

Aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie

Der Heinrich-Heine-Universität

Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig

Thrombozyteneinwanderung und Thrombozyten induzierte Angiogenese und Zellüberleben nach Myokardinfarkt

Dissertation

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

vorgelegt von

Celina Fabienne Lersch

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Margitta Elvers

Zweitgutachter/in: Prof. Dr. rer. nat. Martina Krüger

Die Wissenschaft ist Teil der Lebenswirklichkeit; es ist das Was, das Wie und Warum von allem in unserer Erfahrung“

(Rachel Carson)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Krüger, I.; Reuswig, F.; Krott, K.J.; Lersch, C.F.; Spelleken, M.; Elvers, M
“Genetic Labeling of Cells Allows Identification and Tracking of Transgenic
Platelets in Mice” *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3710

Klier, M.; Dille, M.A.; Ayhan, A.; Benkhoff, M.; Lersch, C.; Prinz, A.; Gorressen, S.;
Fischer, J.W.; *et al.* „Only Acute but Not Chronic Thrombocytopenia Protects Mice
against Left Ventricular Dysfunction after Acute Myocardial Infarction.” *Cells*
2022, 11, 3500.

Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt stellt noch immer die häufigste Todesursache der westlichen Welt dar. Die Ischämie in Folge des myokardialen Infarkts, führt im betroffenen Gewebe zu einem Absterben der residenten Kardiomyozyten mit nachgeschaltetem Umbau zu kollagenem Narbengewebe. Dass Thrombozyten maßgeblich an der inflammatorischen Reaktion nach Myokardinfarkt beteiligt sind, ist bereits in früheren Studien gezeigt worden. Dabei regulieren die Thrombozyten vor allem durch die von ihnen sezernierte Granula, sowie sogenannte Mikropartikel/Exosomen (PMP/Es) die an die Ischämie anschließende Signalkaskade. Es handelt sich dabei sowohl um pro- als auch anti-inflammatorische Stoffwechselprozesse.

Ob die Thrombozyten dabei auch in das Myokard einwandern oder ob diese Prozesse ausschließlich durch Absonderung der Granula aus koronaren Gefäßen gesteuert werden ist bisher nicht vollständig geklärt.

Mit Hilfe der transgenen Mauslinie *mT/mG;Pf4-Cre* ist schon in vergangenen Studien eine eindeutige visuelle Analyse von Thrombozyten in verschiedenen Stoffwechselprozessen ermöglicht worden. Dieses Mausmodell führt durch eine Veränderung des Genoms zu einer Markierung der Thrombozyten ohne die Notwendigkeit einer spezifischen Antikörperfärbung. Dies ermöglicht im Versuchsaufbau die Verwendung von mehreren parallelen Färbemethoden.

Ziel dieser Arbeit war es die extravaskuläre Einwanderung der Thrombozyten in das Myokard in der akuten Entzündungsphase visuell darzustellen und dabei den Nutzen der dafür verwendeten Mauslinie zu bestimmen. Anschließend sollte eine Aussage zum Einfluss der Thrombozyten auf die Infarktheilung, beziehungsweise auf die Angiogenese nach Myokardinfarkt, getroffen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die *mT/mG;Pf4-Cre*-Maus ein hilfreiches Tool für den visuellen Nachweis einer extravaskulären Einwanderung der Thrombozyten in das Myokard darstellt. Der Einfluss der Thrombozyten auf die Angiogenese während der Heilungsphase konnte in diesem Projektvorhaben nicht eindeutig bestimmt werden.

Summary

Myocardial infarction still represents the most common cause of death in the Western world. Ischemia secondary to myocardial infarction, leads to the death of resident cardiomyocytes in the affected tissue with downstream remodeling to collagenous scar tissue. Platelets have been shown to be significantly involved in the inflammatory response after myocardial infarction in previous studies. In this context, platelets regulate the signaling cascade following ischemia primarily through the secreted granules, as well as so-called microparticles/exosomes (PMP/Es). Pro-inflammatory as well as anti-inflammatory metabolic processes are regulated through these secreted particles.

Whether platelets actively migrate into the myocardium or if these processes are exclusively controlled by the emission of granules from coronary vessels has not been fully elucidated yet.

Unambiguous visual analysis of platelets in various metabolic processes using the transgenic mouse line *mT/mG;Pf4-Cre* has been established already in past studies. By modifying the murine genome platelets are fluorescently labeled and specific antibody staining is redundant. This allows multiple parallel staining methods in an experimental setup.

The aim of this work was a visual detection of the extravascular migration of platelets into the myocardium during the acute inflammatory phase after myocardial infarction. Thereby the benefit of using *mT/mG;Pf4-Cre*-mice should be determined for this purpose. Subsequently, the influence of platelets on infarct healing respectively the angiogenesis after myocardial infarction should be verified.

It was shown that *mT/mG;Pf4-Cre* mice are a useful tool for the visual detection of extravascular migration of platelets into the myocardium. Platelet influence on angiogenesis during the healing phase could not be clearly determined in this project.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---|---|
| mT/mG;Pf4-Cre Mäuse | |
| STOCK Tg (Pf4-cre)QRsko/J Gt(ROSA)26Sor ^{tm4} (ACTBtdTomato,-EGFP) ^{Luo} /J Mäuse | |
| μl | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |
| °C | Grad Celsius |
| A. dest. | Aqua destillata |
| ADAP | engl. adhesion and degranulation-promoting adapter protein |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AMI | engl. acute myocardial infarction |
| AMR | Ashwell-Morell-Rezeptor |
| APC | Allophycocyanin |
| BSA | Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C57BL/6J | "Black6" Wildtyp-Mausstamm |
| Ca ²⁺ | Kalzium |
| CCR2 | C-C-Chemokinrezeptor Typ 2 |
| c-MPL | engl. myeloproliferative leukemia virus oncogene |
| CX3CR1 | CX3C Chemokinrezeptor 1 |
| Cy3 | Cyanin 3 |
| Cy5 | Cyanin 5 |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidin |
| DAPI | 4',6-Diamidino-2-Phenylindole |
| DNA | engl. desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure |
| ECM | engl. extracellular matrix, Extrazelluläre Matrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFP | engl. enhanced green fluorescent protein, grün fluoreszierendes Protein |
| ES | Exosomen |
| EtOH | Ethanol |
| FACS | engl. fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie |
| FELASA | engl. Federation of European Laboratory Animal Science Association |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FSC | engl. forward scatter, Vorwärtsstreulicht |
| g | Gramm |
| g (Zentrifuge) | Erdbeschleunigung |
| GP1a | Glykoprotein 1a |
| h | engl. hour, Stunde |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HCl | Salzsäure |
| HE-Färbung | Hämalaun-Eosin-Färbung |
| HIT | Heparin-induzierte Thrombozytopenie |
| HRP | engl. horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase |
| HSZ | Hämatopoetische Stammzelle |
| IF-Färbung | Immunofluoreszenzfärbung |
| IgG | Immunglobulin G |
| kDa | Kilodalton |
| LANUV NRW | Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein- Westphalen |
| LSM | engl. laser scanning microscope |
| LY6C | Lymphozytenantigen 6C |
| M | Molar |
| mG | membranständiges grün fluoreszierendes Protein |
| mg / kg | Milligramm pro Kilogramm |
| MgCl ₂ | Magnesium-Chlorid |
| MI | Myokardinfarkt |
| min | Minuten |
| miRNA | engl. micro-ribonucleic acid, Mikro-Ribonukleinsäure |
| ml | Milliliter |
| mm ² | Quadratmillimeter |
| MOM-Puffer | engl. "mouse-on-mouse" buffer, Maus spezifischer Puffer |
| MPA | engl. monocyte-platelet-aggregates |
| mT | membranständiges Tomato (rot fluoreszierendes Protein) |
| n | Anzahl durchgeführter Messungen |
| NaOH | Natronlauge |
| nm | Nanometer |

| | |
|---------------------|---|
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PBS | engl. phosphate buffered saline, Phosphatgepufferter Kochsalzlösung |
| PDGF..... | engl. platelet derivated growth factor, Thrombozytenwachstumsfaktor |
| PE..... | Phycoerythrin |
| PECAM-1..... | engl. platelet endothelial cell adhesion molecule, Thrombozyten- Endothelzellen-Adhäsionsmolekül |
| Pf4..... | engl. platelet factor 4, Thrombozytenfaktor 4 |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PMP..... | engl. platelet microparticles |
| PSGL-1 | P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 |
| remote-Gebiet..... | nicht-infarziertes Gebiet |
| ROS..... | engl. reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies |
| RT..... | Raumtemperatur |
| SCC..... | engl. side scatter, Seitwärtsstreulicht |
| s..... | Sekunden |
| SEM..... | engl. standard error of mean |
| SPM..... | engl. specialized pro-resolving mediator |
| TGF- β 1..... | engl. transforming growth factor beta 1, Transformierender Wachstumsfaktor beta 1 |
| TPO | Thrombopoietin |
| TSP-1 | Thrombospondin-1 |
| U / ml..... | engl. units per millilitre, Einheiten pro Milliliter |
| VEGF..... | engl. vascular endothelial growth factor, Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor |
| WGA..... | engl. wheat germ agglutinin, Weizenkeim-Agglutinin |
| z.B | zum Beispiel |
| ZETT..... | Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben |
| α | Alpha |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Zusammenfassung | I |
| Summary | II |
| Abkürzungsverzeichnis | III |
| Tabellenverzeichnis | X |
| Abbildungsverzeichnis | XI |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Akuter Myokardinfarkt | 1 |
| 1.1.1 Epidemiologie | 1 |
| 1.1.2 Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts | 2 |
| 1.1.3 Zeitliches Profil des akuten Myokardinfarktes | 3 |
| 1.1.4 Einteilung des Myokards nach Myokardinfarkt | 5 |
| 1.2 Thrombozyten und ihre Rolle in der Pathophysiologie des Myokardinfarkts | 7 |
| 1.2.1 Thrombozyten: Morphologie und Funktion | 7 |
| 1.2.2 Der Lebenszyklus der Thrombozyten | 8 |
| 1.2.3 Die Bedeutung der durch Thrombozyten sezernierten Mediatoren | 10 |
| 1.2.4 Die Rolle der Thrombozyten während des Myokardinfarktes | 11 |
| 1.2.5 Die Bedeutung von Thrombozyten während des Heilungsprozesses nach Myokardinfarkt und der Einfluss der Thrombozyten auf die Angiogenese | 13 |
| 1.3 Die mT/mG;Pf4-Cre Mauslinie | 14 |
| 1.3.1 Das Cre/loxP-System zur spezifischen DNA-Exzision | 14 |
| 1.3.2 Thrombozytenfaktor 4 als Promotor für das Cre/loxP-Rekombinase-System | 16 |
| 1.3.3 Die mT/mG;Pf4-Cre-Reportermaus | 16 |
| 1.4 Zielsetzung | 18 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2 | Matherial und Methoden | 19 |
| 2.1 | Material | 19 |
| 2.1.1 | Geräte und Arbeitsmaterialien | 19 |
| 2.1.2 | Chemikalien | 21 |
| 2.1.3 | Antikörper | 22 |
| 2.1.4 | Kits | 23 |
| 2.1.5 | Lösungen und Puffer | 23 |
| 2.1.6 | Software | 24 |
| 2.2 | Versuchstiere | 24 |
| 2.2.1 | Wildtypischer Mausstamm C57BL/6J | 25 |
| 2.2.2 | (Pf4-cre) Q3Rsko/J Gt (Rosa) 26Sor ^{tm4} (ACTB-tdTomato-EGFP) ^{Luo} /J Mäuse | 25 |
| 2.2.3 | Akute versus chronische Thrombozytopenie im Mausmodell | 26 |
| 2.2.4 | Blutentnahme | 26 |
| 2.2.5 | Generierung von Blutausstrichen | 27 |
| 2.2.6 | Durchflusszytometrie | 28 |
| 2.2.7 | Die histologische Untersuchung der transgenen Maus | 31 |
| 2.2.8 | Organentnahme und Fixierung von Mausherzen in Tissue-Tek | 31 |
| 2.2.9 | Fixierung der Femur- und Milz- und Leberproben | 32 |
| 2.2.10 | Herstellung von Kryoschnitten | 33 |
| 2.3 | Definition von Infarkt - und remote-Gebiet | 34 |
| 2.3.1 | Die Hämalaun-Eosin-Färbung | 34 |
| 2.3.2 | Die Wheat-Germ-Agglutinin Färbung (WGA) | 34 |
| 2.4 | Immunfluoreszenz-Analysen | 35 |
| 2.4.1 | Die PECAM-Immunfluoreszenz Färbung | 35 |
| 2.4.2 | Die Mac3-Immunfluoreszenzfärbung | 36 |
| 2.4.3 | Die Zusammenführung der immunhistologischen Färbemethoden auf Folgeschnitten der Herzpräparate | 37 |
| 2.5 | Immunhistochemische Färbemethoden | 38 |
| 2.5.1 | Die Pecam-DAB-Färbung | 38 |
| 2.6 | Statistische Auswertung | 41 |
| 3 | Ergebnisse | 42 |
| 3.1 | Charakterisierung der transgenen Mauslinie mT/mG;Pf4-Cre | 42 |
| 3.1.1 | Fluoreszenzaufnahmen von Blutausstrichen des peripheren Blutes | 43 |

| | Inhaltsverzeichnis |
|--|--------------------|
| 3.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der Blutproben | 45 |
| 3.2 Analyse des Myokards der mT/mG;Pf4-Cre | 47 |
| 3.2.1 Analyse von gesunden Herzen der mT/mG;Pf4-Cre | 47 |
| 3.2.2 WGA-Färbung zur Definition des Infarktgebietes im Myokard | 49 |
| 3.2.3 PECAM-1-Immunofluoreszenz-Färbung zur Detektion von Blutgefäßen im Myokard | 51 |
| 3.2.4 Mac3-Immunofluoreszenz-Färbung zur Detektion von Makrophagen im Myokard | 52 |
| 3.2.5 Analyse der Thrombozyten-Lokalisation im Myokard der mT/mG;Pf4-Cre-Mäuse 24 h nach Myokardinfarkt | 54 |
| 3.2.6 Analyse der Thrombozyten-Makrophagen-Kolokalisation im Myokard der mT/mG;Pf4-Cre-Mäuse 24 h nach Herzinfarkt | 56 |
| 3.3 Analyse der Angiogeneserate in Abhängigkeit der Anwesenheit von Thrombozyten | 58 |
| 3.3.1 Vergleich der Thrombozytenzahlen beider Modelle | 58 |
| 3.3.2 Analyse der Angiogenese im MPL-Knock-Out-Mausmodell | 59 |
| 3.3.3 Analyse der Angiogenese im Mausmodell der akuten Thrombozytopenie | 60 |
| 4 Diskussion | 62 |
| 4.1 Die mT/mG;Pf4-Cre Mauslinie als nützliches Tool zur visuellen Darstellung von Thrombozyten | 63 |
| 4.1.1 Die mG Fluoreszenz der Leukozyten stellt die Exklusivität der mT/mG;Pf4-Cre in Zweifel | 65 |
| 4.1.2 Die fehlende Fluoreszenz der Erythrozyten im Blutaussstrich | 66 |
| 4.1.3 Veränderung der Fluoreszenz im Paraffinpräparat | 67 |
| 4.1.4 Die visuelle Darstellung extravaskulärer Thrombozytenaggregate im infarzierten Myokard | 68 |
| 4.1.5 Thrombozyten-Makrophagen-Kolokalisation im Infarktgebiet 24 h nach Myokardinfarkt | 69 |
| 4.2 Der Einfluss der Thrombozyten auf die Angiogenese nach Myokardinfarkt im thrombozytopenen Mausmodell | 70 |
| 4.2.1 Sinkende Angiogeneserate bei MPL ^{-/-} -Mäusen 21 Tage nach Myokardinfarkt | 71 |
| 4.3 Zusammenfassung und Ausblick | 73 |

5 Literaturverzeichnis

Danksagung

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien | 19 |
| Tabelle 2: Geräte | 20 |
| Tabelle 3: verwendete Chemikalien | 21 |
| Tabelle 4: verwendete Primärantikörper | 22 |
| Tabelle 5: verwendete Sekundärantikörper..... | 22 |
| Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie..... | 22 |
| Tabelle 7: verwendete Kits..... | 23 |
| Tabelle 8: verwendete Lösungen und Puffer | 23 |
| Tabelle 9: verwendete Software | 24 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abb. 1: Häufigste Todesursachen in Deutschland 2020 | 2 |
| Abb. 2: Zelluläre Prozesse nach Eintritt des akuten Myokardinfarkts..... | 5 |
| Abb. 3: Definition der histologischen Zonen nach Myokardinfarkt..... | 7 |
| Abb. 4: Schematische Darstellung der Megakaryopoiese und anschließender Thrombopoiese..... | 9 |
| Abb. 5: Rolle der Thrombozyten-Mediatoren während/nach Myokardinfarkt..... | 13 |
| Abb. 6: Cre-Rekombinase Aktivität im loxP-flankierten mT/mG-Genabschnitt..... | 17 |
| Abb. 7: Schematische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse einer Zellsuspension..... | 29 |
| Abb. 8: Beispielhafte Darstellung der Zusammenführung der etablierten Färbemethoden in Folgeschnitten desselben Myokards..... | 37 |
| Abb. 9: Fluoreszenzaufnahmen der Blutausrichungen des peripheren Blutes..... | 44 |
| Abb. 10: Evaluierung der Durchflusszytometrie-Daten | 46 |
| Abb. 11: FACS-Analyse von EGFP- und tdTomato-Signalen der verschiedenen Blutzelltypen | 47 |
| Abb. 12: Fluoreszenzaufnahmen des gesunden Myokards von mT/mG;Pf4-Cre positiven Mäusen..... | 48 |
| Abb. 13: WGA-Färbung gesunden murinen Myokards im Vergleich zum Myokard 24 h nach Myokardinfarkt..... | 50 |
| Abb. 14: PECAM-1-Immunofluoreszenz-Färbung von mT/mG;Pf4-Cre positivem und mT/mG;Pf4-Cre negativem gesundem Myokard..... | 52 |
| Abb. 15: Mac3-Immunofluoreszenz-Färbung von mT/mG;Pf4-Cre positivem und mT/mG;Pf4-Cre negativem gesundem Myokard..... | 54 |
| Abb. 16: WGA und PECAM-1 IF-Färbung in Folgeschnitten von mT/mG;Pf4-Cre positiven und mT/mG;Pf4-Cre negativen Präparaten mit und ohne Myokardinfarkt. | 55 |
| Abb. 17: WGA- und Mac3-Immunofluoreszenz-Färbung in Folgeschnitten von mT/mG;Pf4-Cre positiven und mT/mG;Pf4-Cre negativen Präparaten mit und ohne Myokardinfarkt..... | 57 |

| | |
|---|----|
| Abb. 18: Vergleich der Thrombozytenzahlen der thrombozytopenen Mausmodelle zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Myokardinfarkt. | 59 |
| Abb. 19: Analyse der Kapillaren / mm ² in MPL-Knock-out Tieren | 60 |
| Abb. 20: Analyse der Kapillaren / mm ² in Mäusen mit akuter Thrombozytopenie fünf Tage sowie 21 Tage nach Myokardinfarkt..... | 61 |

1 Einleitung

1.1 Akuter Myokardinfarkt

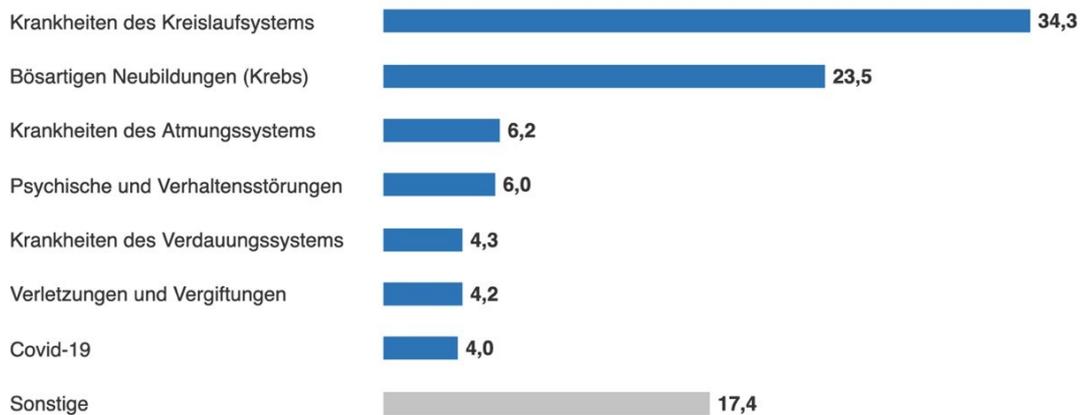
1.1.1 Epidemiologie

Der akute Myokardinfarkt (Herzinfarkt, engl. *acute myocardial infarction*, AMI) ist eine irreversible Verletzung des Herzgewebes, verursacht durch anhaltende Ischämie und Hypoxie [1]. Noch immer zählt der Myokardinfarkt zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt. Laut dem Bericht des Statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2022 starben allein in Deutschland im Jahr 2020 über 338.000 Personen an kardiovaskulären Erkrankungen. Damit liegen Erkrankungen des Kreislaufsystems mit 34,3 % noch vor dem Tod durch bösartige Neubildungen (Krebs) mit 23,5 % (Abb.1) [2]. Die chronisch ischämische Herzkrankheit wird dabei als die am häufigsten zum Tode führende Erkrankung in Deutschland im Jahr 2020 angegeben, dicht gefolgt vom akuten Myokardinfarkt und der Herzinsuffizienz. Einem Bericht der European Society of Cardiology aus dem Jahr 2012 zufolge stirbt jeder sechste Europäer und jede siebte Europäerin an einem Myokardinfarkt [3]. Beim Myokardinfarkt handelt es sich um eine komplexe, oftmals multifaktorielle Erkrankung, deren individuelles Risiko unter anderem von einer genetischen Prädisposition, Umweltfaktoren und dem Lebensstil beeinflusst wird. Zu den Risikofaktoren zählen Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus, Übergewicht sowie ungesunde Ernährung und Rauchen [1]. Symptomatisch äußert sich ein Myokardinfarkt meist durch starke, unspezifische Brustschmerzen, die in Schulter, Oberbauch oder Unterkiefer ausstrahlen können, sowie Schwitzen und/oder Atembeschwerden. Die Ursache für die hohe Sterblichkeit bei dieser Erkrankung liegt häufig in einem späten Behandlungsbeginn aufgrund der zum Teil unspezifischen Symptome der betroffenen Patienten und darin, dass die Regeneration von abgestorbenem Herzmuskelgewebe durch Zellteilung noch nicht möglich ist. Somit ist eine schnellstmögliche Reperfusion des betroffenen Myokards zu gewährleisten [4]. Dies würde die Prognose der Erkrankung wesentlich verbessern und einen großen Fortschritt in der Behandlung von kardiovaskulären Leiden bedeuten. Um therapeutisch gezielt in die an den Myokardinfarkt

anknüpfenden Prozesse eingreifen zu können, gilt es diese ausführlich aufzuschlüsseln und zu verstehen. Dabei ist vor allem die Interaktion der verschiedenen zellulären Akteure der initialen Entzündungsreaktion von besonderem Interesse.

Todesursachen nach Krankheitsarten 2020

in %



© Statistisches Bundesamt (Destatis), 2022

Abb. 1: Häufigste Todesursachen in Deutschland 2020.

Erkrankungen des Kreislaufsystems waren im Jahre 2020 die häufigste krankheitsbedingte Todesursache, sowohl bei der männlichen als auch bei der weiblichen deutschen Bevölkerung (Destatis) [2].

1.1.2 Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts

Während eines Myokardinfarkts verursacht ein Verschluss eines koronaren Blutgefäßes eine Sauerstoff-Minderversorgung im Versorgungsgebiet des betroffenen Gefäßes. Meist entsteht eine solche Gefäßobstruktion durch einen atherosklerotischen Plaque [5]. Atherosklerose ist eine sich über die Jahre entwickelnde Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems. Ein chronisch erhöhter Cholesterinspiegel führt zu einer Ansammlung von Lipiden an der Gefäßwand und löst eine Entzündungsreaktion aus. Dies hat eine Instabilität der Gefäßwand zur Folge. In der Regel entsteht ein Myokardinfarkt durch die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques. Durch das chronische Entzündungsgeschehen in der Gefäßwand kommt es letztendlich zu einer Aktivierung von Thrombozyten. Diese

bilden über Fibrinvernetzungen einen Thrombus, der das Gefäß entweder am Ort des Plaques oder auch weiter davon entfernt (distal) verschließt, wenn der Thrombus rupturiert ist.

1.1.3 Zeitliches Profil des akuten Myokardinfarktes

Nach Verschluss einer Koronararterie und der damit einher gehenden, fehlenden Sauerstoffzufuhr kommt es umgehend zu einem Absterben von Kardiomyozyten in dem betroffenen Areal [6]. Dies führt zu einer eingeschränkten Kontraktionsfähigkeit des Herzens.

Der weitere Zeitverlauf kann in drei Entwicklungsphasen unterteilt werden: die inflammatorische Phase, die proliferative Phase und schließlich die Heilungsphase [4] (Abb. 2). Die einzelnen Phasen unterscheiden sich in den makroskopischen und mechanischen Eigenschaften und sind zudem durch charakteristische, mikroskopische und biochemische Veränderungen voneinander abgrenzbar. Die Dauer dieser Phasen variiert jedoch je nach Art des Lebewesens stark. So beträgt die Dauer der inflammatorischen Phase beim Menschen von einer Stunde (h) bis zu vier Tagen, beim Nager ist diese Phase auf eine – 48 h nach Einsetzen der Ischämie begrenzt. Auch die proliferative Phase (28 h – 5 Tage) und die Heilungsphase (5 – 28 Tage) sind bei Nagetieren im Vergleich zum Menschen deutlich verkürzt [7]. Die zellulären Mechanismen der einzelnen Phasen können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Inflammatorische Phase: Die durch die Hypoxämie geschädigten bzw. sterbenden Kardiomyozyten setzen reaktive Sauerstoffspezies frei [7]. Dies führt zu einer Aktivierung von Entzündungsmediatoren, die wiederum neutrophile Granulozyten rekrutieren. Diese wandern in das infarzierte Gewebe ein und entfernen durch Sezernierung proteolytischer Enzyme die zerstörten Zell- und Matrixbestandteile [4, 7]. Zusätzlich fördern die eingewanderten neutrophilen Granulozyten die Migration von Monozyten aus der Milz und dem Knochenmark, welche sich schließlich im Myokard zu Makrophagen differenzieren [8]. Die eingewanderten Monozyten können im murinen Myokard-Modell in zwei verschiedene Monozytenpopulationen

eingeteilt werden. Während der inflammatorischen Phase kommt es zu einer großen Ansammlung von C-C-Chemokinrezeptor Typ 2 (CCR2) Lymphozytenantigen 6C (LY6C)-reichen Monozyten [9]. Diese unterstützen durch Phagozytose sowie Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie z.B. Metallomatrixproteinen den weiteren Säuberungs- und Wundheilungsprozess [10]. Die zweite Monozytenpopulation ist erst im späteren Heilungsverlauf von Bedeutung und wird, wie es scheint, nicht durch neutrophile Granulozyten rekrutiert [4].

2. Proliferative Phase: Während der proliferativen Phase kommt es zum Einstellen der Entzündungsmediatorsynthese [4]. Dabei werden die Entzündungszellen von der zweiten, in das Myokard migrierende Monozytenpopulation abgelöst. Diese zweite Population umfasst pro-reparative CCR2-LY6Clow, CX3C Chemokinrezeptor 1(CX3CR1)-reiche Monozyten, die sich ebenfalls zu Makrophagen differenzieren und neben der Angiogenese, die Akkumulation von Myofibroblasten fördern [4, 8]. Die Myofibroblasten produzieren, nachdem sie aktiviert wurden, Kollagen I und III als Bestandteile der extrazellulären Matrix [11] und sorgen so für den Umbau des geschädigten Myokardiums [12].
3. Heilungsphase: 28 Tage nach dem im murinen Modell ausgelösten Myokardinfarkt, ist das nekrotische Myokard vollständig durch fibröses Gewebe ersetzt [12] und die Kollagenproduktion wird eingestellt. Es kommt zu einer Narbenbildung. Die Kardiomyozyten des nicht-infarzierten Gewebes, die an das Infarktgebiet angrenzen, hypertrophieren. Dies führt letztendlich zu einer Verdickung des linken Ventrikels, um die kontraktile Funktion aufrechtzuerhalten [4].

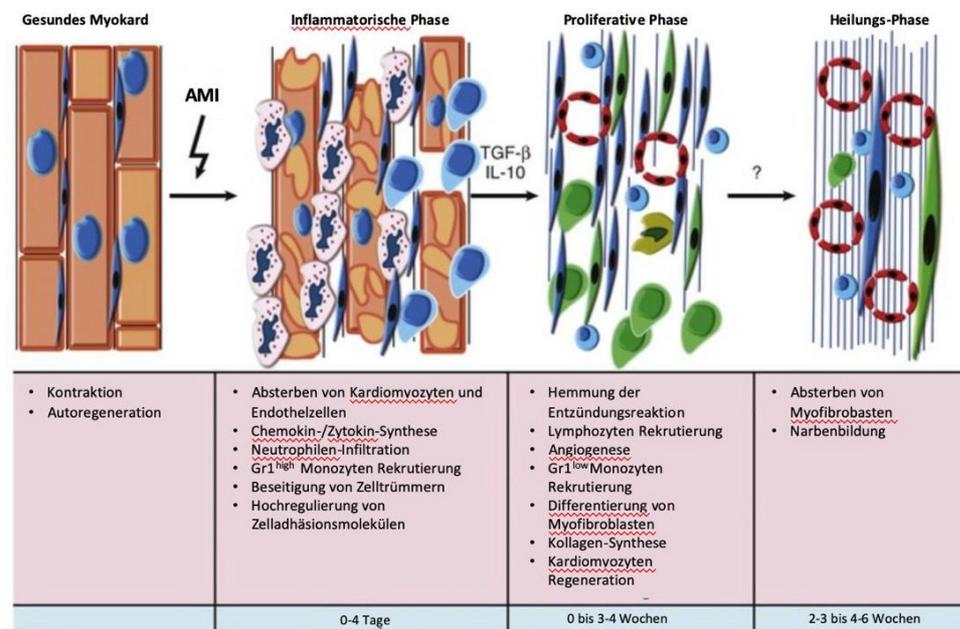


Abb. 2: Zelluläre Prozesse nach Eintritt des akuten Myokardinfarkts.

Die zellulären und biochemischen Prozesse nach myokardialer Ischämie können in drei Phasen gegliedert werden. In der inflammatorischen Phase sterben die Kardiomyozyten und es kommt zur Rekrutierung von Immunzellen. Die proliferative Phase ist durch die allmähliche Differenzierung von Myofibroblasten zu Fibroblasten und dem Beginn der kardialen Remodellierung bestimmt. In der Heilungsphase beginnt die Narbenbildung. Liehn *et al.* 2011, modifiziert [4].

1.1.4 Einteilung des Myokards nach Myokardinfarkt

Das Myokard kann, nach Ischämie-induziertem Infarkt, in drei morphologisch voneinander abgrenzbare Zonen unterteilt werden: die ischämische Zone, die Randzone und die nicht-ischämische Zone (Abb. 3).

Die ischämische Zone ist histologisch durch die abgestorbenen Kardiomyozyten geprägt. Durch die im Infarkt vorherrschende Hypoxie und Azidose kommt es zu einer Stimulation des Komplementsystems. Die aktivierten Leukozyten setzen daraufhin unter anderem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei, welche die Phospholipide der doppelwandigen Zellmembran schädigen [13]. Durch diese, als oxidativer Stress bezeichnete Reaktion, kommt es zu einer Instabilität der Zellmembran, wodurch Wasserionen ins Zellinnere einströmen können. In der Folge kommt es zu einer allmählichen Auflösung der Zellmembran [14]. Im histologischen

Präparat sind 24 h nach dem myokardialen Infarkt daher in der Infarktzone vor allem atypisch geformte Kardiomyozyten mit teilweise zerstörten Zellwänden und dicht beieinander-liegende Zellkerne zu sehen.

Die Randzone ist als das Gebiet definiert, das sowohl an die ischämische Zone als auch an die nicht-ischämische Zone grenzt. Die Kardiomyozyten in dieser Zone gelten zwar als lebensfähig, sie sind jedoch einer hohen mechanischen Belastung ausgesetzt. Diese ergibt sich durch die Lokalisation zwischen den kontraktile Kardiomyozyten der nicht-ischämischen Zone und den nicht-kontraktile Kardiomyozyten der ischämischen Zone. Dadurch kommt es zu weiterem, oxidativem Stress und zur Aktivierung von pro-inflammatorischen Faktoren innerhalb der Kardiomyozyten. Weiterhin führt die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten. Entsprechend führen diese Faktoren vermehrt zur Apoptose der Kardiomyozyten, wodurch es zu einer Ausweitung des Narbengewebes in das Randzonengebiet kommen kann [15].

Die nicht-ischämische Zone steht, getrennt durch die Randzone, nicht in Kontakt mit der ischämischen Zone. In dieser auch als *Remote*-Gebiet bezeichneten Zone, gleichen die Kardiomyozyten morphologisch denen des gesunden Myokards. Die Zellwände und -kerne erscheinen intakt und es lässt sich ein Bienenwaben-ähnlicher Zellverband erkennen. Auf zellulärer Ebene werden die im *remote*-Gebiet liegenden Zellen jedoch ebenfalls indirekt durch die Prozesse der ischämischen Zone beeinflusst [16]. So bewirken die erhöhten physischen, oxidativen und nitrosativen Belastungen auch in der nicht-ischämischen Zone eine reaktive Zellvergrößerung (Hypertrophie).

Da auf lange Sicht gesehen, diese kardiale Hypertrophie zu einer Herzinsuffizienz führen kann [15], ist eine adäquate therapeutische Behandlung des kardialen Gewebes nach einem Myokardinfarkt von größtem Interesse.

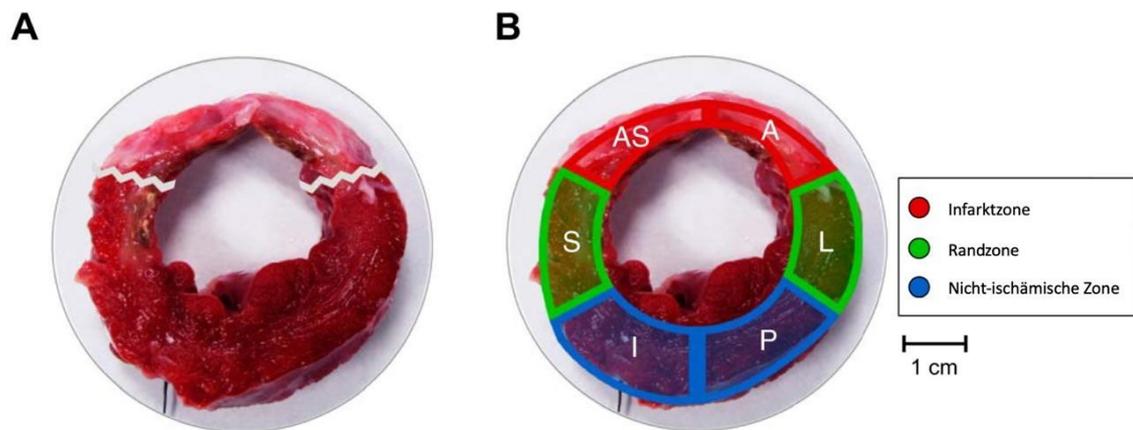


Abb. 3: Definition der histologischen Zonen nach Myokardinfarkt

A + B: Repräsentative Darstellungen des linken Ventrikels, 28 Tage nach Myokardinfarkt. Die weißen Markierungen in A grenzen den Infarktbereich ein. AS = anteriores Septum; S = septal; I = inferior; P = posterior; L = lateral; A = anterior. Torres *et al.* 2018, modifiziert [17].

1.2 Thrombozyten und ihre Rolle in der Pathophysiologie des Myokardinfarkts

1.2.1 Thrombozyten: Morphologie und Funktion

Das murine Blut ist, genau wie das des Menschen, aus drei verschiedenen Zelltypen zusammengesetzt: den Erythrozyten, den Leukozyten und den Thrombozyten. Jeder dieser Zelltypen übernimmt dabei mehrere, für den Organismus existenzielle Aufgaben. Eine gesunde, ausgewachsene Maus besitzt im Durchschnitt ein Blutvolumen von 1,2 - 2,5 Millilitern (ml). Darunter finden sich bis zu 1×10^6 Thrombozyten pro Mikroliter (μl) Blut. Thrombozyten, auch (Blut-)Plättchen genannt, sind mit einem Durchmesser von etwa zwei bis vier Mikrometern (μm), die kleinsten Zellen des Blutes [18]. Diese diskoidal geformten, anukleären Zellen werden im Knochenmark gebildet [19, 20] und zirkulieren für ca. acht bis 12 Tage bei Menschen und drei bis vier Tage bei Mäusen im Blut [21]. Abgebaut werden sie über die Leber und Milz.

Obwohl sie kernlos sind, verfügen Thrombozyten über ein aus Proteinen und Transkriptionsfaktoren aufgebautes Genom [22], durch welches sie in der Lage sind, verschiedene sowohl physiologische als auch pathologische Prozesse zu

initiieren und zu regulieren. Sie sind z.B. maßgeblich an der primären und sekundären Hämostase beteiligt und spielen durch Interaktion mit anderen Zellen eine entscheidende Rolle in inflammatorischen Prozessen.

1.2.2 Der Lebenszyklus der Thrombozyten

Die Produktion von Thrombozyten ist ein komplexer Prozess, der auch als Thrombopoese bezeichnet wird. Auch wenn in der Literatur die Bildung von Thrombozyten zu einem geringen Anteil in der Lunge beschrieben wird [23], findet diese hauptsächlich im Knochenmark statt [19, 24]. Dort herrscht eine spezielle Mikroumgebung, die in eine osteoblastische sowie in eine vaskuläre Nische eingeteilt werden kann [25, 26]. Diese spezielle Mikroumgebung trägt, unter anderem zur Differenzierung und Proliferation der Thrombozytenvorläuferzellen bei. Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) differenzieren sich zu spezialisierten Vorläuferzellen aus, den Megakaryozyten. Dieser Prozess wird hauptsächlich durch Thrombopoietin (TPO), ein Zytokin aus der Familie der Glykoproteine, reguliert, indem es den dazugehörigen Oberflächenrezeptor c-MPL (engl. *myeloproliferative leukemia virus oncogene*) auf den HSZ bindet [9, 24].

Nachdem die Differenzierung vollendet ist, migrieren reife Megakaryozyten von der osteoblastischen in die vaskuläre Nische, und bilden dort pseudopodiale Projektionen aus (s. Abb. 4). Der Ausbildung dieser Zellfortsätze, welche auch als Pro-Thrombozyten (engl. *proplatelets*) bezeichnet werden, folgt die Freisetzung von Thrombozyten aus deren Enden. Dieser Vorgang dauert bei Mäusen in der Regel zwei bis drei Tage und folgt einer Umverteilung der zellulären Strukturen im Zytoplasma der Megakaryozyten [25]. Die finale Ausreifung findet erst nach Freisetzung der Thrombozyten über sinusförmige Blutgefäße in den Blutkreislauf statt [27].

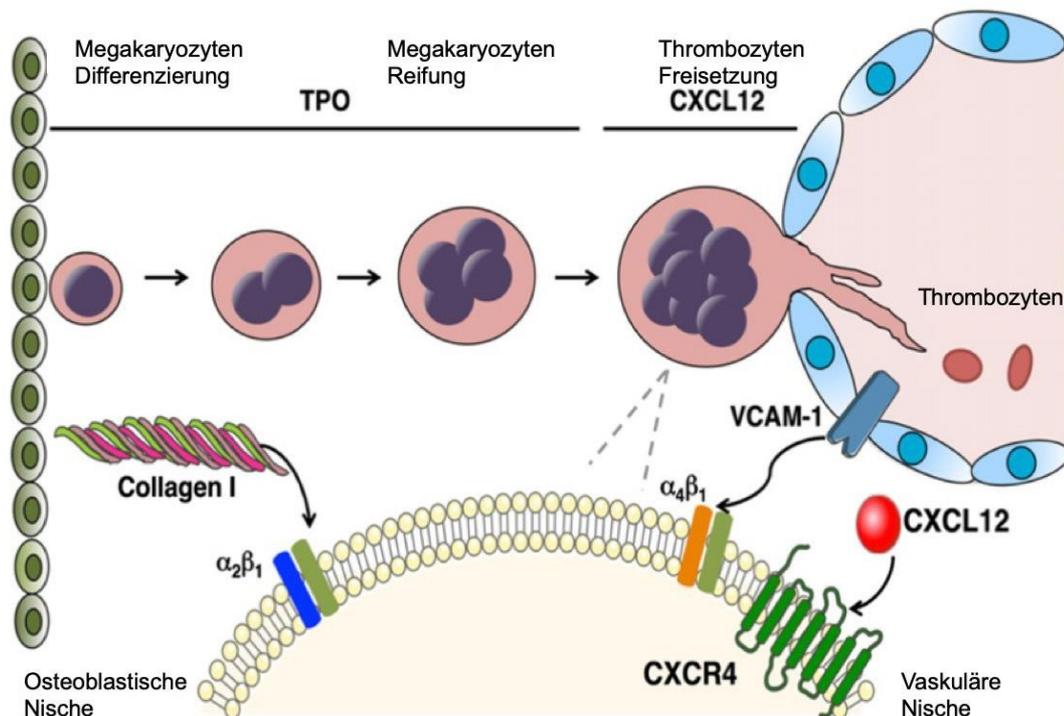


Abb. 4: Schematische Darstellung der Megakaryopoese und anschließender Thrombopoese.

Die Differenzierung der Megakaryozyten aus hämatopoetischen Stammzellen erfolgt im Knochenmark unter Einfluss des Zytokins Thrombopoietin. Die ausgereifte Vorläuferzelle der Thrombozyten migriert in die vaskuläre Nische und lässt dort über Zellausläufer Thrombozyten frei, welche schließlich im Blut vollständig ausreifen. Grozowski *et al.* 2015, modifiziert [24].

Nachdem die Thrombozyten etwa drei bis vier Tage im murinen Blut zirkuliert sind [21], erfolgt ihr Abbau hauptsächlich in der Leber und in der Milz [28]. Verschiedene Mechanismen tragen dabei zur Entsorgung von gealterten oder aktivierten Thrombozyten bei. Beispielsweise wird einer dieser Mechanismen durch bestimmte Lektine in der Leber, wie z.B. dem Ashwell-Morell-Rezeptor (AMR) reguliert. Dieser erkennt die fehlende Sialinsäure an der zum Abbau bereiten Thrombozytenmembran [29, 30].

Ein weiterer Mechanismus besteht darin, dass der Abbau durch autoreaktive Antikörper gegen bestimmte Oberflächenmoleküle der Thrombozyten (z.B. Glykoprotein Ia, (GPIa)) induziert wird. Die so markierten Thrombozyten werden anschließend durch Makrophagen und T-Zellen eliminiert. Außerdem kann die Antikörper-induzierte Markierung ebenfalls zu einer Desialysierung an der

Thrombozytenoberfläche führen, wodurch der Abbau erneut über den hepatischen AMR erfolgt [24]. Neben diesen durch äußere Faktoren regulierten Mechanismen, kann der Thrombozytenabbau auch intrinsisch durch den programmierten Zelltod (Apoptose) erfolgen [28].

1.2.3 Die Bedeutung der durch Thrombozyten sezernierten Mediatoren

Dass Thrombozyten neben ihren konventionellen Hauptaufgaben, wie beispielsweise der Beteiligung an der Hämostase, weitere Funktionen ausführen, ist bereits seit einigen Jahren bekannt. So konnte bereits eine Beteiligung der Thrombozyten an entzündlichen Prozessen wie Arteriosklerose und rheumatoider Arthritis, bzw. auch eine Beeinflussung der Neogenese von Gefäßen und Lymphgefäßen, sowohl im gesunden, als auch im tumorösen Gewebe nachgewiesen werden [31-33].

In den Thrombozyten befinden sich spezifische Speichervesikel, sogenannte Granula, die eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Gerinnungsaktivatoren enthalten. Bei der Aktivierung der Thrombozyten werden diese Inhaltsstoffe exozytotisch ins Blut sezerniert. Dieser Ausschüttungsvorgang ist ein essentieller Schritt für eine intakte primäre Hämostase.

Man unterscheidet zwischen α -Granula, dichter Granula und lysosomaler Granula [31]. Diese Organellen weisen nicht nur eine jeweils unterschiedliche charakteristische Morphologie auf, sondern unterscheiden sich auch in der Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe. Auf diese funktionelle Heterogenität, die sich aus metabolischen Funktionen der Thrombozyten ergibt, konnte bereits im Jahr 1969 anhand von unterschiedlicher Thrombozytengröße und -dichte rückgeschlossen werden [34]. Außerdem konnte 1999 von Heijnen *et al.* die Existenz zweier Populationen von Membranvesikeln nachgewiesen werden [35].

Unterschieden werden sich von der Thrombozytenmembran abschnürende, ca. 100 Nanometer (nm) bis zu einem μm große Mikrovesikel (engl. *platelet microparticles*, PMP) und Exosomen (ES). ES sind mit einer Größe von etwa 40 bis 100 nm deutlich kleiner und von endosomaler Herkunft [35]. Auch der Inhalt der Vesikel unterscheidet sich. So konnten mittels Westernblotanalysen bereits über

300 verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Signalinduktionen als Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichervesikel identifiziert werden [31].

Neben Proteinen enthalten PMPs und ES auch verschiedene Lipide und nicht-kodierende Mikro-RNA-Fragmente (mikro-Ribonukleinsäure, engl. micro-ribonuclein acid, (miRNA), durch welche ein Eingriff in das Genom von verschiedenen Zellen des vaskulären Systems möglich ist. Eine Studie aus dem Jahr 2013 von X. Cao *et al.* untersuchte beispielsweise den Einfluss der von Thrombozyten sezernierten miRNA-29a auf den Wiedereintritt in den Zellzyklus von Kardiomyozyten [36].

1.2.4 Die Rolle der Thrombozyten während des Myokardinfarktes

Kommt es in Folge eines Herzinfarktes sowohl bei Mäusen als auch beim Menschen nach der Ischämie zu einer inflammatorischen Reaktion (s. 1.1.3), so sind die durch Thrombozyten sezernierten PMPs und ES maßgeblich an der Rekrutierung der Immunzellen in das infarzierte Gewebe beteiligt [37] (s. Abb. 5).

Die Sezernierung der α -Granula enthaltenen Inhaltsstoffe wie ADP, ATP, Ca^{2+} sowie Proteinen und Enzymen ist eine direkte Folge der bei der Thrombusbildung auftretenden Immunreaktion. Zum einen werden eine Vielzahl von Chemokinen (z.B. Histamin) und Zytokinen (z.B. Interleukin- 1β) freigesetzt. Zum anderen werden spezifische Oberflächenrezeptoren (z.B. Glykoprotein-Ib α und P-Selektin) exprimiert, welche eine Interaktion mit Leukozyten erleichtern [38].

Beispielweise führt die Aktivierung der Thrombozyten durch Adenosindiphosphat (ADP) zur P-Selektin-Freisetzung aus der α -Granula. Während des Sekretionsprozesses wird die Vesikelmembran in die Zellmembran der Thrombozyten integriert. Das intrazellulär in der α -Granula gespeicherte P-Selektin gelangt somit an die Thrombozytenoberfläche. Dort kommt es anschließend, durch Ausbildung des P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL-1) zur Aggregatbildung mit Immunzellen, insbesondere mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten [38, 39].

Nach der akuten Phase folgt die proliferative Phase, in welcher die pro-inflammatorische Zytokinausschüttung gehemmt wird und es zu einem Wiederaufbau der extrazellulären Matrix durch aktivierte Myofibroblasten kommt.

Außerdem kommt es zu einem Wechsel der inflammatorischen (Typ-1) Makrophagen zu den residenten, die Heilung fördernden (Typ-2) Makrophagen [40]. Der Wechsel von pro- zu anti-inflammatorischen Signalen wird ebenfalls durch verschiedene, von Thrombozyten freigesetzte Mediatoren, wie beispielsweise Maresin 1, unterstützt. Maresin 1 ist ein sogenannter SP-Mediator (engl. *specialized pro-resolving mediator*, SPM) welcher sich aus Omega-3-Fettsäuren ableitet. In einer Studie von Lannan *et al.* konnte nachgewiesen werden, dass Maresin 1, die Freisetzung von P-Selektin unterdrückt [41]. Dies deutet daraufhin, dass Maresin 1 die Entzündungsreaktion hemmt und somit die Heilungsphase einleitet.

Die Fibroblastenaktivierung in der proliferativen Phase erfolgt ebenfalls zum Teil durch Mediatoren der Thrombozytengranula. Um das verloren gegangene Myokardgewebe durch die Bildung von kollagenem Gewebe zu ersetzen, muss eine Differenzierung der Fibroblasten zu Myofibroblasten erfolgen. Serotonin sowie der transformierende Wachstumsfaktor beta 1 (TGF- β 1) konnten bereits als Mediatoren der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten identifiziert werden [42, 43].

Auch eine Auswirkung auf die nach Ischämie verbliebenen Kardiomyozyten durch Thrombozyten wird in der Literatur beschrieben, hauptsächlich durch die in PMPs und ES vorhandene mi-RNA. So konnte gezeigt werden, dass mi-RNA-1 die Differenzierung von kardialen Vorläuferzellen zu Kardiomyozyten unterstützt [44]. Auch mi-RNA-126 wird eine positive Wirkung auf die nach der Ischämie folgende Angiogenese zugeschrieben [45].

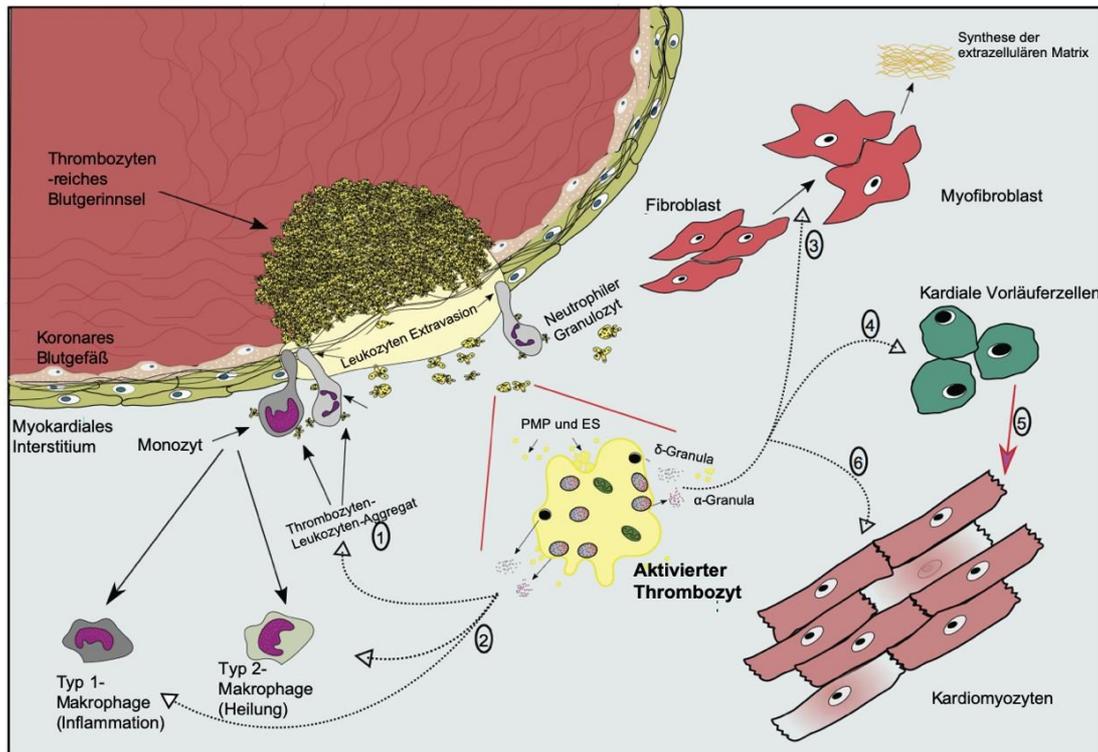


Abb. 5: Rolle der Thrombozyten-Mediatoren während/nach Myokardinfarkt.

Darstellung verschiedener Stoffwechselprozesse während/nach Myokardinfarkt, reguliert durch die sezernierte Fracht aktivierter Thrombozyten. Walsh *et al.* 2018, modifiziert [46].

1.2.5 Die Bedeutung von Thrombozyten während des Heilungsprozesses nach Myokardinfarkt und der Einfluss der Thrombozyten auf die Angiogenese

Die Wundheilung nach akutem Myokardinfarkt geht mit einer angiogenen Reaktion einher. Dabei kommt es zur Bildung eines dichten Kapillarnetzes, welches von der Randzone ausgehend bis in den Infarktkern reicht. Durch das neu gebildete Gefäßsystem können Entzündungszellen, wie beispielsweise neutrophile Granulozyten, schneller zum Zielort gelangen und dort, durch weitere Freisetzung von pro-angiogenen Faktoren (z.B. Interleukin-8) das Ausmaß des Gewebsschadens beeinflussen [47, 48].

Die angiogene Reaktion wirkt sich im Falle des akuten Myokardinfarkts positiv auf die Infarktheilung aus. Durch die schnelle Bereitstellung von Nährstoffen kann eine effiziente Versorgung der noch aktiven Kardiomyozyten erfolgen. Dieser Mechanismus vermindert die Schäden der vorausgegangenen Nekrose und dient dem Erhalt der Inotropie [48].

Die Bildung neuer Blutgefäße beginnt mit der Aussprossung von Endothelzellen, welche sich sowohl untereinander als auch mit der extrazellulären Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM) verknüpfen. Die Zellverknüpfungen werden durch verschiedene enzymatische Stoffwechselprozesse ermöglicht und führen zu einem hydrolytischen Umbau der ECM.

Es gibt drei Haupttypen von Endothelzellen: Spitzen-, Stiel- und Phalanxzellen [49]. Während des angiogenen Vorgangs sind vor allem die Spitzen- und Stielzellen von Bedeutung. Sie sind am äußeren Rand der Blutgefäße lokalisiert und setzen eine Reihe von pro-angiogenen Faktoren frei. Dazu gehören unter anderem der vaskuläre, endotheliale Wachstumsfaktor (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) der Fibroblasten-Wachstumsfaktor und der Wachstumsfaktor aus Thrombozyten (engl. *platelet derived growth factor*, PDGF) [50].

Der Prozess der Gefäßneubildung nach Myokardinfarkt wird hauptsächlich durch die vorausgegangene Hypoxie stimuliert. Durch den Sauerstoffverlust kommt es zu einer Aktivierung der mikrovaskulären Endothelzellen unter Expression einer Vielzahl von Zelloberflächenintegrinen, die sich an verschiedene Matrixproteine anheften können. Auch die Rekrutierung von Immunzellen zum Infarktgebiet beeinflusst die nachfolgenden, angiogenen Prozesse [51]. So konnte in der Vergangenheit eine Beteiligung von neutrophilen Granulozyten und Mastzellen nachgewiesen werden [52, 53].

Aus anderen Krankheitskontexten ist auch die Beteiligung von Thrombozyten an Stoffwechselprozessen der Angiogenese bekannt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die α -Granula der Thrombozyten auch angiogene Faktoren, wie VEGF, enthält und dass die ausgeschüttete Menge dieser Faktoren dabei variieren kann [54, 55]. Ob die Thrombozyten, die beim Myokardinfarkt vor allem inflammationsfördernde Aufgaben erfüllen, einen positiven oder negativen Einfluss auf die Angiogenese während der Infarktheilung haben ist bislang noch nicht ausreichend erforscht.

1.3 Die *mT/mG;Pf4-Cre* Mauslinie

1.3.1 Das *Cre/loxP*-System zur spezifischen DNA-Exzision

In der heutigen Zeit ist es möglich, durch molekularbiologische Methoden die genetische Information der chromosomalen Desoxyribonukleinsäure (engl. *desoxyribonucleic acid*, DNA) durch gezieltes Hinzufügen oder Ausschalten von Genen zu verändern und damit bestimmte physiologische sowie pathologische Prozesse weitergehend zu analysieren. Insbesondere die genetische Modifikation muriner DNA ist zum jetzigen Zeitpunkt ein in der Wissenschaft häufig genutztes Mittel, um bestimmte zelluläre Prozesse sichtbar zu machen.

Beim *Cre/loxP*-Rekombinationssystem wird das aus Bakteriophage P1 stammende Cre-Rekombinase-Gen in das murine Genom eingebaut und unter der Kontrolle zellspezifischer Promotoren exprimiert [56]. Die Cre-Rekombinase ist in der Lage, gezielt Gensequenzen herauszuschneiden und somit die Transkription dieses Genabschnittes zu verhindern. Markiert wird dieser Genabschnitt durch sogenannte *loxP*-Sequenzen, wodurch sich ein für die Cre-Rekombinase vorbestimmter chromosomaler Locus für das Herausschneiden von spezifischen Abschnitten und das nachträgliche Zusammenführen der homologen DNA-Stränge ergibt. Die *loxP*-Sequenzen sind aus 34 Basenpaaren zusammengesetzte DNA-Sequenzabschnitte. Aufgebaut sind diese Abschnitte aus einem zentralen asymmetrischen Abschnitt von acht Basenpaaren und zwei flankierenden Abschnitten, die aus 13 Basenpaaren aufgebaut sind und sowohl vorwärts- als auch rückwärts gelesen werden können [57]. Der hinter der Rekombination stehende Mechanismus beruht darauf, dass ein Rekombinase-Molekül je eine Pallindrom-Einheit der *loxP*-Sequenz bindet. Durch die darauffolgende Bildung einer tetrameren Struktur kommt es zu einer Zusammenführung beider *loxP*-Sequenzen, sodass nach der Rekombination die zwei übrig gebliebenen komplementären Hälften eine verbleibende *loxP*-Sequenz bilden [58]. Die stereochemische Konfiguration der *loxP*-Sequenzen -*cis* oder *trans*- ist für das Ergebnis der Cre-vermittelten Rekombination verantwortlich. So kann es bei einer *cis*-Konfiguration zu einer Exzision oder Inversion des umrahmten Sequenzabschnittes kommen. Bei einer *trans*-Konfiguration der *loxP*-Bindungssequenzen kann durch die Cre-Rekombinase eine gezielte Insertion von DNA-Fragmenten oder eine Chromosomen-Translokation katalysiert werden [57]. Von Nagy *et al.* konnte 1998 gezeigt werden, dass eine spezifische Rekombination stattfindet, wenn die *loxP*-Sequenzen in gleicher Orientierung, also in *cis*-Konfiguration, vorliegen [57].

1.3.2 Thrombozytenfaktor 4 als Promotor für das *Cre/loxP*-Rekombinase-System

Der Thrombozytenfaktor 4 (engl. *platelet-factor 4*, Pf4) ist ein Polypeptid, welches in der α -Granula von Thrombozyten und Megakaryozyten gespeichert ist und nach Aktivierung der Zelle als Mediator zur Regulierung von pro- und anti-inflammatorischen Prozessen beiträgt. Das dazugehörige Gen, auch *CLCX4* genannt, wird in der megakaryozytären Zelllinie exprimiert, weshalb sich dessen Promotor zur Generierung von Transgenen in dieser Linie eignet [59].

Zur Generierung von transgenen Mäusen, welche die Cre-Rekombinase ausschließlich in der megakaryozytären Linie exprimieren, wurde in einer Studie von Thiedt *et al.* im Jahre 2007 mit Hilfe eines Klons des bakteriellen künstlichen Chromosoms (BAC) eine Cre-cDNA an die Stelle des ersten Exons des Pf4 eingesetzt. Der so erhaltene Mausstamm wurde nachträglich mit anderen, genetisch veränderten Mausstämmen gekreuzt und jeweils die spezifische Markierung der Thrombozyten untersucht. Dabei konnte beispielsweise nach Kreuzung mit Mäusen mit *loxP*-flankierten Integrin β -1-Sequenzen in der nachfolgenden Analyse eine vollständige Exzision dieses Integrins in den Thrombozyten der Mäuse nachgewiesen werden [60].

1.3.3 Die *mT/mG;Pf4-Cre*-Reportermaus

Um die Fragestellung dieser Arbeit zu untersuchen wurde eine globale doppelt fluoreszierende Cre-Reportermaus *mT/mG* (B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sor^{tm4}(ACTB-tdTomato,-EGFP)^{Luo}/J) mit einer *Pf4-Cre* Maus (C57BL/6-Tg(Pf4-icre)Q3Rsko/J) gekreuzt. Dabei wurde das oben beschriebene *Cre/loxP*-System zur Generierung einer effizienten Mauslinie genutzt. Die *mT/mG;Cre*-Reportermaus besitzt einen *loxP*-flankierten Genabschnitt welcher ein membranständiges Tandemdimer tdTomato (*mT*), sowie das membranständige grün fluoreszierende Protein EGFP (*mG*) enthält. Die *mT/mG;Pf4-Cre*-Maus exprimiert vor der Cre-vermittelten Exzision tdTomato in allen Gewebszellen. Dadurch kommt es unter anderem zu Rot fluoreszierenden Zellen bei fehlender Cre-Rekombinase (*Pf4-Cre negative*

Mäuse). Durch das Vorhandensein einer aktiven Cre-Rekombinase kommt es zur Exzision des *mT*-Genabschnittes und nur noch *mG* wird in Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert. Infolgedessen weisen *mT/mG;Pf4-Cre-positive* Mäuse grün fluoreszierende Thrombozyten auf, wobei alle restlichen Zellen rot fluoreszieren (s. Abb. 6).

In früheren Studien konnte eine nahezu ubiquitäre Expression des *mT/mG* Reporters nachgewiesen werden [61], sodass sich bereits vorab verschiedene Annahmen für die Analyse der verwendeten Mauslinie ergaben. So konnte angenommen werden, dass die anderen untersuchten Blutzellen (Erythrozyten und Leukozyten) immer rot fluoreszieren und nur die spezifisch markierten Thrombozyten bei vorhandener Cre-Rekombinase grün.

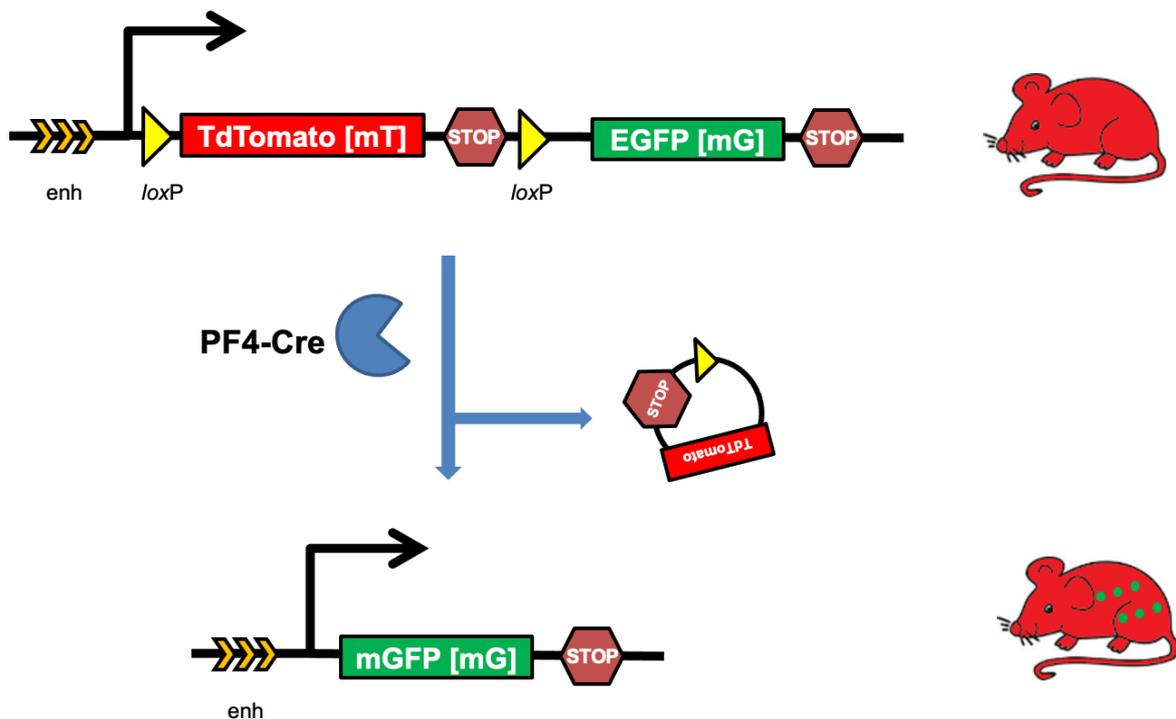


Abb. 6: Cre-Rekombinase Aktivität im *loxP*-flankierten *mT/mG*-Genabschnitt.

Schematische Darstellung der Cre-Rekombinase im *mT/mG*-Genabschnitt. Bei aktiver Cre-Rekombinase wird der *loxP*-flankierte Gen-Abschnitt *tdTomato* ausgeschnitten, sodass nur der *EGFP* Genabschnitt in Thrombozyten und Megakaryozyten transkribiert wird. Krüger *et al.* 2021, modifiziert [62].

1.4 Zielsetzung

Es ist bekannt, dass Thrombozyten eine maßgebliche Rolle während der inflammatorischen Phase nach einem Myokardinfarkt spielen und die Stoffwechselprozesse hauptsächlich durch die von Thrombozyten sezernierten Faktoren gesteuert werden. Ob sich die Zellen dabei auch im infarzierten Gewebe anreichern oder von extern diese Prozesse beeinflussen ist noch nicht ausreichend geklärt.

Daher war das Ziel dieser Arbeit, die Lokalisation der Thrombozyten im Myokardgewebe zum Zeitpunkt der Inflammation (24 h nach Myokardinfarkt) visuell darzustellen. Dies erfolgte über ein genetisch verändertes Mausmodell, welches durch grün fluoreszierende Thrombozyten die Möglichkeit bietet, ohne viele weitere immunologische Färbungen zu arbeiten. Dadurch wurde die Manipulation der Präparate sehr gering gehalten und ein möglichst unverfälschtes visuelles Bild generiert. Außerdem sollte der Nutzen des verwendeten *mT/mG;Pf4-Cre* Mausmodells für weitere Analyse Zwecke der Thrombozyten im Herzgewebe untersucht werden.

Zusätzlich zur Thrombozyten-Lokalisation sollte auch eine mögliche Kolo-kalisation der Thrombozyten mit Makrophagen im Infarktgebiet untersucht werden, um anschließend weitere Anhaltspunkte für die Interaktionen der Thrombozyten mit anderen Immunzellen zu erhalten.

Außerdem wurde in einem zweiten Versuchsaufbau der Einfluss der Thrombozyten auf die Angiogenese zum Zeitpunkt der Heilungsphase (5 bis 21 Tage nach Myokardinfarkt) analysiert um daraus einen möglichen therapeutischen Nutzen zur Förderung der Myokardheilung zu gewinnen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Arbeitsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

| Gerät | Model | Firma | Katalognummer |
|---------------------|------------------------------------|---|--------------------------|
| Ampuwa® Wasser | Plastipur | Fresenius Kabi | # B23067A |
| Blutsammel-Röhrchen | BD Vacutainer® sodium citrate tube | BD Biosciences | # 367714 |
| FACS - Röhrchen | 5 ml, 75 x 12 mm | Sarstedt | #55.1579 |
| Deckgläser | 24 x 60 mm | Engelbrecht Medizin - und Labortechnik GmbH | #k12460 |
| Falkon-Röhrchen | 50 ml | Corning Science | # 352070 |
| Spritzen | 2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, | B-Braun | # 9166017V # 4606205V |
| Multipette | | Eppendorf AG | # 4982000012 |
| Skalpell | | Neolab | # 11566 |
| Objektträger | 76 x 26 x 1 mm | Paul Marienfeld GmbH | # 1000612 |

Tabelle 2: Geräte

| Gerät | Model | Firma (Sitz) |
|---|----------------------------------|------------------|
| Automatischer Hämatologie-Analysator | KX-21N | Sysmex |
| Durchflusszytometer | BD FACS-Calibur | Becton Dickinson |
| Inkubator | D06059 Modell 300 | Memmert |
| Kryostat | CM3050S | Leica |
| Lichtmikroskop | Axioskop | Zeiss |
| Lichtmikroskop Kamera | Axiocam 506 color | Zeiss |
| LSM (konfokales Laser Scanning Mikroskop) | LSM 880 | Zeiss |
| LSM (konfokales Laser Scanning Mikroskop) | LSM 510-META | Zeiss |
| Magnetrührer | RET basic | IKA Labortechnik |
| Mikrowelle | NN-E201WM | Panasonic |
| pH-Meter | WTW pH526 | Xylem Inc. |
| Stromquelle | PowerPac TM Universal | Bio-Rad |
| Waagen | DKD-K-100502 | Sartorius |
| | AE166 | Mettler |
| Wasserbad | GFL 1052 | GFL |
| Zentrifuge(n) | 5415C | Eppendorf AG |
| | 5424R | Eppendorf AG |
| | 2-16P | Sigma |

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 3: verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Firma |
|---|----------------------------|
| Isotonische Natriumchloridlösung (0,9 % NaCl) | Fresenius Kabi AG |
| 4-2-Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure (HEPES) | Carl ROTH GmbH |
| 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) | Roche Diagnostics |
| Acetat (CH ₃ COOH) | Sigma-Aldrich |
| Aqua dest. | Otto Fischer GmbH |
| Apyrase | Sigma-Aldrich |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich |
| Calciumchlorid (CaCl) | Sigma-Aldrich |
| Chloroform | Sigma-Aldrich |
| Citronensäure (C ₆ H ₈ O ₇) | Sigma-Aldrich |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich |
| Eosin | Carl ROTH GmbH |
| Ethanol 100% (EtOH) | Merck Millipore |
| Goat Serum | Bio & Sell |
| Hämalaun (Hämatoxylin) | Carl ROTH GmbH |
| Heparin-Natrium-25000 | Rathipharm GmbH |
| Isofluran | Piramal critical care |
| Methanol 100% (MeOH) | Merck Millipore |
| Mounting Medium ProLong™ Diamond Antifade Mountant | Thermo Fisher Scientific |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma-Aldrich |
| Tissue-Tek® O.C.T.™ compound | Sakura Finetek Europe B.V. |
| Paraffin | Carl ROTH GmbH |
| Paraformaldehyd 4% phosphatgepuffert, pH 7 | Carl ROTH GmbH |
| PBS (Phosphate buffered saline) | Sigma-Aldrich |

| | |
|----------------------|--------------------------|
| Proteinase-Inhibitor | Roche Diagnostics |
| Proteinase K | Thermo Fisher Scientific |
| RNase-1 | Thermo Fisher Scientific |
| ROTI® Histokitt | Carl ROTH GmbH |
| ROTI® Histol | Carl ROTH GmbH |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich |
| Tween® 20 | Merck Millipore |
| β-Mercaptoethanol | Carl ROTH GmbH |

2.1.3 Antikörper

Tabelle 4: verwendete Primärantikörper

| Antikörper | Firma |
|--|--------------------------|
| PECAM-1 (MEC 13.3) antibody | Santa Cruz Biotechnology |
| Mac-3 antibody | BD Biosciences |
| Purified Rat anti mouse CD31 | BD Biosciences |
| Rat IgG2b kappa Isotype Control (eB149/10H5) | Thermo Fisher Scientific |

Tabelle 5: verwendete Sekundärantikörper

| Antikörper | Firma |
|---|--------------------------|
| Alexa Fluor 647 goat anti rat-IgG | Life technologies |
| Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor™ 647 Conjugate | Thermo Fisher Scientific |
| MOM Biotinylated Anti-Mouse igG Stock-Solution | Dako GmbH |

Tabelle 6: Antikörper für die Durchflusszytometrie

| Antikörper | Firma |
|--------------------------------------|------------------|
| APC Rat Anti-Mouse TER-119 | BD Biosciences |
| DyLight649-labeled anti-mouse GPIIbα | Emfret Analytics |
| APC Rat anti-mouse CD45 | BD Biosciences |

2.1.4 Kits

Tabelle 7: verwendete Kits

| Kit | Firma |
|------------------|--------------------------|
| LSAB2 system-HRP | Dako GmbH |
| M.O.M. Kit | Thermo Fisher Scientific |

2.1.5 Lösungen und Puffer

Ohne besonderen Vermerk wurden alle Lösungen und Puffer mit destilliertem Wasser angesetzt.

Tabelle 8: verwendete Lösungen und Puffer

| Puffer/Lösung | Zusammensetzung |
|-----------------------------------|--|
| Blockierlösung | 1% (m/v) BSA in PBS |
| Citratpuffer | 41 ml 0.1 M tri-Na-Citrat 9 ml 0.1 M Citronensäure 450 ml Aqua dest. pH 6.0 |
| DAB - Lösung | Liquid DAB + Substrate Chromogen System |
| Entkalkifizierungs-Puffer | 10% EDTA PBS pH 8.0 |
| Heparin-Lösung (20 U/ml) | 40 µl Heparin-Natrium 5000 I.E. 10 ml PBS |
| Muriner Tyrode Puffer, Stock | 134 mM NaCl 12 mM NaHCO ₃ 2.9 mM KCl 0.34 mM Na ₂ HPO ₄ 20 mM HEPES 10 mM MgCl ₂ 5 mM glucose 0.2 mM CaCl ₂ pH 7,35 |
| TBS (Tris buffered saline), Stock | 15,8 g Trizma-HCl 45 g NaCl ad 1 L dH ₂ O pH 7,6 |
| TBS-T | 100 mL 5x TBS-Puffer 500 µL Tween 20 400 mL dH ₂ O |

2.1.6 Software

Tabelle 9: verwendete Software

| Software | Firma |
|---------------------------------|-----------------------|
| FlowJo Single Cell Analysis v10 | FlowJo LLC |
| Graph Pad Prism 8.02 | GraphPad Software |
| Microsoft Office 2017 | Microsoft Corporation |
| ZEN 2012 (blue) | Zeiss |
| AxioVision Rel. 4.8 | Zeiss |

2.2 Versuchstiere

Alle Tierversuche in dieser Arbeit wurden an Mäusen durchgeführt, sodass ausschließlich mit murinem Probenmaterial gearbeitet wurde. Diese Nagetiere sind genetisch und immunologisch sehr gut erforscht und zeichnen sich durch einen kurzen Generationswechsel und eine hohe Vermehrungsrate aus. Daher lassen sich Mäuse mit genetisch verändertem Erbgut relativ einfach erzeugen und sind zeitnah als geeignetes Tiermodell für menschliche Krankheiten verfügbar [63]. Zahlreiche Mausmodelle wurden erfolgreich entwickelt, um die Rolle der Blutplättchen, der Blutgerinnungsproteine, des Endothels und der Gefäßwand bei der Thrombusbildung in Mäusen zu erforschen [64]. Bei den etablierten Mutanten ist das Resultat der genetischen Veränderung bezüglich des Phänotyps bekannt und wissenschaftliche Ergebnisse an der Maus lassen sich hervorragend auf den Menschen übertragen und erweitern den Kenntnisstand über die Physiologie und der Pathologie in komplexen biologischen Systemen [65]. Für die Generierung des Probenmaterials wurden die Mäuse getötet und die wissenschaftliche Fragestellung wurde mittels Präparationsschnitten der Herzen, sowie angefertigten Paraffin-Asservaten von Leber, Milz und Femur untersucht.

Alle in diesem Projektvorhaben untersuchten Tiere stammen aus der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Alle Mäuse wurden dort unter spezifiziert pathogen-freien Bedingungen, entsprechend den Richtlinien der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA), gehalten. Alle Tiere

hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser und Futter und wurden einem geophysiologicalen, 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt.

Die Blut- und Organentnahmen erfolgten ausschließlich durch Angestellte im Labor, welche die Qualifikation nach FELASA B besitzen. Entsprechend wurde in dieser Arbeit nur mit Endprobenmaterial gearbeitet. Alle Experimente mit Mäusen wurden gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und der EU Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt. Zudem besteht eine Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) mit dem Aktenzeichen AZ 84-02.04.2015.A558.

2.2.1 Wildtypischer Mausstamm C57BL/6J

Der Wildtypmausstamm *C57BL/6J* ist der am häufigsten verwendete genetische Hintergrund für gentechnisch veränderte Maustämme. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden *C57BL/6J* Mäuse von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) als Kontrollgruppe eingesetzt [66].

2.2.2 (Pf4-cre) Q3Rsko/J Gt (Rosa) 26Sort^{tm4}(ACTB-tdTomato-EGFP)Luo/J Mäuse

Diese Mauslinie zeichnet sich durch die Expression von grün fluoreszierendem Protein (engl. *enhanced green fluorescent protein*, EGFP) in Megakaryozyten und Thrombozyten aus (s.1.3.3). Die Anregung von EGFP erfolgt bei einer Wellenlänge von 395-475 nm und die nachfolgende Emission bei einer Wellenlänge von 509 nm. Dadurch können die Thrombozyten ohne eine weitere Färbung einwandfrei durch Fluoreszenz detektiert werden.

Zur Züchtung dieser transgenen Mauslinie wird eine doppelt fluoreszierende Cre-Reportermaus *mT/mG* (B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sort^{tm4}(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J) mit einer Megakaryozyten/Thrombozyten-spezifischen *Pf4-Cre*-Maus (C57BL/6-Tg(Pf4-icre)Q3Rsko/J) gekreuzt [61, 60]. Die *mT/mG*-Maus exprimiert vor der Cre-vermittelten Exzision das membranständige Tandem-Dimer tdTomato (*mT*) und nach der Cre-vermittelten Exzision das membranständige grün-fluoreszierende

Protein EGFP (*mG*). Infolgedessen weisen *mT/mG;Pfl4-Cre positive* Mäuse grünfluoreszierende Thrombozyten auf. Thrombozyten der *mT/mG;Pfl4-Cre negativen* Mäusen produzieren das tdTomato-Protein und sollen daher, wie alle andere Zellen in diesem Tier, nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 554-561 nm und einer Emission bei 581 eine rote Fluoreszenz aufweisen.

2.2.3 Akute versus chronische Thrombozytopenie im Mausmodell

Im zweiten Versuchsaufbau dieser Arbeit wurden mit Paraffin-Asservaten des Myokards von zwei Mausmodellen mit induzierter Thrombozytopenie gearbeitet. Die Thrombozytenzahlen beider Modelle wurden zuvor mit Hilfe des automatischen Hämatologie-Analysators (Sysmex Corporative, Kobe, Japan) bestimmt.

MPL^{-/-}-Mäuse (B6;129S1-Mpl^{tm1Wsa}) zeichnen sich durch einen genetischen *knock-out* des Thrombopoietin-Rezeptors c-MPL aus [67]. Der c-MPL ist maßgeblich an der Thrombopoese beteiligt (s. 1.2.2). Durch Ausschaltung dieses Gens weisen *MPL*^{-/-}-Mäuse, gegenüber dem Wildtypstamm nur noch ca. 10% der basalen Thrombozytenzahl auf (s. Abb. 18). Entsprechend simuliert dieses Modell eine chronische Thrombozytopenie.

Im Vergleich dazu wurde mit Paraffin-Asservaten des Myokards von C57BL/6J-Mäusen mit Antikörper induzierter Thrombozytopenie gearbeitet (*Depl.*). Die Thrombozytendepletion wird dabei durch die Injektion eines Anti-GPIa-Antikörpers, oder des dazugehörigen IgG-Kontrollantikörpers 24 h vor dem experimentellen Myokardinfarkt erreicht [68]. Dadurch kommt es zu einer kurzzeitigen Reduktion von >99% der Thrombozyten (s. Abb. 18). Dieses Mausmodell repräsentiert somit eine akute Thrombozytopenie.

2.2.4 Blutentnahme

Die zu untersuchenden Mäuse wurden vorab mit dem volatilen Inhalationsanästhetikum Isofluran in einer Kammer narkotisiert. Isofluran (ISO1) ist

ein Anästhetikum mit einer vergleichsweise mäßigen kardiodepressiven Wirkung und wird daher häufig im Tierversuchsmodell verwendet [96].

Mit Hilfe einer heparinisierten Glaskapillare erfolgte anschließend die Entnahme des Blutes über den retrobulbären Venenplexus in 300 µl Heparin. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Blut bei 37 °C im Inkubator gelagert. Eine erneute Blutentnahme fand frühestens nach einer zwei Wochen andauernden Ruhephase der Mäuse statt und war in einem solchen Falle eine finale Blutentnahme unter Narkose, um die Belastung des Tieres so gering wie möglich zu halten.

2.2.5 Generierung von Blutaussstrichen

Für die histologische Charakterisierung der *mT/mG;Pf4-Cre*-Mäuse wurden zunächst Blutaussstriche angefertigt. Diese wurden anschließend für die weitere Analyse fixiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) gefärbt. Für die Anfertigung der Blutaussstriche wurde jeweils ein Tropfen des zuvor entnommenen und in 300 µl Heparin verdünnten Blutes auf einen Objektträger gegeben. Für die spätere Auswertung ist eine plane Darstellung der Blutzellen erforderlich. Um einen möglichst dünn auslaufenden Blutfilm für die zweidimensionale Darstellung der Zellen zu erzeugen, wurde der Tropfen mit einem zweiten, abgerundeten Objektträger verstrichen. Dazu wurde dieser schräg in einem 45°-Winkel an den Blutropfen des unteren Objektträgers gelegt und der sich an die Kante anlegende Blutstreifen mit einer schnellen Wischbewegung auf dem Objektträger verteilt. Der Ausstrich wurde bei Raumtemperatur (RT) ca. 10 Minuten (min) getrocknet und anschließend fixiert. Die Fixierung erfolgte mit einem Methanol / H₂O₂-Gemisch im Verhältnis 9:1. Dafür wurde die Fixierlösung 30 Sekunden lang auf die Objektträger pipettiert und zwei Mal mit Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen.

Nach der Fixierung wurden die Blutaussstriche mit DAPI blau gefärbt, um die kernhaltigen Blutzellen (Leukozyten) zu markieren. Dazu wurde die 1:30-Stocklösung auf 1:3000 in PBS verdünnt und die Schnitte für 5 min bei RT inkubiert. Das Eindeckeln der Präparate erfolgte nach einem Waschvorgang mit PBS mit dem Mounting-Medium ProLong™ Diamond Antifade Mountant

(Thermo Fisher Scientific). Das Mounting Medium wurde gewählt um die Haltbarkeit der Fluoreszenz zu verlängern.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (engl. *fluorescence activated cell sorting*, FACS) ist ein seit den 1960er Jahren in der Biologie etabliertes besonders leistungsfähiges Messverfahren, welches eine quantitative Analyse von Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und (Auto-)Fluoreszenz anhand emittierter Fluoreszenzstrahlung auf Einzelzellebene erlaubt. Neben der Messung der physikalischen Eigenschaften der Zellen ermöglicht die Methode auch eine Unterscheidung von einzelnen Zellpopulationen. Das Prinzip beruht auf einer ausgelösten Antigen-Antikörper-Reaktion, welche nach Zugabe von spezifischen, mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern zu der zu untersuchenden Zellsuspension erfolgt. Die zu analysierenden Zellen der Suspension werden durch einen Hüllstrom einzeln an einem gebündelten Laserstrahl mit definierter Wellenlänge vorbeigeleitet, wobei das von den einzelnen Zellen reflektierte Licht, in Form von Photonen, durch einen Photodetektor emittiert wird. Dabei korreliert die emittierte Photonenkonzentration mit der Menge an gebundenen Antikörpern. Außerdem wird die Lichtbeugung und -streuung gemessen, was Rückschlüsse auf die Größe und Granularität der jeweils gemessenen Zelle zulässt. Neben den Daten, die man durch Fluoreszenzanregung erhält, werden zusätzliche Informationen aus den Anteilen des Seitwärtsstreulichts (engl. *side scatter*, SCC) und des Vorwärtsstreulichts (engl. *forward scatter*, FSC) in jeweils eigenen Kanälen gemessen (s. Abb. 7). Das SSC verhält sich proportional zur Granularität bzw. der Vesikelmenge in der Zelle während das FSC die Beugung des Lichtes im flachen Winkel angibt und mit der Zellgröße korreliert.

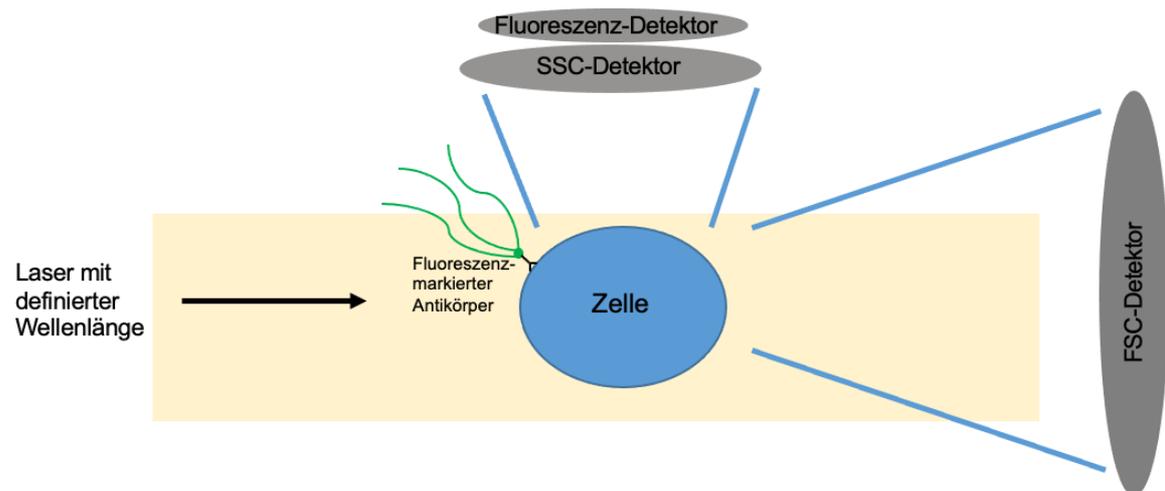


Abb. 7: Schematische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse einer Zellsuspension.

Die Zelle wird hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz-Eigenschaften untersucht. Dabei ermittelt der FSC-Detektor die Zellgröße und der SSC-Detektor die Granularität der Zelle. Außerdem werden die Fluoreszenzsignale der zur Markierung verwendeten Antikörper über spezielle Detektoren miterfasst.

Eine gleichzeitige Messung verschiedener Zellpopulationen, wie es üblicherweise bei einer physiologischen Zellsuspension wie etwa Blut der Fall ist, ist durch die Verwendung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen zur Markierung der Antigene möglich. Die Farbstoffe werden zwar mit Licht derselben Wellenlänge angeregt, verfügen aber über unterschiedliche Emissionsspektren, die dem jeweiligen Farbstoff und somit auch der jeweils markierten Zellpopulation zugeordnet werden können [69, 70].

Da mit einer transgenen Mauslinie gearbeitet wurde, deren Zellen entweder durch tdTomato im roten Bereich oder EGFP im grünen Bereich fluoreszierten, wurden in diesem Projektvorhaben ausschließlich Allophycocyanin (APC) gelabelte Antikörper zur Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen des murinen Blutes genutzt. APC wird durch Licht einer Wellenlänge von 594 bis 633 nm angeregt. Das Absorptionsmaximum liegt bei 650 nm, das Emissionsmaximum bei 660 nm [97]. Eingesetzt wurden ein APC-Ter-119 Antikörper zur Markierung der Erythrozyten (APC Rat Anti-Mouse TER-119, BD Bioscience), ein APC-CD45-Antikörper zur Bestimmung der Leukozyten (APC Rat anti-mouse CD45, BD Bioscience) sowie ein APC-GPIIb-Antikörper, welcher an den GPIIb-Rezeptor der Thrombozyten bindet (DyLight649-labeled anti-mouse GPIIb α , Emfret Analytics).

Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 496 nm, grünes Licht (Wellenlänge ca. 520 bis 530 nm) emittiert. Die in dieser Arbeit verwendete Mauslinie *mT/mG;Pf4-Cre* verfügt, wie bereits in 1.3.3 beschrieben, über eine Thrombozyten-spezifische Cre-Recombinase und ist entsprechend dem genetischen Modell durch EGFP grün-fluoreszierend. Die im Durchflusszytometer ermittelten GPIb-positiven Zellen, können nun mit einer Auswertung im FITC-Kanal hinsichtlich der EGFP-Fluoreszenz untersucht werden. Dabei würde eine Übereinstimmung von GPIb-positiven und FITC-positiven Zellen für eine spezifische Markierung der Thrombozyten bei *Pf4-Cre positiven* Mäusen (= aktive Cre-Rekombinase) sprechen [71, 72].

Phycoerythrin (PE), kommt natürlicherweise in Cyanobakterien und den Rotalgen Rhodophyceae vor und ist ein akzessorisches Pigment der Photosynthese. Durch ein zentrales Kupferatom im Proteinkomplex des Phycoerythrin, wird nach Anregung rotes Licht mit einer Wellenlänge zwischen 496-555 nm emittiert [73] und kann im sogenannten PE-Kanal des Durchflusszytometers gemessen werden.

Neben dem FITC Kanal zur Detektion der grünen EGFP-Fluoreszenz wurde auch der PE Kanal zur Detektion der roten tdTomato-Fluoreszenz genutzt. Ein zu erwartendes Ergebnis für die *mT/mG;Pf4-Cre* wären PE-Signale ausgehend von allen Zellpopulationen in den *Pf4-Cre negativen* Proben, sowie PE-positive Signale von Erythrozyten und Leukozyten in *Pf4-Cre-positiven* Proben.

Für den Versuch wurde zunächst eine Kalzium (Ca^{2+})-freie Tyrode-Lösung angesetzt. Dazu wurden 18 ml Aqua destillata (A. dest.), mit 1 ml 20 x Tyrode Stocklösung, 200 μl 0,1 Molar (M) Magnesium-Chlorid (MgCl_2), 200 μl Glucose (10 %) und 720 μl Rinderserumalbumin (BSA) (10 %) gemischt. Die Tyrode wurde im Anschluss mit Natronlauge (NaOH) 0,1 M auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C gelagert.

Die Blutproben der Versuchstiere wurden vor Beginn der Messung ebenfalls bei 37 °C auf Körpertemperatur gehalten.

Die Proben der *mT/mG;Pf4-Cre positiven* und *mT/mG;Pf4-Cre negativen* Tiere wurden zur Vorbereitung für die Messung drei Mal mit der angesetzten Tyrodelösung gewaschen, um das darin enthaltene Heparin zu entfernen. Nach jedem Waschvorgang mit 500 μl Ca^{2+} -freier Tyrode-Lösung wurden die Proben 5

min lang bei 650 g zentrifugiert und der Überstand anschließend abpipettiert. Vor jedem erneuten Zentrifugieren wurden die am Boden des Reaktionsgefäßes verbleibenden, zellulären Bestandteile, das Pellet, in 500 µl frischer Tyrode-Lösung aufgenommen.

Im letzten Schritt wurden die Proben nochmals mit 500 µl Tyrode vermischt und auf ein erneutes Zentrifugieren verzichtet.

In FACS-Röhrchen wurden in der Zwischenzeit je 3 µl der APC gelabelten Antagonisten (Ter-119, GPIb oder CD45) vorgelegt und mit 27 µl der murinen Probenlösung versehen. Nach lichtgeschützter, 15-minütiger Inkubationszeit bei 37 °C wurde der Reaktionsvorgang mit 300 µl PBS abgestoppt und die Proben mit dem BD FACS-Calibur Durchflusszytometer einzeln analysiert. Für die Auswertung der Erythrozyten und Thrombozyten wurden jeweils 10.000 positive Ereignisse gemessen. Bei den Leukozyten wurde die Auswertung, aufgrund der geringeren Leukozytenzahl im Blut, auf 2.000 Ereignisse beschränkt. Die Datenauswertung erfolgte über FlowJo (FlowJo Single Cell Analysis v10, FlowJo LLC).

2.2.7 Die histologische Untersuchung der transgenen Maus

Für die histologischen Untersuchungen wurden sehr dünne, gefärbte Gewebeschnitte hergestellt und anschließend unter einem Mikroskop analysiert. Die Organe der analysierten Tiere wurden zuvor in einem Kryomedium (Tissue-Tek® O.C.T.TM compound, Sakura Finetek) eingebettet und anschließend mit dem Kryostaten zu Organschnitten mit einer Schichtdicke von 5 µm verarbeitet. Nach einer anschließenden (immun-)histologischen Färbung wurden die Proben hinsichtlich der Fragestellung weiter untersucht.

2.2.8 Organentnahme und Fixierung von Mausherzen in Tissue-Tek

Für die Organentnahme wurden die Mäuse getötet und die infarzierten Herzen wurden für die nachfolgenden histologischen Analysen im Anschluss an die Tötung in Tissue-Tek® O.C.T.TM compound eingebettet. Dazu wurden die Tiere zuvor mit Ketamin [100 mg / kg] / Xylazin [10 mg / kg] anästhesiert. Die Tötung erfolgte über eine Eröffnung des Thorax und die darauffolgende Spülung des Herzens mit 4 ml

Heparinlösung (20 U / ml in PBS, Roche). Mit einer Kanüle wurde die Lösung in die Apex cordis des linken Ventrikels appliziert bei eröffnetem rechten Vorhof für eine Spülung des gesamten Kreislaufs. Die Heparinspülung verhindert die vorzeitige Aggregation des Blutes, was für eine weitere Analyse der Thrombozyten im Gewebe unerlässlich ist. Anschließend wurden die Blutgefäße durchtrennt, das gesamte Herz entnommen und in 4 °C kaltes PBS gelegt. Danach wurden beide Vorhöfe entfernt und das Herz nativ in dem Kryo-Medium eingebettet. Das Einbetten der Herzen erfolgte über Trockeneis, wodurch ein langsames Hochfrieren des Kryo-Mediums gewährleistet werden konnte. Dadurch konnte das äußerst empfindliche Myokardgewebe vor Einrissen durch einen zu schnellen Temperaturwechsel geschützt werden. Nachdem die entnommenen Herzen vollständig in dem gefrorenem Kryo-Medium eingebettet waren, wurden die Präparate bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C im Tiefkühlschrank gelagert.

2.2.9 Fixierung der Femur-, Milz- und Leberproben

Aus forensischen Gründen, und für die nachfolgende Analyse der transgenen Linie wurden den getöteten Mäusen neben dem Myokard auch Milz-, Leber- und Femurproben entnommen. Die Einbettung der Organe erfolgte hierbei mit Paraffin. Dazu wurden alle Proben bis auf die Femuren nach der Entnahme zunächst für maximal sieben Tage in 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei 4 °C fixiert. Für den weiteren Einbettvorgang wurden die Präparate in Einbettkassetten überführt und über folgendes Protokoll mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert:

- 12 h in 70% Ethanol (EtOH) bei 4 °C
- 2 h in 80% EtOH bei RT
- 2 h in 90% EtOH bei RT
- 2 h in 96% EtOH bei RT
- 2 h in 100% EtOH bei RT

Nach der Entwässerung und einer 12-stündigen Inkubation in RotiHistol bei RT erfolgte das Einbetten in flüssigem Paraffin. Die Proben wurden nach vollständiger Aushärtung für weitere Analysezwecke bei RT gelagert.

Die Femuren der Tiere wurden vor dem Einbettvorgang zunächst vier Wochen in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) bei 4 °C entkalkifiziert. Das anschließende Einbetten der Femuren erfolgte nach demselben Protokoll wie das der Milz- und Leberproben.

2.2.10 Herstellung von Kryoschnitten

Die im Kryo-Medium eingebetteten Herzen wurden mit Hilfe eines Kryotoms (Leica CM3050 S Cryostat, Leica Microsystems) zu Gewebeschnitten mit einer Schichtdicke von je 5 µm verarbeitet. Für den Schneidevorgang wurde der Tissue-Tek® - Block in die Vorrichtung des Kryostaten eingespannt und die gewünschte Schnittdicke über den Monitor eingestellt. Danach wurde der Block parallel zur eingespannten Kryostatklänge ausgerichtet und mittels Hand- oder Fußpedal in der eingestellten Schnittdicke geschnitten. Für das infarzierte Herz wurden zuvor 10 Ebenen definiert. Jede Ebene umfasste dabei 20 Schnitte à 5 µm. Zwischen den Ebenen wurden jeweils 20 Schnitte mit je 5 µm verworfen bevor die nächste Ebene geschnitten wurde. Ebene 1 definierte die ersten 20 Schnitte, angefangen an der Apex cordis. Durch die konische Form des Herzmuskels wurde der Durchschnitt der Schnitte mit jeder Ebene größer, wodurch zwar eine bessere Beurteilung des infarzierten Gewebes in den höheren Ebenen möglich war, jedoch erhöhte sich dadurch auch die Einriss-Quote der Schnitte durch die Zunahme des nekrotischen Gewebes. Daher wurden für das Projektvorhaben ausschließlich die Ebenen 3-5 mit je 20 Schnitten à 5 µm ausgewählt.

Die Schnitte wurden jeweils mit einem Objektträger aufgenommen und bei RT zwischengelagert. Die anschließende Langzeitlagerung der Präparate erfolgte bei -80 °C im Tiefkühlschrank. Für die Versuche wurden die Proben jeweils 30 Minuten vor Versuchsbeginn bei RT wieder aufgetaut.

2.3 Definition von Infarkt - und *Remote*-Gebiet

2.3.1 Die Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gilt als klassische Übersichtsfärbung für Zell- und Gewebestrukturen in der Histologie. Dabei werden zwei Farbstoffe, das basische Hämalaun und das saure Eosin, eingesetzt. Diese Farbstoffe reagieren aufgrund ihrer pH-Eigenschaften mit unterschiedlichen Bestandteilen des zu untersuchenden Gewebes. So wird durch die Reaktion des Hämalauns mit sauren Gewebestrukturen, wie beispielsweise der Zellkerne, eine blaue Farbreaktion ausgelöst. Das Eosin reagiert vorzugsweise mit basischen Zell- und Gewebebestandteilen, wie beispielsweise Zytoplasmaproteinen. Bei der Reaktion entsteht eine typische Rotfärbung. So können Gewebe- und Zellveränderungen mit dem Durchlichtmikroskop erfasst und analysiert werden. Für die Unterscheidung zwischen der Infarkt- und *Remote*-Zone wurden die Kryoschnitte zunächst bei Raumtemperatur aufgewärmt und anschließend über eine 10-minütige Einlage in 4 °C kaltem Aceton fixiert. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in Hämalaun-Lösung inkubiert. Nach ca. 20 s Inkubationszeit in 1 % Salzsäure (HCl) / 70 % EtOH erfolgte ein 10-minütiges Waschen der Schnitte unter fließendem Leitungswasser. Anschließend wurden die Schnitte für 20 s in 1 %ige Eosin Lösung gelegt und danach mittels der in 2.2.9 beschriebenen aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Eingedeckt wurde mit Roti-Histokitt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des ZEISS Axio Observer D1 Mikroskops mit 20- und 40-facher Vergrößerung.

2.3.2 Die Wheat-Germ-Agglutinin Färbung (WGA)

Diese Färbung ist eine in der Biologie verwendete Methode um den Gewebeverband darzustellen. Weizenkeim-Agglutinin (engl. *wheat germ agglutinin*, WGA) ist ein Lektin mit einem Molekulargewicht von 38 kDa, welches in der Lage ist Glykosaminoglykane, wie sie beispielsweise in der Zellmembran vorkommen, zu binden. Fluoreszenzfarbstoffe mit definierten Anregungs- und Emissionsspektren können mit WGA hochspezifische Konjugate bilden. Dadurch ist es möglich den

Zellverband in seiner Struktur detailliert darzustellen und zu analysieren. Nach dem Myokardinfarkt verändert sich der im Myokard unter physiologischen Bedingungen herrschende, „Bienenwaben“-ähnliche Zellverband. Durch Stickstoffmonoxid (NO)-Freisetzung kommt es in Folge des starken osmotischen Drucks, zu einer allmählichen Auflösung der Zellwände der Kardiomyozyten. In Folge dessen akkumulieren die freien Zellkerne und es herrscht eine insgesamt ungeordnetere Struktur durch den aufgelösten Zellverband.

In dieser Arbeit wurde die WGA-Färbung genutzt um den Übergang von Infarktzone zu nicht-infarziertem Gewebe (*Remote-Zone*) darzustellen. Dazu wurden die Kryopräparate der zu untersuchenden Herzen zunächst bei RT angetaut und anschließend mit kaltem Aceton fixiert. Um die darzustellenden Zellwände für die Färbung zu permeabilisieren, folgte eine 12-minütige Inkubation mit Proteinase K (Thermo Fisher Scientific Inc.) in Tris / HCl (1:10000), sowie eine 20-minütige Inkubation mit RNase I in PBS (Thermo Fisher Scientific Inc., 1:200000) bei 37 °C. Zwischen den beiden Inkubationsvorgängen wurden die Präparate mit PBS gespült. Für die darauffolgende Zellmembranfärbung mit dem WGA-Farbstoff (Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor™ 647 Conjugate, Thermo Fisher Scientific Inc.) wurde jeweils ein Tropfen des Antikörpers unverdünnt auf die Schnitte gegeben und 30 min in einer lichtundurchlässigen Feuchtigkeitskammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und mit dem Mounting Medium eingedeckt.

2.4 Immunfluoreszenz-Analysen

2.4.1 Die PECAM-Immunfluoreszenz Färbung

Um zu untersuchen, ob die im Myokard befindlichen Thrombozyten in der inflammatorischen Phase nach Myokardinfarkt intra- oder extravaskulär lokalisiert sind, wurde eine immunhistologische PECAM-1 (CD31)-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die kryokonservierten Herzpräparate der *mT/mG;Pf4-Cre* sowie die Wildtyp-Hezen der *C57BL/6J* Mäuse zunächst 30 min bei RT aufgetaut und in 4 °C kaltem Aceton fixiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit übersättigter Blockierlösung (5 % BSA, 5 % Ziegenserum in PBS) bei RT. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen weitestgehend geblockt und somit die

spezifische Bindung der Primärantikörper optimiert. Die Primärantikörper (Purified Rat anti mouse CD31, BD, 1:75) wurden in verdünnter Blockierlösung (1 % BSA, 1 % Ziegenserum in PBS) gelöst und anschließend für 1 h bei RT in einer lichtundurchlässigen Feuchtigkeitskammer inkubiert. Respektive wurde nach gleichem Protokoll eine Immunglobulin G (IgG)-Kontrolle für die Färbung verwendet (IgG2b kappa Isotype Control (eB149/10H5); Thermo Fisher Scientific Inc., 1:50). Die Schnitte wurden drei Mal für je 5 min mit PSB gewaschen, bevor eine Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 647 goat anti rat-IgG, Life technologies, 1:50) für 1 h bei RT erfolgte. Nach einem erneuten Waschvorgang mit PBS und anschließender DAPI-Färbung wurden die Schnitte, wie bereits im Vorfeld beschrieben wurde, für die visuellen Analysen fixiert. Die anschließenden *Laser-Scanning-Microscope* (LSM-)Aufnahmen erfolgten in 63 x Vergrößerung mit dem Konfokalmikroskop LSM 880 (ZEISS). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Zen Blue (ZEN 2012 (blue), ZEISS).

2.4.2 Die Mac3-Immunfluoreszenzfärbung

Neben der Analyse der extra- bzw. intravaskulären Thrombozyten in der Infarktzone 24 h nach Infarkteinleitung, war es in dieser Arbeit von Interesse die Lagebeziehung der Thrombozyten zu Makrophagen, zu untersuchen. Verschiedene Studien stellten bereits Thesen auf, die eine Art „Huckepack“-Transport der Thrombozyten über die Makrophagen aus dem Gefäß in das paravaskuläre Gewebe beschreiben [74]. Um eine mögliche Ko-Lokalisation der beiden Zelltypen nachzuweisen, wurden die Kryoschnitte der *mT/mG;Pf4-Cre* Tiere ebenfalls mit einem Mac3-Primärantikörper (Mac-3 antibody, BD Biosciences, 1:75) inkubiert. Das Protokoll der Färbung entsprach dem Protokoll der PECAM-1-Immunfluoreszenzfärbung in Kapitel 2.4.1, jedoch wurde die Blockierlösung für diese Färbung in 0,3% Triton-PBS Lösung angesetzt. Zur Visualisierung der Färbung wurde der mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierte Sekundärantikörper (Alexa Fluor 647 goat anti rat-IgG, Life technologies, 1:50) ebenfalls für 1 h bei RT in der Feuchtigkeitskammer inkubiert und die Schnitte anschließend DAPI gefärbt und fixiert. Die Bildaufnahmen sowie die Auswertung der Bilder erfolgten ebenfalls wie bereits in 2.4.1 beschrieben.

2.4.3 Die Zusammenführung der immunhistologischen Färbemethoden auf Folgeschnitten der Herzpräparate

Durch das eingeschränkte Absorptionsspektrum des Fluoreszenzmikroskops und der überlappenden Absorptionsspektren der verwendeten Fluoreszenz-markierten Antikörper war es in diesem Versuch nicht möglich, eine gleichzeitige, visuelle Darstellung der einzelnen Färbemethoden vorzunehmen. Um die angefärbten Zellen dennoch in einen gemeinsamen Kontext zu bringen, wurden Folgeschnitte der einzelnen Herzpräparate mit verschiedenen Färbungen gefärbt und ein durch Orientierungspunkte im Präparat (Gefäße, Randbereiche) definierter Bildausschnitt für das Zusammenführen der unterschiedlich gefärbten Herzen gewählt.

In Abb. 8 wird dies beispielhaft anhand eines Schemas für einen WGA-gefärbten Schnitt (1) und einen CD31-gefärbten Folgeschnitt (1') gezeigt. Die Aufnahmen wurden nach erfolgter Färbung der Präparate mit dem LSM 880 (ZEISS) aufgenommen, die anschließende Auswertung erfolgte über die Software Zen 2012 (Blue), ZEISS.

Um die beiden Schnitte (1 und 1') miteinander vergleichen zu können, wurde in diesem Fall eine Gefäßengstelle (orangener Pfeil) als morphologischer Orientierungspunkt gewählt. Aus der zu untersuchenden Übersichtsaufnahme wurde ein passender Bildausschnitt vergrößert dargestellt und für die visuelle Auswertung graphisch nebeneinander positioniert.

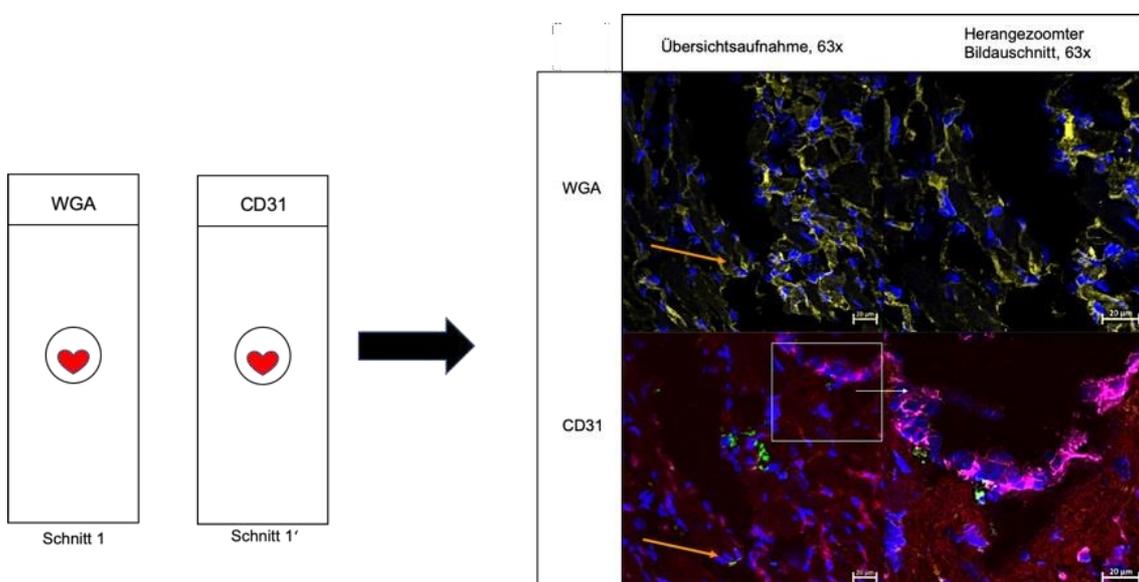


Abb. 8: Beispielhafte Darstellung der Zusammenführung der etablierten Färbemethoden in Folgeschnitten desselben Myokards.

2.5 Immunhistochemische Färbemethoden

2.5.1 Die Pecam-DAB-Färbung

Für die histochemische Markierung von Gefäßepithelzellen in Paraffinschnitten muriner Herzen wurde eine Immunperoxidase-Färbemethode gewählt. Diese Färbung beruht auf einer chemischen Reaktion zwischen einer an den Sekundärantikörper bindenden Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) und dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die Bindung der HRP an den Sekundärantikörper beruht auf der Bildung eines Avidin-Biotin-Komplexes: Der verwendete Sekundärantikörper ist dabei an das Biotin gekoppelt und bindet das Avidin, welche mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Kommt es zur Zugabe von DAB, wird dieses durch die Peroxidaseaktivität der HRP oxidiert. Dies führt zur Bildung eines unlöslichen Präzipitats, welches unter dem Lichtmikroskop in brauner Farbe sichtbar wird. Die HRP markiert also nach Zugabe von DAB den Antikörper-Antigen-Komplex im sichtbaren Licht.

Die Paraffinschnitte der im zweiten Teil dieser Arbeit untersuchten Mäuse (MPL-*knock-out* Mäuse, *MPL*^{-/-} und *MPL*^{+/+}) und Thrombozyten-depletierte Mäuse (*Depl.* und *IgG*) wurden mit Hilfe dieser Färbemethode im zeitlichen Profil nach dem Myokardinfarkt gefärbt, mit dem Ziel die Gefäßneubildung zu analysieren.

Dazu wurden alle Schnitte zunächst 30 min bei 50 °C im Inkubator hitzefixiert. Anschließend erfolgte das Entparaffinieren über eine absteigende Alkoholreihe. Dazu wurde das folgende Protokoll verwendet:

- 10 min in RotiHistol bei RT
- 2 x 2 min in 100 % EtOH bei RT
- 2 min in 96 % EtOH bei RT
- 2 min in 90 % EtOH bei RT
- 2 min in 70 % EtOH bei RT

Die Präparate wurden anschließend kurz in A. dest. neutralisiert und danach drei Mal für je 5 min in einem zuvor angesetzten Citrat-Puffer bei 600 Watt in der

Mikrowelle erhitzt um die Antigene vor Inkubation zu demaskieren. Danach erfolgten drei Waschvorgänge mit PBS (jeweils 5 min) und eine nachfolgende 15- minütige Einlage der Präparate in einer 3 % H₂O₂ / Methanol-Lösung. Vor der Inkubation mit Blockierlösung erfolgte ein 5-minütiges Waschen der Herzen mit T-PBS (Tween®20) und PBS-Lösung.

Da es bei Verwendung von Antikörpern derselben Spezies wie der zu untersuchenden Proben häufig zu einer starken Hintergrund-Färbung kommt, wird oft mit einem spezifischen Puffer gearbeitet. Dieser blockiert unspezifische Bindungsstellen. In diesem Fall wurde dazu ein Maus-spezifischer Puffer (engl. „Mouse on Mouse“-buffer, MOM-Puffer) verwendet. Das MOM Mouse IgG Blocking Reagent (Thermo Fisher Scientific) wurde zunächst in PBS gelöst (1:30) und der Puffer 1 h bei RT inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit PBS erfolgte die 30-minütige Inkubation des Erstantikörpers (PECAM-1 (MAC 13.3) antibody, Santa Cruz Biotechnology Inc., 1:50) bei RT. Der Erstantikörper bzw. die IgG-Kontrolle (Mouse(G3A1) mAb IgG1 Isotype Control, Thermo Fisher Scientific) wurde dazu mit einer vorher angesetzten Verdünnungslösung aus MOM-Proteinkonzentrat Stock-Lösung in PBS (1:12) weiter auf ein Verhältnis 1:50 verdünnt. Nach dem erneuten Waschen mit PBS erfolgte eine 10-minütige Inkubation des Sekundärantikörpers (MOM biotinylierte Anti-Maus IgG Stock-Lösung). Dieser wurde ebenfalls vor Inkubation mit MOM-Diluent verdünnt (1:250). Danach wurde nach erneutem Waschen mit PBS das dritte Reagenz in Form der Streptavidin-gekoppelten HRP (Avidin/Streptavidin/HRP-Detektionssystem, Dako GmbH) für 45 min bei RT inkubiert. Erneut wurden alle Präparate mit PBS gewaschen und anschließend die für die Farbreaktion verantwortliche DAB-Lösung (25 µl Chromogen + 500 µl Puffer aus dem DAKO-Kit) dazu gegeben. Nach ca. 5 min war die Farbreaktion abgeschlossen und die Präparate wurden nach kurzer Neutralisierung mit A. dest. für 6 min mit purem Hämalaun gegengefärbt und anschließend 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Präparate wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe fixiert und anschließend mit Roti-Histokitt eingedeckt. Das Protokoll der für die Fixierung verwendeten Alkoholreihe war wie folgt:

- 30 Sekunden (s) in 70 % EtOH bei RT

- 30 s in 96 % EtOH bei RT
- 2 min in 100 % EtOH bei RT
- 3 min in RotiHistol bei RT

2.6 Statistische Auswertung

Die Anzahl der untersuchten Individuen ist mit n bezeichnet. Die graphische Auswertung der Daten erfolgte in Form von Balkendiagrammen. Die dabei eingezeichneten Fehlerbalken geben den Mittelwert (MW) \pm SEM (engl. *standard error of mean*) an.

Bei einer geringen Stichprobenmenge wie in der vorliegenden Arbeit können keine statistisch relevanten Normalverteilungstests erfolgen.

Da ausschließlich mit Wurfgeschwistern (*mT/mG;Pf4-Cre* positiv und *mT/mG;Pf4-Cre* negativ mit/ohne Myokardinfarkt) gearbeitet wurde, die sich genetisch kaum voneinander unterscheiden, geht man von einer Normalverteilung aus. Entsprechend wurden parametrische Tests (T-Test und Two-way ANOVA) verwendet.

Werte für $p \leq 0.05$ wurden als statistisch signifikant bewertet. Die Kennzeichnung erfolgte nach den folgenden Signifikanzniveaus: $p \leq 0.05$ *, $p \leq 0.01$ **, $p \leq 0.001$ ***.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der transgenen Mauslinie *mT/mG;Pf4-Cre*

Die komplexen Vorgänge bei der Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung können mit Hilfe von *in vitro* Methoden nur unzureichend simuliert werden. Daher werden auch Tiermodelle verwendet, um ein besseres Verständnis zu erlangen. Insbesondere die Entwicklung von transgenen Thrombozyten-spezifischen Mauslinien, welche einen zell- oder gewebespezifischen Knockout von Schlüsselgenen aufweisen, hat sich dabei als vorteilhaft erwiesen.

In einer Reihe von Studien wurde die erstmals von Tiedt *et al.* beschriebene „Pf4-Cre“-Mauslinie eingesetzt, in der ein kurzer Promotor für den Plättchenfaktor 4 (*Pf4*) an das Transgen für das Enzym Cre-Rekombinase (*Cre*) gekoppelt ist. Da *Pf4* insbesondere in Megakaryozyten exprimiert wird, welche Vorläuferzellen von Thrombozyten sind, bleibt die *Cre*-Expression auf diese Zelltypen beschränkt [60]. Für detaillierte Untersuchungen sind auch transgene Mauslinien vorteilhaft, bei denen die Tiere fluoreszierende Reporterproteine im Zellgewebe exprimieren, welche dann mittels moderner Bildgebungsverfahren untersucht werden können. Bereits 2007 wurde von Muzumdar *et al.* die transgene doppelt-fluoreszierende Cre-Reportermauslinie *mT/mG* gezüchtet [61]. Diese Maus exprimiert das rot fluoreszierende tandem dimer Tomato (*mT*) Protein ubiquitär auf allen Zellmembranen, solange der entsprechende DNA-Abschnitt vorhanden ist. Falls es zu einer Expression von Cre-Rekombinase kommt, wird das tdTomato kodierende Gen in der ausgewählten Zelllinie entfernt und das gewünschte Zielgewebe bzw. Zelltyp durch das grün fluoreszierende EGFP (*mG*) markiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine thrombozytenspezifische Mauslinie *mT/mG;Pf4-Cre* als Modell verwendet, um einen visuellen Einblick in verschiedene Vorgänge bei der Thrombozytenaktivierung nach akuten Myokardinfarkt zu ermöglichen. Dazu wurde die von Muzumdar *et al.* beschriebene doppelt-fluoreszierende Cre-Reportermauslinie *mT/mG* mit *Pf4-Cre*-Mäusen gekreuzt.

Eine solche *mT/mG;Pf4-Cre*-Maus exprimiert vor der Cre-vermittelten Exzision *tdTomato* in allen Gewebszellen, was zu einer roten Fluoreszenz in den *Pf4-Cre* *negativen* Mäusen führt. Gemäß unserer Arbeitshypothese wird nach der Aktivierung der Cre-Rekombinase der *mT*-Genabschnitt aus dem Mausgenom entfernt und daraufhin wird ausschließlich *mG* in Megakaryozyten und Thrombozyten exprimiert. Infolgedessen sollten sich in *mT/mG;Pf4-Cre* *positiven* Mäusen grün fluoreszierende Thrombozyten nachweisen lassen, während für alle restlichen Zellen das Auftreten einer roten Fluoreszenz erwartet wird.

Ziel der nachfolgend beschriebenen Untersuchungen war es, zu prüfen, inwieweit diese transgene Mauslinie dazu geeignet ist, die Vorgänge, die während der Thrombozytenaktivierung und -aggregation ablaufen, aufzuklären. Dazu wurden immunohistochemische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Blutzellen und Gewebeschnitten an diesen Tieren durchgeführt und mit jeweiligen Proben, die vom Wildtypstamm erhalten wurden, verglichen. In weiterführenden Experimenten wurde außerdem untersucht, inwieweit die *mT/mG;Pf4-Cre*-Mäuse als Modell geeignet sind, um die extravaskuläre Einwanderung der Thrombozyten in das Myokard in der akuten Entzündungsphase visuell darzustellen.

3.1.1 Fluoreszenzaufnahmen von Blutaussstrichen des peripheren Blutes

In Vorarbeiten für die vorliegende Arbeit wurde die Spezifität der Cre-Rekombinase kontrolliert, indem Blutproben des peripheren Blutes der Mäuse entnommen und diese hinsichtlich ihrer Blutzellen (Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten) differenziert und morphologisch untersucht wurden. Analysen der *tdTomato*- und EGFP-Fluoreszenz der so erhaltenen Proben einer *mT/mG;Pf4-Cre* *positiven*, einer *mT/mG;Pf4-Cre* *negativen* und eines Wildtyp-Mausstamms (*C57Bl6/J*) wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt (Abb. 9)

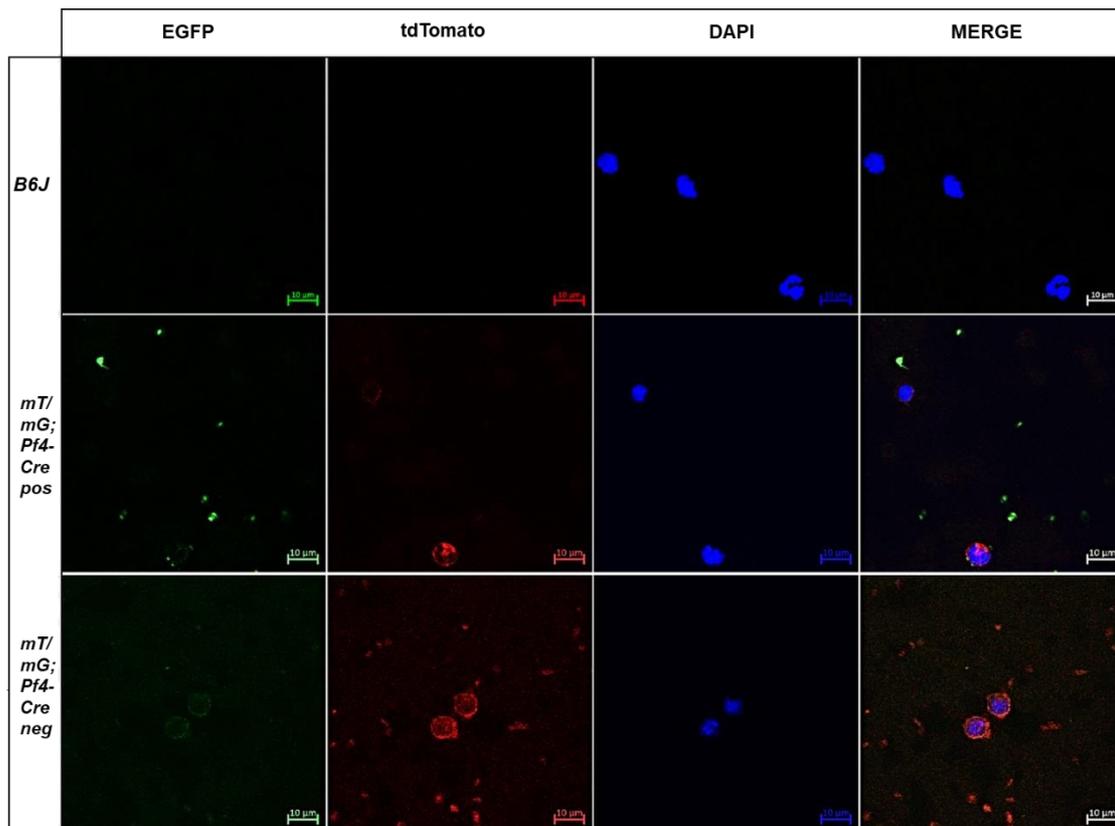


Abb. 9: Fluoreszenzaufnahmen der Blutausrichungen des peripheren Blutes.

Fluoreszenz-Aufnahmen der Blutausrichungen einer *mT/mG;Pf4-Cre negativen* (untere Bildreihe) und einer *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Maus (mittlere Bildreihe) im Vergleich zur C57BL/6J Wildtyp-Kontrolle (B6J) (obere Bildreihe). Die grüne EGFP-Fluoreszenz in den kernlosen Thrombozyten ist in den Ausrichungen der *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Mäuse deutlich detektierbar. Die C57BL/6J Wildtyp-Kontrolle (B6J) zeigt ausschließlich blaue Fluoreszenzsignale im DAPI-Kanal (Kernfärbung). (n = 3; der Maßstabsbalken entspricht 10 µm)

Die Blutausrichungen zeigten neben dem bereits zu erwartenden Signal für eine positive EGFP-Fluoreszenz ausgehend von kleinen, zellkernlosen Zellen (wahrscheinlich Thrombozyten) bei Cre-Rekombinase Aktivität auch ein tdTomato-positives Signal derselben Zellen bei den *mT/mG;Pf4-Cre neg.* Tieren. Zusätzlich zeigte sich auch ein tdTomato-Signal, welches ausgehend von großen kernhaltigen Zellen des Blutausrichunges (Leukozyten) erzeugt wurde. Dieses Signal konnte sowohl bei den *mT/mG;Pf4-Cre pos.* als auch bei *mT/mG;Pf4-Cre neg.* Mäusen detektiert werden.

Diese Ergebnisse bestätigen weitestgehend die Annahme, dass eine spezifische Markierung von peripheren Thrombozyten vorliegt. Zudem diente dieser

Arbeitsschritt einer ersten Visualisierung der EGFP-positiven Thrombozyten der *mT/mG;P4-Cre* positiven Tiere.

Die für die Aufnahmen gewählten Einstellungen am Fluoreszenzmikroskop wurden als Grundlage für alle folgenden Analysen der Fluoreszenz von Gewebsschnitten gewählt.

3.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der Blutproben

Um weitere Informationen über die Fluoreszenzsignale der Leukozyten zu erhalten, wurde das Blut mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurde Blut retrobulbär entnommen in ein Röhrchen mit Antikoagulanzen gegeben. Die Blutproben wurden anschließend mit APC-gelabelten Antikörpern der verschiedenen Blutzellen versehen (TER119-Antikörper zur Detektion der Erythrozyten, CD45-Antikörper zur Markierung der Leukozyten oder GPIIb-Antikörper für die Thrombozyten). Nach erfolgter Inkubation der Antikörper wurden die Messungen durchgeführt und die zellspezifische Expression über die tdTomato-positiven Signale im PE-Kanal sowie die EGFP-positiven Signale im FITC-Kanal für die jeweilige Zellpopulation detektiert.

Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte dabei mittels FlowJo (BD Bioscience). Hierzu wurden aus den Daten der Wildtyp-Kontrolltiere (*C57BL/6J*) zunächst die zu untersuchenden Zellen anhand der aus der Literatur bekannten Zellgröße und der entsprechenden APC-Antikörper Markierung in verschiedene Subpopulationen differenziert und den drei zu untersuchenden Blutzelltypen zugeordnet. Danach erfolgte die Analyse der Zellen für die verschiedenen Mausproben anhand des Spektrums der jeweilig emittierten PE (mT)- und FITC (mG)-Signale (Abb. 10). Dabei strahlt das Fluoreszenzlicht der PE-Signale in den roten Kanal, während FITC-Signale ihr Licht im grünen Kanal emittieren. Die PE- und FITC-Signale wurden für jede Blutprobe quantitativ ermittelt und anschließend graphisch dargestellt.

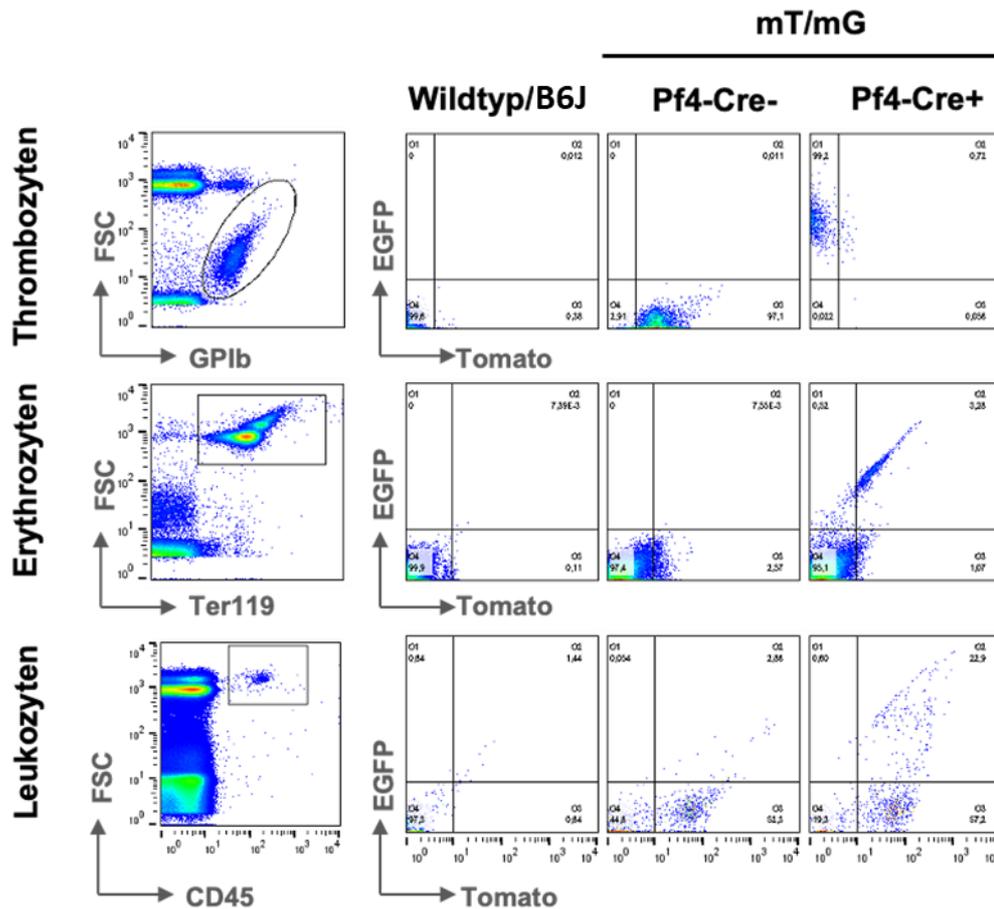


Abb. 10: Evaluierung der Durchflusszytometrie-Daten.

Dargestellt sind repräsentative Punkt-Plots der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), anhand derer das Gating für die jeweilige Zellpopulation erfolgte. Zur Auswertung und anschließenden Interpretation der mittels Durchflusszytometrie erhobenen Daten wurden die Datensätze mit dem Analyseprogramm FlowJo ausgewertet. Die Zelltyp-Differenzierung erfolgte dabei zunächst für die *C57BL/6J* Wildtyp-Kontrolltiere und wurde anschließend für alle Proben hinsichtlich des PE- für tdTomato und FITC-Signale für EGFP ausgewertet. Krüger *et. al.* 2021, modifiziert [62].

Die Auswertung der erhobenen FACS-Daten aus Abb.11 bestätigt die Hypothesen, die sich bereits aus den Daten der Blutausstriche ergaben. Wie zu erwarten war, zeigen alle TER119 positiven Zellen (Erythrozyten) kaum Fluoreszenzsignale (*mT/mG*; *Pf4-Cre* neg. 97,4%, *mT/mG*; *Pf4-Cre* pos. 95,1% Fluoreszenz-negative Zellen, Abb. 10), weder im PE- noch im FITC-Kanal. Die Thrombozyten zeigen in den *mT/mG*; *Pf4-Cre* pos. Proben ausschließlich im FITC-Kanal eine starke mG-Fluoreszenz (99,46%). In den *mT/mG*; *Pf4-Cre* neg. Proben werden von den Thrombozyten fast ausschließlich mG-Signale im PE-Kanal detektiert (92,92%). Überraschenderweise zeigen sich bei den CD45-positiven

Zellen (Leukozyten) im PE-Kanal eindeutige mT-Fluoreszenzsignale (64,89%). Auch im FITC-Kanal kann eine geringe Anzahl positiver mG-Signale der Leukozyten in den *mT/mG;Pf4-Cre pos.* Proben erfasst werden (13,39%). Bei den Blutzellen der Wildtyp-Kontrolltiere wurde, wie zu erwarten, weder eine mT- noch eine mG-Fluoreszenz nachgewiesen.

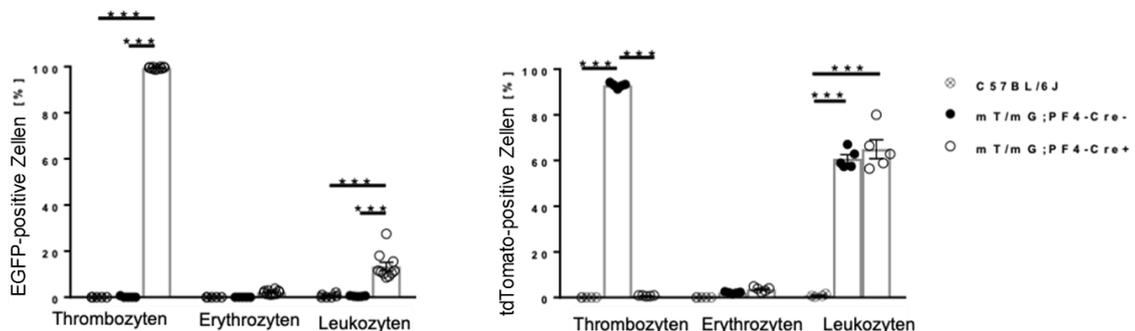


Abb. 11: FACS-Analyse von EGFP- und tdTomato-Signalen der verschiedenen Blutzelltypen.

Dargestellt sind jeweils die GFP-positive Zellen (links) und die tdTomato-positiven Zellen (rechts) unterteilt in die jeweiligen Blutzell-Gruppen. Für die GPIb-positiven Zellen (Thrombozyten) zeigte sich bei den *mT/mG;Pf4-Cre pos.* Mäusen ein deutliches GFP-positives Signal, sowie ein deutliches tdTomato-Signal bei den *mT/mG;Pf4-Cre neg.* Mäusen. Die CD45-positiven Zellen (Leukozyten) zeigten ein schwaches EGFP-Signal in den Blutproben der *mT/mG;Pf4-Cre pos.* Mäuse und ein stärkeres mTomato-Signal in sowohl *mT/mG;Pf4-Cre pos.* als auch in *mT/mG;Pf4-Cre neg.* Blutproben. Die TER119-positiven Zellen (Erythrozyten) zeigten in allen Proben kein Fluoreszenzsignal. (n = 5, MW ± SEM), p ≤ 0.001*** Krüger et al. 2021, modifiziert [62].

3.2 Analyse des Myokards der *mT/mG;Pf4-Cre* Maus

3.2.1 Analyse von gesunden Herzen der *mT/mG;Pf4-Cre* Maus

Nachdem die spezifische Markierung der Thrombozyten (GPIb-positive Zellen im FACS) der *mT/mG;Pf4-Cre* Mäuse untersucht wurde, wurden zunächst gesunde, in Paraffin eingebettete Herzen (n = 3) von *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Mäusen mit DAPI gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Schnitte zeigen eine deutliche Autofluoreszenz der Kardiomyozyten im EGFP-Kanal. Ebenso kann ein schwach positives EGFP-Signal detektiert werden, welches von Zellen ausgeht,

die morphologisch Erythrozyten entsprechen. (Abb. 12, linkes Bild). Im Vergleich dazu wurden gesunde Herzen ($n = 3$) von *mT/mG;Pf4-Cre* positiven Mäusen untersucht, welche nach Entnahme in Kryo-Medium eingebettet wurden. Hier ist die visuelle Beurteilung sehr viel besser möglich: Bei den Schnitten der in Kryo-Medium eingebetteten Herzen ist das durch die Autofluoreszenz der Kardiomyozyten hervorgerufene Hintergrundsignal erheblich geringer. Und bei den Zellen, welche hinsichtlich ihrer Morphologie den Thrombozyten ähneln, kann ein intensives EGFP-Signal beobachtet werden (Abb. 12, rechtes Bild). Der direkte Vergleich der verschiedenen Einbettmedien zeigt, dass die in Kryo-Medium eingebetteten Proben deutliche Vorteile für die Auswertung und die Bildqualität bei den Thrombozyten im Myokard zeigen. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit in Kryo-Medium eingebetteten Herzen der *mT/mG;Pf4-Cre* Mäuse durchgeführt.

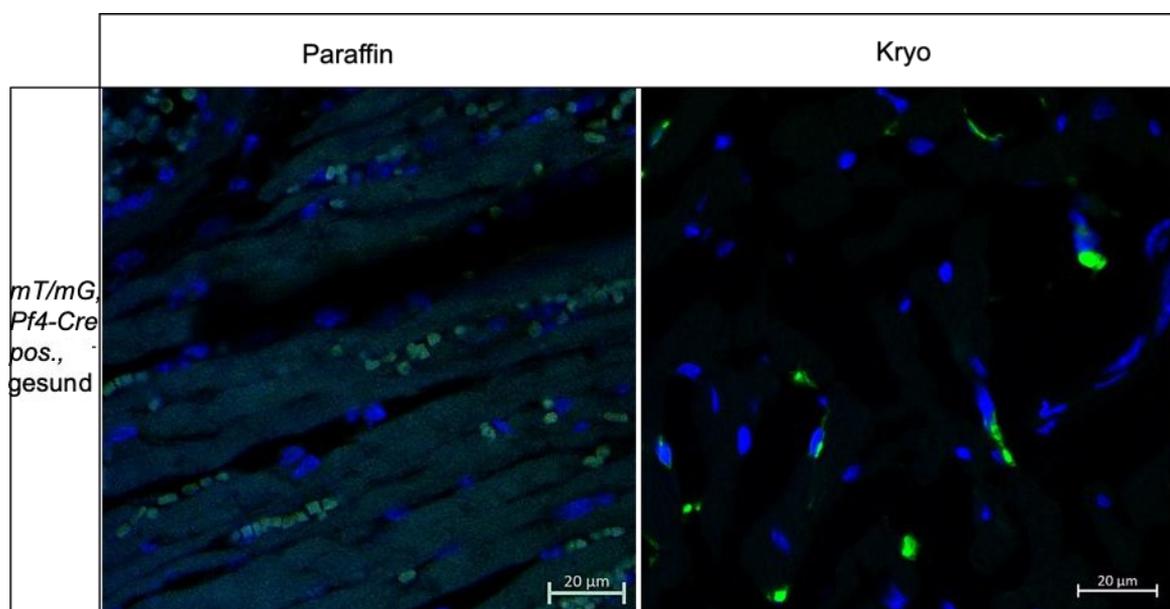


Abb. 12: Fluoreszenzaufnahmen des gesunden Myokards von *mT/mG;Pf4-Cre* positiven Mäusen.

Vergleich zwischen einem in Paraffin eingebetteten Herzen (links) und einem in Kryo-Medium eingebetteten Herzen (rechts) von gesunden, *mT/mG;Pf4-Cre* positiven Mäusen. Die Zellkerne wurden zuvor mit DAPI gefärbt (blau). Das in Paraffin eingebettete Herz zeigte kein eindeutiges positives EGFP-Signal. Bei den Fluoreszenzaufnahmen der in Kryo-Medium eingebetteten *mT/mG;Pf4-Cre* positiven Herzen war bei den Zellen, deren Morphologie den Thrombozyten entspricht, eine leuchtend grüne Fluoreszenz zu erkennen. ($n = 3$).

3.2.2 WGA-Färbung zur Definition des Infarktgebietes im Myokard

Um im späteren Verlauf der Arbeit den Infarktgebiet des Myokards besser interpretieren zu können, wurde das Herzgewebe von nicht operierten (nativen) Wildtyp-Tieren untersucht. Als Vergleich diente das Herzgewebe von Wildtyp-Tieren, die 24 h nach Myokardinfarkt mit nachfolgender kontrollierter Reperfusion untersucht wurden. Zunächst wurden die Präparate mit dem Lektin WGA (s. 2.3.2) behandelt (*C57BL/6J-Tiere* n = 3). Anschließend wurde eine DAPI Färbung durchgeführt, um die Zellkerne der Gewebszellen zu markieren. Das Gewebe wurde daraufhin unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich seiner Morphologie untersucht.

Die zu vergleichenden Präparate zeigen ein einheitliches Bild und weisen alle ein deutliches Fluoreszenzsignal im Cyanin 5 (Cy5)-Kanal sowie im DAPI Kanal auf, was für eine erfolgreiche Färbung spricht. Somit konnte die Auswertung des Zellverbandes der Präparate erfolgen und der Infarktgebiet definiert werden. In den gesunden Myokardpräparaten deuten die Cy5- und DAPI positiven Signale auf einen geordneten Zellverband mit einer wabenähnlichen Struktur (Abb. 13, A) hin, was ein deutlicher Hinweis auf eine intakte Membranintegrität der Zellen ist. In den Präparaten der infarzierten Herzen kann zusätzlich zu der Wabenstruktur auch sehr deutlich ein Bereich abgegrenzt werden, indem gehäuft ungeordnete, DAPI-positive Signale zu sehen sind (Abb. 12, B). Dies weist zweifelsfrei auf eine Akkumulation von Zellkernen und folglich Zellinvasion nach Reperfusion hin. Naheliegend ist, dass hier eine Störung der Membranintegrität vorliegt, bei der der physiologische Zellverband als Folge ischämischer Schädigung der Kapillaren im Myokard partiell zerstört wird. Daher wurde dieser Bereich im weiteren Verlauf der Arbeit als Infarktzone des infarzierten Myokards definiert.

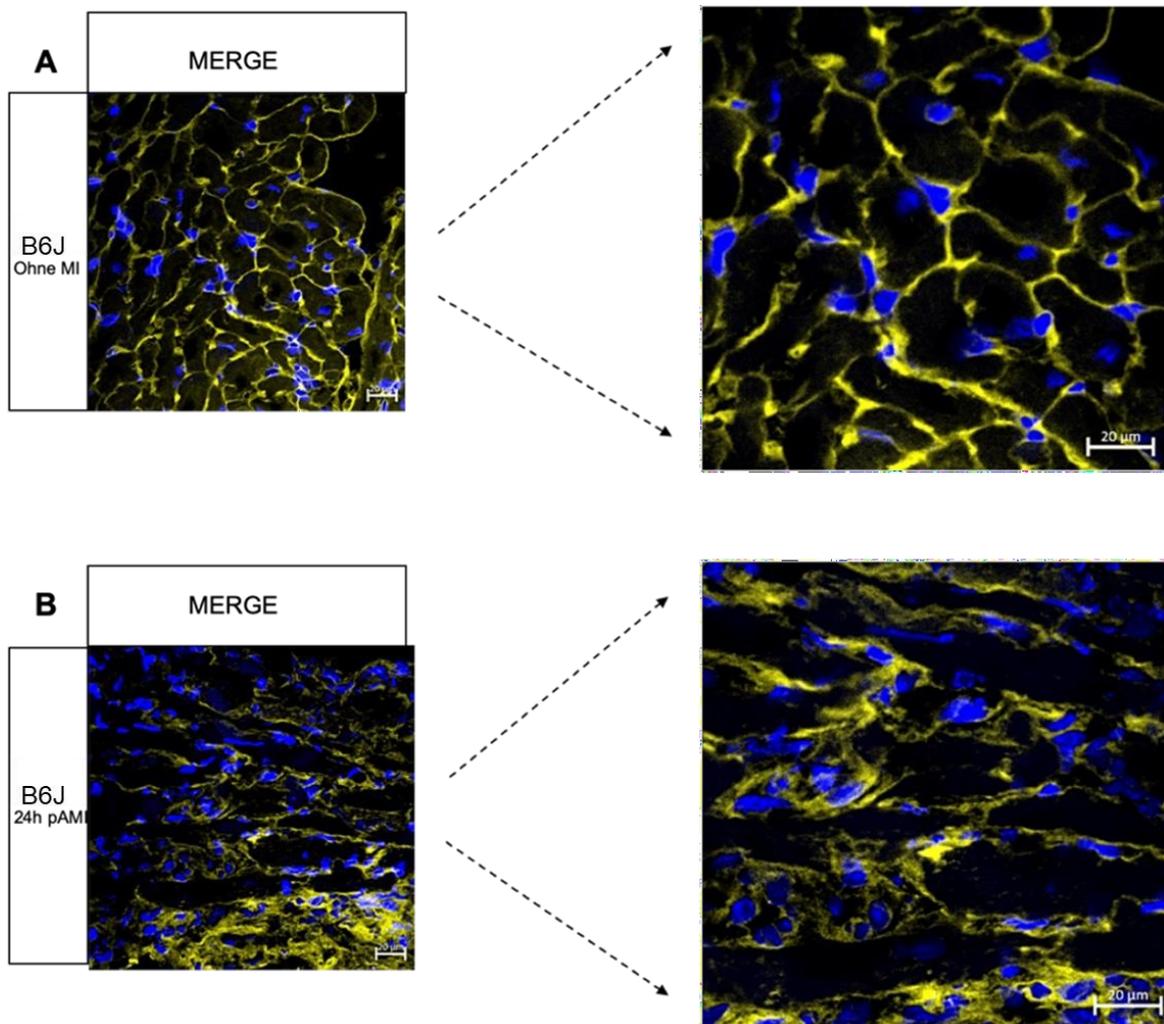


Abb. 13: WGA-Färbung gesunden murinen Myokards im Vergleich zum Myokard 24 h nach Myokardinfarkt.

Vergleich zwischen dem Zellverband im gesunden Wildtyp-Myokard (ohne MI) (A) und 24 h nach akutem Myokardinfarkt (24 h pAMI) (B). Die mit WGA-Antikörpern markierten Zellwände der Kardiomyozyten emittieren ein positives Cy5-Signal (gelb). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt. Die scharfe Darstellung der Cy5- und DAPI-Signale im gesunden Präparat weist auf einen klar strukturierten und intakten Zellverband mit intakter Plasmamembranintegrität hin. Die Fluoreszenzsignale im erkrankten Myokard lassen dagegen auf einen strukturell ungeordneten Zellverband schließen, indem die Zellmembranen geschädigt sind (*C57BL/6J*-Tiere, $n = 3$).

3.2.3 PECAM-1-Immunofluoreszenz-Färbung zur Detektion von Blutgefäßen im Myokard

Es wurden Kryoschnitte von gesunden *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Mäusen (n = 3), sowie von gesunden *mT/mG;Pf4-Cre negativen* Mäusen (n = 3) mit einer PECAM-1-Immunofluoreszenzfärbung (IF-Färbung) (CD31-Antikörper) gefärbt, um die Blutgefäße im Myokard abzubilden. Dazu wurden Kryoschnitte des zu untersuchenden Herzgewebes mit einem CD31-Antikörper markiert und nach zusätzlicher DAPI-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop charakterisiert. In Abb. 14 sieht man die exemplarische Gegenüberstellung von *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Präparaten (A) und *mT/mG;Pf4-Cre negativen* Präparaten (B). Die jeweilige IgG-Kontrolle zeigt sowohl bei den *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Herzen, als auch bei den *mT/mG;Pf4-Cre negativen* Herzen kein Signal im Cy5-Kanal des Fluoreszenzmikroskops. Dieser detektiert das Absorptionsspektrum des verwendeten Sekundärantikörpers (650-670 nm).

Somit kann von einer erfolgreichen PECAM-1-IF-Färbung der Präparate ausgegangen werden. Im EGFP-Kanal sieht man ausschließlich bei den *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Präparaten Fluoreszenzsignale. Im Cyanin 3 (Cy3)-Kanal (550-570 nm, fluoreszierend im roten Bereich des Lichtspektrums) sind bei allen Präparaten unspezifische Fluoreszenzsignale in gleicher Weise wahrzunehmen. In den Myokardschnitten sind in jedem der gefärbten Präparate Signale im DAPI-Kanal nachweisbar, wobei sich die Intensität der Signale bei den Präparaten nach Myokardinfarkt verstärkt.

Mit Hilfe der hier etablierten PECAM-1-IF-Färbemethode wurde im Anschluss die Fragestellung der Arbeit, die visuelle Darstellung der Thrombozyten-Lokalisation 24 h nach Myokardinfarkt, weiter untersucht.

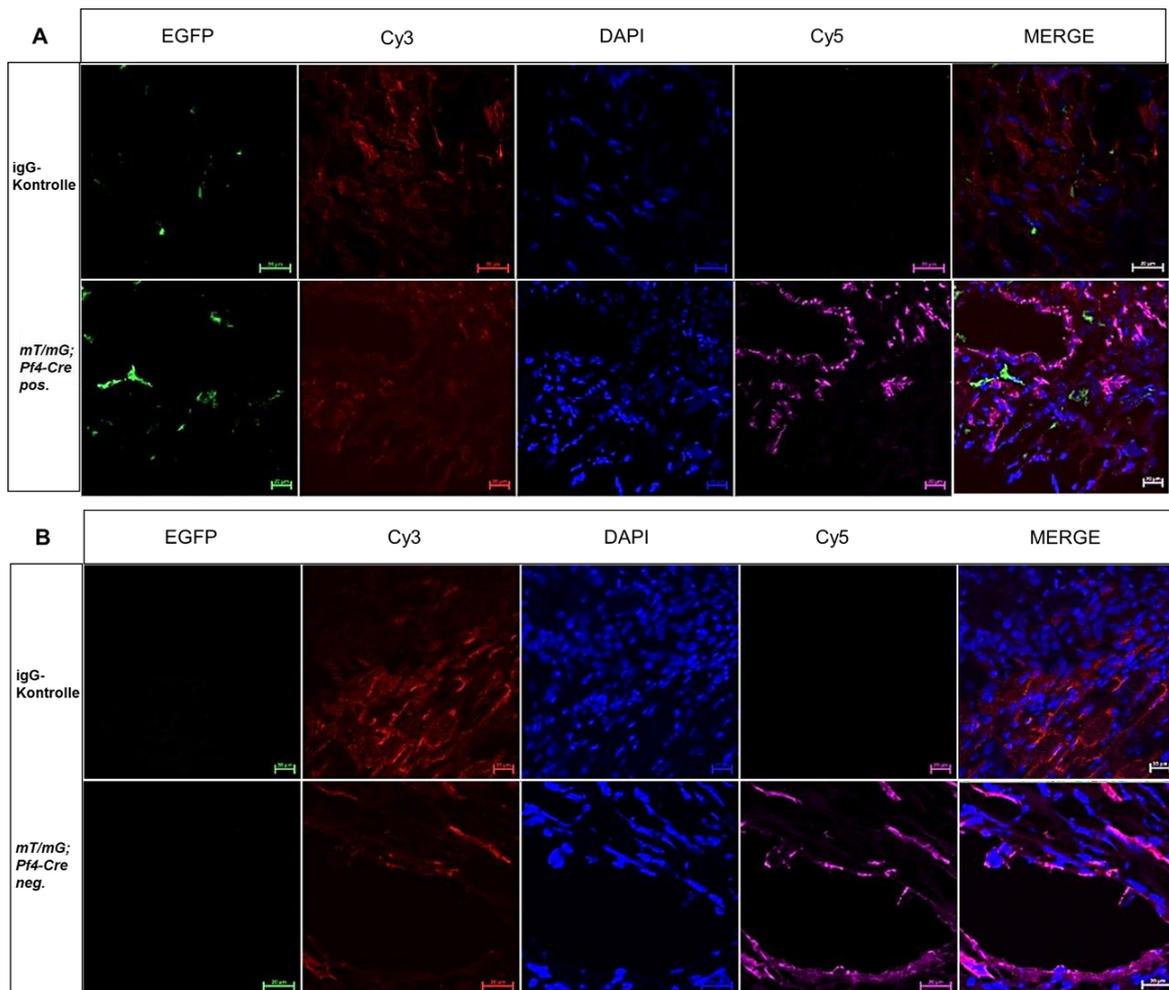


Abb. 14: PECAM-1-Immunofluoreszenz-Färbung von *mT/mG;Pf4-Cre* positivem und *mT/mG;Pf4-Cre* negativem gesundem Myokard.

Die mit dem CD31-Antikörper gefärbten *mT/mG;Pf4-Cre* positiven (A) und *mT/mG;Pf4-Cre* negativen (B) Präparate zeigten ein deutliches Signal im Cy5-Kanal des Fluoreszenzmikroskops (untere Reihe, violett). In den dazugehörigen IgG-Kontrollen konnte kein Cy5-positives Signal nach Anregung mit Licht derselben Wellenlänge detektiert werden. Alle Präparate zeigten DAPI-Fluoreszenzsignale (blau). Die *mT/mG;Pf4-Cre* positiven Präparate zeigten im Vergleich zu den *mT/mG;Pf4-Cre* negativen Präparaten ein deutliches EGFP-Signal (grün). (n = 3; der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m).

3.2.4 Mac3-Immunofluoreszenz-Färbung zur Detektion von Makrophagen im Myokard

Kryoschnitte der gleichen Präparate (s. 3.2.3) wurden mit Hilfe eines Mac3-IF-Antikörpers gefärbt, um eine Markierung von Makrophagen im Myokard

durchzuführen. Dazu wurden die Präparate erneut über Nacht mit dem IF-Farbstoff markiertem Mac3-Antikörper, respektive mit der dazugehörigen IgG-Kontrolle inkubiert und anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. In der Bildauswertung zeigt sich auch hier ein deutlich positives Cy5-Signal (violette Fluoreszenz) in den mit dem Mac3-Antikörper inkubierten Präparaten (Abb. 15 A und B jeweils untere Reihe). In den dazu gehörigen IgG-Kontrollen kann kein Cy5-Signal bei Anregung mit gleicher Wellenlänge detektiert werden. Somit ist auch hier von einer gut funktionierenden Markierung der Mac3 positiven Zellen mit dem verwendeten Antikörper auszugehen. Im Cy3-Kanal können auch hier in allen Präparaten keine eindeutigen Signale nachgewiesen werden, wobei sich die einzelnen Präparate nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Im EGFP-Kanal werden ausschließlich in den *mT/mG;Pfl4-Cre* positiven Präparaten eindeutige Signale emittiert. Der DAPI-Kanal zeigt in allen Präparaten eindeutige Fluoreszenzsignale, die von den Zellkernen der Kardiomyozyten emittiert werden.

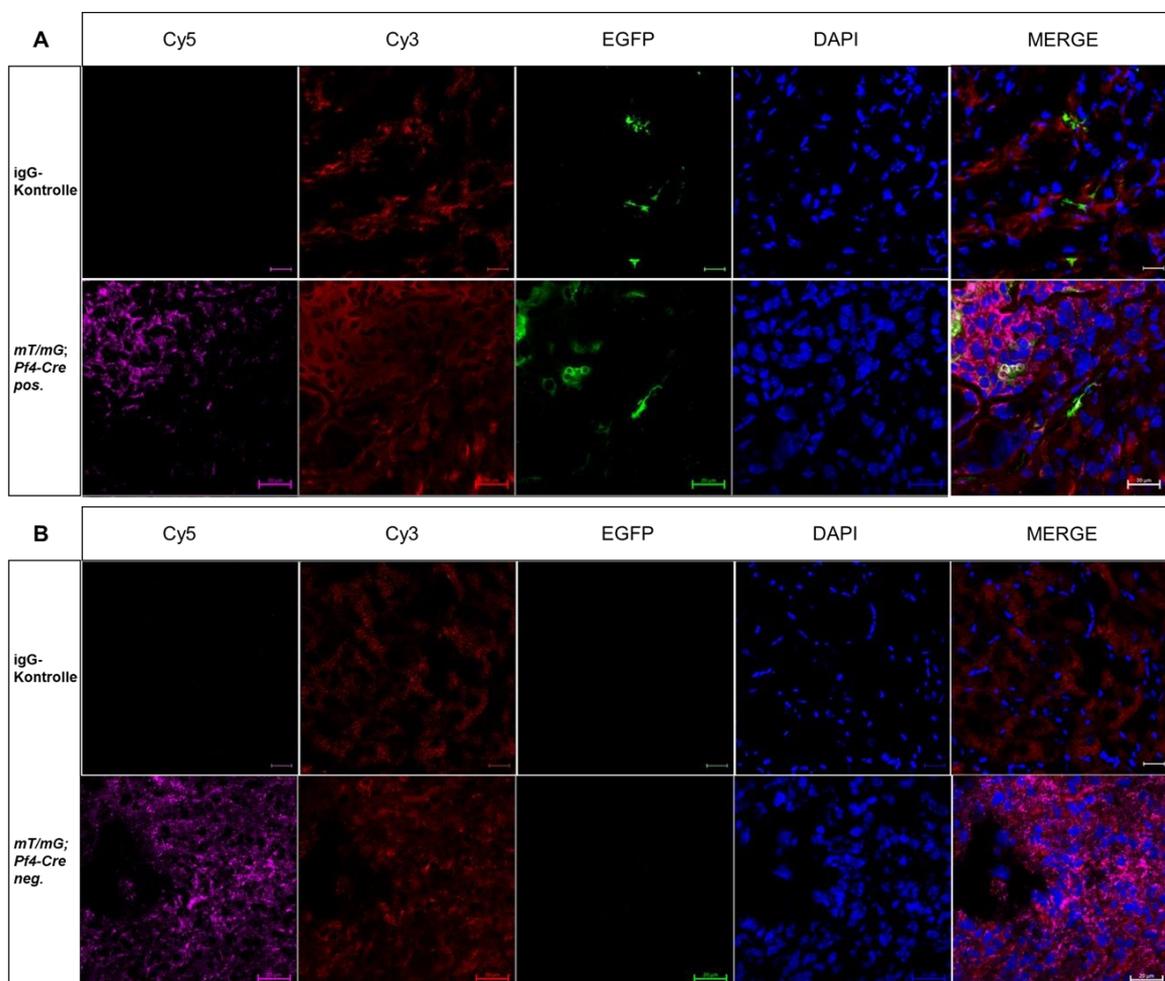


Abb. 15: Mac3-Immunofluoreszenz-Färbung von *mT/mG;Pf4-Cre* positivem und *mT/mG;Pf4-Cre* negativem gesunden Myokard.

Im Cy5-Kanal konnte ein deutliches Fluoreszenzsignal für die Mac3-positiven Zellen erfasst werden. Die Präparate, die mit dem IgG-Kontrollantikörper behandelt wurden zeigten hingegen kein zu detektierendes Cy5-Signal (n = 3; der Maßstabsbalken entspricht 20 µm).

3.2.5 Analyse der Thrombozyten-Lokalisation im Myokard der *mT/mG;Pf4-Cre*-Mäuse 24 h nach Myokardinfarkt

In einer weiteren Versuchsreihe sollte auch die Thrombozytenlokalisierung im infarzierten Myokard geklärt werden. Um diese Fragestellung in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, wurden die zuvor etablierten Färbeprotokolle der WGA- und PECAM-1-IF-Färbung erneut angewendet. Für die Versuche wurden jeweils drei Präparate von *mT/mG;Pf4-Cre* positiven Tieren und drei Präparate von *mT/mG;Pf4-Cre* negativen Tieren 24 h nach Myokardinfarkt (MI) verwendet (Abb. 16 A und C). IgG Kontrollen wurden im jeweiligen Genotyp ohne Myokardinfarkt gemacht. Die Färbemethoden wurden dabei in zwei aufeinanderfolgenden Herzschnitten durchgeführt. Im ersten Herzschnitt wurde mit Hilfe der WGA-Färbung der zu untersuchende Bereich definiert. Im darauffolgenden Schnitt wurde nach erfolgter PECAM-1-IF-Färbung der gleiche Bildausschnitt anhand von morphologischen Orientierungspunkten aufgesucht und dort die Lokalisation der Thrombozyten analysiert (s. 2.4.3).

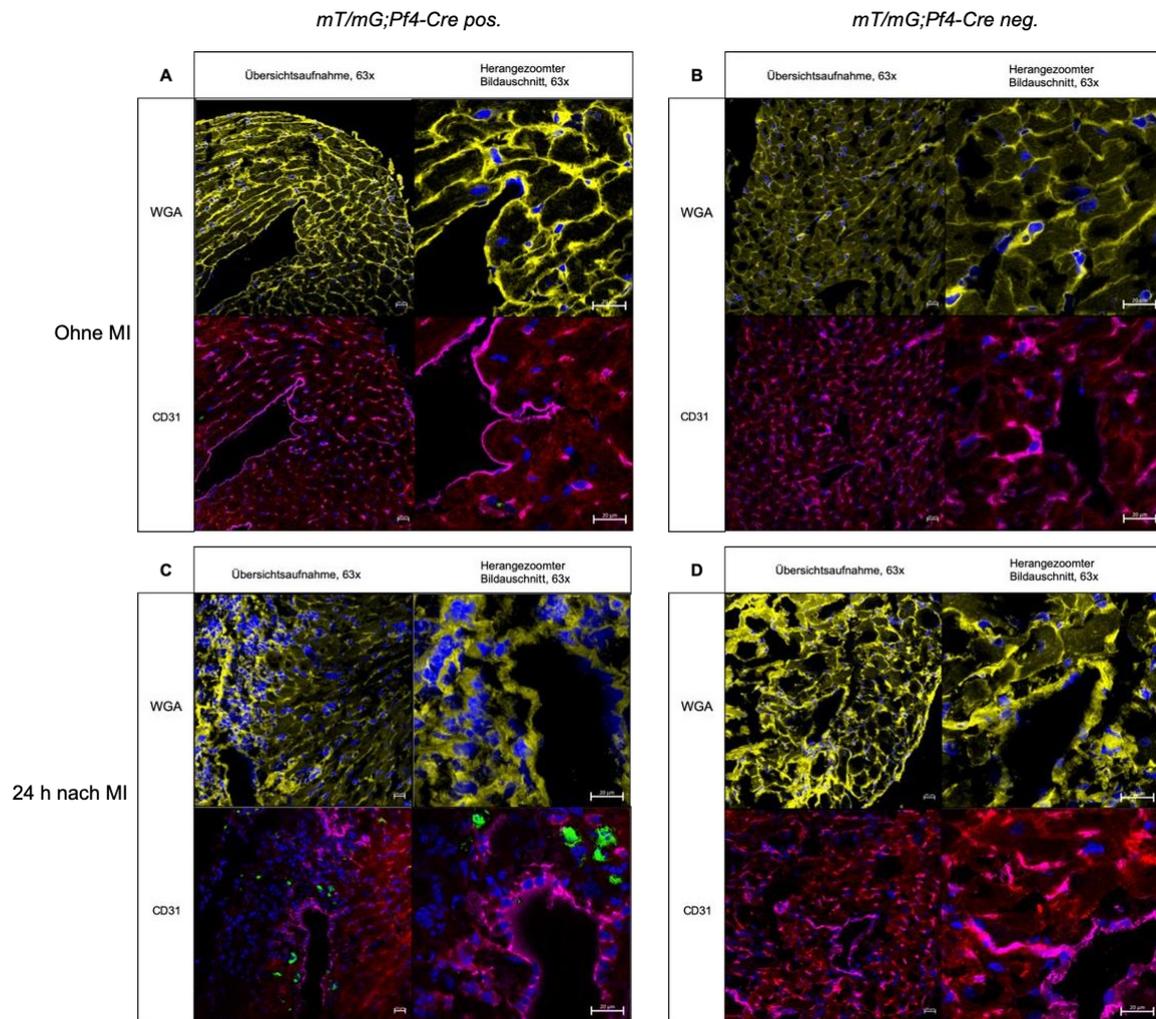


Abb. 16: WGA und PECAM-1 IF-Färbung in Folgeschnitten von *mT/mG;Pf4-Cre* positiven und *mT/mG;Pf4-Cre* negativen Präparaten mit und ohne Myokardinfarkt.

In den Präparaten der *mT/mG;Pf4-Cre* positiven Tiere nach Myokardinfarkt (MI) konnten die meisten EGFP-positiven Signale detektiert werden. Die EGFP-positiven Zellen waren dabei in enger räumlicher Lage zu den CD31-positiven Zellen im Cy5-Kanal (Magenta). In den Kontrollpräparaten (*mT/mG;Pf4-Cre* negative Tiere, ohne MI und 24 h nach MI) wurden keine Zellen mit grüner Fluoreszenz erfasst. Die Aufnahmen wurden in 63 x Vergrößerung mit dem LSM 880 aufgenommen. Der erste Bildausschnitt zeigt eine Übersichtsaufnahme, der zweite Bildausschnitt einen herangezoomten Bereich der Übersichtsaufnahme (n = jeweils 3; der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m).

Abb. 16 zeigt exemplarische Fluoreszenzaufnahmen, die für den visuellen Nachweis genutzt wurden. Es wurden jeweils Bildausschnitte von Bereichen mit einem deutlichen violetten Fluoreszenzsignal der CD31-positiven Zellen im Cy5-Kanal (Magenta) gewählt, um eine Aussage bezüglich der Thrombozyten hinsichtlich der intra- oder extravaskulären Lokalisation in der Infarktzone treffen zu

können. In den Proben der *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Tiere (Abb. 16 A und C) können im Vergleich zu denen der *mT/mG;Pf4-Cre negativen* Tiere (Abb. 16 B und D) EGFP-positive Signale erfasst werden. Die EGFP-positiven Signale sind in den Geweben der *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Tiere 24 h nach Myokardinfarkt in deutlich höherer Anzahl gegenüber den Präparaten der *mT/mG;Pf4-Cre positiven*, gesunden Tieren vorhanden. Die EGFP-positiven Zellen (Thrombozyten) akkumulieren dabei vor allem in den *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Herzen 24 h nach Myokardinfarkt in räumlicher Nähe der CD31-positiven Zellen (Makrophagen) (Abb. 16 C). Die Bildausschnitte der WGA-gefärbten Präparate wurden ausschließlich im DAPI und Cy5-Kanal (zur Differenzierung in Gelb) dargestellt, da hier nur der zu untersuchende Bereich definiert wurde.

3.2.6 Analyse der Thrombozyten-Makrophagen-Kolokalisation im Myokard der *mT/mG;Pf4-Cre*-Mäuse 24 h nach Herzinfarkt

Im Anschluss sollte eine mögliche Kolokalisation von Thrombozyten und Makrophagen in der Infarktzone überprüft werden. Dazu wurde das gleiche, bereits in 3.2.5 beschriebene Analyseverfahren im Anschluss zur Untersuchung genutzt. Dabei wurden Folgeschnitte der zuvor WGA-gefärbten Präparate mit der im Vorfeld etablierten Mac3-IF-Färbung (s. 3.2.4) gefärbt. Für die anschließende Analyse wurden erneut drei Herzen von *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Tieren (Abb. 17 C) und drei Herzen von *mT/mG;Pf4-Cre negativen* Tieren (Abb. 17 D) jeweils 24 h nach Myokardinfarkt verwendet. IgG-Kontrolle wurden erneut im jeweiligen Genotyp verwendet (Tiere ohne Myokardinfarkt). Auch hier können in den *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Präparaten EGFP-positive Signale nachgewiesen werden, wobei in den *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Tieren 24 h nach Myokardinfarkt im Vergleich deutlich mehr EGFP-positive Signale detektiert werden können. In den Präparaten nach Myokardinfarkt kann, im Vergleich zu den gesunden Herzen, eine deutliche Erhöhung der violetten Fluoreszenzintensität der Mac3-positiven Zellen im Cy5-Kanal (Magenta) gemessen werden. In den *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Tieren 24 h nach Myokardinfarkt stehen die Mac3-positiven Zellen dabei in räumlicher Lagebeziehung zu den im EGFP-Kanal gemessenen Zellen (Abb. 17 C unterer Bildausschnitt).

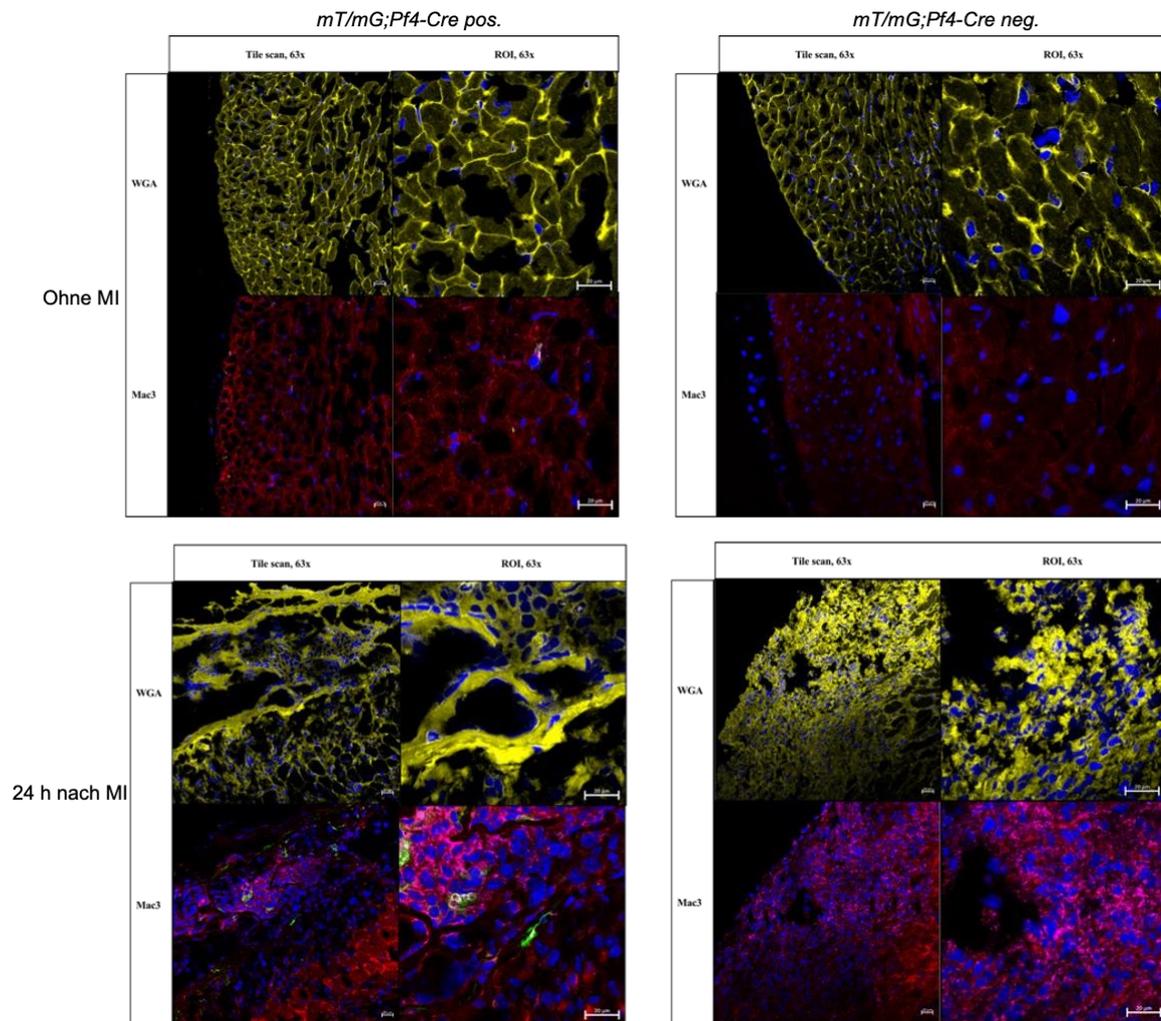


Abb. 17: WGA- und Mac3-Immunofluoreszenz-Färbung in Folgeschnitten von *mT/mG;Pf4-Cre* positiven und *mT/mG;Pf4-Cre* negativen Präparaten mit und ohne Myokardinfarkt.

Mac3-positiven Zellen konnten in den *mT/mG;Pf4-Cre* positiven und *mT/mG;Pf4-Cre* negativen Präparaten 24 h nach Myokardinfarkt im Cy5-Kanal detektiert werden. Dabei konnten in den *mT/mG;Pf4-Cre* positiven Tieren nach Myokardinfarkt auch EGFP-positive Signale erfasst werden, welche in räumlicher Lagebeziehungen zu den Mac3-positiven Zellen standen. Die repräsentativen Aufnahmen der gesunden Präparate zeigten keine Mac3-positiven Zellen im Cy5-Kanal. Außerdem wiesen die gesunden *mT/mG;Pf4-Cre* positiven Präparaten nur wenige EGFP-positive Signale auf. Alle Aufnahmen wurden in 63 x Vergrößerung aufgenommen (LSM 880) (n = jeweils 3; Maßstabsbalken entsprechen 20 μ m).

3.3 Analyse der Angiogeneserate in Abhängigkeit der Anwesenheit von Thrombozyten

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung einer Thrombozytopenie im Myokard auf die Regeneration des Herzgewebes untersucht.

Die Regeneration nach akutem Myokardinfarkt umfasst die Umwandlung des nekrotischen Gewebes (nach Ischämie) zu fibrotischem Gewebe [40]. Dabei kann auch die Bildung neuer Gefäße als begünstigender Faktor der Regeneration angesehen werden [48].

Für den Versuch wurde mit zwei thrombozytopenen Mausmodellen gearbeitet. Das erste genetische Mausmodell war eine Mauslinie, die aufgrund des genetischen *knock-outs* des *c-Mpl*-Gens (*MPL^{-/-}*) eine chronische Thrombozytopenie simuliert. Im zweiten Mausmodell wurde eine akute Thrombozytopenie über Antikörper-Depletion von Thrombozyten induziert (*Depl.*) (s.2.2.3).

Ziel des Versuches war es den Einfluss der beiden Thrombozytopenie-Modelle auf die Gefäßneubildung nach Myokardinfarkt zu vergleichen. Dazu wurden Paraffin-Schnitte der Herzen der Tiere zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt (fünf Tage, sowie 21 Tage nach Myokardinfarkt) verwendet.

3.3.1 Vergleich der Thrombozytenzahlen beider Modelle

Um die beiden Mausmodelle initial miteinander zu vergleichen wurden Blutproben der Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten (ohne Myokardinfarkt, sowie 24 h, fünf Tage und 21 Tage nach Myokardinfarkt) hinsichtlich der Thrombozytenzahlen untersucht. Dazu wurden heparinisierte Blutproben der Tiere mit dem automatischen Hämatologie-Analysator (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) gemessen.

Die zuvor mittels Antikörper behandelten Mäuse (*Depl.*) wiesen nach Injektion (vor Myokardinfarkt) sowie 24 h nach Myokardinfarkt eine Reduktion der Thrombozytenzahlen von >99% auf (s. Abb. 18). Auch fünf Tage nach Myokardinfarkt war die Thrombozytenzahl, im Vergleich zu denen der

Kontrollgruppe (IgG), immer noch um ca. 50% reduziert [68]. Nach 21 Tagen war die Thrombozytenzahl wieder auf dem Niveau der Kontrollgruppe.

Die *MPL*^{-/-}-Mäuse wiesen hingegen zu jedem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante Reduktion der Thrombozytenzahl von ca. 90% auf.

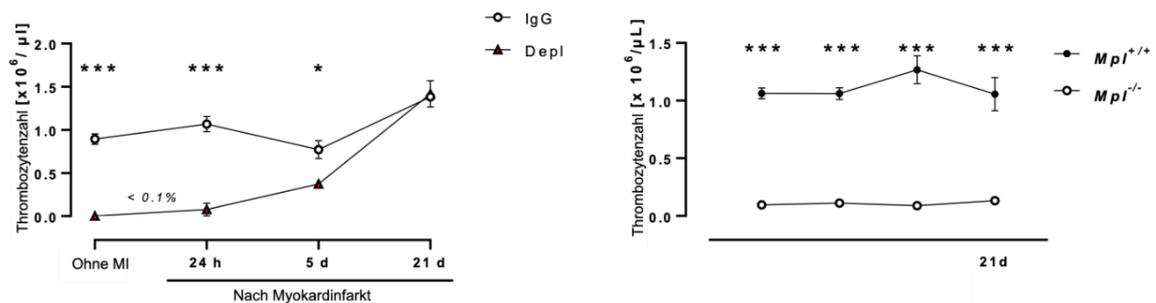


Abb. 18: Vergleich der Thrombozytenzahlen der thrombozytopenen Mausmodelle zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Myokardinfarkt.

Thrombozytenzahlen von *MPL*^{-/-} und *Depl*-Mäusen, sowie den dazugehörigen Kontrolltieren wurden vor Myokardinfarkt sowie jeweils 24 h, fünf Tage und 21 Tage nach Myokardinfarkt gemessen. Die Thrombozytenzahlen der *Depl*-Mäuse waren bis zu 24 h nach Myokardinfarkt signifikant reduziert. Die *MPL*^{-/-}-Mäuse zeigten zu jedem Zeitpunkt signifikant reduzierte Thrombozytenzahlen. (n = 4-5, MW \pm SEM), p \leq 0.05* p \leq 0.001***, Reusswig *et al.* 2022, modifiziert [68].

3.3.2 Analyse der Angiogenese im MPL-Knock-out-Mausmodell

Um die Gefäße in den Präparaten für die anschließende Auswertung vorzubereiten, wurde zunächst eine Pecam-DAB-Färbung sowie eine DAPI-Gegenfärbung aller Präparate des *MPL*-knock-out-Mausmodells durchgeführt (*MPL*^{-/-} vs. *MPL*^{+/+} fünf Tage nach Myokardinfarkt n = 5-4, 21 Tage nach Myokardinfarkt n = 5-5). Für die darauffolgende Analyse wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops je Präparat fünf beispielhafte Bildausschnitte in 40 x Vergrößerung aufgenommen (Abb. 19 B). Die angefärbten Kapillaren wurden visuell quantifiziert und der Mittelwert der angefärbten Kapillaren pro Quadratmillimeter (mm²) für jedes Tier bestimmt. Bei den *MPL*^{-/-} - Tieren kann 21 Tage nach Myokardinfarkt eine signifikante Abnahme der Kapillaren / mm² im Vergleich zu der Kapillaranzahl pro mm² fünf Tage nach

Myokardinfarkt festgestellt werden. Die Präparate der $MPL^{+/+}$ -Tiere zeigen hingegen keinen signifikanten Unterschied bei der Angiogenese im zeitlichen Verlauf nach Myokardinfarkt (Abb. 19 B und C).

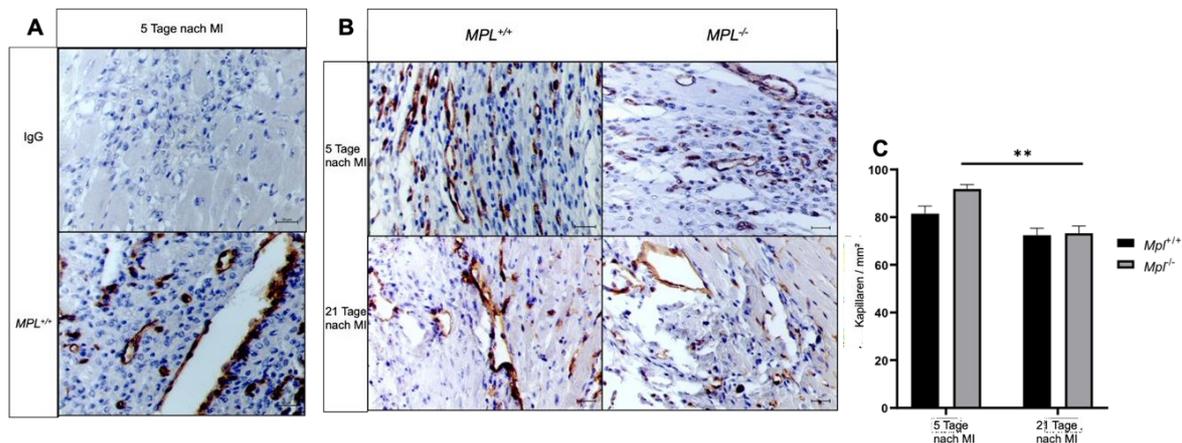


Abb. 19: Analyse der Kapillaren / mm² in MPL-Knock-out Tieren.

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Pecan-DAB-gefärbten Kapillaren im MPL-Knock-out-Mausmodell. Repräsentative Aufnahmen der Pecan-DAB-Färbung (A) sowie der zur Quantifizierung verwendeten Bildausschnitte (B). Die statistische Analyse (C) ergab eine signifikante Abnahme der Kapillaren / mm² für die $MPL^{-/-}$ -Tiere. Die Auswertung der Präparate der $MPL^{+/+}$ -Tiere ergab keine signifikante Zu- oder Abnahme der Kapillaren / mm². ($MPL^{-/-}$ vs. $MPL^{+/+}$ 5 Tage nach Myokardinfarkt n = 5-4, 21 Tage nach Myokardinfarkt n = 5, MW ± SEM; p ≤ 0.01**; Maßstabsbalken entspricht 50 µm)

3.3.3 Analyse der Angiogenese im Mausmodell der akuten Thrombozytopenie

Die untersuchten Präparate wurden nach gleichem Schema wie bereits in 3.3.2 beschrieben, analysiert und ausgewertet. Die Präparate umfassten hierbei jeweils vier Tiere mit Thrombozytendepletion (*Depl.*), sowie drei Tiere ohne Depletion als IgG-Kontrolle (*IgG*), jeweils fünf Tage nach Myokardinfarkt. Von den Tieren, die 21 Tage nach Myokardinfarkt untersucht wurden, sind jeweils drei *Depl.*-Tiere und drei *IgG*-Tiere in die Auswertung einbezogen worden. Die Analyse ergibt für das hier untersuchte Mausmodell keine signifikante Änderung der Kapillaren / mm² in Bezug auf den zeitlichen Verlauf nach Myokardinfarkt. In Abb. 20 sind repräsentative Bilder der Ausschnitte sowie die dazugehörige statistische Analyse dargestellt.

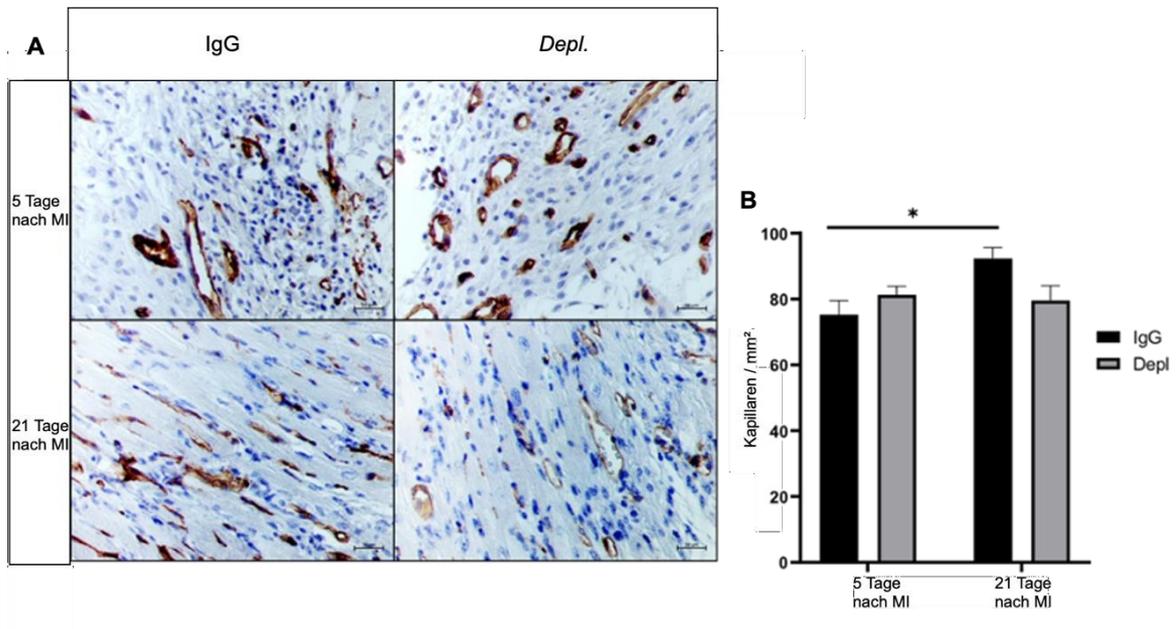


Abb. 20: Analyse der Kapillaren / mm² in Mäusen mit akuter Thrombozytopenie fünf Tage sowie 21 Tage nach Myokardinfarkt.

Repräsentative Lichtmikroskopaufnahmen der Pecam-DAB-gefärbten Kapillaren im Mausmodell der akuten Thrombozytopenie über Depletion (A). Die statistische Analyse (B) ergab hierbei keine signifikante Änderung der Kapillaren / mm² im zeitlichen Profil nach Myokardinfarkt. (IgG vs Depl. 5 Tage nach Myokardinfarkt n = 3-4, 21 Tage nach Myokardinfarkt n = 3; MW ± SEM; p ≤ 0.05*; Maßstabsbalken entspricht 50 µm)

4 Diskussion

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, insbesondere der akute Myokardinfarkt, verlaufen auch in der heutigen Zeit häufig letal. Es ist daher entscheidend, die dahinterstehenden zellulären Prozesse weiter zu erforschen, um in diese gezielt therapeutisch einzugreifen zu können. Dass vor allem Thrombozyten einen enormen Einfluss auf die inflammatorischen Stoffwechselprozesse haben, wurde in diversen Studien bereits beleuchtet [37, 38]. So ist beispielsweise bekannt, dass die in den Thrombozyten vorhandenen Speicher-Granula ein breites Spektrum an Inhaltstoffen wie Zytokine, Chemokine und andere Biomoleküle freisetzen können und daher eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von anderen Immunzellen spielen. Dies beeinflusst die Reaktionskette im Verlauf des Myokardinfarkts maßgeblich [37]. Die anfänglich inflammatorisch geprägte Phase wird durch die freigesetzten Mediatoren abgeschwächt, wodurch die Heilungsphase beschleunigt wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Nutzen der doppelt-fluoreszierenden Mauslinie *mT/mG;Pf4-Cre* für die visuelle Darstellung der Zellmorphologie in Blutaussstrichen und Herzgewebe sowie für nachfolgende Untersuchungen der Thrombozyten im Myokard bestätigt. Darüber hinaus konnte auch die Thrombozytenlokalisation während der akuten inflammatorischen Phase des Myokardinfarktes visuell realisiert werden, wodurch weitere Rückschlüsse auf die Funktion und Interaktion der Thrombozyten in der Reaktionskette des akuten Myokardinfarktes möglich werden. Dadurch kann das verwendete Mausmodell einen wertvollen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Biologie von Thrombozyten leisten. Anknüpfend an diese Ergebnisse kann in nachfolgenden Studien möglicherweise ein weiterer therapeutischer Ansatz zur Verbesserung des Myokardinfarkts gefunden werden.

4.1 Die *mT/mG;Pf4-Cre* Mauslinie als nützliches Tool zur visuellen Darstellung von Thrombozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer *mT/mG;Pf4-Cre* Mauslinie gearbeitet. Dazu wurden eine doppelt-fluoreszierende Cre-Reportermaus *mT/mG* und eine *Pf4-Cre*-Maus, die unter der Kontrolle eines Megakaryozyten-spezifischen *Pf4*-Promoters eine Cre-Rekombinase exprimiert, miteinander verpaart. Dadurch wird, eine doppelt-fluoreszierende Cre-Reporter-Maus erhalten, bei der in allen Zellen ohne *Pf4-Cre* tdTomato exprimiert wird und in den *Pf4-Cre* positiven Megakaryozyten und Thrombozyten EGFP zellspezifisch exprimiert wird.

In einer von Muzumdar *et al.* im Jahre 2007 veröffentlichten Studie wurde der Nutzen der *mT/mG*-Reportermaus bereits umfassend analysiert. Dabei konnte eine nahezu ubiquitäre Expression des Reporter-Gens *mT/mG* nachgewiesen werden, wodurch eine Fluoreszenzmarkierung in verschiedenen Gewebetypen möglich ist [61].

In allen untersuchten Gewebetypen konnte eine starke Expression der *mT/mG*-Fluoreszenz detektiert werden. Dies spricht für eine spezifische Positionierung des gewählten Gen-Markers. Die Kreuzung dieser Mäuse mit der konditionalen Mausmutante *Pf4-Cre*, bei der die Gen-Deaktivierung nur in den Cre-exprimierenden Zellen auftritt, bietet den Vorteil, dass der Verlust des spezifischen Gens oder Genabschnitts im entstandenen Phänotyp eindeutig beobachtet werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Thrombozytenfaktor 4 (*Pf4*) als Promotor für das Cre/loxP-System genutzt, wodurch eine Thrombozyten-exklusive Markierung erzielt werden sollte. Die Exklusivität des BAC-abgeleiteten *Pf4-Cre* Transgens konnte in einigen Studien bestätigt werden [60]. Andere Quellen hingegen hinterfragen die spezifische Markierung der Thrombozyten mit Hilfe des Promotors [75, 76]. Darauf wird in der Diskussion weiter unten nochmals ausführlicher eingegangen.

Die Befunde der hier durchgeführten Arbeiten zeigen, dass die *mT/mG;Pf4-Cre*-Maus ein geeignetes Instrument für die Detektion und visuelle Darstellung von

Thrombozyten ist, da sie mit Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie kompatibel sind.

Je nach verwendetem Kanal ist anhand des emittierten Fluoreszenzsignals der Thrombozyten eine einfache und selektive Unterscheidung zwischen Pf4-Cre positiven (mG- bzw. EGFP-Fluoreszenz im FITC-Kanal) und negativen Tieren (mT- bzw. tdTomato-Fluoreszenz im PE-Kanal) möglich. Die hellgrüne EGFP-Fluoreszenz, die bei den *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Tieren in über 99% aller Thrombozyten auftritt, ermöglicht eine elegante und eindeutige Visualisierung dieses Zelltyps sowohl in Blutaussstrichen wie auch in Gewebeproben des Myokards.

Wie die Ergebnisse der Abb. 10 und 12 zeigen werden in den *mT/mG;Pf4-Cre negativen* Proben für die Thrombozyten fast ausschließlich mT-Signale (92,92%) im PE-Kanal detektiert. Signale für das tdTomato-Protein treten in den Leukozyten gleichermaßen bei *mT/mG;Pf4-Cre positiven* als auch bei *mT/mG;Pf4-Cre negativen* Mäusen auf [62].

Der Unterschied zwischen Thrombozyten aus den transgenen Mäusen und den Wildtyp-Kontrolltieren ist ebenfalls leicht möglich, da letztere weder mT- noch mG-Fluoreszenzsignale ausstrahlen.

Mit weiteren Färbemethoden wie beispielsweise einer zusätzlichen Mac3-IF-Färbung konnte weiterhin die Annahme unterstützt werden, dass es sich bei den markierten Zellen um Thrombozyten bzw. Thrombozyten-Aggregate und nicht um Makrophagen (Leukozyten) handelt. Unsere Ergebnisse bestärken zusammenfassend die Ausgangshypothese dieser Arbeit, dass es sich bei der *mT/mG;Pf4-Cre* um ein hilfreiches Instrument zur Detektion von Thrombozyten handelt.

4.1.1 Die *mG* Fluoreszenz der Leukozyten stellt die Exklusivität der *mT/mG;Pf4-Cre* in Zweifel

Zur Charakterisierung der *mT/mG;Pf4-Cre* wurden zu Beginn Blutproben des peripheren Blutes hinsichtlich der Fluoreszenz der verschiedenen Blutzelltypen überprüft.

Die Blutausrichthe decken sich dabei mit den Auswertungen der FACS Messung hinsichtlich der Fluoreszenzen der einzelnen Zelltypen. So können bei den *mT/mG;Pf4-Cre* positiven Mäusen beinahe ausschließlich EGFP positive Thrombozyten detektiert werden. Dies spricht zunächst für eine spezifische Markierung der Thrombozyten durch die *mT/mG;Pf4-Cre*.

Die Annahme, dass in den anderen Blutzellpopulationen (Leukozyten, Erythrozyten) keine EGFP-positiven Zellen detektiert werden können, kann nicht vollständig bestätigt werden. Ein kleiner Teil der Leukozyten (ca. 13%) zeigt in den FACS-Auswertungen ebenfalls EGFP-positive Signale (s. Abb. 11). Diese Unstimmigkeit mit der Theorie lässt unterschiedliche Erklärungsansätze zu. Ursächlich könnten z.B. bereits angesprochene Zweifel hinsichtlich der Spezifität des Pf4-Promotors sein. So wurde bereits in einigen Studien eine breitere Expression des *Pf4-Cre*-Transgens der Maus über die Megakaryozytenlinie hinaus diskutiert. Laut einer Studie von Calaminus *et al.* soll es auch in anderen myeloischen und lymphoiden Abstammungslinien zwischen 15-60% zu einer Expression der *Cre*-Rekombinase kommen [75]. Außerdem wird in der Studie gezeigt, dass es auch in der fetalen Leber und im Knochenmark zu einer *Pf4-Cre*-Rekombination in HSZ kommt. Auch Pertuy *et al.* konnten einen geringen Anteil CD45-positiver Zellen mit EGFP positiven Fluoreszenzsignalen in durchflusszytometrischen Analysen nachweisen [76].

Im Gegensatz dazu gibt es auch Studien, die sehr wohl für eine exklusive Markierung der Thrombozyten durch das transgene Mausmodell mit dem *Pf4* Promotor sprechen. Rudolph *et al.* konnten dies mittels einer Verpaarung einer *Pf4-Cre* Maus mit einer konditionalen *ADAP-knock-out*-Maus (engl. *adhesion and degranulation-promoting adapter protein*) zeigen [77]. Mit der erzeugten Mauslinie

konnte die Auswirkung der Cre-Rekombinase ausschließlich in Thrombozyten und Megakaryozyten festgestellt werden.

Insgesamt sollte vor der Datenerhebung die Verwendbarkeit der zu untersuchenden *Pf4-Cre*-Mäuse sorgfältig geprüft werden. Dazu sollten zuvor die EGFP-positiven Zellen detektiert und eindeutig als Thrombozyten identifiziert werden. Interessant wäre z.B. auch zu prüfen, ob das Geschlecht der Maus, die das *Pf4*-Gen trägt einen Einfluss auf die Spezifität des Promotors nimmt. In einer Studie von Li *et al.* konnte beispielsweise eine veränderte Genexpression durch den Einfluss von Sexualhormonen in Leberpräparaten von transgenen Ratten veranschaulicht werden [78]. Außerdem kann es je nach Kreuzungsschema der transgenen Linie zu einer veränderten Funktionsweise der Cre-Rekombinase kommen. In einem Review aus dem Jahre 2013 von Joseph *et al.* werden verschiedene zelltypspezifische Cre-Linien hinsichtlich deren Vorteile und Limitationen miteinander verglichen. Dabei kommt es in einigen Fällen zu einer Keimbahndeletion [79]. Entsprechend könnte auch dies einen zu berücksichtigenden Faktor vor der Verwendung der *Pf4-Cre* darstellen.

4.1.2 Die fehlende Fluoreszenz der Erythrozyten im Blutaussstrich

Eine weitere Unstimmigkeit in der Charakterisierung der *mT/mG;Pf4-Cre* war die fehlende Fluoreszenz der Erythrozyten sowohl im Blutaussstrich als auch in den FACS Messungen. Eine mögliche Erklärung für diese unerwarteten Fluoreszenz-Signale der Blutzellen könnte in der Autofluoreszenzen der Zellen begründet sein. Yakimov *et al.* konnten in einer Studie zeigen, dass eine starke Autofluoreszenz von Leukozyten absorbiert wird [80].

Auch die Absorption von sichtbarem Licht und der starke Fluoreszenzverlust des Hämoglobins der Erythrozyten wurde in dieser Studie untersucht und könnte ursächlich für die fehlenden tdTomato-Signale der Erythrozyten in unseren Ergebnissen sein. Die Absorption und Lichtstreuung nehmen mit zunehmender Wellenlänge des Lichts ab. Da die Wellenlängen für tdTomato bei 554 / 581 nm

(Anregung / Emission) und für EGFP bei 488 / 509 nm (Anregung / Emission) liegen, kommt es durch die gleichzeitige Darstellung beider Kanäle möglicherweise zu einer zu starken bzw. zu schnellen Absorption des angeregten Hämoglobins.

4.1.3 Veränderung der Fluoreszenz im Paraffinpräparat

Um der Fragestellung der Thrombozyten Lokalisation im Infarktbereich nachzugehen wurden zunächst bereits asservierte Paraffinherzen der *mT/mG;Pf4-Cre* unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Die Aufnahmen zeigen sowohl im EGFP- als auch im tdTomato-Kanal keine eindeutigen Fluoreszenz-Signale (s. Abb. 12). Es kann lediglich ein schwaches Signal ausgehend von Erythrozyten detektiert werden. Eine zusätzliche TER-119-Färbung bestätigt dies.

Dass die Paraffineinbettung bzw. vor allem die dafür verwendete Ethanol-Behandlung eine Auswirkung auf die Intensität verschiedener Fluoreszenzsignale hat ist bereits bekannt [81, 82]. Besonders die Struktur der Proteine, welche grünes und gelbes Licht emittieren wird stark geschädigt. Da die Thrombozyten im EGFP-Kanal detektiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass es auch hier zu einer Zerstörung des EGFP beim Einbettprozess für die Paraffinschnitte kam. Das Vergleichspräparat einer *mT/mG;Pf4-Cre positiven* Maus, welches kryokonserviert wurde, zeigt dagegen ein eindeutiges EGFP-Signal der Thrombozyten. Man kann davon ausgehen, dass der Konservierungsprozess einen Einfluss auf die Fluoreszenzsignale respektive den Nutzen der *mT/mG;Pf4-Cre* hat.

Da jedoch durch unsere Arbeitsgruppe auch eine eindeutige Visualisierung der Thrombozyten in Paraffin eingebetteten Femuren und Milz bei *mT/mG;Pf4-Cre* Mäusen möglich war [62], ist es ebenso denkbar, dass das Myokard durch seine äußerst sensible und komplexe Struktur zu einer Auslöschung der EGFP-Fluoreszenz führt. Dies könnte durch die starke Autofluoreszenz der Kardiomyozyten, welche maßgeblich durch die Stoffwechselprozesse der enthaltenen Mitochondrien moduliert sind, erfolgen [83, 84]. Vor allem in den infarzierten Myokardpräparaten sind die Oxidationsprozesse sehr präsent, wodurch eine veränderte Autofluoreszenz des Herzgewebes sehr wahrscheinlich ist.

Um ein aussagekräftigeres EGFP-Signal der Thrombozyten zu generieren, welches der Autofluoreszenz der Kardiomyozyten entgegenwirkt, könnte mit einer weiteren, gegen das EGFP gerichtete Antikörperfärbung gearbeitet werden. Eine Studie von Perniss *et al.* aus dem Jahre 2020, untersuchte mit Hilfe von transgenen Mäusen synaptische Prozesse in chemosensorischen Zellen der Trachea [85]. Dazu wurde ebenfalls ein GFP-Fusionsprotein mit spezifischem Promoter in das Genom der Mäuse zur Markierung dieser Zellen eingebracht. Eine Anti-GFP-Antikörperfärbung führte im Verlauf der Studie zu einer ausschlaggebenden Verstärkung der GFP-Signale in den Fluoreszenzaufnahmen. Diese Verstärkung der Signale könnte eventuell dazu beitragen, die Fluoreszenzaufnahmen des Myokards der *mT/mG;P4-Cre*-Tiere auch in Paraffin eingebetteten Präparaten zu untersuchen.

4.1.4 Die visuelle Darstellung extravaskulärer Thrombozytenaggregate im infarzierten Myokard

In den LSM800 Aufnahmen der Herzschnitte von *mT/mG;P4-Cre positiven* Mäusen nach Infarkt konnten eindeutig Aggregate von GFP-positiven Thrombozyten detektiert werden. Diese Aggregate sind dabei zumeist im Infarktbereich der Herzen angesiedelt. Mittels zusätzlicher Pecam-1-Immunofluoreszenz-Färbung kann außerdem eine extravaskuläre Lokalisation der Thrombozytenaggregate gezeigt werden (s. Abb. 16). Dieser Nachweis deckt sich mit denen bereits in vergangenen Studien geschilderten Theorien der Thrombozytenlokalisierung bzw. deren Migration ins Myokard. So konnte bereits 2011 von Yang Liu *et al.* mittels unterschiedlicher histologischer Färbungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Myokardinfarkt eine Thrombozytenanreicherung im Interstitium der Infarktzone visuell nachgewiesen werden [74]. Die Thrombozyten wurden dazu mit einem CD41-Antikörper markiert. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Thrombozytenmarkierung ein transgenes Mausmodell genutzt, um Fehler, die sich bei mehrfacher Antikörperfärbung ergeben könnten, auszuschließen. Durch die genaue Definition von Infarkt- und *Remote*-Gebiet, sowie die sorgfältige Etablierung der PECAM-1-IF-Färbung konnte hier ein

eindeutiger visueller Nachweis von extravasuklär lokalisierten Thrombozyten im infarzierten Myokard erbracht werden.

4.1.5 Thrombozyten-Makrophagen-Kolokalisation im Infarktgebiet 24 h nach Myokardinfarkt

Zusätzlich zu der Thrombozytenlokalisierung im Infarktgebiet sind auch Aggregate von Mac3-positiven Zellen in enger räumlicher Lagebeziehung zu den GFP-positiven Thrombozyten visuell dargestellt worden (s. Abb. 16). Dies lässt Rückschlüsse auf eine Kolokalisation von Makrophagen und Thrombozyten im Myokard während der Inflammationsphase zu.

Dass in der Blutbahn zirkulierende Monozyten, die Vorläuferzellen der Makrophagen, Aggregate mit Thrombozyten bilden (engl. *monocyte-platelet-aggregates*, MPA) ist bereits bekannt [86]. Der PSGL-1 bindet dabei an den Oberflächenrezeptor P-Selektin der Thrombozyten [87]. Diese Aggregatbildung führt wiederum dazu, dass sich die Monozyten phänotypisch verändern und weitere pro-inflammatorische Stoffwechselprozesse initiiert werden [86].

In gleicher Weise kommt es auch zu einer Aggregatbildung der Thrombozyten mit neutrophilen Granulozyten [88]. Die Bindung des Liganden führt in diesem Falle zu einer weiteren Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten.

Während der inflammatorischen Phase nach Myokardinfarkt muss eine schnelle Rekrutierung von Entzündungszellen gewährleistet werden, um die zerstörten Zell- und Matrixrückstände abzubauen (s. 1.1.3). Daher ist anzunehmen, dass auch im Myokard eine solche Aggregatbildung stattfindet, wodurch vermutlich die Entzündungskaskade amplifiziert wird.

Yang Liu *et al.* zeigten in ihrer Studie ebenso eine enge räumliche Lagebeziehung von Makrophagen zu den in das Myokard eingewanderten Thrombozyten. Sie spekulierten außerdem über einen möglichen „Huckepack“-Transport der Thrombozyten in das Herzgewebe durch Aggregatbildung mit Leukozyten [74].

Der genaue Mechanismus der Thrombozyteneinwanderung in das Infarktgewebe bleibt jedoch bislang ungeklärt. In zukünftigen Studien könnte durch weitere Analysen der Permeabilität der koronaren Gefäße die Einwanderung der Thrombozyten weiter erforscht werden. So könnte beispielsweise ein passives

Einströmen der Thrombozyten ins Interstitium durch Gefäßverletzungen ausgeschlossen werden. Dies würde die „Huckepack“-Einwanderungstheorie weiter stützen.

4.2 Der Einfluss der Thrombozyten auf die Angiogenese nach Myokardinfarkt im thrombozytopenen Mausmodell

Da die visuell dargestellten Thrombozyten in räumlicher Lagebeziehung zu Blutgefäßen kolokalisiert waren (s. Abb. 16), war es weiterhin interessant zu untersuchen ob sich daraus ein Einfluss auf nachgeschaltete, angiogene Prozesse im infarzierten Myokard ergibt.

Dass sich Thrombozyten an Endothelzellen anlagern konnte bereits mit Hilfe eines *in vitro* Matrigel-Modells gezeigt werden [89]. Die Interaktion von Endothelzellen und Thrombozyten führt unter anderem zu pro-angiogenen Stoffwechselprozessen. Potente *et al.* beschreiben in einem Übersichtsartikel beispielsweise, dass vor allem der VEGF nach Bindung an die Endothelzellen zu einer Proliferation dieser führt [90]. VEGF wird in der α -Granula der Thrombozyten gespeichert und gilt als wichtiger pro-angiogener Faktor [55].

Auch eine durch Hypoxie ausgelöste, pro-angiogene Reaktion durch Thrombozyten ist bereits beschrieben. Durch Feng *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der α -Granula mit ischämischem Gewebe zu einer Rekrutierung von proangiogenen Knochenmarkszellen führt [91]. Es wird jedoch auch darauf hingewiesen, dass dieser Prozess durch Thrombospondin-1 (TSP-1), ein anti-angiogener Faktor der ebenfalls in der α -Granula gespeichert ist, ausgeglichen wird [91].

Um zu prüfen ob die Thrombozytenaggregate nach Myokardinfarkt einen Einfluss auf die Angiogenese haben und ob dieser von pro- oder antiangiogener Qualität ist sollte im zweiten Teil dieser Arbeit untersucht werden. Entsprechend wurde mit zwei thrombozytopenen Mausmodellen gearbeitet um die Angiogeneserate in An- und Abwesenheit von Thrombozyten im Myokard zu vergleichen.

4.2.1 Sinkende Angiogeneserate bei *MPL*^{-/-}-Mäusen 21 Tage nach Myokardinfarkt

In dem Versuchsaufbau zur Untersuchung der Angiogenese im Myokard nach akutem Myokardinfarkt konnte ausschließlich in einem der beiden thrombozytopenen Mausmodelle eine Veränderung der Angiogenese im zeitlichen Verlauf festgestellt werden.

Die Thrombozytopenie wurde in den Modellen auf zwei unterschiedliche Weisen hervorgerufen. Zum einen wurde durch einen genetischen *knock-out* des *c-MPL*-Genes eine chronische Thrombozytopenie verursacht. Die Thrombozytenzahlen waren konstant um ca. 90 % gegenüber dem Wildtyp-Stamm reduziert (s. Abb. 18). Zum anderen wurde über Antikörper-Injektion (Anti-GPIb) eine Thrombozytendepletion verursacht, was zu einem zunächst starken Abfall der Thrombozytenzahlen von > 99 % führt, sich nach ca. 21 Tagen dem Niveau der Kontrollgruppe wieder angepasst hat (s. Abb. 18). Entsprechend ist dieses Modell repräsentativ für eine akute Thrombozytopenie.

Verschiedene Erkrankungen sind mit einer akuten Thrombozytopenie assoziiert [92]. In einigen Fällen, zum Beispiel bei der Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT), wird durch die Thrombozytopenie reaktiv eine Thrombozytenaktivierung ausgelöst, wodurch das Risiko der Entstehung einer arteriellen und venösen Thrombose und somit auch das eines akuten Myokardinfarktes extrem steigt [93]. Der Umgang mit Thrombozytopenie-Patienten nach akutem Myokardinfarkt ist ein weiterer klinisch relevanter Aspekt in der Erforschung der Einflussnahme der Thrombozyten auf die dem Myokardinfarkt folgenden Prozesse.

In dem Versuch kam es nur in den Präparaten der *MPL*^{-/-}-Tieren zu einer signifikanten Abnahme der Angiogenese 21 Tage nach Myokardinfarkt (s. Abb. 19). Da die Angiogenese als wesentlicher Faktor zur Gewebsregeneration nach einem Myokardinfarkt beiträgt [48], würden diese Ergebnisse dafürsprechen, dass die fehlenden Thrombozyten zu einem geringeren kardialen *Outcome* durch die reduzierte Angiogenese führen würden. Dies würde im Umkehrschluss bedeuten,

dass die Thrombozyten einen positiven Einfluss auf die Stoffwechselprozesse während des kardialen Remodelling hätten.

Dass Thrombozyten eine bifunktionale Rolle bei entzündlichen Prozessen wie dem Myokardinfarkt spielen und sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine sezernieren, ist literaturbekannt [46]. Jedoch lassen weitere Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe darauf schließen, dass das MPL-Mausmodell durch eine verbleibende Thrombozytenzahl von ca. 10 % (s. Abb. 18) keine aussagekräftige Interpretation der Ergebnisse erlaubt [94]. So waren in weiteren, vergleichenden Analysen der beiden Mausmodelle das kollagene Remodelling nach Myokardinfarkt sowie eine Erhöhung der Expression von apoptotischen Faktoren (Bcl-2, Bax) ausschließlich in dem Modell der Thrombozytendepletion zu erkennen.

Die Annahme wird weiterhin durch eine Studie von Morowski *et al.* aus dem Jahre 2013 unterstützt, in der ebenfalls mit einem thrombozytopenen Mausmodell gearbeitet wurde. Dieses Modell wies nach Thrombozytendepletion noch ca. 20 - 30 % der ursprünglichen Thrombozytenzahlen auf. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch diesen Restbestand an Thrombozyten kein Einfluss auf die Hämostase sowie thrombotische Prozesse stattfand [95].

Dies würde wiederum die Hypothese unterstützen, dass Thrombozyten sich negativ auf das kardiale *Outcome* nach Myokardinfarkt auswirken.

Außerdem sollte bei der Interpretation der Thrombozytendepletion berücksichtigt werden, dass der anfänglich sehr starken Reduktion der Thrombozyten um >99 %, eine rasche Thrombozyten-Neubildung folgt. Wie Abb. 18 verdeutlicht, findet dies hauptsächlich zwischen dem fünften und 21. Tag nach Myokardinfarkt statt. Da die Angiogenese nach Myokardinfarkt ebenfalls in diesen Zeitraum fällt, sind die angiogenen Prozesse möglicherweise auch durch das thrombozytäre Ungleichgewicht verändert.

Ob die Thrombozyten einen positiven oder negativen Einfluss auf die Angiogeneserate nach Myokardinfarkt haben konnte mit Hilfe der beiden thrombozytopenen Mausmodelle (akute versus chronische Thrombozytopenie) nicht abschließend geklärt werden und bedarf der weiteren Analyse.

Therapeutisch sollte in jedem Fall nach weiteren Methoden zur Unterdrückung der inflammationsfördernden Prozesse durch die Thrombozyten geforscht werden. Eine

Möglichkeit dies zu tun, wäre z.B. die weitere Analyse der in PMP und ES enthaltenen miRNA.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

Insgesamt konnte in diesem Versuchsaufbau gezeigt werden, dass die *mT/mG;Pf4-Cre*-Maus ein nützliches Tool für die Analyse von Thrombozyten darstellt. In weiteren Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurden mit Hilfe dieser Mäuse bereits zusätzliche durch Thrombozyten regulierte Stoffwechselprozesse in der Milz, im Knochenmark sowie in der Aorta untersucht [62]. Ob die Mauslinie letztendlich ausschließlich Thrombozyten-spezifisch markiert, muss jedoch in weiteren Studien geklärt werden. Eine Möglichkeit dies zu untersuchen, wäre beispielweise weitere hämatopoetische Zellen in die Analyse der *mT/mG;Pf4-Cre*-Mäuse einzubeziehen. Es wäre zum Beispiel denkbar neben der hier verwendeten Mac3-IF-Färbung auch Antikörper zur Detektion von B- und T-Lymphozyten einzusetzen und die Zellinteraktionen in weiteren Thrombozyten-abhängigen Stoffwechselprozessen zu beleuchten.

Neben dem visuellen Nachweis der Thrombozyteneinwanderung in das myokardiale Interstitium nach Myokardinfarkt, sollte auch der sich aus der verstärkten Thrombozytenakkumulation ergebende Nutzen für das kardiale *Outcome* bestimmt werden. Die hier erbrachten Ergebnisse der Angiogenese in Abhängigkeit zur Anwesenheit der Thrombozyten erlauben keine eindeutigen Rückschlüsse auf eine positive oder negative Auswirkung der Thrombozyten auf die post-ischämische Remodellierung. In unserer Forschungsgruppe konnte jedoch ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Fehlen von Thrombozyten und der Narbenbildung nach Infarkt gezeigt werden [94]. Dadurch erscheint es sehr wahrscheinlich, dass eine verstärkte Einwanderung von Thrombozyten ins Myokard eher zu einer Verschlechterung des kardialen *Outcome* führen würden. Es wäre daher interessant, thrombozytäre Angiogenesefaktoren, wie beispielsweise VEGF, in weiteren Experimenten des Maus-Modells mit Thrombozytendepletion zu untersuchen.

5 Literaturverzeichnis

1. Kumar, M., et al., *Animal models of myocardial infarction: Mainstay in clinical translation*. Regul Toxicol Pharmacol, 2016. **76**: p. 221-30.
2. *Todesursachen nach Krankheitsarten 2020*. 2022; Available from: https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#.
3. Ibanez, B., et al., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J, 2018. **39**(2): p. 119-177.
4. Liehn, E.A., et al., *Repair after myocardial infarction, between fantasy and reality: the role of chemokines*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(23): p. 2357-62.
5. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410-22.
6. Thygesen, K., et al., *Universal definition of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2007. **50**(22): p. 2173-95.
7. 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.
8. Viola, M., S.C.A. de Jager, and J.P.G. Sluijter, *Targeting Inflammation after Myocardial Infarction: A Therapeutic Opportunity for Extracellular Vesicles?* Int J Mol Sci, 2021. **22**(15).
9. Bunting, S., et al., *Normal platelets and megakaryocytes are produced in vivo in the absence of thrombopoietin*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3423-9.
10. Nielsen, S.H., et al., *Understanding cardiac extracellular matrix remodeling to develop biomarkers of myocardial infarction outcomes*. Matrix Biol, 2019. **75-76**: p. 43-57.

11. Sutton, M.G. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy*. *Circulation*, 2000. **101**(25): p. 2981-8.
12. Frangogiannis, N.G., *The mechanistic basis of infarct healing*. *Antioxid Redox Signal*, 2006. **8**(11-12): p. 1907-39.
13. Liu, P., et al., *Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(5 Pt 2): p. H2327-36.
14. Piper, H.M. and D. Garcia-Dorado, *Prime causes of rapid cardiomyocyte death during reperfusion*. *Ann Thorac Surg*, 1999. **68**(5): p. 1913-9.
15. French, B.A. and C.M. Kramer, *Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling*. *Drug Discov Today Dis Mech*, 2007. **4**(3): p. 185-196.
16. Kalogeris, T., et al., *Ischemia/Reperfusion*. *Compr Physiol*, 2016. **7**(1): p. 113-170.
17. Torres, W.M., et al., *Regional and temporal changes in left ventricular strain and stiffness in a porcine model of myocardial infarction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018. **315**(4): p. H958-H967.
18. Bauer, F.B., G; Gary, T; Gutmann, A; Höger, FS; Kölblinger, C; Neumeister, P; Pfanner, G; Prüller, F; Ramschak, H; Steiner, K; Walch, W; Weihs, W; Weiss, *Gerinnung im klinischen Alltag*. 2012: Interdisziplinäre Gerinnungsgruppe Steiermark.
19. Stegner, D., et al., *Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 127.
20. Junt, T., et al., *Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow*. *Science*, 2007. **317**(5845): p. 1767-70.
21. Schmitt, A., et al., *Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets*. *Exp Hematol*, 2001. **29**(11): p. 1295-302.
22. Dittrich, M., et al., *Understanding platelets. Lessons from proteomics, genomics and promises from network analysis*. *Thromb Haemost*, 2005. **94**(5): p. 916-25.
23. Lefrancais, E., et al., *The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors*. *Nature*, 2017. **544**(7648): p. 105-109.
24. Grozovsky, R., et al., *Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond*. *Blood*, 2015. **126**(16): p. 1877-84.

25. Machlus, K.R. and J.E. Italiano, Jr., *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation*. J Cell Biol, 2013. **201**(6): p. 785-96.
26. Kiel, M.J. and S.J. Morrison, *Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 862-4.
27. Bender, M., et al., *Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein*. Blood, 2015. **125**(5): p. 860-8.
28. Mason, K.D., et al., *Programmed anuclear cell death delimits platelet life span*. Cell, 2007. **128**(6): p. 1173-86.
29. Grozovsky, R., et al., *The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling*. Nat Med, 2015. **21**(1): p. 47-54.
30. Hoffmeister, K.M., *The role of lectins and glycans in platelet clearance*. J Thromb Haemost, 2011. **9 Suppl 1**: p. 35-43.
31. Coppinger, J.A., et al., *Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2096-104.
32. Boulaftali, Y., et al., *Platelet immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) signaling and vascular integrity*. Circ Res, 2014. **114**(7): p. 1174-84.
33. Boilard, E., et al., *Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production*. Science, 2010. **327**(5965): p. 580-3.
34. Karpatkin, S., *Heterogeneity of human platelets. I. Metabolic and kinetic evidence suggestive of young and old platelets*. J Clin Invest, 1969. **48**(6): p. 1073-82.
35. Heijnen, H.F., et al., *Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3791-9.
36. Cao, X., et al., *MicroRNA profiling during rat ventricular maturation: A role for miR-29a in regulating cardiomyocyte cell cycle re-entry*. FEBS Lett, 2013. **587**(10): p. 1548-55.
37. Duerschmied, D., et al., *Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice*. Blood, 2013. **121**(6): p. 1008-15.

38. Zarbock, A., R.K. Polanowska-Grabowska, and K. Ley, *Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation*. *Blood Rev*, 2007. **21**(2): p. 99-111.
39. Qi, C., et al., *P-selectin-mediated platelet adhesion promotes tumor growth*. *Oncotarget*, 2015. **6**(9): p. 6584-96.
40. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis*. *Circ Res*, 2016. **119**(1): p. 91-112.
41. Lannan, K.L., et al., *Maresin 1 induces a novel pro-resolving phenotype in human platelets*. *J Thromb Haemost*, 2017. **15**(4): p. 802-813.
42. Yabanoglu, S., et al., *Platelet derived serotonin drives the activation of rat cardiac fibroblasts by 5-HT_{2A} receptors*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(4): p. 518-25.
43. Pierce, G.F., et al., *Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms*. *J Cell Biol*, 1989. **109**(1): p. 429-40.
44. Sluijter, J.P., et al., *MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(4): p. 859-68.
45. van Solingen, C., et al., *Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(8A): p. 1577-85.
46. Walsh, T.G. and A.W. Poole, *Do platelets promote cardiac recovery after myocardial infarction: roles beyond occlusive ischemic damage*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018. **314**(5): p. H1043-H1048.
47. Potente, M., H. Gerhardt, and P. Carmeliet, *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. *Cell*, 2011. **146**(6): p. 873-87.
48. Wu, X., et al., *Angiogenesis after acute myocardial infarction*. *Cardiovasc Res*, 2021. **117**(5): p. 1257-1273.
49. Vandekeere, S., M. Dewerchin, and P. Carmeliet, *Angiogenesis Revisited: An Overlooked Role of Endothelial Cell Metabolism in Vessel Sprouting*. *Microcirculation*, 2015. **22**(7): p. 509-17.

50. Weinstein, N., et al., *A Network Model to Explore the Effect of the Micro-environment on Endothelial Cell Behavior during Angiogenesis*. *Front Physiol*, 2017. **8**: p. 960.
51. Befani, C. and P. Liakos, *Hypoxia upregulates integrin gene expression in microvascular endothelial cells and promotes their migration and capillary-like tube formation*. *Cell Biol Int*, 2017. **41**(7): p. 769-778.
52. Ribatti, D., R. Tamma, and A. Vacca, *Mast Cells and Angiogenesis in Human Plasma Cell Malignancies*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(3).
53. Fetz, A.E., M.Z. Radic, and G.L. Bowlin, *Neutrophils in Biomaterial-Guided Tissue Regeneration: Matrix Reprogramming for Angiogenesis*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2021. **27**(2): p. 95-106.
54. Battinelli, E.M., B.A. Markens, and J.E. Italiano, Jr., *Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis*. *Blood*, 2011. **118**(5): p. 1359-69.
55. Italiano, J.E., Jr., et al., *Angiogenesis is regulated by a novel mechanism: pro- and antiangiogenic proteins are organized into separate platelet alpha granules and differentially released*. *Blood*, 2008. **111**(3): p. 1227-33.
56. Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(14): p. 5166-70.
57. Nagy, A., *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*. *Genesis*, 2000. **26**(2): p. 99-109.
58. Voziyanov, Y., S. Pathania, and M. Jayaram, *A general model for site-specific recombination by the integrase family recombinases*. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(4): p. 930-41.
59. Ravid, K., et al., *Selective targeting of gene products with the megakaryocyte platelet factor 4 promoter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(4): p. 1521-5.
60. Tiedt, R., et al., *Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo*. *Blood*, 2007. **109**(4): p. 1503-6.
61. Muzumdar, M.D., et al., *A global double-fluorescent Cre reporter mouse*. *Genesis*, 2007. **45**(9): p. 593-605.
62. Kruger, I., et al., *Genetic Labeling of Cells Allows Identification and Tracking of Transgenic Platelets in Mice*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(7).

63. Rosenthal, N. and S. Brown, *The mouse ascending: perspectives for human-disease models*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(9): p. 993-9.
64. Stalker, T.J., *Mouse models of platelet function in vivo*. Platelets, 2020. **31**(4): p. 415-416.
65. Gurusurthy, C.B. and K.C.K. Lloyd, *Generating mouse models for biomedical research: technological advances*. Dis Model Mech, 2019. **12**(1).
66. Mekada, K., et al., *Genetic differences among C57BL/6 substrains*. Exp Anim, 2009. **58**(2): p. 141-9.
67. Alexander, W.S., et al., *Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2162-70.
68. Reusswig, F., et al., *Only Acute but Not Chronic Thrombocytopenia Protects Mice against Left Ventricular Dysfunction after Acute Myocardial Infarction*. Cells, 2022. **11**(21).
69. Nebe-von-Caron, G., et al., *Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting*. J Microbiol Methods, 2000. **42**(1): p. 97-114.
70. Litman, G.W., M.K. Anderson, and J.P. Rast, *Evolution of antigen binding receptors*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 109-47.
71. Schroder, U., K.E. Arfors, and O. Tangen, *Stability of fluorescein labeled dextrans in vivo and in vitro*. Microvasc Res, 1976. **11**(1): p. 57-66.
72. Liu, M., et al., *Instrument response standard in time-resolved fluorescence spectroscopy at visible wavelength: quenched fluorescein sodium*. Appl Spectrosc, 2014. **68**(5): p. 577-83.
73. Jenkins, J., et al., *A genomic clone encoding a cryptophyte phycoerythrin alpha-subunit. Evidence for three alpha-subunits and an N-terminal membrane transit sequence*. FEBS Lett, 1990. **273**(1-2): p. 191-4.
74. 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.
75. Calaminus, S.D., et al., *Lineage tracing of Pf4-Cre marks hematopoietic stem cells and their progeny*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51361.

76. Pertuy, F., et al., *Broader expression of the mouse platelet factor 4-cre transgene beyond the megakaryocyte lineage*. J Thromb Haemost, 2015. **13**(1): p. 115-25.
77. Rudolph, J.M., et al., *Characterization of Mice with a Platelet-Specific Deletion of the Adapter Molecule ADAP*. Mol Cell Biol, 2019. **39**(9).
78. Li, Q., et al., *A promoter that drives gene expression preferentially in male transgenic rats*. Transgenic Research, 2014. **23**(2): p. 341-349.
79. Joseph, C., et al., *Deciphering hematopoietic stem cells in their niches: a critical appraisal of genetic models, lineage tracing, and imaging strategies*. Cell Stem Cell, 2013. **13**(5): p. 520-33.
80. Yakimov, B.P., et al., *Label-free characterization of white blood cells using fluorescence lifetime imaging and flow-cytometry: molecular heterogeneity and erythrophagocytosis [Invited]*. Biomed Opt Express, 2019. **10**(8): p. 4220-4236.
81. Vankelecom, H., *Fixation and paraffin-embedding of mouse tissues for GFP visualization*. Cold Spring Harb Protoc, 2009. **2009**(10): p. pdb prot5298.
82. Zhanmu, O., et al., *Maintenance of Fluorescence During Paraffin Embedding of Fluorescent Protein-Labeled Specimens*. Front Neurosci, 2019. **13**: p. 752.
83. Huang, S., A.A. Heikal, and W.W. Webb, *Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of NAD(P)H and flavoprotein*. Biophys J, 2002. **82**(5): p. 2811-25.
84. Chorvat, D., Jr., et al., *Spectral unmixing of flavin autofluorescence components in cardiac myocytes*. Biophys J, 2005. **89**(6): p. L55-7.
85. Perniss, A., et al., *Chemosensory Cell-Derived Acetylcholine Drives Tracheal Mucociliary Clearance in Response to Virulence-Associated Formyl Peptides*. Immunity, 2020. **52**(4): p. 683-699 e11.
86. Michelson, A.D., et al., *Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction*. Circulation, 2001. **104**(13): p. 1533-7.
87. Hamburger, S.A. and R.P. McEver, *GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils*. Blood, 1990. **75**(3): p. 550-4.
88. Rossaint, J. and A. Zarbock, *Platelets in leucocyte recruitment and function*. Cardiovasc Res, 2015. **107**(3): p. 386-95.

89. Pipili-Synetos, E., E. Papadimitriou, and M.E. Maragoudakis, *Evidence that platelets promote tube formation by endothelial cells on matrigel*. Br J Pharmacol, 1998. **125**(6): p. 1252-7.
90. Potente, M. and P. Carmeliet, *The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism*. Annu Rev Physiol, 2017. **79**: p. 43-66.
91. Feng, W., et al., *A novel role for platelet secretion in angiogenesis: mediating bone marrow-derived cell mobilization and homing*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3893-902.
92. Ali, N. and H.E. Auerbach, *New-onset acute thrombocytopenia in hospitalized patients: pathophysiology and diagnostic approach*. J Community Hosp Intern Med Perspect, 2017. **7**(3): p. 157-167.
93. Knobl, P., *[Thrombocytopenia in the intensive care unit]*. Wien Klin Mag, 2017. **20**(1): p. 6-14.
94. Friedrich Reusswig*, A.P., M. Klier¹, M. Dille¹, A. Ayhan², M. Benkhoff², C. Lersch¹, A. M. Prinz³, S. Gorressen³, S. Karray⁴, J.-W. Fischer³, M. Kelm², M. Elvers¹, *Platelets modulate cell survival in the early phase and cardiac remodelling in the later phase after acute myocardial infarction*. 2022.
95. Morowski, M., et al., *Only severe thrombocytopenia results in bleeding and defective thrombus formation in mice*. Blood, 2013. **121**(24): p. 4938-47.
96. Janssen BJ, De Celle T, Debets JJ, Brouns AE, Callahan MF, Smith TL, *Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(4): p. 1618-24.
97. Yeh SW, Ong LJ, Clark JH, Glazer AN, *Fluorescence properties of allophycocyanin and a crosslinked allophycocyanin trimer*. Cytometry. 1987. **8**(1): p. 91-5.

Danksagung

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. Margitta Elvers für die Möglichkeit dieses Projektvorhaben in ihrem Institut durchzuführen bedanken. Ich konnte dadurch einen interessanten und prägenden Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten erlangen. Fr. Prof. Dr. Martina Krüger möchte für die Zusage als Zweitgutachter meiner Dissertation zu fungieren danken.

Des Weiteren möchte ich der ZETT für die Pflege und Zurverfügungstellung der *mT/mG;Pf4-Cre*-Mäuse meinen Dank aussprechen. Vielen Dank auch dem CAi, insbesondere Frau Prof. Dr. Stefanie Weidtkamp-Peters. Ohne die Bereitstellung des LSM880 wäre es nicht zu diesen eindrucksvollen Fluoreszenzaufnahmen gekommen.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut bedanken! Vielen Dank für eure Geduld und Unterstützung. Ich habe mich in der kurzen Zeit bei euch sehr wohl gefühlt und konnte meinen wissenschaftlichen Erfahrungsschatz durch viele interessante Diskussionen erweitern. Bei Martina Spelleken bedanke ich mich für die außerordentliche Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank gilt auch Dr. Irena Krüger und Dr. Friedrich Reusswig für die Betreuung meiner Arbeit und Unterstützung während der Versuche.

Dem SFB1116, vor allem Fr. Dr. Sandra Berger, möchte ich außerdem für die Möglichkeit danken, dieses Projektvorhaben im Rahmen eines Stipendiums absolvieren zu können. Dadurch hatte ich nicht nur die Möglichkeit, aufgrund der finanziellen Entlastung mich Vollzeit auf dieses Projekt zu konzentrieren, sondern konnte ebenso durch viele themenbezogene Vorträge mein Verständnis zu wissenschaftlichem Arbeiten erweitern.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Danke, dass ihr mir jederzeit Mut zugesprochen habt. Papa, du bist für mich ein großes Vorbild.