Stimulation	42
3.2.2	PLD1 beeinflusst die Mac-1-Expression von Neutrophilen nach LPS-Stimulation	43
3.3	PLD1 beeinflusst Faktoren der Blutgerinnung in der LPS-induzierten Sepsis	44
3.3.1	PLD1 beeinflusst die LPS-induzierte Thrombozytopenie	45
3.3.2	PLD1 zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten in der LPS-induzierten Sepsis	46
3.4	PLD1-defiziente Mäuse zeigen nach LPS-Stimulation weniger Schäden von Leber und Lunge	46
3.4.1	<i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse zeigen 24 h nach LPS-Stimulation signifikant niedrigere Plasmaspiegel von ALT und LDH im Vergleich zu <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> -Mäusen	47
3.4.2	<i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> -Mäuse zeigen nach LPS-Stimulation vermehrt thrombotische Läsionen in Leber – und Lungengewebe verglichen mit <i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen	48
3.5	PLD1 moduliert die Zellapoptose	50
3.5.1	PLD1-Defizienz ist mit reduzierter Apoptose LPS-stimulierter MEFs assoziiert	51
3.5.2	PLD1-defiziente Mäuse zeigen nach LPS-Stimulation weniger Zellapoptose in Leber und Lunge	52
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>54</b>
4.1	PLD1 beeinflusst die TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel in der durch gramnegative Bakterien induzierten Sepsis	55
4.2	PLD1-Defizienz verhindert die maximale Egr-1-Expression nach LPS-Stimulation	56
4.3	PLD1 moduliert die TNF- $\alpha$ -Expression über den MAP3K-Signalweg	58
4.4	PLD1 und die zelluläre Immunantwort	59
4.5	PLD1 wirkt in der LPS-induzierten Entzündung modulierend auf die Hämostase	60
4.6	PLD1 und die Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten in der LPS-induzierten Sepsis	62
4.7	Endorganschäden in der Sepsis in Abhängigkeit von PLD1	63
4.7.1	Funktionsbeeinträchtigung der Leber	63
4.7.2	Die PLD1-Defizienz geht mit einer geringeren Apoptoserate einher	64
4.8	Zusammenfassung, Kritik und Ausblick	65
<b>5</b>	<b>Anhang</b>	<b>67</b>
5.1	Literaturverzeichnis	67
5.2	Abbildungsverzeichnis	75
5.3	Tabellenverzeichnis	76
5.4	Danksagung	77

# 1 Einleitung

## 1.1 Sepsis

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Die Sepsis ist eine schwerwiegende systemische Reaktion des Organismus auf eine Infektion, bei der es zu einer lebensbedrohlichen, dysregulierten Immunantwort mit Organdysfunktion kommt [1,2].

Von einem primären infektiösen Fokus ausgehend, greift eine Immunreaktion im Krankheitsverlauf auf den gesamten Organismus über und richtet sich schließlich auch gegen körpereigenes Gewebe. Hierdurch kann es zum Multiorganversagen und Schockgeschehen kommen [3]. Da mehrere Organsysteme zeitgleich betroffen sind, handelt es sich bei diesem Krankheitsbild um einen Symptomkomplex. Die Definition der Sepsis wurde mit zunehmenden wissenschaftlichen und klinischen Erkenntnissen mehrfach modifiziert. Ursprünglich stammt der Begriff Sepsis aus dem Griechischen und bedeutet so viel wie Zersetzung [4]. 1991 wurde die Sepsis erstmalig von einer Konsensuskonferenz definiert, welche zwischen *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS), Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock unterschied. Um neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie zu berücksichtigen und eine genauere und schnellere Diagnostik zu ermöglichen, wurde zuletzt 2016, initiiert durch die *Society of Critical Care Medicine* und die *European Society of Intensive Care Medicine*, eine aktualisierte Definition der Sepsis veröffentlicht. Hiernach charakterisiert die Sepsis eine lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer dysregulierten Immunantwort in Folge einer Infektion [2].

Zur klinischen Diagnostik und zur Erfassung des Schweregrades einer Sepsis wird die Funktion verschiedener Organsysteme zeitgleich betrachtet. Zur Beurteilung der Organfunktionen soll ein Scoring System verwendet werden. Der sogenannte *Sequential (sepsis related) Organ Failure Assessment Score* (SOFA) umfasst die in Tabelle 1.1 gezeigten Parameter, wobei in jeder Kategorie je nach Schweregrad bis zu 4 Punkte erreicht werden können. Ein Anstieg um 2 oder mehr Punkte wird als Indikator für eine Organdysfunktion gewertet [5].

Lunge	arterieller Sauerstoffpartialdruck [mmHg] / inspiratorische Sauerstoffkonzentration [%] (PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> )
Niere	Kreatinin [mg/dl]
Leber	Bilirubin [mg/dl]
Kreislauf	Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) oder Einsatz von Vasopressoren
Blutbild	Thrombozytenzahl
ZNS	<i>Glasgow Coma Scale (GCS)</i>

**Tabelle 1.1 Kriterien des SOFA Score**

Zur schnellen Identifikation kritisch kranker Patienten wird der *quickSOFA Score* (qSOFA) verwendet (Tabelle 1.2). Eine Sepsis wird angenommen, wenn mindestens zwei Kriterien zutreffen.

Verändertes Bewusstsein	GCS <15
Atemfrequenz	≥ 22/min
Systolischer Blutdruck	≤ 100 mmHg

**Tabelle 1.2 Kriterien des qSOFA Score**

Als septischer Schock wird ein Zustand bezeichnet, bei dem trotz adäquater Volumentherapie Vasopressoren benötigt werden, um einen mittleren arteriellen Druck von mindestens 65 mmHg zu erhalten und bei dem ein Serumlaktatspiegel von über 2 mmol/L vorliegt [5].

Weltweit ist die Sepsis eine der häufigsten Todesursachen in Krankenhäusern. In Industrienationen zeigte sich über die letzten Jahrzehnte ein Anstieg der Inzidenz, was am ehesten durch die insgesamt alternde und damit vulnerablere Bevölkerung zu erklären ist. Laut einer Studie aus den USA aus dem Jahr 2012, liegen die Inzidenzen von Patienten mit Sepsis bereits höher als die von Patienten mit Herzinfarkt oder Schlaganfall [6,7]. Für Deutschland wurde anhand von Abrechnungsdaten eine Inzidenz von ca. 300000 Fällen

pro Jahr mit einer steigenden Tendenz angegeben [8]. Dank eines früheren Erkennens und damit schnelleren Therapiebeginns ist die Mortalität tendenziell gering rückläufig. Die in der Literatur vorhandenen Daten unterliegen jedoch recht großen Schwankungen, was unter anderem dadurch bedingt ist, dass sich die meisten epidemiologischen Erhebungen lediglich auf *high-income countries* beziehen. Schätzungen zufolge sind weltweit jährlich etwa 30 Millionen Menschen betroffen und es ist von bis zu 6 Millionen Todesfällen auszugehen [9].

### 1.1.2 Pathomechanismus der Sepsis

In den meisten Fällen ist eine bakterielle, häufig durch gramnegative Bakterien induzierte, Infektion für das Entstehen der Sepsis verantwortlich. Prinzipiell kann sie jedoch auch durch andere Erreger wie Viren oder Pilze ausgelöst werden. Die Pathogene müssen hierfür zunächst in den Körper eindringen und die natürlichen Schutzbarrieren wie Haut und Schleimhäute überwinden. Anschließend werden Erregerbestandteile, die sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen erkannt. Mit Hilfe von Oberflächenrezeptoren, den *pattern recognition receptors* (PRRs), detektieren die Zellen des angeborenen Immunsystems die PAMPs. Die Immunzellen können die Pathogene je nach Größe und Erreger direkt phagozytieren, zytotoxische Faktoren freisetzen und außerdem die adaptive Immunantwort einleiten [1,10]. In dieser Arbeit wird die gramnegative Sepsis in Zellkultur und im Tiermodell untersucht. Deshalb wird die durch gramnegative Bakterien ausgelöste Immunantwort im Folgenden konkreter beschrieben.

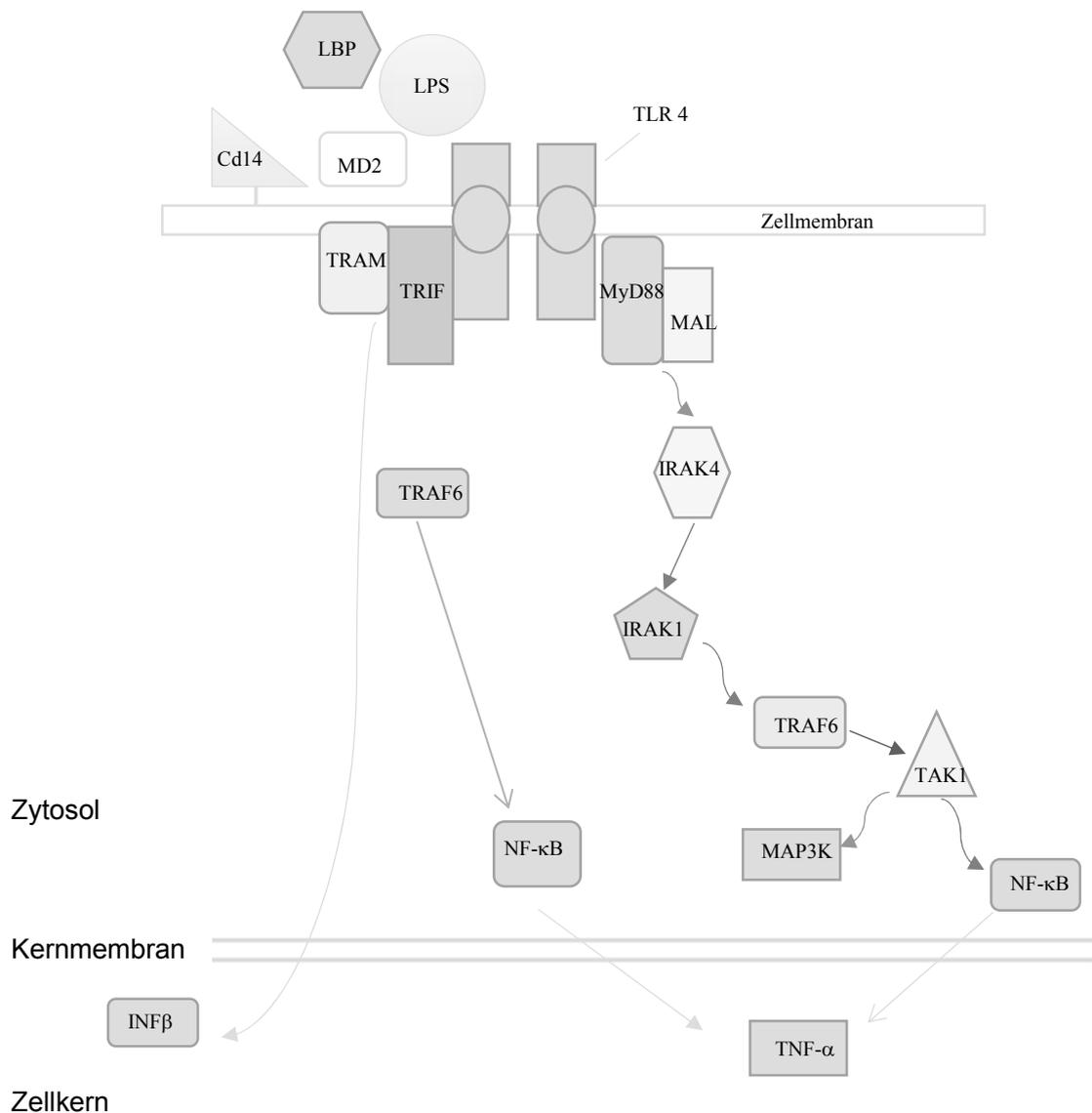
#### 1.1.2.1 Immunologische Prozesse in der gramnegativen Entzündung

Gramnegative Bakterien enthalten in ihrer Zellwand als zentrales Strukturelement das Lipopolysaccharid (LPS), ein mikrobielles Toxin, welches zur Gruppe der PAMPs gehört. Es ist ein potenter Stimulus der angeborenen Immunantwort und somit häufiger Auslöser der Sepsis [11-13]. Das LPS wird zunächst von dem Plasmaprotein *LPS-binding protein* (LBP) erkannt, mit dem monozytären Antigen *Cluster of Differentiation 14* (CD14) markiert und über diesen Komplex an *Toll-like receptor 4* gebunden (TLR4) [14,15].

*Toll-like* Rezeptoren sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und gehören zur Gruppe der PRRs [16]. Als Transmembranrezeptoren besitzen sie sowohl extra- als auch intrazelluläre Anteile. Nach LPS-Stimulation kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors

und darüber zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, welche unter anderem die Produktion proinflammatorischer Zytokine (1.1.2.3) induzieren. Bei der Interaktion von LPS und TLR4 wirkt außerdem das Protein *myeloid differentiation factor 2* (MD-2) als Kofaktor, indem es die LPS-Sensitivität zusätzlich steigert [11,17].

Wenn es durch LPS zur Rezeptoraktivierung gekommen ist, erfolgt die intrazelluläre Signalübertragung über verschiedene Adapterproteine (diese enthalten alle eine *Toll/IL-1receptor* (TIR) Domäne) und mehrere Phosphorylierungsschritte. Vereinfacht ist dies in Abbildung 1.1 dargestellt. Zu den bekannten Adapterproteinen zählen *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), *TIR-related adaptor protein inducing interferon* (TRIF), *MyD88 adaptor like* (MAL), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) und *sterile- $\alpha$  and armadoll motif-containing protein* (SARM). Bezüglich der intrazellulären Signalweiterleitung wird zwischen einem MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen, bzw. TRIF-abhängigen Signalweg unterschieden [18,19]. MyD88 ist ein von *Toll-like* Rezeptoren genutztes Adapterprotein, welches auch in der durch TLR4 ausgelösten Kaskade eine bedeutende Rolle spielt [20]. Hierbei kommt es zunächst zur Bindung von MyD88 an den zytoplasmatischen Teil des TLR4. MyD88 rekrutiert daraufhin *interleukin-1 receptor-associated kinase 4* (IRAK-4). Durch Phosphorylierung kommt es zur Aktivierung von IRAK-1 und zur Assoziation mit der Ubiquitin-Ligase *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6). In der aktivierten Form rekrutiert TRAF6 *TGF- $\beta$ -activated kinase 1* (TAK1), welche zur *mitogen-activated protein 3 kinase* (MAP3K)-Familie gehört. TAK1 setzt daraufhin einerseits die MAP3K-Kaskaden in Gang und führt unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *activator protein 1* (AP-1). Andererseits phosphoryliert TAK1 den *I- $\kappa$ B kinase*-Komplex (IKK), wodurch über mehrere Schritte *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) freigesetzt und in den Zellkern verlagert wird [18].



**Abb. 1.1 Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden nach LPS-Bindung an TLR 4**

Lipopolysaccharid (LPS) bindet mit Hilfe von *LPS binding protein* (LBP) und *myeloid differentiation factor 2* (MD2) und dem Antigen *cluster of differentiation 14* (Cd 14) an *toll-like receptor 4* (TLR 4), wodurch es zur Dimerisierung von TLR4 und folgend zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden kommt. Über den intrazellulären, aktivierten Anteil von TLR4 kommt es zur Signalweiterleitung über das Adapterprotein *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) mit dem Faktor *MyD88 adaptor like* (MAL). Diese rekrutieren *interleukin-1 receptor-associated kinase 4* (IRAK4), welche die Aktivierung von *interleukin-1 receptor-associated kinase 1* (IRAK1) induziert. Über die Assoziation mit *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6) kommt es zur Rekrutierung von *TGF- $\beta$ -activated kinase 1* (TAK1). Dieses aktiviert einerseits den *mitogen-activated protein 3 kinase* Signalweg (MAP3K). Es induziert andererseits die Verlagerung von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) in den Zellkern. Beides führt unter anderem zu einer gesteigerten Produktion von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Neben dem MyD88-Signalweg existiert noch ein *TIR-related adaptor protein inducing interferon* (TRIF)-abhängiger Signalweg. TRIF führt zusammen mit *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) zur Interferon- $\beta$ -Produktion (INF $\beta$ ) [18-20].

Die MAPK-Kaskaden bestehen jeweils aus mehreren aufeinander folgenden Kinasen. Diese werden über Phosphorylierungsschritte aktiviert (Abbildung 1.2). Die Kaskaden verlaufen über drei Hauptwege, *extracellular signal regulated kinase 1/2* (ERK1/2), *C-Jun-N-terminal kinase* (JNK) und p38-MAP-Kinase und führen letztlich über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Expression bestimmter Zielgene und damit zum Fortlauf der Immunreaktion [21].



**Abb. 1.2 schematische Darstellung der MAP3K-Kaskade**

Durch extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Strahlung, oxidativen Stress etc. kann die Kinase-Kaskade aktiviert werden. Über mehrere Phosphorylierungsschritte kommt es zu einer Adaptation der Zellantwort [21].

Sowohl durch die MAPK-Kaskaden als auch durch NF- $\kappa$ B kommt es zur vermehrten Produktion und Freisetzung proinflammatorischer Faktoren. Hierzu zählen beispielsweise Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Cyclooxygenase-2 oder Kollagenase-1 [22,23]. Neben dem MyD88-Signalweg existiert noch ein TRIF-abhängiger Signalweg. TRIF führt zusammen mit TRAM über mehrere Zwischenschritte zu einer MyD88-unabhängigen Interferon- $\beta$ -Produktion [18].

#### 1.1.2.2 Der Transkriptionsfaktor *Early Growth Response Protein 1* (Egr-1)

MAP3K-Signalwege führen über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Expression von Zielgenen. Ein relevanter Transkriptionsfaktor ist Egr-1, ein Zinkfingerprotein, dessen Expression von verschiedenen Stimulatoren wie LPS, oxidativem Stress, Zytokinen oder Wachstumsfaktoren gesteigert wird [24,25]. Im Zusammenhang mit den MAP3K-Signalkaskaden wurde insbesondere für den ERK-Weg eine Aktivierung von Egr-1 beschrieben [26,27]. Egr-1 spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation von multiplen Zielgenen im Rahmen von akuten und chronischen Entzündungsprozessen und reguliert u.a. TNF- $\alpha$ , *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), *Tissue Factor* (TF) und viele mehr [26-28]. Aufgrund seiner kinetischen Eigenschaften wird es zu den „*immediate-early response*“-Proteinen gezählt. Beispielsweise konnte Egr-1 im murinen Ileusmodell als Schlüsselfaktor in der Initiation der frühen postoperativen Entzündungsreaktion identifiziert werden [26].

### 1.1.2.3 Zytokine in der Sepsis

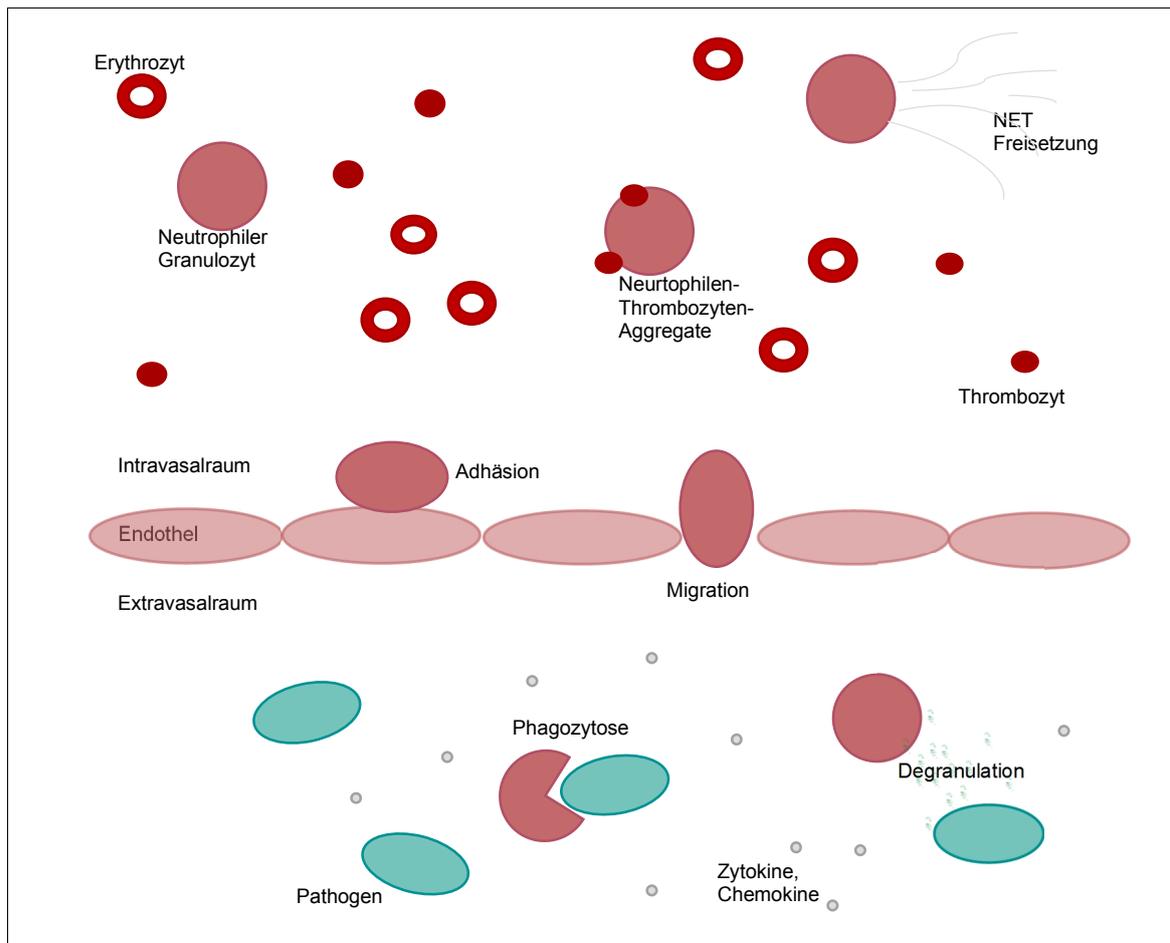
Der Begriff Zytokin umschreibt eine heterogene Gruppe kleiner Proteine (<40 kDa), welche von unterschiedlichen Zellen gebildet werden und regulierende Funktionen auf Wachstum und Differenzierung, sowie auf die Zellinteraktion in immunologischen Prozessen haben [27]. Sie lassen sich je nach Ursprungszelle und Funktion weiter unterkategorisieren und werden dann entsprechend als Lymphokine, Interleukine oder Chemokine bezeichnet [27,28]. In inflammatorischen Erkrankungen wie der Sepsis spielen sie eine Rolle bei der Entstehung, Aufrechterhaltung und Beseitigung der Entzündungsreaktion. Es wird dabei zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen unterschieden [29]. Zu den am besten untersuchten proinflammatorischen Zytokinen zählt TNF- $\alpha$ . Dieser Faktor wurde 1975 erstmals von Carswell *et al.* beschrieben [30]. Bei TNF- $\alpha$  handelt sich um ein 17kDa großes Protein, das größtenteils von Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und teilweise auch von Fibroblasten produziert wird [31]. Seine Hauptaufgaben bestehen in der Aktivierung von Immunzellen, u.a. Makrophagen (im Sinne eines *feedforward-loop*), der Aktivierung von Endothelzellen, der Stimulation von Thrombozyten und somit gesteigerten Blutgerinnung und der Initiation von Apoptoseprozessen. Außerdem hat TNF- $\alpha$  eine pyrogene Wirkung und verstärkt die hepatische Synthese von Akute-Phase-Proteinen [1,32,33]. Ähnliche Wirkungen zeigen IL-1 und IL-6. Daneben zählen Interferon- $\gamma$ , *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und weitere Interleukine, v.a. die der IL-20-Familie, zu den proinflammatorischen Faktoren. Zu den antiinflammatorischen Zytokinen zählen IL-1-Rezeptor-Antagonist, IL-4, IL-10, IL-11 und weitere [34]. Zur Beseitigung einer Infektion und Entzündungsreaktion sind sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Faktoren notwendig. Kommt es hierbei jedoch zu einer Dysregulation mit einer übermäßigen Zytokinproduktion - einem sogenannten „Zytokinsturm“ - kann es zu Gewebe- und Organschäden kommen und die Infektion kann nicht hinreichend beseitigt werden [29,34,35].

### 1.1.2.4 Neutrophile Granulozyten und ihre Doppelrolle in der Immunreaktion

Neutrophile Granulozyten sind im Knochenmark gebildete Leukozyten, welche im gesunden Organismus kontinuierlich ins Blut freigesetzt werden und dort in relativ konstanter Zahl vorliegen. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind sie an der unmittelbaren Abwehr eindringender Pathogene beteiligt. Während einer Entzündungsreaktion werden im Knochenmark vermehrt neutrophile Granulozyten produziert und in die Blutbahn freigesetzt. Geleitet von Chemokinen migrieren die

neutrophilen Granulozyten an den Ort der Infektion. In der Zielregion evozieren u.a. Zytokine eine Endothelzellaktivierung mit Ausbildung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM1 oder *Vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1) und induzieren eine vermehrte Gefäßpermeabilität. Die durch Zytokine aktivierten neutrophilen Granulozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche vermehrt Rezeptoren wie z.B. *Macrophage – 1 antigen* (Mac-1). Diese Rezeptoren interagieren mit den Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen, so dass die neutrophilen Granulozyten in das umliegende infizierte Gewebe migrieren können [33,36,37]. Am Ort der Infektion können die neutrophilen Granulozyten Pathogene phagozytieren und proteolytische Enzyme, zytotoxische Sauerstoffradikale wie beispielsweise Stickstoffmonoxid (NO) und weitere Zytokine freisetzen. Durch die gesteigerte NO-Freisetzung kommt es zudem zu einer zunächst lokalen und später generalisierten Vasodilatation und konsekutiv zu intravasalem Flüssigkeitsverlust mit der klinischen Folge von Hypotension und der Bildung von Ödemen [27,32,38,39].

Eine besondere Eigenschaft in der Immunreaktion von Neutrophilen ist die intravaskuläre Freisetzung von netzartigen DNA-haltigen Strukturen, den sogenannten *Neutrophil extracellular traps* (NETs). Mit ihnen können Pathogene insbesondere in kleinen Gefäßen wie Lebersinusoiden oder pulmonalen Kapillaren inaktiviert werden. Dies geht jedoch mit einer erhöhten Thromboseneigung einher, was durch die bereits bekannte Interaktion von Neutrophilen und Thrombozyten in der Entzündung zusätzlich verstärkt wird. Sowohl durch die Freisetzung zytotoxischer Substanzen als auch durch vermehrte Ischämien kann im Rahmen der Immunreaktion auch körpereigenes Gewebe geschädigt werden [40-43].



**Abb. 1.3 Funktionen der Neutrophilen im Rahmen der Immunantwort**

Stimuliert von proinflammatorischen Zytokinen werden in der Entzündung vermehrt neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn freigesetzt. Geleitet von Chemokinen migrieren die neutrophilen Granulozyten in die Zielregion. Intravasal interagieren die neutrophilen Granulozyten mit aktivierten Thrombozyten und können außerdem NETs freisetzen, mit welchen Pathogene inaktiviert werden können. Durch die Interaktion von Oberflächenrezeptoren (v.a. Mac-1) mit endothelialen Adhäsionsmolekülen können die neutrophilen Granulozyten den Intravasalraum verlassen und in das infizierte Gewebe einwandern. Dort können sie Pathogene phagozytieren, durch Degranulation zytotoxische Substanzen wie Sauerstoffradikale freisetzen und zur Aufrechterhaltung der Immunreaktion weitere proinflammatorische Zytokine sezernieren [39-43].

#### 1.1.2.5 Aktivierung und Dysregulation des Gerinnungssystems in der Sepsis

Die Sepsis geht in der Regel mit Veränderungen der Blutgerinnung einher. Das Gerinnungssystem wird von Thrombozyten, Plasmaproteinen und Endothelzellen gebildet, die auf komplexe Weise interagieren. In der Sepsis werden sie durch verschiedene proinflammatorische Faktoren wie Zytokine oder bereits aktivierte Immunzellen aktiviert und können sich gegenseitig kaskadenartig verstärken. Dieses Zusammenspiel von inflammatorischen und koagulatorischen Mechanismen wurde bereits vielfach beschrieben [44,45]. Eine Komplikation, die in diesem Zusammenhang auftreten kann, ist die

*disseminated intravascular coagulation* (DIC). Hierbei kommt es zu einer massiven Aktivierung des Gerinnungssystems mit multifokalen mikrovaskulären Thrombosen und daraus resultierenden Ischämien. Durch den konsekutiven Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten kann es dabei im Verlauf zu einer verstärkten Blutungsneigung kommen [3,46,47].

Verantwortlich für die im Entzündungszustand veränderte Hämostase ist die Aktivierung prokoagulatorischer - und gleichzeitig die Inhibition antikoagulatorischer Mechanismen [46]. Aktivierte Monozyten und Makrophagen exprimieren in der Entzündung verstärkt das Glykoprotein *Tissue factor* (Gewebethromboplastin, TF) auf ihrer Oberflächenmembran. TF führt bei Kontakt mit dem Blut zur Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade und wird im gesunden Zustand primär von subendothelial lokalisierten Zellen exprimiert, so dass es nur im Falle einer Gefäßverletzung zur Aktivierung des Gerinnungssystems kommt. In der Entzündung kann es durch die Expression von TF auf intravasalen Immunzellen entsprechend auch an Stellen ohne lokale Gefäßverletzung zur Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade kommen. Die extrinsische Gerinnungskaskade führt zur Aktivierung von Thrombin, einem Gerinnungsfaktor, welcher im aktiven Zustand zur Fibrinogenierung und Aktivierung von Thrombozyten führt [12,48]. Thrombozyten können darüber hinaus direkt durch Endotoxin oder proinflammatorische Zytokine aktiviert werden und führen ebenfalls zu einer verstärkten Fibrinogenierung [46]. Neben diesen gesteigerten prokoagulatorischen Mechanismen kommt es zusätzlich zur Hemmung antikoagulatorischer Vorgänge. Zu diesen zählen insbesondere das Protein C-System, Antithrombin und der *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI), welche hier jedoch nicht genauer erläutert werden [49-52]. Der dritte wesentliche Vorgang für das Gleichgewicht der Hämostase ist die Fibrinolyse. Auch diese wird in der Entzündung gehemmt und die Thromboseneigung somit gesteigert [3,8,25,30].

#### 1.1.2.6 Dysregulation der Immunantwort

Eine lokale Infektion kann in den meisten Fällen durch unser Immunsystem bekämpft und beseitigt werden. Dabei besteht in der Regel ein Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Faktoren. Wenn es jedoch zur systemischen Dissemination von Pathogenen oder ihrer Toxine kommt, kann sich die Immunantwort exponentiell steigern, da die zuvor beschriebenen immunologischen Prozesse nicht mehr lokal, sondern multifokal stattfinden. Neben der gegen das Pathogen gerichteten Reaktion kann es hierbei auch zur Schädigung körpereigenen Gewebes und damit zu Nekrosen kommen. Die PRRs erkennen dabei neben den PAMPs auch

Molekülstrukturen endogener geschädigter Zellen, sogenannte *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Dies kann ebenfalls zur Aktivierung proinflammatorischer Kaskaden und damit zu einer weiteren Steigerung der Immunantwort im Sinne eines *feed-forward*-Mechanismus führen [51]. Durch die zunehmende Schädigung körpereigenen Gewebes kann es schließlich zum Multiorganversagen und einem Zustand der Immunsuppression kommen, wodurch die Infektion nicht mehr beseitigt werden kann [13,53].

### 1.1.3 Aktuelle Therapieansätze

Bei der Sepsis handelt es sich um ein akut lebensbedrohliches Krankheitsbild. Eine frühzeitige Diagnose und ein zeitnaher Therapiebeginn sind deshalb entscheidend. Die Therapie besteht primär in der Sanierung der Infektionsquelle, der antimikrobiellen Therapie und der supportiven Kreislaufunterstützung. Die *Surviving Sepsis Campaign* veröffentlicht seit 2004 regelmäßig aktualisierte, evidenzbasierte Guidelines zur Sepsistherapie. Die Version aus dem Jahr 2018 enthält als zentralen Baustein das *1-Hour Sepsis Bundle* (Tabelle 1.3) [3]. Dieses umfasst die Maßnahmen, welche innerhalb der ersten Stunde durchgeführt werden sollten. Die vorherigen Guidelines enthielten ein 3 h und 6 h *Bundle*, welche in der aktuellen Version in dem 1 h *Bundle* zusammengefasst werden. Hierdurch wird der zeitliche Aspekt des Therapiebeginns als relevanter Faktor hervorgehoben [54].

- Abnahme von Blutkulturen
- Gabe von Breitspektrumantibiotika
- Bei Hypotension oder Laktat  $\geq 4$  mmol/L Gabe von Kristalloiden (30 ml/kgKG)
- Gabe von Vasopressoren bei unter Flüssigkeitstherapie anhaltender Hypotension um einen MAP von  $\geq 65$  mmHg zu erhalten
- Laktatmessung, Wiederholung wenn initial  $\geq 2$  mmol/L

**Tabelle 1.3 Therapieansatz 1 - Hour Bundle**

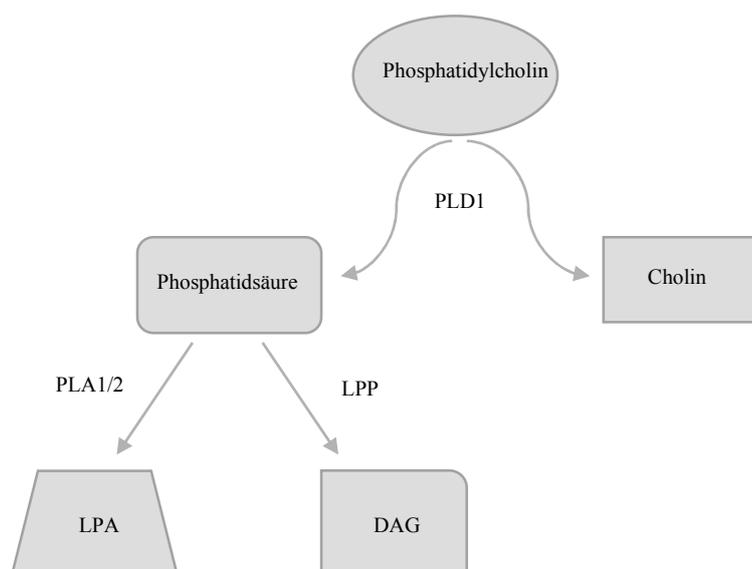
Die übermäßige Immunreaktion ist eine besondere Herausforderung in der Sepsis, weshalb ein großes Interesse an der Erforschung immunmodulatorischer Therapiestrategien besteht. Es wurden bereits Therapieversuche mit Glukokortikoiden, der spezifischen

Blockade von proinflammatorischen Faktoren wie TNF- $\alpha$  oder IL-1, der Applikation von Immunglobulinen und vielen weiteren Strategien zur Beeinflussung der Immunantwort unternommen. Bisher konnten die zum Teil im Tierversuch vielversprechenden Maßnahmen im klinischen Einsatz keine eindeutigen Erfolge zeigen [55,56]. Die Deutsche Sepsis-Gesellschaft gibt deshalb in ihrer aktuellen S3 Leitlinie (Stand 2020) keine generelle Empfehlung für den Einsatz derartiger Therapien [57]. Die Identifikation und Erforschung immunmodulatorischer Therapien bleibt dennoch ein vielversprechender Teil aktueller Forschung und ist auch das zentrale Thema dieser Arbeit [3,10].

## 1.2 Phospholipase D

### 1.2.1 Phospholipase D – Vorkommen und Funktion

Phospholipase D (PLD) ist eine Phosphodiesterase, deren Vorkommen in Säugetieren 1973 erstmals durch Saito und Kanfer beschrieben wurde [58,59]. Sie hydrolysiert Phosphatidylcholin zu Cholin und Phosphatidsäure (*phosphatidic acid*; PA), welches als *second messenger* oder als Vorläufer von den ebenfalls bioaktiven Molekülen Diacylglycerin (DAG) und Lysophosphatidsäure (LPA) wirkt [60].



**Abb. 1.4 Spaltung von Phosphatidylcholin durch PLD1**

Phospholipase D1 spaltet Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure und Cholin. Phosphatidsäure wird durch Phospholipase A1/2 (PLA1/2) zu Lysophosphatidsäure (LPA) und durch *lipid phosphate phosphatase* (LPP) zu Diacylglycerin (DAG) umgesetzt [63].

Darüber hinaus ist PLD an vielfältigen zellulären Prozessen wie Membrantransport, Phagozytose, zytoskelettale Organisation, neuronale Stimulation oder Neutrophilenmigration beteiligt [61-63]. Als regulierendes und immunologisch wirksames Enzym spielt PLD u.a. in Erkrankungen wie Krebs, Alzheimer, koronaren Herzerkrankungen, Schlaganfall und Erkrankungen des autoimmunen Formenkreises eine Rolle [62,64,65].

In Säugetieren sind zwei Isoformen der PLD - Phospholipase D1 (PLD1) und Phospholipase D2 (PLD2) - bekannt, welche ubiquitär exprimiert werden und zu etwa 55% homolog sind. Sie werden von verschiedenen Faktoren wie Fettsäuren, Proteinkinasen, Calcium, Wachstumsfaktoren, Neurotransmittern, *reactive oxygen species* (ROS) und Guanosintriphosphat (GTP)-bindenden Proteinen reguliert. Für PLD2 wurde eine deutlich höhere basale Aktivität nachgewiesen als für PLD1, wogegen die Aktivität von PLD1 nach Stimulation durch *phorbol-12 myristate 13 acetate* (PMA) verglichen mit PLD2 deutlich stärker anstieg [66-70].

### 1.2.2 Die Rolle von PLD1 in der Entzündung

Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe sowie viele weitere Studien zeigen, dass PLD1 eine bedeutende Funktion in entzündlichen Prozessen einnimmt. Ein Hinweis dafür ist, dass die Expression von PLD1 im Entzündungszustand hochreguliert wird [71]. Dies wurde beispielsweise im Rahmen der Peritonitis, der rheumatoiden Arthritis, des Herzinfarktes, der Alzheimer-Erkrankung oder des ischämischen Schlaganfalls gezeigt [72-77]. Darüber hinaus besteht eine Interaktion mit der Expression und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, sowie der Adhäsion und Migration von Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten, Makrophagen etc. [61,72,78]. Norton *et al.* beschreiben PLD1 außerdem als notwendig für eine effiziente ROS-Produktion in neutrophilen Granulozyten und damit als relevant für die Funktionsfähigkeit von Neutrophilen in der Inflammation [79].

Der genaue Mechanismus, über den PLD1 im Rahmen der Immunantwort wirksam wird, ist noch nicht bis ins Detail verstanden und Gegenstand dieser Arbeit. Studien weisen bereits auf eine Wirkung über den NF- $\kappa$ B- und die MAP3K-Signalwege hin [71,80,81]. Oh *et al.* beschreiben beispielsweise einen Zusammenhang von LPS und PLD1 über den TLR4/MyD88-Signalweg und eine daraufhin hochregulierte TNF- $\alpha$ -Produktion über JNK [82]. Kang *et al.* dagegen beschreiben für die rheumatoide Arthritis eine Modulation über den TRAF6/ERK/NF- $\kappa$ B- und den TRAF6/p38-Signalweg [74].

Ein weiterer interessanter Aspekt von PLD1 in der Entzündung ist der Einfluss von PLD1 auf die Aktivierung von Thrombozyten und die Bildung von Thrombosen. Elvers *et al.*

konnten in Mäusen mit PLD1-Defizienz eine reduzierte Aktivierung von Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  und folglich eine reduzierte Thrombenbildung nachweisen. Durch die Modulation der Blutgerinnung könnte die Funktion von PLD1 im Rahmen der Sepsis bei der Ausbildung der DIC relevant sein [65].

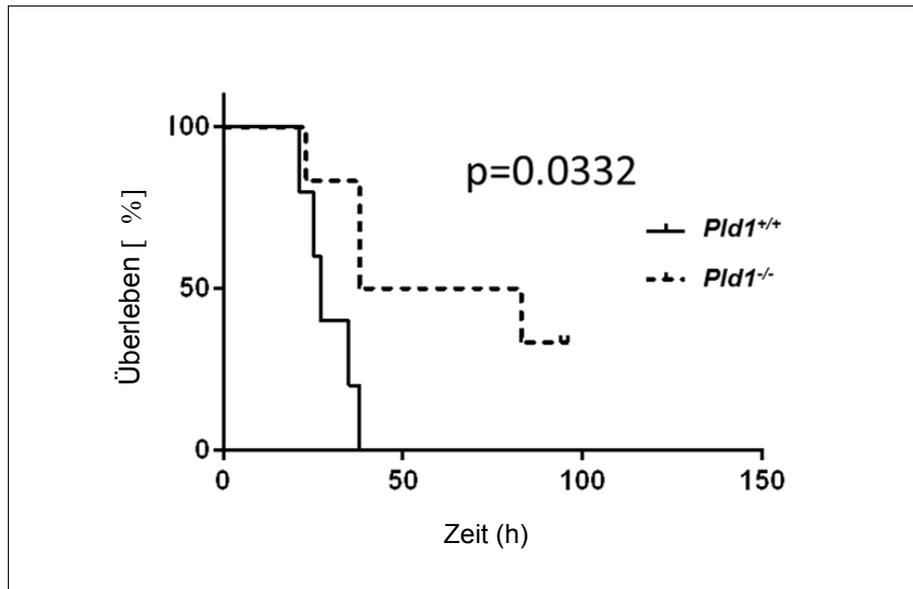
### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die Sepsis stellt trotz neuer, präziserer Definition und Weiterentwicklung in Diagnostik und Therapie im klinischen Alltag weiterhin eine große Herausforderung dar. Durch frühzeitigeres Erkennen und unverzüglichem Therapiebeginn konnte die Überlebensrate bereits verbessert werden. Die aktuellen, von den Leitlinien vorgesehenen Therapiestrategien beschränken sich jedoch primär auf die antimikrobielle und additive, kreislaufunterstützende Therapie. Gezielte pharmakologische Konzepte, welche auf die besondere Situation des Immunsystems in der Sepsis abzielen, konnten bisher nicht etabliert werden.

Wie Vorarbeiten aus unserer und anderen Arbeitsgruppen zeigen, ist PLD1 als Phospholipid-degradierendes Enzym an der Regulation der Immunantwort beteiligt. Hier scheint es insbesondere an der Modulation proinflammatorischer Schlüsselzytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$  mitzuwirken. PLD1 könnte daher eine interessante Zielstruktur in der Sepsistherapie sein. Mitglieder unserer Arbeitsgruppe untersuchten den Einfluss von PLD1 auf das Überleben von Mäusen im Tiermodell der gramnegativen Sepsis. Hierbei zeigten Mäuse mit PLD1-Defizienz nach intraperitonealer LPS-Injektion einen Überlebensvorteil gegenüber der *Pld1*<sup>+/+</sup>-Vergleichsgruppe (Abbildung 1.5) [83].

In dieser Arbeit soll im *in vitro* Modell mit *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) und im *in vivo* Modell mit *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen der Zusammenhang von PLD1 und  $\text{TNF-}\alpha$  im Rahmen der gramnegativen Inflammation genauer untersucht werden, um die Funktion von PLD1 in inflammatorischen Signalkaskaden besser zu verstehen.

Des Weiteren soll der Einfluss von PLD1 auf die Funktion von Thrombozyten, die Entstehung von Mikrothromben und die Interaktion von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten im Rahmen der LPS-induzierten Sepsis untersucht werden.



**Abb. 1.5 Mortalität in Abhängigkeit von PLD1 nach i.p. LPS-Injektion**

*Pld1*<sup>+/+</sup> und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäuse nach i.p. Injektion von LPS (10 mg/kg KG); Monitoring für 100 h. N=10; p-Wert = 0.0332, Log-rank Mantel-Cox Test. Untersuchung durchgeführt und ausgewertet von Dr. med. vet. Irena Krüger [83].

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gebrauchsmaterial

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

## 2.1.2 Geräte

Hämatologie-Analysator	KX-21N; Sysmex
Blut-Analysator	Spotchem-biochemical analyzer EZ SP-4430 (AxionLaB/Arkray)
Binokular	Nikon SMZ25  Lichtquelle: Digital Slight DS-U3, Nikon
Blotkammer	Perfect blue Semi-Dry Elektrobloetter; PeqLab
CO <sub>2</sub> -Inkubator	CO <sub>2</sub> -Inkubator C150; Binder
Cycler	Mastercycler nexus gradient; Eppendorf
Durchflusszytometer	FACS Calibur; Becton Dickinson
ELISA-Plattenleser	Easyreader; Sunrise Tecan
Mikroplattenleser	GloMax®-Multi Detection System; Promega
Imager	Chemi Doc XRS; Bio Rad
Inkubator	D06059 Modell 300; Memmert
Laufkammer	Vertikale Doppelgelsysteme; PeqLab
Mikrotom	Mikrotom Heidelberg GmbH; D-6900 Heidelberg, Typ 400, FabrNr 299, #HM400
Mikroskop(e)	Axioskop; Zeiss  Objektive: Achroplan (40x) Plan-Neofluar (20x)  Kamera: AxioCam 105 color  Axio Observer – Inverses Mikroskop; Zeiss  Objektive: Plan Aplanachromat (100x) LD Plan-Neofluar (40x)  Kamera: AxioCam MRm; Zeiss AxioCam 502 color; Zeiss
Neubauerkammer	LaborOptik, 0.1mm Tiefe, 0.0025 mm <sup>2</sup>
pH-Meter	pH526; WTW
Photometer	BioPhotometer; Eppendorf

Sterilbank	BSB 3A; Gelaire Flow Laboratories
Stickstoffbehälter	MACH SM-43; MVE Cryogenics
Waage(n)	DKD-K-100502; Sartorius AE166; Mettler
Wasserbad	GFL 1052; GFL
Zentrifuge(n)	Zentrifuge 5424R; Eppendorf Laborfuge 400; Heraeus Zentrifuge 2-16P; Sigma

### 2.1.3 Chemikalien

4 x Sammelgel-Puffer	6.05 g Trisbase (Sigma, # SLBN9543V) 100 ml <i>A. dest.</i> 0.4 g SDS (Roth, # 2326.1) pH = 6,8
4 x Trenngelpuffer	91 g Trisbase 500 ml <i>A. dest.</i> 2 g SDS (Roth, # 2326.1) pH = 8,8
5 x TGE-Laufpuffer	15.1 g Trisbase 72 g Glycin (Sigma, # G8898-500G) 25 ml 20 % SDS (Roth, # 2326.1) 1000 ml <i>A. dest.</i> pH = 8,3 (auf 1 x mit <i>A. dest.</i> verdünnen zur Anwendung)

6 x Lämmli-Puffer	7 ml 4 x Tris / HCL / SDS; pH 6,8 3 ml Glycin (Sigma, # G8898-500G) 1 g SDS (Roth, # 2326.1) 0.93 g DTT (Sigma, # D0632-5g) 1.2 g Bromphenolblau (VWR, # 1.081 .220.005)
BSA	Sigma, # A7906
Citratpuffer	41 ml 0.1 M tri-Na-Citrat 9 ml 0.1 M Citronensäure 450 ml <i>A. dest.</i> pH 6.0
DMEM - Medium	Life Technologies, # 41965062
DMSO	Dimethylsulfatoxid, Sigma, # D2650
<i>DNaseI recombinant</i>	Roche, # 04716728001
<i>RNase - free</i>	
FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	Life Technologies, # 16010159
Formaldehyd	Sigma, # 47608
Gentamicin	Life Technologies, # 11140050
Heparin Natrium 2500	Ratiopharm, # 002304
IP-Puffer	15 mM Tris-Hydrochlorid 155 mM NaCL (Fresenius Kabi, # 15HM229B1) 1 mM EDTA (Sigma, # E9884) 0.005 % NaN <sub>3</sub> 1 L <i>A. dest.</i>
Isofluran	Pirmala critical care
Molekulargewichtsmarker	4 µl Precision Plus Protein Western C- Standard Sample

	(Biorad; # 161-0376) 1 µl Precision Plus Protein Dual Color (Bio- rad, # 1610374)
NaCL-Lösung	Fresenius Kabi, # 15HM229B1
NEAA ( <i>non-essential amino acids</i> )	Life Technologies, # 11140050
PBS	Sigma, # D8537
Penicillin / Streptomycin	Life Technologies, # 15140122
Ponceau-Lösung	Sigma, # P7170-1L
Roti Histokitt	Roth, # 6638.1
Roti Histol	Roth, # 6640.4
Streptactin	Precision Protein Streptactin-HRP, BioRad; # 1610380
T-PBS	0.05 % Tween20 in PBS
Trypanblau	Sigma, # RNBD1064
Trypsin-EDTA (0.05 %)	Life Technologies, # 25300062
Tween20	VWR, # 8.221.840.500
Tyrode-Puffer (Stock 20 x)	2.73 M Natriumchlorid 53.6 mM Kaliumchlorid 238 mM Natriumhydrogencarbonat 8 mM Dinatriumhydrogen-phosphat 0.5 M Hepes (Roth, #9105.2) 1 x Stock 20 x
Tyrode-Puffer (1 x, zur Anwendung)	18 x <i>A. dest.</i> 0.1 M MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid, Roth, # KK36.1) 10 % Glukose 10 % BSA (Sigma, # A7906-50MG)

Waschpuffer	0.1 M CaCl <sub>2</sub> pH = 7,35 R&D Systems, # 895126
β-Mercaptoethanol	Roth, # 4227.1

## 2.1.4 Kits

ELISA	R&D Systems; DuoSet ELISA Mouse TNF-α; Catalog No: DY410-05; Lot: 332127
PCR	Qiashredder (Qiagen Cat No. 79654) RNeasy Mini Kit (Qiagen Cat No. 74104) Promega; Reverse Transcription System Ref. A3500
Caspase Assay	Promega; Caspase-Glo 3/7 Assay System

## 2.1.5 Software

Imager	Quantity One Software
ELISA Reader	Magellan
Mikroskop	ZEN 2 (blue edition); Zeiss
PC	Office 2010; Microsoft

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierexperimentelle Versuche

Für den tierexperimentellen Teil dieser Arbeit wurden konstitutive *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäuse und korrespondierende *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäuse beider Geschlechter im Alter von 2-4 Monaten verwendet. Sämtliche Versuche erfolgten unter Achtung der Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Association* (FELASA) und des deutschen Tierschutzgesetzes mit der Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV, 84-02.04.2013.A294). Die Prüfung erfolgte durch den ortsständigen Tierschutzbeauftragten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT). Die Tötung der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation.

Die LPS-Applikationen, Blut- und Organentnahmen und die Tötung der Tiere wurden von Dr. med. vet. Irena Krüger und Dr. rer. nat. Meike Klier durchgeführt.

#### 2.2.1.1 LPS vermitteltes *in vivo* Sepsismodell

Bei der Sepsis kommt es aufgrund einer Infektion zu einer generalisierten Entzündung. Häufig sind als Erreger gramnegative Bakterien die Auslöser und hierbei genauer das LPS ihrer Zellwand (1.1.2.1). Für die Simulation einer gramnegativen Inflammation wurde den Mäusen 4 mg/kg KG LPS gelöst in 200 µl *phosphate buffered saline* (PBS) (*E.coli 0111: b4 product number L2630 Sigma*) intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Es erfolgten mehrere Blutentnahmen und nach Tötung durch zervikale Dislokation (nach 1 h, 5 h oder 24 h) die Entnahme von Organen um verschiedene, im Folgenden beschriebene Parameter der Immunantwort in Abhängigkeit von PLD1 zu untersuchen.

#### 2.2.1.2 Blutentnahme, Messung der Zellzahlen und Plasmagewinnung

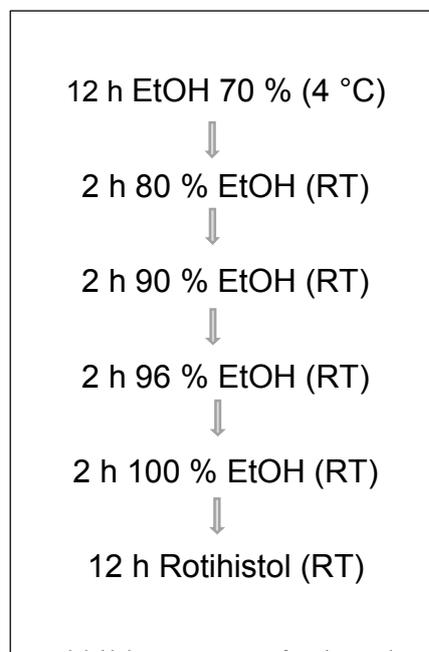
Um den Mäusen Blut aus dem retrobulbären Venenplexus zu entnehmen, wurde eine Narkose mit 2 % Vol. Isofluran durchgeführt. Pro Maus wurden je 50 µl Blut entnommen und in 300 µl Heparin aufgenommen. Zur Generierung von Basalwerten erfolgte die Blutentnahme vor der LPS-Stimulation. Anschließend wurde 1 h, 3 h, 5 h und 24 h nach der LPS-Injektion Blut entnommen. Zu je nach Versuch festgelegten Zeitpunkten erfolgte

eine finale Blutentnahme. Dabei wurde das Blut in 50 µl Citrat aufgenommen, um hieraus Plasma zu gewinnen. Im Hämatologie-Analysator (KX-21N; Sysmex) wurden die Blutproben gemessen und die Blutzellzahlen bestimmt. Anschließend wurden die Zellkonzentrationen mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren berechnet.

Um aus dem gewonnenen Citratblut Plasma zu isolieren, wurden die Proben bei Raumtemperatur (RT) bei 5000 g für 15 min zentrifugiert, wobei das Plasma sich als zellfreie Phase oberhalb des Hämatokrits absetzte. Das Plasma wurde anschließend in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -40 °C gefroren.

### 2.2.1.3 Organentnahme und – aufbereitung

Nach der Tötung durch zervikale Dislokation wurde den Mäusen Leber und Lunge entnommen. Die Organe wurden entweder für die spätere RNA-Isolation oder für histologische Untersuchungen vorbereitet und gelagert. Für die RNA-Isolation wurden die Organe unmittelbar in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Für die histologische Aufarbeitung wurden die Organe für eine Woche bei 4 °C in 4 % Paraformaldehyd (PFA) gelagert, daraufhin mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert (Abbildung 2.1) und anschließend in flüssigem Paraffin eingebettet.



**Abb. 2.1 Aufsteigende Alkoholreihe zur Organentwässerung**

Um die Organe vor der Einbettung in Paraffin zu entwässern, wurden sie in einem Becherglas für jeweils 12 h bzw. 2 h in Alkoholen mit aufsteigender Konzentration inkubiert.

#### 2.2.1.4 Durchflusszytometrie zur Analyse von Zellaggregaten und Oberflächenmarkern

Mit der Durchflusszytometrie werden Zellen in einer Suspension analysiert. Hierfür fließt die Flüssigkeit mit hoher Geschwindigkeit durch eine Flusszelle an einem Lichtstrahl vorbei, wobei das Licht durch die jeweilige Zellbeschaffenheit unterschiedlich abgelenkt wird. Das hierbei entstehende Streulicht lässt sich in Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches v.a. durch die Oberflächenbeschaffenheit der Zelle ausgelöst wird und Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), welches v.a. durch die Granularität und Komplexität des Zellinneren bestimmt wird, unterscheiden. Im Inneren des Durchflusszytometers befinden sich einerseits linear und andererseits seitlich zum Lichtstrahl ausgerichtete Detektoren, um die verschiedenen Arten von Streulicht zu differenzieren. Je nach Zelltyp entstehen so charakteristische Analysemuster, anhand derer die Zellen sortiert werden. Zusätzliche Informationen liefert die Messung von Fluoreszenz-Emissionen. Diese Emissionen werden entweder durch die Eigenfluoreszenz einzelner Zellbestandteile oder durch den gezielten Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen erzeugt. Diese Form der Durchflusszytometrie wird als fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS; *fluorescence activated cell sorting*) bezeichnet.

Je nach zu untersuchendem Molekül wird ein spezifischer, mit Fluorochromen markierter Antikörper eingesetzt. Die Fluorochrome werden durch den Laser angeregt und emittieren anschließend Licht bestimmter Wellenlängen, welches von Fluoreszenzdetektoren erfasst wird. Innerhalb einer Analyse lassen sich somit mehrere Parameter bestimmen.

Für die Messungen wurden je 4 Tropfen Blut in 300  $\mu\text{l}$  Heparin aufgenommen. Die Proben wurden jeweils zweimal mit 500  $\mu\text{l}$  Tyrode-Puffer gewaschen. Hierfür wurde bei RT für 5 min bei 650 g zentrifugiert, wobei sich die in der Probe enthaltenen Zellen absetzten. Anschließend wurde der flüssige Überstand über den Zellen bis auf einen geringen Rest entfernt. Die Zellen wurden resuspendiert und es wurden je 25  $\mu\text{l}$  der Proben für die FACS-Analyse eingesetzt.

Bei den Untersuchungen wurden je nach Zielstruktur unterschiedliche Antikörper eingesetzt (Tabelle 2.1; Tabelle 2.2). Die Blutproben wurden mit den Antikörpern für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Durch den Zusatz von je 400  $\mu\text{l}$  PBS wurde die Antikörpermarkierung gestoppt. Anschließend wurde unmittelbar mit der Probenanalyse im Durchflusszytometer (FACSCalibur; BD Bioscience) begonnen.

Wie in Kapitel 1.1.2.4 beschrieben kommt es in Entzündungsprozessen im Rahmen der zellulären Immunantwort zur Interaktion von Leukozyten - insbesondere Neutrophilen - und Thrombozyten. Um den Einfluss von PLD1 auf die Aggregatbildung von Thrombozyten und Leukozyten zu untersuchen, wurden die Proben für die FACS-Analyse mit Thrombozyten- bzw. Leukozyten-spezifischen Antikörpern inkubiert. Hierfür wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Thrombozyten	2,5 µl PE anti mouse GPIb, Emfret
Leukozyten	1 µl APC anti mouse CD45, BD Bioscience

**Tabelle 2.1 FACS Antikörper**

Mac-1 ist ein Oberflächenrezeptor von Neutrophilen, welcher u.a. an der Zell-Extravasation beteiligt ist und dessen Expression im Entzündungszustand hochreguliert wird. Um den Einfluss von PLD1 auf die Mac-1-Expression auf Neutrophilen zu messen, wurden die Antikörper aus Tabelle 2.2 für die FACS-Analyse eingesetzt.

Mac-1	1 µl APC Rat Anti-Mouse CD11b (Mac-1)
Neutrophile	1 µl Anti Mouse Ly6G DyLight 488
IgG Kontrolle	1 µl Mac-1 IgG

**Tabelle 2.2 FACS Antikörper**

Kontrollproben wurden mit 5 µl PMA (10 ng 1:10 in Tyrode) stimuliert.

Die Auswertung erfolgte anhand der *mean fluorescence intensity* (MFI).

#### 2.2.1.5 Messung der Transaminasen und der Laktatdehydrogenase zur Untersuchung einer insbesondere hepatischen Zellschädigung

Um die Beteiligung der Leber im Rahmen des Entzündungsprozesses zu untersuchen, wurden die in den Hepatozyten vorkommenden Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) im Plasma gemessen. Bei einer Schädigung der Leber werden die Enzyme freigesetzt und steigen in der Folge im Plasma an.

Die Bestimmung dieser sogenannten Transaminasen erfolgte in Plasmaproben von *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen und *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Die Mäuse wurden zuvor nicht oder 5 h bzw. 24 h mit LPS

stimuliert. Neben den Transaminasen wurde die Laktatdehydrogenase (LDH) gemessen. LDH kommt sowohl in der Leber als auch in anderen Geweben vor. Ein Anstieg von LDH im Plasma ist somit ein unspezifischer Indikator für Zellschädigung.

Die Plasmaproben wurden mittels klinisch-chemischer Teststreifenanalyse im Blut-Analysesystem (*Spotchem-biochemical analyzer* EZ SP-4430; AxionLaB/Arkray) untersucht.

#### 2.2.1.6 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) zur Untersuchung der humoralen Immunantwort

Mit dem ELISA lässt sich ein in Lösung vorliegendes Protein nachweisen bzw. seine Konzentration bestimmen. Hierfür werden die zu untersuchenden Proben mit enzymgekoppelten Antikörpern inkubiert, welche jeweils spezifisch an das nachzuweisende Protein binden. Hierauf folgen mehrere Waschvorgänge, um die nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wird ein Substrat hinzugegeben, welches von dem Antikörper-gebundenen Enzym umgesetzt wird und zu einem Farbumschlag der Probe führt. Dieser Farbumschlag kann photometrisch gemessen werden. Das Protein wird durch den Vergleich mit einer Standardreihe mit festgelegten Konzentrationen quantifiziert.

Um TNF- $\alpha$  im Plasma zu messen, wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Dabei ist der Einsatz von zwei Antikörpern notwendig, welche beide an unterschiedliche Stellen des zu detektierenden Antigens binden. Es wurde der TNF- $\alpha$ -ELISA von R&D Systems (*DuoSet ELISA Mouse TNF- $\alpha$* ; Catalog No: DY410-05; Lot: 332127) verwendet. Die Durchführung erfolgte anhand des Herstellerprotokolls.

An Tag 1 wurde eine 96-Well-Platte mit dem ersten, in PBS gelösten, Antikörper (*capture antibody*) vorbereitet (50  $\mu$ l/Well) und über Nacht bei RT inkubiert, um den Antikörper an der Platte zu binden. An Tag 2 wurde die Antikörperlösung abgekippt und anschließend dreimal mit einfachem Waschpuffer gewaschen (150  $\mu$ l/Well). Um mögliche unspezifische Bindungsstellen zu belegen, wurde für 1 h mit 1 % BSA in PBS (150  $\mu$ l/Well) geblockt und danach der Waschvorgang wiederholt. Als nächstes wurden die Proben bzw. Standards aufgetragen (50  $\mu$ l/Well), für 2 h bei RT inkubiert und im Anschluss wieder gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Für weitere 2 h wurden die Platten mit dem zweiten Antikörper (*detection antibody*; 50  $\mu$ l/Well) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden je 50  $\mu$ l Streptavidin-*horseradish peroxidase* (HRP) auf die Wells gegeben und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Es wurde erneut gewaschen und anschließend mit je 50  $\mu$ l *Substrat Solution* für 20 min im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden je 25  $\mu$ l *Stop Solution*

hinzugegeben und die Absorption bei 450 nm im *ELISA-Reader* (Tecan) ermittelt. Durch den Vergleich mit den Standardproben wurde die TNF- $\alpha$ -Konzentration ermittelt.

### 2.2.1.7 Molekularbiologische Methoden - Quantitative Echtzeit-PCR

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) dient dem Nachweis von DNA oder RNA und deren Quantifizierung. Durch den Einsatz bestimmter Primer können dabei ausgewählte Gene amplifiziert werden, welche in ihrer Expression mit einem Referenzgen verglichen werden. Diese Referenzgene, sogenannte *housekeeping* Gene, werden unabhängig von Zelltyp, Zellstadium oder sonstigen Einflüssen konstant exprimiert. Während der PCR kann durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, welche sich in Doppelstrang-DNA einlagern, die Amplifikation der Nukleinsäuren detektiert werden, da die Fluoreszenz proportional zum PCR-Produkt zunimmt.

Ein PCR-Zyklus besteht jeweils aus drei temperaturabhängigen Schritten, der Denaturierungsphase, der Primeranlagerung und der Extensionsphase. Gemessen wird der *cycle threshold* (CT-Wert), ein Schwellenwert des exponentiellen Kurventeils, an welchem die Hintergrundfluoreszenz überschritten wird. Der CT-Wert ist somit umso kleiner, je mehr cDNA vorliegt.

Die Probenaufbereitung für die qRT-PCR erfolgt in drei Teilschritten, der RNA-Isolation, dem DNase-Verdau und der cDNA-Synthese. Anschließend wird die PCR mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green durchgeführt.

Ausgangsmaterial für die Isolation der mRNA war gefrorenes Lebergewebe von *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen und *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen (2.2.1.3), welches in flüssigem Stickstoff gemörsert und in je 600  $\mu$ l Lysepuffer (RLT Puffer + Mercaptoethanol) überführt wurde. Darauf folgte die mRNA-Isolation über eine Säulenaufreinigung (Qias shredder; Qiagen Cat No. 79654) mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen Cat No. 74104) unter Befolgung des Herstellerprotokolls. Zuletzt wurde die isolierte mRNA in RNase-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration im Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Die fertigen Proben wurden bei  $-80$  °C gefroren und gelagert.

Um eine potenzielle Verunreinigung der Proben durch verbliebene DNA-Reste zu vermeiden, wurde vor der cDNA-Synthese ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurden die mRNA-Proben mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von je 18  $\mu$ l mit 1  $\mu$ g suspendierter mRNA gebracht und mit jeweils 2  $\mu$ l DNase in ein 200  $\mu$ l Reaktionsgefäß

überführt. Der DNase-Verdau erfolgte über 30 min bei 37 °C im *Thermocycler* (Eppendorf). Anschließend wurden die Proben für 10 min auf 75 °C erhitzt, um die DNase zu inaktivieren. Bei der cDNA-Synthese wird mit Hilfe einer Reversen Transkriptase aus RNA komplementäre DNA hergestellt. Hierfür wurde ein Kit von Promega (Reverse Transcription System Ref. A3500) genutzt.

Die im DNase-Verdau generierten 20 µl mRNA-Proben wurden für die cDNA-Synthese mit 2 µl Oligo dt Primer versetzt. Jeder Probe wurden 9 µl *Mastermix* zugegeben (Tabelle 2.3). Die cDNA- Synthese erfolgte im *Thermocycler* in drei Phasen: der Anlagerungsphase (25 °C für 5 min), der Extensionsphase (42 °C für 60 min) und der Inaktivierungsphase (72 °C für 15 min). Die fertige cDNA wurde in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei – 20 °C gelagert.

ImProm – II 5 Reaction Buffer	4 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTP Mix; 0,5 mM je dNTP	1 µl
recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
ImProm – II Reverse Transcritase	1 µl

**Tabelle 2.3 Mastermix cDNA-Synthese**

Zur Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR wurden auf einer 96-Well-Platte je 18 µl *Mastermix* (Tabelle 2.4) und 2 µl cDNA-Probe pro Well aufgebracht. Die Ausplattierung erfolgte in Triplets mit je 3 Ansätzen pro Probe. Die Platte wurde anschließend bei RT für 5 min bei 600 g zentrifugiert.

Fast SYBR® Green Master Mix (Katalog-Nr.: 4385612)	10 µl
dH <sub>2</sub> O	6 µl
Primer for	1 µl
Primer rev	1 µl

**Tabelle 2.4 Mastermix qRT - PCR**

Es wurden Primer für Egr-1 und als Referenz für das *housekeeping gene* Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt (Tabelle 2.5). Die PCR erfolgte im *Thermocycler*, wobei die DNA amplifiziert und proportional Fluoreszenzfarbstoff eingebaut wurde. Die dabei entstandene Fluoreszenzzunahme wurde mittels ViiA7 detektiert.

GAPDH for	`GGTGAAGGCGGTGTGAACG`
GAPDH rev	`CTCGCTCCTGGAAGATGGTG`
Egr-1 for	`TGAAGACAGGGGCCTTTTTG`
Egr-1 rev	`AATTCGCCGGA GACTCTCG`

**Tabelle 2.5 Primer**

Um die Probengruppen miteinander zu vergleichen, wurden ihre CT-Werte in mehreren Schritten miteinander in Beziehung gesetzt. Jede Probengruppe setzte sich aus mehreren Untergruppen (Triplets) zusammen. Zunächst wurden vom Zielgen und vom Referenzgen jeweils die CT-Mittelwerte der einzelnen Triplets gebildet. Der Mittelwert des Referenzgens wurde anschließend vom Mittelwert des Zielgens subtrahiert. Bei dem dabei entstandenen Wert handelt es sich um den  $\Delta$ CT. Anschließend wurde der Mittelwert der  $\Delta$ CTs der Referenzgruppen gebildet und von den einzelnen CTs der Zielgruppe und der Referenzgruppe subtrahiert. Bei dem hierbei entstandenen Wert handelt es sich um den  $\Delta\Delta$ CT. Über die zweifach-negative Potenz des  $\Delta\Delta$ CT wurde der relative *expression fold change* berechnet, womit die Gene verglichen werden können.

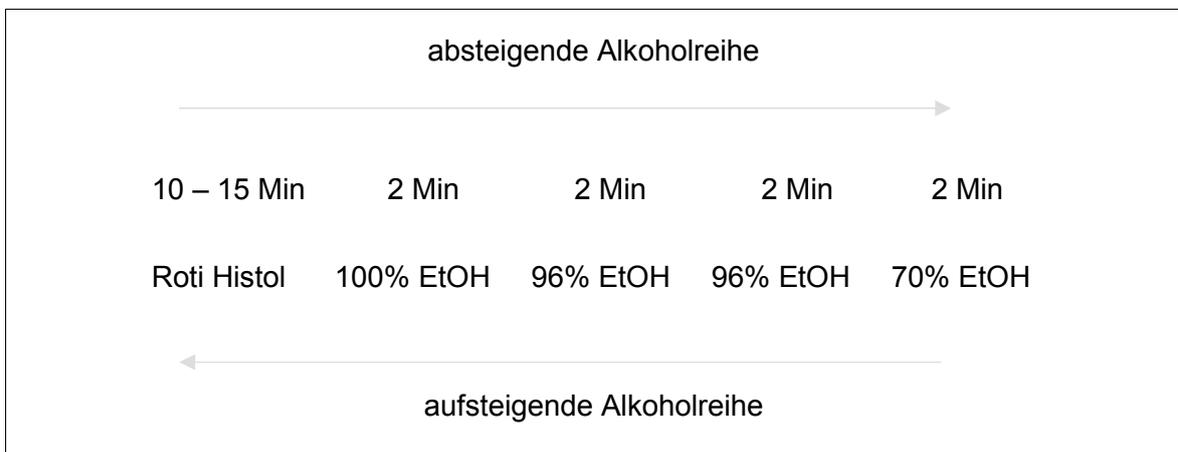
## 2.2.2 Histologische Untersuchungen

Zum Erstellen histologischer Präparate wurden die zuvor in Paraffin gebetteten Lebern und Lungen mit dem Mikrotom (Microm HM400) in 5 µm dicke Schichten geschnitten und auf Objektträger gezogen.

### 2.2.2.1 Hämalaun-Eosin-Färbung von Leber- und Lungengewebe

Bei der Hämalaun-Eosin-Färbung handelt es sich um eine klassische Übersichtsfärbung. Die beiden Farbstoffe Hämalaun und Eosin reagieren jeweils unterschiedlich mit den verschiedenen Gewebebestandteilen und ermöglichen so eine Differenzierung und die Detektion morphologischer Veränderungen. Hämalaun reagiert als basische Substanz mit sauren Strukturen wie beispielsweise Zellkernen und färbt diese bläulich. Eosin hingegen reagiert mit basischen Elementen wie z.B. Zytoplasma, welches eine rötliche Farbe annimmt.

Zur Vorbereitung wurden die Paraffinschnitte zunächst 30 min bei 60 °C inkubiert, um das Paraffin zu verflüssigen und die Schnitte vor der Färbung thermisch an den Objektträgern zu fixieren. Anschließend wurde das Paraffin durch eine absteigende Alkoholreihe entfernt.



**Tabelle 2.6 Alkoholreihe zur Entfernung des Paraffins und zur Entwässerung**

Die Schnitte wurden daraufhin für 10 min in Hämalaun-Lösung, danach einige Sekunden in Leitungswasser und dann für 30 – 60 s in HCl-Alkohol-Lösung (1 % in 70 % EtOH) gestellt. Unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte für 10 min gebläut und anschließend für 20 s in 1 % Eosin-Lösung gestellt. Um die Schnitte anschließend zu entwässern, wurde eine aufsteigende Alkoholreihe verwendet. Die Schnitte wurden mittels *Roti Histokitt* eingedeckt und über Nacht getrocknet. Die Aufnahmen wurden mit einem Mikroskop (Carl Zeiss) erstellt.

#### 2.2.2.2 Immunhistochemische Caspase-Färbung

Um herauszufinden, ob es durch die LPS-induzierte Entzündung zu Gewebeuntergängen in Leber und Lunge kommt, wurde mittels immunhistochemischer Färbung aktivierte Caspase 3 als Apoptosemarker untersucht.

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, wurden die Leber – und Lungenschnitte hierfür zunächst mit einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Da durch die vorherige Fixierung die Antigene für die Bindung des Primärantikörpers blockiert sein können, wurden die Schnitte in Citratpuffer (0.1 M Na - Citrat; 0.1 M Citronensäure, *A. dest.*, pH 6.0) für 3 x 5 min aufgekocht, um die Fixierung zu lösen. Nach einer 30-minütigen Abkühlphase wurden die Schnitte 3 x für 5 min mit PBS gewaschen. Für etwa 60 min wurde ein Blockmedium (5 % Ziegen Serum, 5 % BSA/PBS) auf die Schnitte gegeben und anschließend erneut gewaschen. Die Schnitte wurden daraufhin für 1 h mit dem Primärantikörper (Cleaved Caspase 3; # 9661S; CellSignalling, [1:50]) in 1 % BSA/PBS bei RT inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden anschließend mit dem Sekundärantikörper (Alex Fluor 555 – donkey-anti-rabbit, A31572; Thermo Fisher; 1:100 in Blockmedium) ebenfalls bei RT für 1 h inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Zum Anfärben der Zellkerne wurde für 3 min mit einer DAPI-Lösung (1:3000) inkubiert und daraufhin 3 x mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit *Mounting Medium* (Aqueous mounting medium F468-25M2, Sigma) eingedeckt.

### 2.2.3 Zellkulturtechnik

#### 2.2.3.1 Kultivierung von *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs)

10 % FCS	(Life technologies, # 16010159)
1 % Penicillin / Streptomycin	(Life Technologies, #15140122)
1 % NEAA	(Life Technologies, # 11140050)
0.2 % Gentamicin	(Life Technologies, # 15750037)
in DMEM-Medium	(Life Technologies, # 41965062)

**Tabelle 2.7 Kulturmedium MEFs**

Um murine embryonale Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) zu kultivieren, wurden Mäuseembryonen zwischen Tag 12 und 14 *post conceptionem* unter sterilen Bedingungen aus *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen und *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen entnommen. Den Embryonen wurden in Petrischalen mit sterilem PBS mittels chirurgischer und anatomischer Pinzette Dottersack, Plazenta, Kopf und rote Organe entfernt. Sie wurden daraufhin erneut in Petrischalen mit sterilem PBS überführt (maximal 3 Embryonen/Schale) und mechanisch zerkleinert. Pro Embryo wurde 1 ml Trypsin zugegeben und das Gemisch anschließend in einem 50 ml Falcon 3 x 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach Zugabe von 10 ml Kulturmedium wurden die Zellen über Nacht in einer t25-Flasche bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert.

Zur Kultivierung und Vermehrung der Zellen müssen diese im Verlauf geteilt und in neue Kulturflaschen überführt werden. Wenn die Zellen nach Beurteilung mit dem Lichtmikroskop eine etwa 80 %ige Konfluenz erreicht hatten, erfolgte das sogenannte *Splitting*. Hierfür wurde unter sterilen Bedingungen das Medium entfernt und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Um die Zellen von den Kulturflaschen zu lösen, wurde Trypsin hinzugegeben (1 ml /T25-Flasche, 2 ml /T75-Flasche) und die Flaschen für ca. 2 Minuten inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Die Trypsinreaktion wurde durch Zugabe von 3 bis 5 ml Kulturmedium gestoppt und die Lösung in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde für 7 min bei 1100 rpm zentrifugiert, so dass sich die Zellen am Grund absetzten. Nach Entfernung des Überstands wurden die Zellen in neuem Medium resuspendiert, in Kulturflaschen gefüllt und im Inkubator erhalten.

Um die MEFs über einen längeren Zeitraum zu erhalten, wurden sie in flüssigem Stickstoff konserviert. Hierfür wurden die Zellen wie beim *Splitting* mit Hilfe von Trypsin gelöst und anschließend in Kulturmedium zentrifugiert, wobei sich die Zellen absetzten. Die Zellen wurden in 1 ml FCS resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Um zu verhindern, dass beim Einfrieren zellschädigende Eiskristalle entstehen, wurden 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben. Die Röhrchen wurden bei -80 °C gefroren und am folgenden Tag zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Für die versuchsspezifische Anzucht größerer Zellmengen wurden gefrorene MEFs aufgetaut. Hierfür wurden die gefrorenen Zellen in Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Zellen daraufhin in T25-Flaschen mit 8 - 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium und 2 ml FCS aufgenommen und im Inkubator kultiviert.

### 2.2.3.2 Bestimmung der Zellkonfluenz

In den unterschiedlichen Versuchen mussten jeweils bestimmte Zellmengen eingesetzt werden. Hierfür wurden die MEFs in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Wie beim *Splitting* wurden die Zellen zunächst mit Trypsin von den Kulturflaschen abgelöst, zentrifugiert und anschließend in PBS gelöst. 10 µl von dieser Suspension wurden mit 10 µl Trypanblau gefärbt und hiervon wiederum 10 µl auf eine Hälfte der Neubauer-Zählkammer gegeben. Mit Hilfe von Trypanblau lässt sich die Zellvitalität beurteilen, da der Farbstoff in absterbende oder tote Zellen eindringen und sie färben kann, wohingegen lebendige Zellen ungefärbt erscheinen.

Die Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop gezählt und mit folgender Gleichung berechnet:  $Z \times VF \times V \times 10000$

Z = gezählte Zellen

VF = Verdünnungsfaktor

V = Resuspensionsvolumen

10000 = Faktor Neubauer-Kammer

### 2.2.3.3 Erstellung von Lysaten aus MEFs

Um proteinbiochemische Untersuchungen in MEFs durchzuführen, müssen die Zellen zunächst lysiert werden. Zum Erstellen von Zelllysaten wurden die MEFs nach dem Zählen in Kulturmedium aufgenommen (ca. 50000 Zellen/100 µl Medium). Sie wurden auf 48-Well-Platten mit je 100 µl/Well ausgesät und für 3 – 3,5 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Ausgewählte Wells wurden für 30 min mit LPS stimuliert (0,1 µg LPS in 10 µl PBS). Anschließend wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden für ca. 20 min mit IP-Puffer lysiert (50 µl IP-Puffer/ Well) und die Lysate daraufhin in Reaktionsgefäße überführt.

### 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.2.4.1 Western Blot

Die Western Blot-Methode ist ein Verfahren, welches den Nachweis von Proteinen in einer Probe ermöglicht. Die Proteine werden hierbei zunächst über eine Elektrophorese nach Größe und Ladung getrennt und anschließend im eigentlichen *Blotting*-Prozess auf eine Trägermembran übertragen. Diese wird in mehreren Teilschritten mit Antikörpern inkubiert, wodurch Proteinbanden detektierbar werden.

Um die aus den MEFs gewonnenen Lysate für den Western Blot einzusetzen, müssen die Proteine zunächst denaturiert werden, um eine spätere Antikörperbindung zu ermöglichen. Hierfür wurde den Zelllysaten je 10 µl 6 x *Lämmli*-Puffer pro 50 µl Probe zugegeben. Anschließend wurden die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt. Da die Zellen vor der Probenerstellung gezählt wurden (2.2.3.2), wurde auf eine Proteinbestimmung verzichtet.

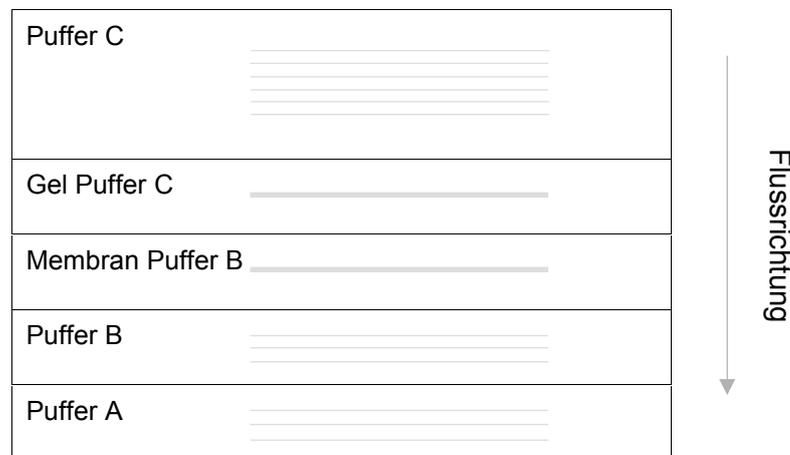
Die Gelelektrophorese wird in einem zweiphasigen Polyacrylamidgel durchgeführt. Die beiden Phasen bestehen aus einem Trenn- und einem Sammelgel, welche sich in ihrer Acrylamidkonzentration unterscheiden.

Zunächst wurde das Trenngel angesetzt, in eine Western-Blot-Kammer gegossen und mit Isopropanol bedeckt. Nach Verfestigung des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel eingegossen und ein Trennkamm eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Kammer mit Laufpuffer befüllt. Anschließend wurden die Proben und ein Molekulargewichtsmarker als Referenz in die Geltaschen gefüllt und bei 25 mA (50 mA bei zwei Gelen) aufgetrennt.

Trenngel	3,75 ml Trenngelpuffer pH 8,8, 7,25 ml A. dest. 4 ml Acrylamid 30 %, 100 µl APS 10 %, 100 µl TEMED
Sammelgel	1,25 ml Sammelgelpuffer pH 6,8, 3,05 ml A. dest., 650 µl Acrylamid 30 %, 25 µl APS 10 %, 5 µl TEMED

Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entnommen, um die Proteine mittels *Semi-Dry Blotting* vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren. Hierfür wurden zwischen Anode und Kathode der Blotkammer 12 in Blotpuffer getränkte Filterpapiere, die in Blotpuffer getränkte Membran und das in Blotpuffer getränkte Gel anhand des in Abbildung 2.2 dargestellten Schemas luftdicht übereinander platziert. Das *Blotting* erfolgte bei einer Spannung von 70 mA (bei 2 Gelen 140mA) mit der Laufrichtung von Kathode zu Anode, wobei die Proteinbanden vom Gel auf die ihm anliegende Membran übertragen wurden.

Kathode ( - )



Anode ( + )

### Abb. 2.2 Aufbau eines Blotsystems

Schematischer Aufbau des Western Blot-Systems mit in den entsprechenden Puffern getränkten Filterpapieren. Das Gel wird in Puffer C äquilibriert und die Membran für etwa 15 Sekunden in Puffer B aktiviert.

Zur Kontrolle des erfolgreichen Proteintransfers wurde die Membran mit *Ponceau S*-Lösung gefärbt und nach der Kontrolle mit destilliertem Wasser und 1 ml NaOH entfärbt. Nach

mehreren Waschschritten mit TBST wurde die Membran für 1 h bei RT mit 5 ml TBST + 5 % Milchpulver geblockt und anschließend erneut mit TBST gewaschen. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit dem Erstantikörper (1:500 in 5 ml TBST mit 5 % BSA) auf einem Rollenmischer inkubiert und am nächsten Morgen 3 x 5 min mit 5 ml TBST gewaschen.

MEK1/2	(CellSignaling, #9122)
phospho-MEK1/2	(CellSignaling, #9121)
Egr-1	(Santa Cruz, sc-110)
β-Tubulin	(CellSignaling, #2144)

**Tabelle 2.8 Primärantikörper für den Western Blot**

Anschließend wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper (1:2500 in 5 ml TBST mit 5 % Milchpulver und 1 µl StrepTactin-HRP) für etwa 1 h bei RT inkubiert und danach erneut gewaschen. Die Membran wurde auf einer Glasscheibe mit einem Gemisch aus 1 ml destilliertem Wasser und Chemilumineszenz-Reagenz (500 µl *Peroxidasesolution*, 500 µl *Luminol/enhancersolution* (Clarity Western ECL Substrate)) für 5 min bei RT inkubiert. Hierbei kommt es durch die an den Sekundärantikörper gebundene HRP und das Luminol der Entwicklerlösung zu einer Chemilumineszenzreaktion. Die Proteine können so indirekt nachgewiesen werden. Abschließend erfolgte die Detektion der Proteinbanden mit einem Chemilumineszenz-Detektor (*Chemiluminescence Imager System*; Bio Rad).

anti-rabbit IgGs	(GE Healthcare, Code: NA9340)
------------------	-------------------------------

**Tabelle 2.9 Sekundärantikörper für den Western Blot**

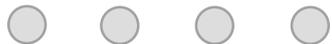
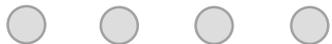
#### 2.2.4.2 Caspase-Assay

Um den Einfluss von PLD1 auf die Apoptose in mit LPS stimulierten MEFs zu untersuchen, wurden Caspasen als Teil der Apoptosekaskade gemessen. Hierfür wurde der *Promega Caspase-Glo 3/7-Assay* verwendet. Bei dieser Untersuchung wird mit Hilfe einer Lichtreaktion der Gehalt von Caspase 3 und 7 gemessen. Hierdurch kann die Quantität apoptotischer Zellen zwischen den Untersuchungsgruppen verglichen werden.

Zur Durchführung des Assays wurden *Pld1<sup>+/+</sup>*-MEFs und *Pld1<sup>-/-</sup>*-MEFs mit einer Dichte von 10000 Zellen/ 50 µl Medium in weißen 96-Well-Platten ausgesät und für 4 h bei 37 °C und

5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um an der Platte zu adhären. Anschließend wurden die Wells in Gruppen eingeteilt (4 Wells/Gruppe) und, wie in Tabelle 2.10 angegeben, entweder mit einem Gemisch aus 5 µl PBS + LPS stimuliert oder als Kontrolle nur mit 5 µl PBS behandelt. Zusätzlich wurde ein *Blank*, bestehend aus PBS, Reagenz und zellfreiem Medium, gemessen, um die Hintergrundlumineszenz zu ermitteln und sie bei der anschließenden Auswertung zu berücksichtigen.

Nach 2 h Inkubation wurden je 55 µl Assay-Reagenz auf die Wells gegeben und die Platte für 30 s geschwenkt. Anschließend wurde die Lumineszenz im Mikroplatten-Lesegerät (*Glomax*, Promega) gemessen.

<i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> + 2 µg LPS/ml für 2 h 	<i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> + 1 µg LPS/ml für 2 h 	<i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> + 1 µg LPS/ml für 1 h 
<i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> + 2 µg LPS/ml für 2 h 	<i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> + 1 µg LPS/ml für 2 h 	<i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> + 1 µg LPS/ml für 1 h 
PBS, Reagenz, Medium 	<i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> + PBS 	<i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> + PBS 

**Tabelle 2.10** Befüllung einer 96-Well-Platte für den Caspase 3/7-Assay

### 2.2.5 Statistische Datenanalyse

Die statistischen Auswertungen und Diagramme wurden mit Microsoft Excel 2016 erstellt. Die untersuchten Gruppen wurden mit Hilfe des ungepaarten t-Tests (*Student's t-Test*) verglichen. Unterschiede wurden als signifikant bewertet, wenn folgendes zutrifft:

$p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*,  $p \leq 0.001$ \*\*\*.

Die Anzahl der untersuchten Tiere bzw. Wells pro Gruppe wurden mit n bezeichnet. Es wird jeweils der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung  $\pm$  SEM (*standard error of mean*) angegeben.

## 3 Ergebnisse

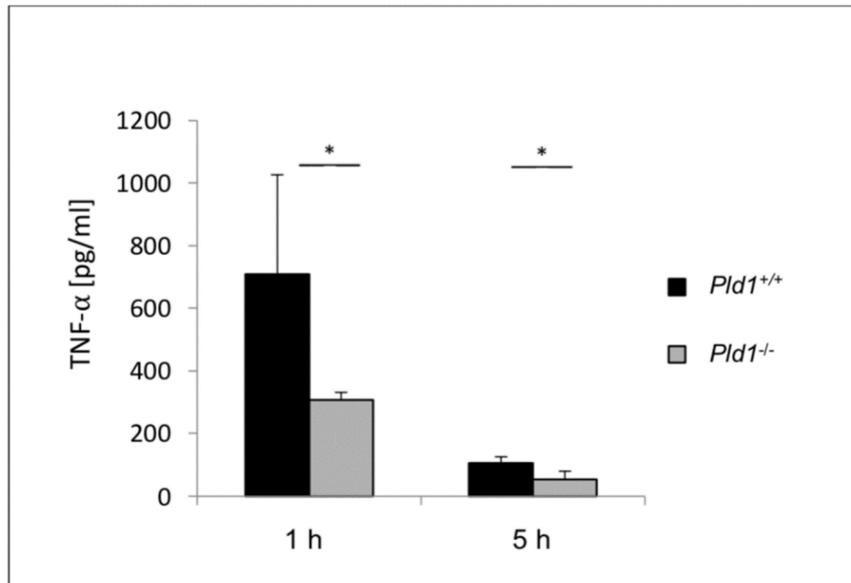
### 3.1 PLD1 moduliert die TNF- $\alpha$ -Expression und Freisetzung in der LPS-induzierten Sepsis

In entzündlichen Prozessen werden im Rahmen der Immunantwort proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine freigesetzt (1.1.2.3). Ein proinflammatorisches Schlüsselzytokin ist TNF- $\alpha$ , welches während einer Entzündung in erhöhter Konzentration im Blut nachgewiesen werden kann. Um zu untersuchen, ob PLD1 in der LPS-induzierten Sepsis einen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -Expression und Freisetzung ausübt, wurde ein in unserem Labor etabliertes Sepsismodell mit *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen, welchen intraperitoneal LPS verabreicht wurde, verwendet (2.2.1.1). Zu festgelegten Zeitpunkten nach LPS-Injektion wurde Plasma isoliert und die TNF- $\alpha$ -Konzentration mit einem ELISA bestimmt.

#### 3.1.1 PLD1 moduliert den TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel nach LPS-induzierter Inflammation

Um den Einfluss von PLD1 in der LPS-induzierten Sepsis zu untersuchen und das gewählte Studienmodell zu überprüfen, wurden TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel 1 h und 5 h nach LPS-Stimulation gemessen.

Sowohl nach 1 h als auch nach 5 h zeigten sich im Vergleich zu *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant höhere TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel in *Pld1*<sup>+/+</sup>-Tieren. Beide Gruppen zeigten eine höhere Konzentration nach 1 h als nach 5 h (1 h: *Pld1*<sup>+/+</sup> 708,66 pg/ml  $\pm$  317,35 pg/ml; *Pld1*<sup>-/-</sup> 307,33 pg/ml  $\pm$  24,27 pg/ml; p=0,05; 5 h: *Pld1*<sup>+/+</sup> 106,34 pg/ml  $\pm$  19,89 pg/ml; *Pld1*<sup>-/-</sup> 54,02 pg/ml  $\pm$  26,51 pg/ml; p=0,029; Abbildung 3.1).



**Abb. 3.1** Mäuse mit PLD1-Defizienz zeigen nach LPS-Stimulation im Plasma eine signifikant niedrigere TNF- $\alpha$ -Konzentration als *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäuse.

Bestimmung der Plasma-TNF- $\alpha$ -Konzentration nach intraperitonealer LPS-Applikation (4mg/kgKG) bei *Pld1*<sup>+/+</sup>- und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Entnahme der Blutproben erfolgte jeweils 1 h bzw. 5 h nach Stimulationsbeginn. Die Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Zu beiden Zeitpunkten zeigen sich signifikant höhere Konzentrationen in der *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe im Vergleich zur *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe und eine in beiden Gruppen höhere Konzentration nach 1 h als nach 5 h. (n=4 pro Gruppe)  $p \leq 0.05$  \*, ungepaarter t-Test

### 3.1.2 PLD1 moduliert die Phosphorylierung von MEK1/2 und die Protein-Expression von Egr-1

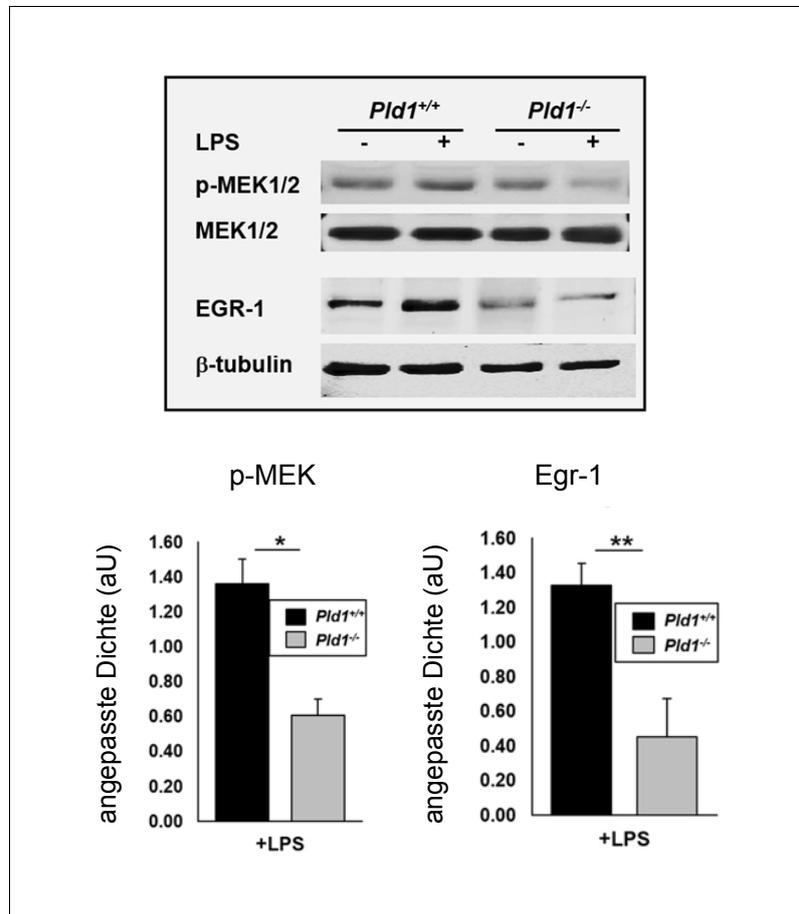
Um der Frage nachzugehen, wie PLD1 in der LPS-induzierten Inflammation die TNF- $\alpha$ -Spiegel moduliert, wurde ein Zellkulturmodell mit MEFs aus *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen etabliert (2.2.3). MEFs lassen sich nach einmaliger Isolation vielfach vermehren und eignen sich so als stabiles Modell, wodurch sich der Einsatz von Versuchstieren begrenzen lässt.

Um im Modell den Einfluss von PLD1 auf den MAP3K-Signalweg näher zu untersuchen, wurden die Zellen mit LPS stimuliert und zu Western Blot-Proben aufbereitet (2.2.4.1).

Der MAP3K-Weg ist ein bekannter Signalweg, welcher unter anderem durch LPS über mehrere Schritte aktiviert wird und in seiner Endstrecke zur TNF- $\alpha$ -Expression und Freisetzung beiträgt.

In dieser Arbeit wurden als Bestandteile bzw. Endstrecke des MAP3K-Signalwegs die Proteine MEK1/2 und Egr-1 untersucht. Ziel der Studie war es, den Phosphorylierungsgrad,

also den Grad der Aktivierung von MEK1/2 und die absolute Proteinmenge von Egr-1 zu bestimmen.



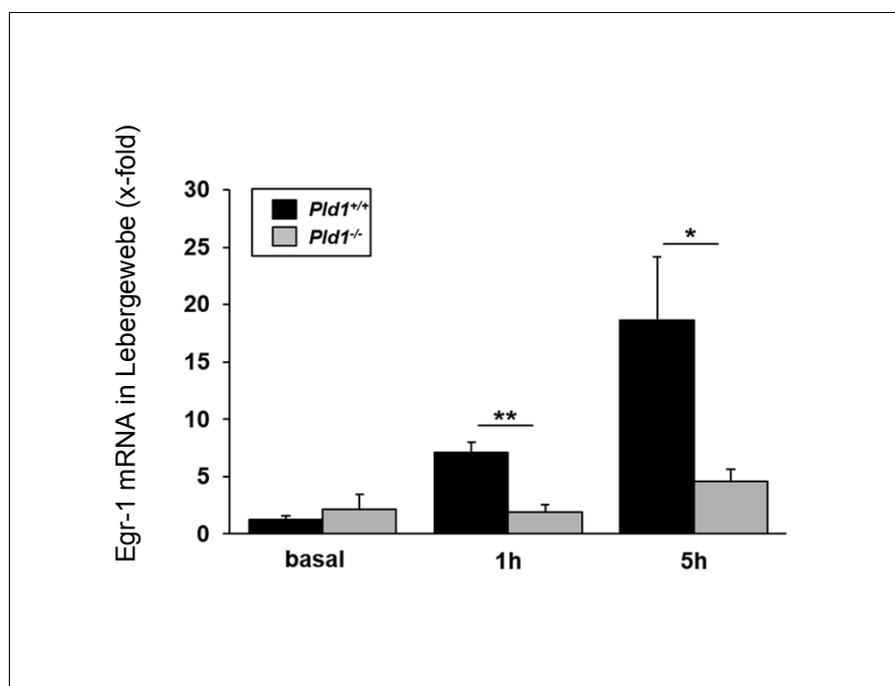
**Abb. 3.2** *Pld1*<sup>-/-</sup>-MEFs zeigen nach LPS-Stimulation eine geringere Phosphorylierung von MEK1/2 und eine niedrigere Egr-1-Expression als *Pld1*<sup>+/+</sup>-MEFs.

Repräsentative Western Blot-Analyse der Proteinmenge bzw. anschließend phosphorylierten Proteinmenge von MEK1/2 und der Proteinexpression von Egr-1 in Proben aus *Pld1*<sup>-/-</sup> und *Pld1*<sup>+/+</sup>-MEFs, jeweils mit und ohne 30-minütige LPS-Stimulation.  $\beta$ -Tubulin fungiert als Ladekontrolle für Egr-1. Nach Stimulation zeigt sich eine stärkere Phosphorylierung von MEK1/2 und eine größere Proteinmenge von Egr-1 in der *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe [83].  $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*, ungepaarter t-Test

Im Western Blot zeigte sich nach 30-minütiger LPS-Stimulation eine signifikant geringere Phosphorylierung von MEK1/2 in *Pld1*<sup>-/-</sup>-MEFs im Vergleich zu *Pld1*<sup>+/+</sup>-MEFs und ebenfalls eine signifikant geringere Proteinmenge von Egr-1 in *Pld1*<sup>-/-</sup>-MEFs (Abbildung 3.2).

### 3.1.3 PLD1 führt nach LPS-Stimulation zu einer verstärkten relativen Expression von Egr-1 in Lebergewebe

Um den Einfluss von PLD1 in der LPS-induzierten Sepsis nicht nur auf Protein-, sondern auch auf genregulatorischer Ebene zu untersuchen, wurde die relative mRNA-Expression von Egr-1 mittels qRT-PCR in RNA-Proben aus Lebergewebe von *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen nachgewiesen. Die Mäuse wurden zuvor für 1 h oder 5 h mit LPS stimuliert. Als Kontrolle wurden Lebern gesunder Vergleichstiere untersucht.



**Abb. 3.3 *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen nach LPS-Stimulation eine signifikant geringere relative Egr-1-Expression in Lebergewebe.**

Messung der relativen Egr-1-Expression mittels qRT-PCR in Lebergewebe von *Pld1*<sup>-/-</sup> und *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen basal sowie 1 h bzw. 5 h nach intraperitonealer LPS-Applikation. Es zeigt sich eine niedrige basale Egr-1-Expression ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Nach 1 h und 5 h zeigen *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäuse eine signifikant stärkere Egr-1-Expression als *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäuse [83]. (n=9)  $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*, ungepaarter t-Test

Es zeigte sich eine niedrige basale Egr-1-Expression in Lebergewebe ohne signifikanten Unterschied zwischen *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen. Bereits 1 h nach LPS-Stimulation ließ sich ein deutlicher Anstieg der Egr-1-Expression in der *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe und im Vergleich zur *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe eine hochsignifikant stärkere Egr-1-Expression messen.

Nach 5 h zeigte sich in beiden Gruppen ein Anstieg in der relativen Egr-1-Expression im Vergleich zum 1 h – und zum Basalwert. Im Gruppenvergleich zeigte sich nach 1 h und 5 h eine signifikant stärkere Egr-1-Expression in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe im Vergleich zur *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe (Abbildung 3.3).

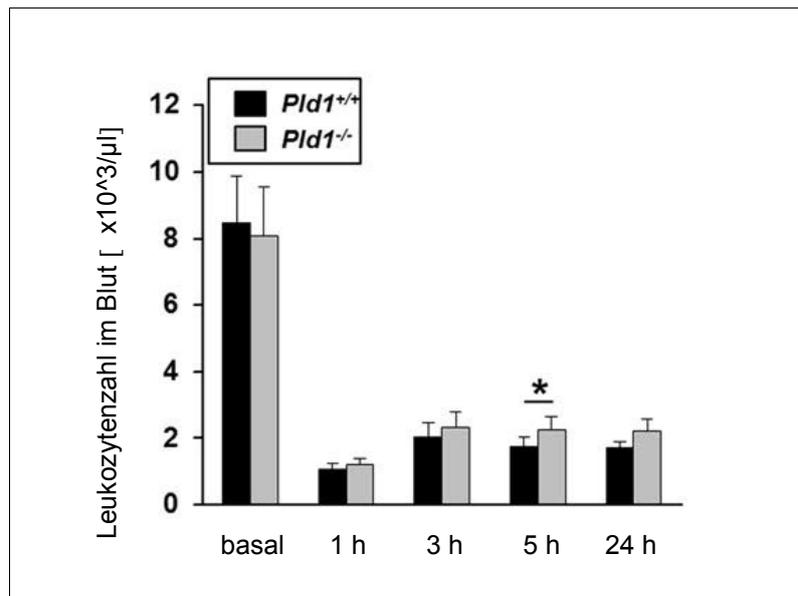
## 3.2 PLD1 moduliert die zelluläre Immunantwort in der LPS-induzierten Entzündung

Als Zellen des angeborenen Immunsystems sind Leukozyten an der unmittelbaren Abwehr von Pathogenen beteiligt. Dies geht in der Regel mit einer veränderten Konzentration der Leukozyten im Blut einher. Zudem kommt es bei aktivierten Leukozyten, insbesondere neutrophilen Granulozyten, neben der Phagozytose und der Ausschüttung zytotoxischer Substanzen zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und zur Zellmigration (1.1.2.4).

### 3.2.1 PLD1 beeinflusst die Leukozytenzahl im Blut nach LPS-Stimulation

Um mögliche Veränderungen der Leukozytenzahl im Blut nach LPS-Stimulation in Abhängigkeit von PLD1 nachzuweisen, wurde *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen und *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen basal und 1 h, 3 h, 5 h und 24 h nach LPS-Stimulation Blut abgenommen. Anschließend wurde die Konzentration der Leukozyten im Blut gemessen.

Es zeigte sich nach LPS-Stimulation sowohl in *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen als auch in *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen ein schneller Abfall der Leukozytenzahl im Blut. Die niedrigste Konzentration der Leukozyten wurde in beiden Gruppen 1 h nach Stimulationsbeginn gemessen. Tendenziell zeigte sich zu allen Zeitpunkten nach LPS-Stimulation in *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen verglichen mit *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen ein etwas stärkerer Abfall der Leukozytenzahl. Dieser Unterschied war jedoch lediglich in der Messung nach 5 h signifikant (Abbildung 3.4).

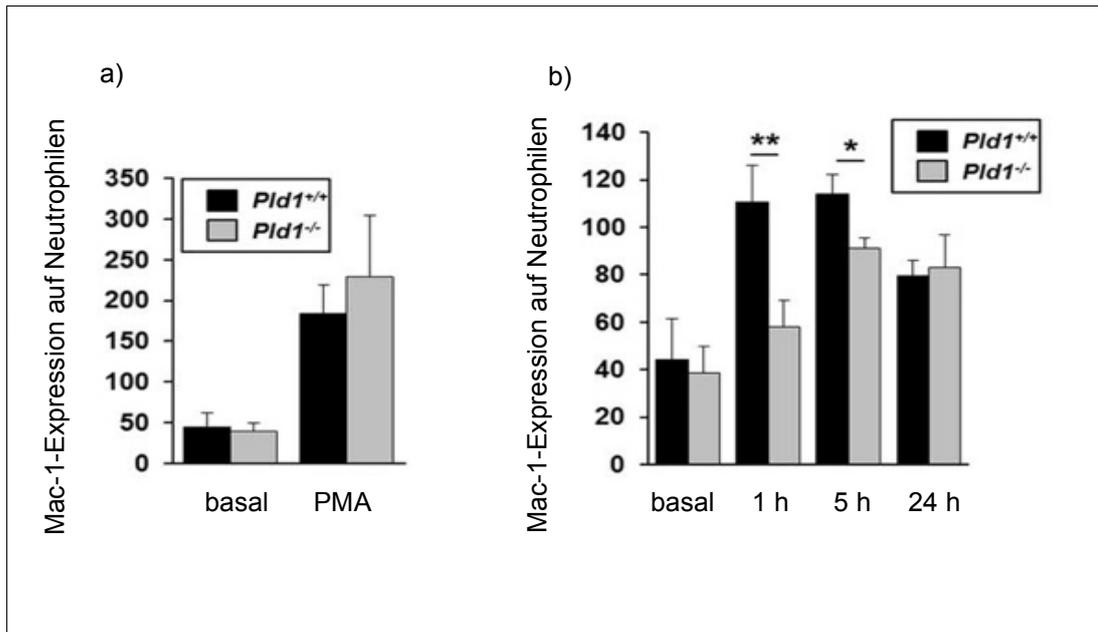


**Abb. 3.4** Nach LPS-Stimulation kommt es in *Pld1*<sup>+/+</sup>- und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen zur Leukopenie. Nach 5 h ist diese in *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen im Vergleich zu *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant stärker.

Bestimmung der Leukozytenzahl basal bzw. nach LPS-Stimulation (4mg/kgKG) im Blut von *Pld1*<sup>+/+</sup> und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Entnahme erfolgte jeweils nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h [83]. (n=4-10)  $p \leq 0.05$  \*, ungepaarter t-Test

### 3.2.2 PLD1 beeinflusst die Mac-1-Expression von Neutrophilen nach LPS-Stimulation

Mac-1 wird als für die Zellextravasation relevantes Oberflächenprotein von neutrophilen Granulozyten in der Entzündung hochreguliert [37]. Um zu untersuchen, ob dieser Prozess von PLD1 beeinflusst wird, wurde *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen basal und 1 h, 5 h und 24 h nach LPS-Stimulation Blut entnommen. Anschließend wurden FACS-Analysen mit spezifischen, gegen Mac-1 und neutrophile Granulozyten gerichteten, Antikörpern durchgeführt. Als Positivkontrolle erfolgte zusätzlich eine Messung mit PMA. PMA wird zur Stimulation von unterschiedlichen Zellen eingesetzt [84,85]. In neutrophilen Granulozyten induziert PMA u.a. die Translokation von Mac-1 aus intrazellulären Vesikeln auf die Plasmamembran [86,87].



**Abb. 3.5 Mäuse mit PLD1-Defizienz zeigen 1 h und 5 h nach LPS-Stimulation eine geringere Mac-1-Expression auf neutrophilen Granulozyten als *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäuse.**

FACS-Analyse zur Mac-1-Expression auf Neutrophilen im Blut von *Pld1<sup>+/+</sup>* und *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. a) Die Kontrollbestimmung erfolgte basal und nach Stimulation mit PMA (10ng). b) Die Bestimmung erfolgte basal und 1 h, 5 h und 24 h nach LPS-Stimulation (4mg/kgKG) [83]. (n=4-5)  $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*, ungepaarter t-Test

Es zeigte sich zunächst im Kontrollversuch nach Stimulation mit PMA ein signifikanter Anstieg der Mac-1-Expression im Vergleich zum Basalwert. Die Kontrolle zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe und der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe.

Nach Stimulation mit LPS zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der Mac-1-Expression im Vergleich zum Basalwert. Dieser erfolgte schneller und stärker in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe verglichen mit der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe. Bei den Messungen aus Blutproben nach 1 h und nach 5 h wurde Mac-1 in der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe signifikant weniger exprimiert als in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe. Bei den Messungen nach 24 h konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Verglichen mit den vorherigen Zeitpunkten (1 h und 5 h) zeigte sich in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe nach 24h eine tendenziell rückläufige Mac-1-Expression.

### 3.3 PLD1 beeinflusst Faktoren der Blutgerinnung in der LPS-induzierten Sepsis

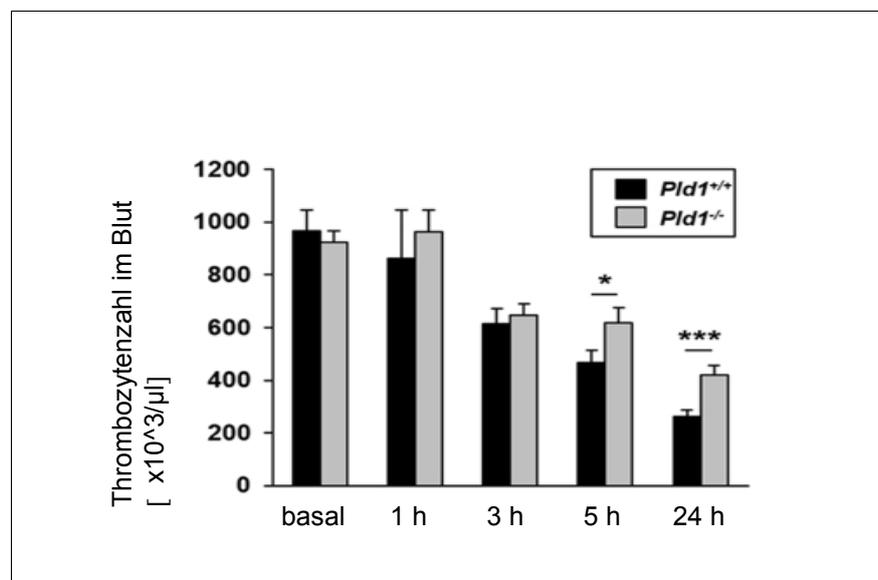
Die Sepsis geht in der Regel mit Veränderungen der Blutgerinnung aufgrund der Interaktion von inflammatorischen und koagulatorischen Prozessen einher (1.1.2.5) [88].

Als Parameter hierfür wurde die Konzentration von Thrombozyten im Blut nach LPS-Stimulation im Zeitverlauf untersucht. Außerdem wurden FACS-Analysen zur Aggregatbildung von Thrombozyten und Leukozyten im Blut durchgeführt.

### 3.3.1 PLD1 beeinflusst die LPS-induzierte Thrombozytopenie

In der Sepsis kommt es typischerweise durch die Aktivierung des Gerinnungssystems und die direkte Aktivierung von Thrombozyten zum Verbrauch intravasaler Thrombozyten und damit zur Thrombozytopenie. Eine mit der Sepsis verbundene Komplikation ist die DIC, wobei es zur Bildung multipler Mikrothromben kommt (1.1.2.5).

Um zu untersuchen, ob PLD1 die Thrombozytopenie in der LPS-induzierten Sepsis beeinflusst, wurde die Konzentration der Thrombozyten im Blut von *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen und *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen basal und 1 h, 3 h, 5 h und 24 h nach LPS-Stimulation gemessen. Hierbei zeigte sich eine im Verlauf progrediente Abnahme der Thrombozytenzahl in beiden Gruppen. Nach 1 h und 3 h zeigte sich im Vergleich zur *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe eine tendenziell stärkere Thrombozytopenie in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe. Dieser Unterschied wurde jedoch nicht als signifikant gemessen. Nach 5 h und 24 h wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit mehr Thrombozyten im peripheren Blut in der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe detektiert (Abbildung 3.6).

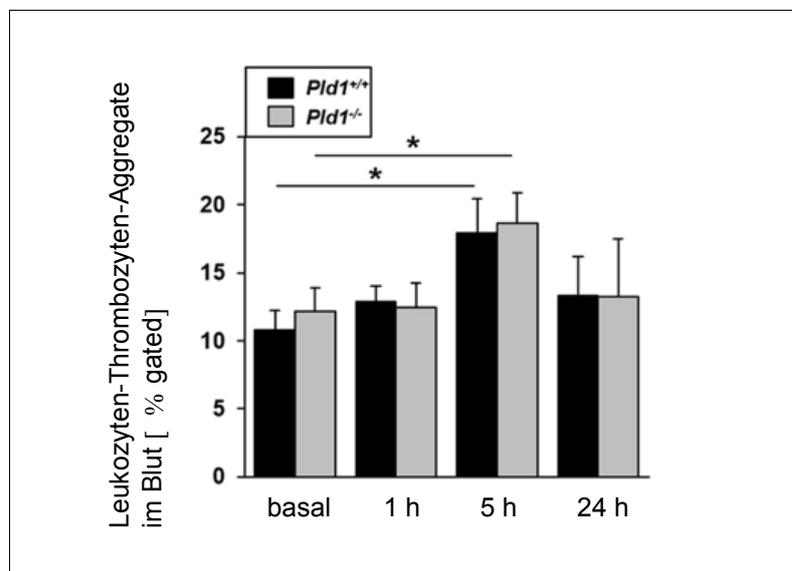


**Abb. 3.6** Nach LPS-Stimulation zeigt sich eine zunehmende Thrombozytopenie in *Pld1<sup>+/+</sup>*- und *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. 5 h und 24 h nach Stimulationsbeginn ist diese in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe signifikant stärker.

Bestimmung der Thrombozytenzahl im Blut von *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen und *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen. Die Bestimmung erfolgte basal und nach intraperitonealer LPS-Stimulation (4mg/kgKG) nach 1 h, 3 h, 5 h und 24 h [83]. (n=15)  $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*,  $p \leq 0.001$ \*\*\*, ungepaarter t-Test

### 3.3.2 PLD1 zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten–Aggregaten in der LPS-induzierten Sepsis

In der Sepsis kommt es zur Interaktion von Inflammation und Blutgerinnung. Ein Messparameter hierfür ist die Aggregatbildung von aktivierten Thrombozyten und Leukozyten, insbesondere neutrophilen Granulozyten, welche im Blut nachgewiesen werden können. Mittels FACS-Analyse wurden Thrombozyten–Leukozyten-Aggregate basal sowie 1 h, 5 h und 24 h nach LPS-Stimulation im Blut von *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen gemessen. Sowohl in der *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe als auch in der *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe zeigte sich, verglichen mit dem Basalwert, ein signifikanter Anstieg von Aggregaten nach 5 h. Zwischen den beiden Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.



**Abb. 3.7** Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss von PLD1 auf die Ausbildung von Leukozyten-Thrombozyten–Aggregaten.

FACS-Analyse von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten im Blut von *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen basal und 1 h, 5 h und 24 h nach LPS-Stimulation (4mg/kgKG). Verglichen wurde die detektierte Menge in % gated [83]. (n=5)  $p \leq 0.05$  \*, ungepaarter t-Test

### 3.4 PLD1-defiziente Mäuse zeigen nach LPS-Stimulation weniger Schäden von Leber und Lunge

Die Sepsis geht als systemisches Syndrom aufgrund der multifokalen inflammatorischen und koagulatorischen Reaktionen mit einer Vielzahl von Organschäden, unter anderem von

Leber und Lunge, einher. Die Beeinträchtigung von Leber- und Lungenfunktion wird auch im *SOFA Score* berücksichtigt und ist somit prognostisch relevant (1.1.1).

Um zu untersuchen, ob PLD1 die Leberschädigung im Rahmen der LPS-induzierten Sepsis beeinflusst, wurde *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen basal und 5 h und 24 h nach LPS-Stimulation Blut entnommen und hieraus Plasma isoliert. Im Plasma wurden die Transaminasen AST und ALT gemessen. ALT ist leberspezifisch, befindet sich überwiegend im Zytoplasma von Hepatozyten und wird bei einer Schädigung der Zelle freigesetzt. AST liegt ebenfalls im Zytoplasma von Hepatozyten vor, ist jedoch zu ca. 70 % in den Mitochondrien lokalisiert. Außerdem kommt AST auch in Herz, Muskeln und Erythrozyten vor. Erhöhte Plasmaspiegel der beiden Enzyme können auf eine Leberzellschädigung hinweisen [89].

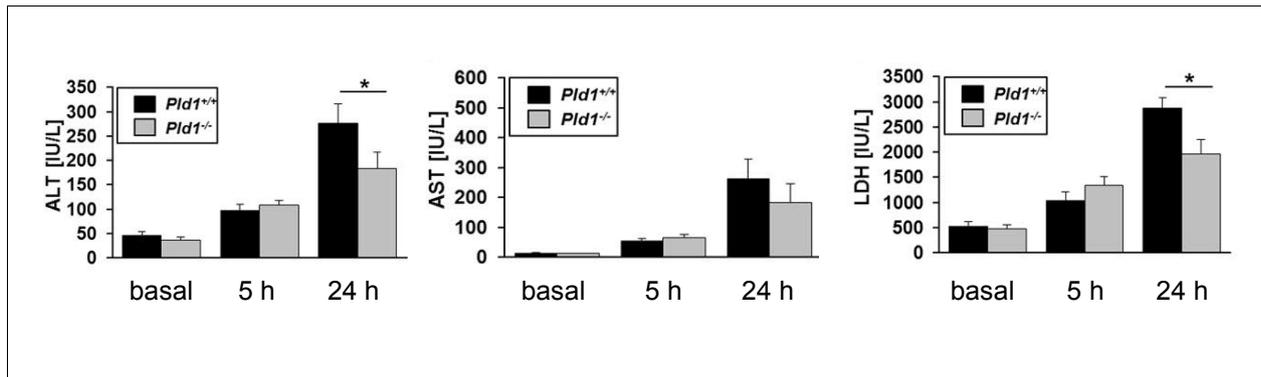
Zur Einschätzung des Schweregrads der Leberzellschädigung wird der sogenannte De-Ritis-Quotient (AST/ALT) verwendet. Bei einer geringen Schädigung werden zunächst zytoplasmatische Transaminasen freigesetzt und der Quotient ist <1. Schwerwiegende Schäden führen zusätzlich zur Freisetzung der mitochondrialen Enzyme und der Quotient wird >1.

Das Enzym LDH wurde zusätzlich als unspezifischer Marker für Zelluntergänge gemessen [89].

Darüber hinaus wurden histologische Präparate von Leber- und Lungengewebe mit und ohne LPS-Stimulation angefertigt und mit Hämalaun-Eosin gefärbt, um visuell potenzielle Organschäden zu detektieren (2.2.2.1).

#### 3.4.1 *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen 24 h nach LPS-Stimulation signifikant niedrigere Plasmaspiegel von ALT und LDH im Vergleich zu *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen

Als Hinweis für die Schädigung der Leber im Rahmen der LPS-induzierten Entzündung wurde der Anstieg der Transaminasen ALT und AST im Blutplasma von *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen basal sowie 5 h und 24 h nach LPS-Stimulation gemessen. Als ein genereller Marker für den Zelluntergang wurde außerdem LDH bestimmt.



**Abb. 3.8** Nach LPS-Stimulation zeigen sich im Verlauf zunehmende Plasmaspiegel von ALT, AST und LDH. Nach 24 h sind die Spiegel von ALT und LDH in der *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe verglichen mit der *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe signifikant niedriger.

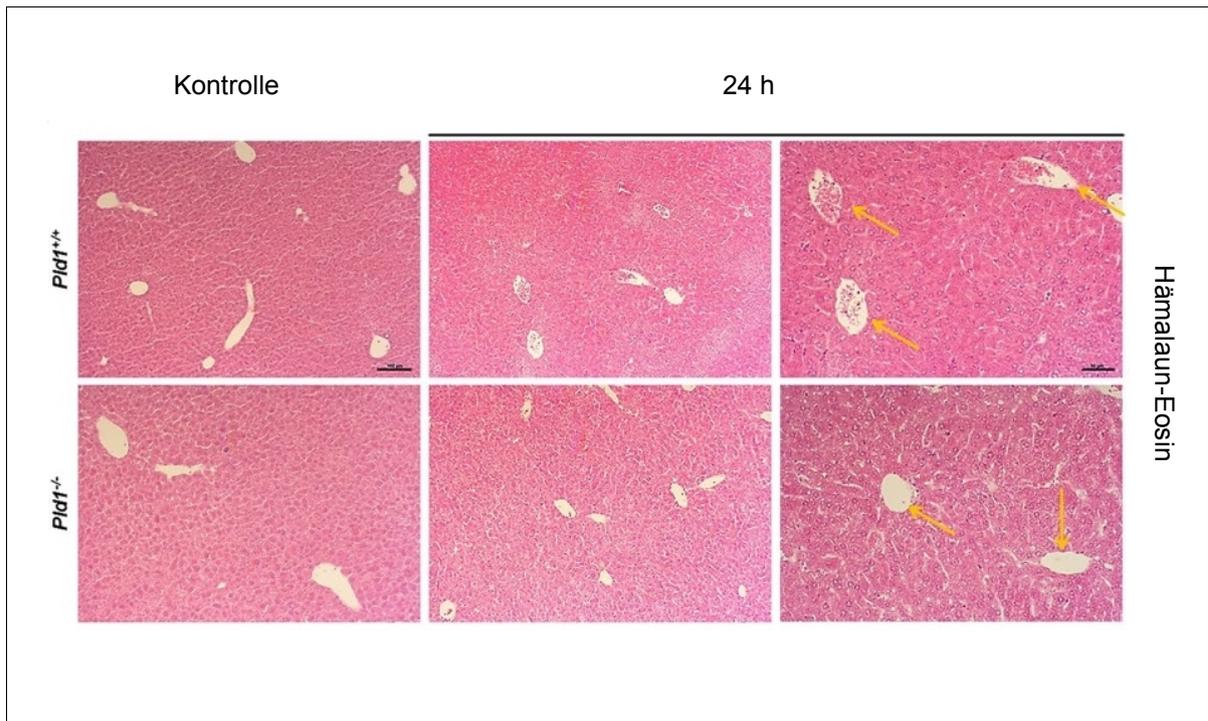
Bestimmung der Transaminasen ALT und AST sowie von LDH im Plasma von *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Bestimmung erfolgte basal und 5 h bzw. 24 h nach intraperitonealer LPS-Applikation (4mg/kgKG) [83]. (n=4-10)  $p \leq 0.05$  \*, ungepaarter t-Test

Sowohl *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäuse als auch *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten nach LPS-Stimulation im Verlauf eine deutliche Zunahme der Plasmaspiegel von ALT, AST und LDH. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten für ALT und LDH nach 24 h mit jeweils höheren Spiegeln in der *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe verglichen mit der *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe nachgewiesen werden (Abbildung 3.8).

### 3.4.2 *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäuse zeigen nach LPS-Stimulation vermehrt thrombotische Läsionen in Leber – und Lungengewebe verglichen mit *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen

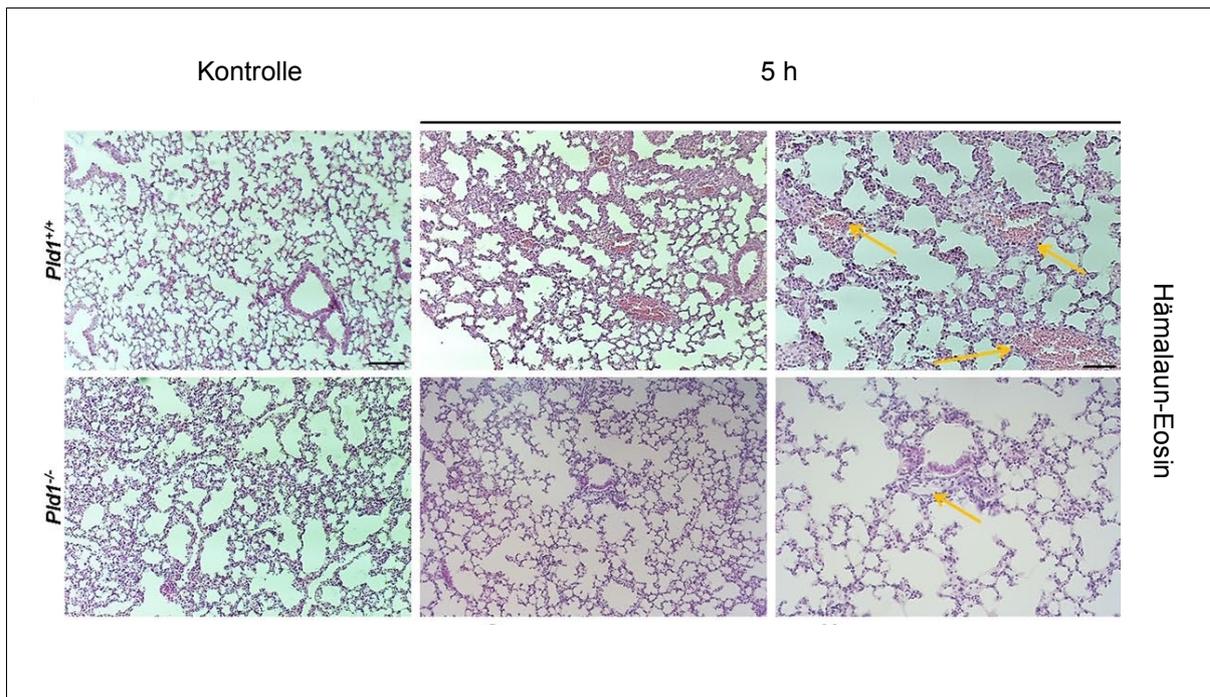
Um die Auswirkungen auf die Integrität von Leber- und Lungengewebe genauer zu untersuchen, wurden histologische Präparate hergestellt und diese mit Hämalaun-Eosin gefärbt.

Es zeigte sich nach LPS-Stimulation ein tendenziell vermehrtes Auftreten von Immunzellen und insbesondere in der Lunge vermehrte thrombotische Läsionen (Pfeile). Diese zeigten sich häufiger in der *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe verglichen mit der *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe.



**Abb. 3.9 *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen nach LPS-Stimulation intrahepatisch weniger thrombotische Läsionen als *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäuse.**

Repräsentative Hämalaun-Eosin gefärbte Leberpräparate von *Pld1*<sup>+/+</sup> und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen basal und 24 h nach LPS-Stimulation (4mg/kgKG). Die Pfeile zeigen exemplarische Zentralvenen mit teils thrombotischem Material [83].



**Abb. 3.10 *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen nach LPS-Stimulation intrapulmonal weniger thrombotische Läsionen als *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäuse.**

Repräsentative Hämalaun-Eosin gefärbte Lungenpräparate von *Pld1*<sup>+/+</sup> und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen basal und 5 h nach LPS-Stimulation (4mg/kgKG). Die Pfeile zeigen exemplarisch auf teils thrombosierte Gefäße [83].

### 3.5 PLD1 moduliert die Zellapoptose

Eine Folge der schweren Sepsis ist eine Organschädigung durch massiven Zelluntergang und damit eine Störung der Organintegrität. Der kontrollierte Zelltod, die Apoptose, kann von vielfältigen Stimuli induziert werden. Hierzu zählen sowohl direkte Schädigungen der Zelle bzw. der enthaltenen DNA als auch Änderungen des Umgebungsmilieus wie beispielsweise Hypoxie, das vermehrte Vorkommen von Sauerstoffradikalen oder hohe TNF- $\alpha$ -Spiegel [90]. Über verschiedene Wege werden Caspasen aktiviert, welche als Proteasen essenzieller Bestandteil der Apoptose sind [91].

Um zu untersuchen, ob PLD1 die Apoptose in Folge einer LPS-induzierten Entzündung beeinflusst, wurde ein Caspase-Assay in MEFs durchgeführt (2.2.4.2). Außerdem wurde Lungen- und Lebergewebe von *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit einer Caspase-Färbung immunhistochemisch untersucht (2.2.2.2).

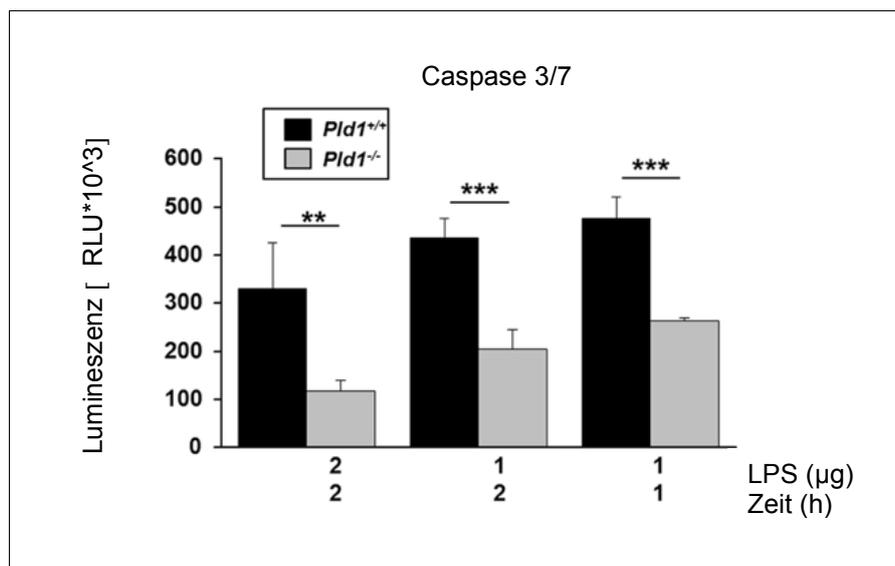
### 3.5.1 PLD1-Defizienz ist mit reduzierter Apoptose LPS-stimulierter MEFs assoziiert

Zur Untersuchung des Überlebens von MEFs in Abhängigkeit von PLD1 nach LPS-Stimulation wurde ein *Caspase 3/7 Luminescence Assay* durchgeführt.

Caspase 3 und 7 sind als intrazelluläre Proteasen maßgeblich an der Apoptose beteiligt.

Durchgeführt wurden Messungen mit 1 h, bzw. 2 h Stimulationszeit und mit 1, bzw. 2  $\mu\text{g}$  LPS/ml.

Es zeigte sich zu beiden untersuchten Zeitpunkten sowie bei beiden LPS-Konzentrationen ein signifikant höherer Caspase 3/7-Spiegel in *Pld1*<sup>+/+</sup>-MEFs im Vergleich zu *Pld1*<sup>-/-</sup>-MEFs (Abbildung 3.11). Pro Gruppe wurden je 4 Wells untersucht. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit PBS stimuliert, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte.



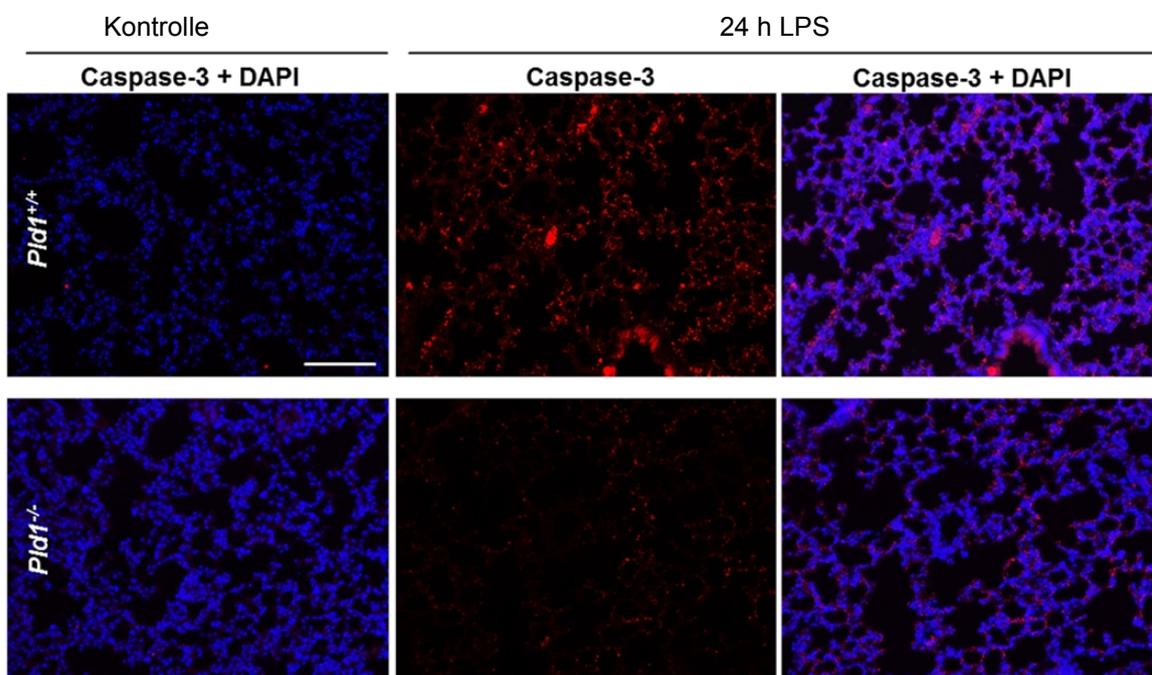
**Abb. 3.11 *Pld1*<sup>-/-</sup>-MEFs zeigen nach LPS-Stimulation geringere Caspase 3/7-Spiegel verglichen mit *Pld1*<sup>+/+</sup>-MEFs.**

Lumineszenz-Assay zur Bestimmung von Caspase 3/7 in mit LPS stimulierten MEFs. Die Zellen wurden für 1 h bzw 2 h mit 1  $\mu\text{g}$  bzw. 2  $\mu\text{g}$  LPS/ml stimuliert [83]. (n=4)  $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*,  $p \leq 0.001$ \*\*\*, ungepaarter t-Test

### 3.5.2 PLD1-defiziente Mäuse zeigen nach LPS–Stimulation weniger Zellapoptose in Leber und Lunge

Um apoptotische Zellen in Leber– und Lungengewebe zu detektieren, wurden die Organe 24 h nach LPS-Stimulation entnommen und immunhistochemisch mit einem gegen Caspase 3 gerichteten Antikörper untersucht. An die Antikörper gebundene Zellen wurden visuell ausgezählt. Als Kontrolle wurden Organe gesunder Vergleichstiere betrachtet. Beispielbilder werden in Abbildung 3.12 und 3.13 gezeigt.

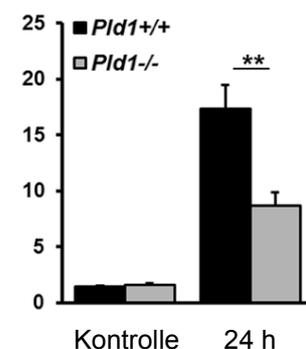
Nach LPS-Stimulation zeigten sich in beiden Organen vermehrt Caspase-positive Zellen. Im Vergleich zur *PLD1*<sup>+/+</sup>-Gruppe war die Zahl der Caspase-positiven Zellen bei PLD1-defizienten Tieren signifikant niedriger.

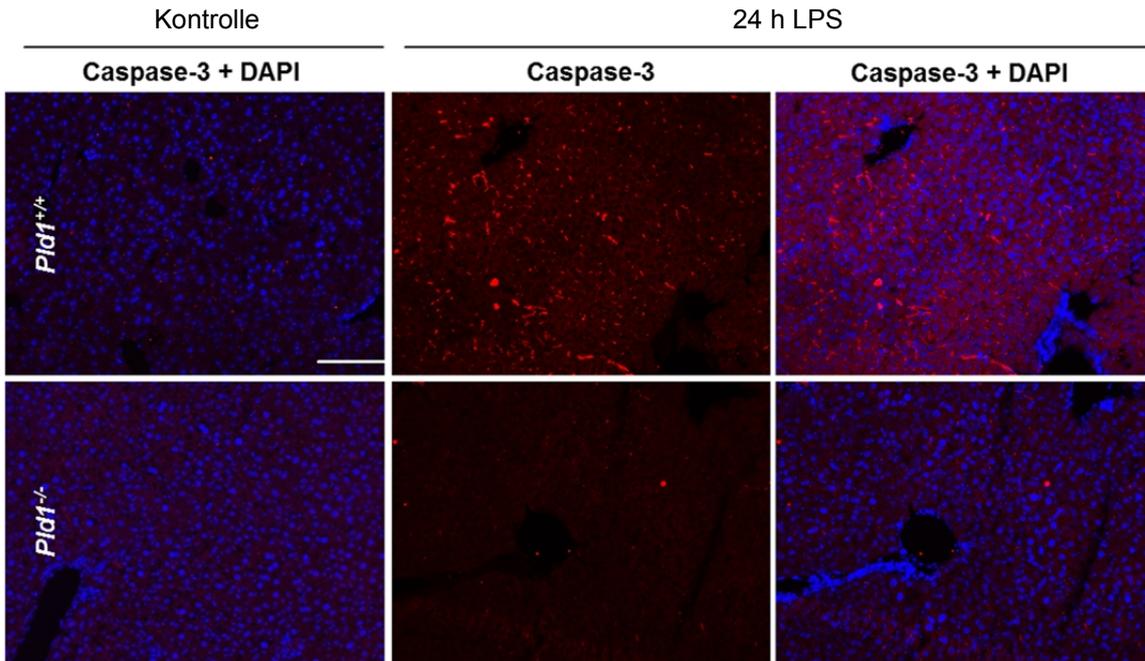


**Abb. 3.12 Immunhistochemischer Nachweis aktiver Caspase 3 in Lungengewebe**

Repräsentative Schnitte von mit Caspase3-Antikörper und DAPI gefärbtem Lungengewebe von *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen basal und 24 h nach intraperitonealer LPS–Stimulation (4mg/kgKG) [83]. Maßstabsskala 100  $\mu$ m. Visuelle Auszählung. (n=5)  $p \leq 0.05$  \*,  $p \leq 0.01$  \*\*, ungepaarter t-Test

%Cas-3 positive Zellen

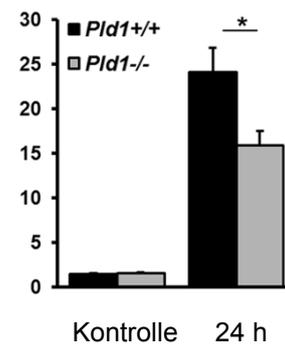




**Abb. 3.13 Immunhistochemischer Nachweis aktiver Caspase 3 in Lebergewebe**

Repräsentative Schnitte von mit Caspase 3-Antikörper und DAPI gefärbtem Lebergewebe von *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen basal und 24 h nach intraperitonealer LPS-Stimulation (4mg/kgKG) [83]. Maßstabsskala 100 µm. Visuelle Auszählung. (n=5)  $p \leq 0.05$  \*, ungepaarter t-Test

%Cas-3 positive Zellen



## 4 Diskussion

Die Sepsis ist eine medizinische Notfallsituation, bei der es aufgrund der dysregulierten Immunantwort zu einer lebensbedrohlichen Organdysfunktion kommen kann [5]. In Folge des demografischen Wandels, der Zunahme multimorbider Patienten und des gesteigerten Anspruchs an die moderne Medizin, auch in hohem Alter Risikoeingriffe durchzuführen, ist die Inzidenz tendenziell steigend. Von der WHO wurde die Sepsis als „*Global Health Priority*“ anerkannt [92]. Als häufigste, die Sepsis auslösende Mikroorganismen nennt das Robert Koch Institut in seinem epidemiologischen Bulletin von 2017 *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* [93]. Letzteres zählt zu den gramnegativen Bakterien, welche mit dem in ihrer Zellwand enthaltenen LPS einen potenten Stimulator der Immunantwort besitzen und so eine Sepsis provozieren können [94].

Phospholipase D1 ist als Phospholipid-degradierendes Enzym an vielfältigen zellulären Prozessen beteiligt und konnte in verschiedenen Studien als Modulator in immunologischen Prozessen identifiziert werden [62]. So konnten Bluth *et al.* beispielsweise in einem *in vivo* Modell der akuten Pankreatitis eine Hochregulation des Enzyms in der akuten Krankheitsphase feststellen. [95] Eine Vorarbeit aus unserem Institut zeigte eine deutlich vermehrte PLD1-Expression in infarziertem Myokard [72]. Sethu *et al.* detektierten im Mausmodell einen Einfluss von PLD1 auf die Entzündungsreaktion nach intraperitonealer TNF- $\alpha$ -Applikation. In ihren Untersuchungen stellten sie fest, dass Mäuse, bei welchen die PLD1-Expression mittels siRNA inhibiert wurde, geringere reaktive IL-6-, *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP)-1a- und MIP-1b-Serumspiegel, eine geringere Gefäßpermeabilität und weniger Migration von Neutrophilen zeigten [96].

Ergebnisse eines in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Überlebensversuchs zeigten nach intraperitonealer LPS-Injektion einen Überlebensvorteil für PLD1-defiziente Mäuse (Abbildung 1.5) [83]. Somit ist ein modulierender Einfluss von PLD1 auf den Verlauf der Entzündungsreaktion in Folge einer gramnegativen Infektion anzunehmen.

Ziel dieser Arbeit war es, diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen und Informationen darüber zu erhalten, ob PLD1 gezielt bestimmte Faktoren immunologischer Signalkaskaden moduliert.

#### 4.1 PLD1 beeinflusst die TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel in der durch gramnegative Bakterien induzierten Sepsis

Kommt es zum Eindringen gramnegativer Bakterien in den menschlichen Organismus, so wird das LPS im Rahmen der primären Immunantwort von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt. Dies führt über extra- und intrazelluläre Signalkaskaden zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (1.1.2.1). Ein Schlüsselzytokin, welches zur Initiation und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beiträgt, ist TNF- $\alpha$  (1.1.2.3). Im Mausmodell stellte sich eine Inhibition von TNF- $\alpha$  im Rahmen des Endotoxinschocks als protektiv heraus [97]. Bereits 1993 publizierten Pfeffer *et al.* Studienergebnisse, die zeigten, dass Mäuse mit Defizienz des TNF- $\alpha$ -Rezeptors TNFRp55 resistenter gegenüber Endotoxinexposition waren als Mäuse mit dem entsprechenden Rezeptor [98].

In der vorliegenden Arbeit konnten nach intraperitonealer LPS-Applikation erhöhte TNF- $\alpha$ -Spiegel im Plasma von *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen gemessen werden (Abbildung 3.1). Es zeigten sich hohe Konzentrationen nach 1 h und bereits geringere Konzentrationen nach 5 h. Zu beiden gemessenen Zeitpunkten wiesen *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäuse signifikant höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen auf, als die *Pld1*<sup>-/-</sup>-Vergleichsgruppe. Die Ergebnisse korrelieren mit Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe, in denen jedoch zum Teil andere Zeitpunkte gemessen wurden (basal, 0,5 h, 1,5 h, 3 h, 5 h). Urbahn detektierte in seinen Messungen den höchsten Wert nach 1,5 h mit anschließendem Konzentrationsabfall und konnte nach 1,5 h, 3 h und 5 h ebenfalls signifikante Unterschiede mit höheren TNF- $\alpha$ -Spiegeln in der *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe im Vergleich zur *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe nachweisen. Er untersuchte außerdem das ebenfalls proinflammatorisch wirksame Zytokin IL-6. Auch hier ließen sich signifikant höhere Konzentrationen in der *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe verglichen mit der *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe nachweisen. Die höchste Konzentration von IL-6 konnte er nach 3 h detektieren. Der Höhepunkt der Konzentration von IL-6 liegt zeitlich somit etwas hinter dem von TNF- $\alpha$  [83]. Unser Modell zeigt entsprechend in der „Frühphase“ nach LPS-Stimulation hohe TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Plasma als Ausdruck der angeborenen Immunantwort. Da die Konzentration und somit auch die proinflammatorische Wirkung von TNF- $\alpha$  bei Mäusen mit PLD1-Defizienz geringer ist, ist in der Folge ein milderer Entzündungsverlauf anzunehmen.

Eine Studie zum Einfluss von PLD1 im Kontext des Herzinfarkts kam zu vergleichbaren Ergebnissen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass PLD1-Defizienz bei myokardialer Ischämie und Reperfusion mit erniedrigten TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegeln einhergeht [72]. Oh *et al.* konnten darüber hinaus einen Zusammenhang von PLD1 und der LPS-induzierten TNF-

$\alpha$ -Expression in einem in vitro Versuch mit RAW 264.7 Zellen nachweisen. Anders als im Modell aus unserer Arbeitsgruppe induzierten sie den *Knockdown* von PLD1 und PLD2 mit jeweils spezifischer siRNA. Korrelierend zu unseren Ergebnissen stellten sie fest, dass PLD1-Defizienz mit einer reduzierten, LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Expression assoziiert ist [82]. Eine weitere Arbeit aus dem gleichen Institut zeigte darüber hinaus einen Einfluss von PLD1 auf die Leptin-induzierte TNF- $\alpha$ -Expression [99].

Der Einfluss von PLD1 auf weitere proinflammatorische Zytokine wurde außerdem in mehreren Studien zur rheumatoiden Arthritis untersucht. Kang *et al.* konnten in diesem Zusammenhang im Zellkulturmodell nach Hemmung von PLD1 mittels siRNA reduzierte Zytokinspiegel messen. Sie untersuchten dabei allerdings nicht TNF- $\alpha$  sondern IL-6, IL-15 und *Monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 und stimulierten die Zellen nicht mit LPS sondern mit IL-1 $\beta$  [74]. Auch Friday und Fox erforschten die Rolle von PLD1 im Kontext der rheumatoiden Arthritis und stellten fest, dass sie für die maximale Sekretion mehrerer proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-6 von Bedeutung ist [81].

PLD1-Defizienz scheint somit neben einer reduzierten, LPS-induzierten TNF- $\alpha$ -Expression mit einer reduzierten humoralen Immunantwort in verschiedenen entzündlichen Prozessen einherzugehen.

## 4.2 PLD1-Defizienz verhindert die maximale Egr-1-Expression nach LPS-Stimulation

Um zu untersuchen, ob PLD1 die TNF- $\alpha$ -Konzentration auch auf genregulatorischer Ebene beeinflusst oder ob lediglich die Freisetzung von TNF- $\alpha$  bei PLD1-Defizienz erniedrigt ist, wurden in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe Proben aus Lebergewebe von *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen basal und 1,5 h und 5 h nach LPS-Stimulation mittels qRT-PCR untersucht. Urbahn konnte hierbei in der *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe im Vergleich zur *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe eine signifikant reduzierte TNF- $\alpha$ -Expression messen [83].

In dieser Arbeit wurde die Expression von Egr-1 untersucht, um zu herauszufinden, ob sie nach LPS-Stimulation ebenfalls auf genregulatorischer Ebene von PLD1 beeinflusst wird. Eine gesteigerte Egr-1-Expression als Reaktion auf eine Stimulation mit LPS ist bereits mehrfach beschrieben [25,100]. In den vorliegenden Untersuchungen dieser Arbeit zeigte sich eine geringe basale Egr-1-Expression ohne signifikanten Unterschied zwischen der *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe und der *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe. 1 h nach LPS-Stimulation war bereits eine deutlich

gesteigerte Egr-1-Expression in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe nachzuweisen. Nach 5 h ließ sich in beiden Gruppen ein weiterer Anstieg feststellen. Zu beiden Zeitpunkten war die Egr-1-Expression in der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe signifikant geringer als in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass PLD1, zumindest in unserem Modell, für die maximale Egr-1-Expression notwendig ist. Über den Transkriptionsfaktor Egr-1 ist bekannt, dass er in Entzündungsprozessen multiple Gene von proinflammatorischen Faktoren wie u.a. TNF- $\alpha$  reguliert (1.1.2.2). Die bei PLD1-Defizienz reduzierte Egr-1-Expression könnte somit mit der von Urbahn gemessenen, verminderten TNF- $\alpha$ -Expression assoziiert sein.

Bezogen auf den zeitlichen Verlauf zeigte sich in dieser Arbeit ein späterer Anstieg der hepatischen Egr-1-Expression im Vergleich zu der in Kapitel 4.1. diskutierten TNF- $\alpha$ -Plasmakonzentration. Die Plasmakonzentration von TNF- $\alpha$  erreichte ihren Maximalwert in dieser Arbeit nach ca. 1 h und fiel anschließend wieder ab. Die Egr-1-Expression in Lebergewebe stieg dagegen zum Messzeitpunkt 5 h weiter an. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die erst sekundäre, bzw. verzögerte Organaffektion als Folge der disseminierten Entzündung. Eine weitere mögliche Erklärung ist die Induktion der Egr-1-Expression durch TNF- $\alpha$ . Mehrere Studien konnten, wenn auch in anderen Modellen, eine Induktion der Egr-1-Expression durch TNF- $\alpha$  nachweisen [101,102]. Die frühe signifikant höhere TNF- $\alpha$ -Plasmakonzentration in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe verglichen mit der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe könnte somit in der Folge auch eine stärkere Egr-1-Expression in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe induzieren. Bezüglich der Frage, ob die maximale Egr-1-Expression bereits nach 5 h erreicht ist, müssten weitere Versuche zu späteren Zeitpunkten durchgeführt werden.

Zum aktuellen Zeitpunkt sind mir aus der Literatur keine Studien bekannt, welche die Assoziation von PLD1 und Egr-1 im Rahmen der LPS-induzierten Sepsis untersuchen. Vergleichend können somit lediglich ähnliche Studien zum Einfluss von PLD1 auf proinflammatorische Faktoren im Rahmen entzündlicher Erkrankungen herangezogen werden.

Friday und Fox beschrieben beispielsweise im *in vitro* Modell der rheumatoiden Arthritis einen signifikanten Einfluss von PLD1 auf die Sekretion mehrerer proinflammatorischer Zytokine. Bei der rheumatoiden Arthritis kommt es in der Synovia zur Hyperplasie von Fibroblasten, welche durch die Interaktion mit Immunzellen und Stimulation durch verschiedene Zytokine proinflammatorische Faktoren sezernieren. Friday und Fox untersuchten die Expression und Sekretion von IL-6, IL-8 und *CC-chemokine ligand 20* (CCL20) in synovialen Fibroblasten in Abhängigkeit von PLD1 und PLD2. Die Funktionen der PLD-Isoformen hemmten sie dabei unspezifisch mit 1-Butanol oder isoformspezifisch mit siRNA oder spezifischen *small-molecule*-Inhibitoren. Sie konnten dabei sowohl auf dem

Niveau der Transkription als auch auf dem posttranskriptionellen Level einen Einfluss der PLD detektieren und zeigten, dass PLD1 und PLD2 für die maximale IL-6 Sekretion in ihrem Untersuchungsmodell notwendig sind. Auf dem Niveau der Transkription kamen sie dabei zu heterogenen Ergebnissen, was u.a. in der Methode mit teils unspezifischer bzw. inkompletter Inhibition der PLD begründet sein kann [81]. Da in unserem Modell methodisch keine unspezifische oder inkomplette PLD1-Inhibition vorliegen kann, könnten die Ergebnisse konstanter sein.

### 4.3 PLD1 moduliert die TNF- $\alpha$ -Expression über den MAP3K-Signalweg

Es stellt sich in der Folge die Frage, auf welche Weise PLD1 die TNF- $\alpha$ -Expression und Freisetzung beeinflusst. Aus verschiedenen Studien ist bereits bekannt, dass LPS mehrere intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzt, wodurch u.a. der MAP3K-Signalweg und der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktiviert werden. Hierdurch wird vermehrt TNF- $\alpha$  exprimiert und freigesetzt [22,103]. Guha *et al.* konnten mit Hilfe eines MEK1/2-Inhibitors zeigen, dass der MAP3K-Signalweg über die vermehrte Expression von Egr-1 für die maximale Expression von TNF- $\alpha$  und *Tissue Factor* als Reaktion auf eine LPS-Stimulation in Monozyten entscheidend ist [104].

Um zu untersuchen, ob PLD1 den MAP3K-Signalweg beeinflusst, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Zellkulturmodell mit *Pld1*<sup>-/-</sup>-MEFs und *Pld1*<sup>+/+</sup>-MEFs etabliert. In diesem *in vitro* Modell wurden mehrere Signalproteine des MAP3K-Signalwegs mittels Western Blot untersucht. Eine Vorarbeit aus unserer Arbeitsgruppe konnte bereits eine geringere Phosphorylierung von ERK1/2 in der *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe im Vergleich zur *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe zeigen [83]. In der vorliegenden Arbeit konnte für das *upstream* von ERK1/2 gelegene Protein MEK1/2 ebenfalls eine geringere Phosphorylierung in der *Pld1*<sup>-/-</sup>-Gruppe im Vergleich zur *Pld1*<sup>+/+</sup>-Gruppe gemessen werden. Bezüglich der Frage, ob PLD1 gezielt dort eingreift oder ob es bereits weiter *upstream* modulierend wirkt, müssten weitere Untersuchungen folgen. Zusätzlich zur verminderten Phosphorylierung von MEK1/2 konnte in der Folge in dieser Arbeit auch eine reduzierte Egr-1-Konzentration in *Pld1*<sup>-/-</sup>-MEFs im Vergleich zur *Pld1*<sup>+/+</sup>-MEFs nachgewiesen werden (Abbildung 3.2).

Wenngleich in dieser Arbeit die TNF- $\alpha$ -Expression in Folge der Aktivierung von Egr-1 untersucht wurde ist zu unterstreichen, dass Egr-1 darüber hinaus eine Vielzahl von weiteren proinflammatorischen Faktoren, u.a. weitere Zytokine, ICAM oder *Tissue Factor*,

reguliert. Schmidt *et al.* haben in einem Mausmodell des postoperativen Ileus den Einfluss von Egr-1 genauer untersucht. Hierbei konnten sie für *Egr-1<sup>-/-</sup>*-Mäuse und chimäre Mäuse mit *Egr-1<sup>-/-</sup>*-Knochenmark eine mildere Entzündungsreaktion mit verringerter Freisetzung proentzündlicher Zytokine, NO und einer geringeren Migration von Leukozyten nachweisen. In der Folge konnten sie eine verbesserte Darmmotilität im Vergleich zu *Egr-1<sup>+/+</sup>*-Mäusen und Chimären mit *Egr-1<sup>+/+</sup>*-Knochenmark beobachten [26]. Es ist somit möglich, dass auch in unserem Modell der gramnegativen Entzündung, aufgrund der herabgesetzten Expression von Egr-1 bei PLD1-Defizienz neben geringeren TNF- $\alpha$ -Spiegeln, weitere proinflammatorische Faktoren in geringerem Maße freigesetzt werden.

#### 4.4 PLD1 und die zelluläre Immunantwort

Bei einer Infektion kommt es im Rahmen der angeborenen Immunantwort zur Aktivierung von im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten. Geleitet durch Chemokine migrieren sie zum Ort der Infektion, wo sie u.a. Pathogene phagozytieren und zytotoxische Substanzen freisetzen (1.1.2.4).

In dieser Arbeit wurde in Folge der LPS-Stimulation ein Konzentrationsabfall der Leukozyten im Blut von *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen und *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen gemessen. Dies ist in erster Linie durch den reaktiven Verbrauch der zirkulierenden Leukozyten durch Aktivierung und Migration zu erklären. Die Untersuchungen zeigten zu allen nach LPS-Stimulation gemessenen Zeitpunkten in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe im Vergleich zur *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe eine etwas stärkere Reduktion der Leukozytenkonzentration im Blut. Dieser Unterschied wurde 5 h nach LPS-Stimulation als signifikant gemessen (Abbildung 3.4).

In verschiedenen Untersuchungen zeigte sich bereits ein Einfluss von PLD1 auf die Migration und die Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten. Ali *et al.* konnten bei PLD1-Defizienz eine herabgesetzte Motilität von neutrophilen Granulozyten aufgrund von Alterationen des Zytoskeletts feststellen, was zu einer reduzierten Migration in das entzündete Gewebe führte [105]. Dies könnte auch erklären, warum in der vorliegenden Arbeit in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe im Vergleich zur *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe eine stärkere Leukopenie nachgewiesen wurde. Ein durch PLD1-Defizienz vermindertes Einwandern von Immunzellen ist außerdem in der myokardialen Ischämie und Reperfusion beschrieben [72].

Bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten kommt es zur Hochregulierung von an der Zelladhäsion beteiligten Oberflächenproteinen. Ein solches Oberflächenprotein von

neutrophilen Granulozyten ist Mac-1 (1.1.2.4). Die Oberflächenproteine interagieren mit Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen, um so die Migration der neutrophilen Granulozyten ins Zielgewebe zu ermöglichen [33].

In dieser Arbeit wurde mittels FACS-Analyse untersucht, ob die Hochregulierung von Mac-1 als Reaktion auf eine Stimulation mit LPS von PLD1 beeinflusst wird. Es zeigte sich dabei nach LPS-Stimulation - wie auch im Kontrollversuch mit PMA - eine Hochregulierung von Mac-1 auf neutrophilen Granulozyten. Diese Hochregulierung war nach 1 h und 5 h in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe signifikant stärker ausgeprägt als in der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe. Zum dritten Messzeitpunkt, nach 24 h, ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen und die gemessene Mac-1 Expression war in beiden Gruppen tendenziell gering rückläufig (Abbildung 3.5). Dies könnte bedeuten, dass die stärkste Mac-1-Expression auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und in der Folge die stärkste Zellmigration in der „frühen“ bis „mittleren Phase“ der Sepsis stattfindet. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich innerhalb der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe ein bereits starker Anstieg nach 1 h und kein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen nach 1 h und 5 h. Innerhalb der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe zeigte sich ein relevanter Anstieg erst nach 5 h und kein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen nach 5 h und 24 h. Es ist somit möglich, dass die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und die Hochregulierung von Mac-1 auf ihrer Oberfläche bei PLD1-Defizienz nicht nur in geringerem Maß, sondern auch zeitlich verzögert erfolgt. Ein Grund hierfür könnten die, in Kapitel 4.1 erwähnten, primär geringeren Spiegel proinflammatorischer Zytokine im Blutplasma sein, welche zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten beitragen. Wenngleich in den Untersuchungen zur zellulären Immunantwort nicht zu allen Messzeitpunkten signifikante Unterschiede ermittelt werden konnten, deuten die Ergebnisse dennoch in der Zusammenschau auf eine verstärkte zelluläre Immunantwort und eine vermehrte Migration von neutrophilen Granulozyten in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe im Vergleich zur *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe hin.

#### 4.5 PLD1 wirkt in der LPS-induzierten Entzündung modulierend auf die Hämostase

In der Sepsis kommt es zur Interaktion und gegenseitigen Verstärkung von inflammatorischen und koagulatorischen Prozessen. Durch die vermehrte Ausschüttung von Zytokinen, insbesondere von TNF- $\alpha$ , werden einerseits Thrombozyten aktiviert. Andererseits wird durch Aktivierung von Immunzellen vermehrt *Tissue Factor* exprimiert.

Dieser führt zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und damit zur Generierung von Thrombin, welches u.a. wiederum Thrombozyten aktivieren kann. Gleichzeitig kommt es durch die vermehrte Freisetzung von NO zur Vasodilatation mit Verlangsamung des Blutflusses und zum gesteigerten Flüssigkeitsverlust ins umliegende Gewebe. Die zunehmende Freisetzung von Sauerstoffradikalen führt außerdem zur Schädigung des Endothels, wodurch wiederum vermehrt *Tissue Factor* freigesetzt wird. Initial erscheint die Steigerung der Blutgerinnung protektiv und immunologisch sinnvoll, da so die Dissemination von Pathogenen eingedämmt werden kann. Gerät das System aus pro- und antikoagulatorischen Mechanismen jedoch aus dem Gleichgewicht, kann es zur Komplikation der DIC kommen, welche mit multifokalen Thrombosen, insbesondere in kleinen Gefäßen, einhergeht [106-108].

Elvers *et al.* konnten im Mausmodell einen Einfluss von PLD1 auf die Thrombenbildung aufgrund eines Integrindefekts in *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen nachweisen. Unter hohen, Glykoprotein Ib (GPIb)-abhängigen Scherkräften konnte sich aufgrund des Defekts von Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  kein stabiler Thrombus bilden [65].

Als Messparameter für Alterationen der Blutgerinnung wurde in dieser Arbeit die Konzentration von Thrombozyten im Blut herangezogen, welche im klinischen Alltag als prognostischer Faktor auch im *SOFA Score* berücksichtigt wird (1.1.1). Die Konzentration der Thrombozyten wurde basal und zu bestimmten Zeitpunkten nach LPS-Stimulation gemessen (Abbildung 3.6). Hierbei zeigte sich im Verlauf eine zunehmende Thrombozytopenie, was einen gesteigerten Verbrauch im Rahmen der Blutgerinnung vermuten lässt. Im fortgeschrittenen Verlauf, nach 5 h und 24 h, ließ sich ein signifikanter Unterschied, mit einer geringeren Thrombozytenkonzentration in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe im Vergleich zur *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe, feststellen. Zusätzlich zeigten histologische Untersuchungen von Leber- und Lungengewebe in *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen verglichen mit der Kontrollgruppe weniger thrombotisches Material. Mäuse mit PLD1-Defizienz könnten somit verglichen mit *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen vor Komplikationen wie der DIC besser geschützt sein. Diese Annahme wird von weiteren Versuchsergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe unterstützt. So wurde beim Vergleich von gesunden *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen und *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen basal und nach Stimulation mit Thrombin eine reduzierte Thrombingenerierung im Blut von *Pld1<sup>-/-</sup>*-Tieren gemessen. Des Weiteren konnte im Lungengewebe nach LPS-Stimulation in *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäusen mehr Fibrin detektiert werden als in der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe [83]. Diese Messungen stehen im Einklang mit meinen Untersuchungen, da nach LPS-Stimulation jeweils bei Anwesenheit von PLD1 ein stärker prokoagulatorisches Milieu vorlag als bei PLD1-Defizienz.

## 4.6 PLD1 und die Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten in der LPS-induzierten Sepsis

Eine Schnittstelle von inflammatorischen und koagulatorischen Prozessen in der Sepsis ist die Komplexbildung von Thrombozyten und Leukozyten. Das Vorliegen von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten kann somit auch als Marker der Thrombozytenaktivierung betrachtet werden [109].

Um festzustellen, ob PLD1 die Interaktion von Thrombozyten und Immunzellen beeinflusst, wurden Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate im Blut mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abbildung 3.7). Die Aggregate wurden vor und 1 h, 5 h und 24 h nach LPS-Stimulation gemessen. Hierbei zeigte sich lediglich nach 5 h ein signifikanter Anstieg der Aggregate verglichen mit dem Basalwert. Nach 24 h ließ sich gegenüber dem Basalwert keine signifikante Steigerung mehr messen. Zwischen den beiden Untersuchungsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In der Untersuchung zeigte sich somit kein Einfluss von PLD1 auf die Aggregatbildung.

Hurley *et al.* untersuchten die Aktivierung von Thrombozyten und ihre Aggregatbildung mit neutrophilen Granulozyten in ihrer Arbeit zur Streptokokken-induzierten Sepsis. Hierin beschreiben sie einen Anstieg der Aggregate 12 h nach Infektion und eine Normalisierung nach bereits 18 h. Als Ursache vermuten sie, dass eine verstärkte Aggregatformation im zeitlich „mittleren Abschnitt“ der Sepsis, als Resultat der erfolgten Aktivierung von Thrombozyten stattfindet und anschließend ein Abbau der Aggregate in der „späten Sepsis“ erfolgt [110]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich der Aggregatanstieg bereits nach 5 h und somit früher als in den Untersuchungen von Hurley *et al.*. Ein Grund hierfür könnten die unterschiedlichen eingesetzten Pathogene sein. Hurley *et al.* arbeiteten mit dem grampositiven Bakterium *S. pyogenes*, welches sie den Versuchstieren intraperitoneal injizierten, um so eine Entzündungsreaktion hervorzurufen. In der vorliegenden Arbeit wurde das LPS als Pathogen ebenfalls intraperitoneal appliziert. Es handelt sich dabei jedoch um die direkte Stimulation mit einem Endotoxin, was möglicherweise zu einer schnelleren Immunreaktion geführt haben könnte als die Applikation intakter grampositiver Bakterien in der Studie von Hurley *et al.*. Hurley *et al.* beobachteten außerdem einen Anstieg der Bakterienkonzentration im Blut im längeren Zeitverlauf von 12 h bis 18 h nach Applikation, wobei die Bakterienpräsenz in den untersuchten Organen Milz und Leber zur gleichen Zeit nicht weiter anstieg. Sie mutmaßen deshalb, dass *S.pyogenes* im Blut überleben könnte [110]. In der vorliegenden Arbeit wurden keine Bakterien injiziert, welche im Blut überleben könnten, sondern ausschließlich LPS. Auch dies könnte zu den unterschiedlichen Ergebnissen mit einer längeren oder späteren Reaktion im Modell von

Hurley *et al.* beitragen. Des Weiteren wurden zum Teil unterschiedliche Zeitpunkte nach Infektion gemessen. Da in dieser Arbeit keine Messungen nach 12 h oder 18 h durchgeführt wurden, sondern ausschließlich nach 5 h und 24 h, sind größere Aggregatmengen zu den Zeitpunkten 12 h und 18 h nicht auszuschließen. Hierfür müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Die Aggregatbildung von Thrombozyten und Leukozyten wurde in unserer Arbeitsgruppe zusätzlich zur FACS-Analyse auch mittels Immunhistochemie in Lungen – und Lebergewebe von *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen detektiert. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und *Pld1*<sup>+/+</sup>-Mäusen [83]. In dieser Studie zeigt sich somit kein signifikanter Einfluss von PLD1 auf die Aggregatbildung von Leukozyten und Thrombozyten.

## 4.7 Endorganschäden in der Sepsis in Abhängigkeit von PLD1

### 4.7.1 Funktionsbeeinträchtigung der Leber

Im Sepsis-assoziierten Multiorganversagen ist unter anderem die Leber betroffen. Ursächlich für das Leberversagen sind vermutlich direkt zellschädigende inflammatorische Faktoren wie freigesetzte Zytokine, Sauerstoffradikale, sowie eine Hypoperfusion und Hypoxie durch eine verstärkte Blutgerinnung. Insbesondere in den Lebersinusoiden kann es im Rahmen der DIC zu Mikrozirkulationsstörungen kommen [111,112].

Um zu untersuchen, ob es in dem murinen Sepsismodell nach LPS–Applikation zur Schädigung der Leber kommt, wurden AST und ALT im Plasma bestimmt. Beide Transaminasen zeigten einen Anstieg nach LPS-Stimulation. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigte sich nach 24 h für das leberspezifische Enzym ALT mit einer geringeren Konzentration in *Pld1*<sup>-/-</sup>-Mäusen. ALT wird aufgrund seiner Lokalisation im Zytoplasma bei hepatischer Schädigung schneller freigesetzt als AST, welches aufgrund seines größeren Vorkommens in Mitochondrien erst bei schwerer Schädigung freigesetzt wird. Für AST konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Eine Rolle hierbei könnte die zur Stimulation eingesetzte LPS-Menge spielen. Um herauszufinden, ob eine stärkere Stimulation mit einer größeren Menge LPS oder mehrere zeitlich aufeinander folgende Stimulationen ggf. stärkere Unterschiede zwischen den Gruppen hervorgerufen hätten, müssten weitere Untersuchungen folgen.

In unserer Arbeitsgruppe wurde aus den oben genannten Daten und Zeitpunkten für jedes Versuchstier der De-Ritis-Quotient bestimmt. Ein Quotient >1 spricht dabei für einen

schweren Leberschaden (3.4). Bei der Datenanalyse war der De-Ritis-Quotient bei 75% der untersuchten *Pld1<sup>+/+</sup>*-Mäuse  $>1$ . Bei *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäusen war dieser lediglich bei 54% der Tiere  $>1$ , was auf eine tendenziell geringere Leberschädigung bei PLD1-Defizienz hindeutet. Einschränkend bezüglich der Aussagekraft ist zu erwähnen, dass innerhalb der Untersuchungsgruppen eine große interindividuelle Streuung zwischen den einzelnen Untersuchungstieren vorlag.

Als unspezifischer Marker für eine Zellschädigung wurde in dieser Arbeit außerdem die LDH im Plasma gemessen. Nach LPS-Stimulation stieg ihre Konzentration im Plasma in beiden untersuchten Gruppen. Ein signifikanter Unterschied in Assoziation mit PLD1 konnte nach 24 h mit einer geringeren LDH-Konzentration in der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe im Vergleich zur *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe gemessen werden. Daher ist die Zellschädigung in *Pld1<sup>-/-</sup>*-Tieren vermutlich deutlich geringer als in der Kontrollgruppe (Abbildung 3.8). Betrachtet man den zeitlichen Verlauf, so zeigte sich für AST, ALT und LDH bei den untersuchten Zeitpunkten 5 h und 24 h nach LPS-Stimulation eine im Verlauf progrediente Plasmakonzentration als Hinweis für einen zunehmenden Zellschaden.

Ähnliche Beobachtungen machten Hurley *et al.* in ihrer bereits in Kapitel 4.6 erwähnten Studie zur Streptokokken-induzierten Sepsis. Sie untersuchten ebenfalls die Aktivität von AST im Plasma im zeitlichen Verlauf nach Infektion und beobachteten eine progrediente AST-Aktivität, einhergehend mit progredienter Thrombozytopenie im Blut und einer Zunahme von Thrombozyten in den Lebersinusoiden (betrachtete Zeitpunkte 12 h und 18 h nach Infektion). Hieraus schlussfolgerten sie, dass es im Verlauf zur Akkumulation von aktivierten Thrombozyten in kleinen Gefäßen kommt. Dies führe zum Abfall der Thrombozytenkonzentration im Blut und gleichzeitig zu Mikrozirkulationsstörungen, welche zu Organschäden führen können [110].

#### 4.7.2 Die PLD1-Defizienz geht mit einer geringeren Apoptoserate einher

Wenn es im Rahmen der Sepsis zur Organschädigung kommt, werden auf zellulärer Ebene regelhaft Apoptosekaskade aktiviert. Ein zentraler Bestandteil dieser Kaskaden ist die Aktivierung von Caspase 3, welche durch verschiedene Faktoren wie u.a. TNF- $\alpha$  oder LPS aktiviert wird [90,113]. Um die nach LPS-Stimulation reaktive Zellschädigung nachzuweisen, wurden sowohl im *in vitro* als auch im *in vivo* Modell Caspasen als Marker für eine beginnende Zellapoptose untersucht. Im *in vitro* Modell konnte in dieser Arbeit nach LPS-Stimulation eine signifikant geringere Apoptoserate in *Pld1<sup>-/-</sup>*-MEFs verglichen mit *Pld1<sup>+/+</sup>*-MEFs nachgewiesen werden. Entsprechend ließen sich im Mausmodell nach LPS-

Stimulation in Leber- und Lungengewebe immunhistochemisch vermehrt Caspase 3-positive Zellen detektieren. Die Anzahl der Caspase 3-positiven Zellen war in der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe in Vergleich zur *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe erniedrigt. Zusammen mit den Ergebnissen der in Kapitel 4.7.1 beschriebenen indirekten Marker für Zellschädigung AST, ALT und LDH deuten die Ergebnisse auf eine geringere Organschädigung bei PLD1-Defizienz hin.

## 4.8 Zusammenfassung, Kritik und Ausblick

In meiner Arbeit untersuchte ich sowohl in Zellkultur als auch im Tiermodell den Einfluss von PLD1 auf verschiedene Aspekte der entzündlichen Immunantwort in Anwesenheit gramnegativer Bakterien. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine PLD1-Defizienz mit einer geringeren proinflammatorischen Immunreaktion und in der Folge weniger thrombotischen Komplikationen und geringeren Organschädigungen einhergeht.

Nach LPS-Stimulation ließ sich zunächst eine schnelle Aktivierung humoraler und zellulärer Faktoren der angeborenen Immunantwort im Blut nachweisen. Hierbei zeigten sich Hinweise auf eine geringere Ausprägung der Immunantwort in der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe im Vergleich zur *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe. Im Verlauf der Sepsis kam es zu einer progredienten Thrombozytopenie, welche ebenfalls zu einzelnen Zeitpunkten in der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe signifikant geringer ausgeprägt war als in der *Pld1<sup>+/+</sup>*-Gruppe. Durch reduzierte Thrombin- und Fibrinogenierung lässt sich bei PLD1-Defizienz eine geringere DIC-Neigung und damit ein geringerer Organschaden vermuten. Tatsächlich ließen sich in der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe an den untersuchten Organen Leber und Lunge weniger pathologische Veränderungen nachweisen. Als protektive Faktoren sind hierfür vermutlich sowohl die mildere Inflammation als auch die verbesserte Mikrozirkulation verantwortlich. Schlussendlich konnte in unserem Modell in einem Überlebensversuch nach LPS-Stimulation eine signifikant geringere Mortalität für *Pld1<sup>-/-</sup>*-Mäuse gezeigt werden [83].

Es ist jedoch zu erwähnen, dass sich zwar in vielen Versuchen eine mildere Entzündungsreaktion in der *Pld1<sup>-/-</sup>*-Gruppe zeigte, dieser Unterschied zur Vergleichsgruppe jedoch zum Teil nur zu einzelnen Zeitpunkten als signifikant nachgewiesen werden konnte. Außerdem bestanden vereinzelt hohe interindividuelle Schwankungen innerhalb der Untersuchungsgruppen. Um hier mögliche Einflussfaktoren und die Stabilität der Wirkung von PLD1 zu erforschen, müssten weitere Untersuchungen mit gegebenenfalls größeren Untersuchungsgruppen folgen.

In der kritischen Rückschau ist festzustellen, dass unser Sepsismodell stark vereinfacht ist und so eine reale Sepsis nur eingeschränkt repräsentieren kann. Durch die einmalige intraperitoneale LPS-Applikation ist das Modell zwar gut kontrollierbar, aber hinsichtlich der Übertragbarkeit auf eine reale Sepsis aufwändigeren Systemen wie beispielsweise dem *Cecum ligation and puncture* (CLP)-Modell unterlegen, in welchem kontinuierlich Bakterien freigesetzt werden [114]. Dennoch bildet die Arbeit gerade aufgrund ihrer Vereinfachung und den vielen untersuchten Aspekten eine Grundlage mit vielversprechenden Ergebnissen, welche im Verlauf gezielt in komplexeren Modellen untersucht werden könnten.

Aufgrund seiner modulatorischen Wirkung in der Entzündung erscheint PLD1 als therapeutisches Target nicht nur in der Sepsis, sondern für eine Vielzahl von Erkrankungen interessant. Entsprechend wurde PLD1 bereits bei neurodegenerativen und kardiovaskulären Erkrankungen oder Malignomen als potenzielles Target diskutiert und experimentelle Studien in unterschiedlichen Krankheitsfeldern durchgeführt [72,76,115].

Anhand der vorliegenden Untersuchungen lässt sich jedoch auch kritisch feststellen, dass bei einer möglichen therapeutischen Modulation von PLD1 das Therapiemonitoring aufgrund der vielfältigen regulatorischen Beteiligungen von PLD1 eine große Herausforderung darstellen würde. Bezüglich des Einsatzes in der Sepsistherapie käme erschwerend hinzu, dass die Sepsis ebenfalls von vielen unterschiedlichen Parametern abhängig ist, wie z.B. Komorbiditäten oder Alter des Patienten. Bereits in unserem vereinfachten und gut kontrollierbaren Mausmodell zeigten sich in einigen Versuchen größere interindividuelle Schwankungen. Zudem müssen im Rahmen der Sepsis in der Regel schnelle Therapieentscheidungen getroffen werden, wodurch patientenspezifische Faktoren nur eingeschränkt berücksichtigt werden können. Eine Modulation bzw. Suppression der Immunantwort birgt neben den möglichen protektiven Effekten gleichzeitig das Risiko, dass die eigentliche Infektion nicht mehr hinreichend bekämpft werden kann [116]. Bisher haben immunmodulatorische Therapien in der Sepsis im klinischen Alltag noch keine eindeutig überzeugenden Ergebnisse zeigen können. Perspektivisch wäre PLD1 als Target möglicherweise im Rahmen chronischer Erkrankungen vielversprechender, bei denen Therapien längerfristig geplant und individuell moduliert werden können. Hierzu sind umfangreiche weitere Studien notwendig.

## 5 Anhang

### 5.1 Literaturverzeichnis

- [1] J. Cohen, „The immunopathogenesis of sepsis“, *Nature*, Bd. 420, Nr. 6917, S. 885–891, Dez. 2002, doi: 10.1038/nature01326.
- [2] M. Singer u. a., „The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)“, *JAMA*, Bd. 315, Nr. 8, S. 801, Feb. 2016, doi: 10.1001/jama.2016.0287.
- [3] B. Gyawali, K. Ramakrishna, und A. S. Dhamoon, „Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management“, *SAGE Open Medicine*, Bd. 7, S. 205031211983504, Jan. 2019, doi: 10.1177/2050312119835043.
- [4] D. J. Funk, J. E. Parrillo, und A. Kumar, „Sepsis and Septic Shock: A History“, *Critical Care Clinics*, Bd. 25, Nr. 1, S. 83–101, Jan. 2009, doi: 10.1016/j.ccc.2008.12.003.
- [5] M. Singer u. a., „The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)“, *JAMA*, Bd. 315, Nr. 8, S. 801, Feb. 2016, doi: 10.1001/jama.2016.0287.
- [6] C. W. Seymour, T. D. Rea, J. M. Kahn, A. J. Walkey, D. M. Yealy, und D. C. Angus, „Severe Sepsis in Pre-Hospital Emergency Care: Analysis of Incidence, Care, and Outcome“, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Bd. 186, Nr. 12, S. 1264–1271, Dez. 2012, doi: 10.1164/rccm.201204-0713OC.
- [7] G. Polat, R. A. Ugan, E. Cadirci, und Z. Halici, „Sepsis and Septic Shock: Current Treatment Strategies and New Approaches“, *The Eurasian Journal of Medicine*, Bd. 49, Nr. 1, S. 53–58, März 2017, doi: 10.5152/eurasianjmed.2017.17062.
- [8] C. Fleischmann-Struzek u. a., „Challenges in assessing the burden of sepsis and understanding the inequalities of sepsis outcomes between National Health Systems: secular trends in sepsis and infection incidence and mortality in Germany“, *Intensive Care Med*, Bd. 44, Nr. 11, S. 1826–1835, Nov. 2018, doi: 10.1007/s00134-018-5377-4.
- [9] C. Fleischmann u. a., „Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations“, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Bd. 193, Nr. 3, S. 259–272, Feb. 2016, doi: 10.1164/rccm.201504-0781OC.
- [10] J. E. Gotts und M. A. Matthay, „Sepsis: pathophysiology and clinical management“, *BMJ*, S. i1585, Mai 2016, doi: 10.1136/bmj.i1585.
- [11] S. M. Opal und C. E. Huber, „Bench-to-bedside review: Toll-like receptors and their role in septic shock“, *Critical Care Medicine*, Bd. 30, Nr. 2, S. 12, 2002.
- [12] T. van der Poll und S. M. Opal, „Host–pathogen interactions in sepsis“, *The Lancet Infectious Diseases*, Bd. 8, Nr. 1, S. 32–43, Jan. 2008, doi: 10.1016/S1473-3099(07)70265-7.
- [13] M. Aziz, A. Jacob, W.-L. Yang, A. Matsuda, und P. Wang, „Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis“, *Journal of Leukocyte Biology*, Bd. 93, Nr. 3, S. 329–342, März 2013, doi: 10.1189/jlb.0912437.
- [14] S. Wright, R. Ramos, P. Tobias, R. Ulevitch, und J. Mathison, „CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein“, *Science*, Bd. 249, Nr. 4975, S. 1431–1433, Sep. 1990, doi: 10.1126/science.1698311.
- [15] L. A. J. O’Neill, D. Golenbock, und A. G. Bowie, „The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity“, *Nature Reviews Immunology*, Bd. 13, Nr. 6, S. c
- [16] Y. Kumagai und S. Akira, „Identification and functions of pattern-recognition

- receptors“, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Bd. 125, Nr. 5, S. 985–992, Mai 2010, doi: 10.1016/j.jaci.2010.01.058.
- [17] I. Botos, D. M. Segal, und D. R. Davies, „The Structural Biology of Toll-like Receptors“, *Structure*, Bd. 19, Nr. 4, S. 447–459, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.str.2011.02.004.
- [18] S. Mukherjee, S. Karmakar, und S. P. S. Babu, „TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review“, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, Bd. 20, Nr. 2, S. 193–204, März 2016, doi: 10.1016/j.bjid.2015.10.011.
- [19] E. M. Palsson-McDermott und L. A. J. O’Neill, „Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4“, *Immunology*, Bd. 113, Nr. 2, S. 153–162, Okt. 2004, doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x.
- [20] T. Kawasaki und T. Kawai, „Toll-Like Receptor Signaling Pathways“, *Frontiers in Immunology*, Bd. 5, Sep. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00461.
- [21] M. Cargnello und P. P. Roux, „Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases“, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Bd. 75, Nr. 1, S. 50–83, März 2011, doi: 10.1128/MMBR.00031-10.
- [22] B. Kaminska, „MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy—from molecular mechanisms to therapeutic benefits“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, Bd. 1754, Nr. 1–2, S. 253–262, Dez. 2005, doi: 10.1016/j.bbapap.2005.08.017.
- [23] E. K. Kim und E.-J. Choi, „Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Bd. 1802, Nr. 4, S. 396–405, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009.
- [24] E. S. Silverman *u. a.*, „The Transcription Factor Early Growth-response Factor 1 Modulates Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Immunoglobulin E, and Airway Responsiveness in Mice“, *Am J Respir Crit Care Med*, Bd. 163, Nr. 3, S. 778–785, März 2001, doi: 10.1164/ajrcem.163.3.2003123.
- [25] D. L. Coleman, A. H. Bartiss, V. P. Sukhatme, und J. Liu, „Lipopolysaccharide induces Egr-1 mRNA and protein in murine peritoneal macrophages.“, S. 8.
- [26] J. Schmidt *u. a.*, „Proinflammatory Role of Leukocyte-Derived Egr-1 in the Development of Murine Postoperative Ileus“, *Gastroenterology*, Bd. 135, Nr. 3, S. 926–936.e2, Sep. 2008, doi: 10.1053/j.gastro.2008.05.079.
- [27] B. G. Chousterman, F. K. Swirski, und G. F. Weber, „Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis“, *Seminars in Immunopathology*, Bd. 39, Nr. 5, S. 517–528, Juli 2017, doi: 10.1007/s00281-017-0639-8.
- [28] C. A. Dinarello, „Historical insights into cytokines“, *European Journal of Immunology*, Bd. 37, Nr. S1, S. S34–S45, Nov. 2007, doi: 10.1002/eji.200737772.
- [29] T. S. Blackwell und J. W. Christman, „Sepsis and cytokines: current status“, *British Journal of Anaesthesia*, Bd. 77, Nr. 1, S. 110–117, Juli 1996, doi: 10.1093/bja/77.1.110.
- [30] E. A. Carswell, L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, und B. Williamson, „An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Bd. 72, Nr. 9, S. 3666–3670, Sep. 1975, doi: 10.1073/pnas.72.9.3666.
- [31] N. Parameswaran und S. Patial, „Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages“, *Critical Reviews<sup>TM</sup> in Eukaryotic Gene Expression*, Bd. 20, Nr. 2, S. 87–103, 2010, doi: 10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v20.i2.10.
- [32] W. Schulte, J. Bernhagen, und R. Bucala, „Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View“, *Mediators of Inflammation*, Bd. 2013, S. 1–16, 2013, doi: 10.1155/2013/165974.

- [33] H. Zelová und J. Hošek, „TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: interactions between old acquaintances“, *Inflamm. Res.*, Bd. 62, Nr. 7, S. 641–651, Juli 2013, doi: 10.1007/s00011-013-0633-0.
- [34] H. Chaudhry, J. Zhou, Y. Zhong, M. M. Ali, P. S. Nagarkatti, und M. Nagarkatti, „Role of Cytokines as a Double-edged Sword in Sepsis“, S. 28, 2015.
- [35] J.-M. Zhang und J. An, „Cytokines, Inflammation, and Pain“., *International Anesthesiology Clinics*, Bd. 45, Nr. 2, S. 27–37, 2007, doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e.
- [36] Y. Lerman und M. Kim, „Neutrophil Migration Under Normal and Sepsis Conditions“, *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, Bd. 15, Nr. 1, S. 19–28, Jan. 2015, doi: 10.2174/1871529X15666150108113236.
- [37] T. K. Kishimoto, M. A. Jutila, und E. C. Butcher, „Neutrophil Mac-i and MEL-14 Adhesion Proteins Inversely Regulated by Chemotactic Factors“, Bd. 245, S. 5.
- [38] F. Sônego u. a., „Paradoxical Roles of the Neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious“, *Frontiers in Immunology*, Bd. 7, Apr. 2016, doi: 10.3389/fimmu.2016.00155.
- [39] J. N. Sharma, A. Al-Omran, und S. S. Parvathy, „Role of nitric oxide in inflammatory diseases“, *Inflammopharmacol*, Bd. 15, Nr. 6, S. 252–259, Dez. 2007, doi: 10.1007/s10787-007-0013-x.
- [40] S. R. Clark u. a., „Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood“, *Nature Medicine*, Bd. 13, Nr. 4, S. 463–469, Apr. 2007, doi: 10.1038/nm1565.
- [41] T. Lisman, „Platelet–neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease“, *Cell and Tissue Research*, Bd. 371, Nr. 3, S. 567–576, März 2018, doi: 10.1007/s00441-017-2727-4.
- [42] V. Papayannopoulos, „Neutrophil extracellular traps in immunity and disease“, *Nat Rev Immunol*, Bd. 18, Nr. 2, S. 134–147, Feb. 2018, doi: 10.1038/nri.2017.105.
- [43] J. Rossaint, A. Margraf, und A. Zarbock, „Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation“, *Front. Immunol.*, Bd. 9, S. 2712, Nov. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02712.
- [44] K. Okamoto, T. Tamura, und Y. Sawatsubashi, „Sepsis and disseminated intravascular coagulation“, *Journal of Intensive Care*, Bd. 4, Nr. 1, Dez. 2016, doi: 10.1186/s40560-016-0149-0.
- [45] F. Vardon-Bounes, S. Ruiz, M.-P. Gratacap, C. Garcia, B. Payrastre, und V. Minville, „Platelets Are Critical Key Players in Sepsis“, *IJMS*, Bd. 20, Nr. 14, S. 3494, Juli 2019, doi: 10.3390/ijms20143494.
- [46] M. Levi und T. van der Poll, „Inflammation and coagulation“., *Critical Care Medicine*, Bd. 38, S. S26–S34, Feb. 2010, doi: 10.1097/CCM.0b013e3181c98d21.
- [47] N. Semeraro, C. T. Ammollo, F. Semeraro, und M. Colucci, „SEPSIS-ASSOCIATED DISSEMINATED INTRAVASCULAR COAGULATION AND THROMBOEMBOLIC DISEASE“, *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, Bd. 2, Nr. 3, S. 2010024, Aug. 2010, doi: 10.4084/mjhid.2010.024.
- [48] A. J. Chu, „Tissue Factor, Blood Coagulation, and Beyond: An Overview“, *International Journal of Inflammation*, Bd. 2011, S. 1–30, 2011, doi: 10.4061/2011/367284.
- [49] A.-C. J. M. de Pont u. a., „Endotoxaemia induces resistance to activated protein C in healthy humans“, *British Journal of Haematology*, Bd. 134, Nr. 2, S. 213–219, Juli 2006, doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06127.x.
- [50] R. S. Hotchkiss, L. L. Moldawer, S. M. Opal, K. Reinhart, I. R. Turnbull, und J.-L. Vincent, „Sepsis and septic shock“, *Nature Reviews Disease Primers*, Bd. 2, Nr. 1, Dez. 2016, doi: 10.1038/nrdp.2016.45.

- [51] D. C. Angus und T. van der Poll, „Severe Sepsis and Septic Shock“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 369, Nr. 9, S. 840–851, Aug. 2013, doi: 10.1056/NEJMra1208623.
- [52] C. Papageorgiou u. a., „Disseminated Intravascular Coagulation: An Update on Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutic Strategies“, *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, S. 107602961880642, Okt. 2018, doi: 10.1177/1076029618806424.
- [53] C. Hörner u. a., „Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis“, *Der Anaesthetist*, Bd. 53, Nr. 1, S. 10–28, Jan. 2004, doi: 10.1007/s00101-003-0626-4.
- [54] M. M. Levy, L. E. Evans, und A. Rhodes, „The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update“, *Intensive Care Medicine*, Bd. 44, Nr. 6, S. 925–928, Juni 2018, doi: 10.1007/s00134-018-5085-0.
- [55] C. L. Sprung u. a., „Hydrocortisone Therapy for Patients with Septic Shock“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 358, Nr. 2, S. 111–124, Jan. 2008, doi: 10.1056/NEJMoa071366.
- [56] P. Qiu, X. Cui, J. Sun, J. Welsh, C. Natanson, und P. Q. Eichacker, „Antitumor Necrosis Factor Therapy Is Associated With Improved Survival in Clinical Sepsis Trials: A Meta-Analysis“, *Critical Care Medicine*, Bd. 41, Nr. 10, S. 2419–2429, Okt. 2013, doi: 10.1097/CCM.0b013e3182982add.
- [57] Deutsche Sepsis Gesellschaft e. V. u. a., „S3-Leitlinie Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge: Langfassung“, *Med Klin Intensivmed Notfmed*, Bd. 115, Nr. S2, S. 37–109, Mai 2020, doi: 10.1007/s00063-020-00685-0.
- [58] M. Saito und J. Kanfer, „Solubilization and properties of a membrane-bound enzyme from rat brain catalyzing a base-exchange reaction“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 53, Nr. 2, S. 391–398, Juli 1973, doi: 10.1016/0006-291X(73)90674-8.
- [59] M. Saito und J. Kanfer, „Phosphatidohydrolase activity in a solubilized preparation from rat brain particulate fraction“, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Bd. 169, Nr. 1, S. 318–323, Juli 1975, doi: 10.1016/0003-9861(75)90346-X.
- [60] R. Cummings, N. Parinandi, L. Wang, P. Usatyuk, und V. Natarajan, „Phospholipase D/phosphatidic acid signal transduction: Role and physiological significance in lung“, in *Oxygen/Nitrogen Radicals: Cell Injury and Disease*, V. Vallyathan, X. Shi, und V. Castranova, Hrsg. Boston, MA: Springer US, 2002, S. 99–109. doi: 10.1007/978-1-4615-1087-1\_11.
- [61] D. J. Powner, T. R. Pettitt, R. Anderson, G. B. Nash, und M. J. O. Wakelam, „Stable adhesion and migration of human neutrophils requires phospholipase D-mediated activation of the integrin CD11b/CD18“, *Molecular Immunology*, Bd. 44, Nr. 12, S. 3211–3221, Mai 2007, doi: 10.1016/j.molimm.2007.01.033.
- [62] M. A. Frohman, „The phospholipase D superfamily as therapeutic targets“, *Trends in Pharmacological Sciences*, Bd. 36, Nr. 3, S. 137–144, März 2015, doi: 10.1016/j.tips.2015.01.001.
- [63] J. Gomez-Cambronero, „New Concepts in Phospholipase D Signaling in Inflammation and Cancer“, *The Scientific World JOURNAL*, Bd. 10, S. 1356–1369, 2010, doi: 10.1100/tsw.2010.116.
- [64] R. C. Bruntz, C. W. Lindsley, und H. A. Brown, „Phospholipase D Signaling Pathways and Phosphatidic Acid as Therapeutic Targets in Cancer“, *Pharmacological Reviews*, Bd. 66, Nr. 4, S. 1033–1079, Okt. 2014, doi: 10.1124/pr.114.009217.
- [65] M. Elvers u. a., „Impaired I1b 3 Integrin Activation and Shear-Dependent Thrombus Formation in Mice Lacking Phospholipase D1“, *Science Signaling*, Bd. 3, Nr. 103, S. ra1–ra1, Jan. 2010, doi: 10.1126/scisignal.2000551.

- [66] K. E. Meier, T. C. Gibbs, S. M. Knoepp, und K. M. Ella, „Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Bd. 1439, Nr. 2, S. 199–213, Juli 1999, doi: 10.1016/S1388-1981(99)00095-5.
- [67] M. McDermott, M. J. O. Wakelam, und A. J. Morris, „Phospholipase D“, *Biochemistry and Cell Biology*, Bd. 82, Nr. 1, S. 225–253, Feb. 2004, doi: 10.1139/o03-079.
- [68] M. Vorland, V. A. T. Thorsen, und H. Holmsen, „Phospholipase D in platelets and other cells“, *Platelets*, Bd. 19, Nr. 8, S. 582–594, Jan. 2008, doi: 10.1080/09537100802454992.
- [69] M. Liscovitch, M. Czarny, G. Fiucci, und X. Tang, „Phospholipase D : molecular and cell biology of a novel gene family“, S. 15, 2000.
- [70] V. Natarajan, W. M. Scribner, und S. Vepa, „Regulation of phospholipase D by tyrosine kinases“, *Chemistry and Physics of Lipids*, Bd. 80, Nr. 1–2, S. 103–116, Mai 1996, doi: 10.1016/0009-3084(96)02548-0.
- [71] D. W. Kang, K.-Y. Choi, und D. S. Min, „Functional Regulation of Phospholipase D Expression in Cancer and Inflammation“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 289, Nr. 33, S. 22575–22582, Aug. 2014, doi: 10.1074/jbc.R114.569822.
- [72] T. Schönberger *u. a.*, „Pivotal Role of Phospholipase D1 in Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Mediated Inflammation and Scar Formation after Myocardial Ischemia and Reperfusion in Mice“, *The American Journal of Pathology*, Bd. 184, Nr. 9, S. 2450–2464, Sep. 2014, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.06.005.
- [73] S. Sethu, P. N. Pushparaj, und A. J. Melendez, „Phospholipase D1 Mediates TNF $\alpha$ -Induced Inflammation in a Murine Model of TNF $\alpha$ -Induced Peritonitis“, *PLoS ONE*, Bd. 5, Nr. 5, S. e10506, Mai 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010506.
- [74] D. W. Kang *u. a.*, „Phospholipase D1 Has a Pivotal Role in Interleukin-1 -Driven Chronic Autoimmune Arthritis through Regulation of NF- $\kappa$ B, Hypoxia-Inducible Factor 1 , and FoxO3a“, *Molecular and Cellular Biology*, Bd. 33, Nr. 14, S. 2760–2772, Juli 2013, doi: 10.1128/MCB.01519-12.
- [75] B. Krishnan, R. Kayed, und G. Tagliavola, „Elevated phospholipase D isoform 1 in Alzheimer’s disease patients’ hippocampus: Relevance to synaptic dysfunction and memory deficits“, *Alzheimer’s & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, Bd. 4, S. 89–102, 2018, doi: 10.1016/j.trci.2018.01.002.
- [76] F. V. Bravo, J. Da Silva, R. B. Chan, G. Di Paolo, A. Teixeira-Castro, und T. G. Oliveira, „Phospholipase D functional ablation has a protective effect in an Alzheimer’s disease *Caenorhabditis elegans* model“, *Scientific Reports*, Bd. 8, Nr. 1, Dez. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-21918-5.
- [77] J.-K. Jin *u. a.*, „Phospholipase D1 is associated with amyloid precursor protein in Alzheimer’s disease“, *Neurobiology of Aging*, Bd. 28, Nr. 7, S. 1015–1027, Juli 2007, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.022.
- [78] W. H. Ali *u. a.*, „Deficiencies of the Lipid-Signaling Enzymes Phospholipase D1 and D2 Alter Cytoskeletal Organization, Macrophage Phagocytosis, and Cytokine-Stimulated Neutrophil Recruitment“, *PLoS ONE*, Bd. 8, Nr. 1, S. e55325, Jan. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0055325.
- [79] L. J. Norton *u. a.*, „PLD1 rather than PLD2 regulates phorbol-ester-, adhesion-dependent and Fc  $\gamma$ -receptor-stimulated ROS production in neutrophils“, *Journal of Cell Science*, Bd. 124, Nr. 12, S. 1973–1983, Juni 2011, doi: 10.1242/jcs.082008.
- [80] S. Bechoua und L. W. Daniel, „Phospholipase D Is Required in the Signaling Pathway Leading to p38 MAPK Activation in Neutrophil-like HL-60 Cells, Stimulated by N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 276,

- Nr. 34, S. 31752–31759, Aug. 2001, doi: 10.1074/jbc.M101265200.
- [81] S. C. Friday und D. A. Fox, „Phospholipase D enzymes facilitate IL-17- and TNF $\alpha$ -induced expression of proinflammatory genes in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RASf)“, *Immunology Letters*, Bd. 174, S. 9–18, Juni 2016, doi: 10.1016/j.imlet.2016.04.001.
- [82] C.-H. Oh, S.-Y. Park, und 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*, Bd. 66, Nr. 1, S. 69–77, März 2014, doi: 10.1016/j.cyto.2013.12.018.
- [83] M.-A. Urbahn u. a., „Phospholipase D1 regulation of TNF-alpha protects against responses to LPS“, *Scientific Reports*, Bd. 8, Nr. 1, Dez. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-28331-y.
- [84] W. Ai, H. Li, N. Song, L. Li, und H. Chen, „Optimal Method to Stimulate Cytokine Production and Its Use in Immunotoxicity Assessment“, *IJERPH*, Bd. 10, Nr. 9, S. 3834–3842, Aug. 2013, doi: 10.3390/ijerph10093834.
- [85] R. D. Gray u. a., „Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps“, *J Inflamm*, Bd. 10, Nr. 1, S. 12, 2013, doi: 10.1186/1476-9255-10-12.
- [86] H. Sengelov, L. Kjeldsen, und M. S. Diamond, „Subcellular Localization and Dynamics of Mac-1 (amfi2) in Human Neutrophils“, S. 10.
- [87] W. Hartwig, R. E. Jimenez, C. Fernandez-del Castillo, A. Kelliher, R. Jones, und A. L. Warshaw, „Expression of the Adhesion Molecules Mac-1 and I-Selectin on Neutrophils in Acute Pancreatitis is Protease- and Complement-Dependent“, *Annals of Surgery*, Bd. 233, Nr. 3, S. 371–378, März 2001, doi: 10.1097/00000658-200103000-00011.
- [88] S. Zeerleder, C. E. Hack, und W. A. Wuillemin, „Disseminated Intravascular Coagulation in Sepsis“, *Chest*, Bd. 128, Nr. 4, S. 2864–2875, Okt. 2005, doi: 10.1378/chest.128.4.2864.
- [89] *Herold et al., Innere Medizin 2014, Eigenverlag ISBN: 978-3-9814660-3-4.*
- [90] H. Jaeschke, M. A. Fisher, J. A. Lawson, A. Farhood, und D. A. Jones, „Activation of Caspase 3 (CPP32)-Like Proteases Is Essential for TNF- $\alpha$ -Induced Hepatic Parenchymal Cell Apoptosis and Neutrophil-Mediated Necrosis in a Murine Endotoxin Shock Model“, *The Journal of Immunology*, S. 8.
- [91] A. G. Porter und R. U. Jänicke, „Emerging roles of caspase-3 in apoptosis“, *Cell Death Differ*, Bd. 6, Nr. 2, S. 99–104, Feb. 1999, doi: 10.1038/sj.cdd.4400476.
- [92] K. Reinhart, R. Daniels, N. Kissoon, F. R. Machado, R. D. Schachter, und S. Finfer, „Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution“, *N Engl J Med*, Bd. 377, Nr. 5, S. 414–417, Aug. 2017, doi: 10.1056/NEJMp1707170.
- [93] RKI, Epidemiologisches Bulletin 37/17, „37\_17.pdf“.
- [94] J. Cohen, „The immunopathogenesis of sepsis“, *Nature*, Bd. 420, Nr. 6917, S. 885–891, Dez. 2002, doi: 10.1038/nature01326.
- [95] M. Bluth, „Use of Gene Expression Profiles in Cells of Peripheral Blood to Identify New Molecular Markers of Acute Pancreatitis“, *Arch Surg*, Bd. 143, Nr. 3, S. 227, März 2008, doi: 10.1001/archsurg.2007.73.
- [96] S. Sethu, P. N. Pushparaj, und A. J. Melendez, „Phospholipase D1 Mediates TNF $\alpha$ -Induced Inflammation in a Murine Model of TNF $\alpha$ -Induced Peritonitis“, *PLoS ONE*, Bd. 5, Nr. 5, S. e10506, Mai 2010, doi: 10.1371/journal.pone.0010506.
- [97] Avi ASHKENAZI\*†, SCOT A. MARSTERS\*, DANIEL J. CAPON\*†, STEVEN M. CHAMOW§, IRENE S. FIGARI¶, DIANE PENNICAI¶, DAVID V. GOEDDELII, MICHAEL A. PALLADINO¶, AND DOUGLAS H. SMITH\*, „pnas01073-0170.pdf Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor-immunoadhesin“.

- [98] K. Pfeffer *u. a.*, „Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection“, *Cell*, Bd. 73, Nr. 3, S. 457–467, Mai 1993, doi: 10.1016/0092-8674(93)90134-C.
- [99] S.-M. Lee, H.-J. Choi, C.-H. Oh, J.-W. Oh, und J.-S. Han, „Leptin Increases TNF- $\alpha$  Expression and Production through Phospholipase D1 in Raw 264.7 Cells“, *PLOS ONE*, Bd. 9, Nr. 7, S. 9, 2014.
- [100] J. Yao, N. Mackman, T. S. Edgington, und S.-T. Fan, „Lipopolysaccharide Induction of the Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Promoter in Human Monocytic Cells“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 272, Nr. 28, S. 17795–17801, Juli 1997, doi: 10.1074/jbc.272.28.17795.
- [101] B. Grimbacher, W. K. Aicher, H. H. Peter, und H. Eibel, „TNF- $\alpha$  induces the transcription factor Egr-1, pro-inflammatory cytokines and cell proliferation in human skin fibroblasts and synovial lining cells“, S. 8.
- [102] X. M. Cao, G. R. Guy, V. P. Sukhatme, und Y. H. Tan, „Regulation of the Egr-1 gene by tumor necrosis factor and interferons in primary human fibroblasts.“, *Journal of Biological Chemistry*, Bd. 267, Nr. 2, S. 1345–1349, Jan. 1992, doi: 10.1016/S0021-9258(18)48437-2.
- [103] T. van der Bruggen, S. Nijenhuis, E. van Raaij, J. Verhoef, und B. Sweder van Asbeck, „Lipopolysaccharide-Induced Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Human Monocytes Involves the Raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 Pathway“, *Infect. Immun.*, Bd. 67, Nr. 8, S. 3824–3829, Aug. 1999, doi: 10.1128/IAI.67.8.3824-3829.1999.
- [104] M. Guha *u. a.*, „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“, Bd. 98, Nr. 5, S. 12, 2001.
- [105] W. H. Ali *u. a.*, „Deficiencies of the Lipid-Signaling Enzymes Phospholipase D1 and D2 Alter Cytoskeletal Organization, Macrophage Phagocytosis, and Cytokine-Stimulated Neutrophil Recruitment“, *PLoS ONE*, Bd. 8, Nr. 1, S. e55325, Jan. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0055325.
- [106] O. Shannon, „The role of platelets in sepsis“, *Res Pract Thromb Haemost*, Bd. 5, Nr. 1, S. 27–37, Jan. 2021, doi: 10.1002/rth2.12465.
- [107] C.-M. Tsao, S.-T. Ho, und C.-C. Wu, „Coagulation abnormalities in sepsis“, *Acta Anaesthesiologica Taiwanica*, Bd. 53, Nr. 1, S. 16–22, März 2015, doi: 10.1016/j.aat.2014.11.002.
- [108] J. Simmons und J.-F. Pittet, „The coagulopathy of acute sepsis“, *Current Opinion in Anaesthesiology*, Bd. 28, Nr. 2, S. 227–236, Apr. 2015, doi: 10.1097/ACO.0000000000000163.
- [109] A. D. Michelson, M. R. Barnard, L. A. Krueger, C. R. Valeri, und M. I. Furman, „Circulating Monocyte-Platelet Aggregates Are a More Sensitive Marker of In Vivo Platelet Activation Than Platelet Surface P-Selectin: Studies in Baboons, Human Coronary Intervention, and Human Acute Myocardial Infarction“, *Circulation*, Bd. 104, Nr. 13, S. 1533–1537, Sep. 2001, doi: 10.1161/hc3801.095588.
- [110] S. M. Hurley, N. Lutay, B. Holmqvist, und O. Shannon, „The Dynamics of Platelet Activation during the Progression of Streptococcal Sepsis“, *PLOS ONE*, Bd. 11, Nr. 9, S. e0163531, Sep. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0163531.
- [111] E. Woźnica, M. Ingot, R. Woźnica, und L. Łysenko, „Liver dysfunction in sepsis“, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, Bd. 27, Nr. 4, S. 547–552, Apr. 2018, doi: 10.17219/acem/68363.
- [112] M. Minemura, „Liver involvement in systemic infection“, *World Journal of Hepatology*, Bd. 6, Nr. 9, S. 632, 2014, doi: 10.4254/wjh.v6.i9.632.
- [113] T. Shioiri *u. a.*, „Caspase-3 is activated and rapidly released from human umbilical

vein endothelial cells in response to lipopolysaccharide“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Bd. 1792, Nr. 10, S. 1011–1018, Okt. 2009, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.06.006.

[114] L. Dejager, I. Pinheiro, E. Dejonckheere, und C. Libert, „Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?“, *Trends in Microbiology*, Bd. 19, Nr. 4, S. 198–208, Apr. 2011, doi: 10.1016/j.tim.2011.01.001.

[115] H. A. Brown, P. G. Thomas, und C. W. Lindsley, „Targeting phospholipase D in cancer, infection and neurodegenerative disorders“, *Nature Reviews Drug Discovery*, Bd. 16, Nr. 5, S. 351–367, Mai 2017, doi: 10.1038/nrd.2016.252.

[116] D. J. Stearns-Kurosawa, M. F. Osuchowski, C. Valentine, S. Kurosawa, und D. G. Remick, „The Pathogenesis of Sepsis“, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, Bd. 6, Nr. 1, S. 19–48, Feb. 2011, doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130327.

## 5.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1</b> Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden nach LPS-Bindung an TLR 4	5
<b>Abbildung 1.2</b> Schematische Darstellung der MAP3K-Kaskade	6
<b>Abbildung 1.3</b> Funktionen der Neutrophilen im Rahmen der Immunantwort	9
<b>Abbildung 1.4</b> Spaltung von Phosphatidylcholin durch PLD1	12
<b>Abbildung 1.5</b> Mortalität in Abhängigkeit von PLD1 nach i.p. LPS-Injektion	15
<b>Abbildung 2.1</b> Aufsteigende Alkoholreihe zur Organentwässerung	23
<b>Abbildung 2.2</b> Aufbau eines Blotsystems	35
<b>Abbildung 3.1</b> Mäuse mit PLD1-Defizienz zeigen nach LPS-Stimulation im Plasma eine signifikant niedrigere TNF- $\alpha$ -Konzentration als <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> -Mäuse.	39
<b>Abbildung 3.2</b> <i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> -MEFs zeigen nach LPS-Stimulation eine geringere Phosphorylierung von MEK1/2 und eine niedrigere Egr-1-Expression als <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> -MEFs.	40
<b>Abbildung 3.3</b> <i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse zeigen nach LPS-Stimulation eine signifikant geringere relative Egr-1-Expression in Lebergewebe.	41
<b>Abbildung 3.4</b> Nach LPS-Stimulation kommt es in <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> - und <i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen zur Leukopenie. Nach 5 h ist diese in <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> -Mäusen im Vergleich zu <i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen signifikant stärker.	43
<b>Abbildung 3.5</b> Mäuse mit PLD1-Defizienz zeigen 1 h und 5 h nach LPS-Stimulation eine geringere Mac-1-Expression auf neutrophilen Granulozyten als <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> -Mäuse.	44
<b>Abbildung 3.6</b> Nach LPS-Stimulation zeigt sich eine zunehmende Thrombozytopenie in <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> - und <i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen. 5 h und 24 h nach Stimulationsbeginn ist diese in der <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> -Gruppe signifikant stärker.	45
<b>Abbildung 3.7</b> Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss von PLD1 auf die Ausbildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten.	46
<b>Abbildung 3.8</b> Nach LPS-Stimulation zeigen sich im Verlauf zunehmende Plasmaspiegel von ALT, AST und LDH. Nach 24 h sind die Spiegel von ALT und LDH in der <i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> -Gruppe verglichen mit der <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> -Gruppe signifikant niedriger.	48
<b>Abbildung 3.9</b> <i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse zeigen nach LPS-Stimulation intrahepatisch weniger thrombotische Läsionen als <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> -Mäuse.	49

<b>Abbildung 3.10</b> <i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse zeigen nach LPS-Stimulation intrapulmonal weniger thrombotische Läsionen als <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> -Mäuse.	50
<b>Abbildung 3.11</b> <i>Pld1</i> <sup>-/-</sup> -MEFs zeigen nach LPS-Stimulation geringere Caspase 3/7-Spiegel verglichen mit <i>Pld1</i> <sup>+/+</sup> -MEFs.	51
<b>Abbildung 3.12</b> Immunhistochemischer Nachweis aktiver Caspase 3 in Lungengewebe	52
<b>Abbildung 3.13</b> Immunhistochemischer Nachweis aktiver Caspase 3 in Lebergewebe	53

### 5.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1</b> Kriterien des SOFA Score	2
<b>Tabelle 1.2</b> Kriterien des qSOFA Score	2
<b>Tabelle 1.3</b> Therapieansatz 1 - Hour Bundle	11
<b>Tabelle 2.1</b> FACS Antikörper	25
<b>Tabelle 2.2</b> FACS Antikörper	25
<b>Tabelle 2.3</b> Mastermix cDNA-Synthese	28
<b>Tabelle 2.4</b> Mastermix qRT - PCR	29
<b>Tabelle 2.5</b> Primer	29
<b>Tabelle 2.6</b> Alkoholreihe zur Entfernung des Paraffins und zur Entwässerung	30
<b>Tabelle 2.7</b> Kulturmedium MEFs	32
<b>Tabelle 2.8</b> Primärantikörper für den Western Blot	36
<b>Tabelle 2.9</b> Sekundärantikörper für den Western Blot	36
<b>Tabelle 2.10</b> Befüllung einer 96-Well-Platte für den Caspase 3/7-Assay	37

## 5.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während der Arbeit im Labor und bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und ertragen haben.

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Margitta Elvers für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung. Desweiteren danke ich von Herzen den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Friedrich (danke, für die lustigen Stunden im Labor und für deine Aufmunterung und Gelassenheit), Martina und Meike für die Einarbeitung im Labor und Irena und Lilli für eure Anregungen und Unterstützung.

Außerdem danke ich meiner Familie und Freunden für die unendliche Geduld und Motivation.