

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

Systemische Analyse der Rolle und Bedeutung von
PLD2 für die Inflammation und
Adaptationsmechanismen nach Myokardinfarkt

Dissertation

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

vorgelegt von
Aglaia-Maria Klose

2024

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

*„Anfangs wollt ich fast verzagen
und ich glaubt, ich trüg es nie;
und ich hab es doch getragen,
aber fragt mich nur nicht wie.“*

Heinrich Heine

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Klose, A., Klier, M., Gorressen, S., Elvers, M., (2021), Enhanced Integrin Activation of PLD2-Deficient Platelets Accelerates Inflammation after Myocardial Infarction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9) 3210

Zusammenfassung

Herz-Kreislaufkrankungen, darunter insbesondere der akute Myokardinfarkt (MI), gehören zu den führenden Todesursachen weltweit. Die günstige Beeinflussung prognostischer Faktoren, wie etwa der Infarktgröße, könnte dazu beitragen, die globale kardiovaskuläre Krankheitslast zu reduzieren. Phospholipase D1 (PLD1) und Phospholipase D2 (PLD2) sind Enzyme, die Phospholipide in Phosphatsäure und Cholin spalten. PLD1-Defizienz schützt vor arterieller Thrombose und führt zu einer reduzierten Infarktgröße nach ischämischem Schlaganfall. Nach MI führte das Fehlen der PLD1 hingegen zu einer verringerten Zytokinausschüttung und einem vergrößerten Infarktgebiet. Im ischämischen Schlaganfall führte PLD2-Defizienz im Gegensatz zur PLD1 nicht zu Veränderungen der Infarktgröße. Ziel dieser Arbeit war es, den bisher unbekannten Einfluss von PLD2 auf postischämische Prozesse nach MI zu untersuchen.

Hierzu diente ein experimentelles Mausmodell zum akuten MI und die Verwendung von PLD2 *knock-out* sowie Kontroll-Tieren. Bei den Tieren wurde operativ ein MI induziert. Anschließend wurden Parameter der kardialen Pumpfunktion, Infarktgröße, Inflammation sowie der Narbenbildung zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Defizienz von PLD2 zu einer erhöhten Thrombozytenaktivierung nach MI führt. Durch Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ in der frühen Phase nach MI kam es in PLD2-defizienten Mäusen zu einer erhöhten IL-6 Ausschüttung aus Endothelzellen. Außerdem kam es zu einer vermehrten Zelleinwanderung von Leukozyten in die Infarktzone 24 Stunden nach MI und einem erniedrigten Spiegel von TGF- β im Serum 72 Stunden nach MI. Im Gegensatz zu PLD1 konnte durch PLD2 kein Einfluss auf die Expression von TNF- α festgestellt werden. Auch kam es nicht zu einer Veränderung der Infarkt- und Narbengröße oder der Herzfunktion durch PLD2-Defizienz.

Zusammenfassend konnten wir den Einfluss der PLD2 auf postischämische Prozesse nach Myokardinfarkt näher beschreiben und zeigen, dass PLD2 andere Wirkungswege und Funktionen hat als PLD1 und die Isoformen somit nicht redundant wirken. Beide Isoformen spielen eine zentrale Rolle in der myokardialen Adaptation nach MI und sollten in Zukunft im Hinblick auf therapeutische Möglichkeiten weiter untersucht werden.

Abstract

Cardiovascular diseases, particularly acute myocardial infarction (MI), are among the leading causes of death worldwide. Important prognostic factors, such as infarct size, could help reduce the global cardiovascular burden of disease. Phospholipase D1 (PLD1) and phospholipase D2 (PLD2) are mammalian enzymes that cleave phospholipids into phosphatidic acid and choline. PLD1-deficiency protects against arterial thrombosis and leads to reduced infarct size after ischemic stroke. In contrast, the absence of PLD1 resulted in reduced cytokine release and enlarged infarct area after MI. In ischemic stroke, PLD2-deficiency did not lead to changes in infarct size, in contrast to PLD1. Before starting this project, the role of PLD2 was still unknown. Thus, the aim of this work was to investigate the influence of PLD2 on postischemic processes after MI.

For this purpose, we used an experimental mouse model of acute MI using PLD2 knock-out and control mice. The MI was induced in a monitored surgical procedure. Subsequently, parameters of left ventricular function, infarct size, systemic and local inflammation and myocardial scar formation were measured at different time points.

We here demonstrate that PLD2-deficiency leads to enhanced platelet activation after MI. Stimulation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in the early phase after MI resulted in increased IL-6 release from endothelial cells in PLD2-deficient mice. Furthermore, we found increased cell infiltration into the infarct zone 24 hours after MI and decreased levels of serum TGF- β 72 hours after MI. In contrast to PLD1, PLD2 did not affect TNF- α expression, infarct and scar size or cardiac function.

In summary, we described the impact of PLD2 on postischemic processes after myocardial infarction and demonstrated that PLD2 uses different signaling pathways and has other functions than PLD1 and that the isoforms do not act redundantly. Both isoforms play key roles in postischemic myocardial adaptation and should be further investigated in the future to identify therapeutic possibilities for the treatment of acute MI.

Abkürzungsverzeichnis

#	Bestellnummer
%	Prozent
°C	Grad Celsius
<i>A. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
AAR	<i>area at risk</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
AK	Antikörper
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
Arf-1	<i>ADP-ribosylation factor-1</i>
ASS	Acetylsalicylsäure
BAMBI	<i>bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor</i>
<i>Bax</i>	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
<i>Bcl-2</i>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<i>Bcl-xl</i>	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
Ca ²⁺	Calcium
CD40L	<i>cluster of differentiation 40 ligand</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CO	<i>cardiac output</i>
COX	Cyclooxygenase-1
CRP	<i>Collagen-related-peptide</i>
CT	<i>cycle threshold</i>
d	<i>days</i>
DAB	Diaminobenzidin
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EDV	<i>enddiastolic volume</i>
EF	<i>ejection fraction</i>
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme linked Immunosorbent Assay</i>
ESV	<i>endsystolic volume</i>
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell scanning</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Association</i>
FIPI	<i>5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
FS	<i>fractional shortening</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GP	Glykoprotein
h	Stunden (engl. <i>hours</i>)
HCl.....	Chlorwasserstoff
HE.....	Hämatoxylin-Eosin
HF	<i>hydrofluoric acid</i>
HR.....	<i>heart rate</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
i.p.	intraperitoneal
I/R	Ischämie/ Reperfusion
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IgG.....	Immunglobulin G
IL-10	Interleukin-10
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
INF.....	<i>infarcted area</i>
ko	<i>knock-out</i>
LANUV	Landesamt für Natur-, Umwelt-, und Verbraucherschutz
LPS	Lipopolysaccharide
LV	linker Ventrikel
LVAWd	<i>left ventricle anterior wall in diastole</i>
LVAWs.....	<i>left ventricle anterior wall in systole</i>
LVPWd	<i>left ventricle posterior wall in diastole</i>
LVPWs	<i>left ventricle posterior wall in systole</i>
Mac-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MAPK.....	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MEFs	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MFI	<i>mean of fluorescence intensity</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHEC-5	<i>mouse heart endothelial cell clone 5 transformed</i>
MHz	Megahertz
MI	Myokardinfarkt
min	Minuten
mL.....	Milliliter
mM.....	Millimol
mm ²	Quadratmillimeter
MW	Mittelwert
NaCl.....	Natriumchlorid
NF	<i>nuclear factor</i>

nm	Nanometer
NRW	Nordrhein-Westfalen
o.g.	oben genannt
O ₂	Sauerstoff
PA	<i>phosphatidic acid</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline, phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGFR	<i>platelet derived growth factor</i>
PF	<i>platelet factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLD	Phospholipase D
PLD1	Phospholipase D1
PLD2	Phospholipase D2
PRP	<i>platelet-rich plasma</i>
PSGL-1	<i>P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RDB	<i>RNA-Dilution Buffer</i>
Rho	<i>Ras homologue</i>
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
s.c.	<i>subcutan</i>
sek	Sekunden
SEM	<i>standard error of mean</i>
SFB	Sonderforschungsbereich
SSC	<i>side scatter</i>
SV	<i>stroke volume</i>
TGF- β	<i>tumor growth factor - β</i>
TLR4	<i>toll like receptor 4</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T-PBS	<i>Tween in PBS</i>
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
TXA ₂	Thromboxan A ₂
U	<i>Units</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion protein</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vol	Volumen

vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO.....	<i>world health organization</i>
wt	Wildtyp
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
ZZ	Zellzahl
α -SMA	α -smooth muscle actin
Δ	<i>delta</i>
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromol

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Gesellschaftliches Gewicht und klinische Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen.....	1
1.2	Myokardinfarkt	1
1.3	Thrombozyten	6
1.4	Phospholipase D.....	10
1.5	Ziele der Arbeit	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Material	16
2.2	Methoden.....	23
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Der Effekt von PLD2-Defizienz auf die Inflammation in der akuten Phase nach Myokardinfarkt	42
3.2	PLD2-Defizienz führt über eine verstärkte Thrombozytenaktivierung zu einer erhöhten IL-6 Ausschüttung aus Endothelzellen	47
3.3	Keinen Einfluss von PLD2 auf die Regulation der TNF- α Expression und Ausschüttung nach akutem MI	50
3.4	Unveränderte Infarktgröße und Herzfunktion trotz erhöhter Inflammation nach MI in PLD2-defizienten Mäusen	51
3.5	PLD2 hat keinen Einfluss auf die Apoptose der Kardiomyozyten nach akutem MI	54
3.6	Kein Einfluss von PLD2 auf kardiale Prozesse 21 Tage nach akutem MI	55
4	Diskussion.....	60
4.1	Expression der PLD-Isoformen im Myokard nach MI	60
4.2	Rolle der PLD Isoformen in der Thrombozyten-vermittelten Inflammation... ..	61
4.3	Bedeutung der PLD2 für zelluläre Prozesse in der Sepsis	66

4.4	Einfluss der PLD2 auf die TGF- β Plasmaspiegel in verschiedenen Phasen nach MI	68
4.5	Rolle der PLD2 für die Apoptoseaktivität im Myokard von Mäusen nach MI	69
4.6	Einfluss der PLD2 auf Infarktgröße und Herzfunktion in verschiedenen Phasen nach MI	70
4.7	Konklusion und Ausblick.....	72
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	74

1 Einleitung

1.1 Gesellschaftliches Gewicht und klinische Bedeutung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen

In Deutschland stellen Herz-Kreislauf-Erkrankungen seit Jahrzehnten die häufigste Todesursache dar. Weltweit steigt die Prävalenz seit 1990 stetig an [3]. Im Jahr 2020 stellte die chronisch ischämische Herzkrankheit in Deutschland bei beiden Geschlechtern die häufigste Todesursache dar. Der akute Myokardinfarkt (MI) war bei Männern mit 26.400 Fällen im Jahr die dritthäufigste Todesursache [4]. Auch weltweit sind ischämische Herzerkrankungen ab einem Alter von 50 Jahren die häufigste Todesursache [5]. Es handelt sich demnach um eine Krankheitsentität, die auch in Zukunft eine große Rolle für die Weltbevölkerung spielen wird.

1.2 Myokardinfarkt

Der MI wurde erstmalig von Adam Hammer im Jahr 1878 in Wien als Verschluss einer Koronararterie beschrieben [6]. Seitdem ist die Definition des MI stetig überarbeitet und aufgrund neuer Forschungsergebnisse weiterentwickelt worden. Inzwischen ist in Zusammenarbeit des *American College of Cardiology*, der *American Heart Association*, der *European Society of Cardiology*, der *International Society and Federation of Cardiology*, der *Monitoring of trends and determinants in cardiovascular diseases*, dem *National Heart, Lung and Blood Institute*, der *World Heart Federation* und der world health organization (WHO) eine universale Definition des MI entwickelt worden [7]. Diese soll helfen die vielseitigen Symptome des MI und die verschiedenen diagnostischen Mittel, die zur Verfügung stehen, zu vereinbaren. Für die Bezeichnung „akuter Myokardinfarkt“ im klinischen Setting gelten folgende Voraussetzungen: Verletzung des Myokards mit klinisch eindeutigen Hinweis auf Myokardischämie und Dynamik des Troponinwerts. Des Weiteren muss eines der folgenden Kriterien zusätzlich erfüllt sein: typische Symptome kardialer Ischämie, neue ischämietypische EKG-Veränderungen, pathologische Q-Zacken, bildmorphologischer Nachweis von Wandbewegungsstörung und/oder neuem avitalem Myokard. Jenseits dieser Grundvoraussetzungen ist folgende Einteilung gültig: Myokardinfarkt Typ I: Post-mortem Nachweis athero-sklerotischer Plaques; Myokardinfarkt Typ II: Nachweis einer Imbalance zwischen Sauerstoffangebot und -nachfrage; Myokardinfarkt Typ III: Herztod in Patienten mit infarkttypischen

Symptomen und neuen ischämietypischen EKG-Veränderungen unabhängig der Troponinwerte. In der rein pathologischen Definition gilt der Untergang von Kardiomyozyten aufgrund verlängerter Ischämiezeit als Myokardinfarkt [7].

1.2.1 Phasen der myokardialen Veränderung nach Myokardinfarkt

Das Myokard ist ein aus Kardiomyozyten und extrazellulären Matrixbestandteilen bestehendes Gewebe. Die ein- bis zweikernigen Kardiomyozyten stehen v.a. über Desmosomen in Kontakt und sind darüber mechanisch gekoppelt. Es gibt keine Nervenfasern im Herzgewebe, die Erregung geht von spezialisierten Kardiomyozyten aus, die sog. „Taktgeber“. Die Erregungsweiterleitung erfolgt über *Gap junctions* und Ionenporter. Aufgrund dieser Erregungsweitergabe von einer Zelle zur nächsten wird die Herzmuskulatur auch als funktionelles Synzytium bezeichnet [8].

Bei Ischämie kommt es im Myokard zu einer Koagulationsnekrose. Dabei werden Proteine denaturiert, die Zellkerne gehen zugrunde und es kommt zur Einwanderung von Leukozyten. Die Veränderungen, die das Myokard nach MI durchläuft, können in drei Phasen unterteilt werden: Die inflammatorische Phase, die proliferative Phase und die Reifungsphase (engl. *Remodeling*) [1]. In jeder dieser Phasen spielen sich wichtige zelluläre Prozesse ab, die in Summe zur Narbenbildung führen (Abb. 1). Für das klinische *outcome* (engl.: Resultat) ist jede dieser Phasen von großer Bedeutung, sodass sie im Folgenden einzeln beschrieben werden.

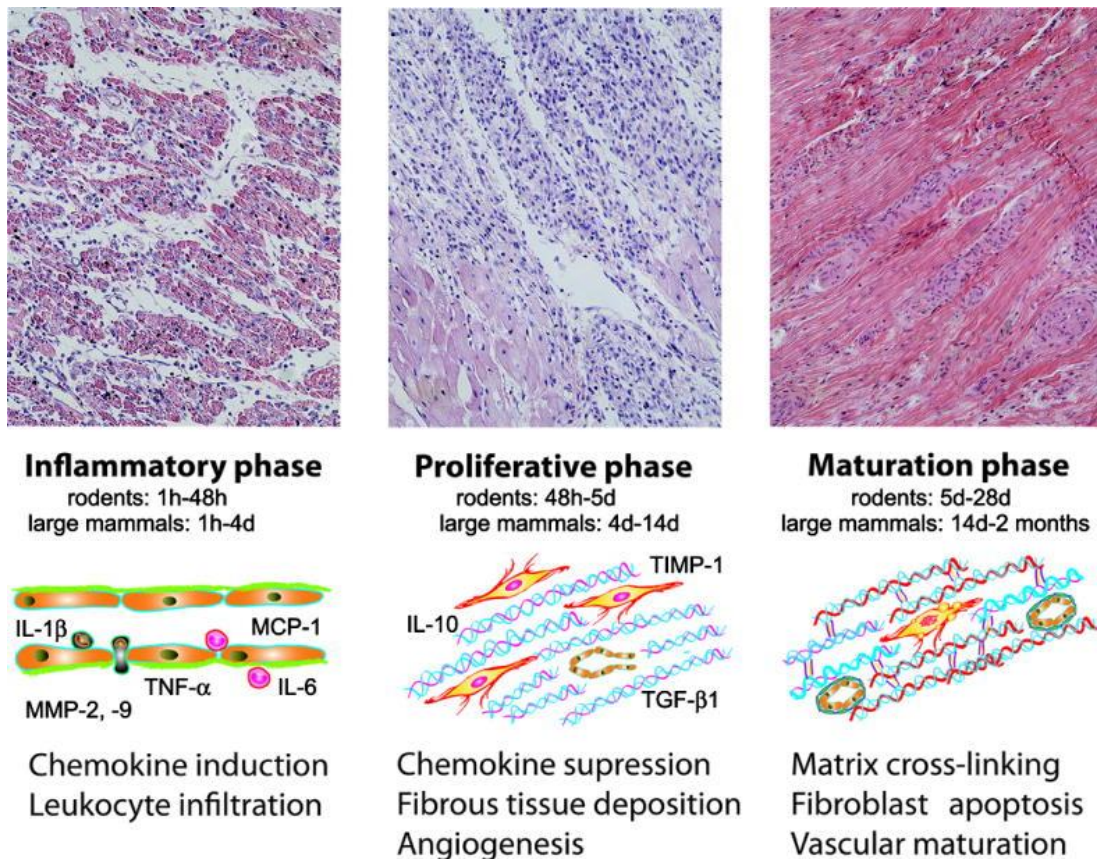


Abb. 1: Phasen des Prozesses im Myokard nach MI

Nach einem MI wandelt sich das Myokard. Dabei können diese Veränderungen in die inflammatorische, die proliferative und die Reifungsphase unterteilt werden. Unterschiedliche Prozesse finden in den Phasen statt und führen schlussendlich zur Narbenbildung. Die Länge der Phasen ist bei Nagetieren geringer als bei großen Säugetieren wie z.B. den Menschen [1]. Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1), Matrix-Metalloprotease-2, -9 (MMP-2, -9), Interleukin-10 (IL-10), *tissue inhibitor of metalloproteinase-1* (TIMP-1), *Tumor growth factor- β 1* (TGF- β 1). Abbildung veröffentlicht mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc. und Copyright Clearance Center (License Number 5547110597925) aus Dobaczewski *et al.* [1].

1.2.1.1 Inflammationsphase

In der Inflammationsphase werden Entzündungsmediatoren freigesetzt, Leukozyten rekrutiert und weitere Signalwege aktiviert, die als Akutreaktion auf den vorangegangenen entzündlichen Stimulus zu wirken sind. Die inflammatorische Phase nach MI beginnt sowohl bei Nagern als auch bei Menschen ca. 1 h nach Ischämie/Reperfusion (I/R). Bei Menschen hält sie 4 Tage (d; engl. *days*) an, bei Nagern nur ca. 48 Stunden [1]. Die Prozesse in dieser Phase bilden das Fundament aller weiteren zellulären Veränderungen, daher ist eine ausgeglichene inflammatorische Antwort von großer Bedeutung. Eine zu stark oder zu schwach ausgeprägte Inflammation kann den nachfolgenden Heilungsprozess negativ beeinträchtigen [9]. Die reine Unterdrückung der

Immunantwort durch Corticosteroide nach MI hat beispielsweise in Hunden zu einer reduzierten Infarktgröße geführt [10], im Menschen aber fatale Auswirkungen auf die Herzfunktion gezeigt [11, 12]. Zur Entwicklung therapeutischer Ansätze ist daher eine detaillierte Kenntnis der Signalwege und Wirkungen der einzelnen Komponenten unerlässlich. Durch den Untergang von Kardiomyozyten wird über die Aktivierung von *nuclear factor- κ B* (NF- κ B) und *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine ausgelöst [13]. Im Mausmodell ist insbesondere eine starke Ausschüttung von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) messbar [14]. Infolgedessen kommt es zur Leukozyteneinwanderung in das infarzierte Gewebe [1]. Einen Großteil davon bilden die neutrophilen Granulozyten, die das Gewebe über Phagozytose von nekrotisierten Kardiomyozyten befreien [15]. Sie führen außerdem durch die Ausschüttung toxischer Substanzen im Zuge der Degranulation zu Gewebeschäden [16]. Im Tiermodell ist bereits über verschiedene Wege die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Infarktbereich reduziert worden, was zu einem reduzierten Infarktareal und einer besseren Pumpfunktion geführt hat [13]. Eine Depletion von neutrophilen Granulozyten hingegen führte zu einem deutlich schlechteren *outcome* [17], was erneut die Relevanz einer exakt ausbalancierten Entzündungsreaktion unterstreicht. Adhäsionsmoleküle wie *intercellular adhesion molecule – 1* (ICAM-1), P-Selektin und Integrine ermöglichen das Andocken der Leukozyten an die Endothelzellen und somit deren Einwanderung in die kardiale Matrix [18]. Metzler *et al.* haben die Auswirkungen eines *knock-outs* von ICAM-1 nach MI im Mausmodell untersucht und herausgefunden, dass ein Fehlen dieses Adhäsionsmoleküls zwar zu einer geringeren Entzündungsreaktion führt aber keinen Einfluss auf die Narbengröße hat [19]. Neben neutrophilen Granulozyten wandern auch weitere Subgruppen der Leukozyten wie Monozyten, M1-Makrophagen und Lymphozyten in das infarzierte Gewebe ein [13].

1.2.1.2 Proliferationsphase

In der Proliferationsphase wird die Entzündungsreaktion gebremst und der Organismus geht in eine Aufbauphase, die der Wiederherstellung der ursprünglichen Funktionen dienen soll. Die Differenzierung von proinflammatorisch wirkenden M1-Makrophagen zu anti-inflammatorisch wirkenden M2-Makrophagen, ist ein wichtiger Schritt im Übergang von der Inflammations- zur Proliferationsphase [9]. Anti-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und *tumor growth factor – β* (TGF- β) werden zum

Abstoppen der Entzündungsreaktion ausgeschüttet [20]. Insbesondere TGF- β führt zu einer Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [21], welche wichtige Produzenten von Kollagen und anderen extrazellulären Matrixproteinen sind und somit maßgeblich an der Narbenbildung beteiligt sind [22]. Kardiale Myofibroblasten unterscheiden sich durch das Persistieren von *α -smooth muscle actin* (α -SMA) von dermalen Myofibroblasten in einer Hautnarbe, bei denen α -SMA nur transient vorhanden ist [23]. Neben TGF- β sind auch die mechanische Belastung auf das Gewebe sowie Fibronectin, das von Makrophagen und Fibroblasten freigesetzt wird, wichtige Trigger für die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [24, 25]. Parallel zu diesen Prozessen findet die Angiogenese, hauptsächlich ausgelöst durch den Wachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor* (VEGF), statt. Zymek *et al.* wiesen nach, dass der *platelet derived growth factor* (PDGFR) ebenfalls die Angiogenese und Kollagenbildung im Myokard unterstützt und somit zur Stabilisierung der Narbe beiträgt [26]. Die Proliferationsphase dauert bei Nagetieren bis Tag 5 nach MI an, bei größeren Säugetieren kann sie sich bis zu Tag 14 nach MI ziehen.

1.2.1.3 Reifungsphase

In der Reifungsphase, auch Heilungsphase, reparative Phase oder *Remodeling*-Phase genannt, bildet sich die Narbe über Vernetzung von Myofibroblasten, Kollagen, Hyaluronsäure und weitere extrazelluläre Matrixproteine in ihrer endgültigen Form. Bei Nagern findet dieser Prozess 5 bis 28 d nach MI und bei Menschen 14 d bis 2 Monate nach MI statt [1]. Es sind bei weitem nicht alle Signalkopplungen bekannt, die zum Übergang von der proliferierenden in die reifende Aktivität führen. Ein Abstoppen der TGF- β - Aktivität durch *bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor* (BAMBI) wurde von Villar *et al.* im Rahmen experimentell induzierter Volumenbelastung des linken Ventrikels in Nagetieren beobachtet [27]. Die Kollagentypen I und III haben den größten Anteil an der Narbe [28]. Die Stabilität des Kollagens sowie die Vernetzungen, die sich in dieser Phase zwischen den verschiedenen ECM-Proteinen bilden, schützen das Herz vor der Ausbildung von Ventrikelfisteln und -rupturen [29]. Für die reine Pumpfunktion ist die Narbe behinderndes Gewebe, da sie durch die Steifigkeit des Kollagens und der interzellulären Verbindungen wenig kontraktile ist [30]. Einzelne überlebende Kardiomyozyten im Infarktgebiet spielen eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung und Kontraktion in der eigentlich undynamischen und metabolisch zunehmend inaktiven Narbe [31]. Die Zellularität des

Gewebes nimmt in dieser Phase stark ab. Ein dafür verantwortlicher Mechanismus ist der programmierte Zelltod, die sogenannte Apoptose, worüber in der ehemaligen Infarktzone vorhandene Myofibroblasten, Endothelzellen und Leukozyten eliminiert werden [32, 33]. Diese wird in den Kardiomyozyten über komplexe Signalwege nach MI induziert und ist neben der Nekrose einer der wichtigsten Wege der Zellveränderung im Myokard [34]. Über Messung der Expression pro-apoptotischer Marker wie *B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)* und *Bcl-2 associated X protein (Bax)* und anti-apoptotischer Marker wie *B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xl)* lässt sich die Apoptoseaktivität bestimmen [35].

1.3 Thrombozyten

Thrombozyten sind zellkernlose Zellen, die im Knochenmark und in der Lunge gebildet werden [36]. Sie nehmen eine zentrale Rolle in der Pathogenese des akuten MI ein [37]. Thrombopoetin fördert die Abschnürung der Thrombozyten von deren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, aus denen jeweils bis zu 5000 Thrombozyten entstehen können. Sie haben einen Durchmesser von ca. 3 μm und sind somit die kleinsten Zellen der korpuskulären Bestandteile des Bluts [38, 39]. Im Zytoplasma der Thrombozyten gibt es drei Arten von Granula, α -, δ -, und γ -Granula, die unterschiedliche gerinnungsfördernde Moleküle und Gerinnungsfaktoren speichern. Der Inhalt der Granula wird zu bestimmten Zeitpunkten der Hämostase als Antwort auf spezifische Signale freigesetzt. Die α -Granula speichern u.a. den von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibrinogen bzw. Faktor I, die Faktoren V und VIII, Fibronectin, P-Selektin und verschiedene Wachstumsfaktoren. In den δ -Granula findet sich Adenosindiphosphat (ADP) als essenzieller Thrombozytenaktivator und Calcium als wichtiger Cofaktor der Gerinnung. Die γ -Granula haben lediglich eine lysosomale Funktion [38, 40]. Auf der Oberfläche der Thrombozyten befinden sich der von-Willebrand-Rezeptor, auch als Glykoprotein (GP) Ib-IX-V bezeichnet, der ADP-Rezeptor P2Y₁₂ und der Hauptrezeptor für Kollagen GP VI. Auch Integrine, die auf der Oberfläche von Thrombozyten zu finden sind, tragen maßgeblich zur Thrombozytenfunktion bei. Bei Aktivierung der Thrombozyten wechseln sie ihre Konstitution in den aktiven Zustand und gehen verschiedene Bindungen ein: Integrin $\alpha_2\beta_1$ bindet an Kollagen, Integrin $\alpha_5\beta_1$ bindet an Fibronectin, Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, das auch als GP IIb/IIIa bekannt ist, bindet an vWF, Fibrinogen und Fibronectin [41].

1.3.1 Hämostase

Hämostase bedeutet wörtlich aus dem Altgriechischen übersetzt „Blutstillung“. Es handelt sich dabei um einen mehrschrittigen Prozess, der bei einer Verletzung des Endothels in Gang gesetzt wird. Ist die Hämostase, z.B. aufgrund von Krankheiten, dysreguliert und somit nicht ausgeprägt genug oder überaktiv, kann es zu lebensbedrohlichen Blutungs- oder thrombotischen Komplikationen kommen [42]. Man unterscheidet die primäre von der sekundären Hämostase. Bei der primären Hämostase sind die Hauptakteure die Thrombozyten, die zu einem vorläufigen Verschluss des Gefäßdefekts durch den sog. „weißen Thrombus“ führen. Daran schließt sich die sekundäre Hämostase an, bei der eine Abfolge von Gerinnungsfaktoraktivierungen, die sog. „Gerinnungskaskade“, zur Spaltung von Fibrinogen und damit zur Bildung des „roten Thrombus“ aus Fibrin führt [43]. Für die vorliegende Arbeit ist die primäre Hämostase von großer Bedeutung und wird daher im folgenden Abschnitt 1.3.1.1 ausführlich beschrieben.

1.3.1.1 Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase, schematisch dargestellt in Abb. 2, lässt sich in vier Schritte unterteilen: Die vaskuläre Blutstillung, gefolgt von der Adhäsion, der Aktivierung und der Aggregation von Thrombozyten. Bei einer Gefäßverletzung kommt es bereits nach wenigen Sekunden zur Vasokonstriktion. So wird der Blutfluss im Gefäß und dadurch der Blutverlust durch den Gefäßdefekt verringert. Außerdem erleichtert die Vasokonstriktion aufgrund der dadurch resultierenden Erhöhung der Scherkräfte, die auf Thrombozyten wirken, die Adhäsion dieser an das verletzte Endothel. Diese wird durch die Bindung des vWF einerseits an das durch die Verletzung freigewordene Kollagen in der subendothelialen Matrix und andererseits an den GPIb-IX-V Rezeptor auf den Thrombozyten hervorgerufen [44]. Der vWF wird bei Verletzung des Endothels aus den Weibel-Palade-Körperchen im Endothel und aus den α -Granula der Thrombozyten freigesetzt [45]. Ist, wie beim von-Willebrand-Jürgens-Syndrom, der vWF nicht oder nur unzureichend vorhanden, so führt dies zu einer erhöhten Blutungsneigung [46, 47]. Die Bindung der Thrombozyten an den vWF führt zur Aktivierung der Thrombozyten und somit zur nächsten Phase der primären Hämostase [42]. Die Thrombozyten verformen sich von flachen Scheiben zu rundlicheren Zellen mit Ausläufern und schütten aus den Granula verschiedene Botenstoffe aus. P-Selektin wird unmittelbar nach der Aktivierung auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert und gilt daher als ein wichtiges Merkmal für

die Thrombozytenaktivierung [48]. ADP aus den δ -Granula führt über das Andocken an den ADP-Rezeptor P2Y₁₂ auf der Thrombozytenmembran zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten an die verletzte Stelle. Thromboxan A₂ (TXA₂) wird in den Thrombozyten bei Aktivierung synthetisiert und ausgeschüttet, fördert die Vasokonstriktion und aktiviert ebenfalls weitere Thrombozyten [49, 50]. Der GPIIb/IIIa-Rezeptor auf den Thrombozyten wechselt in seinen aktiven Zustand und kann so an Fibrinogen binden, sodass die Thrombozyten über Fibrinogen miteinander verbunden werden. Dieser Prozess wird als Aggregation bezeichnet und führt zur Bildung des „weißen Thrombus“ bestehend aus Fibrinogen und Thrombozyten, der zwar einen schnellen Verschluss des Gefäßdefekts ermöglicht, aber zu instabil ist, um die Wunde langfristig zu verschließen. Hierfür folgt die sekundäre Hämostase, in der über Aktivierung der Gerinnungsfaktoren ein dichtes Netz aus Fibrin, Thrombozyten und Erythrozyten entsteht, das als „roter Thrombus“ bezeichnet wird [42].

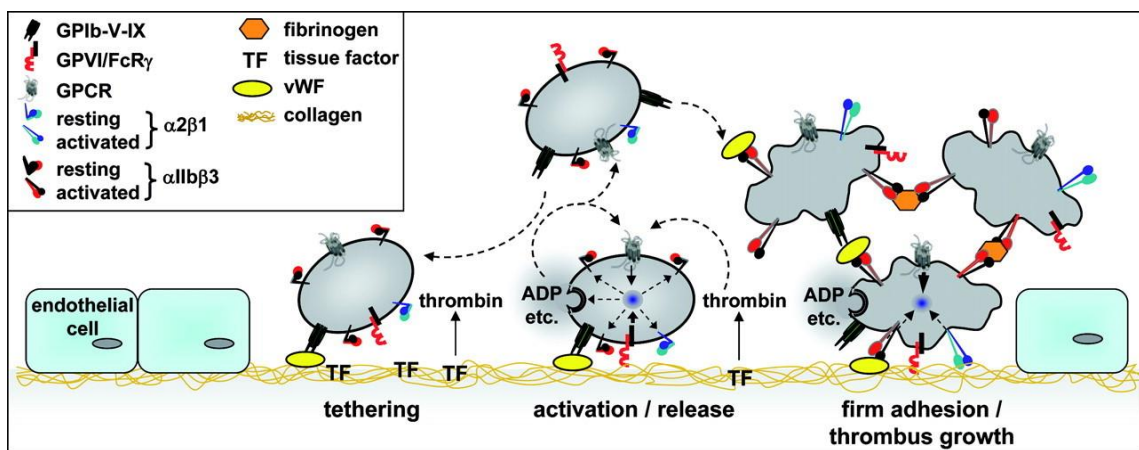


Abb. 2: Primäre Hämostase

Durch einen Gewebeschaden bekommt die extrazelluläre Matrix Kontakt mit Thrombozyten, die über die Bindung ihres Glykoprotein Ib (GPIb)-Rezeptors an den gewebeständigen von-Willebrand-Faktor (vWF) andocken. Durch diese Adhäsion kann Glykoprotein VI (GPVI) mit dem Kollagen der Matrix ebenfalls eine Bindung eingehen. Die Thrombozyten werden dadurch aktiviert und schütten Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan A₂ (TXA₂) aus. Die Integrine $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ wechseln in ihren aktiven Status und führen über Bindung an Fibrinogen und vWF zur Aggregation der Thrombozyten. Der aus dem Gewebe freigesetzte *tissue factor* (TF) führt zur Aggregation der Thrombozyten. Der aus dem Gewebe freigesetzte *tissue factor* (TF) führt zur Thrombinausschüttung, welches wiederum zur Thrombozytenaktivierung führt [51]. Abbildung veröffentlicht mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc. und Copyright Clearance Center (License Number 5547111487632) aus Varga-Szabo *et al.* [51].

Die Prozesse der primären Hämostase sind Angriffspunkte für thrombozytenhemmende Medikamente wie z.B. Acetylsalicylsäure (ASS). ASS bindet irreversibel an die Cyclooxygenase (COX) -1, die TXA₂ katalysiert und führt somit zu einer geringeren Thrombozytenaggregation [52]. Einen vergleichbaren Effekt erzielt Clopidogrel durch kompetitive Hemmung des ADP-Rezeptors P2Y₁₂ [53].

1.3.2 Thrombozyten in der Inflammation

Thrombozyten interagieren nicht nur mit Endothelzellen, sondern auch mit Leukozyten und sind selbst in der Lage, proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und Chemokine wie *platelet factor* (PF) 4 auszuschütten. Damit spielen sie eine wichtige Rolle in der Inflammation und damit verbundenen Pathologien. Die Atherosklerose, die als prädisponierender Faktor für Plaquerupturen letztlich die Grundlage für Myokardinfarkte vom Typ I nach der aktuell gültigen Definition bildet [7], wird maßgeblich durch die proinflammatorischen Eigenschaften der Thrombozyten beeinflusst [54].

Von Thrombozyten ausgeschüttetes IL-1 β spielt eine besonders wichtige Rolle in der Aktivierung von Endothelzellen. IL-1 β kann von Thrombozyten selbst gebildet werden und wird bei Aktivierung dieser sezerniert [55]. Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [56] führt IL-1 β in Endothelzellen zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie IL-6 und IL-8 [57, 58] sowie von Chemokinen wie *monocyte chemoattractant protein* (MCP) -1, als auch zur erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, *vascular cell adhesion protein* (VCAM) - 1 und Integrin $\alpha_5\beta_3$ [59]. Henn *et al.* zeigten, dass *cluster of differentiation 40 ligand* (CD40L) in Thrombozyten gespeichert vorliegt und nach Aktivierung rasch an der Oberfläche präsentiert wird. Dieser bindet an CD40 auf den Endothelzellen und führt dadurch ebenfalls zu einer verstärkten Ausschüttung o.g. proinflammatorischer Botenstoffe und Präsentation o.g. Adhäsionsmoleküle bei Thrombozyten und Endothelzellen [60].

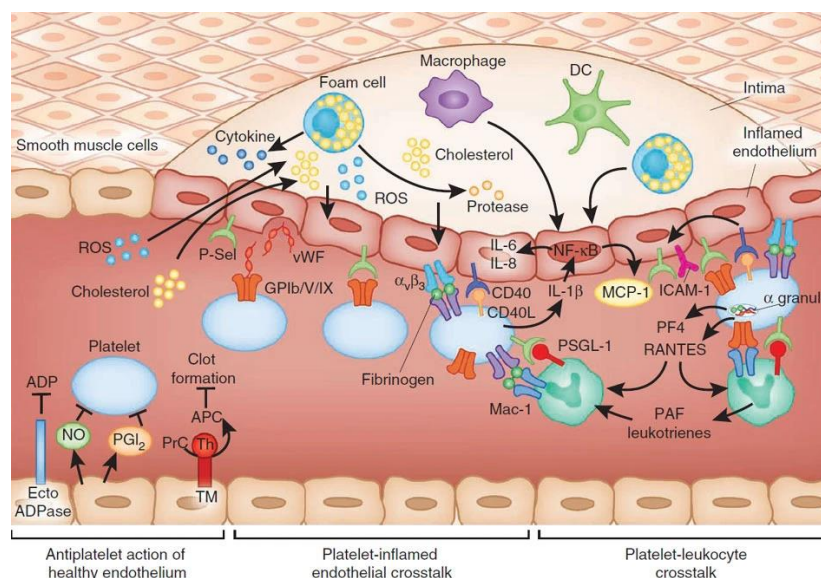


Abb. 3: Signalwege der Interaktion zwischen Thrombozyten, Endothelzellen und Leukozyten in der Inflammation

Einleitung

Nach der Adhäsion von Thrombozyten an das defekte Endothel erfolgt deren Aktivierung und die Ausschüttung multipler Zytokine, u.a. Interleukin-1 β (IL-1 β), die zur Migration von Leukozyten führen und Endothelzellen zur Expression weiterer Entzündungsmediatoren, z.B. Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8) stimulieren. Auch die Expression von Oberflächenmarkern wie *vascular cell adhesion protein* (VCAM-1), *intercellular adhesion protein* (ICAM-1), *monocyte chemoattractant protein* (MCP-1) und Integrin $\alpha_5\beta_3$ wird stimuliert. *Nuclear factor- κ B* (NF- κ B) spielt dabei als Transkriptionsfaktor eine zentrale Rolle. Die Bindung von CD40L auf Thrombozyten mit CD40 auf Endothelzellen führt wiederum zur verstärkten inflammatorischen Antwort beider Zellarten. Über die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 erfolgt die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten. Dadurch wird die Expression von Mac-1 auf Leukozyten stimuliert, welches an Glykoprotein Ib (GP Ib) und Glykoprotein $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GP $\alpha_{IIb}\beta_3$) auf Thrombozyten bindet und dadurch eine stabile Verbindung von Leukozyten und Thrombozyten herstellt [54]. Abbildung veröffentlicht mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc. und Copyright Clearance Center (License Number 5547120545439) aus Jackson *et al.* [54].

Schlussendlich führen diese Prozesse zu einer Adhäsion von Leukozyten an das Endothel und einer Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten. Dies erfolgt über bestimmte Rezeptoren auf der Oberfläche der verschiedenen Zellen: Sowohl GP Ib als auch GP $\alpha_{IIb}\beta_3$ werden auf den Thrombozyten präsentiert und binden an das auf Leukozyten befindliche Integrin *Macrophage-1 Antigen* (Mac-1) [61]. GP $\alpha_{IIb}\beta_3$ wird hier synonym für Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ verwendet. P-Selektin wird sowohl von aktivierten Endothelzellen als auch von aktivierten Thrombozyten exprimiert und bindet an P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL-1) auf Leukozyten [62].

In der akuten Phase nach MI konnte eine erhöhte Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten festgestellt werden. Dabei fiel besonders die vermehrte Bindung von Monozyten und Thrombozyten auf [63]. Thrombozyten spielen also auch nach MI eine Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten und sind somit ein wichtiger Baustein der myokardialen Inflammation nach MI (Abb. 3).

1.4 Phospholipase D

Die Phospholipase D (PLD) ist ein Enzym, das über Hydrolyse Phosphatidylcholin in Phosphatidsäure (engl. *phosphatidic acid* (PA) und Cholin spaltet [64]. PA ist ein bioaktives Lipid, das eine wichtige Rolle als *second messenger* bei multiplen zellulären Prozessen, darunter Adhäsion, Migration und Überleben von Zellen, spielt. Cholin hingegen ist nicht weiter an intrazellulären Signalwegen beteiligt [65, 66]. PLD ist ubiquitär in Bakterien, Viren, Pilzen, Pflanzen und Säugetieren nachgewiesen worden. Bei Säugern kann man zwischen zwei Isoformen der PLD unterscheiden: Phospholipase D1 (PLD1) und Phospholipase D2 (PLD2) [67, 68]. Sie weisen, wie in Abb. 4 schematisch dargestellt, einen deutlichen Unterschied in der Form der Aktivierung auf: PLD1 hat eine niedrige basale Aktivität und wird durch Mitglieder der *Ras homologue*

(Rho)-Familie, u.a. RhoA, *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1), durch die Proteinkinase C (PKC), durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) oder durch *ADP-ribosylation factor-1* (Arf-1) aktiviert. PLD2 hingegen weist eine hohe basale Aktivität auf und hat keine nennenswerten zellulären Aktivatoren [65].

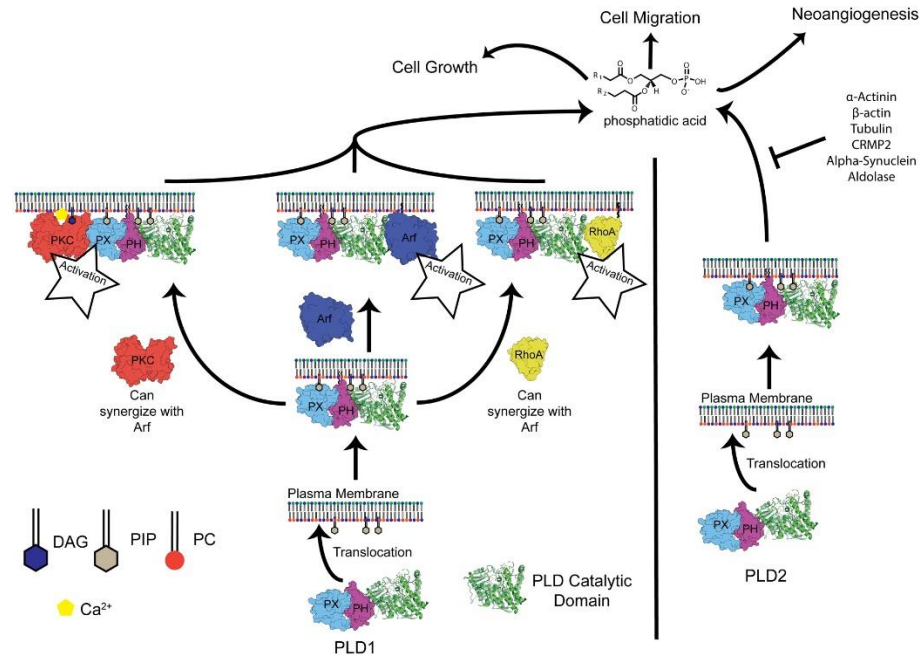


Abb. 4: Aktivierungswege der PLD1 und PLD2

Phospholipase D1 (PLD1) wird an die Plasmamembran transloziert und durch das Andocken von Proteinen wie Proteinkinase C (PKC), *ADP-ribosylation factor* (Arf) oder (*Ras homologous A*) (Rho A) aktiviert. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat₂ und ₃ (PIP_2 und PIP_3) sind dabei wichtige Cofaktoren. Es entsteht *phosphatidic acid* (PA), das als *second messenger* an vielen zellulären Prozessen beteiligt ist. Phospholipase D2 (PLD2) katalysiert ohne weitere Interaktion mit Aktivatoren die Reaktion zur Entstehung von PA. Proteine wie α -Actinin, β -actin oder Tubulin können die enzymatische Aktivität der PLD hemmen [69]. Abbildung veröffentlicht mit Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc. und Copyright Clearance Center (License Number 5547121103672) aus Bowling *et al.* [69].

1.4.1 PLD in der Hämostase

In Thrombozyten sind beide Isoformen der PLD vorhanden [70]. Bei Thrombozytenaktivierung findet die Translokation von PLD1 und PLD2 an die Zellmembran statt, wo sie die Spaltung von Membranlipiden zu PA katalysieren, welches als *second messenger* über verschiedene Signalwege die Aktivierung des Integrins $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ unterstützt [70]. Nachdem andere Phospholipasen bereits als konkrete Mitspieler der Hämostase identifiziert worden waren, genauere Analysen zu den Wirkungswegen der PLD auch mittels Untersuchung von *knock-out* (ko) Modellen jedoch fehlten, konnten Elvers *et al.* durch ebendiese Methode nachweisen, dass die PLD eine zentrale Rolle in der Thrombusbildung spielt [71]. In PLD1-defizienten Mäusen konnten sie nach Thrombozytenstimulation eine reduzierte $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrinaktivierung und P-

Selektinexposition und daraus resultierend einen relativen Schutz vor arterieller Thrombose und eine Minimierung der Infarktgröße nach zerebralem Infarkt feststellen [71]. Auch bei Defizienz beider PLD Isoformen sowohl konstitutiv im PLD1/PLD2-doppeldefizienten Mausmodell als auch durch pharmakologische Inhibierung mittels 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI), konnte eine vergleichbare Auswirkung festgestellt werden. Die Hämostase blieb dabei sowohl bei mit FIPI behandelten Mäusen als auch in PLD1/PLD2- doppeldefizienten Mäusen unbeeinträchtigt [72, 73]. In PLD2-defizienten Mäusen konnten diese Veränderungen in der Thrombozytenaktivierung nicht festgestellt werden, obwohl zu früheren Messzeitpunkten durchaus eine erniedrigte PLD-Aktivität in Thrombozyten von *Pld2*^{-/-} Mäusen zu messen war [73].

1.4.2 PLD in der Inflammation

Die Rolle der PLD in der Inflammation ist in verschiedenen akuten sowie chronischen Versuchsmodellen untersucht worden. Zur PLD1 lässt sich zusammenfassend sagen, dass in *Pld1*^{-/-} Mäusen die inflammatorische Antwort reduziert war, was auf eine entzündungsfördernde Wirkung der PLD1 schließen lässt. In einem murinen Modell der chronischen Arthritis führte eine Blockierung der PLD1 über erniedrigte IL-1 β Ausschüttung und NF- κ B-Expression zu einer Reduktion der entzündlichen Aktivität in der Synovia [74]. Bei akuter Pankreatitis war die Expression der PLD1 im Pankreasgewebe sowohl in der akuten als auch in der regenerativen Phase deutlich erhöht, sodass in diesem Modell von einem hochregulierenden Einfluss der PLD1, nicht nur auf die Inflammation sondern auch auf die Regeneration geschlossen werden kann [75]. Auch TNF- α , ein zentraler Mitspieler der Inflammation, ist bei blockierter PLD1 herunterreguliert. Im Rahmen einer experimentell induzierten Peritonitis im Mausmodell führte die Reduktion von TNF- α zu einer signifikanten Reduktion des Serumspiegels von IL-6 sowie einer geringeren Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten [76]. Unsere Arbeitsgruppe hat in einem murinen Sepsismodell gezeigt, dass in PLD1-defizienten Mäusen die Monozyten signifikant weniger TNF- α ausschütten und die Adhäsion der Monozyten an aktiviertes Endothel gestört ist [77]. Nach experimentell induziertem MI bei Mäusen konnte durch die erniedrigte Expression von TNF- α ein schlechteres *outcome* in Form von gesteigerter Infarktgröße und verringerter Herzfunktion festgestellt werden. Es wird vermutet, dass die proinflammatorische Wirkung von PLD1 auch das kardiale *Remodeling* nach MI fördert [78]. Powner *et al.* untersuchten die Migration und Adhäsion von neutrophilen Granulozyten in

Abhängigkeit von PLD und konnten zeigen, dass PLD die Aktivierung von CD11b/CD18 und damit die Migration von neutrophilen Granulozyten fördert [79]. In einem murinen Modell von *acute respiratory distress syndrome* (ARDS), wo eine starke Inflammation die Schädigung der Lunge und damit das klinische *outcome* maßgeblich beeinflusst, konnten Abdulnour *et al.* entgegengesetzte Wirkungen der beiden Isoformen nachweisen. PLD1 fördert die alveoläre Barrierefunktion und vermindert somit die Gewebeverletzung, während PLD2 die Leukozyteneinwanderung minimiert und damit zu einem vergrößerten Gewebeschaden führt. Dabei ist also in PLD2-defizienten Tieren eine Erhöhung der Inflammation in Form von vermehrter Migration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen festgestellt worden [80]. Die vermehrte Migration neutrophiler Granulozyten in PLD2-defizienten Tieren konnte im LPS-induzierten Sepsismodell ebenfalls beobachtet werden. Dabei wirkt PLD2, wie PLD1, über NF- κ B und moduliert damit in diesem Fall die Expression von CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2, die ausschlaggebend für die Neutrophilenmigration ist [81].

In onkologischen Erkrankungen konnte für die PLD2 bisher eine tumorfördernde und prometastatische Wirkung nachgewiesen werden. Beispielhaft sind hier die Arbeiten von Kang *et al.*, in denen *in vitro* die Hemmung der PLD2 über eine Inhibition von NF- κ B zu einer geringeren Proliferation von Magenkrebszellen führte [82] sowie von Knoepp *et al.*, bei der ein *loss of function* (engl. Funktionsverlust) der PLD2 zu einer erniedrigten Adhäsion und Migration von Lymphomzellen führte [83].

PLD1 und PLD2 scheinen basierend auf den bisher vorhandenen Daten nicht synergistisch zu wirken und an unterschiedlichen, teils gegensätzlichen, Mechanismen beteiligt zu sein. Eine aktuelle Arbeit von Hwang *et al.* zeigte im Mausmodell zwei unterschiedlichen Signalwege auf, an denen die Isoformen beteiligt sind. Demnach wird PLD1 über die Bindung von LPS an den *toll like receptor 4* (TLR4) über den *Myeloid differentiation primary response 88*-Signalweg induziert und PLD2 über die Bindung von IL-4 an den IL-4-Rezeptor über den Januskinase-3-Signalweg. PLD1 fördert hierüber die Differenzierung von M1-Makrophagen, ist inflammationsfördernd und spielt eine aktivierende Rolle in der Sepsis; PLD2 wiederum fördert die Differenzierung von M2-Makrophagen, wirkt anti-inflammatorisch und positiv auf das *Remodeling* [84].

1.4.3 Wirkung der PLD auf die Prozesse nach Myokardinfarkt

Der Einfluss der PLD1 auf die zellulären Mechanismen und die damit zusammenhängende Herzfunktion ist in den letzten Jahrzehnten ausführlich untersucht worden. Schönberger *et al.* haben gezeigt, dass ein erniedrigter TNF- α Spiegel in *Pld1*^{-/-} Mäusen und eine geringere Zelleinwanderung in die Infarktzone 24 h nach MI sowie ein erniedrigter TGF- β Spiegel 72 h nach MI zu einer erhöhten Infarktgröße und einer Verschlechterung der Herzfunktion 4 Wochen nach MI führen [78]. Insgesamt scheint die PLD1 im Rahmen eines MI also kardioprotektiv zu wirken. Die Inhibition der enzymatischen Aktivität der PLD durch FIPI führte zwar zu einer reduzierten Migration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in die Infarktzone 24 h nach MI, die Zytokinspiegel sowie die Infarktgröße und Herzfunktion blieben allerdings unverändert. Es ist also davon auszugehen, dass die rein enzymatische Aktivität der PLD1 die TNF- α Regulation nicht beeinflusst, doch aber die Migration von Leukozyten in das Infarktgebiet [85]. Welche Einflüsse die PLD2 auf die Prozesse nach MI hat, ist bisher ungeklärt.

1.5 Ziele der Arbeit

Als weltweit verbreitete Volkskrankheit ist der Myokardinfarkt eine intensiv erforschte Krankheit zu dem stetig neue Erkenntnisse bezüglich zugrunde liegender molekularer Mechanismen und Therapiemöglichkeiten gewonnen werden. Der Einfluss von PLD1 auf Herzinfarkt, Inflammation und Thrombozytenverhalten ist in mehreren Arbeiten untersucht worden. Die Relevanz von PLD2 auf o.g. Themen ist bisher nur in Zusammenhang mit der enzymatischen Hemmung durch FIPI oder im PLD1/PLD2-doppeldefizienten Modell angeschnitten worden. Bisher ist kein Fokus auf die alleinige Wirkung der PLD2 gelegt worden.

In dieser Arbeit sollen mit Hilfe eines experimentellen Mausmodells mit *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen, bei dem den Tieren operativ ein MI induziert wird, die Prozesse nach MI genauer analysiert werden. Dieses Mausmodell erlaubt es den Einfluss von PLD2 auf molekulare und zelluläre Mechanismen sowie auf klinische Parameter isoliert zu betrachten. Der Fokus soll besonders auf der lokalen Leukozyteneinwanderung ins Myokard, der systemischen Zytokinausschüttung ins Blut, der Aktivierungsmuster von Thrombozyten, der Infarkt- bzw. Narbengröße, der Herzfunktion und der Narbenqualität liegen. Durch die Ergebnisse soll eine Aussage darüber getroffen werden können, ob die PLD2 pro- oder anti-inflammatorisch wirkt, ob durch hervorgerufene molekulare und zelluläre Veränderungen Einfluss auf das klinische *outcome* genommen wird und ob sie vergleichbare Funktionen übernimmt wie ihre Isoform PLD1.

Diese Arbeit soll dem besseren Verständnis der Rolle der PLD2 im MI dienen und darüber hinaus ggfs. neue Ansätze für Therapiemöglichkeiten liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gebrauchsartikel

Gegenstand	Modell	Firma
Bechergläser	25ml, 50ml, 100ml, 250ml	Duran Schott
Butterfly	Vacutainer Safety-Lock Blood Collection Set, REF 367286	BD BioSciences
Cryoröhrchen	Low temperature freezer vials, LOT # 202666691	VWR
Küvette	Cuvette G1.0, #6138GJ603150	Eppendorf
Deckgläser	24x60 mm, #k12460 24x32mm, #10145	Engelbrecht
Durchflusszytometrie-röhrchen	Röhre 5 ml, LOT#7044312	Sarstedt
Einbettkassetten	Einbettkassette, #7-0010 + #7-0009	neoLab
Entsorgungsbeutel	#759705	Brand
Eppendorfreagiergefäß	Safe-Lock-Tubes 2ml, LOT#E162982N	Eppendorf
	Reagiergefäß 1,5 ml, LOT#7082211	Sarstedt
Falcon-Röhrchen	15 ml, 50 ml	Greiner
Färbeküvette	Kuvette	Wertheim Glaswerk
Filterpapier		Whatman
Kanüle	100 Sterican, LOT#16D22G8811	Braun
Klingen	Microtome Blades S35, LOT#1603145OP	FEATHER
Magnetrührer	RCT IKAMag	IKA Labortechnik
Magnetsäulen	Macs Separating Columns, LOT#5140128011	miltenyibiotec
Magnetständer	Macs Stand Multi	miltenyibiotec
Mikrokapillare	#612-2650	VWR
Mikropipetten	Research plus	Starlab & Eppendorf
Mörser & Schale		Haldenwanger
Multipipette	Multipette® plus, #4982000012	Eppendorf
Objektträger	Histobond Microscope slides, LOT#37088202	Marienfeld
Petrischalen	TC-Schale 100 Cell +, LOT#4024701	Sarstedt
Pipette	Peqpette	Peqlab
Plattenabdeckfolie	Plate Sealers, LOT#328927	R&D Systems
Präparatekasten	#52.850723	Ceesem
Prolene (Faden)	#8695H	Ethicon
Schlittenbahnenöl		TechnoMed

Skalpelli	#11566	Neolab
Spritzen	1ml, LOT#16M28C8	Braun
	2ml, LOT#16C07C8	
	5ml, LOT#17B20C8	
	10ml, LOT#15M02C8	
	20ml, LOT#16B22CB	
96-Well-Platte (ELISA)	Costar Assay Plate, 96 Well, LOT#11814042	Corning
96-Well-Platte (Zellkultur)	TC-Platte 96 Well, Cell+F, #4025002	Sarstedt

Tabelle 1: Gebrauchsartikel

2.1.2 Geräte

Gerät	Modell	Firma
Automatischer Hämatologie-Analysator	KX-21N	Sysmex
Binokular	Nikon SMZ25 Lichtquelle: Digital Slight DS-U3	Nikon
CO ₂ -Inkubator	C150	Binder
Durchflusszytometer	FACS Calibur	BD BioSciences
ELISA-Reader	Sunrise Remote, # F039300	Tecan
Heizplatte	Oberflächentemperaturheizplatte; IKAMAG RCT	IKA
Inkubator	D06059 Modell 300	Memmert
Mikroskope	Axioskop Objektive: Achroplan (40x) Plan-Neofluar (20x) Kamera: AxioCam 105 color	Zeiss
	Axio Observer – Inverses Objektive: Plan Apochromat (100x) & LD Plan-Neofluor (40x) Kamera: AxioCam MRm & AxioCam 502 color Lichtquelle: HXP 120C; Kübler	Zeiss
	DM2500MH Objektiv: W 20x/0,5	Leica
Mikrotom	Microm Gerät HM 355	Thermo Fisher Scientific
Mikrowelle	NN-E201WM	Panasonic
Paraffinbad	Paraffinspender rund, Typ 43900, #40935	Medax
PCR-Cycler	Mastercycler Nexus Gradient, #6331CH503744	Eppendorf
pH-Meter	IKAMAG RCT, #228502	IKA

Photometer	Bio Photometer, #6133GH201538	Eppendorf
Real-Time PCR System	ViiA™ 7 Real-Time PCR System, 7 Flex System	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	BSB 3A	Gelaire
Stickstoffbehälter	MACH SM-43	MVE Cryogenics
Ultraschallgerät & Schallkopf	Vevo2100 & Vevo3100	VisualSonics Inc.
Waagen	Delta Range AE166	Mettler
	DKD-K-100502	Sartorius
Wärmematte	Wärmeunterlage, Witte+Sutor; #461265	ThermoLux
Wasserbad	Typ 1052, #10602116C	GFL
Zählkammer	Neubauerkammer improved, LOT#ZK06	Marienfeld
Zentrifugen	Centrifuge 5415C	Eppendorf
	Centrifuge 5424R	Eppendorf
	Zentrifuge 2-16P	Sigma
	Zentrifuge TMC1206125	Neolab

Tabelle 2: Geräte

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Produktbezeichnung	Firma
Anilinblau	#42755	Chroma-Gesellschaft Schmid
Apyrase 500 U	#A7646	Sigma
Chromotrope 2R	#1B259	Chroma Gesellschaft Schmid
Ethanol (EtOH)	Ethanol 99, 5 % denaturated with 1% MEK, LOT#16KO44120	VWR
Adenosindiphosphat (ADP)	#A2754	Sigma-Aldrich
Ammoniumchlorid	Ammonium Chloride Solution, LOT# 17#E80968	Stemcell
Aqua destillata	Demi-Wasser, PZN 04914151	Fischar
Apyrase	Apyrase Grade III, A-6410	Sigma-Aldrich
Biocoll	Biocoll Separating Solution buffered with 10 mM HEPES, LOT# 0617F	Biochrom
Bouin's solution	# HT10132-11	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin	Albumin from bovine serum, LOT# SLBD2258V, CAS 9048- 46-8	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂)	LOT#SLBC0871V, C5080- 500G	Sigma-Aldrich
CD11b Micro Beads	Mouse and human, MACS, LOT#130-049-601	miltenyl Biotec
Citronensäure	#6490.3	Carl Roth GmbH

Material und Methoden

Collagen related peptide (CRP)		University of Cambridge, UK
DAPI	LOT#70317525	Roche
DNaseI recombinant RNase-free	#04716728001	Roche
Eosin-Lösung	Eosin G Lösung 1% methanolisch, Art Nr: 3139.2	Carl Roth GmbH
Essigsäure	#320099-500ML	Sigma-Aldrich
Essigsäure (für Gomori-Färbung)	#37385	Carl Roth GmbH
Evans blue-Lösung	#A4388,0025	AppliChem
Fetales Kälberserum (FCS/ FBS)	#16010159	Life Technologies
Glukose	D(+)-Glukose wasserfrei, #HN06.2	Carl Roth GmbH
Goatserum	#ZIE.SE.0100	Bio&Sell
Hämalaun	Hämalaun-Lösung sauer nach Mayer, Art Nr: T865.2	Carl Roth GmbH
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	LOT#1167080	gibco
Heparin-Natrium 2500	# 5394.02.00	Ratiopharm
Hydroxyethylpiperazin-1-ethanesulfonic acid (HEPES)	Pufferano $\geq 99,5\%$ p.a., LOT# 9105.4	Carl Roth GmbH
Isofluran		Primala critical care
Isopropanol	2-Propanol for molecular biology, Bio Reagent $\geq 99,5\%$, LOT# SHBH8682	Sigma
Kaliumchlorid	# 1.04936.1000	Merck
Ketamin	Ketaset 100mg/ml; #21283	Zoetis
Lipopolysaccharid (LPS)	Life science Lipopolysaccharide L2630 / E. coli 0111:B4)	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Magnesiumchlorid, 100g, #KK36.1	
Natriumchlorid (NaCl)	LOT#SLBS5149	Sigma
Natriumhydrogen-carbonat (NaHCO ₃)	#6885	Merck
Natriumdihydrogen-phosphat (NaH ₂ PO ₄)	#4984	Carl Roth GmbH
Natriumazid (NaN ₃)	LOT#BCBJ1210V	Sigma Aldrich
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	#3580	Carl Roth GmbH
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	#S6508	Sigma-Aldrich
Paraffin	Paraffin 50-52°C reinst, #CN48.2	Carl ROTH GmbH
Paraformaldehyd (PFA)	PFA 4%	Carl Roth GmbH
Penicillin/Streptomycin	#15140122	Life Technologies

Phosphate buffered saline (PBS)	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, LOT#RNBG0684	Sigma
Picro-Siriusrot-Lösung	#13422.00250	Morphisto
Prostaglandin I ₂ (PGI ₂)	#538925	Calbiochem
Proteinaseinhibitor	cOmplete Tablets Mini Easypack; #04693124001	Roche
RNase free water	LOT# 145031384	Qiagen
Roti Histol	#6640.4	Carl Roth GmbH
Roti Histokitt	#6638.1	Carl Roth GmbH
RPMI Medium	VLE RPMI 1640 Medium, LOT# 0353F	Biochrom
Salzsäure (HCl)	Hydrochlorid acid 25%; Emsure, LOT#Z0345816517	Merck
Thrombin	20U/31.25mg lyo from human plasma; LOT#30602423	Roche
T - PBS	0,05% Tween20 in PBS	
Tris-Hydrochlorid		Sigma-Aldrich
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C ₆ H ₉ Na ₃ O ₉)	#4088.3	Carl Roth GmbH
Trypanblau	Trypan Blue Solution 0,4%, LOT# RNBD1064	Sigma
Tween	Tween 20, LOT#S6568784247	Merck
Ultraschallgel	Aquasonic 100 Gel;	Parker Laboratories
U46	U46619, LOT#6C/17920	Tocris
Wasserstoffperoxid	#1.08597.1000	Merck
Weigerts Eisen Hämatoxylin	Hämatoxylinlösung A nach Weigert, #X906.1	Carl Roth GmbH
	Hämatoxylinlösung B nach Weigert, #X907.1	
Waschpuffer	Wash Buffer 25x Concentrate, LOT#P104304	R&D Systems
Wolframatophosphorsäure – Hydrat	#1.00583	Merck
Xylazin 2%	Xylazinhydrochlorid	Serumwerk Bernburg

Tabelle 3: Chemikalien, Puffer und Lösungen

2.1.4 Puffer & Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Gomori Lösung	0,6 g Chromotrope 2R 0,3 g Anilinblau 1 mL Essigsäure 0,8 g Wolframatophosphorsäure – Hydrat (Merck; #1.00583) 100 mL A.dest
HF-Puffer	100 mL HBSS 20 mL FBS/FCS 10 mL Penicillin/ Streptomycin 10 mL HEPES

Lysepuffer für murine Thrombozyten	IP-Puffer 1% IGPAL (Sigma; LOT#MKBJ6286V) 1x Proteaseinhibitor (PI) (Roche; #04693124001)
Tyrode-Stock	160 g NaCl 20 g NaHCO ₃ 4 g KCl 1,16 g NaH ₂ PO ₄ 119 g HEPES (Roth, #9105.2) 1 L dH ₂ O
Tyrode-Puffer	18 mL dH ₂ O 1 mL Tyrode Stock 200 µL 0,1 M MgCl ₂ 200 µL 10 % Glukose 720 µL 10 % BSA pH 7,35
Tyrode-Puffer mit Calcium	2 mL Tyrode-Puffer 40 µL 0,1 M CaCl ₂

Tabelle 4: Puffer & Lösungen

2.1.5 Antikörper

Antikörper	Bestellnummer	Firma
Rat anti mouse Ly6G	LOT#6021906	BD Pharmingen
APC Rat IgG2a K Isotype Ctrl (Ly6G Kontrolle)	LOT#B185058	BioLegend
Rat anti mouse CD107b (Mac3)	LOT#3017879	BD Pharmingen
Purified Mouse IgG1K Isotype Control (Mac3 Kontrolle)	LOT#4324640	BD Pharmingen
Goat pAb to rat IgG (HRP)	LOT#GR262346-6	Abcam

Tabelle 5: Antikörper für DAB-basierte Immunhistologie

Rat anti mouse CD45 - APC	BD Bioscience; LOT#5174609
Anti mouse Ly6G - APC	Biolegend; LOT#B241313
Rat anti mouse GPIbα (CD42b) - PE	Emfret; LOT#402-C
Jon-A (α _{IIb} β ₃) - PE	Emfret; LOT#FE
P-Selectin (CD62P) - FITC	Emfret; LOT#FD
Anti mouse Ly6G - DyLight 488	Leinco; LOT#121443200; 0,5mg/ml
Rat Anti Mouse Mac-1 (CD11b) - APC	BD Bioscience; LOT#6057932; 0.2mg/ml
Rat IgG2b Isotype control PerCP eFluor 710	eBioscience; LOT#E11872-1634

Tabelle 6: Antikörper für Durchflusszytometrie

2.1.6 Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
MHEC5-T	<i>mouse heart endothelial cell clone 5 transformed</i> (engl. Mausherz-Endothelzellen, MHEC5-T) (H. Langer, Deutsches Herzkompetenzzentrum Universitätsklinikum Tübingen) 10% FCS (Life Technologies; #16010159) 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technologies; #15140122) 1% L-Glutamin (Life Technologies; # 25030024) in DMEM-Medium (Life Technologies, # 41965062)

Tabelle 7: Zellkulturmedien

2.1.7 Primer

Gen	Richtung	Sequenz
Pld2	<i>forward</i>	5'GAAAGGGATAGGAAAGTCCAGG'3
Pld2	<i>reverse</i>	3'GGGTGGAAAGAGAACCCATAG'5
GAPDH	<i>forward</i>	5'GGTGAAGGCGGTGTGAACG'3
GAPDH	<i>reverse</i>	3'CTCGCTCCTGGAAGATGGTG'5
TNF – α	<i>forward</i>	5'GCCCCCACTCTGACCCCTTT'3
TNF – α	<i>reverse</i>	3'GGGGCTGGCTCTGTGAGGAA'5
IL – β	<i>forward</i>	5'AGCTTCCTTGTGCAAGTGTCTGAG'3
IL – β	<i>reverse</i>	3'TGTTGATGTGCTGCTGCGAGAT'5
BAX	<i>forward</i>	5'TGAAGACAGGGGCCTTTT'3
BAX	<i>reverse</i>	3'AATTCGCCGGAGACACTCG'5
Bcl – 2	<i>forward</i>	5'ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA'3
Bcl – 2	<i>reverse</i>	3'CATGCTGGGGCCATATAGTT'5
Bcl – xl	<i>forward</i>	5'GACAAGGAGATGCAGGTATTGG'3
Bcl – xl	<i>reverse</i>	3'TCCCGTAGAGACCACAAAAGT'5

Tabelle 8: Primersequenzen

2.1.8 Kits

Kit	Bestellnummer	Firma
DuoSet Mouse IL-1 β /IL-1F2 ELISA	LOT #P107671	R&D Systems
DuoSet Mouse TNF- α ELISA	LOT#1368462	R&D Systems
DuoSet Mouse IL-6 ELISA	LOT#331611	R&D Systems
DuoSet Mouse TGF- β ELISA	LOT#327010	R&D Systems
Liquid DAB + Substrate Chromogen System	#K3467	DAKO
Relia Prep RNA Tissue Miniprep System	#Z6010	Promega
PromII Reverse transcription System	#A3800	Promega

Tabelle 9: Kits

2.1.9 Software

Gerät	Verwendete Software zur Datenverarbeitung
Binokular	NIS-Elements BR4; Nikon
ELISA Reader	Magellan
Mikroskop(e)	ZEN 2 (blue edition); Zeiss
PC	Office 2016; Microsoft GraphPad Prism 7.02
RTq-PCR	ViiA7 Software: Applied Biosystem; Version 1.2

Tabelle 10: Software

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

2.2.1.1 Versuchstiere

Um den Einfluss der Phospholipase D2 (PLD2) auf die Prozesse nach MI zu untersuchen, wurde das *Pld2*-Gen in Mäusen deaktiviert. Oliveira *et al.* haben dieses Verfahren in ihrer Arbeit beschrieben [86]. Die dadurch entstandenen Mäuse mit dem Genotyp *Pld2*^{-/-} wurden auf dem genetischen Hintergrund einer C57BL/6J-Mauslinie zurückgekreuzt, um wildtypische und gendefiziente Mäuse im Vergleich analysieren zu können. Bei den tierexperimentellen Arbeiten wurden stets die europäischen Richtlinien der *Federation of European Laboratory Animal Science Association* (FELASA) sowie das deutsche Tierschutzgesetz eingehalten. Die Überprüfung erfolgte durch die Tierschutzbeauftragten der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Universität Düsseldorf. Die Tierversuchsgenehmigung wurde vom Landesamt für Natur-, Umwelt-, und Verbraucherschutz (LANUV) des Landes Nordrhein-Westfalen (NRW) erteilt (LANUV; NRW; AZ 84-02.04.2015.A558). Als Tötungsmethode wurde die Öffnung des Thorax und die anschließende Spülung und Entnahme des Herzens angewandt. Vor Organentnahme wurden die Mäuse intraperitoneal mit Ketamin [100 mg/kg] / Xylazin [10 mg/kg] narkotisiert. Alle Versuchstiere wurden in einer keimfreien Umgebung, dem Laborstandard des ZETT und den Leitlinien der FELASA entsprechend, gehalten. Die Haltung der Mäuse erfolgte gruppiert in Plastik Käfigen mit adäquater Ventilation und einem standardisierten

zirkadianen Rhythmus. Die Tiere wurden mit Wasser und Labortierfutter *ad libitum* gefüttert.

2.2.1.2 Murine Blutentnahme

Vor der Blutentnahme wurden die Mäuse mit einem Gasgemisch bestehenden aus Isofluran (2%) und Sauerstoff narkotisiert. Die Tiefe der Narkose wurde über den Zehenreflex geprüft. Bei Erlöschen dieses Reflexes galt die Narkose als ausreichend tief. Zur Blutabnahme wurde der retrobulbäre Venenplexus mit einer Glaskapillare punktiert. Das Blut wurde in einem Eppendorfreagiergefäß gesammelt, in dem bereits eine gerinnungshemmende Substanz eingefüllt worden war. Die Menge sowie die Art der Substanz variierte je nach Verwendungszweck des Blutes und ist daher in den dazugehörigen Abschnitten genauer beschrieben.

2.2.1.3 Induktion der kardialen Ischämie/-Reperfusion im Mausmodell

Der operative Eingriff, die Echokardiographien sowie die Infarktplanimetrie über TTC-Färbung (s. 2.2.6.2) erfolgte durch spezialisierte und zugelassene Mitarbeiter des Sonderforschungsbereichs (SFB) 1116.

Zur Untersuchung des murinen Organismus nach MI wurde bei 10-12 Wochen alten Mäusen per *open-chest*-Modell eine vorübergehende Myokardischämie induziert. Zunächst erfolgte die Narkose über die intraperitoneale Injektion von Ketamin [90 mg/kg] und Xylazin [10 mg/kg]. Nach dem Eintritt einer suffizient tiefen Anästhesie wurde die Maus in Rückenlage auf einem erwärmten Operationstisch fixiert und es erfolgte die Intubation. Beatmet wurde mit durch 40 %Sauerstoff (O₂) angereicherte Raumluft und dem volatilen Anästhetikum Isofluran (2 % Vol). Zur Kontrolle der kardialen Aktivität und der Narkose wurde während der gesamten Operationszeit ein Elektrokardiogramm (EKG) abgeleitet. Die Körpertemperatur wurde konstant bei 36 bis 38 °C gehalten und über eine Analsonde überwacht. Der Eingriff erfolgte mittels lateraler Thorakotomie über den 4. Interkostalraum. Nach Freipräparation des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) der linken Koronararterie wurde um diesen mit einem 6/0 Prolene-Faden eine Schlinge gebildet. Diese wurde zugezogen und das Gefäß somit abgebunden. Durch das Ablassen des distal davon gelegenen Myokards konnte die korrekte Position der Schlinge bestätigt werden. Die Ischämie wurde 45 Minuten (min) lang aufrechterhalten. Nach Ablauf der Zeit wurde die Schlinge wieder geöffnet, der Faden entfernt und der Thorax verschlossen. Die Beatmung wurde bis zur Wiedererlangung der Reflexe

weitergeführt, erst danach erfolgte die Extubation. Postoperativ wurde alle 8 Stunden (h) Buprenorphin (0,05-0,1 mg/kg] subkutan (s.c.) zur Schmerzstillung appliziert.

2.2.1.4 Echokardiographie

Für die genaue Analyse der Herzfunktion wurde prä- und postoperativ zu festgelegten Zeitpunkten bei den Versuchstieren eine Echokardiographie durchgeführt. Mit diesem bildgebenden Verfahren konnten unterschiedliche Parameter gemessen werden, die die Funktion des Herzens präzise abbilden: *ejection fraction* (EF, engl. Ejektionsfraktion), *endsystolic volume* (ESV, engl. Endsystolisches Volumen), *enddiastolic volume* (EDV, engl. Enddiastolisches Volumen), *stroke volume* (SV, engl. Schlagvolumen), *cardiac output* (CO, engl. Herzzeitvolumen), *fractional shortening* (FS, engl. Fraktionelle Verkürzung), *heart rate* (HR, engl. Herzfrequenz), *left ventricle anterior wall in diastole* (LVAWd, engl. Diastolische linksventrikuläre anteriore Wanddicke), *left ventricle anterior wall in systole* (LVAWs, engl. Systolische linksventrikuläre anteriore Wanddicke), *left ventricle posterior wall in diastole* (LVPWd, engl. Diastolische linksventrikuläre posterior Wanddicke), *left ventricle posterior wall in systole* (LVPWs, engl. Systolische linksventrikuläre posteriore Wanddicke).

Die Maus wurde hierzu über eine Maske mit Isofluran in Narkose gelegt. Dabei lag sie auf einem beheizten Elektroden-Kontakt-Pad, mit dem Herz-, Atemfrequenz und EKG abgeleitet wurden. Die Körpertemperatur wurde rektal mittels Analsonde gemessen. Um optimale Untersuchungsbedingungen zu schaffen, wurde der Thorax freirasiert und Ultraschallgel aufgetragen. Mit einem 18-38 Megahertz (MHz) Schallkopf konnten die lange und kurze Achse des linken Ventrikels dargestellt werden und die oben genannten (o.g.) Parameter gemessen werden. Nach Ende der Untersuchung wurde die Narkose beendet und die Maus bis zur vollständigen Erholung warmgehalten und beobachtet.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Thrombozyten aus murinem Blut

Den Mäusen wurde wie in 2.2.1.2 beschrieben Blut abgenommen. Dabei wurden 300 µL Blut in ein mit Heparin (20 U/ mL) präpariertes Reaktionsgefäß aufgefangen. Dieses heparinisierte Blut wurde für 5 min bei 250 g zentrifugiert. Dabei entstanden drei Phasen, eine obere milchige Phase mit Blutplasmabestandteilen, eine schmale Zwischenphase und eine untere rötliche Phase, die hauptsächlich aus Erythrozyten besteht. Die obere Phase

sowie die Zwischenphase wurden abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß für 5 min bei 50 g zentrifugiert. Dabei entstanden erneut zwei Phasen, von denen die obere abgenommen wurde. Diese bezeichnet man als *platelet-rich plasma* (engl. Plättchenreiches Plasma, PRP). Die verbleibende untere Phase wurde in 200 µL Tyrode suspendiert und für weitere 5 min bei 50 g zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde zu dem zuvor gewonnenen PRP hinzugefügt. Einer Präaktivierung der im PRP vorhandenen Thrombozyten wurde durch die Hinzugabe von Apyrase (0,02 U / mL) und PGI₂ (0,5 µM) vorgebeugt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 650g für 5 min nach welchem erneut der Überstand abgenommen wurde und dieser in 1 mL Tyrode resuspendiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation mit 650 g für 5 min wurde der Überstand in Tyrode-Puffer mit Calcium (Ca²⁺) (0,2 mM) resuspendiert. Zur Bestimmung der Thrombozytenzahl im automatischen Hämatologie-Analysator (Sysmex) wurde die Zellsuspension 1:10 in PBS verdünnt. Die Zentrifugationsschritte erfolgten alle bei Raumtemperatur (RT).

2.2.2.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie (FACS, engl. *fluorescence activated cell scanning*) können Zellen durch spezifische Marker identifiziert und quantifiziert werden. Dazu dient ein Laserstrahl, der das Medium, in dem sich die Zellsuspension befindet, passiert und über Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *forward scatter*) das Volumen und über Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. *side scatter*) die Granularität der Zellen bestimmen kann. Das Streulicht wird von den bestrahlten Zellen erzeugt, die während der Messung durch die Flusszelle fließen und kann von einer speziellen Software in einem Streulichtdiagramm dargestellt werden.

2.2.2.2.1 Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten

Um die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten im Blut nach MI zu ermitteln, wurde die Aggregatbildung dieser beiden Zellarten sowohl bei unbehandelten Tieren als auch 24 h und 72 h nach MI durchflusszytometrisch gemessen. Hierzu wurden ca. 4 Tropfen murines Blut in 300 µL Heparin aufgenommen und dieses mit 500 Mikroliter (µL) muriner Tyrode verdünnt. Es folgten zwei Zentrifugierungsschritte (5 min/ 650 Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung (g) nach denen jeweils der Überstand entfernt und zwischen denen die Probe erneut in 500 µL muriner Tyrode resuspendiert wurde. Aus der so

entstandenen Zellsuspension wurden 25 μL pro Ansatz entnommen und 15 min lang im Dunkeln bei RT mit verschiedenen Antikörpern zur Markierung von Thrombozyten (PE anti-mouse GPIb, Emfret), neutrophilen Granulozyten (APC anti-mouse Ly6G, Biolegend) und Leukozyten (APC anti-mouse CD45, BD Bioscience) inkubiert. Die Reaktion wurde nach Ablauf der Zeit mit 400 μL *Phosphate buffered saline* (PBS) gestoppt und die Proben mit dem Durchflusszytometer gemessen. Zur Auswertung diente die gemittelte Fluoreszenzintensität (MFI, engl. *mean of fluorescence intensity*) der doppelt-positiven Zellen (GPIb/ Ly6G und GPIb/ CD45).

2.2.2.2.2 Quantifizierung aktivierter Immunzellen

Um die systemische Inflammation nach MI näher zu bestimmen, wurden vor und 24 h nach MI die aktivierten neutrophilen Granulozyten im Blut der Mäuse per Durchflusszytometrie gemessen. Für die Messung wurde das Blut wie in 2.2.2.2.1 aufbereitet. Die so entstandenen Proben wurden ebenfalls 15 min lang im Dunkeln mit Antikörpern gegen neutrophile Granulozyten im Ruhezustand (DyLight 488 anti-mouse Ly6G; Leinco) und im aktivierten Zustand (APC anti-mouse Mac-1 CD11b; BD) bei RT inkubiert und die Reaktion mit 400 μL PBS abgestoppt. Gemessen wurde der Anteil aktivierter neutrophiler Granulozyten innerhalb von 300 gemessenen neutrophilen Granulozyten und mittels MFI angegeben.

2.2.2.2.3 Thrombozytenaktivierung

Zur Bestimmung der Thrombozytenaktivität im Rahmen des Infarktgeschehens wurden 0 h, 4 h, 24 h und 21 d nach MI die Degranulation der Thrombozyten sowie die Integrinaktivierung als Maße für die Thrombozytenaktivierung gemessen. Hierzu wurden ca. 50 μL Blut in 300 μL Heparin aufgenommen und mit 500 μL muriner Tyrode verdünnt. Zum Waschen wurden die Proben zentrifugiert (5 min/ 650 g) und anschließend der Überstand abgenommen. Nach dreimaligem Wiederholen dieses Waschschrittes wurde die Zellsuspension in 500 μL calciumhaltiger Tyrode verdünnt. Daraus wurden 24 μL pro Ansatz entnommen und mit 3 μL des P-Selektin-AK (FITC CD62P; Emfret) und 3 μL des Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -AK (PE Jon-A $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$; Emfret) zusammenpipettiert. Pro Ansatz wurden 3 μL eines Thrombozytenagonisten (ADP, U46691, CRP, Thrombin) in einer bestimmten Konzentration (Tabelle 11) hinzugefügt und für 7 min bei 37 Grad Celsius ($^{\circ}\text{C}$) und weitere 7 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion nach Ablauf der Inkubationszeit mit 400 μL PBS. Anschließend wurden

durchflusszytometrisch die P-Selektin Exposition und die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ gemessen und anhand der MFI verglichen.

Agonist	Finale Konzentration
Thrombin	0,1 U/ mL
Thrombin	0,02 U/ mL
Thrombin	0,005 U/ mL
CRP	5 μ g/ ml
CRP	1 μ g/ mL
CRP	0,1 μ g/ mL
ADP/ U46	10 μ M/ 3 μ M

Tabelle 11: In der FACS-Analyse verwendete Thrombozytenagonisten mit Angabe der für den Versuch hergestellten finalen Konzentrationen

2.2.3 Zellkulturtechniken

2.2.3.1 Kultivierung von MHEC5-T Zellen

Zur Analyse des gegenseitigen Einflusses von Endothelzellen und Thrombozyten in der Inflammation verwendeten wir *mouse heart endothelial cell clone 5 transformed* (engl. Mauserherz-Endothelzellen, MHEC-5). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/ Streptomycin und 1 % L - Glutamin versetztem DMEM-Medium bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung im Brutschrank. Für das Ablösen und Passagieren verwendeten wir 0,05 % Trypsin-EDTA.

2.2.3.2 Kultivierung von Monozyten

Um die Zytokinausschüttung aus murinen Monozyten genauer zu untersuchen, wurden Monozyten aus dem Blut der Genotypen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} isoliert und mit LPS stimuliert und der Überstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen. Die Messung der Zytokine erfolgte anschließend mittels Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) (s.u.).

2.2.3.2.1 Monozytenisolation aus murinem Blut

Zunächst erfolgte die Blutentnahme (s. 2.2.1.2) wobei das Blut in 100 μ L Natriumcitrat aufgenommen wurde. Dabei wurden jeweils drei Blutproben eines Genotyps gepoolt, da der prozentuale Anteil von Monozyten zu gering ist, um diese erfolgreich aus der von einer Maus abgenommenen Blutmenge zu isolieren. Die Proben wurden mit PBS auf 5 Milliliter (mL) aufgefüllt und anschließend auf eine vorgelegte Schicht *Biocoll Separating Solution* gegeben. Durch den darauffolgenden Zentrifugierungsschritt (20

min/ 400 g/ ohne Bremse) entstanden drei Phasen, wobei die obere Plasmaschicht abgenommen und verworfen wurde. Die mittlere Schicht wurde großzügig abgenommen und erneut in PBS gelöst. Nach einer zweiten Zentrifugierung (10 min/ 300 g) wurde erneut der Überstand abgenommen und verworfen. Um die Erythrozyten in dem verbliebenen Pellet zu lysieren, wurden 3 ml Ammoniumchlorid zu jeder Probe hinzugegeben und diese 10 min bei 4 °C auf einem Rollbrett inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben erneut zentrifugiert (10 min/ 300 g) und der Überstand verworfen. Das so entstandene Pellet wurde in 1 mL PBS gelöst und ein Teil davon in einem separaten Eppendorfreagiergefäß 1:10 mit Trypanblau verdünnt. Die Auszählung der Monozyten erfolgte in einer Neubauerkammer mit Hilfe eines Mikroskops bei 40-facher Vergrößerung. Nach Bestimmung der ZZ (Zellzahl) wurde die verbliebene Probe erneut zentrifugiert (10 min/ 300 g), der Überstand verworfen und das Pellet in 90 µL *hydrofluoric acid* (HF)-Puffer pro 10^7 Zellen aufgenommen. 10 µL CD11b *Microbeads* pro 10^7 Zellen wurden dazugegeben und die Proben mind. 15 min bei 4-8 °C rollend inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 1,5 mL HF-Puffer pro 10^7 Zellen hinzugemischt und die Proben erneut zentrifugiert (10 min/ 300 g). Das dabei entstandene Pellet wurde in 1 mL HF-Puffer suspendiert und die Suspension in die vorher mit 2 mL HF-Puffer gespülte Magnetsäule gegeben. Da die hier verwendeten *Microbeads* magnetisch wirksame Monozytenantikörper sind, konnte man so die Monozyten von den restlichen Zellen trennen. Nachdem die gesamte Probe durchgelaufen war, wurde zusätzlich 2-mal mit 1 mL HF-Puffer gewaschen, bevor die Säule vom Magneten getrennt wurde und die Monozyten mit 5 mL HF-Puffer unter Druck in neue Falcons ausgespült wurden. Diese wurden zentrifugiert (10 min/ 300 g), der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µL RPMI + 1% FCS + 1% Penicillin/ Streptomycin gelöst. Für die Zählung der Monozyten wurde eine 1:2 Verdünnung mit Trypanblau angefertigt. Die Auszählung erfolgte in der Neubauerkammer unter dem Mikroskop. Zur Bestimmung der genauen ZZ diente folgende Formel: $ZZ/4 * 10 * 0,2 * 10^4$.

2.2.3.2.2 Monozytenstimulation mit LPS

Die Stimulation der Monozyten mit LPS erfolgte unter sterilen Zellkulturbedingungen. Isolierte Monozyten im o.g. Zellmedium wurden auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Dabei wurden pro Well 50.000 Zellen, gelöst in 150 µL Medium, aufgetragen, und über Nacht bei 37 °C inkubiert, um eine Adhäsion der Monozyten auf der Platte sicherzustellen. Am nächsten Morgen wurde als Basiswert der Überstand einiger Proben

abgenommen, bevor die restlichen Wells mit jeweils 1,5 µL LPS (final: 10 µg/ mL) stimuliert wurden. Davon wurde der Überstand nach weiteren 6 h, 12 h und 24 h abgenommen und zentrifugiert (10 min/ 300 g). Der Überstand wurde für folgende Untersuchungen bei -20 °C eingefroren.

2.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur quantitativen Bestimmung der Zytokinausschüttung im Plasma und im Überstand entzündlich stimulierter Monozyten (s. 0) diente die Methode des ELISA. Dabei wurde je nach zu untersuchendem Zytokin das passende DuoSet Mouse-Kit (R&D Systems) verwendet und stets die Herstellerangaben befolgt. Die Methode basiert auf einer Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexbildung, weshalb sie auch als Sandwich-ELISA bezeichnet wird. Zunächst wurde eine 96-Well Platte über Nacht mit 50 µL *Capture-AK* pro Well inkubiert. Am Folgetag wurde die Lösung abgeschüttet und 3-mal mit 150 µL Waschpuffer pro Well gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Platte kopfüber behutsam ausgeklopft, um lediglich die über Nacht angehaftete Antikörperschicht auf dem Grund zu belassen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen am *Capture-AK* folgte eine einstündige Inkubation bei RT mit *Reagent Diluent* (1% *Bovines Serumalbumin* (BSA/ PBS)). Nach Ablauf der Zeit wurde die Platte, wie bereits oben beschrieben, erneut gewaschen und anschließend 50 µL der Proben pro Well aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Standardreihe nach Herstellerprotokoll pipettiert, anhand welcher am Ende des Versuchs die Quantifizierung der Zytokine erfolgt. Die Platte wurde 2 h bei RT inkubiert, um die Bindung des zu untersuchenden Antigens an den *Capture-AK* zu ermöglichen. Es folgte der o.g. Waschschrift und anschließend wurden 50 µL pro Well des *Detection-AK* aufgetragen und die Platte wieder 2 h bei RT inkubiert. Dieser Biotin-gekoppelte Antikörper bindet ebenfalls an das in der Probe enthaltene Antigen, sodass der namensgebende Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Anschließend wurde nach erneutem Waschen 50 µL Streptavidin - *horse radish peroxidase* (HRP) pro Well hinzugefügt und die Platte 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Hierbei wird das Chromogen durch die HRP enzymatisch gespalten, wodurch ein blauer Farbumschlag zustande kommt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 25 µL Stop-Lösung pro Well aufgetragen, wobei es zu einem pH-Wert bedingten gelben Farbumschlag kam. Daraufhin erfolgte die photometrische Messung zur Quantifizierung des markierten Antigens mit Hilfe des ELISA-Readers (Tecan) bei einer Absorption von 450 Nanometer (nm).

Zur Herstellung der Plasmaproben wurde murines Blut 24 h, 72 h und 21 d nach I/ R in Heparin aufgenommen und dieses 10 min bei 650 g zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde abgenommen und für die unterschiedlichen ELISA verwendet. Außerdem wurde der Zellkultur-Überstand der mit LPS stimulierten Monozyten (s. 2.2.3.2.2) als Proben verwendet.

2.2.4.1 Messung der IL-6 Sekretion aus mit aktivierten Thrombozyten inkubierten Endothelzellen

Um die IL-6 Sekretion der Endothelzellen zu messen, wurden diese nach Kultivierung (s. 2.2.3.1) für 3,5 h mit aktivierten Thrombozyten inkubiert. Die Thrombozyten wurden dafür vorher wie in 2.2.2.1 beschrieben aus murinem Blut isoliert. Die so gewonnenen Thrombozyten (1×10^8 / Well) wurden mit den in Tabelle 12 angegebenen Agonisten stimuliert und zu den MHEC5-T-Zellen (1×10^5 / Well) gegeben.

Agonist	Finale Konzentration
Thrombin	0,02 U/ mL
Thrombin	0,005 U/ mL
ADP/ U46	10 μ M/ 3 μ M
TNF- α	100 ng/ mL

Tabelle 12: Thrombozytenagonisten mit Angabe der für den Versuch hergestellten finalen Konzentrationen

Nach 3,5 h Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und dieser bei 600 g für 5 min zentrifugiert. In dem aus diesem Schritt verbleibenden Überstand wurde die IL-6 Konzentration mittels ELISA (s. 2.2.4) ermittelt. Um auszuschließen, dass die Endothelzellen durch die Agonisten selbst stimuliert werden, führten wir parallel eine Inkubation von Endothelzellen nur mit den in Tabelle 12 angegebenen Agonisten, ohne Thrombozyten, durch. Als Positivkontrolle diente dabei TNF- α (100 ng/ mL). Die Inkubation damit erfolgte dabei über Nacht bei 37 °C.

2.2.5 Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Zur Untersuchung der Genexpression von *Pld2*, der Zytokine *TNF- α* und *IL-1 β* , des pro-apoptotischen Faktors *Bax* sowie der anti-apoptotisch wirksamen Faktoren *Bcl-2* und *Bcl-xl* wurde die Methode der *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR) angewendet. Diese ermöglicht eine quantitative Bestimmung der *polymerase chain*

reaction (PCR)-Produkte durch Messung von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit. Diese gemessenen Signale verhalten sich proportional zur Menge der amplifizierten *desoxyribonucleic acid* (DNA) und erlauben somit Rückschlüsse auf die in der Probe initial vorhandene Menge an *complementary desoxyribonucleic acid* (cDNA). Darauf basierend kann die Menge an transkribierter mRNA bestimmt und somit die Genexpression quantifiziert werden. Zur Umsetzung dieser Methode sind folgende drei Schritte durchzuführen: 1. *Ribonucleic acid* (RNA)-Isolation, 2. cDNA-Synthese 3. SYBR green basierte qRT-PCR.

2.2.5.1 RNA-Isolation aus murinen Herzlysaten

Zur RNA-Isolation aus murinen Herzen wurde das ReliaPrep RNA Tissue Miniprep System Kit (Promega) verwendet. Die Herzen wurden 24 h nach I/ R wie in 2.2.1 beschrieben mit 4 ml Heparinlösung (20 *Units* (U)/ ml in PBS) gespült und anschließend entnommen. Die Spülung erfolgte, um der Bildung eines Gerinnsels vorzubeugen. Dabei wurde die Spüllösung in die Herzspitze (lat. *Apex cordis*) des noch schlagenden Herzens injiziert und vorher der rechte Vorhof eröffnet, um den Durchfluss zu ermöglichen. Die entnommenen Herzen wurden nochmals mit gekühltem PBS gespült. Anschließend wurde der rechte Ventrikel entfernt und der linke Ventrikel gewogen und für den weiteren Versuchsverlauf mit Hilfe eines Mörsers und Flüssigstickstoff pulverisiert. Dabei war stets darauf zu achten, dass das Gewebe nicht auftaut. Pro Probe wurde eine gewichtsadaptierte Menge (500 µL/ 20 mg) Lysepuffer hinzugegeben und ca. 10-mal auf- und abpipettiert, um eine suffiziente Durchmischung der Probe mit dem Puffer sicherzustellen. Die Hälfte des Volumens wurde abgenommen und für weitere Versuche bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurde für die Lyse 500 µL *RNA-Dilution Buffer* (RDB) pro 20mg Gewebe zu den Proben hinzugegeben. Dabei galt zu beachten, dass sich zu diesem Zeitpunkt nur noch die Hälfte des initialen Gewebes in der Probe befand. Nachdem die Proben 10 Sekunden (Sek) gevortext und 1 min bei RT inkubiert worden waren, wurde das so entstandene Lysat 3 min bei 14.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt. Eine an das in der Probe befindliche Gewebe angepasste Menge Isopropanol (240 µL/ 20 mg) wurde hinzugefügt und zum Mischen 3-mal invertiert. Anschließend folgte die Isolation der RNA mit Hilfe eines Säulensystems. Hierzu wurden zunächst Auffangröhrchen unter den Säulen platziert und anschließend 800 µL Probe auf eine Säule gegeben und 1 min bei 14.000 g zentrifugiert. Der Unterstand wurde verworfen und 500 µL *RNA Wash Solution* pro Säule aufgetragen. Es folgte ein

weiterer Zentrifugationsschritt (30 sek/ 14.000 g) und der dabei entstandene Unterstand wurde erneut verworfen. Im nächsten Schritt wurden 30 µL des *DNase incubation Mix* auf die Säulen gegeben, sodass die Proben vollständig bedeckt waren. Im Anschluss wurden sie 15 min bei RT inkubiert. Bei diesem Schritt bindet die RNA an die in der Säule befindlichen Membran. Zum Waschen wurden 200 µL der *Column Wash Solution* hinzugegeben und 15 sek bei 14.000 g zentrifugiert. Der Unterstand wurde verworfen und es folgten zwei weitere Waschschrte mit 500 µL bzw. 300 µL *RNA Wash Solution* und 30 sek bzw. 2 min Zentrifugierung bei 14.000 g. Nach dem letzten Schritt wurden die Säulen auf neue sterile Reaktionsgefäße gesetzt und mit 20 µL *RNase free water* gespült. Durch einen nächsten Zentrifugationsschritt (1 min/ 14.000 g) wurde die RNA aus den Säulen gespült. Die Menge und Reinheit der nun isolierten RNA konnten anschließend in einer 1:10 Verdünnung mit *RNase free water* photometrisch bestimmt und bei -80 °C gelagert werden.

2.2.5.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese, die sich der RNA-Isolation anschließt, wurde das ImPromII Reverse transcription System Kit (Promega) verwendet. Um eine Verunreinigung durch Kontamination mit DNA zu vermeiden, wurde im ersten Schritt ein DNA-Verdau mit den, wie im letzten Abschnitt beschrieben, gewonnenen RNA-Proben durchgeführt. Um die Proben für diesen Schritt vorzubereiten, wurde zunächst die Menge an verwendbarer RNA ausgerechnet. Dabei orientierte man sich an der Probe mit der geringsten RNA-Menge, um ein einheitliches Maß für alle Proben zu finden und die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die errechnete Menge wurde entnommen und mit *RNase-free water* auf 18 µL aufgefüllt. Die so erhaltenen Proben wurden mit 2 µL DNaseI vermischt und im Thermocycler (Eppendorf) zum DNA-Verdau für 30 min bei 37°C erhitzt und anschließend zur Inaktivierung der DNase für weitere 10 min bei 75 °C erhitzt.

Für die darauffolgende cDNA-Synthese wurde unter sterilen Bedingungen ein Mastermix angesetzt. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 13 beschrieben.

Reagenz	Volumen
<i>ImProm-II 5x Reaction Buffer</i>	4 µL
MgCl ₂ (7 mM)	2,5 µL
dNTP Mix (0,5 mM)	1,0 µL
<i>Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor</i>	0,5 µL
<i>ImPromII Reverse Transcriptase</i>	1,0 µL

Tabelle 13: Zusammensetzung Mastermix für cDNA-Synthese pro Ansatz

Aus jeder Probe wurden 20 µL entnommen und 2 µL Oligo(dT)Primer sowie 9 µL des angesetzten Mastermix hinzugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem in Tabelle 14 beschriebenen Programm im Thermocycler (Eppendorf).

Prozess	Temperatur (°C)	Zeit (min)
<i>Annealing</i>	25	5
<i>Extension</i>	42	60
Inaktivierung der reversen Transkriptase	72	15

Tabelle 14: Programm im Thermocycler für cDNA-Synthese

2.2.5.3 SYBR green basierte qRT-PCR

Um die im vorigen Schritt synthetisierte cDNA zu amplifizieren, wurde die qRT-PCR angewendet. Zur Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte diente *SYBR green* als Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Die Messungen wurden mit Hilfe des ViiA™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem) durchgeführt. Um einen Vergleichswert zu haben, wurden Referenzgene (sog. *house keeping genes*), die konstant in einer Zelle exprimiert werden, mitamplifiziert. Hierzu diente in dieser Versuchsreihe Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Für die Amplifikation der cDNA werden Primer benötigt, die ein Andocken der für die Elongation zuständige Polymerase ermöglichen. Dabei handelt es sich immer um Primerpaare (*forward/-reverse*), da die Elongation an beiden komplementär zueinander ausgerichteten DNA-Strängen erfolgt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 in Abschnitt 2.1.7 aufgelistet. Pro Ansatz wurden 2 µL cDNA und 18 µL eines frisch angesetzten Mastermixes (Zusammensetzung s. Tabelle 15) verwendet.

Reagenz	Menge in µL
<i>Fast Cybr Green Master Mix</i>	10
<i>Aqua destillata (A. dest.)</i>	6
Primer for	1 [1:10 in <i>RNase-free water</i>]
Primer rev	1 [1:10 in <i>RNase-free water</i>]

Tabelle 15: Zusammensetzung Mastermix für qRT-PCR pro Ansatz

Mit dem in Tabelle 16 beschriebenen Programm führte das oben genannte Gerät die PCR für die unterschiedlichen Gene durch.

Zielgen	GAPDH	PLD2	TNF-α	IL-β	BAX	Bcl-xl
Zyklen	35	35	35	35	35	35

Denaturierung	2 min/ 90°C	2 min/ 90°C	2 min/ 90°C	2 min/ 90°C	2 min/ 90°C	2 min/ 90°C
Primer Annealing	62/58 °C	62°C	62 °C	62 °C	62 °C	58 °C
Elongation	10 sec/ 95 °C	10 sec/ 95 °C	10 sec/ 95 °C	10 sec/ 95 °C	10 sec/ 95 °C	10 sec/ 95 °C

Tabelle 16: Programm qRT-PCR

Anhand des *cycle threshold* (CT)_k-Werts konnten die Ergebnisse der qRT-PCR ausgewertet werden. Dieser Wert gibt den Zeitpunkt, zu dem die gemessene Fluoreszenz den Hintergrundwert übersteigt, an. Die ist wie folgt zu interpretieren: Zu Beginn des PCR-Zyklus wird die doppelsträngige cDNA denaturiert und zerfällt somit in Einzelstränge. An diese kann der Fluoreszenzfarbstoff *Sybr green* nur basal binden. Nachdem die Primer an die Einzelstränge angedockt sind und die Elongation voranschreitet, bilden sich zunehmend Doppelstränge, mit welchen der Fluoreszenzfarbstoff eine affine Bindung eingehen kann. Je mehr Bindungen eingegangen werden, desto stärker wird das Fluoreszenzsignal. Ein niedriger CT-Wert zeigt somit an, dass die Hintergrundintensität bereits früh im Zyklus überschritten wurde und somit in der Probe viel cDNA vorhanden sein musste. Im Gegenzug bedeutet ein hoher CT-Wert eine geringe Ausgangsmenge cDNA in der Probe. Der $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Wert bezieht das Referenzgen mit ein und erlaubt somit einen Vergleich der Proben untereinander. Zur Berechnung dieses Wertes wurde zunächst der Mittelwert (MW) aus den CT-Dubletten jeder Probe gezogen. Dieser MW des Referenzgens wurde von dem des Zielgens abgezogen, sodass der ΔCT -Wert entstand. Da das Referenzgen parallel zu jedem zu untersuchenden Zielgen gemessen wurde, wurde der MW des ΔCT -Werts des Referenzgens gebildet, um einen einheitlichen Vergleichswert zu haben. Dieser wiederum wurde von den ΔCT -Werten der Zielgene subtrahiert, um den $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert erhalten. Daraus wurde die zweifach negative Potenz gezogen und somit der $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Wert erhalten [87].

2.2.6 Histologische Verfahren

2.2.6.1 Einbettung von Mausherzen in Paraffin

Die Herzentnahme erfolgte 24 h und 21 d nach MI. Vor Organentnahme wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion mit Ketamin [100 mg/ kg]/ Xylazin [10 mg/ kg] narkotisiert. Der rechte Vorhof wurde eröffnet, um die anschließende Spülung des Herzens mit 4 ml Heparinlösung (20 U/ ml in PBS) zu ermöglichen. Dabei wurde die Spüllösung bei noch schlagendem Herzen in die Herzspitze injiziert. Auf diese Weise wurde der Bildung von Blutgerinnseln im Herzen vorgebeugt. Die entnommenen Herzen wurden nochmals in gekühltem PBS gewaschen und nach Entfernung der Vorhöfe zur Fixierung für mind. 24 h in 4% Paraformaldehyd (PFA) inkubiert. Anschließend wurden die Herzen in PBS gewaschen und mittels aufsteigender Alkoholreihe (s. Tabelle 17) entwässert. Darauf folgte eine 12-stündige Inkubation in Roti Histol, bevor die Organe in flüssigem Paraffin eingebettet werden konnten. Dieses musste 24 h bei 4 °C aushärten, erst danach konnten die Herzen geschnitten werden. Dafür wurde ein Microtom (Heidelberg GmbH) verwendet und Schnitte von 5 Mikrometer (µm) Dicke, beginnend an der Herzspitze (lat. *Apex*), angefertigt. Um eine einheitliche Einteilung der Organe zu schaffen, wurden die Herzen in Ebenen unterteilt. In einer Ebene wurden 20 aufeinanderfolgende Schnitte aufgefangen. Zum Auffangen der Schnitte auf die Objektträger wurden diese nach dem Schneiden im Heißwasserbad gestreckt und anschließend glatt auf Objektträger aufgezogen. Zwischen den Ebenen wurden jeweils 30 Schnitte verworfen. So konnte ein Herz in ca. 10 Ebenen eingeteilt werden. Um die Schnitte auf den Objektträgern zu fixieren, wurden diese für 30 min bei 50 °C inkubiert. Vor den darauffolgenden Färbungen mussten die Schnitte wieder entparaffiniert werden. Dies geschah über eine absteigende Alkoholreihe (s. Tabelle 18). Auf die Färbung folgte wiederum eine aufsteigende Alkoholreihe (s. Tabelle 18) zur Entwässerung, bevor die gefärbten Schnitte konserviert werden konnten. Für dieses sog. „Eindeckeln“ wurde ein Tropfen Histokitt auf den Objektträger gegeben und unter Vermeidung von Blasenbildung ein Deckglas aufgelegt.

aufsteigende Alkoholreihe	
Zeit (h)/ Temperatur	Reagenz
24 / 4°C	70 % EtOH
2/ RT	80 % EtOH
2/ RT	90 % EtOH

2/ RT	96 % EtOH
2/ RT	100 % EtOH

Tabelle 17: aufsteigende Alkoholreihe für Organfixierung

absteigende Alkoholreihe		aufsteigende Alkoholreihe	
Zeit (min)	Reagenz	Zeit (min)	Reagenz
10	Roti Histol	2	70 % EtOH
2	100 % EtOH	2	96 % EtOH
2	96 % EtOH	2	100 % EtOH
2	70 % EtOH	10	Roti Histol

Tabelle 18: Alkoholreihen vor und nach Färbungen

RNA-Isolation aus murinen Herzlysaten

2.2.6.2 TTC-/ Evans Blue-Färbung

Zur Bestimmung der Infarktgröße 24 h nach MI diente die TTC-/ Evans Blue-Färbung. Diese wurde bereits von Rassaf *et al.*, 2014 [88] beschrieben. Durchgeführt wurde diese Methode vom o.g. Serviceprojekt des SFB 1116. Die statistische Auswertung übernahm der Experimentator.

Zunächst erfolgte die Narkotisierung der Mäuse mit Ketamin [90 mg/ kg] und Xylazin [15 mg/ kg] über intraperitoneale (i.p.) Injektion. Um Blutgerinnsel zu vermeiden, wurde den Tieren zusätzlich 1000 IE Heparin verabreicht. Nach Entnahme der Herzen wurden diese mit Natriumchlorid (NaCl) -Lösung (0,9 %) gespült. Nach Abbinden der Koronararterie wurden 1,5 mL der *Evans Blue*-Lösung (1 %) in die LAD injiziert. Nach erneuter Spülung mit NaCl-Lösung (0,9 %) wurden die Herzen gewogen und 1 h bei -20 °C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit war das Gewebe eingefroren, sodass 1-1,5 mm dicke Kryostatschnitte angefertigt werden konnten. Von jedem der 6-7 angefertigten Schnitte pro Herz wurde das Gewicht bestimmt bevor eine 5-minütige Inkubation bei 37 °C in TTC-Lösung erfolgte. Danach konnten die Schnitte in drei farblich unterschiedliche Bereiche unterteilt werden, die Aufschluss über die Vitalität des Gewebes geben. Blau angefärbte Bereiche gelten als gesund, rot angefärbtes Gewebe gilt als gefährdet (*area at risk* (AAR)), engl. gefährdeter Bereich) und weiß angefärbtes Gewebe ist als infarziert (*infarcted area* (INF)) zu werten. Das Gewicht der unterschiedlichen Bereiche konnte zur Auswertung in Relation zum Gesamtgewicht des linken Ventrikels (LV) gesetzt werden.

2.2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung kann man sich eine gute Übersicht über die Morphologie des Gewebes verschaffen. Daher spricht man in der Histologie bei der HE-Färbung auch von einer Übersichtsfärbung. Die zwei Färbemittel reagieren je nach

pH-Wert der Gewebselemente unterschiedlich mit dem Gewebe. So färbt das Hämatoxylin in Form des basischen Hämaun saure Bestandteile blau, während das Eosin basische Elemente rot färbt. Zellkerne werden somit blau und Zytoplasma sowie Kollagen rot dargestellt. Mittels dieser Differenzierung konnte die Einwanderung von Zellen in die Infarktzone quantifiziert werden. Zunächst wurden die durch eine absteigende Alkoholreihe entparaffinierten Schnitte (s. Tabelle 18) mit A. dest gespült und anschließend 10 min in Hämaun inkubiert. Danach wurde mit Leitungswasser gespült und die Schnitte zur genaueren Differenzierung der durch das Hämaun angefärbten Zellkerne 60 sek in Chlorwasserstoff (HCl) (1 % in 70 % EtOH) eingetaucht und anschließend 10 min unter in fließendem Leitungswasser differenziert. Nach erneuter Spülung mit A. dest wurde der zweite Färbeschritt mit Eosin durchgeführt. Dabei wurden die Schnitte 60 sek in die Eosin-Lösung gehalten. Zur Entwässerung folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (s. Tabelle 18), bevor die Objektträger mit Hilfe von Histokitt eingedeckelt werden konnten. Zur Auszählung der in die Infarktgrenzzone eingewanderten Zellen wurden am Mikroskop (Zeiss) bei 20-facher Vergrößerung aus den drei mittleren Ebenen jeweils 8 repräsentative Bilder pro Ebene ausgewählt und manuell ausgezählt. Der MW aus diesen Werten wurde errechnet und mit einem wie folgt berechneten Faktor multipliziert: 1 Quadratmillimeter (mm^2)/ Bildfläche in mm^2 . Auf diese Weise konnte die Zellzahl pro mm^2 ermittelt werden.

2.2.6.4 Immunhistochemie

Zur genaueren Bestimmung der in die Infarktzone eingewanderten Zellen wurden Herzschnitte mit einer auf dem Diaminobenzidin (DAB)-System beruhenden immunhistologischen Antikörperfärbung gefärbt. Dadurch können gezielt bestimmte Zelltypen angefärbt werden und eine Aussage über die in der Infarktzone befindliche Art von Zellen getroffen werden. Hierzu dienten die Schnitte der 24 h nach MI entnommenen murinen Herzen.

Zunächst wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (s. Tabelle 18) entparaffiniert und anschließend 3 Mal für jeweils 5 min mit PBS gewaschen. Um Vernetzungen, die durch die Paraformaldehydfixierung entstanden sind und die Bindung an den Primärantikörper behindern könnten, zu lösen, wurden die Schnitte 15 min in kochendem Citratpuffer und weitere 30 min Inkubation im selben Citratpuffer bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut wie beschrieben mit PBS gewaschen, woraufhin das Blockmedium (5 % Goatserum + 5 % BSA in PBS) aufgetragen und für

30 min auf den Schnitten belassen wurde. Nachdem durch diesen Schritt unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden, folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (s. Tabelle 19) für 24 h bei 4 °C / 1 h bei RT. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Schnitte für 5 min bei RT in H₂O₂ (3 % in PBS) inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren, die die Färbung behindern könnten. Es folgte ein weiterer Waschschrift, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (s. Tabelle 19) 1 h bei RT durchgeführt wurde. Nachfolgend wurden die Schnitte wieder mit PBS gewaschen und anschließend 10 min in *Tween* in PBS (T-PBS) (0,05 %) inkubiert. Als nächstes wurde das DAB appliziert und je nach Geschwindigkeit des makroskopisch erkennbaren Farbumschlags 2-10 min zur Inkubation auf den Schnitten belassen. Nachdem eine Braunfärbung der Schnitte zu erkennen war, wurde das DAB abgeschüttet und 5 min mit T-PBS gewaschen. Es folgte eine 1-minütige Inkubation in A. dest und daraufhin die Kernfärbung über 5 min Inkubation in Hämalaun. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Schnitte 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend 1 min mit A. dest gewaschen. Über eine aufsteigende Alkoholreihe (s. Tabelle 18) wurden die Schnitte entwässert, bevor sie mit Roti-Histokitt versiegelt wurden. Pro Färbedurchlauf wurde stets eine Immunglobulin G (IgG)-Kontrolle mitgefärbt. Die Kontrollantikörper sind ebenfalls in Tabelle 19 aufgeführt. Die Auswertung der Zelleinwanderung erfolgte wie bei der in 2.2.6.3 beschriebenen HE-Färbung.

1. AK	2. AK	Zielzelltyp
Rat anti mouse Ly6G BD Pharmingen LOT#6021906 [1:50]	Goat pAB to rat IgG (HRP) Abcam LOT#GR262346-6 [1:200]	Neutrophile Granulozyten
Rat anti mouse CD107b BD Pharmingen LOT#3017879 [1:50]		Makrophagen
APC Rat IgG2a K Isotype Control BioLegend LOT#B185058		Kontroll-AK Neutrophile Granulozytenfärbung
Purified Mouse IgG1K Isotype Control BD Pharmingen LOT#4324640		Kontroll-AK Makrophagenfärbung
Rabbit anti mouse PLD1 Cell Signaling, Danvers LOT#	LSAB2 System-HRP DAKO Santa Clara, California	PLD1 pos. Zellen
Rabbit anti mouse PLD2		PLD2 pos. Zellen

Acris, Rockville LOT#		
--------------------------	--	--

Tabelle 19: Antikörper für Immunhistochemie über das DAB-System

2.2.6.5 Gomori-Trichrom-Färbung

Die Gomori-Trichrom-Färbung diente in diesem Fall der Abgrenzung von Narbengewebe zu gesundem Myokard 21 d nach MI. Gesunde Muskelfasern werden rot und aus Kollagen bestehendes Narbengewebe blau angefärbt, sodass die Größe der nach 3 Wochen entstandenen Narbe bestimmt werden konnte.

Nach Entparaffinierung der Schnitte (s. Tabelle 18) wurden sie 15 min lang bei 58 °C in Bouin's Solution inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger 5 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und anschließend für 5 min in Weigerts Eisen Hämatoxylin-Lösung inkubiert. Es folgte erneut ein wie oben beschriebener Waschschrift und daraufhin eine Inkubation in Gomori-Lösung für 25 min. Nach Ablauf der Zeit wurden die Schnitte kurz mit Leitungswasser gespült und 2-mal aufeinanderfolgend jeweils 2 min lang in Essigsäure (0,5 % in A. dest) getaucht, um überschüssige Farbreste zu entfernen. Durch eine aufsteigende Alkoholreihe (s. Tabelle 18) wurden die Schnitte entwässert und konnten anschließend, wie in 2.2.6.1 beschrieben, versiegelt werden.

Für die Auswertung wurde aus jeder Ebene ein repräsentativer Schnitt verwendet und mit einem Binokular (Nikon SMZ25) betrachtet. So konnte die Größe der Narbe bestimmt und in Relation zu Gesamtgröße des LV gesetzt werden. Aus den so errechneten Narbe/LV Quotienten pro Ebene wurde der MW gebildet, um einen einheitlichen Wert pro Herz zu erhalten.

2.2.6.6 Sirius-Rot-Färbung

Zur genaueren Bestimmung der Narbenqualität 21 d nach MI wurde die Sirius-Rot-Färbung angewendet. Diese ermöglicht unter polarisiertem Licht eine Unterscheidung der Kollagentypen I und III. Bei Durchlichtmikroskopie kann interstitielles Kollagen dargestellt werden.

Nachdem die Schnitte in absteigender Alkoholreihe (s. Tabelle 18) entparaffiniert und anschließend 3-mal für jeweils 5 min in PBS gewaschen und für 1 min in A. dest getaucht wurden, folgte der erste Färbeschrift mit Celestinblau-Lösung. Nach einer Inkubationszeit von 7 min wurden die Schnitte zweimal in HCl (1 % in A. dest.) und 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Für den zweiten Färbeschrift wurden die Schnitte 15-30 min unter Lichtausschluss in Picro-Siriusrot-Lösung inkubiert. Die Entwässerung

erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe (s. Tabelle 18). Anschließend konnten die Schnitte mit Hilfe von Roti-Histokitt eingedeckelt werden. Für die Auswertung wurden unter Polarisationsmikroskopie das dichte Kollagen (Typ I) und das lockere Kollagen (Typ III) quantifiziert und in Relation zum Gesamtkollagen gesetzt. Das im Myokard vorhandene interstitielle Kollagen konnte lichtmikroskopisch erfasst und die dadurch eingenommene Fläche in Relation zur Gesamtfläche des linken Ventrikels gestellt werden.

2.2.7 Statistische Datenanalyse

Die Anzahl der analysierten Individuen wurde mit der Variablen n bezeichnet. Zur Auswertung der Daten wurden der ungepaarte, zweiseitige *Student's t-test*, der Mann-Whitney-U-Test, der ANOVA-Test und der Spearman Koeffizient angewendet. Die Diagramme stellen den MW zum Parameter der Y-Achse dar. Als Fehlerindikator diente der *standard error of the mean* (SEM). Statistisch signifikante Unterschiede wurden wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***. Die statistischen Tests sowie die Diagramme wurden mit Microsoft Excel 2016, GraphPad Prism 7 und IBM SPSS Statistics 27 gerechnet und erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Der Effekt von PLD2-Defizienz auf die Inflammation in der akuten Phase nach Myokardinfarkt

PLD1 spielt eine zentrale Rolle in der TNF- α vermittelten entzündlichen Antwort nach MI [78]. Um den Einfluss von PLD2 auf die Inflammation nach MI zu analysieren, wurde bei Wildtyp (wt) und PLD2-defizienten Mäusen ein Herzinfarkt experimentell induziert und zu festgelegten Zeitpunkten nach dem Eingriff das Blut sowie das Myokard auf unterschiedliche Entzündungsparameter untersucht.

3.1.1 Erhöhte Expression von PLD1 und PLD2 im linken Ventrikel 24 h nach MI

Zunächst wurden die PLD1- und PLD2-exprimierenden Zellen im infarzierten Myokard von *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen vor und 24 h nach MI quantifiziert. Hierzu wurden die Zellen immunhistochemisch markiert und unter dem Mikroskop gezählt. PLD1 wurde zu Beginn im Myokard von wt Mäusen sowie von PLD2-defizienten Mäusen gleichermaßen exprimiert. 24 h nach MI konnte eine signifikante Steigerung der Proteinexpression, sowohl der PLD1 als auch der PLD2 gemessen werden (Abb. 5 A, B). Für eine Analyse auf Genebene wurde die qRT-PCR als quantitative Messmethode der Genexpression angewendet. Die *Pld2*-Expression im linken Ventrikel war 24 h nach MI signifikant geringer als bei Mäusen ohne MI (Abb. 5 C).

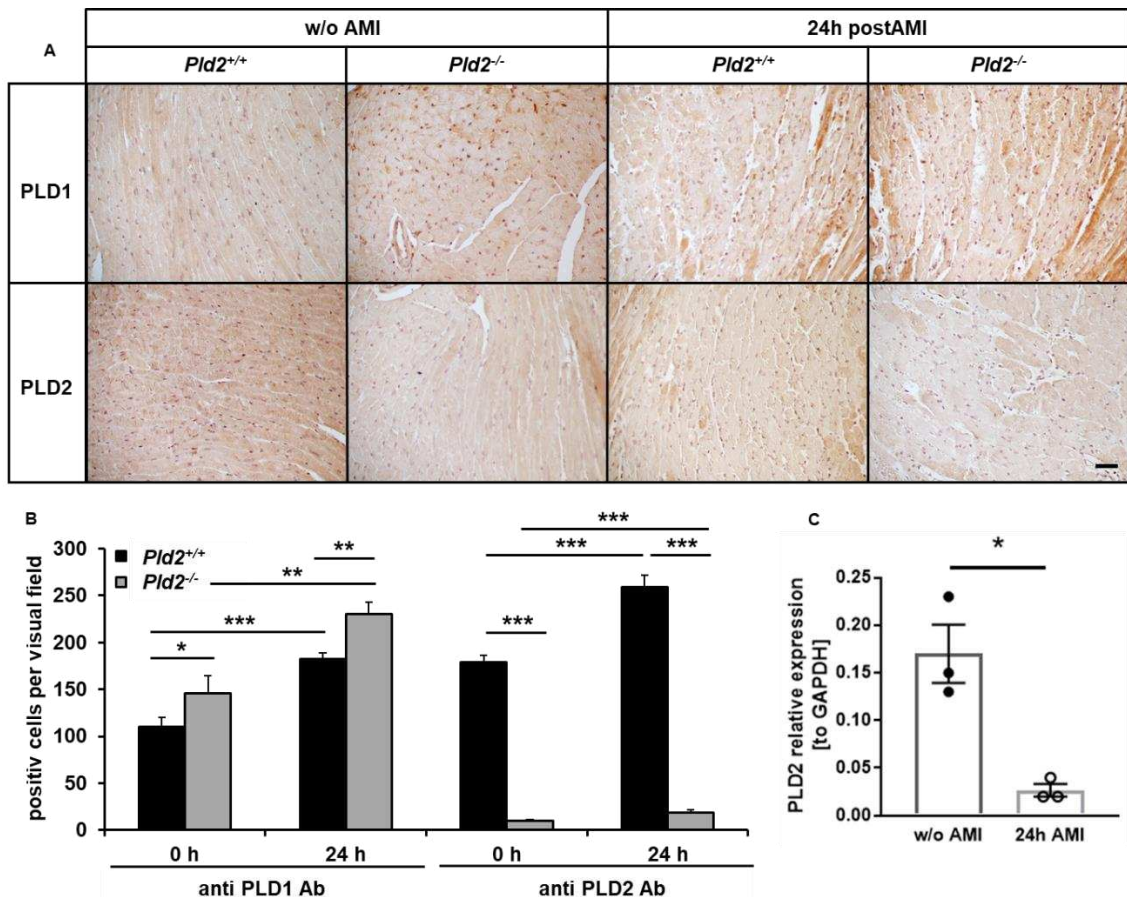


Abb. 5 Erhöhte Expression von PLD1 und PLD2 im Myokard 24h nach MI

Immunhistochemische Färbung von Mausherzen vor und 24 h nach MI auf PLD1- bzw. PLD2-exprimierende Zellen (A) Repräsentative Bilder und (B) statistische Auswertung, n = 4-6. Maßstabsbalken $\cong 50 \mu\text{m}$. (C) Quantifizierung der *Pld2*-Expression im linken Ventrikel von wt Mäusen vor und 24 h nach MI mittels qRT-PCR, n = 3. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *two way ANOVA with Sidak's post-hoc test* (B) und zweiseitigem *Student's t-test* (C). MW + SEM, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. Abb. 5 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2].

3.1.2 Erhöhte Zelleinwanderung in die Infarktzone bei PLD2-Defizienz

Zur Darstellung der eingewanderten Zellen in das Myokard wurde die HE-Färbung genutzt. Die Auszählung mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie ergab eine erhöhte Zellmigration in die Infarktzone bei PLD2-defizienten Tieren 24 h nach MI im Vergleich zum wt (Abb. 6 A, B). Um die Zellen genauer bestimmen zu können, wurden mittels immunhistochemischer Antikörperfärbung die neutrophilen Granulozyten angefärbt. Dabei konnte kein Unterschied der Menge an eingewanderten Neutrophilen zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Abb. 6 C, D).

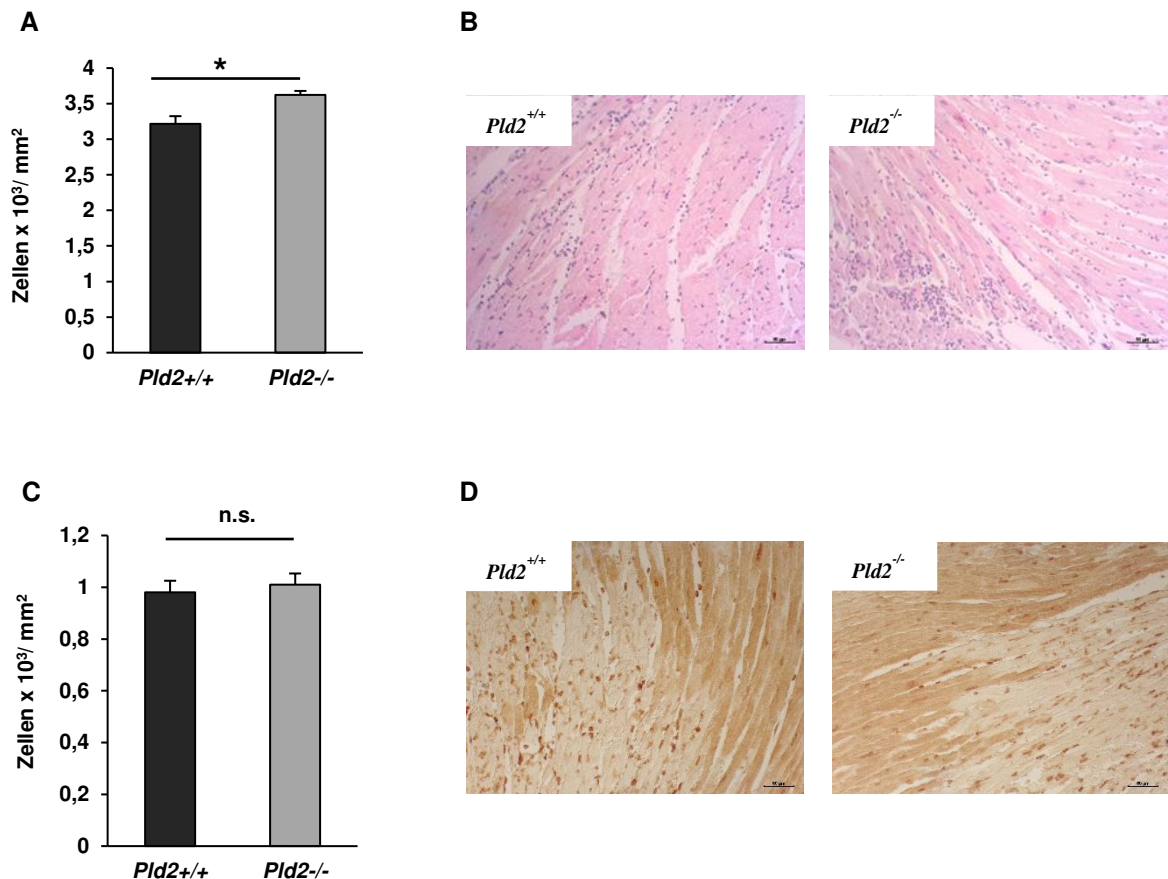


Abb. 6: Erhöhte Zelleinwanderung in die Infarktzone 24 h nach MI in PLD2-defizienten Mäusen

Mittels HE-Färbung konnten die Zellen in der Infarktzone quantifiziert werden. (A) Statistische Auswertung und (B) repräsentative Bilder, n = 4. (C-D) Die spezifische Anfärbung von Neutrophilen Granulozyten erfolgte mittels immunhistochemischer Antikörperfärbung. (C) Statistische Auswertung und (D) repräsentative Bilder, n = 4. Maßstabsbalken $\cong$ 50 μ m. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*. MW + SEM, * = $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant. Abb. 6 A, B modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

3.1.3 Verstärkte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine nach MI im Blut PLD2-defizienter Mäuse

Für eine vollständigere Analyse der Entzündungsreaktion wurden proinflammatorische Zytokine im Blut der Versuchstiere auf Proteinebene mittels ELISA sowie auf Genexpressionsebene mittels qRT-PCR gemessen. Als akute Phase Zytokine der Inflammation wurden IL-1 β und IL-6 gemessen. IL-6 zeigte sich 24 h nach MI bei *Pld2*^{-/-} Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu *Pld2*^{+/+} Mäusen (Abb. 7 A). Die Ausschüttung von IL-1 β zeigte zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 7 B). In der qRT-PCR konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von IL-1 β im linken Ventrikel 24 h nach MI zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden (Abb. 7).

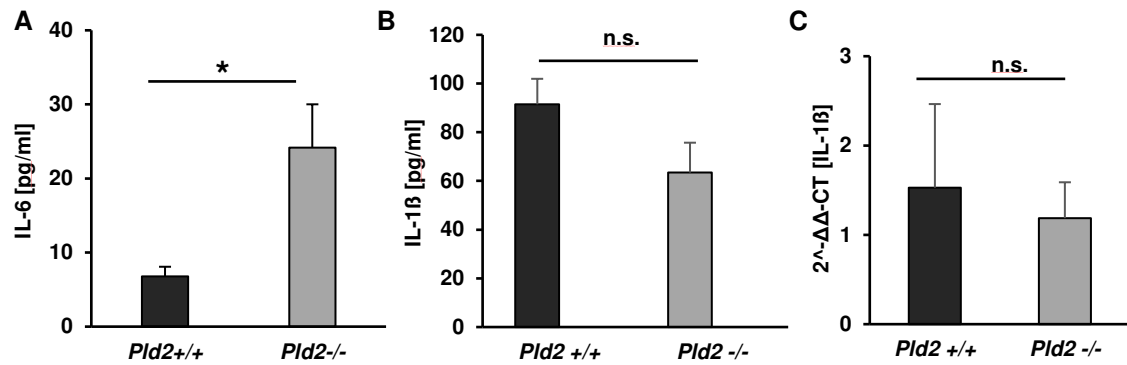


Abb. 7: Erhöhte Zytokinspiegel im Blut von *Pld2*^{-/-} Mäusen 24 h nach MI

Mittels ELISA konnte die Menge an freigesetzten proinflammatorischen Zytokinen im Blut der Versuchstiere 24 h nach MI bestimmt werden. (A) Bei *Pld2*^{-/-} Mäusen war signifikant mehr IL-6 nachweisbar als bei *Pld2*^{+/+} Mäusen, n = 17-16. (B) Die Ausschüttung von IL-1β zeigte keinen Unterschied zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen, n = 18-15. (C) Mittels qRT-PCR gemessene Genexpression von IL-1β im linken Ventrikel, n = 4. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test, U = 71, p = 0,019 (A) und zweiseitigem *Student's t-test* (B,C). MW + SEM, * = p < 0,05, n.s. = nicht signifikant. Abb. 7 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

3.1.4 Geringere TGF-β Ausschüttung in *Pld2*^{-/-} Mäusen 24 h nach MI

Ebenfalls wurde das anti-inflammatorische Zytokin TGF-β mittels ELISA im Blut der Versuchstiere 72 h nach MI gemessen. In PLD2-defizienten Mäusen konnten wir dabei einen signifikant erniedrigten TGF-β Spiegel messen (Abb. 8)

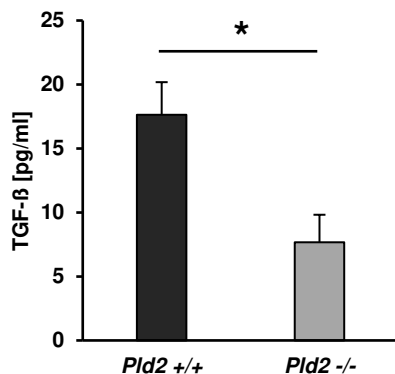


Abb. 8: Erniedrigte TGF-β Zytokinspiegel im Blut von *Pld2*^{-/-} Mäusen 72 h nach MI

Mittels ELISA wurde das anti-inflammatorische Zytokin TGF-β quantitativ im Blut der Mäuse bestimmt. Bei PLD2-defizienten Mäusen war 72 h nach MI ein signifikant geringerer TGF-β-Spiegel messbar als beim wt, n = 5-6. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM, * = p < 0,05. Abb. 8 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

3.1.5 PLD2 beeinflusst nicht die Aktivierung neutrophiler Granulozyten nach MI

In 3.1.2 wurde auf histologischer Ebene nachgewiesen, dass die Anzahl der eingewanderten neutrophilen Granulozyten in die Infarktzone 24 h nach MI in *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen keinen Unterschied aufweist. Mittels Durchflusszytometrie wurden

ergänzend dazu, über Detektion des Mac-1 Oberflächenmarkers, die aktivierten neutrophilen Granulozyten im Blut der Versuchstiere gemessen. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem wt und PLD2-defizienten Mäusen konnte hier ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Abb. 9).

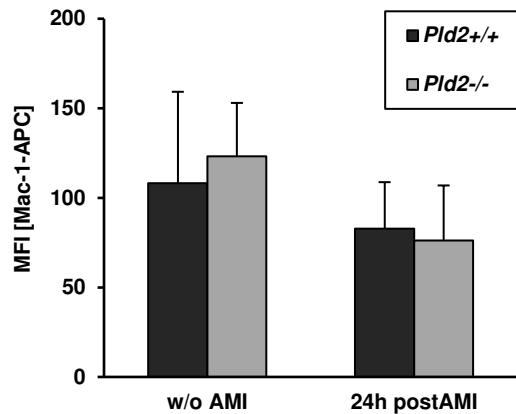


Abb. 9: Durchflusszytometrische Messung der Mac-1-Präsentation auf neutrophilen Granulozyten 24 h nach MI

Durch die FACS-Methode ist es möglich, die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten über Messung der Mac-1 positiven Zellen zu quantifizieren. Hierbei zeigte sich kein Unterschied zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen 24 h nach MI, n = 6-5. Auch im Vergleich zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen, die keinen MI erlitten haben, konnte kein Unterschied in der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM. Abb. 9 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

3.1.6 Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten in der akuten Inflammation nach MI

Auch Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle in der Inflammation nach MI. Thrombozyten und Leukozyten zeigen nach MI eine erhöhte Aggregatbildung [63]. In der vorliegenden Arbeit konnten zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen keine Unterschiede in der Bildung von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten sowie von Thrombozyten-neutrophilen Granulozyten-Aggregaten in der akuten Phase nach MI nachgewiesen werden (Abb. 10).

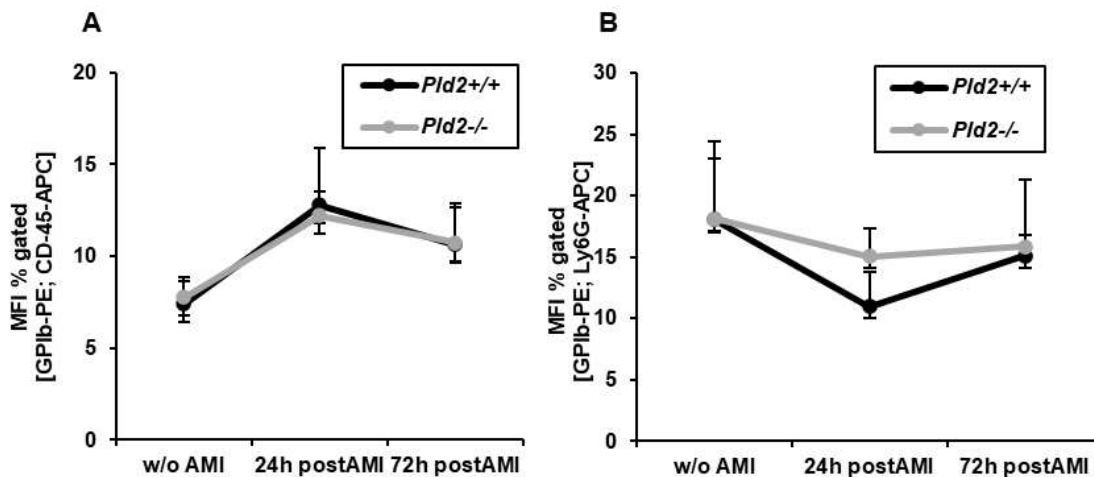


Abb. 10: Messung der Aggregatbildung von Thrombozyten und Leukozyten via Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der FACS-Analyse konnte vor MI sowie 24 h und 72 h nach MI die Aggregatbildung von Thrombozyten mit (A) Leukozyten sowie auch mit (B) einer Untergruppe der Leukozyten, den neutrophilen Granulozyten, quantitativ bestimmt werden. Zu keinem der Zeitpunkte zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen, n = 6. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM. Abb. 10 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

3.2 PLD2-Defizienz führt über eine verstärkte Thrombozytenaktivierung zu einer erhöhten IL-6 Ausschüttung aus Endothelzellen

Da wir einen Zusammenhang zwischen der Thrombozytenaktivierung und der Zytokinausschüttung aus Endothelzellen nach akutem MI vermuteten, führten wir folgende *in vivo* und *in vitro* Messungen durch.

3.2.1 Thrombozytenaktivierung

Zur Messung der Thrombozytenaktivierung wurde mittels Durchflusszytometrie die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung sowie die P-Selektin-Exposition 4 h und 24 h nach MI gemessen. Bei PLD2-defizienten Mäusen war im Vergleich zum wt 4 h nach MI eine signifikante Erhöhung der Integrinaktivierung messbar. 24 h nach MI war kein Unterschied zwischen den Genotypen mehr detektierbar (Abb. 11 B, D). Die P-Selektin-Exposition zeigte sich zu beiden Zeitpunkten zwischen PLD2-defizienten Mäusen und den Kontrolltieren unverändert (Abb. 11 A, C). Bei Mäusen ohne MI bestand kein Unterschied in der Thrombozytenaktivierung zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen (Abb. 11 A-D).

Ergebnisse

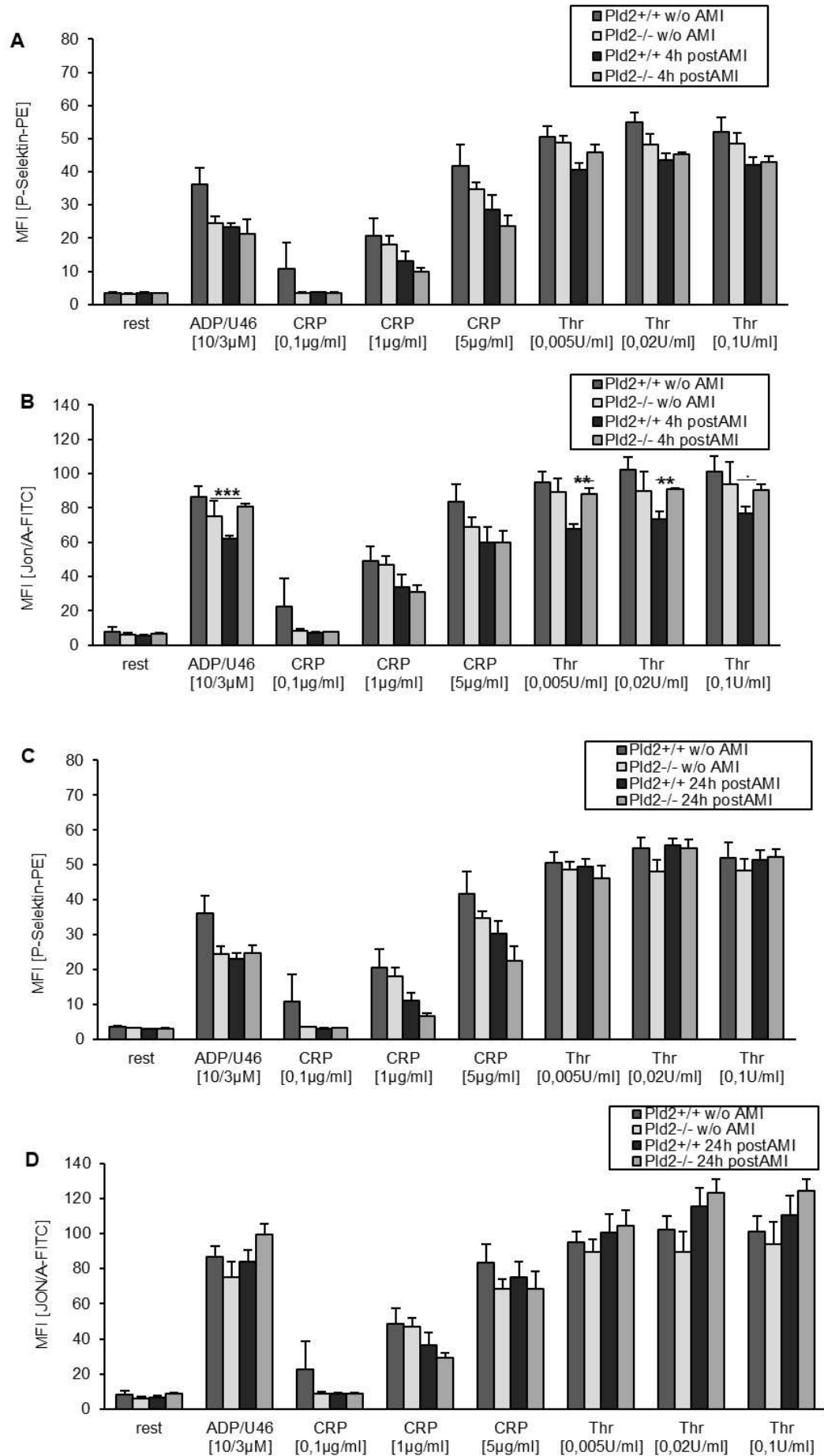


Abb. 11 Durchflusszytometrische Analyse der Thrombozytenaktivierung 4 h und 24 h nach MI

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann die Exposition von P-Selektin als Degranulationsmarker und die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ gemessen werden. Diese dienen als Maß für die Thrombozytenaktivierung. Das Blut der Versuchstiere wurde 4 h und 24 h nach MI mit Thrombozytenagonisten in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. (A) Während die P-Selektin Expression 4 h nach MI zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Thrombozyten unverändert war, (B) zeigte sich bei der Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ 4h nach MI eine signifikante Erhöhung in PLD2-defizienten Mäusen, n = 6-5. (C-D) 24 h nach MI war zwischen den Genotypen kein Unterschied in der Thrombozytenaktivierung messbar, n = 6. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. Abb. 11 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

3.2.2 IL-6 Ausschüttung aus Endothelzellen

Der IL-6 Spiegel im Blut wurde nach Co-Inkubation von Endothelzellen mit Thrombozyten von *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen und anschließender Stimulation mit ADP/U46 und Thrombin mittels ELISA gemessen. Dabei konnte eine signifikant erhöhte IL-6 Ausschüttung in der mit Thrombin stimulierten PLD2-defizienten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 12 B). Um auszuschließen, dass die verwendeten Agonisten die Endothelzellen direkt stimulieren, wurden zur Kontrolle Endothelzellen mit ADP/U46 und Thrombin behandelt. Als Positivkontrolle diente dabei die Behandlung der Endothelzellen mit TNF- α , da dies ein bekannter Mediator für die IL-6 Ausschüttung aus Endothelzellen ist. Es zeigte sich, dass die o.g. Agonisten keinen Einfluss auf die IL-6 Ausschüttung der Endothelzellen haben (Abb. 12 A).

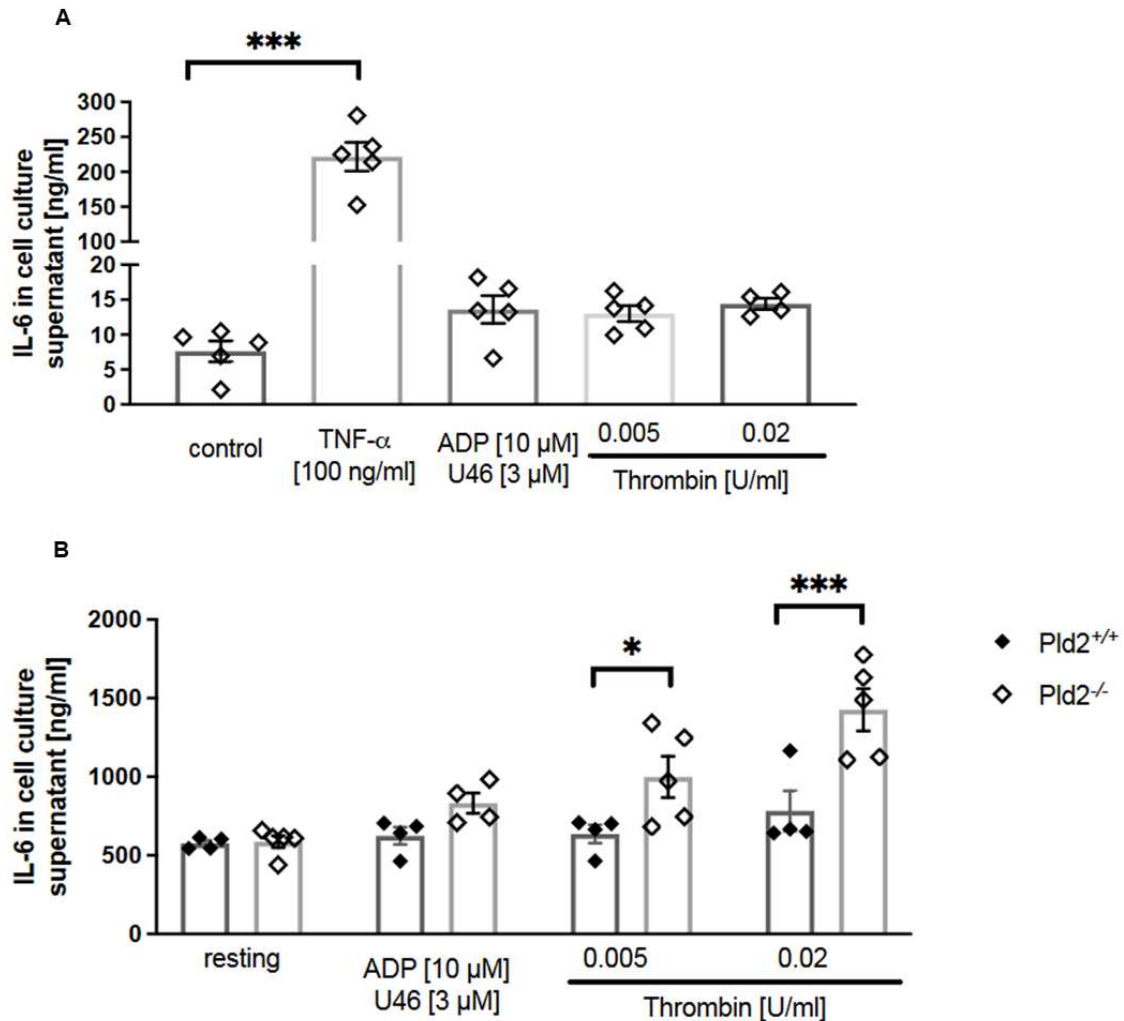


Abb. 12 Thrombozyten-induzierte IL-6 Ausschüttung aus Endothelzellen

Quantitative Bestimmung der IL-6 Ausschüttung aus Endothelzellen der Zelllinie MHEC5-T mittels ELISA nach (A) Stimulation mit 100 ng/ml TNF- α als Positivkontrolle sowie 10 μ M ADP, 3 μ M U46619, 0,005 und 0,02 U/mL Thrombin sowie nach (B) nach vorheriger Coinkubation mit Thrombozyten von *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen, die mit den o.g. Agonisten stimuliert worden waren, n = 5. Die statistische Auswertung erfolgte (A) mittels *one way ANOVA with Dunnett's post-hoc test* und (B) mittels *two way ANOVA with Sidak's post-hoc test*, MW $\pm$ SEM, * = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001. Abb. 12 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

3.3 Keinen Einfluss von PLD2 auf die Regulation der TNF- α Expression und Ausschüttung nach akutem MI

Zur Untersuchung des Einflusses von PLD2 auf die TNF- α Expression wurde diese über qRT-PCR 24 h nach MI im linken Ventrikel gemessen. Es wurde kein Unterschied zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen in der TNF- α Expression gemessen (Abb. 13 A). Auch nach Stimulation von Monozyten mit LPS und anschließender Messung der ausgeschütteten Menge TNF- α mittels ELISA konnten zu mehreren Zeitpunkten keine

signifikanten Unterschiede des TNF- α Spiegels zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Abb. 13 B).

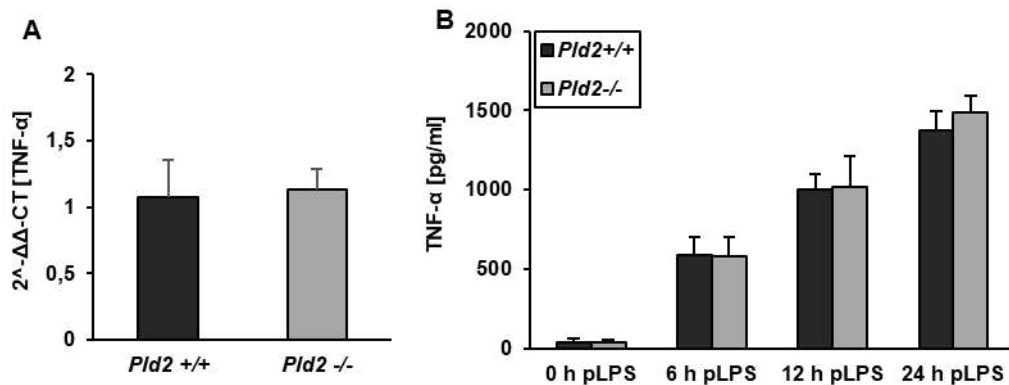


Abb. 13: PLD2 reguliert weder Expression noch Ausschüttung von TNF- α nach akutem MI
 (A) Die qRT-PCR ermöglichte es, die TNF- α Expression im linken Ventrikel bei *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen 24 h nach MI zu messen. Dabei wurde kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt, n = 3. (B) Auch die TNF- α Ausschüttung aus mit LPS stimulierten Monozyten wies zu keinem der gemessenen Zeitpunkte nach Stimulation einen Unterschied zwischen den Versuchstiergruppen auf, n = 9-7. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM. Abb. 13 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

3.4 Unveränderte Infarktgröße und Herzfunktion trotz erhöhter Inflammation nach MI in PLD2-defizienten Mäusen

Zur Ermittlung der Infarktgröße wurden die Mausherzen nach MI mit TTC gefärbt und das nekrotische Gewebe in Relation zum metabolisch aktiven Gewebe gesetzt. 24 h nach MI zeigte die Auswertung keinen Unterschied in der Infarktgröße zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen (Abb. 14).

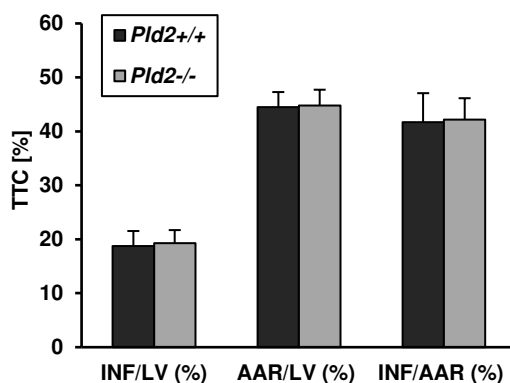


Abb. 14: Analyse der Infarktgröße 24 h nach MI mittels TTC-Färbung
 Die über TTC-Färbung ermittelte Infarktgröße 24 h nach MI zeigte keinen Unterschied zwischen PLD2-defizienten Mäusen und dem Wildtyp, n = 10-9. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM. Abb. 14 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

Die Herzfunktion als wichtiger klinischer Parameter kann präzise mittels Echokardiografie gemessen werden. Die Parameter EF, CO, FS und SV repräsentieren

die Pumpfunktion des linken Ventrikels und können so exemplarisch für die Analyse herangezogen werden. Insgesamt kann eine Reduktion der Herzfunktion 24 h nach MI im Vergleich zu naiven Tieren in beiden Gruppen festgestellt werden, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen (Abb. 15).

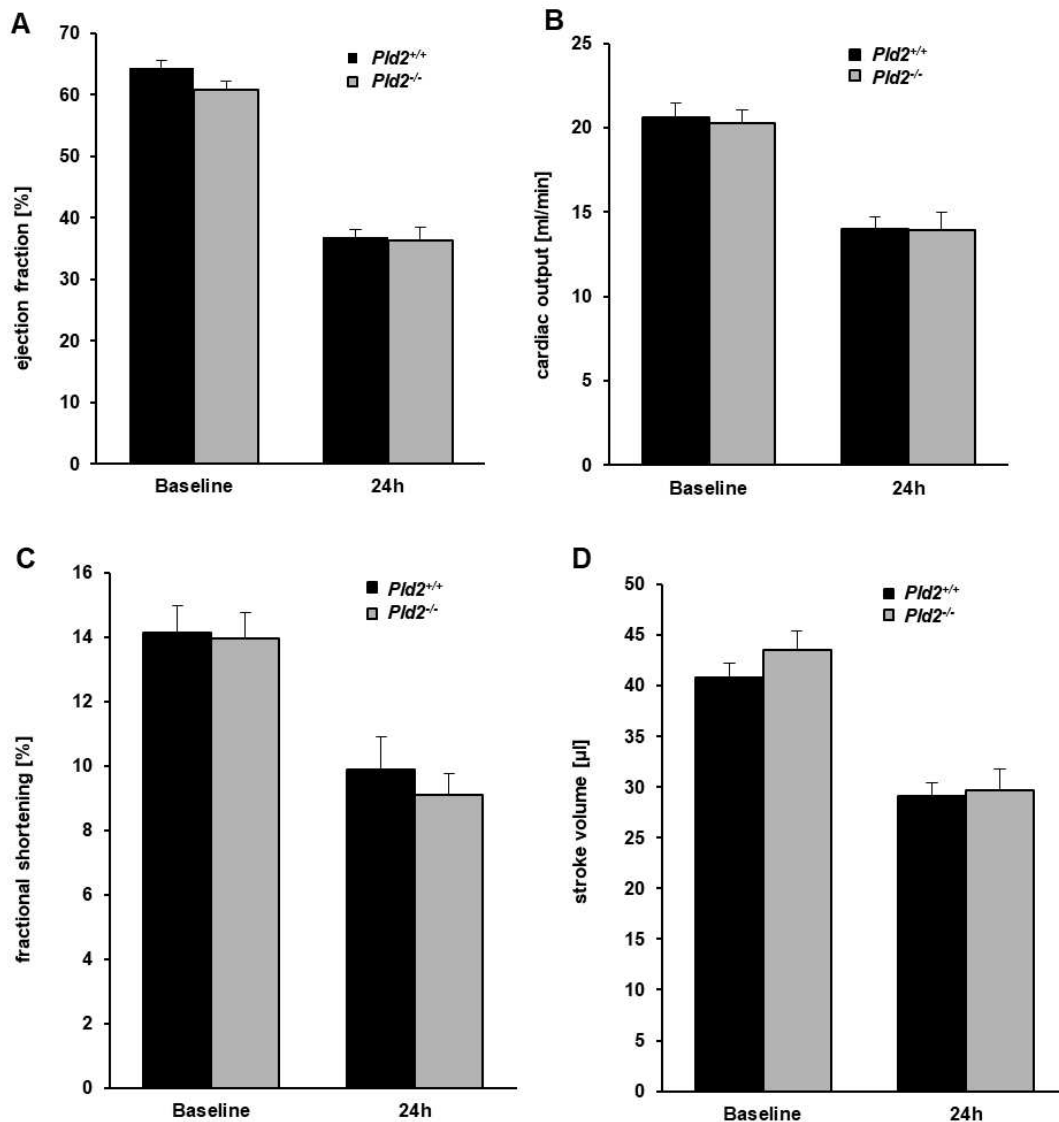


Abb. 15: Kein Unterschied in der Herzfunktion zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen 24 h nach MI
 Die mittels Echokardiografie ermittelte Herzfunktion 24 h nach MI zeigte im Vergleich der beiden Mauslinien *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} keinen signifikanten Unterschied. Beispielfhaft sind die Parameter (A) *ejection fraction*, (B) *cardiac output*, (C) *fractional shortening* und (D) *stroke volume* dargestellt, n = 15-17. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM. Abb. 15 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2].

Da Inflammation, Myokardveränderungen und Pumpfunktion des Herzens in engem Zusammenhang stehen, ist es erforderlich, die Parameter zueinander in Relation zu setzen, um die wechselseitigen Einflüsse genauer zu verstehen. Hierfür dient die statistische Methode der Spearman-Korrelation, mit deren Hilfe die Stärke eines

Ergebnisse

Zusammenhangs berechnet werden kann. Das IL-6-Niveau im Plasma, das sich 24 h nach MI in *Pld2*^{-/-} Mäusen signifikant erhöht gezeigt hatte (3.1.3) und die linksventrikuläre Ejektionsfraktion 24 h nach MI korrelierten in beiden Genotypen nicht miteinander (Abb. 16 A, B). Die Infarktgröße hingegen zeigte eine positive Korrelation mit der IL-6 Konzentration im Plasma 24 h nach MI in *Pld2*^{+/+} Mäusen. In PLD2-defizienten Mäusen konnten wir keine Korrelation zwischen dem IL-6 Plasmaspiegel und der Infarktgröße feststellen (Abb. 16 B, C).

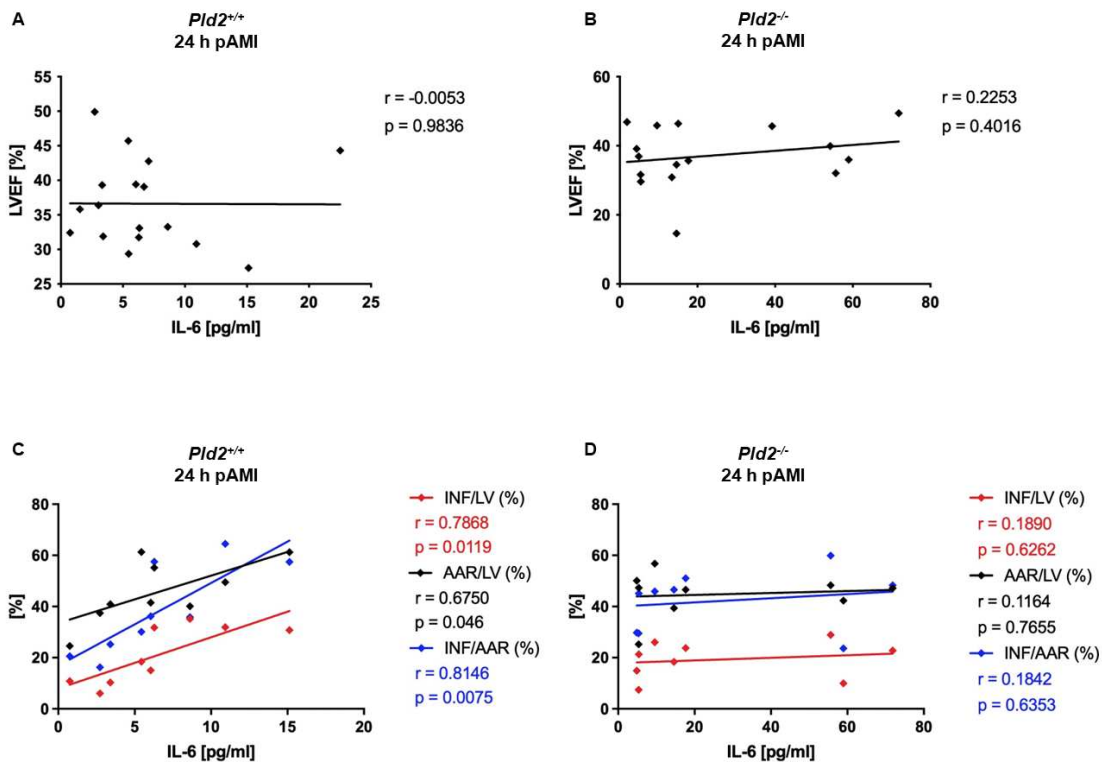


Abb. 16: Zusammenhang zwischen IL-6 und Herzfunktion sowie IL-6 und Infarktgröße durch Ermittlung des Spearman Koeffizienten

Über die Spearman Korrelation konnte weder in (A) *Pld2*^{+/+} noch in (B) *Pld2*^{-/-} Mäusen ein Zusammenhang zwischen IL-6-Konzentration und linksventrikulärer Ejektionsfraktion festgestellt werden. (C) Die Infarktgröße hingegen korreliert bei *Pld2*^{+/+} Mäusen mit der IL-6-Konzentration im Plasma. (D) Bei *Pld2*^{-/-} Mäusen konnte keine Korrelation zwischen Infarktgröße und der Plasmakonzentration von IL-6 nachgewiesen werden. Der Spearman Koeffizient *r* gibt die Stärke der Korrelation an. Abb. 16 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2].

Zudem verglichen wir den Zusammenhang von Infarktgröße und linksventrikulärer Pumpfunktion zwischen wt und PLD2-defizienten Mäusen. Als Parameter für die Herzfunktion diente hierbei die echokardiografisch ermittelte LVEF und als Parameter für die Infarktgröße der prozentuale Anteil des Infarktgebiets am linken Ventrikel und an der AAR 24 h nach MI. In *Pld2*^{+/+} Mäusen zeigte sich ein Trend zu geringerer LVEF bei größerem Infarktareal, der zwar keine statistische Signifikanz aufwies aber eine hohe

Ergebnisse

Effektstärke ($r > 0,5$). In *Pld2*^{-/-} Mäusen war keine Korrelation und kein Trend zwischen der Pumpfunktion und der Infarktgröße nachweisbar (Abb. 17).

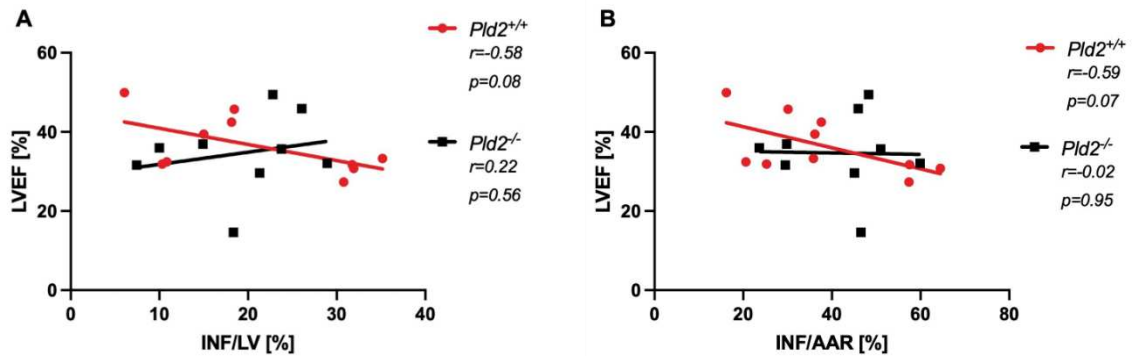


Abb. 17: Ermittlung der Korrelation zwischen Infarktgröße und Herzfunktion anhand des Spearman Koeffizienten 24 h nach akutem MI

Zur Bestimmung eines möglichen Zusammenhangs zwischen linksventrikulärer Ejektionsfraktion und (A) Infarktgröße in Relation zum linken Ventrikel und (B) Infarktgröße in Relation zur *area at risk* wurde der Spearman-Koeffizient berechnet. In beiden Fällen konnte bei *Pld2*^{+/+} Mäusen eine negative Korrelation ohne statistische Signifikanz gemessen werden. In *PLD2*-defizienten Mäusen konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden. Abb. 17 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2].

3.5 PLD2 hat keinen Einfluss auf die Apoptose der Kardiomyozyten nach akutem MI

Die Untersuchung zur Apoptose im linken Ventrikel nach akutem MI im angewendeten experimentellen Mausmodell bildet eine wichtige Grundlage für das Verständnis des Einflusses von PLD2 auf die Veränderungen nach MI. Mittels qRT-PCR mit RNA aus dem linken Ventrikel von *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen 24 h nach MI konnte die Expression des pro-apoptotischen Faktors *Bax* sowie der anti-apoptotischen Faktoren *Bcl-xl* und *Bcl-2* quantifiziert werden. Keiner der untersuchten Faktoren zeigte einen signifikanten Unterschied in der Expression von *Bax*, *Bcl-xl* oder *Bcl-2* zwischen PLD2-defizienten und Kontrollmäusen 24 h nach MI.

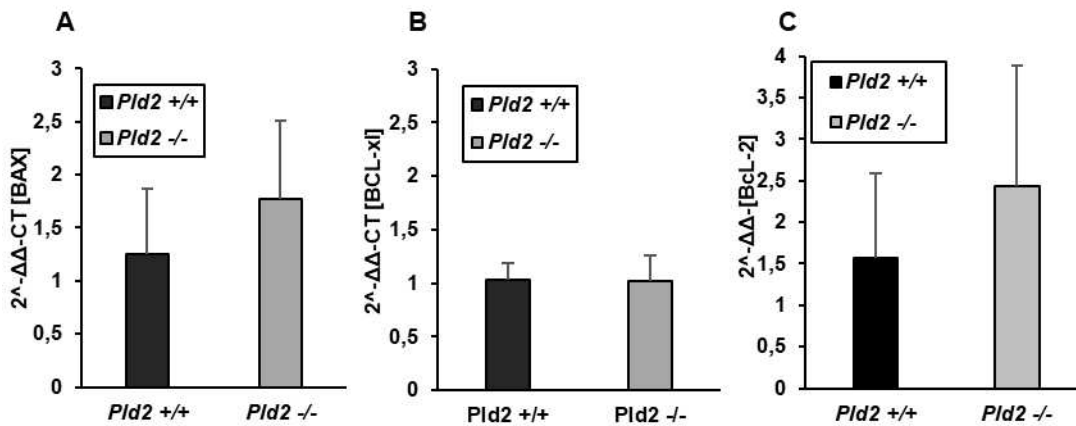


Abb. 18 Analyse der Apoptosemarker *Bax*, *Bcl-xl* und *Bcl-2* 24 h nach MI mittels qRT-PCR
Mittels qRT-PCR wurde 24 h nach MI die Expression verschiedener Apoptosemarker im linken Ventrikel der Versuchstiere gemessen. Sowohl bei dem (A) pro-apoptotischen Marker *Bax* als auch bei den anti-apoptotischen Markern (B) *Bcl-xl* und (C) *Bcl-2* zeigte sich zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen kein statistisch signifikanter Unterschied in der Genexpression, n = 3. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM. Abb. 18 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

3.6 Kein Einfluss von PLD2 auf kardiale Prozesse 21 Tage nach akutem MI

In den letzten Kapiteln haben wir uns auf die Analyse der Prozesse akut nach MI in der inflammatorischen Phase konzentriert. Auch in der proliferativen und regenerativen Phase ist die Messung von Herzfunktion und Thrombozytenaktivität notwendig, um herauszufinden, ob langfristige Veränderungen durch die PLD2 entstehen. Außerdem bildet sich in der proliferativen Phase und in der Reifungsphase die Narbe im Myokard, die ebenfalls im Hinblick auf Größe und Qualität analysiert wurde, um den Einfluss von PLD2 messen zu können.

3.6.1 Unveränderte Herzfunktion in PLD2-defizienten Mäusen 21 Tage nach akutem MI

Die Messung der Herzfunktion 21 d nach MI erfolgte mittels Echokardiografie. Zur Repräsentation der Pumpfunktion des linken Ventrikels analysierten wir folgende Parameter: EF, CO, FS und SV. Bei keinem der gemessenen Parameter zeigte sich ein Unterschied zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen (Abb. 19).

Ergebnisse

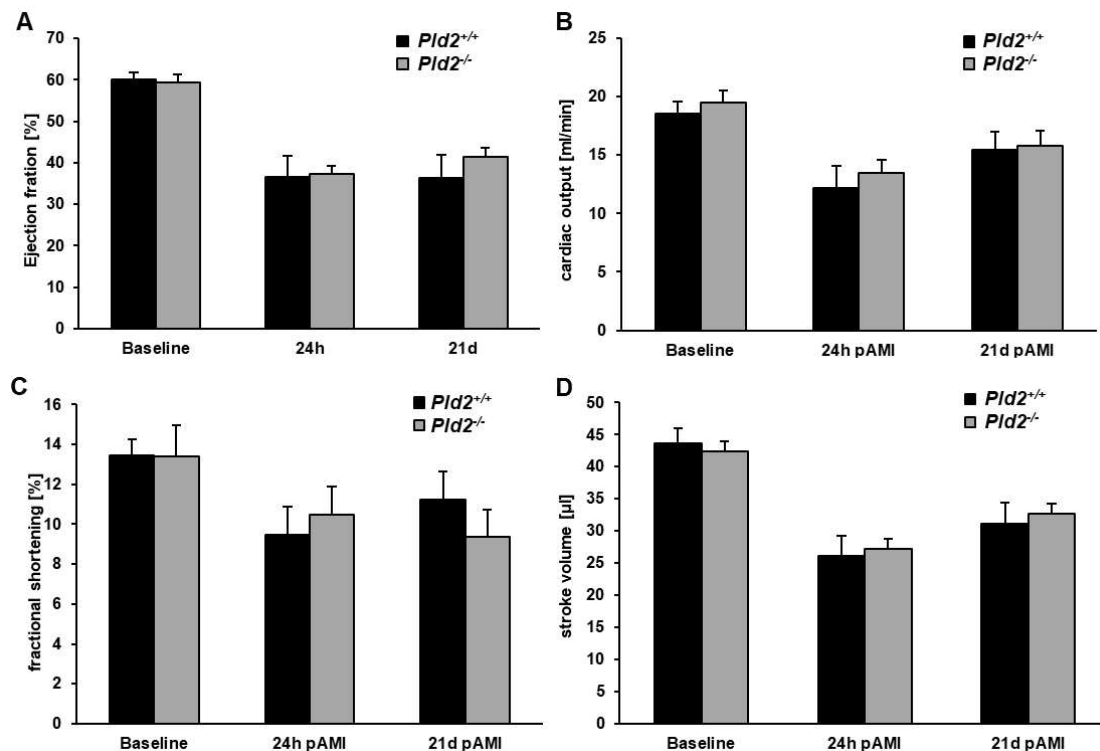


Abb. 19: Kein Unterschied in der Herzfunktion zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen 21 d nach MI
Die mittels Echokardiografie ermittelte Herzfunktion 21 d nach MI zeigte im Vergleich von *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen keinen signifikanten Unterschied. Beispielfhaft sind die Parameter (A) *ejection fraction*, (B) *cardiac output*, (C) *fractional shortening* und (D) *stroke volume* dargestellt, n = 6. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM. Abb. 19 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2].

3.6.2 Unveränderte TGF-β Ausschüttung in PLD2-defizienten Mäusen 21 d nach MI

In der Analyse von TGF-β konnte 21 d nach MI kein Unterschied in der Plasmakonzentration zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen festgestellt werden (Abb. 20).

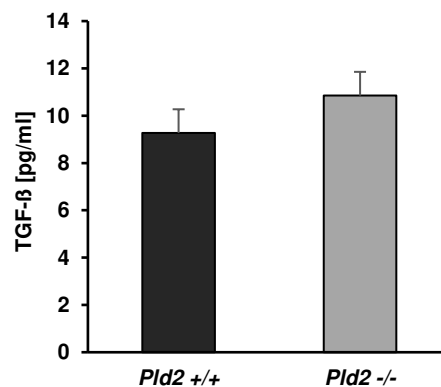


Abb. 20: Analyse des anti-inflammatorischen Zytokins TGF-β 21 d nach MI
Mittels ELISA wurde das anti-inflammatorische Zytokin TGF-β im Blut der Mäuse 21 d nach MI quantitativ bestimmt, n = 4-6. Es konnte kein Unterschied in der TGF-β Ausschüttung zwischen PLD2-defizienten Mäusen und dem wt festgestellt werden. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM. Abb. 20 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

3.6.3 PLD2 hat keinen Einfluss auf die Narbenbildung 21 d nach MI

Um die Narbengröße 21 d nach MI zu bestimmen, wurden die Herzschnitte mit der Gomori-Trichrom-Färbung gefärbt und anschließend der aus kollagenhaltigen Fasern bestehende Teil in Relation zum gesunden Myokard gesetzt. Dabei war die Narbengröße bei PLD2-defizienten und Kontrollmäusen vergleichbar groß (Abb. 21)

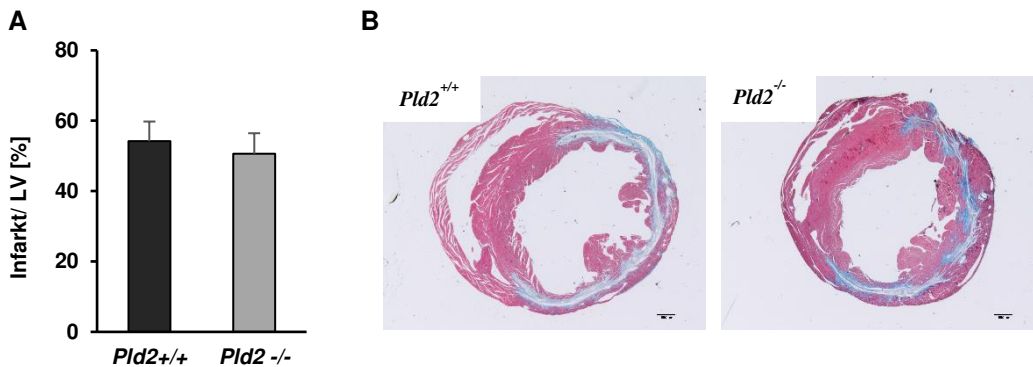


Abb. 21: Bestimmung der Narbengröße 21 d nach MI mittels Gomori-Trichrom-Färbung

Mit Hilfe der Gomori-Trichrom-Färbung konnte das kollagenhaltige Narbengewebe auf Schnitten der 21 d nach MI entnommenen murinen Herzen angefärbt werden, $n = 6$. Hierbei zeigten die *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäuse keinen Größenunterschied der Infarktnarben. (A) Statistische Auswertung und (B) repräsentative Bilder, Maßstabsbalken $\pm 1000 \mu\text{m}$. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM. Abb. 21 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

Eine detailliertere Analyse des Narbengewebes konnte über die Siriusrotfärbung erfolgen. Der Anteil an interstitiellem Kollagen zeigte zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 22 A, B). Der Anteil an dichtem und feinem Kollagen zeigte in PLD2-defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls keinen Unterschied (Abb. 22 C-D).

Ergebnisse

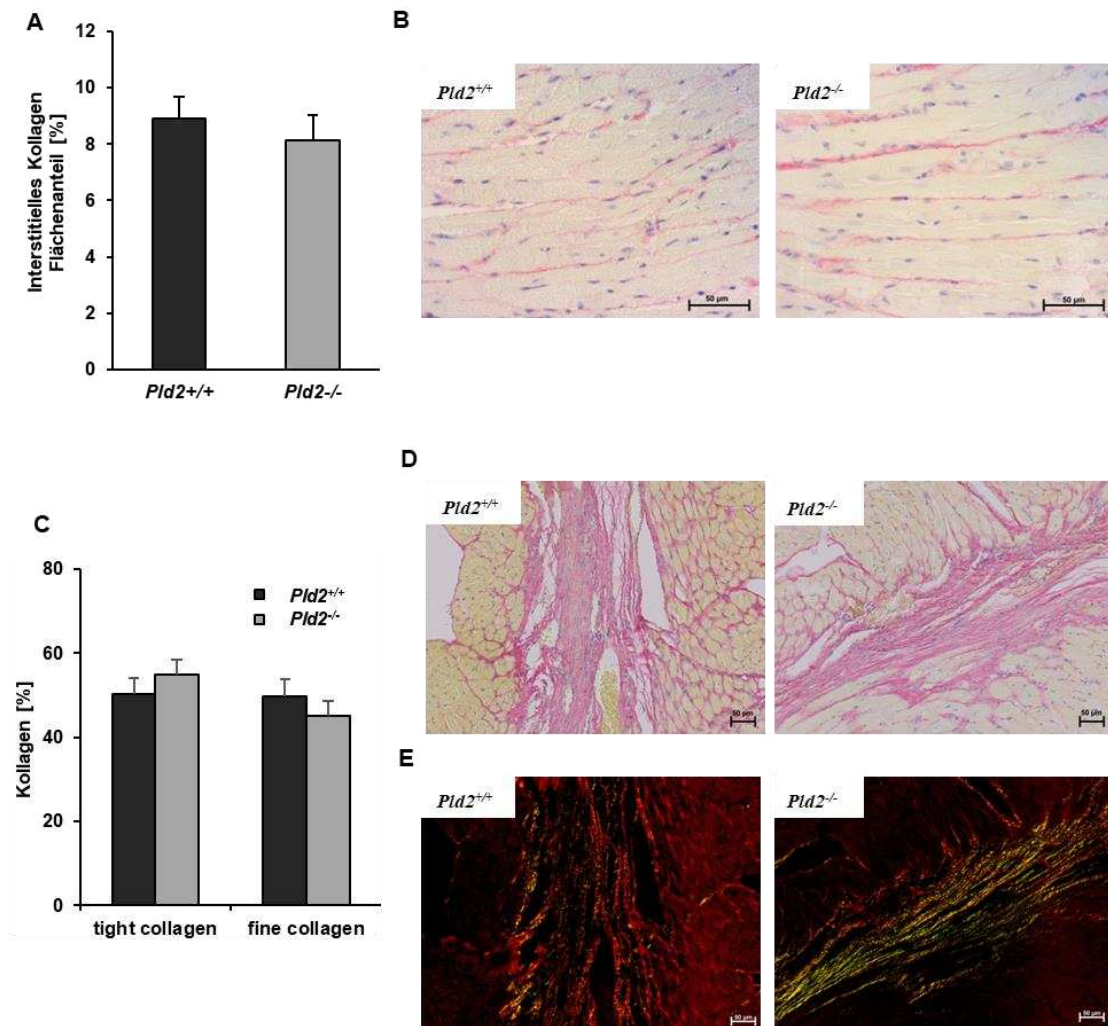


Abb. 22 Analyse der Kollagenqualität als Marker für das Gewebe Remodeling

Durch die Siriusrotfärbung konnte auf Gewebeschnitten der 21 d nach MI entnommenen Herzen das Narbengewebe genauer analysiert werden, $n = 6$. Mittels Durchlichtmikroskopie konnte das angefärbte interstitielle Kollagen untersucht werden. Die quantitative Analyse ergab dabei keinen Unterschied zwischen PLD2-defizienten Tieren und dem wt. (A) Statistische Auswertung und (B) repräsentative Bilder, Maßstabsbalken $\triangleq 50 \mu\text{m}$. Durch Betrachtung mit polarisiertem Licht konnten Unterschiede der Kollagenqualität identifiziert werden. Dabei zeigten die Genotypen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} keinen signifikanten Unterschied bei der Menge der untersuchten Kollagentypen. (C) Statistische Auswertung und (D, E) repräsentative Bilder. Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM. Abb. 22 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

Nachdem 4 h nach MI eine signifikant erhöhte Aktivierung von Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ der Thrombozyten aus *Pld2*^{-/-} Mäusen gemessen werden konnte (s. 3.2.1), wurde mit der gleichen Methode die Thrombozytenaktivierung 21 d nach MI gemessen. Nach Inkubation der murinen Blutproben mit Thrombozytenagonisten konnte, wie schon 24 h nach MI, kein Unterschied in der Aktivierung von Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ und der Exposition von P-Selektin zwischen PLD2-defizienten und wt Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 23).

Ergebnisse

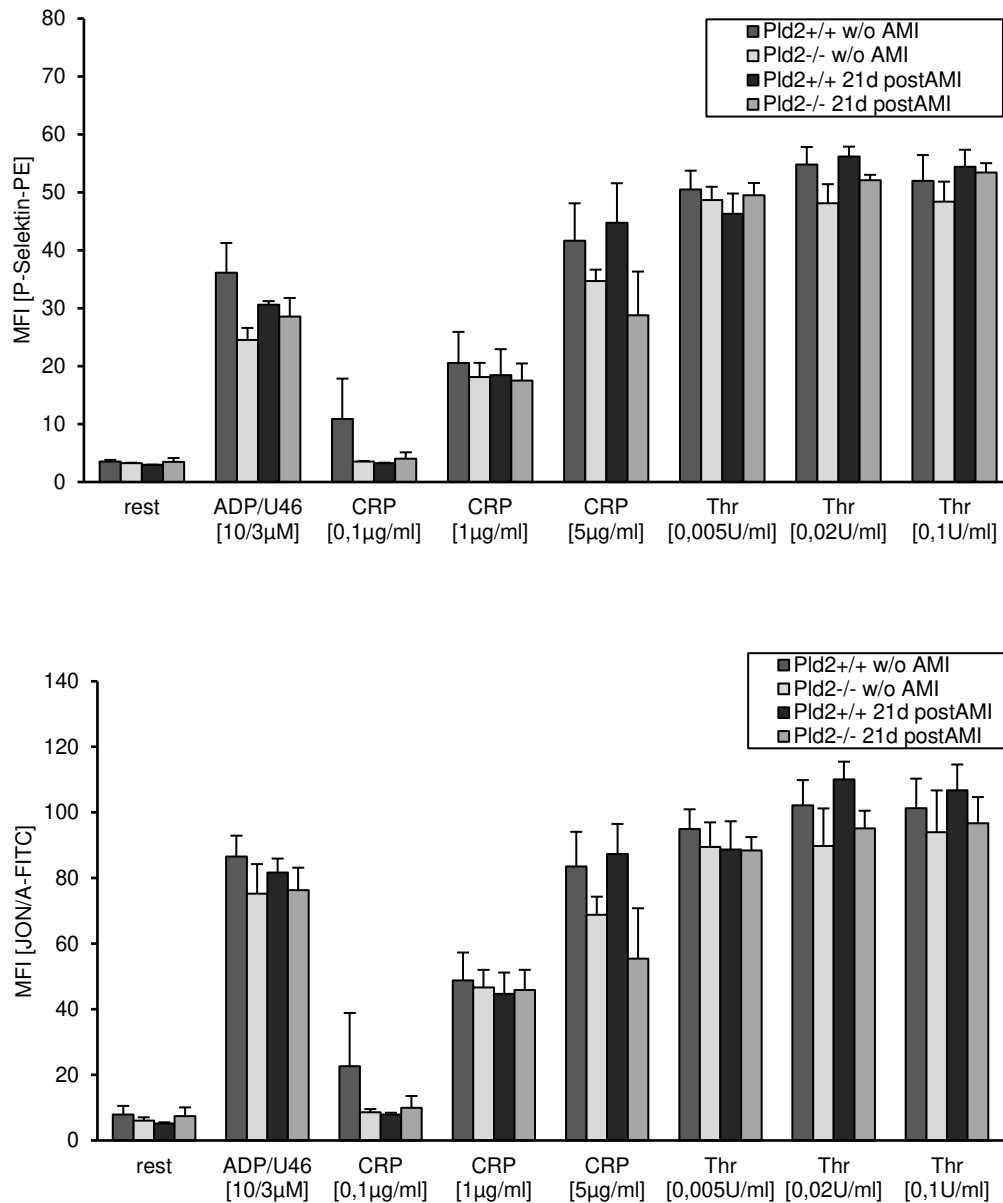


Abb. 23: Durchflusszytometrische Analyse der Thrombozytenaktivierung 21 d nach MI

Mittels Durchflusszytometrie kann die Exposition von P-Selektin und die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ gemessen werden. Diese dienen als Maß für die Thrombozytenaktivierung. Das Blut der Versuchstiere wurde, zusätzlich zu den in Abb. 11 gezeigten Zeitpunkten, auch 21 d nach MI mit Thrombozytenagonisten in verschiedenen Konzentrationen inkubiert und die o.g. Parameter durchflusszytometrisch gemessen, $n = 6$. Die statistische Auswertung erfolgte mittel zweiseitigem *Student's t-test*, MW + SEM. Abb. 23 modifiziert publiziert in Klose *et al.* [2]

4 Diskussion

Ischämische Herzerkrankungen stellen weltweit die häufigste Todesursache dar. Der MI nimmt hierbei aufgrund seiner Häufigkeit und hohen Mortalität eine zentrale Position ein. Zur langfristigen Verbesserung der Prognose wird stetig nach neuen Therapieoptionen gesucht, wobei u.a. die Beeinflussung der postischämischen myokardialen Inflammation, der Infarktgröße und des *Remodelings* besonders in den Fokus gerückt sind [89]. In dieser Arbeit untersuchten wir den Einfluss von PLD2 auf myokardiale und systemische Prozesse nach akutem MI. Hierbei konnten wir in PLD2-defizienten Mäusen 1. eine vermehrte Zelleinwanderung in die Infarktzone 24 h nach MI, 2. eine erhöhte Aktivierung der Thrombozyten 4 h nach MI, 3. eine erhöhte IL-6 Ausschüttung aus Endothelzellen und 4. einen erniedrigten TGF- β Plasmaspiegel 72 h nach MI nachweisen.

Der Wirkmechanismus der PLD1 in systemischen und kardialen Prozessen nach MI ist bereits in vielen Arbeiten untersucht worden. Unklar war bisher die Rolle der PLD2 auf die systemische und myokardiale Inflammation, die Aktivierung von Thrombozyten, das *Remodeling* und die Herzfunktion nach MI. In dieser Arbeit haben wir daher diese Prozesse im experimentellen Mausmodell untersucht und neue Erkenntnisse zur Rolle der PLD2 gewinnen können. Diese ergänzen das bisherige Wissen über den Einfluss von PLD auf die postischämischen Prozesse und liefern neue Anhaltspunkte für nachfolgende Arbeiten. Insbesondere die Auswirkung der PLD2 auf die Thrombozytenaktivierung und die Inflammation können - auch unabhängig des MI - wichtige Anhaltspunkte für weitere Forschungsansätze bieten.

4.1 Expression der PLD-Isoformen im Myokard nach MI

Schon 1991 zeigten Moraru *et al.*, dass die PLD-Aktivität in Mausherzen nach MI erhöht ist. Dabei wurde durch Bestimmung des enzymatischen Endproduktes der PLD, PA, lediglich die PLD-Gesamtaktivität gemessen, PLD1 und PLD2 jedoch nicht voneinander differenziert betrachtet [90]. In der vorliegenden Arbeit konnten wir eine Erhöhung der PLD1-Expression 24 h nach MI im infarzierten Myokard nachweisen (Abb. 5). Dies entspricht den Ergebnissen von Schönberger *et al.* [78]. Wir untersuchten zum gleichen Zeitpunkt die Expression der PLD2 im infarzierten Myokard von Wildtyp und *Pld2*^{-/-} Mäusen. Hierbei konnten wir in Wildtyp Mäusen eine erhöhte PLD2-Expression 24 h nach MI messen. Im Herzgewebe von PLD2-defizienten Mäusen konnten wir, wie

erwartet, zu keinem Zeitpunkt PLD2 nachweisen. Im Wildtyp konnten wir auf der mRNA-Ebene mittels qRT-PCR eine erniedrigte *Pld2*-Expression 24h nach MI im Vergleich zu naiven Mäusen messen. Die Proteinexpression von PLD2 war zum selben Zeitpunkt erhöht. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisdiskrepanz könnten weitere Untersuchungen posttranskriptionaler Veränderungen sowie die Untersuchung beider Zielvariablen zu früheren Zeitpunkten liefern, um mögliche frühere transiente Hochregulationen der entsprechenden RNA zu analysieren. Die Funktionen, die durch die PLD2 erfüllt werden, werden letztlich auf Proteinebene erfüllt, sodass der Nachweis des Proteins relevant für den Einfluss der PLD2 auf die weiteren zellulären Prozesse nach MI ist. Dent *et al.* untersuchten bei Ratten die Genexpression von *Pld1* und *Pld2* in der myokardialen Narbe nach MI [91]. Darin zeigte sich im Narbengewebe eine erhöhte Expression beider PLD-Isoformen. Interessanterweise konnte aber eine Erhöhung des PLD2-Proteinlevels und folglich der PLD2-Aktivität gemessen werden, die bei PLD1 nicht messbar war [91]. In beiden Fällen konnte auf mRNA-Ebene keine *Pld2*-Erhöhung nachgewiesen werden, auf Proteinebene zeigte sich aber eine vermehrte PLD2-Expression. Auch in diesem Fall kann diese Diskrepanz daran liegen, dass zum Messzeitpunkt die mRNA bereits transkribiert ist, bzw. dass nicht untersuchte posttranskriptionale Einflüsse auf die resultierende Proteinexpression vorliegen. Wir können schlussfolgern, dass sowohl im infarzierten Gewebe 24 h nach MI als auch in der zu einem späteren Zeitpunkt entstehenden myokardialen Narbe eine erhöhte PLD2-Expression nachgewiesen werden konnte.

4.2 Rolle der PLD Isoformen in der Thrombozyten-vermittelten Inflammation

Zur PLD1 und ihrer Rolle in der Inflammation nach MI existieren bereits vielzählige Arbeiten. TNF- α spielt über verschiedene Signalwege eine Rolle in der Inflammation und der Gewebeveränderung im Myokard nach MI [92, 93]. In PLD1-defizienten Mäusen konnte nach MI eine erniedrigte TNF- α -Serumkonzentration sowie eine geringere Zelleinwanderung in die Infarktzone gemessen werden als im Wildtyp [78]. Einer der bekannten Signalwege erfolgt über die Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2, die bei PLD1-Defizienz reduziert ist [76, 77]. Klier *et al.* zeigten, dass die reduzierte Zelleinwanderung auf der enzymatischen Aktivität der PLD basiert, wohingegen TNF- α PLD-unabhängig reguliert wird [85]. Bei mit dem PLD-Inhibitor FIPI behandelten Mäusen war die Zelleinwanderung in die Infarktzone ebenfalls verringert, der TNF- α -

Spiegel aber war im Vergleich zu unbehandelten Tieren unverändert. In PLD1/PLD2-doppeldefizienten Mäusen konnte dies bestätigt werden – auch bei diesen Tieren war die TNF- α -Serumkonzentration nach MI deutlich erniedrigt [85]. In diesen Studien wurde jedoch die Frage, welche Auswirkungen ein isolierter *knock-out* der PLD2 auf die myokardiale und systemische Inflammation nach MI hat, nicht behandelt. In der vorliegenden Arbeit konnten wir feststellen, dass PLD2 in den von uns analysierten Prozessen anti-inflammatorisch wirkt. Damit wirkt PLD2 gegensätzlich zur proinflammatorisch wirkenden PLD1. In *Pld2*^{-/-} Mäusen konnten wir 24 h nach MI eine erhöhte Zelleinwanderung in das infarzierte Myokard sowie eine erhöhte IL-6-Konzentration im Serum feststellen (Abb. 6, Abb. 7). Sowohl lokal als auch systemisch reguliert somit die PLD2 die akute Inflammation nach MI. Erniedrigte Zytokinspiegel führen zu einer reduzierten Zelleinwanderung in die Infarktzone. Je weniger Leukozyten infolgedessen in das infarzierte Myokard eingewandert sind, desto weniger Zytokine können von diesen wiederum ausgeschüttet werden. Zytokine werden nicht nur von Leukozyten, sondern auch von anderen Zelltypen ausgeschüttet. In einem *in vitro*-Versuch konnten wir eine erhöhte IL-6-Ausschüttung aus Endothelzellen messen, die mit PLD2-defizienten Thrombozyten inkubiert worden waren, im Vergleich zu Endothelzellen, welche mit Thrombozyten aus Wildtyp Mäusen inkubiert worden waren (Abb. 12). Dies deutet darauf hin, dass eine fehlende PLD2-gesteuerte Kontrolle der Thrombozyten-abhängigen Endothelaktivierung zu erhöhter Zytokinausschüttung und damit zu einer verstärkten lokalen Inflammation führt. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass PLD2 eine gegensätzliche Rolle zur PLD1 im Inflamationsprozess spielen könnte. Wir konnten in dieser Arbeit Hinweise dafür finden, in welcher Weise und über welche Wege die Inflammation über PLD2 gesteuert wird. Weitere Versuche mit PLD2-defizienten Mäusen, auch im direkten Vergleich mit PLD1/PLD2-doppeldefizienten Mäusen und PLD1-defizienten Tieren sind nötig, um die Signalwege und das Zusammen- bzw. Gegenspiel von PLD1 und PLD2 besser zu verstehen und insbesondere die Effektorwege der unterschiedlichen Vorgänge zu charakterisieren.

4.2.1 Einfluss der PLD2 auf die Migration von Leukozyten in die Infarktzone in der akuten Phase nach MI

In *Pld2*^{-/-} Mäusen konnten wir 24 h nach MI eine erhöhte Zelleinwanderung in das infarzierte Myokard im Vergleich zum Wildtyp feststellen, ohne dabei eine Erhöhung der

Anzahl an neutrophilen Granulozyten zu detektieren (Abb. 6). Obwohl neutrophile Granulozyten die größte Zellpopulation darstellen, die akut im Inflammationsprozess mobilisiert werden [15], ist es möglich, dass es sich hier um einen größeren Anteil an anderen Leukozyten, beispielsweise Makrophagen, handelt. Eine spezifische Färbung dieser Zellpopulation und ggfs. auch weiterer Leukozytenpopulationen wäre eine mögliche Herangehensweise, um die eingewanderten Zellen genauer zu differenzieren.

In einer Arbeit von Speranza *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass eine Reduktion der PLD2-Expression auf RNA- und Proteinebene und die konsekutiv verminderte PLD2-Aktivität zu geringerer chemotaktischer Aktivität von Makrophagen führt [94]. Eine Erklärung für diesen Unterschied zu unserem Ergebnis kann im unterschiedlichen Versuchsaufbau liegen. Bei Speranza *et al.* wurde die chemotaktische Fähigkeit der Makrophagen mittels *cell migration assays* gemessen. Im Gegensatz dazu ist es durch unser verwendetes Tiermodell möglich, die Prozesse nicht isoliert, sondern im Zusammenhang mit ihrer vollständigen biologischen Umgebung zu untersuchen. Die Hemmung der PLD2 erfolgte bei Speranza *et al.* nicht über ein *knock-out* des entsprechenden Gens, sondern über Rac-2, welches die Lipaseaktivität der PLD2 hemmt. Um diese Ergebnisse, die auf einer enzymatischen Blockade und nicht auf einem konstitutiven *knock-out* der PLD2 basieren, vergleichen zu können, wäre es interessant die Versuche von Speranza *et al.* mit dem pharmakologischen Inhibitor FIPI, der die enzymatische Aktivität der PLD1 und der PLD2 hemmt, durchzuführen. Damit wäre ein direkter Vergleich der Effekte, die eine isolierte enzymatische Blockade der PLD2 mit der enzymatischen Blockade beider Isoformen möglich. In einem Mausmodell der *acute lung injury* (engl.: akute Lungenschädigung) konnte 24 h nach Verletzung der Lunge durch Einführen von Salzsäure in den linken Hauptbronchus bei *Pld2*^{-/-} Mäusen eine signifikante Steigerung der Anzahl eingewanderter neutrophiler Granulozyten und Makrophagen in das Lungengewebe, sowohl im Vergleich zu *Pld2*^{+/+} Mäusen als auch im Vergleich zu *Pld1*^{-/-} Mäusen, nachgewiesen werden [80]. Dies führte zu einer geringeren Gewebeschädigung der Lunge bei PLD2-defizienten Mäusen. Die in *Pld2*^{-/-} Mäusen verstärkte Differenzierung von Makrophagen führte zu einer erhöhten Zytokinausschüttung [80]. Die Methoden von Abdulnour *et al.* ähnelten im Wesentlichen den in unserer Arbeit verwendeten: Gewebeverletzung im Mausmodell, Verwendung von *knock-out* Mäusen und mikroskopische Quantifizierung der Zelleinwanderung in das geschädigte Gewebe. Damit konnten sie - kongruent zu den Erkenntnissen aus unserer

Arbeit – eine Zunahme der Zelleinwanderung in das betroffene Gewebe in PLD2-defizienten Mäusen nach einem inflammatorischen Stimulus nachweisen. Dies weist erneut auf eine inflammationsregulierende Rolle der PLD2 im betroffenen Gewebe nach Ischämie hin. Der Mechanismus dieses Effekts, insbesondere im Rahmen myokardialer Ischämie, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.2.2 Rolle der PLD2 bei der Integrinaktivierung und IL-6 Sekretion aus Endothelzellen nach MI

Bei systemischen Entzündungsreaktionen ist die Gerinnung ein wichtiger Modulator. Die disseminierte intravasale Gerinnung führt zu Organschäden und ist damit maßgeblich für die Letalität der Sepsis verantwortlich [95]. PLD1-defiziente Mäuse zeigten einen Defekt in der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung, der auf die fehlende Produktion von PA zurückzuführen war [71]. Im murinen Sepsismodell führte dies zu einem verbesserten Überleben von *Pld1*^{-/-} Mäusen [77]. Auch bei zerebraler Ischämie und arterieller Thrombose hatten PLD1-defiziente Mäuse einen Überlebensvorteil gegenüber dem Wildtyp. PLD2 konnte von Elvers *et al.* als negativer Regulator der Thrombozytenfunktion identifiziert werden [96]. Die Sekretion der δ -Granula und damit die Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung war sowohl in mit FIPI behandelten Mäusen des Wildtyps als auch in mit FIPI behandelten *Pld1*^{-/-} Mäusen erhöht, sodass geschlossen werden konnte, dass die erhöhte Thrombozytenaktivierung durch die enzymatische Blockade der PLD2 hervorgerufen wurde und PLD2 damit die Thrombozytenaktivierung hemmt [96]. Wir konnten 4 h nach MI in *Pld2*^{-/-} Mäusen eine erhöhte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp messen (Abb. 11). Außerdem zeigte sich eine erhöhte IL-6 Ausschüttung aus Endothelzellen in *Pld2*^{-/-} Mäusen (Abb. 12). Daher gehen wir davon aus, dass PLD2 über die Stimulation des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu einer erhöhten Thrombozytenaktivierung führt und damit die IL-6-Ausschüttung aus Endothelzellen fördert. Um eine direkte Stimulation der Endothelzellen durch die Thrombozytenagonisten auszuschließen, führten wir einen Kontrollversuch durch und behandelten Endothelzellen *in vitro* nur mit den Agonisten. Danach konnten wir keine erhöhten IL-6-Spiegel messen (Abb. 12), sodass sich schlussfolgern lässt, dass die erhöhte IL-6 Ausschüttung aus den Endothelzellen direkt durch die aktivierten Thrombozyten vermittelt wird. Beide PLD-Isoformen wirken also über Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf die Thrombozytenaktivierung. In der Arbeit von Thielmann *et al.* bestand bei naiven Versuchstieren kein Unterschied in der Thrombozytenaktivierung zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen [73]. In unserer Arbeit konnten wir feststellen, dass

PLD2 nach MI Einfluss auf die Aktivierung der Thrombozyten nimmt. Weitere Versuche im Mausmodell mit anderen Stimuli, z.B. durch LPS induzierte Sepsis oder Schlaganfall sind notwendig, um die Rolle der PLD2 in der Thrombozytenaktivierung weitergehend zu untersuchen.

4.2.3 Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten in Abhängigkeit von PLD2

Die medikamentöse Thrombozytenfunktionshemmung im Rahmen der koronaren Herzkrankheit soll eine Thrombusbildung und damit einen koronaren Verschluss vermeiden [97]. Inzwischen ist bekannt, dass die Thrombozytenfunktionshemmung, z.B. mit Acetylsalicylsäure, gleichzeitig antiinflammatorisch wirkt [98, 99]. Über Leukozyten-Thrombozytenaggregatbildung sowie über die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine beeinflussen die Thrombozyten die Inflamationsprozesse [100]. Bombeli *et al.* beschreiben die Schlüsselrolle von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ für die Bindung von Thrombozyten am unverletzten Endothel [101]. Dass Thrombozyten eine führende Rolle in der systemischen und inflammatorischen Antwort nach MI spielen, zeigten Liu *et al.* in ihrer Arbeit, indem sie eine Reduktion der Inflammation nach MI bei Mäusen, die die Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel und Prasugrel erhalten hatten, feststellten [63]. Die Hemmung des Kollagenrezeptors GPVI auf Thrombozyten führte zu einer Reduktion der Infarktgröße 24 h nach MI, zu einer reduzierten Leukozyteneinwanderung in das infarzierte Myokard [102], zu einer verringerten Degranulation von Thrombozyten, zu einer erniedrigten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und dem Erhalt der linksventrikulären Pumpfunktion nach MI [103].

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die IL-6-Ausschüttung nach MI von den Thrombozyten über das Endothel mitbeeinflusst wird. Während die IL-6-Erhöhung im Serum der Mäuse nach MI durch die PLD2-abhängige Thrombozyten-Endothel-Interaktion beeinflusst war, konnte ein direkter Effekt auf die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten nicht beobachtet werden (Abb. 10). In PLD1-defizienten Mäusen sowie in PLD1/PLD2-doppeldefizienten Mäusen bestand bei der Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten ebenfalls kein Unterschied zum Wildtyp [85]. Ein Einfluss von PLD1 auf die Degranulation der α -Granula und damit auf die P-Selektin-Exposition konnte nicht festgestellt werden [71]. Auch bei der Untersuchung der PLD2

konnten wir in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss der PLD2 auf die P-Selektin-Exposition nach MI feststellen. Jedoch zeigen unsere Ergebnisse, dass PLD2 über die Modulation der Aktivität des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ die Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen wie auch die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten beeinflusst. Für die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten ist auch das thrombozytäre P-Selektin von großer Bedeutung, das mit PSGL-1 auf Leukozyten interagiert und damit zur direkten Rezeptor-vermittelten Interaktion beider Zellen führt [54]. Die P-Selektin-Exposition auf Thrombozyten konnten wir mit Hilfe der Durchflusszytometrie zu verschiedenen Zeitpunkten nach MI bestimmen und keinen Unterschied zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen feststellen (Abb. 11, Abb. 23). Es ist denkbar, dass die Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten nicht erhöht ist, da PLD2 nur die Integrinaktivierung und nicht die P-Selektin-Exposition beeinflusst. Da aber die Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ ebenfalls zu einer rezeptorvermittelten Interaktion beider Zelltypen führt, ist dieser Erklärungsansatz nicht ausreichend. Wir gehen derzeit davon aus, dass die erhöhte Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ nicht ausreicht, um zu einer vermehrten Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten zu führen. Weitere Experimente müssten folgen, um die Gründe für die ausbleibende Aggregatbildung genauer zu analysieren.

4.3 Bedeutung der PLD2 für zelluläre Prozesse in der Sepsis

Die Sepsis ist definiert als eine dysregulierte Immunreaktion eines Organismus auf einen inflammatorischen Stimulus, die mit lebensbedrohlichen Organdysfunktionen einhergeht [104]. Zwischen der Sepsis, die eine bestimmte Form der systemischen Inflammation darstellt und der systemischen Inflammationsreaktion nach MI gibt es einige Parallelen. Die Ausschüttung von akute-Phase-Zytokinen, die Migration von Leukozyten und die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Stimuli spielen eine wichtige Rolle in beiden Erkrankungen. Die Rolle der PLD1 und PLD2 in experimentellen Sepsismodellen der Maus ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden. Urbahn *et al.* untersuchten im Mausmodell die Auswirkungen der PLD1-Defizienz auf eine durch LPS induzierte Sepsis und konnten ein erhöhtes Überleben der PLD1-defizienten Mäuse feststellen. Nach LPS-induzierter Sepsis konnten in *Pld1*^{-/-} Mäusen verminderte Serumlevel von TNF- α und IL-6 gemessen und eine reduzierte Migration von neutrophilen Granulozyten in die Lunge festgestellt werden. Als maßgebliche Ursache für das erhöhte Überleben bei *Pld1*^{-/-} Mäusen wird hierbei die Reduktion von TNF- α beschrieben [77]. Lee *et al.*

untersuchten im Mausmodell die Rolle der PLD2 in der Sepsis [81]. Wie auch in *Pld1*^{-/-} Mäusen von Urbahn *et al.* gemessen, konnten Lee *et al.* in *Pld2*^{-/-} Mäusen nach induzierter Sepsis einen erniedrigten TNF- α Serumspiegel messen. Die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge septischer Mäuse zeigte sich bei PLD2-defizienten Mäusen erhöht [81] und ist somit gegensätzlich zu den Ergebnissen zur PLD1. Ursächlich dafür ist die durch die PLD2 verursachte erhöhte Expression des auf neutrophilen Granulozyten befindlichen Chemokinrezeptors CXCR2. Die erhöhte Migration neutrophiler Granulozyten in die Lunge wurde als ursächlich für das verbesserte Überleben – quantifiziert als Lebenstag pro Maus - bei *Pld2*^{-/-} Mäusen gewertet [81]. Die Zusammenfassung der aktuell vorhandenen Literatur verdeutlicht, dass nicht ein einzelner Mechanismus für das verbesserte Überleben verantwortlich ist. In jedem Fall scheint jedoch die Zytokinausschüttung eine maßgebliche Rolle zu spielen. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit differenzierten Hwang *et al.* erstmals unterschiedliche Aktivierungswege von PLD1 und PLD2 in der Inflammation. LPS führt über Bindung an TLR4 zur Aktivierung von PLD1 und stimuliert damit die Inflammation. IL-4 führt über Bindung an IL-4R zur Aktivierung von PLD2 und gibt damit einen anti-inflammatorischen Stimulus und führt zum Geweberemodeling [84]. Im Gegensatz zu Lee *et al.* konnten Hwang *et al.* somit keinen protektiven Effekt, sondern eine inflammationsstimulierende Wirkung von PLD2-Defizienz nachweisen [84]. Auch in diesem Fall führen unterschiedliche experimentelle Methoden und Mausmodelle möglicherweise zu den unterschiedlichen Ergebnissen. Hwang *et al.* konnten außerdem feststellen, dass bei Blockade der PLD2 auch die Rekrutierung regulatorischer T-Zellen, die eine Schlüsselrolle in der anti-inflammatorischen Antwort spielen, abgeschwächt wird [84]. Dies stellt einen weiteren Erklärungsansatz für die verstärkte Inflammation in PLD2-defizienten Mäusen dar. Die Differenzierung der Lymphozytenpopulationen wäre für zukünftige Arbeiten von Bedeutung, um herauszufinden, ob es auch in der postischämischen myokardialen Schädigung einen Zusammenhang zwischen PLD2 und einer bestimmten Untergruppe der Lymphozyten, z.B. der regulatorischen T-Zellen gibt. Eine Untersuchung unserer Fragestellung von dieser immunologischen Seite aus ist bisher nicht erfolgt.

4.4 Einfluss der PLD2 auf die TGF- β Plasmaspiegel in verschiedenen Phasen nach MI

TGF- β beeinflusst als anti-inflammatorisches Zytokin, das u.a. die Differenzierung pro-inflammatorisch wirkender Makrophagen hemmt, verschiedene zelluläre Prozesse nach MI [20]. Unsere Daten zeigen, dass TGF- β 72 h nach MI in *Pld2*^{-/-} Mäusen signifikant erniedrigt ist (Abb. 8). Dieser Effekt ist 21 d nach MI nicht mehr messbar (Abb. 20). Es gibt also in der akuten Phase nach MI einen Unterschied zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen, der zu dieser Veränderung der TGF- β Ausschüttung führt. Thrombozyten sind in der akuten Phase nach MI maßgeblich an der Ausschüttung von TGF- β beteiligt [105]. Unmittelbar nach MI konnten wir in PLD2-defizienten Mäusen eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Thrombozytenaktivierung messen. Dies ist möglicherweise die Ursache für die reduzierte TGF- β -Ausschüttung in der akuten Phase nach MI. Wir gehen derzeit davon aus, dass es in PLD2-defizienten Mäusen durch eine verstärkte Integrinaktivierung, nicht nur zu gesteigerter Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, sondern auch zu einer reduzierten Ausschüttung anti-inflammatorischer Zytokine wie TGF- β kommt. Die erhöhte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 könnte in der akuten Phase nach MI die TGF- β Ausschüttung gehemmt haben. TGF- β reguliert u.a. über Makrophagen den Übergang von der akuten inflammatorischen Phase in die folgende proliferative Phase und das *Remodeling* und wirkt somit anti-inflammatorisch [105]. Es ist daher ebenfalls denkbar, dass der erniedrigte TGF- β -Spiegel in der akuten Phase nach MI zu der erhöhten inflammatorischen Antwort in PLD2-defizienten Mäusen beigetragen hat. Es ist anzunehmen, dass die genannten Mechanismen nebeneinander ablaufen und sich gegenseitig begünstigen.

In der auf die akute Phase nach MI folgende proliferative und *Remodeling*-Phase fördern Makrophagen und Fibroblasten die Ausschüttung von TGF- β und führen zu einer anhaltenden Hochregulation des Zytokins über die Dauer des kardialen *Remodelings*. TGF- β stimuliert in diesen Phasen die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und die Synthese von extrazellulärer Matrix [105, 106]. Myofibroblasten sind im Gegensatz zu Fibroblasten kontraktile Zellen, die α -SMA exprimieren und extrazelluläre Matrixproteine sekretieren [107]. Während des kardialen *Remodelings* konnten wir im Vergleich zur akuten Inflammationsphase keine erhöhte Thrombozytenaktivierung bei PLD2-defizienten Mäusen feststellen. Wir gehen derzeit

davon aus, dass die TGF- β Ausschüttung in der frühen Phase nach MI maßgeblich von den Thrombozyten beeinflusst wird.

In Thrombozyten depletierten Mäusen konnte 21 d nach MI eine erhöhte TGF- β Sekretion sowie ein erhöhter Anteil an α -SMA positiven Zellen gemessen werden [108]. Außerdem war die Narbengröße bei diesen Versuchstieren verringert und die Kollagenqualität im Vergleich zu nicht-depletierten Mäusen verbessert [108]. Auch im nicht-infarzierten Myokard, konnte durch die Thrombozytendepletion eine Gewebeveränderung im Sinne eines erniedrigten Anteils an interstitiellem Kollagen im Vergleich zu nicht depletierten Mäusen festgestellt werden [108]. Ein erhöhter TGF- β -Spiegel führt demnach zu einer kleineren Narbe und besserer Narbenbildung nach MI. Darüber hinaus konnten Reusswig *et al.* bei diesen Tieren eine verbesserte Herzfunktion messen [108]. Die Thrombozytendepletion bei Mäusen in der *Remodeling*-Phase hat somit über die erhöhte TGF- β -Sekretion und die damit verbundene erhöhte Expression α -SMA positiver Myofibroblasten zu einer verbesserten Herzfunktion in Mäusen nach MI geführt [108]. Wir konnten keinen Unterschied bei der Narbengröße, der Kollagenqualität der Narbe, dem Anteil an interstitiellem Kollagen im Myokard oder der Herzfunktion von *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen 21 d nach MI feststellen. Auch der TGF- β -Spiegel im Blut von *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen 21 d nach MI zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 20). Die 21 d nach MI von uns gemessene unveränderte Thrombozytenaktivierung spielt sicherlich eine Rolle und führt zumindest partiell dazu, dass auch die TGF- β -Ausschüttung zu diesen Zeitpunkten unbeeinflusst bleibt. Allerdings haben auch Fibroblasten, Myofibroblasten und Makrophagen in der *Remodeling*-Phase einen maßgeblichen Einfluss auf die TGF- β -Ausschüttung. Wir gehen davon aus, dass TGF- β als ein wichtiges signalgebendes Zytokin im *Remodeling* maßgeblich Einfluss auf die Narbenbildung nimmt und der unveränderte TGF- β -Spiegel teilweise die unveränderte Narbenbildung erklärt. Weitere Versuche mit beispielsweise der Messung von α -SMA positiven Zellen in der Narbe in der *Remodeling*-Phase nach MI wären notwendig, um genauer zu untersuchen, ob PLD2 einen Einfluss auf das *Remodeling* nimmt.

4.5 Rolle der PLD2 für die Apoptoseaktivität im Myokard von Mäusen nach MI

Bax-, *Bcl-xl*- und *Bcl-2*-Expression wurde in dieser Arbeit als pro- bzw. antiapoptotische Marker im linksventrikulären Myokard mittels qRT-PCR quantifiziert. Ein Unterschied

in der Expression dieser Marker zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen 24 h nach MI konnte nicht festgestellt werden (Abb. 18). Bei enzymatischer Blockade beider PLD-Isoformen mittels FIPI konnte ebenfalls kein Unterschied in der Apoptose im Myokard von Mausherzen nach MI festgestellt werden [85]. Im Gegensatz dazu konnte in verschiedenen Arbeiten bereits gezeigt werden, dass PLD1 und PLD2 die Apoptose beeinflussen. *In vitro* führte PLD2 durch eine Bindung des Aminosäuremotifs LXXLL an Sirtuin-1 zu einer verminderten Expression der pro-apoptotischen Faktoren, was bei PLD1 nicht beobachtet werden konnte [109]. Auch ein anderes *in vitro*-Modell des H₂O₂-induzierten Zelltods identifizierte PLD2, nicht jedoch PLD1, als Suppressor der Apoptose [110]. Bei Brustkrebszellen führte die Inhibition von PLD2 *in vitro* zu einer vermehrten Apoptose, sodass PLD2 bereits als möglicher Angriffspunkt zur Krebstherapie diskutiert wurde [111]. In einem Sepsismodell konnte bei PLD1-defizienten *mouse embryonic fibroblasts* (engl. embryonale Maus-Fibroblasten, MEFs) sowie in Mäusen eine reduzierte Apoptoseaktivität gemessen werden [77]. In diesen Untersuchungen wurde die Caspase 3/7-Aktivität als Indikator für die Apoptoseaktivität in mit LPS stimulierten MEFs bestimmt sowie mittels qRT-PCR aus dem Leberparenchym von Mäusen die Expression von *Bax*, *Bcl-xl* und *Bcl-2* gemessen [77]. In der Sepsis ist die inflammatorische Antwort deutlich verstärkt im Vergleich zu der Inflammation nach MI, sodass die Messzeitpunkte in den o.g. Studien, die die Apoptoseaktivität im septischen Krankheitsmodell untersucht haben, näher am Inflammationsstimulus gewählt wurden. Die Messung der pro- und anti-apoptotischen Marker im Myokard 24 h nach MI – wie in dieser Arbeit durchgeführt – ist nicht ausreichend, um ein umfassendes Bild der Apoptoseaktivität zu erhalten. Für eine detailliertere Untersuchung der Apoptoseaktivität im Myokard nach MI könnte die Caspase-3-Expression im linken Ventrikel gemessen werden. Außerdem wären Messungen der pro- und anti-apoptotischen Marker in Mausherzen zu weiteren Zeitpunkten nach MI interessant, da die Apoptoseaktivität in Mausherzen bis zu einem Monat nach MI anhält [1].

4.6 Einfluss der PLD2 auf Infarktgröße und Herzfunktion in verschiedenen Phasen nach MI

Trotz einiger Unterschiede zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen in den lokalen und systemischen Prozessen nach MI konnten wir keine relevanten Unterschiede in der Infarktgröße und der Herzfunktion zwischen den beiden Gruppen feststellen. In der akuten Phase 24 h nach MI konnte auch im Vergleich zwischen *Pld1*^{+/+} und *Pld1*^{-/-}

Mäusen [78] sowie zwischen mit FIPI-behandelten und -unbehandelten Mäusen [85] kein Unterschied in der Infarktgröße festgestellt werden. Zu einem späteren Zeitpunkt, 28 d nach MI, konnte in PLD1-defizienten Mäusen eine größere Narbe und eine verminderte Herzfunktion gemessen werden [78]. PLD1 führt daher vermutlich nicht zu einer akuten Schädigung des Myokards, sondern greift in die nach I/R vermittelten reparativen/proliferativen Mechanismen ein und verändert so das *outcome* nach MI. Zentral für das Verständnis der Wirkung von PLD1 auf die Prozesse nach MI war die von Schönberger *et al.* festgestellte positive Wirkung der PLD1 auf den TNF- α Spiegel im Serum von Mäusen nach MI [78]. Wie bereits oben beschrieben beeinflusst PLD1 die TNF- α Serumkonzentration durch seine nicht-enzymatischen Eigenschaften. Auch PLD2 wirkt, wenn auch gegensätzlich zur PLD1, auf die Inflammation nach MI. Dennoch spiegelt sich dies nicht in der Infarktgröße oder Herzfunktion wider. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist die fehlende Wirkung von PLD2 auf TNF- α . Dies wird durch die Ergebnisse der mit FIPI behandelten Mäuse unterstützt, da diese ebenfalls keine Infarkt- oder Herzfunktionsveränderung nach MI zeigten [85]. Andere Arbeiten haben gezeigt, dass nur das Zusammenspiel aus Inflammation, kardialem *Remodeling*, Apoptose und Kollagenetzbildung zur Aufrechterhaltung oder Verschlechterung der linksventrikulären Funktion führt [112]. Daher ist vermutlich die Veränderung eines Parameters nicht ausreichend, um Veränderungen der Herzfunktion oder der Infarktgröße zu induzieren.

PLD1 hat über die Modulation von TNF- α einen Einfluss auf die Herzfunktion nach MI [78]. PLD2 beeinflusst nicht die Expression von TNF- α , wirkt aber auf das pro-inflammatorische, akute Phase-Zytokin IL-6 (Abb. 7). Die Infarktgröße und die Herzfunktion unterschieden sich zu keinem der gemessenen Zeitpunkte nach MI zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen (Abb. 14, Abb. 15, Abb. 19, Abb. 21). Ein direkter Einfluss der PLD2 auf diese Parameter ließ sich nicht nachweisen. Wir konnten jedoch im Wildtyp eine positive Korrelation von IL-6 und Infarktgröße sowie einen Trend zu einer negativen Korrelation von Infarktgröße und Pumpfunktion nachweisen (Abb. 16, Abb. 17). In PLD2-defizienten Mäusen konnten wir keinen Zusammenhang zwischen IL-6 und Infarktgröße oder Infarktgröße und Pumpfunktion nachweisen. Aufgrund der niedrigen Versuchstierzahl sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu prüfen ob wirklich ein signifikanter Zusammenhang der o.g. Parameter im wt besteht und ob dieser sich tatsächlich in PLD2-defizienten Mäusen nicht messen lässt. Sollte sich in

Folgeexperimenten mit einer höheren Anzahl an Versuchstieren eine statistische Signifikanz dafür nachweisen lassen, dass bei *Pld2*^{+/+} Mäusen nach MI der IL-6 Plasmaspiegel mit der Infarktgröße positiv korreliert und diese wiederum eine negative Korrelation mit der Pumpfunktion aufweist und dies bei PLD2-defizienten Mäusen nicht nachweisbar ist, würde dies bedeuten, dass *Pld2*^{-/-} Mäuse bei größeren Infarktarealen keine relevant reduzierte LVEF vorweisen. Dies könnte eine neue Richtung für die Untersuchung weiterer PLD2-assoziiierter Effekte im MI eröffnen. Grundsätzlich können LVEF und Infarktgröße unabhängig voneinander verändert sein, wie es auch Schönberger *et al.* beschrieben haben: PLD1-Defizienz führte hier zu einer verringerten linksventrikulären Funktion, ohne dass eine Vergrößerung des Infarkts messbar war [78]. Gerade Infarkt- und Narbengröße sind Parameter, die maßgeblich von der Qualität des Gewebes eines Individuums abhängen. Ebenso unterschiedlich ist die Kompensation, die das gesunde Gewebe leisten kann, um die Herzfunktion aufrechtzuerhalten. Beides sind also Parameter, die vielseitig beeinflusst werden. Daher ist unsere Versuchsgruppe zu klein, um im Falle eines signifikanten Unterschieds eine statistische Signifikanz zu erreichen. Die Untersuchung von wesentlich mehr Versuchstieren wäre notwendig, um eine belastbare Aussage darüber treffen zu können, ob zwischen *Pld2*^{+/+} und *Pld2*^{-/-} Mäusen ein möglicher Zusammenhang zwischen LVEF und Infarktgröße besteht.

4.7 Konklusion und Ausblick

Die PLD2-Defizienz führt zu einer gesteigerten Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ in der frühen Phase nach MI wodurch die Thrombozyten vermittelte IL-6 Ausschüttung aus Endothelzellen erhöht wird. Begleitend dazu ist die Zelleinwanderung in das infarzierte Myokard 24 h nach MI erhöht und der Spiegel von TGF- β im Blut 72 h nach MI erniedrigt. Die PLD2-Defizienz induziert also einen pro-inflammatorischen Effekt in der akuten Phase nach MI. Daher gehen wir derzeit davon aus, dass PLD2 ein wichtiger Regulator der akuten Inflammation nach MI darstellt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass PLD2 maßgeblich an der Regulation einer überschießenden Inflammation nach MI beteiligt ist, indem sie diese über die Aktivität von Endothelzellen negativ beeinflusst. Im Vergleich zu PLD1 nimmt PLD2 keinen Einfluss auf die Expression und Ausschüttung von TNF- α und führt nicht zu einer Veränderung der Infarkt- und Narbengröße oder der Herzfunktion.

Zusammenfassend konnten wir durch diese Arbeit die Rolle der PLD2 in molekularen und zellulären Mechanismen nach MI im Mausmodell charakterisieren. Insgesamt führen die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der Einflussnahme von Phospholipasen auf die Aktivität von Thrombozyten sowie auf zelluläre Prozesse wie der akuten Inflammation nach MI.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind im Hinblick auf ihre klinische Anwendbarkeit kritisch zu hinterfragen. Tiermodelle sind dem menschlichen Organismus zwar ähnlich, dennoch ist keine uneingeschränkte Übertragbarkeit der Ergebnisse möglich. Die künstlich experimentellen Bedingungen unter denen Tierversuche im Labor grundsätzlich durchgeführt werden sind nicht auf den menschlichen Alltag übertragbar. Die in unseren Versuchen verwendeten Mäuse weisen, im Gegensatz zu den meisten Patienten mit MI, keine Komorbiditäten auf. Außerdem handelt es sich in unserem Versuchsmodell um einen experimentell induzierten MI, der unter kontrollierten Bedingungen durch die Ligatur der LAD entsteht und nicht wie im Menschen durch die Ruptur atherosklerotischer Plaques. Außerdem ist die Ischämiezeit bei Patienten mit MI in den meisten Fällen länger als in unserem Versuchsmodell und manche Patienten werden bereits präklinisch mit thrombozytenfunktionshemmenden Medikamenten und Gerinnungsmodulatoren behandelt, die in unserem Mausmodell nicht zum Einsatz gekommen sind. Es wäre interessant die gleichen Versuche in einem Mausmodell durchzuführen, welches beispielsweise Atherosklerose oder Bestandteile des metabolischen Syndroms integriert, um herauszufinden, ob sich die Effekte bei bereits vorhandener chronischer Inflamationsaktivität verstärken. Untersuchungen der PLD2-abhängigen Veränderungen der Thrombozytenaktivierung und IL-6-Ausschüttung aus Endothelzellen in Tiermodellen mit anderen zugrundeliegenden inflammatorischen Stimuli als dem MI wären notwendig, um herauszufinden, ob diese neu charakterisierte Funktion der PLD2 sich lediglich nach MI manifestiert oder auch bei anderen Arten von akuter Inflammation, wie der Sepsis, oder chronischer Inflammation, wie etwa rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, erkennbar ist. Sollte sich die anti-inflammatorische Rolle der PLD2 in weiteren Versuchen bestätigen, könnte diese ein neues therapeutisches Target darstellen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Dobaczewski, M., C. Gonzalez-Quesada, and N.G. Frangogiannis, *The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(3): p. 504-11.
2. Klose, A.M., et al., *Enhanced Integrin Activation of PLD2-Deficient Platelets Accelerates Inflammation after Myocardial Infarction*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(9).
3. Roth, G.A., et al., *Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study*. J Am Coll Cardiol, 2020. **76**(25): p. 2982-3021.
4. Destatis, *Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen, Geschlecht*. 2023, Statistisches Bundesamt, Genesis, Datenlizenz by-2-0.
5. *Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019*. Lancet, 2020. **396**(10258): p. 1204-1222.
6. Hammer, A., *Ein Fall von thrombotischem Verschlusse einer der Kranzarterien des Herzens*. Wiener Medizinische Wochenschrift, 1878. **28**: p. 97-102.
7. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. J Am Coll Cardiol, 2018. **72**(18): p. 2231-2264.
8. Wennemuth, G., *Taschenatlas Histologie*. 2012: Elsevier, Urban & Fischer.
9. Anzai, T., *Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling: a double-edged sword*. Circ J, 2013. **77**(3): p. 580-7.
10. Libby, P., et al., *Reduction of experimental myocardial infarct size by corticosteroid administration*. J Clin Invest, 1973. **52**(3): p. 599-607.
11. Roberts, R., V. DeMello, and B.E. Sobel, *Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction*. Circulation, 1976. **53**(3 Suppl): p. I204-6.
12. Kloner, R.A., et al., *Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids*. Circulation, 1978. **57**(1): p. 56-63.
13. Pluijmert, N.J., D.E. Atsma, and P.H.A. Quax, *Post-ischemic Myocardial Inflammatory Response: A Complex and Dynamic Process Susceptible to Immunomodulatory Therapies*. Front Cardiovasc Med, 2021. **8**: p. 647785.
14. Dewald, O., et al., *Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction*. Am J Pathol, 2004. **164**(2): p. 665-77.
15. Vafadarnejad, E., et al., *Dynamics of Cardiac Neutrophil Diversity in Murine Myocardial Infarction*. Circ Res, 2020. **127**(9): p. e232-e249.
16. Kaminski, K.A., et al., *Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury*. Int J Cardiol, 2002. **86**(1): p. 41-59.
17. Horckmans, M., et al., *Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype*. Eur Heart J, 2017. **38**(3): p. 187-197.
18. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 31-47.
19. Metzler, B., et al., *Mouse model of myocardial remodelling after ischemia: role of intercellular adhesion molecule-1*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(2): p. 399-407.
20. Ikeuchi, M., et al., *Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction*. Cardiovasc Res, 2004. **64**(3): p. 526-35.

21. Cucoranu, I., et al., *NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts*. *Circ Res*, 2005. **97**(9): p. 900-7.
22. Fu, X., et al., *Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart*. *J Clin Invest*, 2018. **128**(5): p. 2127-2143.
23. Willems, I.E., et al., *The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars*. *Am J Pathol*, 1994. **145**(4): p. 868-75.
24. Serini, G., et al., *The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1*. *J Cell Biol*, 1998. **142**(3): p. 873-81.
25. Gabbiani, G., *The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*. *J Pathol*, 2003. **200**(4): p. 500-3.
26. Zymek, P., et al., *The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(11): p. 2315-23.
27. Villar, A.V., et al., *BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor) protects the murine heart from pressure-overload biomechanical stress by restraining TGF- β signaling*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1832**(2): p. 323-35.
28. Wei, S., et al., *Left and right ventricular collagen type I/III ratios and remodeling post-myocardial infarction*. *J Card Fail*, 1999. **5**(2): p. 117-26.
29. Shimazaki, M., et al., *Periostin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction*. *J Exp Med*, 2008. **205**(2): p. 295-303.
30. Richardson, W.J., et al., *Physiological Implications of Myocardial Scar Structure*. *Compr Physiol*, 2015. **5**(4): p. 1877-909.
31. Rutherford, S.L., et al., *High-resolution 3-dimensional reconstruction of the infarct border zone: impact of structural remodeling on electrical activation*. *Circ Res*, 2012. **111**(3): p. 301-11.
32. Takemura, G., et al., *Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction*. *Circ Res*, 1998. **82**(11): p. 1130-8.
33. Zhao, W., et al., *Temporal and spatial characteristics of apoptosis in the infarcted rat heart*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **325**(2): p. 605-11.
34. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. *Circ Res*, 2012. **110**(1): p. 159-73.
35. Elsässer, A., K. Suzuki, and J. Schaper, *Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure*. *J Mol Cell Cardiol*, 2000. **32**(5): p. 711-24.
36. Lefrançois, E., et al., *The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors*. *Nature*, 2017. **544**(7648): p. 105-109.
37. Gawaz, M., *Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 498-511.
38. Gremmel, T., A.L. Frelinger, 3rd, and A.D. Michelson, *Platelet Physiology*. *Semin Thromb Hemost*, 2016. **42**(3): p. 191-204.
39. George, J.N., *Platelets*. *Lancet*, 2000. **355**(9214): p. 1531-9.
40. Siegel, A. and E.F. Lüscher, *Non-identity of the alpha-granules of human blood platelets with typical lysosomes*. *Nature*, 1967. **215**(5102): p. 745-7.
41. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. *Cell*, 2002. **110**(6): p. 673-87.
42. Tomauiuolo, M., L.F. Brass, and T.J. Stalker, *Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis*. *Interv Cardiol Clin*, 2017. **6**(1): p. 1-12.

43. Gale, A.J., *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis*. Toxicol Pathol, 2011. **39**(1): p. 273-80.
44. Ruggeri, Z.M., *The role of von Willebrand factor in thrombus formation*. Thromb Res, 2007. **120 Suppl 1**(Suppl 1): p. S5-9.
45. McCormack, J.J., et al., *Weibel-Palade bodies at a glance*. J Cell Sci, 2017. **130**(21): p. 3611-3617.
46. Nosek-Cenkowska, B., et al., *Bleeding/bruising symptomatology in children with and without bleeding disorders*. Thromb Haemost, 1991. **65**(3): p. 237-41.
47. Leebeek, F.W. and J.C. Eikenboom, *Von Willebrand's Disease*. N Engl J Med, 2016. **375**(21): p. 2067-2080.
48. Jirouskova, M., A.S. Shet, and G.J. Johnson, *A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(4): p. 661-9.
49. Born, G.V., *Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal*. Nature, 1962. **194**: p. 927-9.
50. Crescente, M., et al., *Eicosanoids in platelets and the effect of their modulation by aspirin in the cardiovascular system (and beyond)*. Br J Pharmacol, 2019. **176**(8): p. 988-999.
51. Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt, *Cell adhesion mechanisms in platelets*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. 403-12.
52. Cerletti, C., M. Livio, and G. De Gaetano, *Non-steroidal anti-inflammatory drugs react with two sites on platelet cyclo-oxygenase. Evidence from "in vivo" drug interaction studies in rats*. Biochim Biophys Acta, 1982. **714**(1): p. 122-8.
53. Humphries, R.G., et al., *FPL 66096: a novel, highly potent and selective antagonist at human platelet P2T-purinoreceptors*. Br J Pharmacol, 1994. **113**(3): p. 1057-63.
54. Jackson, S.P., *Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1423-36.
55. Lindemann, S., et al., *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis*. J Cell Biol, 2001. **154**(3): p. 485-90.
56. Gawaz, M., et al., *Transient platelet interaction induces MCP-1 production by endothelial cells via I kappa B kinase complex activation*. Thromb Haemost, 2002. **88**(2): p. 307-14.
57. Hawrylowicz, C.M., G.L. Howells, and M. Feldmann, *Platelet-derived interleukin 1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production*. J Exp Med, 1991. **174**(4): p. 785-90.
58. Kaplanski, G., et al., *Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism*. Blood, 1994. **84**(12): p. 4242-8.
59. Gawaz, M., et al., *Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis*. Atherosclerosis, 2000. **148**(1): p. 75-85.
60. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
61. Zago, A.C., et al., *The importance of the interaction between leukocyte integrin Mac-1 and platelet glycoprotein Ib-a for leukocyte recruitment by platelets and for the inflammatory response to vascular injury*. Arq Bras Cardiol, 2008. **90**(1): p. 54-63.
62. André, P., *P-selectin in haemostasis*. Br J Haematol, 2004. **126**(3): p. 298-306.

63. Liu, Y., et al., *Novel role of platelets in mediating inflammatory responses and ventricular rupture or remodeling following myocardial infarction*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(4): p. 834-41.
64. Möhn, H., V. Chalifa, and M. Liscovitch, *Substrate specificity of neutral phospholipase D from rat brain studied by selective labeling of endogenous synaptic membrane phospholipids in vitro*. J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 11131-6.
65. Oude Weernink, P.A., M. Lopez de Jesus, and M. Schmidt, *Phospholipase D signaling: orchestration by PIP2 and small GTPases*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2007. **374**(5-6): p. 399-411.
66. McDermott, M., M.J. Wakelam, and A.J. Morris, *Phospholipase D*. Biochem Cell Biol, 2004. **82**(1): p. 225-53.
67. Sung, T.C., et al., *Molecular analysis of mammalian phospholipase D2*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 494-502.
68. Sung, T.C., et al., *Structural analysis of human phospholipase D1*. J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3659-66.
69. Bowling, F.Z., M.A. Frohman, and M.V. Airola, *Structure and regulation of human phospholipase D*. Adv Biol Regul, 2021. **79**: p. 100783.
70. Vorland, M. and H. Holmsen, *Phospholipase D in human platelets: presence of isoenzymes and participation of autocrine stimulation during thrombin activation*. Platelets, 2008. **19**(3): p. 211-24.
71. Elvers, M., et al., *Impaired alpha(IIb)beta(3) integrin activation and shear-dependent thrombus formation in mice lacking phospholipase D1*. Sci Signal, 2010. **3**(103): p. ra1.
72. Stegner, D., et al., *Pharmacological inhibition of phospholipase D protects mice from occlusive thrombus formation and ischemic stroke--brief report*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(9): p. 2212-7.
73. Thielmann, I., et al., *Redundant functions of phospholipases D1 and D2 in platelet alpha-granule release*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(11): p. 2361-72.
74. Kang, D.W., et al., *Phospholipase D1 has a pivotal role in interleukin-1beta-driven chronic autoimmune arthritis through regulation of NF-kappaB, hypoxia-inducible factor 1alpha, and FoxO3a*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(14): p. 2760-72.
75. Rydzewska, G., N. Rivard, and J. Morisset, *Dynamics of pancreatic tyrosine kinase and phospholipase D activities in the course of cerulein-induced acute pancreatitis and during regeneration*. Pancreas, 1995. **10**(4): p. 382-8.
76. Sethu, S., P.N. Pushparaj, and A.J. Melendez, *Phospholipase D1 mediates TNFalpha-induced inflammation in a murine model of TNFalpha-induced peritonitis*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10506.
77. Urbahn, M.A., et al., *Phospholipase D1 regulation of TNF-alpha protects against responses to LPS*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 10006.
78. Schonberger, T., et al., *Pivotal role of phospholipase D1 in tumor necrosis factor-alpha-mediated inflammation and scar formation after myocardial ischemia and reperfusion in mice*. Am J Pathol, 2014. **184**(9): p. 2450-64.
79. Powner, D.J., et al., *Stable adhesion and migration of human neutrophils requires phospholipase D-mediated activation of the integrin CD11b/CD18*. Mol Immunol, 2007. **44**(12): p. 3211-21.
80. Abdunnour, R.E., et al., *Phospholipase D isoforms differentially regulate leukocyte responses to acute lung injury*. J Leukoc Biol, 2018. **103**(5): p. 919-932.

81. Lee, S.K., et al., *Phospholipase D2 drives mortality in sepsis by inhibiting neutrophil extracellular trap formation and down-regulating CXCR2*. J Exp Med, 2015. **212**(9): p. 1381-90.
82. Kang, D.W., et al., *Rebamipide-induced downregulation of phospholipase D inhibits inflammation and proliferation in gastric cancer cells*. Exp Mol Med, 2010. **42**(8): p. 555-64.
83. Knoepp, S.M., et al., *Effects of active and inactive phospholipase D2 on signal transduction, adhesion, migration, invasion, and metastasis in EL4 lymphoma cells*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(3): p. 574-84.
84. Hwang, W.C., et al., *PLD1 and PLD2 differentially regulate the balance of macrophage polarization in inflammation and tissue injury*. J Cell Physiol, 2021. **236**(7): p. 5193-5211.
85. Klier, M., et al., *Enzymatic Activity Is Not Required for Phospholipase D Mediated TNF-alpha Regulation and Myocardial Healing*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 1698.
86. Oliveira, T.G., et al., *Phospholipase d2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits*. J Neurosci, 2010. **30**(49): p. 16419-28.
87. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
88. Rassaf, T., et al., *Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning*. Circ Res, 2014. **114**(10): p. 1601-10.
89. Leong, D.P., et al., *Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 2: Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease*. Circ Res, 2017. **121**(6): p. 695-710.
90. Moraru, II, et al., *Phospholipase D signaling in ischemic heart*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1139**(1-2): p. 148-54.
91. Dent, M.R., et al., *Expression of phospholipase D isozymes in scar and viable tissue in congestive heart failure due to myocardial infarction*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(4): p. 526-36.
92. Tian, M., et al., *Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review*. Chronic Dis Transl Med, 2015. **1**(1): p. 18-26.
93. Kleinbongard, P., G. Heusch, and R. Schulz, *TNF α in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure*. Pharmacol Ther, 2010. **127**(3): p. 295-314.
94. Speranza, F.J., M. Mahankali, and J. Gomez-Cambronero, *Macrophage migration arrest due to a winning balance of Rac2/Sp1 repression over β -catenin-induced PLD expression*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(5): p. 953-62.
95. Iba, T., M. Levi, and J.H. Levy, *Sepsis-Induced Coagulopathy and Disseminated Intravascular Coagulation*. Semin Thromb Hemost, 2020. **46**(1): p. 89-95.
96. Elvers, M., et al., *A novel role for phospholipase D as an endogenous negative regulator of platelet sensitivity*. Cell Signal, 2012. **24**(9): p. 1743-52.
97. Raju, N.C., J.W. Eikelboom, and J. Hirsh, *Platelet ADP-receptor antagonists for cardiovascular disease: past, present and future*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2008. **5**(12): p. 766-80.
98. Chaudhary, P.K., S. Kim, and S. Kim, *An Insight into Recent Advances on Platelet Function in Health and Disease*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(11).

99. Bulut, D., V. Becker, and A. Mügge, *Acetylsalicylate reduces endothelial and platelet-derived microparticles in patients with coronary artery disease*. Can J Physiol Pharmacol, 2011. **89**(4): p. 239-44.
100. von Hundelshausen, P. and C. Weber, *Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease*. Circ Res, 2007. **100**(1): p. 27-40.
101. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, *Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), α v β 3 integrin, and GPIb α* . J Exp Med, 1998. **187**(3): p. 329-39.
102. Pachel, C., et al., *Inhibition of Platelet GPVI Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016. **36**(4): p. 629-35.
103. Schönberger, T., et al., *The dimeric platelet collagen receptor GPVI-Fc reduces platelet adhesion to activated endothelium and preserves myocardial function after transient ischemia in mice*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **303**(7): p. C757-66.
104. Singer, M., et al., *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. Jama, 2016. **315**(8): p. 801-10.
105. Bujak, M. and N.G. Frangogiannis, *The role of TGF- β signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling*. Cardiovasc Res, 2007. **74**(2): p. 184-95.
106. Frangogiannis, N.G., *The role of transforming growth factor (TGF)- β in the infarcted myocardium*. J Thorac Dis, 2017. **9**(Suppl 1): p. S52-s63.
107. Lighthouse, J.K. and E.M. Small, *Transcriptional control of cardiac fibroblast plasticity*. J Mol Cell Cardiol, 2016. **91**: p. 52-60.
108. Reusswig, F., et al., *Only Acute but Not Chronic Thrombocytopenia Protects Mice against Left Ventricular Dysfunction after Acute Myocardial Infarction*. Cells, 2022. **11**(21).
109. Lee, H., et al., *Phospholipase D2 is a positive regulator of sirtuin 1 and modulates p53-mediated apoptosis via sirtuin 1*. Exp Mol Med, 2021. **53**(9): p. 1287-1297.
110. Lee, S.D., et al., *Phospholipase D2 activity suppresses hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells*. J Neurochem, 2000. **75**(3): p. 1053-9.
111. Hwang, W.C., et al., *Inhibition of phospholipase D2 augments histone deacetylase inhibitor-induced cell death in breast cancer cells*. Biol Res, 2020. **53**(1): p. 34.
112. Sun, M., et al., *Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction*. Circulation, 2004. **110**(20): p. 3221-8.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Margitta Elvers. Sie haben mir mit der Vergabe dieses Dissertationsthemas die Möglichkeit gegeben, meine ersten Schritte in der Wissenschaft zu machen. Besonders hervorheben möchte ich, dass Sie großen Wert auf die Mitarbeit an Publikationen und Kongressteilnahmen Ihrer Mitarbeiter legen und auch mich dahingehend gefördert haben.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Martina Krüger für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und die Cobetreuung bedanken.

Mein Dank gilt auch dem gesamten Team des SFB 1116 Düsseldorf für die Vergabe des Stipendiums, die Begleitung des Projekts und die Unterstützung bei den Tierversuchen.

Ein herzlicher Dank geht an meine Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor: Meike für deine Arbeit als meine Betreuerin, Friedrich für die geduldige Einarbeitung, Korrekturhilfe und unverblünte Ehrlichkeit, Nadine für die gute Laune im Büro, Evelyn für deine spontane und rasante Korrektur und ganz besonders Martina für deine stetige Unterstützung, und deine Engelsgeduld. Auch allen weiteren Personen der AG Elvers, die mich während der Arbeit begleitet haben, gilt mein Dank. Ohne euch hätte mir die Arbeit im Labor nur halb so viel Spaß gemacht!

Lieber Julius, an dieser Stelle möchte ich dir für deine Unterstützung und deinen Einsatz danken. Ohne dich hätte ich diese Arbeit möglicherweise nie fertiggestellt. Du hast mir für Fragen und Korrekturen stets zur Seite gestanden, hast zurückgesteckt, um mir die Möglichkeit zu geben in Ruhe zu schreiben, hast immer den richtigen Mittelweg zwischen auffordernden, motivierenden und verständnisvollen Worten gefunden und bist mir der beste Wegbegleiter, den ich mir vorstellen kann. Danke!

Mein größter Dank gilt meiner Familie, ohne dessen Unterstützung ich niemals an diesen Punkt gekommen wäre. Ihr habt mich immer bedingungslos unterstützt und an mich geglaubt - ich werde nie genug sagen können, wie dankbar ich euch dafür bin. Gracies Mare, gracies Pare, gracies Jordi, gracies Lluís-Maria, gracies Avia, gracies Avi Rudolf, gracies Tieta i gracies Maite per sempre creure en mi!