

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

Regulation der Thrombozytenzahl  
nach myokardialer Ischämie/Reperfusion in Mäusen

Dissertation

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

vorgelegt von  
Benjamin Tajdar  
2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Margitta Elvers

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Martina Krüger

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2026

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>Summary.....</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>5</b>
<b>Verzeichnis der verwendeten Symbole.....</b>	<b>9</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>11</b>
1.1 Grundlagen: Die Bedeutung Kardiovaskulärer Erkrankungen.....	11
1.2 Thrombozyten .....	12
1.3 Rolle der Thrombozyten im Myokardinfarkt .....	13
1.4 Thrombozyten Abbau.....	15
1.5 Ashwell-Morell-Rezeptor .....	18
1.6 Interleukin-6 und Interleukin-6 Rezeptor .....	20
1.7 Janus-Tyrosin-Kinase.....	22
1.8 Signaltransduktor und Transkriptionsaktivator.....	23
1.9 Thrombopoietin.....	23
1.10 Onkogen des myeloproliferativen Leukämievirus .....	24
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>28</b>
<b>3 Material.....</b>	<b>29</b>
3.1 Verbrauchsmaterialien .....	29
3.2 Geräte.....	29
3.3 Chemikalien .....	30
3.4 Kits.....	33
3.5 Antikörper für Western-Blot.....	33
3.6 Primer für qRT-PCR.....	34
3.7 Software.....	35
<b>4 Methoden .....</b>	<b>36</b>
4.1 Tierexperimentelle Methoden.....	36
4.1.1 Mausmodelle .....	36
4.1.2 Induktion der Ischämie/Reperfusion im Mausmodell .....	38
4.2 Proteinbiochemische Methoden .....	39
4.2.1 Western-Blot-System .....	39

4.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	42
4.3.1	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) .....	42
	(engl. <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> ).....	42
4.4	<i>Histologisches Verfahren</i> .....	46
4.4.1	Hämalaun Eosin-Färbung .....	47
4.5	<i>Statistische Auswertung</i> .....	48
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
5.1	<i>Molekularbiologische Analyse</i> .....	51
5.1.1	Ashwell-Morell Rezeptor.....	51
5.1.2	<i>Il-6r</i> -Genexpression .....	56
5.1.3	<i>Tpo</i> - Genexpression .....	58
5.2	<i>Proteinbiochemische Analyse</i> .....	60
5.2.1	STAT3-Signalweg.....	60
5.2.2	STAT5-Signalweg.....	63
5.3	<i>Histologie</i> .....	65
5.3.1	Histologische Analyse von Knochenmark .....	65
5.3.2	Histologische Analyse der Milz.....	68
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>71</b>
6.1	<i>Thrombozyten in der Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts</i> .....	71
6.2	<i>Hintergrund und bisherige Erkenntnisse</i> .....	72
6.3	<i>Dynamik der Asgr1- und Asgr2-Expression als Marker des AMI</i> .....	72
6.4	<i>Zeitabhängige Regulation der IL-6R-Genexpression</i> .....	74
6.5	<i>Expression des Tpo-Gens und Regulation nach Myokardinfarkt</i> .....	76
6.6	<i>STAT3-Phosphorylierung als Schlüsselregulator für Tpo-Expression</i> .....	79
6.7	<i>Regulation der STAT5-Phosphorylierung nach Myokardinfarkt</i> .....	80
6.8	<i>Differenzielle Regulation der Anzahl der Megakaryozyten im Knochenmark</i> .....	82
6.9	<i>Milz als Schlüsselorgan nach akutem Myokardinfarkt</i> .....	83
6.10	<i>Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse</i> .....	85
6.11	<i>Klinische Bedeutung</i> .....	87
6.11.1	Thrombopoese und TPO-Regulation als therapeutisches Ziel.....	87
6.11.2	Rolle der Milz und Leber bei der Regulation von Thrombozyten.....	87
6.11.3	Modulation entzündlicher Signalprozesse durch IL-6R und STAT .....	88
6.11.4	Bedeutung für kardiovaskuläre Prävention und Nachsorge.....	88
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>90</b>
	<b>Danksagungen</b> .....	<b>101</b>

## Zusammenfassung

Thrombozyten sind zentrale Mediatoren in der Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts (AMI). Neben ihrer etablierten Funktion in der Hämostase tragen sie wesentlich zur Progression des myokardialen Gewebeschadens bei, insbesondere durch die Induktion und Verstärkung inflammatorischer Prozesse. Frühere Studien haben gezeigt, dass Thrombozyten bei Patientinnen und Patienten mit AMI nicht nur das Fortschreiten der Erkrankung begünstigen, sondern auch Rezidivrate und Mortalität signifikant erhöhen. Während der ischämischen Phase und insbesondere in der frühen Reperfusionphase kommt es zu einer ausgeprägten Thrombozytenaktivierung, die eine starke lokale Entzündungsreaktion im Myokard auslöst [1-6].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen der Thrombozytenregulation und die inflammatorische Antwort nach AMI systematisch zu untersuchen. Hierzu wurden zwei Mausmodelle mit Thrombozytopenie – *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie Mäuse mit antikörpervermittelter Thrombozytendepletion – mit Wildtypmäusen (wt-Mäusen) verglichen. Der Fokus lag auf der Identifikation zentraler Faktoren und molekularer Mechanismen, die die Regulation der Thrombozytenzahl nach AMI beeinflussen.

Die zeitabhängige Analyse der Genexpression der Ashwell-Morell-Rezeptor- (AMR)-Untereinheiten *Asgr1* und *Asgr2* zeigte eine dynamische Hochregulation in der akuten Phase nach AMI (6-24 Stunden), gefolgt von einer Normalisierung zwischen dem 5. und 21. Tag in wt-Mäusen. Dies unterstreicht die Rolle des AMR als kritischen Regulator der entzündungsinduzierten Thrombopoese. Parallele Genexpressionsprofile wurden für den IL-6-Rezeptor beobachtet, der ebenfalls innerhalb von 6-24 Stunden signifikant hochreguliert wurde.

Die Thrombozytendepletion und der *Mpl*-Knockout führten zu unterschiedlichen Anpassungen der Signalwege, was auf komplexe kompensatorische Mechanismen hinweist. Die Expression des *Tpo*-Gens in der Leber war 24 Stunden nach AMI in wt-Mäusen signifikant erhöht, während *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse bereits vor dem AMI erhöhte TPO-Spiegel aufwiesen. Dies unterstreicht die zentrale Rolle des *Mpl*-Rezeptors in der Thrombopoese, da *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse trotz erhöhter TPO-Konzentrationen eine ausgeprägte Thrombozytopenie entwickelten. In diesen Mäusen konnte zudem eine

kompensatorische Hochregulation inflammationsrelevanter Gene wie *Il-6r*, *Asgr1* und *Asgr2* nachgewiesen werden.

Die STAT3-Phosphorylierung stieg signifikant innerhalb von 6-24 Stunden nach AMI an und spiegelte die frühe Aktivierung inflammatorischer Signalwege wider. Im Gegensatz dazu zeigte STAT5 in wt-Mäusen eine verstärkte STAT5-Phosphorylierung ab dem 5. Tag nach AMI, was auf eine Rolle in späteren, möglicherweise regenerativen Prozessen hindeutet.

In der Milz konnte innerhalb von 24 Stunden nach AMI ein signifikanter Anstieg der Megakaryozytenzahl beobachtet werden, was auf eine Mobilisierung aus dem Knochenmark schließen lässt. Dies unterstreicht die Rolle der Milz als zentrales Organ in der frühen Phase nach AMI, während das Knochenmark die langfristige Thrombopoese steuert.

Diese Ergebnisse erweitern das Verständnis der Thrombozytenregulation und der inflammatorischen Antwort nach AMI und eröffnen therapeutische Perspektiven. Die gezielte Modulation der AMR-, Mpl-, TPO-, IL-6R- und STAT-Signalwege bietet vielversprechende Ansätze zur Kontrolle von Entzündung und Thrombose bei Patientinnen und Patienten mit AMI.

## Summary

Platelets are central mediators in the pathophysiology of acute myocardial infarction (AMI). In addition to their established role in hemostasis, they significantly promote myocardial tissue injury, primarily by initiating and amplifying inflammatory processes. Previous studies have shown that platelets not only accelerate disease progression in patients with AMI but also significantly increase the risk of recurrence and mortality. During the ischemic phase – and particularly in the early reperfusion phase – platelet activation is markedly increased, initiating a pronounced local inflammatory response within the myocardium [1-6].

The aim of this study was to systematically investigate the mechanisms of platelet regulation and the inflammatory response following AMI. To this end, two thrombocytopenic mouse models – *Mpl*<sup>-/-</sup> mice and mice with antibody-mediated platelet depletion – were compared with wild-type mice (wt mice). The focus was on identifying key molecular factors and pathways regulating platelet counts after AMI.

Time-resolved gene expression analyses revealed a dynamic upregulation of the Ashwell-Morell receptor (AMR) subunits *Asgr1* and *Asgr2* during the acute post-infarction phase (6-24 hours), followed by normalization within 5-21 days in wt mice. These findings highlight AMR as a critical regulator of inflammation-driven thrombopoiesis. A parallel gene expression pattern was observed for the interleukin-6 receptor (IL-6R), which was also significantly upregulated during the early post-AMI period.

Platelet depletion and *Mpl* knockout led to distinct signaling adaptations, suggesting complex compensatory mechanisms. Hepatic expression of the *Tpo* gene was significantly elevated 24 hours after AMI in wt mice, whereas *Mpl*<sup>-/-</sup> mice had already exhibited elevated TPO levels prior to AMI. Despite these elevated TPO concentrations, *Mpl*<sup>-/-</sup> mice developed severe thrombocytopenia, emphasizing the central role of *Mpl* signaling in effective thrombopoiesis. These mice also showed a compensatory upregulation of inflammation-related genes such as *Il-6r*, *Asgr1*, and *Asgr2*.

Phosphorylation of STAT3 increased significantly within 6-24 hours post-AMI, indicating early activation of inflammatory signaling pathways. In contrast, enhanced phosphorylation of STAT5

was observed starting from day 5 after AMI in wt mice, suggesting a role in later, potentially regenerative processes.

A significantly increased number of splenic megakaryocytes were observed within 24 hours post-AMI, indicating mobilization from the bone marrow. This highlights the spleen's role as a central organ in early thrombopoietic responses, whereas the bone marrow governs long-term platelet production.

In summary, these findings deepen our understanding of platelet regulation and the inflammatory response following AMI and suggest new therapeutic perspectives. Targeted modulation of the AMR, Mpl, TPO, IL-6R, and STAT signaling pathways may offer promising strategies for controlling inflammation and thrombosis in patients with AMI.

## Abkürzungsverzeichnis





















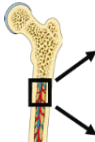
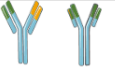




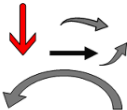














<b>A. dest</b>	aqua destillata
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACS</b>	Akutes Koronarsyndrom
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AMI</b>	Akuter Myokardinfarkt
<b>AMR</b>	Ashwell-Morell-Rezeptor
<b>AML</b>	Akute myeloische Leukämie
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>ASGPR</b>	Asialoglycoproteinrezeptor
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>ca.</b>	<i>circa</i>
<b>cAMP</b>	cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>cDNA</b>	engl. <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNS)
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CML</b>	Chronische myeloische Leukämie
<b>CVD</b>	engl. <i>cardiovascular disease</i> (Kardiovaskuläre Erkrankung)
<b>d</b>	engl. <i>day</i> (dt. Tag)
<b>Depl.</b>	Depletion
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilliertes Wasser
<b>DNA</b>	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ECL</b>	engl. <i>enhanced chemiluminescence</i> (Chemilumineszenz)
<b>ECM</b>	extrazelluläre Matrix
<b>EDTA</b>	EthylendiAMIn - tetraessigsäure
<b>EKG</b>	Echokardiographie
<b>ESV</b>	endsystolisches Volumen
<b>etc</b>	<i>et cetera</i>

<b><i>Fstl</i></b>	<i>Follistatin-related</i>
<b>g</b>	Gramm
<b>g</b>	Zentrifugalbeschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdschwerebeschleunigung; Einheit für Zentrifugationsgeschwindigkeit
<b>g / L</b>	Gramm / Liter
<b>Gal</b>	Galaktose
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd - 3 - phosphat- Dehydrogenase
<b>GlcNAc</b>	N-AcetylglucosAMIn (D-GlucosAMIn)
<b>GP</b>	Glykoprotein
<b>h</b>	engl. <i>hour</i> (dt. Stunde)
<b>HE-Färbung</b>	Hämalaun-Eosin-Färbung
<b>HL</b>	engl. <i>hepatic lectin</i> (Leber-Lektin)
<b>HSC</b>	Hämatopoetische Stammzelle
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IL-6</b>	Interleukin-6
<b>IL-6R</b>	Interleukin-6 Rezeptor
<b>IP</b>	Immunpräzipitation
<b>JAK</b>	Janus Tyrosinkinase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>KHK</b>	Koronare Herzkrankheit
<b>konst.</b>	konstitutiv
<b>L</b>	Liter
<b>LAD</b>	engl. <i>left anterior descending</i> (lat. Ramus interventricularis anterior)
<b>LV</b>	linker Ventrikel
<b>mA</b>	Milliampère
<b>MI</b>	Myokardinfarkt
<b>Min</b>	Minuten
<b>MK</b>	Megakaryozyt
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mM</b>	millimolar

<b>mmhg</b>	Millimeter Quecksilbersäule
<b>mm<sup>2</sup></b>	Quadratmillimeter
<b>mmol</b>	Millimol
<b>mol / L</b>	Mol / Liter
<b>Mpl</b>	Myeloproliferatives Leukämievirus Onkogen
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>MSC</b>	Mesenchymale Stammzelle
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>n.s.</b>	nicht signifikant
<b>OP</b>	Operation
<b>p</b>	phosphoryliert
<b>PBS</b>	Phosphate buffered Saline
<b>PCI</b>	Perkutane Koronarintervention
<b>PCR</b>	engl. <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>pg / ml</b>	Pikogramm/ Milliliter
<b>PI</b>	Proteinase - Inhibitor
<b>PLD1</b>	Phospholipase D 1
<b>PPP</b>	engl. <i>platelet poor plasma</i> (Thrombozytenarmes Plasma)
<b>PS</b>	Phosphatidylserin
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>qRT – PCR</b>	engl. <i>quantitative real – time PCR</i> (quantitative Real - Time PCR)
<b>RNA</b>	engl. <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
<b>rpm</b>	Runden pro Minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>s.</b>	siehe
<b>SDS</b>	engl. <i>sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
<b>sek</b>	Sekunde
<b>SEM</b>	engl. <i>standard error of the mean</i> (Fehlerindikator)
<b>Sia</b>	Sialinsäure
<b>SSC</b>	Side scatter in der Durchflusszytometrie

<b>STAT</b>	Signalwandler und Transkriptionsaktivator
<b>TPO</b>	Thrombopoietin
<b>u. a.</b>	unter anderem
<b>ü/N</b>	über Nacht
<b>UKD</b>	Universitätsklinikum Düsseldorf
<b>vWF</b>	von - Willebrand - Faktor
<b>WHO</b>	engl. <i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganistaion)
<b>wt</b>	Wildtyp
<b>s. c.</b>	lat. <i>subcutan</i> (subkutan)
<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>ZETT</b>	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf
<b>SOCS3</b>	Zytokinsignal 3
<b><math>\alpha</math></b>	Alpha
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\delta, \Delta</math></b>	Delta
<b><math>\lambda</math></b>	Lambda
<b>u.</b>	und
<b>#</b>	Bestellnummer
<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b><math>\mu\text{g} / \text{ml}</math></b>	Mikrogramm / Milliliter
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	Mikroliter

## Verzeichnis der verwendeten Symbole

	ASGPR-1		IL-6		Thrombozyt
	ASGPR-2		Caspase		Erythrozyten
	AMR		Phosphat		Makrophage
	GP130		Integrin α <sub>M</sub> β <sub>2</sub>		T-Lymphozyt
	GP80		JAK1		MK-Vorläufer
	IL-6 Rezeptor		JAK2		MK
	Fc-Rezeptor		STAT3		Knochenmark
	AKs		BAX-BAK		Gefäß
	Integrin α <sub>IIb</sub> β <sub>3</sub>		Zellmembran		Pfeile
	GPIba		Zellkern		
	GPIb-IX		DNA		
	Mpl		TPO-mRNA		
	TPO		Mitochondrium		
	Sia		Zytoskelett		
	Gal		Abgebautes Zytoskelett		
	GlcNAc		PS		

Die einzelnen Elemente der Zeichnungen und Abbildungen stellen keine realen Größenverhältnisse dar.

Die dargestellten Zeichnungen sind entweder direkt von <https://smart.servier.com/> übernommen oder mit Hilfe vorhandener Formen und Strukturen in <https://smart.servier.com/> mit einigen Veränderungen entworfen.

Urheber: **SERVIER MEDICAL ART**

**CREATIVE COMMONS LICENCE:**

Servier Medical Art von Servier ist lizenziert unter [Creative Commons Attribution 3.0 Unported License](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/)

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen: Die Bedeutung Kardiovaskulärer Erkrankungen

Trotz eines Rückgangs der kardiovaskulären Mortalität in den letzten Jahrzehnten stellen kardiovaskuläre Erkrankungen (engl. *cardiovascular diseases*, CVDs) weiterhin die weltweit häufigste Todesursache dar [7-9]. Im Jahr 2017 bestätigte *Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study* (GBD), dass CVDs weltweit für über 17 Millionen Todesfälle verantwortlich waren. Dies machte 32% aller Todesfälle und 46% aller an nicht übertragbaren Krankheiten gestorbener Patienten aus. CVDs verursachen somit mehr als doppelt so viele Todesfälle wie Krebserkrankungen und mehr als alle übertragbaren, neonatalen sowie ernährungsbedingten Erkrankungen zusammen [7, 8, 10]. In Europa führen CVDs jährlich zu über 4 Millionen Todesfällen, was etwa 45 % aller Todesfälle entspricht. Dabei stellen die koronare Herzkrankheit (KHK) und zerebrovaskuläre Erkrankungen mit 1,8 Millionen bzw. 1 Million Todesfällen die häufigsten Ursachen für CVD-bedingte Mortalität dar [8, 11-13]. Das akute Koronarsyndrom (ACS) umfasst ein Spektrum klinischer Manifestationen, das von instabiler Angina pectoris über den nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI) bis hin zum ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) reicht [14-16]. ACS tritt infolge eines Verschlusses der Koronararterien auf, der durch die Ruptur oder Erosion einer atherosklerotischen Plaque bedingt ist. Dies führt zur Bildung eines nicht-okklusiven oder okklusiven intraluminalen Thrombus in einer oder mehreren Koronararterien. Sowohl ein intraluminaler Thrombus als auch eine distale thrombotische Embolisation können den koronaren Blutfluss unterbrechen und dadurch eine Sauerstoffunterversorgung des Myokards verursachen, was letztlich zum Zelltod von Kardiomyozyten führt [14, 16]. Nach einem ACS kann es im Übergang vom akuten zum chronischen Myokardinfarkt (MI) infolge der Ausbildung von fibrotischem Myokardgewebe und der Entwicklung einer koronaren Herzinsuffizienz weiterhin zu ventrikulären Arrhythmien und einem sekundären plötzlichen Herztod kommen [17].

Zusammenfassend stellt der MI eine schwerwiegende kardiovaskuläre Erkrankung mit mikrovaskulärem Schaden der Herzgefäße dar, die mit einer hohen Rezidivrate und Mortalität assoziiert ist [1, 2].

## 1.2 Thrombozyten

Im klassischen Verständnis liegt die Hauptfunktion der Thrombozyten in der Hämostase. Darunter versteht man die physiologische Funktion dieser anukleären Blutzellen, Blutungen zu verhindern. Darüber hinaus gelten Thrombozyten auch als pathophysiologische Auslöser thrombotischer Gefäßverschlüsse in erkrankten Gefäßen (Thrombosen), die zu ischämischen Schädigungen unterschiedlicher Gewebe führen können - etwa bei Myokardinfarkt oder Schlaganfall [18, 19]. Bei Patientinnen und Patienten mit AMI spielen Thrombozyten eine zentrale Rolle beim Fortschreiten der Erkrankung sowie bei der Erhöhung von Rezidivrate und Mortalität. Während der Ischämie und insbesondere in der frühen Phase der Reperfusion nach ischämischen Ereignissen werden sie stark aktiviert und können eine ausgeprägte lokale inflammatorische Reaktion im Myokard auslösen [1-6].

Thrombozyten entstehen aus Megakaryozyten, spezialisierten Zellen des Knochenmarks. Dieses ist stark vaskularisiert und dicht mit Megakaryozyten geringer Motilität besiedelt. Die Mehrzahl reifer Megakaryozyten befindet sich in den Kapillaren sinusförmiger Gefäße, von wo aus sie die Thrombozytenvorläufer durch die Endothelschicht in den Blutkreislauf freisetzen [20-22]. Die Megakaryopoese - also die Entwicklung der Megakaryozyten - erfolgt primär im Knochenmark und beschreibt einen komplexen Prozess, bei dem sich hämatopoetische Stammzellen über mehrere Differenzierungsstufen zu Megakaryozyten entwickeln. Nach ihrer Reifung schnüren diese Zytoplasmafortsätze ab, die in den Blutkreislauf gelangen und dort zu funktionalen Thrombozyten reifen. Dabei werden Organellen, Vesikelstrukturen und Granula vom Zellkörper der Megakaryozyten auf die entstehenden Thrombozyten übertragen [23-28].

Durch eine kontinuierliche Elimination und die tägliche Neubildung von etwa  $10^{11}$  Thrombozyten wird eine stabile Thrombozytenkonzentration im humanen Blut aufrechterhalten - typischerweise im Bereich von 150.000 bis 400.000 Zellen pro Mikroliter [25]. Eine strikte Regulation der Thrombopoese ist essenziell, um spontane Blutungen bei zu niedrigen sowie arterielle

Gefäßverschlüsse und Organschäden bei zu hohen Thrombozytenzahlen zu verhindern. Die Kontrolle dieser Balance erfolgt durch komplexe Mechanismen, welche die Produktion und den Abbau von Thrombozyten unter physiologischen und pathologischen Bedingungen steuern [27, 29].

Neben ihrer hämostatischen Funktion wirken Thrombozyten auch als aktive Sekretionszellen. Sie setzen verschiedene Mediatoren aus intrazellulären Speichergranula frei, darunter  $\alpha$ -Granula, elektronendichte  $\delta$ -Granula und lysosomale  $\lambda$ -Granula. Diese freigesetzten Substanzen modulieren vielfältige physiologische und pathophysiologische Prozesse, wie z. B. Hämostase, Angiogenese, Tumorstadium, Gewebereparatur sowie immunologische und entzündliche Reaktionen.

Chronische Entzündungen sind häufig mit einer reaktiven Thrombozytose ( $> 450.000/\mu\text{l}$ ) assoziiert, während akute systemische Infektionen typischerweise mit einer abrupten Abnahme der Thrombozytenzahl (Thrombozytopenie,  $< 150.000/\mu\text{l}$ ) einhergehen [27, 30].

### **1.3 Rolle der Thrombozyten im Myokardinfarkt**

Es konnte zunehmend beobachtet werden, dass bei ACS-Patienten eine erhöhte Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten sowie ein erhöhter Anteil aktivierter Thrombozyten im Blut nachweisbar sind [3-6]. Aus der Pathophysiologie des MI ist bekannt, dass Thrombozyten neben ihrer Funktion in der Hämostase im vaskulären System eine wichtige Rolle spielen. Dazu zählen die Förderung der atherosklerotischen Plaquebildung, die Plaque-Instabilität, Thrombose sowie das Wiederauftreten von Koronarereignissen bzw. Restenose nach primärer perkutaner Koronarintervention (PCI) [1, 2]. Zusätzlich spielen Thrombozyten eine ursächliche Rolle bei der Pathogenese der myokardialen Schädigung durch myokardiale Ischämie/Reperfusion (I/R), indem sie während des MI aktiviert werden und mit Leukozyten interagieren [31-35]. Aktivierte Thrombozyten adhären am aktivierten Endothel und interagieren mit T-Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen sowie Faktoren des Gerinnungssystems, wobei diese Wechselwirkungen eine thromboinflammatorische Reaktion im Myokard auslösen. Somit fördern eine übermäßige inflammatorische Reaktion des Herzens in den Tagen nach dem MI das Fortschreiten der Atherosklerose und den Umbau der Gefäße sowie zusätzliche Zellschäden und eine kontraktile

Dysfunktion, die die Ausdehnung des Infarktareals vergrößern und eine aberrante Remodellierung des Myokards verursachen [5, 26, 31-43].

Frühere Studien zeigten, dass bereits zwei Minuten nach Reperfusion Thrombozyten am aktivierten Endothel adhären und diese Adhäsion bis zu 60 Minuten nach Reperfusion zunimmt. Zudem beschränkt sich diese Adhäsion auf das zuvor ischämische Myokard, und die adhärenen Thrombozyten kolokalisieren mit Leukozyten. Darüber hinaus korreliert der Grad der Thrombozytenaktivierung mit der Dauer der Ischämie und dem Ausmaß der Gewebenekrose. Aktivierte Thrombozyten wurden ausschließlich im zuvor ischämischen Myokard gefunden, was darauf hinweist, dass Endothelaktivierung oder -dysfunktion sowie Zytokine oder Chemokine, die im ischämischen Myokard freigesetzt werden, zur Thrombozytenadhäsion beitragen. Es wurde festgestellt, dass Neutrophile in denselben ischämischen Regionen wie Thrombozyten rekrutiert werden, wobei die Infiltration von Neutrophilen im Vergleich zur Thrombozytenadhäsion verzögert erfolgt [3, 5]. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass Thrombozyten verschiedene lösliche Faktoren enthalten, darunter inflammatorische Zytokine und von Thrombozyten abgeleitete Wachstumsfaktoren [44]. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass Thrombozyten und ihre löslichen Faktoren die Funktion der Kardiomyozyten unabhängig von ihrer Rolle bei okklusiver Koronarthrombose und Ischämie beeinflussen können [45].

Aktivierte Thrombozyten setzen nach einer koronaren Thrombose Granulainhalte frei, die die zelluläre Extravasation und Akkumulation im Myokard sowie immunaktivierende Reaktionen von Leukozyten beeinflussen. Freigesetzte thrombozytenabgeleitete Mikropartikel und Exosomen induzieren die Expansion von Fibroblasten und deren Transdifferenzierung zu Myofibroblasten, welche traditionell als Hauptverantwortliche für die Adhäsion an der extrazellulären Matrix (EZM) nach Gewebeverletzungen angesehen werden. Letztendlich werden abgestorbene Kardiomyozyten durch kollagenes Narbengewebe ersetzt. Eine verlängerte Aktivierung der Fibroblasten und deren Umwandlung zu Myofibroblasten führt zu einer nachteiligen myokardialen Remodellierung, die sich auch auf das nicht direkt betroffene Myokard ausweiten kann [18, 46, 47].

Bei Patienten sowie Mäusen mit AMI erhöht sich der Plasmaspiegel von Katecholaminen um das Zwei- bis Dreifache. Dieser Befund liefert Hinweise auf Mechanismen, die die Freisetzung von Thrombozyten und Monozyten aus der Milz auslösen und somit die Entzündung fördern. Es ist bekannt, dass die Milz Thrombozyten im Körper speichert und freisetzen kann [38, 48, 49]. Die

Daten deuten darauf hin, dass die Freisetzung von Thrombozyten aus der Milz für die Zunahme der Anzahl zirkulierender Thrombozyten im Zusammenhang mit AMI verantwortlich ist [38].

## 1.4 Thrombozyten Abbau

Megakaryozyten im Knochenmark setzen Vorläuferzellen der Thrombozyten ins Blut frei, in dem sie zu reifen Thrombozyten heranreifen. Beschädigte oder seneszente Thrombozyten werden von Makrophagen der Milz sowie der Leber, insbesondere von den Kupffer-Zellen, erkannt und eliminiert [50]. Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass die Mechanismen des Thrombozytenabbaus bei Menschen und Mäusen trotz einiger Unterschiede viele Gemeinsamkeiten aufweisen [50]. Ein wesentlicher Unterschied besteht beispielsweise in der Lebensdauer der Thrombozyten, die beim Menschen 7 bis 10 Tage und bei Mäusen 4 bis 5 Tage beträgt [51, 52]. Ein höheres Alter der Thrombozyten führt zur Erschöpfung der Zellen, einem Zustand mit reduzierter Sekretions- und Thrombusbildungsfähigkeit [53].

Der Abbau der Thrombozyten erfolgt hauptsächlich in der Leber [54]. Die ortsständigen Lebermakrophagen, die sogenannten Kupffer-Zellen, machen etwa 15 % des Lebergewebes aus und sind in den hepatischen Sinusoiden lokalisiert [54]. Aufgrund ihrer Anordnung in den durchbluteten Sinusoiden sind die Membranrezeptoren der Kupffer-Zellen so positioniert, dass sie mit im Blutstrom befindlichen Substanzen in Kontakt kommen und diese aus dem Kreislaufsystem entfernen können. Hepatische sinusoidale Endothelzellen vermitteln den Abbau von Thrombozyten zudem durch Endozytose [55]. Neben der Leber fungieren auch Milz und Lunge als potenzielle Orte des Thrombozytenabbaus [56].

Es existieren mehrere Mechanismen, die den Abbau von Thrombozyten vermitteln (Abb. 1):

Die Lebensdauer von Thrombozyten wird durch ein Gleichgewicht im Zytoplasma zwischen dem pro-apoptotischen BAX-BAK-Signalweg und den anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie, einschließlich Bcl-2, Bcl-w und Bcl-xL, bestimmt, welche sowohl in menschlichen als auch in murinen Thrombozyten exprimiert werden [27, 50, 57-59]. Reife Thrombozyten weisen zu Beginn ihres Lebenszyklus ein gewisses Kontingent der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine auf, das mit der Zeit abnimmt und dadurch die Inhibition des BAX-BAK-Signalwegs aufhebt. Dieser Signalweg löst die mitochondriale Lyse, die Freisetzung von Cytochrom *c* und die Aktivierung

cytoplasmatischer Caspasen aus. Caspasen zerlegen das Zytoskelett und führen zur Hochregulierung von Phosphatidylserin auf der Membran der Thrombozyten. Zellen, die Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche exprimieren, werden von spezialisierten Phagozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen erkannt und eliminiert [60]. Zusätzlich zu den Rezeptoren, die Phosphatidylserin erkennen, ist die Makrophagenmembran mit weiteren Rezeptoren, wie beispielsweise dem Integrin  $\alpha M\beta 2$ , besetzt, die beschädigten Thrombozyten binden können [61] (Abb. 1A).

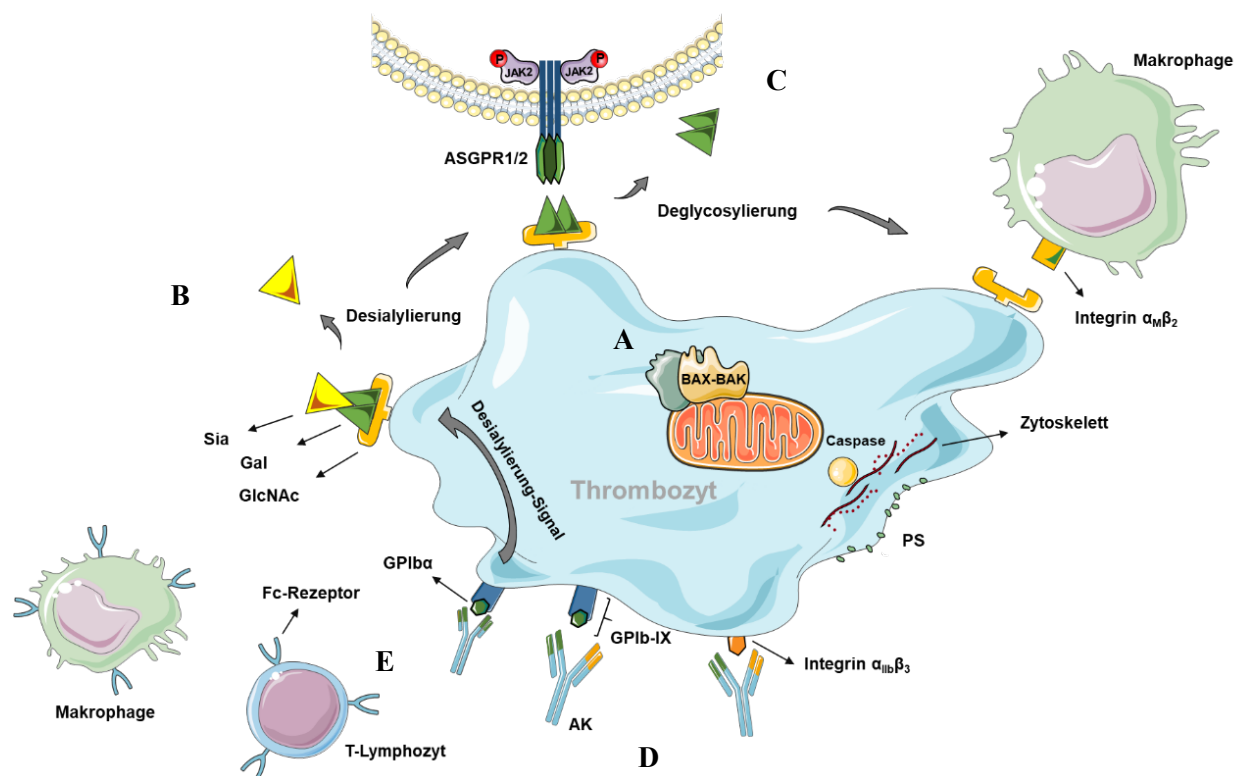
Mit zunehmendem Alter der Thrombozyten werden die negativ geladenen Sialinsäurereste auf den Glykostrukturen der Oberfläche seneszenten Thrombozyten durch Neuraminidasen (*Sialidasen*) entfernt. Neuraminidasen sind Glykosidhydrolasen, die terminale Sialinsäure aus Glykanen ablösen können (Desialylierung) [50]. Desialylierte Thrombozyten werden durch ihre terminalen Galaktosestrukturen von den hepatischen Ashwell-Morell-Rezeptoren (AMR) erkannt, in die Leber aufgenommen und anschließend in den hepatischen Sinusoiden aus dem Blut entfernt [27, 50, 62]. Die Bindung an den AMR induziert zudem eine Erhöhung der Thrombopoietinsynthese in Hepatozyten, die als hämatopoetisches Zytokin die Thrombozytose (Thrombopoese) stimuliert [50] (Abb. 1B).

Nach der Desialylierung verlieren seneszente Thrombozyten zusätzlich Galaktose (Deglycosylierung), was zur Exposition von N-Acetylglucosamin (GlcNAc, D-GlucosAMIn) führt. Diese modifizierten Thrombozyten werden von anderen Kohlenhydratrezeptoren, insbesondere dem Integrin  $\alpha M\beta 2$ , erkannt, wodurch ihre Aufnahme durch Kupffer-Zellen vermittelt wird [50, 63] (Abb. 1C).

Unter pathologischen Bedingungen, insbesondere bei Immunreaktionen, binden autoreaktive Antikörper an das Integrin  $\alpha IIb\beta 3$  und/oder an das Glykoprotein (GP)  $Ib\alpha$  als Teil des von-Willebrand-Rezeptorkomplexes (GPIb-IX) auf der Membran der Thrombozyten. Dadurch können diese Thrombozyten über Fc-Rezeptoren an Makrophagen und zytotoxische  $CD8^+$ -T-Lymphozyten binden und in der Milz abgebaut werden [25, 63] (Abb. 1D).

Spezifische Anti-GPIb $\alpha$ -Antikörper (im Gegensatz zu Anti- $\alpha IIb\beta 3$ -Antikörpern) induzieren neben dem Abbau der Thrombozyten durch Makrophagen und Lymphozyten zusätzlich die Desialylierung der Thrombozyten. Dadurch konvergiert das Signal mit dem immunvermittelten

Abbau über den AMR, welcher wiederum die Thrombopoietinsynthese in Hepatozyten erhöht [25, 29, 63] (Abb. 1E).



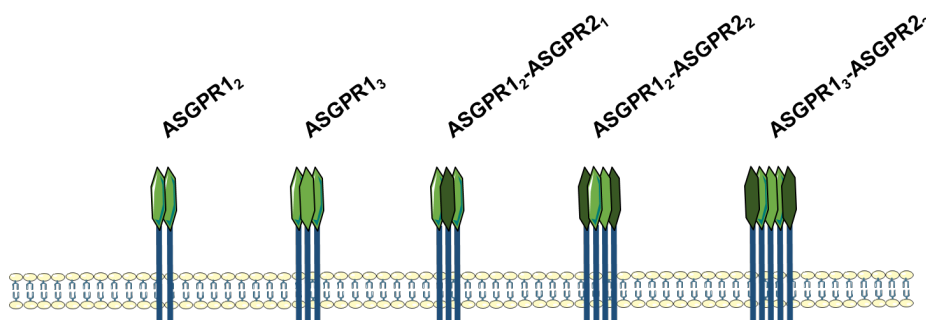
**Abbildung 1: Mechanismen des Abbaus von Thrombozyten.** (A) Der pro-apoptotische BAX-BAK-Signalweg initiiert die mitochondriale Lyse, die Freisetzung von Cytochrom *c* sowie die Aktivierung cytoplasmatischer Caspasen. Diese Caspasen zerlegen das Zytoskelett und bewirken die Hochregulierung von Phosphatidylserin auf der Thrombozytenmembran. Thrombozyten, die Phosphatidylserin exponieren, werden von Immunzellen erkannt und eliminiert. (B) Desialylierte Thrombozyten werden durch ihre terminalen Galaktosestrukturen von hepatischen AMRs erkannt, daraufhin in der Leber aufgenommen und in den hepatischen Sinusoiden aus dem Blut entfernt. (C) Nach der Desialylierung verlieren die Thrombozyten zusätzlich Galaktose (Deglycosylierung), wodurch N-Acetylglucosamin (GlcNAc) exponiert wird. Diese modifizierten Thrombozyten werden vom Integrin  $\alpha M\beta 2$  erkannt, was ihre Aufnahme durch Kupfer-Zellen vermittelt. (D) Autoreaktive Antikörper binden an das Integrin  $\alpha II\beta 3$  und/oder an das Glykoprotein Iba als Teil des von-Willebrand-Rezeptorkomplexes (GPIb-IX) auf der Thrombozytenmembran. Dadurch können diese Thrombozyten über Fc-Rezeptoren an Makrophagen und zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten binden und in der Milz abgebaut werden. (E) Spezifische Anti-GPIb $\alpha$ -Antikörper induzieren zudem die Desialylierung der Thrombozyten, wodurch ein Signal entsteht, das mit dem immunvermittelten Abbau über den AMR konvergiert und zusätzlich die Thrombopoietinsynthese in Hepatozyten erhöht.

Abbildung wurde unter Verwendung grafischer Vorlagen von Servier Medical Art erstellt, [www.servier.com](http://www.servier.com), lizenziert unter CC BY 3.0.

## 1.5 Ashwell-Morell-Rezeptor

Der Ashwell-Morell-Rezeptor (AMR), auch als hepatischer Asialoglycoproteinrezeptor (ASGPR) bezeichnet, war der erste in Säugetieren identifizierte und isolierte zelluläre Lektin-Rezeptor [64]. Er vermittelt die Bindung und Endozytose einer Vielzahl exogen applizierter Glykoproteine, welche frei von Sialinsäure sind und terminal exponierte Galactose-(Gal) -Reste an den Enden ihrer Glycanketten tragen [64, 65].

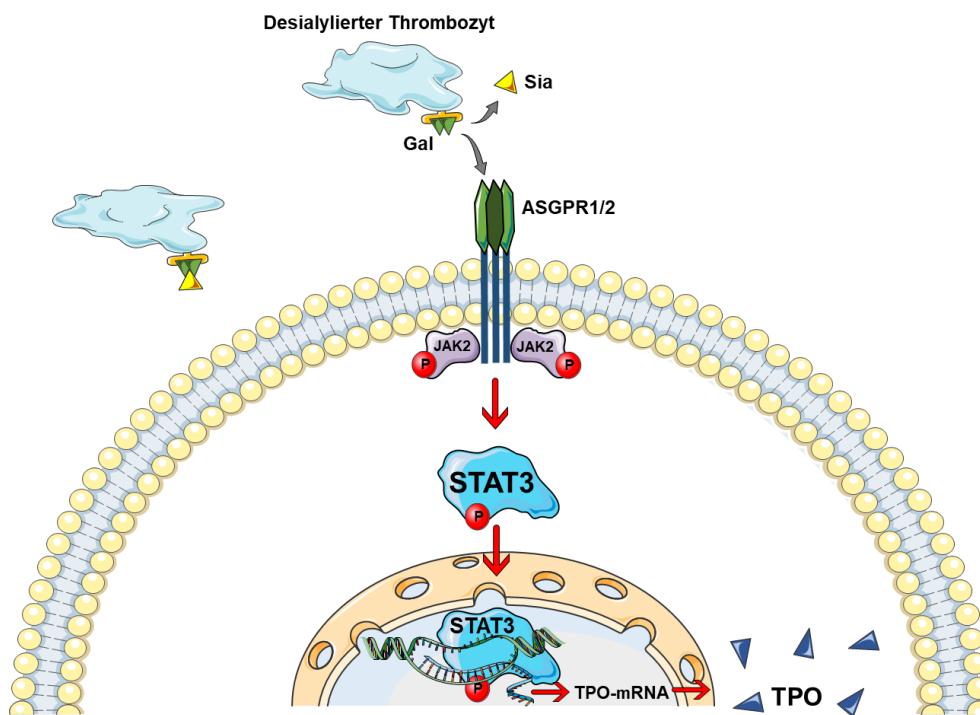
Der AMR besteht aus Transmembran-Glykoproteinen, die als Leber-Lektin-1 bzw. Asialoglycoprotein-1 (HL-1 oder ASGR1) sowie Leber-Lektin-2 bzw. Asialoglycoprotein-2 (HL-2 oder ASGR2) bezeichnet werden und von eng verwandten Genen *ASGR1* und *ASGR2* kodiert werden [66, 67]. *ASGR1* und *ASGR2* werden überwiegend in der Leber exprimiert und gelten dort als charakteristische Marker für Hepatozyten, sind jedoch auch in einigen extrahepatischen Geweben nachweisbar [68]. In verschiedenen zellulären Kontexten bei Säugetieren konnte eine Homo- und Heterooligomerisierung der Glykoproteine ASGR1 und ASGR2 beobachtet werden, die funktionellen Varianten des AMR bilden. Die am häufigsten vorkommende und funktionell stärkste Konformation besteht aus zwei ASGR1- und einer ASGR2-Kette und weist die höchste Affinität für terminale Galactosereste auf [69, 70] (Abb. 2).



**Abbildung 2: Oligomerisierung der Glykoproteine ASGR-1 und ASGR-2 führt zur Bildung funktioneller Varianten des Ashwell-Morell-Rezeptors.** Die häufigste Konformation des AMR besteht aus zwei ASGR-1-Ketten und einer ASGR-2-Kette und weist die höchste Affinität zu terminaler Galactose auf.

Abbildung wurde unter Verwendung grafischer Vorlagen von Servier Medical Art erstellt, [www.servier.com](http://www.servier.com), lizenziert unter CC BY 3.0.

AMRs befinden sich auf der Plasmamembran der Hepatozyten in den Kapillaren der sinusoidalen Lebergefäße und sind so positioniert, dass freiliegende Galactose auf der Oberfläche der Thrombozyten sowie weitere zirkulierende Glykoproteine an sie binden und anschließend in der Leber entfernt werden [71-75]. Darüber hinaus führen die AMRs neben der Vermittlung des Abbaus seneszenter Thrombozyten durch die Induktion der Thrombopoietin (TPO)-Produktion zu einer Stimulation der Thrombopoese [25, 76]. In diesem Zusammenhang erkennen die AMRs in der Leber die desialylierten Thrombozyten im Blutkreislauf und sind verantwortlich für einen direkten Rückkopplungsmechanismus zwischen dem Abbau der desialylierten Thrombozyten und der Expression sowie Sekretion der hepatischen *TPO*-mRNA über die Janus-Tyrosinkinase 2 (JAK2) - und *Signaltransducer and activator of transcription 3* (STAT3) -Phosphorylierung sowie die STAT3-Translokation in den Zellkern. Somit wirkt sich die Interaktion zwischen Thrombozyten und Hepatozyten über TPO direkt auf die Megakaryozyten im Knochenmark aus und stimuliert die Thrombopoese [27, 77, 78] (Abb. 3).



**Abbildung 3: Signalweg der Thrombozyten-Bindung an den AMR mit nachgeschalteter STAT3-Aktivierung, der zur Expression von *TPO*-mRNA führt.** In der Leber erkennen AMRs zirkulierende desialylierte Thrombozyten und vermitteln einen direkten Feedbackmechanismus zwischen deren Abbau und der Expression sowie dem Export hepatozytärer *TPO*-mRNA. Dieser Prozess erfolgt über die Phosphorylierung von JAK2 und STAT3 sowie die Translokation von STAT3 in den Zellkern.

Abbildung wurde unter Verwendung grafischer Vorlagen von Servier Medical Art erstellt, [www.servier.com](http://www.servier.com), lizenziert unter CC BY 3.0.

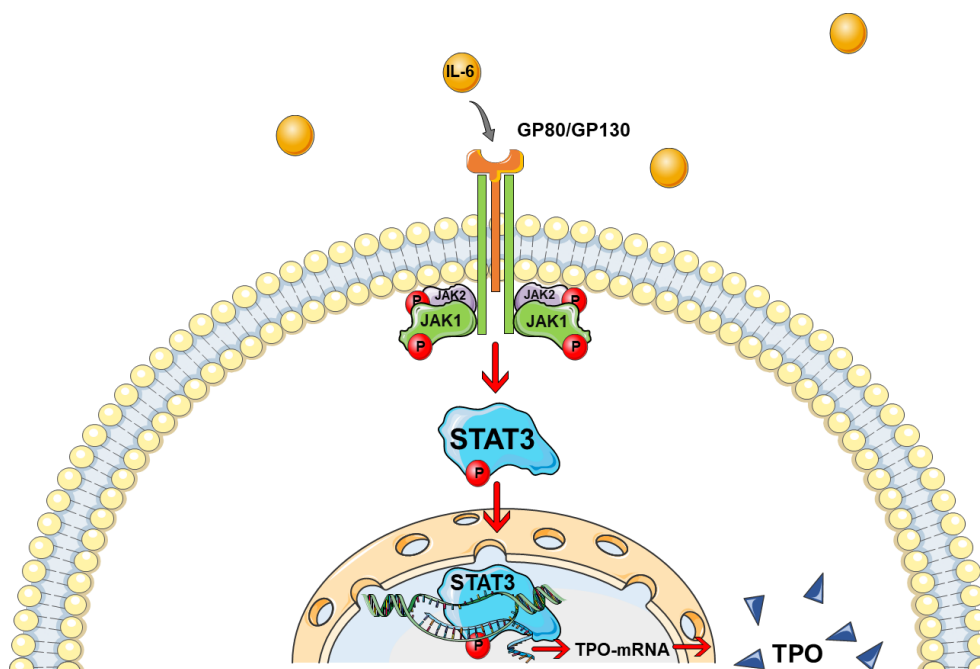
## 1.6 Interleukin-6 und Interleukin-6 Rezeptor

Eine Reihe entzündlicher Erkrankungen wie ACS, Colitis ulcerosa, rheumatoide Arthritis, Ovarialkarzinom u. a. sind mit Thrombozytose und erhöhten TPO-Konzentrationen im Blut assoziiert [79-82]. Dafür spielt Interleukin-6 (IL-6) eine zentrale Rolle als multifunktionaler, proinflammatorischer Entzündungsmediator, der bei inflammatorischen Zuständen - etwa bei akuter myokardialer Ischämie/Reperfusion - rasch freigesetzt wird.

Das proinflammatorische IL-6 ist ein Zytokin mit vier  $\alpha$ -Helices und 184 Aminosäuren, das über ein einzigartiges Rezeptorsystem im Organismus zahlreiche biologische Funktionen ausübt. Unter

entzündlichen Bedingungen wird es von Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, T-Zellen und Endothelzellen synthetisiert und reguliert verschiedene Prozesse wie Entzündung, Hämatopoese, Immunantwort und Akutphasenreaktionen [83-85]. Der IL-6-Rezeptor (IL-6R) auf der Plasmamembran von Hepatozyten besteht aus einer GP80- und zwei GP130-Untereinheiten. Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor (IL-6R) aktiviert primär das GP130-assoziierte Janus-Tyrosinkinase 1 (JAK1) und in geringerem Maße auch JAK2 [86].

Es wurde gezeigt, dass IL-6 eine messbare Affinität ausschließlich zu GP80, nicht jedoch zu GP130 aufweist. Ebenso zeigt GP80 keine Affinität zu GP130. Nur nach Bildung des IL-6/GP80-Komplexes kann eine Bindung an GP130 erfolgen. Dies hat funktionelle Konsequenzen: Während GP130 in nahezu allen Körperzellen exprimiert wird, kommt GP80 nur in wenigen Zelltypen vor, darunter Hepatozyten, bestimmte Leukozyten, Epithelzellen (z. B. Gallenepithelzellen) sowie nichtepitheliale Zellen (z. B. hepatische Sternzellen). Dementsprechend können nur GP80-exprimierende Zellen direkt auf IL-6 reagieren [85, 87]. JAK1 ist an den zytoplasmatischen Anteil von GP130 gebunden. Die Dimerisierung von GP130 führt zur JAK1 sowie Aktivierung von in geringerem Ausmaß von JAK2 [25, 86, 88]. Beide Kinasen phosphorylieren STAT3 und ermöglichen so dessen Translokation in den Zellkern. Dort induziert STAT3 die Expression der *TPO*-mRNA sowie von Proteinen der Akutphasenreaktion, was in der Folge eine Erhöhung der Thrombopoese während akuter Entzündungen bewirkt [86, 89, 90] (Abb. 4).



**Abbildung 4: IL-6/IL-6R/JAK1-2/STAT3-Signalweg, der zur Expression von *TPO*-mRNA führt.** Die Bindung des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) an den IL-6-Rezeptor (IL-6R, bestehend aus GP80 und GP130) aktiviert primär die mit GP130 assoziierte JAK1 und in geringerem Maße JAK2. Beide Kinasen phosphorylieren STAT3, das daraufhin in den Zellkern transloziert wird. Dort induziert STAT3 die Expression von *TPO*-mRNA sowie von Proteinen der Akutphasenreaktion, was zu einer verstärkten Thrombopoese während akuter Entzündungsprozesse führt.

Abbildung wurde unter Verwendung grafischer Vorlagen von Servier Medical Art erstellt, [www.servier.com](http://www.servier.com), lizenziert unter CC BY 3.0.

## 1.7 Janus-Tyrosin-Kinase

Die Janus-Tyrosin-Kinasen (JAK) stellen eine Familie intrazellulärer, nicht-rezeptorgebundener Tyrosin-Kinasen dar, die bei Säugetieren aus vier Mitgliedern besteht: JAK1, JAK2, JAK3 und Tyrosin Kinase 2 (TYK2) [91, 92]. Diese Proteine spielen eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion, die durch eine Vielzahl von Membranrezeptoren initiiert wird. Insbesondere wird JAK2 mit wichtigen nachgeschalteten Signalproteinen, darunter die STATs, assoziiert. Diese regulieren wiederum die Expression diverser Proteine, die an der Induktion oder Hemmung der Apoptose beteiligt sind [91, 93, 94].

## 1.8 Signaltransduktor und Transkriptionsaktivator

Die Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren (STATs) besitzen die Fähigkeit, Signale aus verschiedenen Signalkaskaden zu integrieren und eine Vielzahl von Genen zu regulieren, die an Prozessen wie Zellwachstum, Differenzierung und Überleben beteiligt sind. Der JAK/STAT-Signalweg vermittelt multiple Signale und spielt eine bedeutende Rolle bei der Pathogenese zahlreicher Krebserkrankungen sowie entzündlicher Prozesse. Nach Aktivierung der STAT-Familie (STAT1 bis STAT6) durch Tyrosinphosphorylierung erfolgt deren Dimerisierung und Translokation in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren fungieren [93]. Darüber hinaus können STAT3, STAT5 und STAT6 auch in nicht-phosphorylierter Form in den Kern transloziert werden. Obwohl diese Form nicht an die charakteristische STAT-DNA-Bindungsstelle binden kann, besitzen sie die Fähigkeit, in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren unterschiedliche DNA-Zielsequenzen zu erkennen und dadurch die Genexpression auch unabhängig von der Phosphorylierung zu modulieren. Diese Mechanismen können das Risiko für die Entwicklung von Krebserkrankungen erhöhen [95-98].

## 1.9 Thrombopoietin

Thrombopoietin (TPO) ist der primäre Regulator und das wichtigste hämatopoetische Zytokin, das die Thrombozytose durch die Förderung und Stimulation der Megakaryozyten-Vorläuferzellen (MK-Vorläufer) im Knochenmark steuert. Dadurch ist TPO für eine schnelle Reaktion auf Thrombozytenverlust sowie für die Regulierung der Thrombozytenzahl im homöostatischen Zustand verantwortlich [21, 25, 29, 86, 99]. Northern-Blot-Analysen verschiedener Organe von wt-Mäusen zeigten, dass die TPO-Produktion in mehreren Organen wie den Nieren, der glatten Muskulatur, der Milz und dem Knochenmark erfolgt, wobei die höchste Konzentration von *TPO*-mRNA in der Leber nachweisbar ist [25, 27, 29, 50, 79, 100-104]. Bekannt ist, dass die hepatische TPO-Synthese durch die Bindung alter, desialyierter Thrombozyten an die Ashwell-Morell-Rezeptoren sowie bei entzündlichen Erkrankungen durch Stimulation der IL-6-Rezeptoren reguliert wird, was zur Aktivierung des JAK/STAT3-Signalwegs führt. Daraufhin wird die hepatische *Tpo*-Expression induziert, und das TPO-Protein wird ohne Speicherung direkt in den Blutkreislauf sezerniert [27, 86, 89, 105].

TPO wirkt durch Bindung an einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor, das Myeloproliferative Leukämievirus Onkogen (engl. *myeloproliferative leukemia virus oncogene*, Mpl), auf die MK-Vorläuferzellen. Dies führt zu einer Rezeptor-Dimerisierung und Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege in der Zielzelle [21]. Die bekanntesten dieser Signalwege sind die Proteine der JAK/STAT-Familie, welche phosphoryliert werden und das Zellwachstum fördern. Darüber hinaus werden auch MAP-Kinasewege (engl. *mitogen-activated protein kinase*) aktiviert, die zur Zellreifung sowie zur Induktion proliferationsfördernder und apoptosehemmender Signale beitragen [106,107, 108].

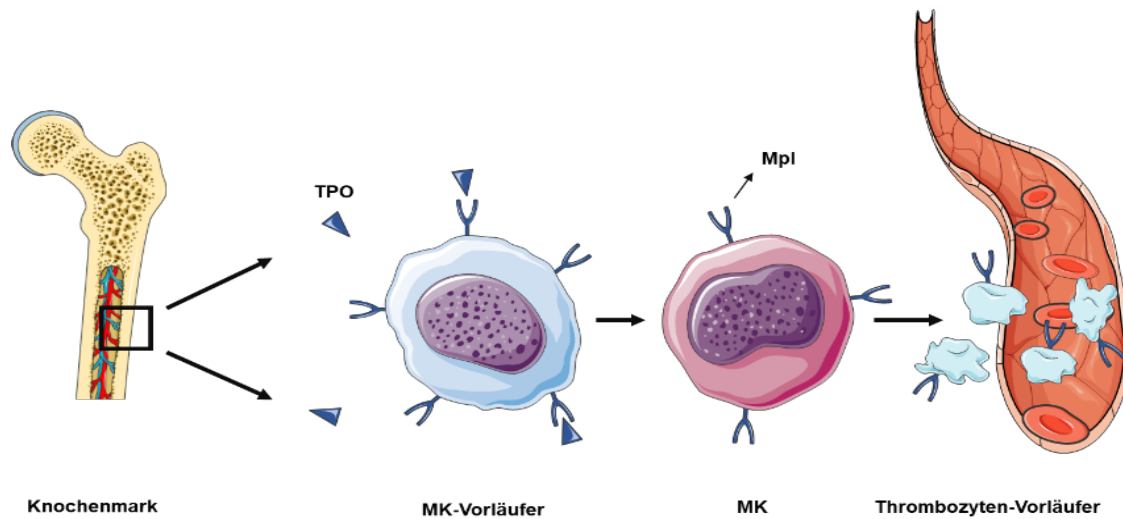
Die Aufnahme und der Abbau von zirkulierendem TPO erfolgt über eine Mpl-vermittelte Endozytose in Thrombozyten, wobei vor allem junge Thrombozyten das TPO maximal internalisieren können [25, 29, 105, 109-112]. Auf der Membranoberfläche eines Thrombozyten sind etwa  $56 \pm 17$  Mpl-Rezeptoren vorhanden, an die TPO bindet und anschließend durch den Thrombozyten internalisiert und abgebaut wird [110].

## 1.10 Onkogen des myeloproliferativen Leukämievirus

Das Onkogen des myeloproliferativen Leukämievirus (Mpl), auch als Thrombopoietin-Rezeptor (TPO-Rezeptor) bezeichnet, ist ein homodimerer Rezeptor mit extrazellulären, transmembranen und intrazellulären Domänen. Die extrazelluläre Domäne besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Zytokin-Rezeptormotiven. Die transmembrane Domäne bildet eine  $\alpha$ -Helix, die für die Insertion des Rezeptors in die Zellmembran notwendig ist. Die intrazelluläre Domäne ist essenziell für die Signaltransduktion, da sie die Bindung an JAK2 vermittelt [113].

Die Expression von *Mpl* ist auf der Oberfläche hämatopoetischer Stammzellen der Megakaryozyten-Linie sowie auf undifferenzierten Vorläuferzellen beschränkt. Dort löst die Stimulierung durch den Liganden TPO kritische Überlebens- und proliferative Signale aus [107]. Die *Mpl*-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen begrenzt die Verfügbarkeit von TPO, um eine übermäßige Megakaryozytose und Myeloproliferation zu verhindern. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass TPO direkte Effekte auf die hämatopoetischen Stammzellen ausüben kann [21, 114]. Die Aktivierung von Mpl durch TPO führt zur Aktivierung mehrerer intrazellulärer Signalmoleküle, darunter JAK2, TYK2, STAT5, STAT3 sowie MAP-Kinasen. Nach der

Aktivierung wird der TPO/Mpl/JAK2-Komplex internalisiert und entweder recycelt oder häufiger durch Proteasomen und Lysosomen abgebaut [24, 113, 115, 116] (Abb. 5).



**Abbildung 5: Megakaryopoese und Thrombozytose.** TPO wirkt durch Bindung an den Rezeptor Mpl auf die Megakaryozyten-Vorläuferzellen, wodurch die Migration und Differenzierung dieser Vorläufer zu reifen Megakaryozyten gefördert wird. Nach ausreichender Reifung schnüren die Megakaryozyten Vorläuferzellen der Thrombozyten ab. Dabei wird die Übertragung von Organellen, Vesikelstrukturen und Granula vom Zellkörper der Megakaryozyten auf die Thrombozytenvorläufer sichergestellt.

Abbildung wurde unter Verwendung grafischer Vorlagen von Servier Medical Art erstellt, [www.servier.com](http://www.servier.com), lizenziert unter CC BY 3.0.

## 2 Zielsetzung

Es gibt zunehmende Hinweise darauf, dass bei Patienten mit ACS eine erhöhte thrombozytäre Aggregationsfähigkeit sowie ein erhöhter Anteil aktivierter Thrombozyten im Blut beobachtet werden. Dies führt dazu, dass Thrombozyten während der Ischämie und der frühen Reperfusion nach der Ischämie aktiviert werden, was eine ausgeprägte lokale inflammatorische Reaktion im Myokard induziert. Somit spielen Thrombozyten eine entscheidende Rolle beim Fortschreiten sowie bei der Erhöhung der Wiederauftretensrate und Mortalität bei Patienten mit MI [1-6].

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der systematischen Untersuchung der Mechanismen der Regulation von Thrombozyten sowie der inflammatorischen Antwort nach AMI. Hierzu wurden zwei verschiedene thrombozytopenische Mausmodelle - *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie Mäuse mit antikörpervermittelter Thrombozytendepletion - mit wt-Mäusen verglichen. Zur Analyse wurden murine Gewebeproben, insbesondere aus Leber, Milz und Knochenmark, 24 Stunden nach I/R entnommen und mit nichtischämischem Gewebe verglichen. In einigen Mauslinien wurden darüber hinaus erweiterte Zeitpunkte (6 Stunden, 5 Tage und 21 Tage nach AMI) berücksichtigt, um zeitliche Dynamiken differenzierter erfassen zu können. Ziel der Studie war es, potenzielle Faktoren und Mechanismen zu identifizieren, die maßgeblich an der Regulation von Thrombozyten beteiligt sind.

### 3 Material

#### 3.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

<b>15 ml Falcon-Röhrchen</b>	Corning Science Mexico, #352095
<b>50 ml Falcon-Röhrchen</b>	Corning Science Mexico, #352070
<b>96-Well-Platte</b>	Sarstedt, #83.3924.300
<b>96-Well Reaktions-Platte für PCR</b>	MicroAmp Fast Optical, applied biosystems, #4346906
<b>Deckgläser 24 x 60 mm</b>	Engelbrecht, #k12460
<b>Objektträger</b>	Marienfeld, #1000612
<b>Pipette</b>	Eppendorf, #05-403-151
<b>Prolene-Faden</b>	Ethicon, #8695H
<b>Reaktionsgefäße</b>	Safe Seal, Sarstedt, #72.706
<b>Skalpell</b>	Neolab, #11566

#### 3.2 Geräte

Tabelle 2: Geräte

<b>Binokular</b>	Nikon SMZ25 Lichtquelle: Digital Slight DS-U3, Nikon
<b>Blotkammer</b>	Perfect Blue Semi Dry Elektrobloetter, PeqLab
<b>Homogenisator</b>	Precellys 24-Dual, BERTIN, #432-3750
<b>Imager</b>	Fusion FX-Vilber
<b>Inkubator</b>	Memmert, D06059 Modell 300
<b>Laufkammer</b>	Perfect Blue Doppel-Gelsystem, #700-0436
<b>Mikrotom</b>	Microtom Heidelberg; D-6900 Typ 400, FabrNr 299, #HM400
<b>Mikroskop(e)</b>	Axioskop; Zeiss Objektive: Plan-Neofluar (20x)

	Kamera: Axiocam 105 color
<b>pH-Meter</b>	WTW, #pH526
<b>Photometer</b>	BioPhotometer; Eppendorf, #035995
<b>Plattenreader</b>	GloMax-Multi Detection System; Promega, #SA3030
<b>Real-Time PCR System</b>	Applied biosystems ViiA 7, #4453534
<b>Stickstoffbehälter</b>	MACH SM-43; MVE Cryogenics
<b>Stromquelle</b>	PowerPac Universal; Bio Rad, #1645070
<b>Thermoschüttler TS - 100C</b>	Hartenstein; #104.1800
<b>Thermocycler</b>	Mastercycler nexus gradient; Eppendorf, #035735
<b>Vortexer</b>	Cenco Instrument
<b>Waage</b>	Sartorius Quintix6102-1S, # GZ-11955-07
<b>Zentrifuge(n)</b>	Centrifuge 5424 R, Eppendorf Centrifuge 5415 C, Eppendorf Zentrifuge 2-16P, Sigma

### 3.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien, Lösungen und Puffer

<b>4 x Sammelgel-Puffer</b>	6.05 g Trizma Base (Sigma, #T6066) 0.4g SDS (Roth, #2326.1) in 100 ml A. dest. (0.4% SDS) pH = 6,8
<b>4 x Trenngel-Puffer</b>	91 g Trizma Base 500 ml A. dest. 2 g SDS (Roth, #2326.1), (0.4% SDS) pH = 8,8
<b>5 x TGE-Laufpuffer</b>	15.1 g Trizma Base 72 g Glycin (Sigma, #G8898-500G) 25 ml 20% SDS (Roth, #2326.1)

	1000 ml A. dest. pH = 8,3 (auf 1 x mit A. dest. verdünnen zur Anwendung)
<b>6 x Lämmli-Puffer</b>	7ml 4 x Tris/ HCL/ SDS pH = 6,8 3 ml Glycin (Sigma, #G8898-500G) 1 g SDS (Roth, #2326.1) 0.93 g DTT (Sigma, #D0632-5g) 1.2 g Bromphenolblau (VWR, #1.081.220.005)
<b>AcrylAMId Fertiglösung</b>	Roth, #A516.1
<b>Ammoniumperoxodisulfat 10% (APS 10%)</b>	1 g APS (Roth, #9592.2) 10 ml A. dest.
<b>Apyrase 500U</b>	Sigma, #A7646
<b>Bovine Serum Albumin (BSA)</b>	Sigma, #A7906
<b>Clarity Western ECL-Substrate</b>	1 ml PeroxidaseLösung, Bio-Rad #1705060 1 ml Luminol/Enhancersolution Bio-Rad #1705060 2 ml destilliertem Wasser.
<b>DNase recombinant RNase-free</b>	Roche, #04716728001
<b>EDTA 10%</b>	10 g EDTA 100 ml PBS pH = 7.4
<b>Eosin G-Lösung 1% methanolisch</b>	Roth, #3139.2
<b>Essigsäure</b>	Sigma, #320099-500ML
<b>Fast SYBR Green Master Mix</b>	appliedbiosystems, #4385612
<b>Hämatoxylinlösung sauer nach Mayer</b>	Roth, #T865.3

<b>IP-Puffer</b>	15 mM Trizma Hydrochlorid #T5941 155 mM NaCl (Fresenius Kabi, #15HM229B1) 1 mM EDTA (Sigma, #E9884) 0.005% NaN <sub>3</sub> 1 L A. dest.
<b>Lysepuffer (für murine Thrombozyten)</b>	IP-Puffer 1 % IGPAL (Sigma, #MKBJ62266V) 1 x Protease Inhibitor (Roche, #04693124001)
<b>Milchpulver</b>	Ferma Reform Magermilchpulver
<b>NaCl-Lösung</b>	Fresenius Kabi, #15HM229B1
<b>N, N, N', N'-Tetramethyl ethylenediAMIne (TEMED)</b>	Sigma, #T9281
<b>Paraffin</b>	Roth, #6642.1
<b>Paraformaldehydlösung 4% (PFA 4%)</b>	Roth, #P087.5
<b>Phosphate buffered Saline (PBS)</b>	Sigma, #D8537
<b>Prostaglandin I2 (PGI2)</b>	Calbiochem, #538925
<b>Ponceau S solution</b>	Sigma, #6226-79-5
<b>Proteinase-Inhibitor</b>	cOmplete Tablets Mini Easypack, Roche, #04693124001
<b>RNA Isolation Reagent (TRI REAGENT)</b>	Sigma, #T9424
<b>RNeasy Mini Kit</b>	Quiagen, #74104
<b>Roti Histokitt</b>	Roth, #6638.1
<b>Roti Histol</b>	Roth, #6640.4
<b>Tris-buffered saline-Tween (TBS-T)</b>	Tris (Sigma, #77-86-1) / HCl 3,6 g NaCl 9 g, pH = 7,6 0.05 % Tween 20
<b>Tween 20</b>	VWR, #c8.221.840.500
<b>Tween-Phosphate buffered Salinev (T - PBS)</b>	0.05 % Tween 20 in PBS
<b>Tyrode-Puffer (Stock 20 x)</b>	2.73 M Natriumchlorid

<b>Tyrode-Puffer (1 x, zur Anwendung)</b>	53.6 mM Kaliumchlorid 238 mM Natriumhydrogencarbonat 8 mM Dinatriumhydrogen-phosphat 0.5 M Hepes (Roth, #9105.2) 1 x Stock 20x  18 x A. dest. 0.1 M MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid, Roth, #KK36.1) 10 % Glukose 10 % BSA (Sigma, #A7906-50MG) 0.1 M CaCl <sub>2</sub> , pH = 7,35
---	---

### 3.4 Kits

Tabelle 4: Kits

<b>Entwicklerlösung für Western-Blot System</b>	Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, #170-5060
<b>ReliaPrep RNA <i>Tissue</i> Miniprep System</b>	Promega, #Z6010
<b>ImProm-II™ <i>Reverse Transcription System-</i></b>	Promega, #A3800
<b><i>Precellys Lysing</i></b>	Bertin #P000918-LYSK0-A

### 3.5 Antikörper für Western-Blot

Tabelle 5: Primäre Antikörper für Western-Blot

<b>GAPDH (14C10) <i>Rabbit</i> mAb</b>	Cell Signaling; #2118S
<b>STAT3 (D3Z26) <i>Rabbit</i> mAb</b>	Cell Signaling; #12640S
<b>P-STAT3 (Y705) <i>Rabbit</i> mAb</b>	Cell Signaling; #9145S
<b>STAT5 (D206Y) <i>Rabbit</i> mAb</b>	Cell Signaling; #94205S
<b>P-STAT5 (Y694) (C11C5) <i>Rabbit</i> mAb</b>	Cell Signaling; #9359S

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper für Western-Blot

<b>ECL-Anti Rabbit IgG horseradish Peroxidase linked F(ab) 2 fragment</b>	GE Healthcare, #NA9340V
---	-------------------------

### 3.6 Primer für qRT-PCR

Tabelle 7: Primersequenzen für qRT-PCR

<i>mAsgr 1</i>	<i>forward</i>	'ACGTGAAGCAGTTAGTGTCTG'	Eurofins Genomics #025658555
<i>mAsgr 1</i>	<i>reverse</i>	'CCTTCATACTCCACCCAGTTG'	Eurofins Genomics #025658556
<i>mAsgr 2</i>	<i>forward</i>	'GCTCAGTGGCGATGATGAAC'	Eurofins Genomics #027600124
<i>mAsgr 2</i>	<i>reverse</i>	'AGAGGCGCTGAGGAAAGG'	Eurofins Genomics #027600125
<i>Fstl 1</i>	<i>forward</i>	'AGCCCACGTGCCTCTGCATT'	Eurofins Genomics #026960313
<i>Fstl 1</i>	<i>reverse</i>	'GGCTGGCAGATGGACTCGCA'	Eurofins Genomics #026960314
<i>Il-6-r</i>	<i>forward</i>	'CTGCCAACCTTGTGGTATCAG'	Eurofins Genomics #026483146
<i>Il-6-r</i>	<i>reverse</i>	'GCAGCAAGTAGTAACTCGGGT'	Eurofins Genomics #026483147
<i>mTpo</i>	<i>forward</i>	'CACAGCTGTCCCAAGCAGTA'	Eurofins Genomics #026358698
<i>mTpo</i>	<i>reverse</i>	'CATTACAGGTCCGTGTGTC'	Eurofins Genomics #026358699

### 3.7 Software

Tabelle 8: Software

<b>Binokular, NIS-Elements BR4</b>	Nikon
<b>Imager, FUSION FX</b>	Vilber
<b>Mikroskop, ZEN 2 (blue edition)</b>	Zeiss
<b>GraphPad Prism (Version 9)</b>	GraphPad Software, LLC
<b>PC</b>	Microsoft

## 4 Methoden

### 4.1 Tierexperimentelle Methoden

#### 4.1.1 Mausmodelle

Der tierversuchsbasierte Teil der Arbeit wurde in der universitätsinternen Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der Universität Düsseldorf durchgeführt. Eine hierfür erforderliche Genehmigung für Tierversuche liegt vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) unter dem Aktenzeichen AZ 84-02.04.2015.A558 vor.

Die tierversuchsgestützte Arbeit zur Induktion der myokardialen Ischämie nach Depletion der Thrombozyten bei Mäusen wurde durch Mitarbeitende der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt. Die Organentnahmen wurden ausschließlich durch die wissenschaftliche Mitarbeiterin Frau Dr. Meike Klier durchgeführt, die im Besitz einer gültigen Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen ist. In der vorliegenden Dissertation wurden ausschließlich die von ihr entnommenen Organmaterialien verwendet.

Im Rahmen dieses Projekts wurde ein Mausstamm durch Rückkreuzung der C57BL/6J (Janvier)-Mauslinie generiert und für die tierexperimentellen Arbeiten gezielt gezüchtet. Dadurch konnten Mäuse mit den Genotypen  $Mpl^{+/+}$  und  $Mpl^{-/-}$  (Onkogen des Myeloproliferative Leukemia Virus) aufgezogen werden. Die Genotypisierung erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR).

Zusätzlich wurden männliche C57BL/6J-Mäuse im Alter von 10-12 Wochen eingesetzt. Diese wurden 24 Stunden vor der Durchführung der Ischämie mit anschließender Reperfusion entweder mit IgG (#R300, *emfret*) oder durch antikörpervermittelte Thrombozyten-Depletion (Antikörper: *emfret*, 2 µg/kg Körpergewicht) behandelt.

Während der IgG-Antikörper als Kontrolle verwendet wurde, bewirkte der depletierende Antikörper die gezielte Elimination von Thrombozyten. Nach Applikation erkennt der depletierende Antikörper die GPIb $\alpha$ -Moleküle auf der Oberfläche von Thrombozyten und markiert diese für deren Entfernung. Die Elimination der Thrombozyten aus dem Blutkreislauf erfolgt Fc-unabhängig. Dies bedeutet, dass die klassische antikörpervermittelte Phagozytose über Fc $\gamma$ -Rezeptoren nicht den primären Mechanismus darstellt. Stattdessen induziert die Bindung des Antikörpers an GPIb $\alpha$  eine Desialylierung der Thrombozytenoberfläche. Diese Modifikation macht die Thrombozyten für den Ashwell-Morell-Rezeptor in der Leber erkennbar, was eine rasche und effiziente Entfernung aus dem Kreislauf ermöglicht.

Der C57BL/6J-Mausstamm diente als wt-Kontrollgruppe. Die Euthanasie der Mäuse erfolgte nach erfolgreicher Anästhesie mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) durch thorakale Eröffnung und nachfolgender Herzpunktion.

**Tabelle 9: Versuchstiergruppen**

Versuchsgruppe	Versuchstiere	Fragestellung	Untersuchungsmethode
<b>Kontrolle</b>	<b>-C57BL/6J</b>	Einfluss des Myokardinfarkts auf die Regulation von Anzahl der Thrombozyten	-Induktion einer I/R durch das „closed-chest“-Modell mit 60 Min Ischämie -Western-Blot-Analysen -qRT-PCR -HE-Färbung
<i>Mpl</i>	<b>-Mpl<sup>+/+</sup></b> <b>-Mpl<sup>-/-</sup></b>		
<b>GPIb-Antikörper behandelt</b>	<b>-C57BL/6J +</b> <b>IgG-Antikörper</b> <b>-C57BL/6J +</b> <b>Depl.-Antikörper</b>		

## **4.1.2 Induktion der Ischämie/Reperfusion im Mausmodell**

Die Induktion der I/R erfolgte durch entsprechend geschultes Personal (siehe 2.1.1) unter Anwendung des *closed-chest*-Modells. Die Versuchstiere wurden während des gesamten experimentellen Zeitraums engmaschig überwacht und tierärztlich versorgt.

### **4.1.2.1 Das *closed-chest* Modell zur Induktion der Ischämie/Reperfusion**

Die Induktion der Ischämie erfolgte bei geschlossenem Thorax, nachdem die Ligatur zunächst 3-5 Tage vor dem Eingriff unter thorakaler Eröffnung angelegt worden war. Nach erfolgreicher Anästhesie mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) sowie trachealer Intubation wurde die Maus an eine Beatmungsmaschine angeschlossen und auf einer auf 37 °C aufgeheizten Wärmematte positioniert. Anschließend wurde die Haut parasternal etwa 1 cm weit inzidiert und eine Thorakotomie im dritten Interkostalraum durchgeführt. Mithilfe eines Polyethylen-Rings (*PE-10*) wurde eine lockere Schlaufe um die linke Koronararterie (*left anterior descending, LAD*) mit einem Prolene-Faden gelegt. Eine blasse Verfärbung des Apex nach kurzem Zug an der Schlaufe galt als Hinweis auf die korrekte Platzierung der Ligatur. Die Prolene-Fäden wurden nach außen geleitet und in einer subkutanen Tasche fixiert. Abschließend wurden Thorax und Haut verschlossen. Die Extubation der Maus erfolgte, sobald nach dem Absetzen der Isofluran-Narkose erste Reflexe beobachtbar waren. Drei bis fünf Tage nach Ligaturanlage wurde die Ischämie bei geschlossenem Thorax induziert. Hierzu wurde das Tier erneut mit Isofluran narkotisiert und zur Überprüfung der Herzfunktion an ein Echokardiographiegerät angeschlossen. Die Ischämie wurde über einen Zeitraum von 60 Minuten durch Zug an den Prolene-Fäden erzeugt, wobei eine ST-Strecken-Erhebung im EKG als Zeichen für eine erfolgreiche Okklusion diente. Die postoperative Versorgung der Versuchstiere erfolgte gemäß dem genehmigten Antrag zur Durchführung von Tierversuchen.

## 4.2 Proteinbiochemische Methoden

### 4.2.1 Western-Blot-System

Mittels des Western Blot ist es möglich, die Phosphorylierung von Proteinen zu untersuchen. Dabei werden die Proteine zunächst durch elektrophoretische Auftrennung anhand ihrer Molekülgröße in einem Polyacrylamidgel getrennt. Anschließend erfolgt der elektrophoretische Transfer der Proteine mittels elektrischer Spannung in einer Transferkammer von dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran. Das auf diese Weise erzeugte Bandenmuster bleibt erhalten und ermöglicht den spezifischen Nachweis der Proteine mittels Antikörper.

Zur detaillierten Analyse des Einflusses von I/R auf die Regulation der AMR- und IL-6-R-abhängigen Signalkaskaden wurden Lysate aus Leberzellen verschiedener Versuchsgruppen präpariert. Die Phosphorylierung von STAT3 sowie STAT5 wurde nachgewiesen und quantifiziert. Die Lysate wurden im Verhältnis 6:1 mit 6× Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Der Lämmli-Puffer wirkt dabei reduzierend auf Disulfidbrücken und linearisiert die Proteine. Die Proteine der Leberzelllysate wurden anschließend mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, das aus einem Trennungsgel (10 %) und einem Sammelgel (5 %) bestand (Tabelle 10). Diese Gele besitzen unterschiedliche Porengrößen und pH-Werte und wurden in einer Elektrophoresekammer gegossen.

**Tabelle 10: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels pro Gel**

Bestandteile	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
<b>4x Sammelgel-Puffer, pH= 6.8</b>	-	1.25 ml
<b>4x Trenngel-Puffer, pH= 8.8</b>	2.8 ml	-
<b>Acrylamid 30%</b>	3.75 ml	650 µl
<b>dest. Wasser</b>	4.7 ml	3.1 ml
<b>APS 10%</b>	112.5 µl	25 µl
<b>TEMED</b>	11.25 µl	5 µl

Nach der vollständigen Polymerisation des Gels in der Elektrophoresekammer wurde das Gel in der mit  $1\times$  Elektrophoresepuffer (TGE) gefüllten Kammer mit den Proben beladen. Zusätzlich wurde ein Protein-Marker als Referenz für die Molekülgröße in einer Randtasche des Gels aufgetragen. Die Proteine werden durch das anionische SDS gleichmäßig negativ geladen. Nach Anlegen einer Spannung von 25 mA an die Elektrophoresekammer wandern die Proteine mit einer ihrer Größe entsprechenden Geschwindigkeit zur Anode, wodurch sie im Trenngel entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Das Ende der Laufspur der Proteine im Gel wird mit Hilfe von Bromphenolblau (Färbefront) im Lämmli-Puffer markiert. Der Lauf wird gestoppt, sobald die Färbefront das Ende des Gels erreicht hat. Nach der vollständigen Trennung der Proteine im Gel erfolgt der eigentliche Western Blot (Semi-Dry-Western Blot), bei dem die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (geblottet) werden.

Für den Blotting-Prozess werden zunächst mehrere Lagen Filterpapier in verschiedenen Puffern getränkt und in einer definierten Reihenfolge übereinander angeordnet: Zunächst werden drei Filterpapierlagen in Blot-Puffer A (Tabelle 11) getränkt und platziert. Darauf folgen drei Filterpapierlagen, die zuvor in Blot-Puffer B getränkt wurden. Anschließend werden die Nitrozellulose-Membran (15 Sekunden in Blot-Puffer B getränkt) und das Elektrophorese-Gel (in Blot-Puffer C getränkt) aufgelegt. Abschließend werden sechs Filterpapierlagen, die in Blot-Puffer C getränkt sind, auf die Anordnung gelegt (Abb. 6).

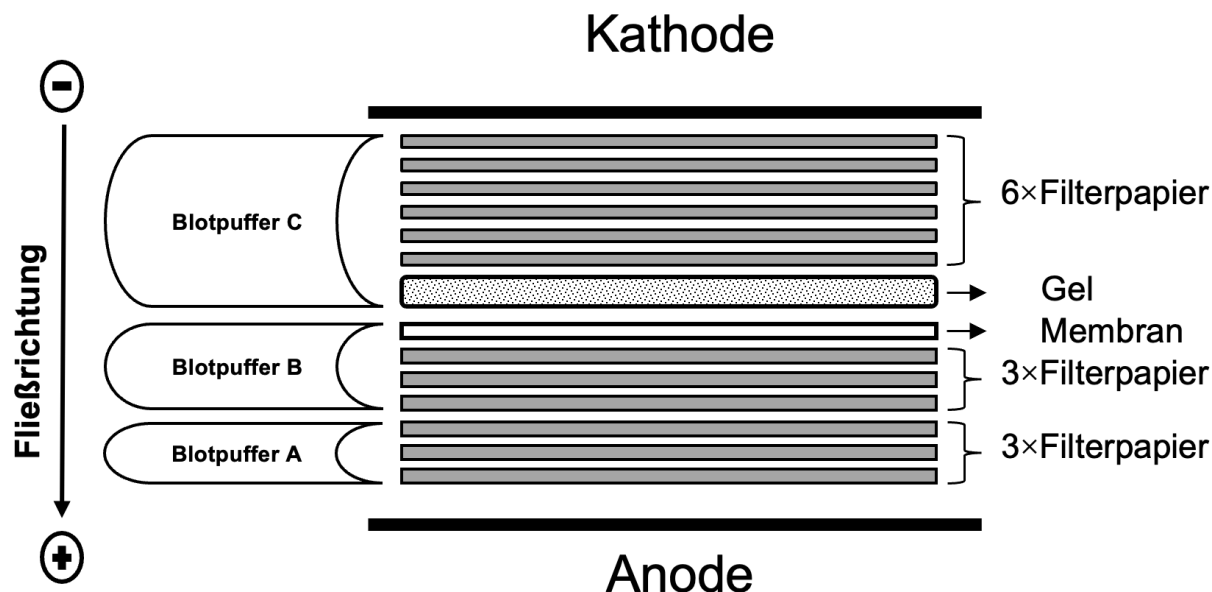


Abbildung 6: Aufbau eines Blots innerhalb des Western-Blot-Verfahrens

Tabelle 11: Blot-Puffer Zusammensetzung

Bestandteile	Blot-Puffer A	Blot-Puffer B	Blot-Puffer C
<b>Tris</b>	18,15 g	1,5 g	-
<b>6-Aminocapronsäure</b>	-	-	2,6 g
<b>MeOH</b>	100 ml	100 ml	100 ml
<b>A. dest.</b>	400 ml	400 ml	400 ml
<b>pH-Wert</b>	10,4	10,4	-

Zwischen Kathode und Anode der Transferkammer für den elektrophoretischen Proteintransfer wird über eine Stunde eine Spannung von 70 mA angelegt, wodurch die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode wandern. Durch hydrophobe Wechselwirkungen werden die Proteine auf die Membran übertragen, sodass das Proteinverteilungsmuster der zuvor aufgetrennten Proteine auf der Membran abgebildet wird. Der korrekte Transfer der Proteine auf die Membran wird durch Färbung mit *Ponceau S*-Färbelösung visuell kontrolliert. Anschließend wird die Färbung durch mehrmaliges Spülen der Membran mit TBS-T-Pufferlösung entfernt. Um spezifische Proteine auf der Membran zu detektieren, werden zunächst unspezifische Bindungsstellen durch Blockierung mit einer übersättigten Proteinlösung (5% Milchpulver in TBS-T) für 1 Stunde bei

Raumtemperatur auf einem rotierenden Inkubator blockiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für jeweils 5 Minuten mit TBS-T erfolgt die Inkubation mit dem spezifischen primären Antikörper (in 5 % BSA in TBS-T mit 0,02 % Natriumazid) bei 4 °C über Nacht auf dem rotierenden Inkubator. Am folgenden Tag wird die Membran dreimal für jeweils 5 Minuten mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Rabbit IgG *Horseradish Peroxidase*, 1:2500 in 5 % Milchpulver in TBS-T) für ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit *TBS-T* wird die Detektion der *Horseradish Peroxidase* mittels verstärkter Chemilumineszenz (engl. *enhanced chemiluminescence*, ECL) durchgeführt. Hierzu wird die Membran für 15 Sekunden bei Raumtemperatur mit der Chemilumineszenz-Reagenz inkubiert. Die bei dieser Reaktion freigesetzte Energie in Form von Licht wird mit einem Chemilumineszenz-Detektionssystem (Fusion FX-Vilber) detektiert. Das Chemilumineszenz-Detektionssystem ermöglicht die Visualisierung des spezifisch gebundenen Antikörpers und somit den indirekten Nachweis des Proteins.

### 4.3 Molekularbiologische Methoden

#### 4.3.1 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) (engl. *quantitative real-time polymerase chain reaction*)

Die qRT-PCR-Methode wird verwendet, um die Menge an komplementärer DNA (cDNA) in einer Probe zu bestimmen. Die cDNA wird zuvor aus der isolierten Gesamt-RNA einer Probe des Versuchstiers synthetisiert. Für die Analyse der Expression des *Asgr*, des *Il-6-r* sowie von *Tpo* in Hepatozyten wurden Lysate aus Leberproben der jeweiligen Versuchsgruppen hergestellt. Nach der RNA-Isolierung und anschließenden Synthese der cDNA wurden mittels qRT-PCR die Expressionsprofile der Zielgene quantitativ erfasst. Die Amplifikation der PCR-Produkte kann dabei in Echtzeit durch Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden, wodurch spezifische Transkripte quantitativ ausgewertet werden können.

Zur Etablierung dieser Methode werden folgende Schritte in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt:

1. Isolierung der RNA
2. Synthese der cDNA
3. qRT-PCR unter Verwendung von SYBR Green

#### **4.3.1.1 Isolierung der RNA aus murinen Lysate von Leberzellen**

Im ersten Schritt werden die bei  $-70^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorenen Lebergewebe mit  $500\ \mu\text{l}$  TRIzol und mithilfe des Gewebehomogenisierungs-Kits (*Precellys*) für 30 s bei 5000 rpm homogenisiert. Anschließend wird das *RNeasy Mini Kit* zur RNA-Isolierung entsprechend den Herstelleranweisungen eingesetzt. Dabei wird die RNA aus den Leberzellen durch wiederholte Zentrifugations- und Waschschritte mit den bereitgestellten Pufferlösungen isoliert und schließlich in  $30\ \mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration und Reinheit der Gesamt-RNA in jeder Probe werden photometrisch bestimmt, um eine Vergleichbarkeit der Proben sicherzustellen.

#### **4.3.1.2 Synthese der cDNA**

Vor der cDNA-Synthese wird ein DNase-Verdau mit RNase-freier, rekombinanter DNase durchgeführt, um gegebenenfalls vorhandene DNA-Reste in den Proben abzubauen. Das Ergebnis ist eine reine mRNA-Lösung. Hierzu werden  $2\ \mu\text{l}$  DNase zu  $18\ \mu\text{l}$  Gesamtvolumen der mRNA-Probe hinzugefügt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 30 Minuten inkubiert. Anschließend werden die Proben bei  $75^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten erhitzt, um die DNase zu deaktivieren. Erst danach erfolgt die cDNA-Synthese. Alle Proben mit einem Gesamtvolumen von  $18\ \mu\text{l}$  mRNA-Probe enthalten eine einheitliche Gesamtkonzentration von  $0,2\ \mu\text{g}$  RNA-Eluat, um eine Vergleichbarkeit der Proben sicherzustellen. Durch Zugabe von  $2\ \mu\text{l}$  DNase wird das Gesamtvolumen jeder Probe auf  $20\ \mu\text{l}$  erhöht. Für die cDNA-Synthese mittels *reverse Transkription* wurde das *ImProm-II™ Reverse Transcription System*-Kit der Firma Promega verwendet. Zunächst werden  $20\ \mu\text{l}$  der mRNA-Lösung mit  $2\ \mu\text{l}$  Oligo(dT)-Primer versetzt, anschließend werden  $9\ \mu\text{l}$  Mastermix hinzugefügt. Der Mastermix setzt sich wie folgt zusammen: (Tabelle 12)

Tabelle 12: Zusammensetzung des Mastermixes für cDNA-Synthese pro Ansatz

<b>ImProm-II 5x Reaction Buffer</b>	4.0 µl
<b>MgCl<sub>2</sub> (7 mM)</b>	2.5 µl
<b>dNTP-Mix (0,5 mM je dNTP)</b>	1.0 µl
<b>Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor</b>	0.5 µl
<b>ImProm-II Reverse Transcriptase</b>	1.0 µl
Gesamt	9.0 µl

Die cDNA-Synthese wird in einem Thermocycler durch folgendes Programm (Tabelle 13) durchgeführt.

Tabelle 13: Thermocycler-Programm für cDNA-Synthese

<b>Primerhybridisierung:</b> Anlagerung der Primer an die RNA-Stränge	25 °C, 5 Min
<b>Elongation:</b> Synthese des komplementären DNA-Strangs	42 °C, 60 Min
<b>Inaktivierung der Reversen Transkriptase</b>	72 °C, 15 Min

#### 4.3.1.3 qRT-PCR unter Verwendung von SYBR Green

Zur Durchführung der qRT-PCR wurde *Follistatin-related protein 1 (Fstl1)* als Referenzgen verwendet, da festgestellt wurde, dass *Fstl1* in Leberzellen konstant exprimiert wird. Somit eignet es sich als Referenz, um Unterschiede in der zellulären Gesamtexpression bei der Auswertung zu normalisieren. Für die Analyse des RNA-Präparats wurden die Messungen für jeden Primer und jede Probe in technischem Triplikate durchgeführt. Die Primer-Sequenzen sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Primersequenzen für qRT- PCR

Name	Richtung 5' → 3'	Sequenzen
<i>Fst11</i>	forward	'AGCCCACGTGCCTCTGCATT'
<i>Fst11</i>	reverse	'GGCTGGCAGATGGACTCGCA'
<i>Il-6-r</i>	forward	'CTGCCAACCTTGTGGTATCAG'
<i>Il-6-r</i>	reverse	'GCAGCAAGTAGTAACTCGGGT'
<i>mAsgr 1</i>	forward	'GAGTCGAAGCTGGAAAAACAG'
<i>mAsgr 1</i>	reverse	'CCTTCATACTCCACCCAGTTG'
<i>mAsgr 2</i>	forward	'ACGTGAAGCAGTTAGTGTCTG'
<i>mAsgr 2</i>	reverse	'CCTTCATACTCCACCCAGTTG'
<i>mTpo</i>	forward	'CACAGCTGTCCCAAGCAGTA'
<i>mTpo</i>	reverse	'CATTACAGGTCCGTGTGTC'

Zuerst werden je Ansatz 2 µl der cDNA-Proben mit 18 µl eines Mastermix gemischt. Die Gesamtvolumina von 20 µl pro Ansatz werden auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Der Mastermix beinhaltet folgende Reagenzien: (Tabelle 15)

Tabelle 15: Mastermix-Zusammensetzung für qRT-PCR pro Ansatz

<b>Fast SYBR Green Master Mix</b>	10 µl
<b>A. dest.</b>	6 µl
<b>Primer forward</b>	1 µl
<b>Primer reverse</b>	1 µl
<b>Gesamt</b>	18 µl

Mithilfe des *ViiA 7 Real-Time PCR*-Systems wird die Genexpression der unterschiedlichen Zielgene nach Durchlaufen des folgenden Programms (Tabelle 16) gemessen:

Tabelle 16: Programm der qRT-PCR

Zielgen	<i>Fstl1</i>	<i>Il-6-r</i>	<i>Asgr1</i>	<i>Asgr2</i>	<i>Tpo</i>
Prozess					
<b>Zyklen</b>	35				
<b>Denaturierung</b>	2 Min / 90 °C				
<b>Primer Annealing</b>	58 - 62 °C				
<b>Elongation</b>	10 Sek. / 95 °C				

Die gemessenen Schwellenwerte (*CT*, engl. *cycle threshold*) mittels des *ViiA™ 7 Real-Time PCR*-Systems ermöglichen die quantitative Auswertung der qRT-PCR für das jeweilige Zielgen in jeder Probe. Dabei gilt: Je höher die Ausgangskonzentration der cDNA des Zielgens in einer Probe, desto niedriger ist der entsprechende *CT*-Wert.

#### 4.4 Histologisches Verfahren

Die Euthanasie der Tiere erfolgte nach erfolgreicher Anästhesie mit Ketamin (100 mg/kg) und Xylazin (10 mg/kg) durch thorakale Eröffnung. Anschließend wurden die Milz sowie das Femur entnommen und für 24 Stunden in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach der Fixierung wurde das Femur für eine Woche in EDTA-Lösung inkubiert, um eine Entkalkung (Dekalzifikation) zu ermöglichen. Die Milz wurde nach der Fixierung, das Femur nach der Entkalkung, jeweils in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und anschließend für 12 Stunden in Roti®-Histol inkubiert. Danach erfolgte eine Infiltration der Gewebeproben in flüssigem Paraffin über 6 Stunden. Zum Abschluss wurden die Proben in Paraffin eingebettet. Aus den paraffinierten Gewebeproben wurden 5 µm dicke Schnittpräparate angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Gewebeschnitte wurden durch Inkubation bei 50 °C für 30 Minuten mittels Wärme auf dem Objektträger fixiert.

#### 4.4.1 Hämalaun Eosin-Färbung

Mithilfe der Hämalaun-Eosin-(HE)-Färbung wurde die Megakaryopoese in der Milz und im Knochenmark des Femurs der verschiedenen Versuchsgruppen histologisch analysiert. Für die Durchführung der Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst durch eine absteigende Alkoholreihe (Tabelle 17) entparaffiniert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Schnitte in Hämalaunlösung für 10 Minuten. Nach kurzem Spülen mit Leitungswasser wurden die Schnitte für 60 Sekunden in 1 % HCl in 70 % Ethanol differenziert und anschließend für 10 Minuten unter fließendem Wasser bläulich gefärbt (Bläuung). Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 40 Sekunden in 1 % Eosinlösung kontrastgefärbt und im Anschluss durch eine aufsteigende Alkoholreihe (s. Tabelle 17) entwässert. Abschließend erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit Histokitt.

**Tabelle 17: Alkoholreihe**

<b>absteigende Alkoholreihe</b>	10 Min	Roti-Histol
	2 Min	100% EtOH
	2 Min (2 x)	96% EtOH
	2 Min	70% EtOH
<b>Färbung</b>	10 Min	Hämalaun-Lösung
	kurz	waschen in Leitungswasser
	60 Sek.	1% HCL/ 70% EtOH
	10 Min	in fließendem Leitungswasser
	40 Sek.	1% Eosin-Lösung
<b>aufsteigende Alkoholreihe</b>	2 Min	70 % EtOH
	2 Min (2 x)	96 % EtOH
	2 Min	100 % EtOH
	10 Min	Roti Histol

In diesem Projekt wurde die Anzahl der Megakaryozyten im Milzparenchym sowie im Knochenmark der jeweiligen Mausversuchsgruppen mikroskopisch quantifiziert, um die Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsgruppen sicherzustellen.

#### 4.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms GraphPad Prism. Die Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe wird mit (n) angegeben. In allen Diagrammen ist auf der Y-Achse der Mittelwert (MW) dargestellt. Zusätzlich wurde der Standardfehler des Mittelwerts (engl. *standard error of the mean*, SEM) in die Diagramme eingetragen.

Zur Überprüfung, ob zwischen zwei Versuchsgruppen ein signifikanter Unterschied besteht, wurde ein t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt definiert und in den Diagrammen gekennzeichnet:

p - Wert $\leq$ 0.05: *	p - Wert $\leq$ 0.01: **	p - Wert $\leq$ 0.001: ***
-------------------------	--------------------------	----------------------------

## 5 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Mechanismen, die an der Regulation der Thrombozytenzahl nach einer Gewebeschädigung infolge einer I/R-Verletzung beteiligt sind. Im Fokus standen dabei die Signalwege der *Asgr*-Genexpression (Asialoglykoprotein-Rezeptor), der *Il-6r*-Genexpression sowie die Aktivierung der STAT-Signaltransduktionskaskaden in der Leber und deren Einfluss auf die nachfolgende TPO-Produktion. Darüber hinaus wurden die Veränderungen in der Anzahl der Megakaryozyten im Knochenmark und in der Milz nach einer I/R-Verletzung analysiert.

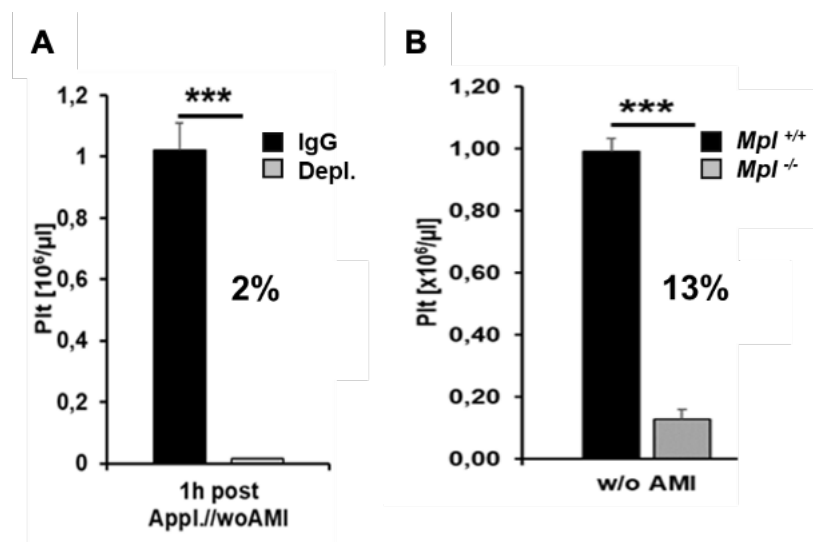
Es wurde untersucht, ob der Anstieg der Thrombozytenzahl nach I/R durch Veränderungen in der *Asgr*- und *Il-6r*-Genexpression in der Leber sowie durch daraus resultierende Modulationen in den Signalwegen (z. B. STATs) und der TPO-Produktion vermittelt wird. Ergänzend dazu wurde analysiert, inwieweit sich die Anzahl der Megakaryozyten in Knochenmark und Milz als Reaktion auf eine I/R-Verletzung verändert.

Die Untersuchungen konzentrierten sich sowohl auf den Ausgangszustand (naiver Zustand) als auch auf Zeitpunkte 24 Stunden nach einem AMI. In einigen Mauslinien wurden darüber hinaus erweiterte Zeitpunkte (6 Stunden, 5 Tage und 21 Tage nach AMI) berücksichtigt, um zeitliche Dynamiken differenzierter erfassen zu können.

Als Wildtyp diente die Mauslinie C57BL/6J. Darüber hinaus wurden Tiere derselben Linie eingesetzt, die entweder mit IgG-Kontrollantikörpern (Kontrollgruppe) oder mit depletierenden Antikörpern (Depl.) behandelt wurden. Zusätzlich wurde eine genetisch modifizierte Zuchtlinie mit den Genotypen *Mpl*<sup>+/+</sup> (wildtypischer Thrombopoietin-Rezeptor, Kontrollgruppe) und *Mpl*<sup>-/-</sup> (defizienter Thrombopoietin-Rezeptor) untersucht. Die Genotypisierung erfolgte mithilfe von qRT-PCR.

Frühere Studien haben gezeigt, dass die Thrombozytenzahl bei depletierten Mäusen sowie bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen (IgG-behandelte bzw. *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäuse) drastisch reduziert ist und lediglich etwa 2 % bzw. 13 % der Kontrollwerte beträgt. Diese

deutlichen Unterschiede unterstreichen die Bedeutung der jeweiligen Signalwege und der genetischen Modulation für die Regulation der Thrombozytenproduktion (Abb. 7\*).



**Abbildung 7\*:** Bestimmung der Thrombozytenzahlen in depletierten und *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen. Die Thrombozytenzahl (Plt) wurde im peripheren Blut mittels automatisierter hämatologischer Analyse quantifiziert. Untersucht wurden Mäuse nach Antikörper-vermittelter Thrombozytendepletion (Depl.) im Vergleich zu IgG-behandelten Kontrolltieren sowie *Mpl*-defiziente Mäuse (*Mpl*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen (*Mpl*<sup>+/+</sup>). **(A)** Die Thrombozytenzahl beträgt in depletierten Mäusen etwa 2 % der Werte IgG-behandelter Kontrollmäuse (n = 3–5). **(B)** Die Thrombozytenzahl liegt in *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen bei etwa 13 % der Werte von *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäusen (n = 3–5). Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (\*\*\*)  $P < 0,001$ . \*Die Abbildung wurde freundlicherweise von Frau Dr. Meike Klier zur Verfügung gestellt.

Diese Arbeit untersucht insbesondere die Hypothese, dass die Regulation von TPO und STAT-Signaltransduktionswegen durch die Expression von *Asgr* und *Il-6r* eine zentrale Rolle bei der Erhöhung der Thrombozytenzahl nach einem AMI spielt. Darüber hinaus wird untersucht, wie genetische und immunmodulatorische Modifikationen insbesondere *Mpl*-Defizienz und Thrombozytendepletion diese Mechanismen beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Arbeit beleuchten die molekularen Mechanismen der Regulation von Thrombozyten und der inflammatorischen Reaktion nach MI. Die Hauptbefunde umfassen Veränderungen in der Expression von *Asgr*-, *Il-6r*- und *Tpo*-Genen sowie deren zeitliche Dynamik in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlung.

## 5.1 Molekularbiologische Analyse

Der primäre Abbau von Thrombozyten erfolgt überwiegend in der Leber [54]. Zur Analyse der Genexpression des *Asgr*, des *Il-6r* sowie der *Tpo* in Hepatozyten wurden Lysate aus Leberproben der jeweiligen Versuchstiere gewonnen. Nach der Isolierung der Gesamt-RNA aus den Proben erfolgte die Synthese der komplementären DNA (*cDNA*) mittels reverser Transkription. Zur Quantifizierung der *cDNA* in jeder Probe und zur Bestimmung der Expressionsmuster der Zielgene wurde qRT-PCR eingesetzt. Dies ermöglichte eine präzise Erfassung und einen Vergleich der Genexpressionsprofile zwischen den verschiedenen Mauslinien.

Ziel der Genexpressionsanalyse war es, potenzielle Einflüsse eines MI auf die Regulation von *Asgr* und *Il-6r* sowie auf die Expression von *Tpo*-mRNA zu identifizieren und deren Rolle in der Regulation der Thrombozytenzahl zu untersuchen.

In diesem Abschnitt werden die Veränderungen der Genexpression in der Leber analysiert, mit besonderem Fokus auf die zeit- und behandlungsabhängige Regulation der Gene *Asgr1*, *Asgr2*, *Il-6r* und *Tpo*.

### 5.1.1 Ashwell-Morell Rezeptor

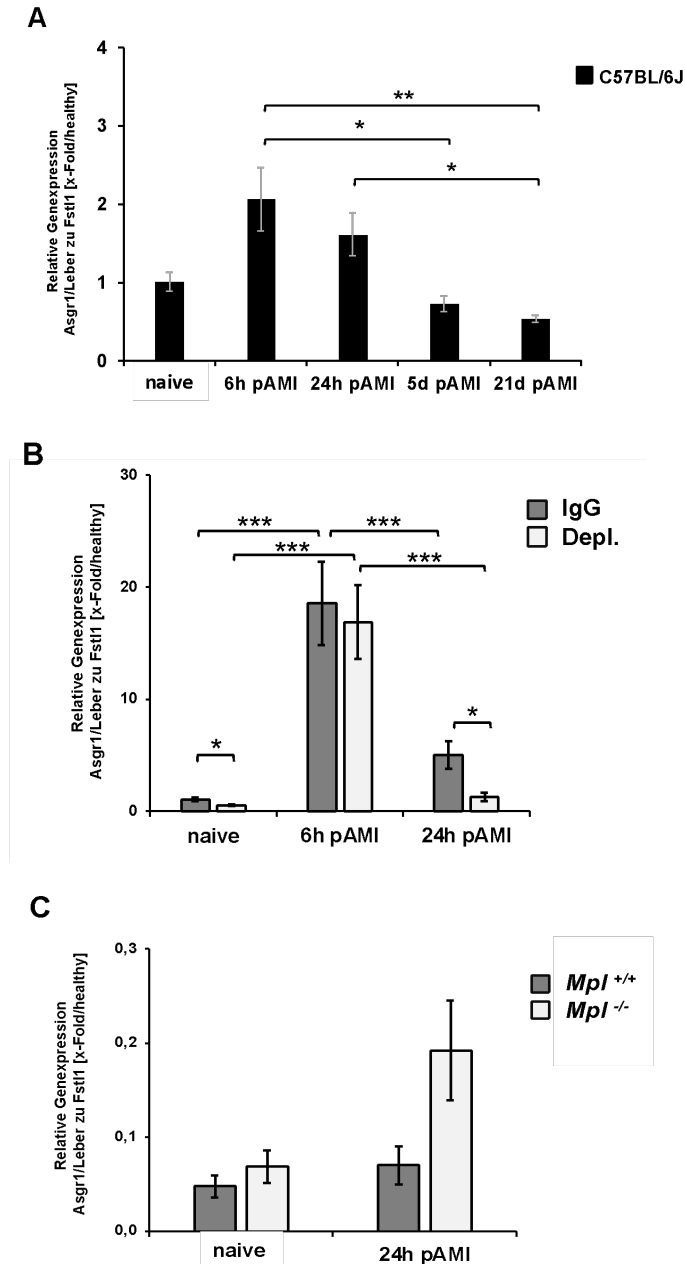
Der AMR befindet sich auf der Plasmamembran der Hepatozyten in den Kapillaren der sinusoidalen Lebergefäße. Der Rezeptor besteht aus Transmembranglykoproteinen, die als Asialoglycoprotein-1 (*Asgr1*) und Asialoglycoprotein-2 (*Asgr2*) bezeichnet werden [66, 67]. Die Hochregulation von *Asgr1* und *Asgr2* weist darauf hin, dass der AMR eine zentrale Rolle bei der Elimination von desialylierten Thrombozyten spielt, die nach einem AMI vermehrt auftreten. Der AMR, der aus zwei *Asgr1*-Ketten und einer *Asgr2*-Kette besteht, stellt die am häufigsten vorkommende Konformation mit der höchsten Affinität für terminale Galactose dar. Während bislang bekannt war, dass sowohl *Asgr1* als auch *Asgr2* von Hepatozyten exprimiert werden, konnte jüngst gezeigt werden, dass *Asgr1* auch auf der Membran von Kupffer-Zellen exprimiert wird. Die zeitliche Regulation von *Asgr1* und *Asgr2* deutet darauf hin, dass diese Gene eng mit der entzündungsbedingten Thrombopoese verknüpft sind [69, 70, 117]. Zur Klärung der Rolle des IL-6R in diesem Netzwerk wurden zudem die Expressionsmuster der entsprechenden Gene analysiert.

### 5.1.1.1 Asgr1-Genexpression

Die Analyse der Expression des *Asgr1*-Gens mittels qRT-PCR bei wt-Tieren der Mauslinie C57BL/6J zeigte eine dynamische Regulation zu verschiedenen Zeitpunkten nach einem AMI. Sechs Stunden nach AMI war eine Hochregulation der Genexpression erkennbar. Im Zeitraum zwischen 6 und 24 Stunden nahm die Genexpression ab, blieb jedoch über dem Ausgangsniveau. Fünf Tage nach AMI war die Genexpression signifikant herabreguliert, und nach 21 Tagen blieb sie weiterhin auf einem deutlich reduzierten Niveau (Abb. 8A).

Die *Asgr1*-Genexpression war bei naiven Mäusen (prä-AMI) in der Gruppe, die mit Depl.-Antikörpern behandelt wurde, im Vergleich zu Mäusen, die mit IgG-Kontrollantikörpern behandelt wurden, signifikant vermindert. Sechs Stunden nach AMI zeigten beide Gruppen eine signifikante Hochregulation der *Asgr1*-Genexpression im Vergleich zu naiven Mäusen. 24 Stunden nach AMI kam es in beiden Gruppen zu einer signifikanten Herabregulation der *Asgr1*-Genexpression, die bei den mit Depl.-Antikörpern behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe noch ausgeprägter war (Abb. 8B).

Die Analyse der Genexpression des *Asgr1*-Gens in *Mpl*<sup>+/+</sup> und *Mpl*<sup>-/-</sup> Mausmodellen zeigte bei naiven Mäusen nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Nach 24 Stunden war eine Hochregulation der *Asgr1*-Expression bei den *Mpl*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den *Mpl*<sup>+/+</sup> Mäusen zu beobachten. Diese Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 8C).



**Abbildung 8. Analyse der hepatischen *Asgr1*-Genexpression nach akutem Myokardinfarkt (AMI) mittels qRT-PCR.** Die Expression des *Asgr1*-Gens wurde in Lebergewebe quantifiziert. Die qRT-PCR erfolgte unter Verwendung eines geeigneten Referenzgens und wurde nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Untersucht wurden Wildtypmäuse (C57BL/6J), Mäuse nach Antikörper-vermittelter Depletion (Depl.) im Vergleich zu IgG-behandelten Mäusen sowie *Mpl*-defiziente Mäuse (*Mpl*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Kontrollgruppen (*Mpl*<sup>+/+</sup>). **(A)** In Wildtypmäusen (C57BL/6J) zeigt sich 6 h und 24 h pAMI eine Hochregulation der *Asgr1*-Expression, gefolgt von einer signifikanten Abnahme zu den späteren Zeitpunkten 5 d und 21 d pAMI (n = 3–4). **(B)** Die *Asgr1*-Expression ist in beiden Gruppen 6 h pAMI signifikant erhöht. Nach 24 h ist die Expression in beiden Gruppen signifikant reduziert, mit einer ausgeprägteren Abnahme in der Depl.-Gruppe (n = 3–5). **(C)** *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen 24 h nach AMI eine höhere *Asgr1*-Expression als

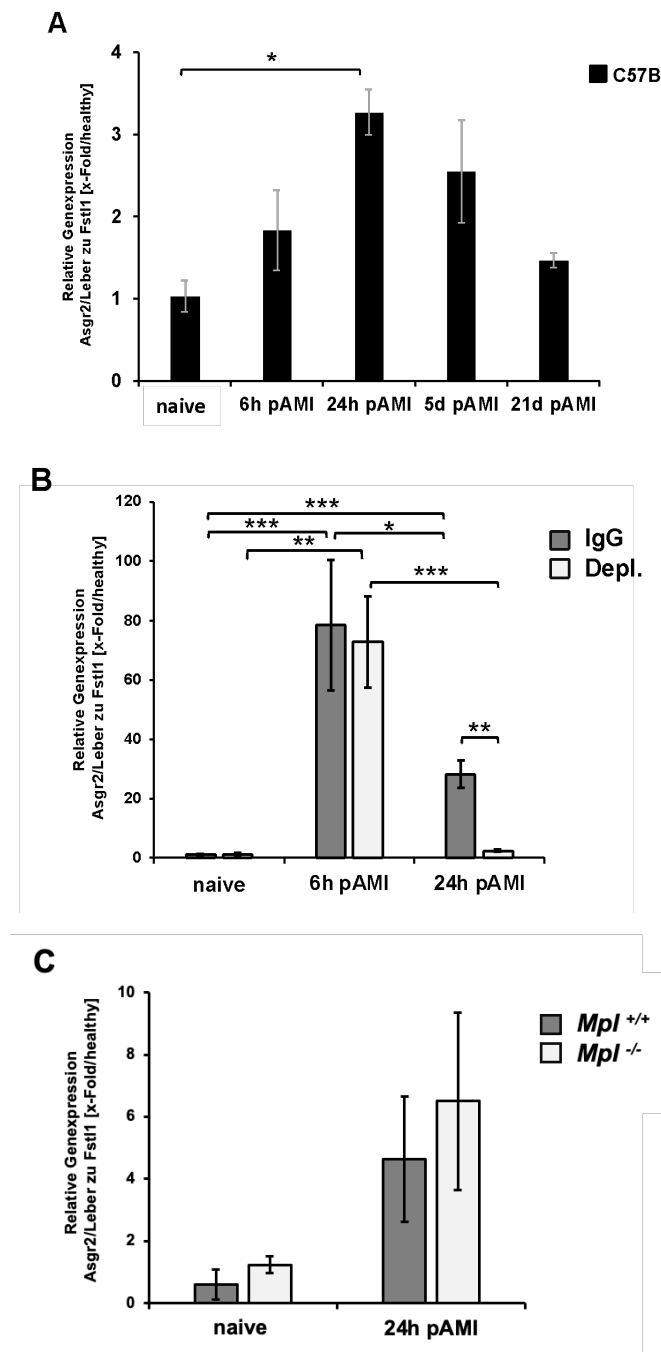
*Mpl*<sup>+/-</sup>-Kontrolltiere, ohne dass der Unterschied statistische Signifikanz erreicht (n = 3–5). Die Daten werden als Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001).

### 5.1.1.2 *Asgr2*-Genexpression

Die Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR zeigte bei wt-Tieren (C57BL/6J) eine signifikante Hochregulierung der *Asgr2*-Genexpression 24 Stunden nach AMI. Die Expression erreichte zu diesem Zeitpunkt ihren höchsten Wert im Vergleich zu naiven Mäusen. Fünf Tage nach AMI war die *Asgr2*-Genexpression weiterhin erhöht, jedoch etwas geringer als nach 24 Stunden. 21 Tage nach AMI zeigte sich eine deutliche Herunterregulierung der *Asgr2*-Genexpression, die jedoch immer noch über dem Niveau der naiven Tiere lag (Abb. 9A).

Die *Asgr2*-Genexpression war sowohl bei mit Depl.-Antikörpern als auch mit IgG-Kontrollantikörpern behandelten Mäusen sechs Stunden nach AMI im Vergleich zu naiven Mäusen signifikant hochreguliert. 24 Stunden nach AMI zeigte sich in beiden Gruppen eine signifikante Herabregulation der *Asgr2*-Genexpression, welche bei den mit Depl.-Antikörpern behandelten Mäusen im Vergleich zu den mit IgG-Kontrollantikörpern behandelten Mäusen noch stärker ausgeprägt war (Abb. 9B).

Die Analyse der Expression des *Asgr2*-Gens in *Mpl*<sup>+/+</sup>- und *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mausmodellen zeigte bei naiven Mäusen nur geringe Unterschiede, wobei die Expression in den *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen leicht höher war als in den *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäusen. Nach 24 Stunden war in beiden Mausmodellen eine Hochregulation der *Asgr2*-Expression zu beobachten, wobei die *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse erneut eine höhere Expression zeigten als die *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäuse. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 9C).



**Abbildung 9. Analyse der hepatischen *Asgr2*-Genexpression nach akutem Myokardinfarkt (AMI) mittels qRT-PCR.** Die Expression des *Asgr2*-Gens wurde in Lebergewebe quantifiziert. Die qRT-PCR erfolgte unter Verwendung eines geeigneten Referenzgens und wurde nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Untersucht wurden Wildtypmäuse (C57BL/6J), Mäuse nach Antikörper-vermittelter Depletion (Depl.) im Vergleich zu IgG-behandelten Mäusen sowie *Mpl*-defiziente Mäuse (*Mpl*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Kontrollgruppen (*Mpl*<sup>+/+</sup>). **(A)** Es zeigt sich eine signifikante Hochregulation der *Asgr2*-Expression 24 h pAMI sowie ein weiterhin erhöhtes Expressionsniveau an Tag 5 pAMI; nach 21 Tagen ist ein Rückgang der Expression erkennbar (n = 3–4). **(B)** Sowohl IgG-behandelte als auch depletierte

Mäuse (Depl.) weisen 6 h pAMI eine ausgeprägte Hochregulation der *Asgr2*-Expression auf; 24 h pAMI zeigt sich in beiden Gruppen ein signifikanter Rückgang, der in der Depl.-Gruppe stärker ausgeprägt ist (n = 3–5). (C) 24 Stunden nach AMI ist die *Asgr2*-Expression in beiden Mausmodellen erhöht, wobei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse höhere Werte als *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäuse aufweisen; dieser Unterschied erreicht jedoch keine statistische Signifikanz (n = 3–5). Die Daten werden als Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001).

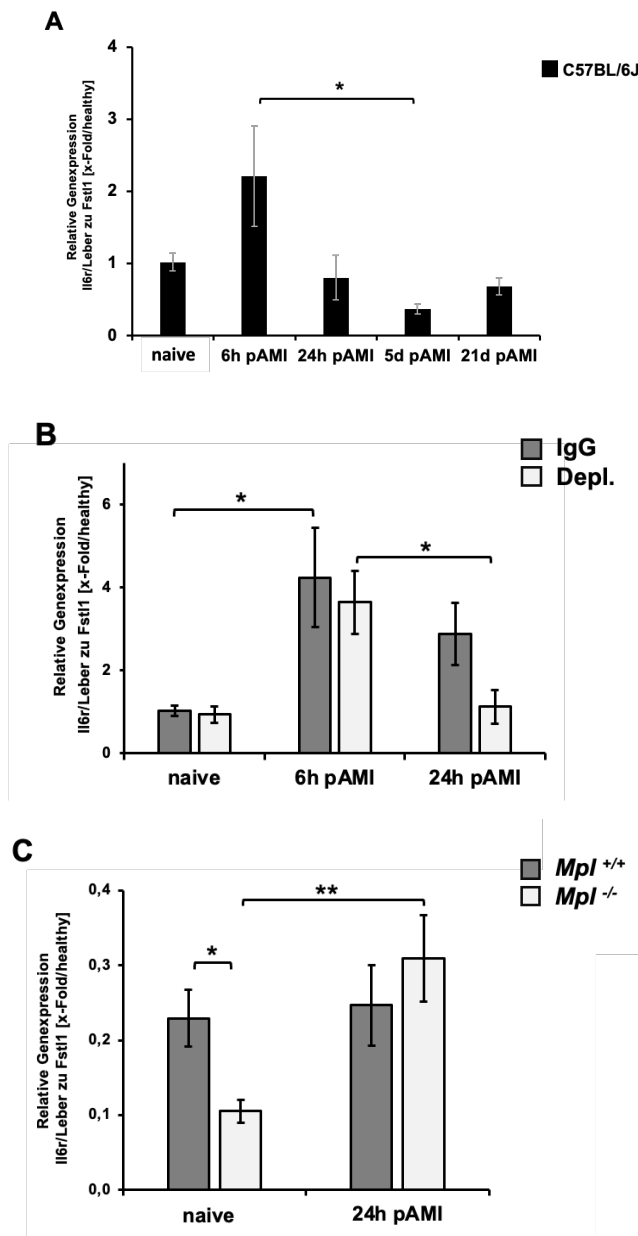
### 5.1.2 *Il-6r*-Genexpression

Das IL-6 wird unter entzündlichen Bedingungen von Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, T-Zellen und Endothelzellen synthetisiert [84, 85]. Verschiedene Entzündungszustände wie das ACS, Colitis ulcerosa und rheumatoide Arthritis sind mit Thrombozytose sowie erhöhten TPO-Plasmaspiegeln assoziiert [79-82].

Die qRT-PCR-Analyse von Lysaten aus Leberzellen wt-Tiermodellen zeigte eine Hochregulierung der *Il-6r*-Genexpression sechs Stunden nach AMI. Im weiteren Verlauf war die *Il-6r*-Genexpression jedoch fünf Tage nach AMI signifikant herunterreguliert (Abb. 10A).

Bei naiven Mäusen, die mit Depl.-Antikörpern behandelt wurden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der *IL-6R*-Genexpression zwischen den Gruppen. Sechs Stunden nach AMI war die *IL-6R*-Genexpression bei den mit IgG-Kontrollantikörpern behandelten Mäusen signifikant hochreguliert, während sie bei den mit Depl.-Antikörpern behandelten Mäusen zwar erhöht, jedoch nicht signifikant war. 24 Stunden nach AMI wurde in beiden Gruppen eine Herunterregulierung der *IL-6R*-Genexpression im Vergleich zu sechs Stunden nach AMI beobachtet, wobei diese Herunterregulation bei den mit Depl.-Antikörpern behandelten Mäusen signifikant ausfiel (Abb. 10B).

Die Analyse der *IL-6R*-Genexpression bei den naiven *Mpl*-Mauslinien ergab, dass *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikant geringere *Il-6r*-Genexpression im Vergleich zu *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäusen aufwiesen. 24 Stunden nach AMI zeigte sich bei den *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäusen keine Veränderung der *Il-6r*-Genexpression im Vergleich zu naiven *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäusen. Hingegen wiesen die *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse 24 Stunden nach AMI einen signifikanten Anstieg der *Il-6r*-Genexpression gegenüber naiven *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf (Abb. 10C).



**Abbildung 10. Analyse der hepatischen *Il-6r*-Genexpression nach akutem Myokardinfarkt (AMI) mittels qRT-PCR.** Die Expression des *Il-6r*-Gens wurde in Lebergewebe quantifiziert. Die qRT-PCR erfolgte unter Verwendung eines geeigneten Referenzgens und wurde nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Untersucht wurden Wildtypmäuse (C57BL/6J), Mäuse nach Antikörper-vermittelter Depletion (Depl.) im Vergleich zu IgG-behandelten Mäusen sowie *Mpl*-defiziente Mäuse (*Mpl*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Kontrollgruppen (*Mpl*<sup>+/+</sup>). **(A)** In Wildtypmäusen zeigt sich 6 h nach AMI eine Hochregulation der *Il-6r*-Expression, während an Tag 5 pAMI ein signifikanter Rückgang sichtbar wird; nach 21 Tagen nähert sich die Expression dem Ausgangsniveau an (n = 3–5). **(B)** Sechs Stunden pAMI weisen sowohl IgG-behandelte Mäuse als auch depletierte Mäuse eine erhöhte *Il-6r*-Expressionswerte auf, wobei die Hochregulation in der IgG-Gruppe signifikant ausfällt; 24 h pAMI ist in beiden Gruppen ein Rückgang erkennbar, der in der Depl.-Gruppe signifikant ist (n = 3–5). **(C)** Naive *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine signifikant geringere *Il-6r*-Expression als naive

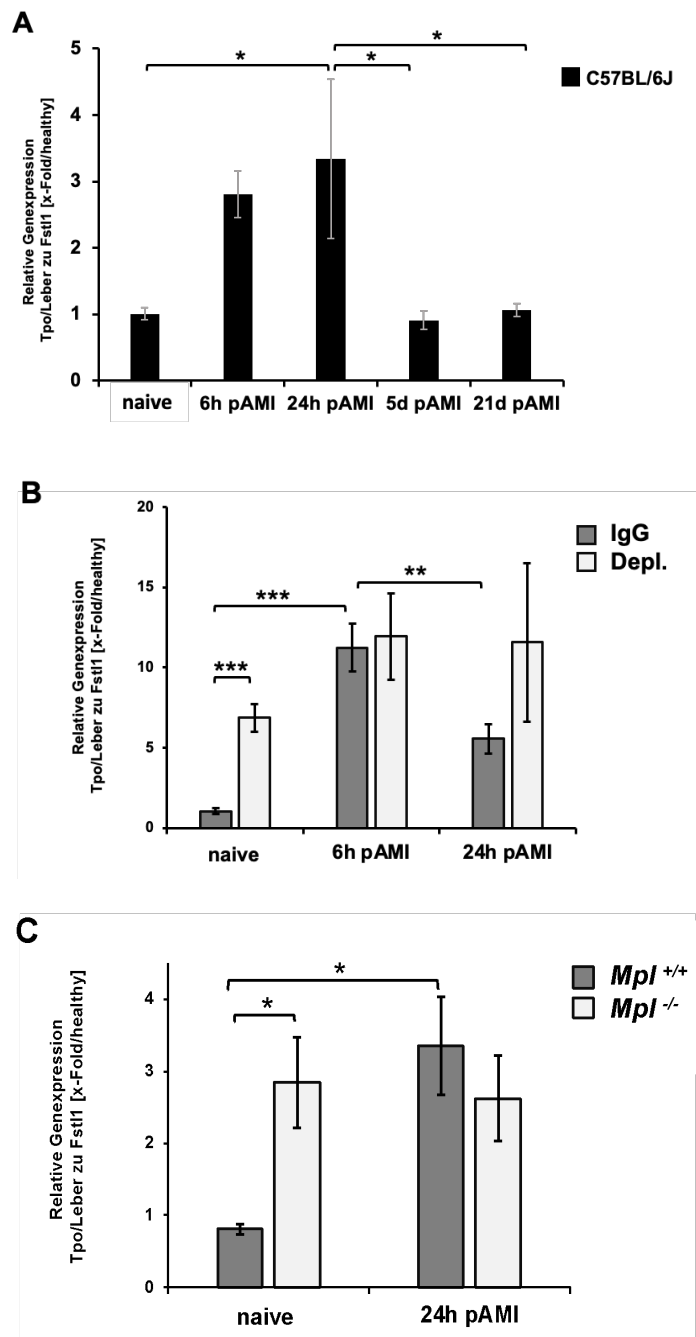
*Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäuse. Nach 24 h pAMI ist bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikante Hochregulation im Vergleich zu ihren naiven Ausgangswerten erkennbar, während bei *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäusen keine Veränderung sichtbar ist (n = 3–5). Die Daten werden als Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001).

### 5.1.3 *Tpo*- Genexpression

Die qRT-PCR-Analyse der Lysate aus Leberzellen von wt-Tieren (C57BL/6J) zeigte eine Hochregulierung der *Tpo*-Expression bereits sechs Stunden nach AMI, wobei nach 24 Stunden eine signifikante Hochregulierung festgestellt wurde. Fünf Tage nach AMI war die *Tpo*-Expression signifikant herunterreguliert und erreichte ein Niveau, das dem der naiven Mäuse entsprach (Abb. 11A).

Bei naiven Mäusen war die *Tpo*-Expression in der Gruppe, die mit Depl.-Antikörpern behandelt wurde, signifikant höher als bei mit IgG-Kontrollantikörpern behandelten Tieren. Sechs Stunden nach AMI stieg die *Tpo*-Expression in der IgG-Kontrollgruppe signifikant an und sank 24 Stunden nach AMI wieder signifikant ab. Im Gegensatz dazu zeigte die *Tpo*-Expression bei mit Depl.-Antikörpern behandelten Mäusen sowohl sechs als auch 24 Stunden nach AMI eine Hochregulation, die jedoch statistisch nicht signifikant war (Abb. 11B).

Die Analyse der *Tpo*-Expression in den *Mpl*-Mauslinien ergab, dass naive *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikant höhere *Tpo*-Expression im Vergleich zu naiven *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäusen aufwiesen. 24 Stunden nach AMI zeigten *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäuse eine signifikante Hochregulation der *Tpo*-Expression im Vergleich zu naiven *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäusen. Bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte 24 Stunden nach AMI hingegen keine signifikante Veränderung der *Tpo*-Expression im Vergleich zu den naiven *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt werden (Abb. 11C).



**Abbildung 11. Analyse der hepatischen *Tpo*-Expression nach akutem Myokardinfarkt (AMI) mittels qRT-PCR.** Die Expression des *Tpo*-Gens wurde in Lebergewebe quantifiziert. Die qRT-PCR erfolgte unter Verwendung eines geeigneten Referenzgens und wurde nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode ausgewertet. Untersucht wurden Wildtypmäuse (C57BL/6J), Mäuse nach Antikörper-vermittelter Depletion (Depl.) im Vergleich zu IgG-behandelten Mäusen sowie *Mpl*-defiziente Mäuse (*Mpl*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Kontrollgruppen (*Mpl*<sup>+/+</sup>). **(A)** Wildtypmäuse zeigen 24 h nach AMI eine signifikante Hochregulation der *Tpo*-Expression; an Tag 5 pAMI ist ein signifikanter Rückgang auf ein Niveau sichtbar, das dem der naiven Tiere entspricht (n = 3–4). **(B)** Naive depletierte Mäuse weisen eine signifikant höhere *Tpo*-Expression auf als IgG-behandelte Tiere. Sechs Stunden pAMI ist die Expression in der IgG-Gruppe signifikant

erhöht, während die Depl.-Gruppe sowohl 6 h als auch 24 h pAMI erhöhte Werte zeigt, jedoch weniger ausgeprägt. Nach 24 h pAMI zeigt sich in der IgG-Gruppe ein signifikanter Abfall der Expression (n = 3–5). (C) Naive *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine signifikant höhere *Tpo*-Expression als naive *Mpl*<sup>+/-</sup>-Tiere. Nach 24 h pAMI steigt die Expression bei *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäusen signifikant an, während bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu ihren naiven Ausgangswerten kaum eine Veränderung erkennbar ist (n = 3–5). Die Daten werden als Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001).

## 5.2 Proteinbiochemische Analyse

Zur detaillierten Untersuchung des Einflusses von I/R auf die Regulation der AMR- und IL-6R-abhängigen Signalkaskaden wurden Lysate aus Leberzellen der verschiedenen Versuchsgruppen gewonnen. Ziel war die Detektion und Quantifizierung der Expression sowie der Phosphorylierung der Signaltransduktoren STAT3 und STAT5. Die Phosphorylierung der Proteine wurde mittels Western-Blot-Analyse untersucht, einem etablierten Verfahren zur Charakterisierung posttranslationaler Modifikationen. Nach Aktivierung der STAT-Proteine (STAT1-STAT6) durch Tyrosinphosphorylierung kommt es zur Dimerisierung und Translokation in den Zellkern. Dort fungieren die phosphorylierten STATs als Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Zielgenen regulieren, darunter die mRNA für die Synthese von TPO und Akutphaseproteinen. Diese Prozesse spielen eine zentrale Rolle bei der entzündungsbedingten Signalübertragung sowie der Regulation der Thrombopoese [86, 89, 90, 93].

### 5.2.1 STAT3-Signalweg

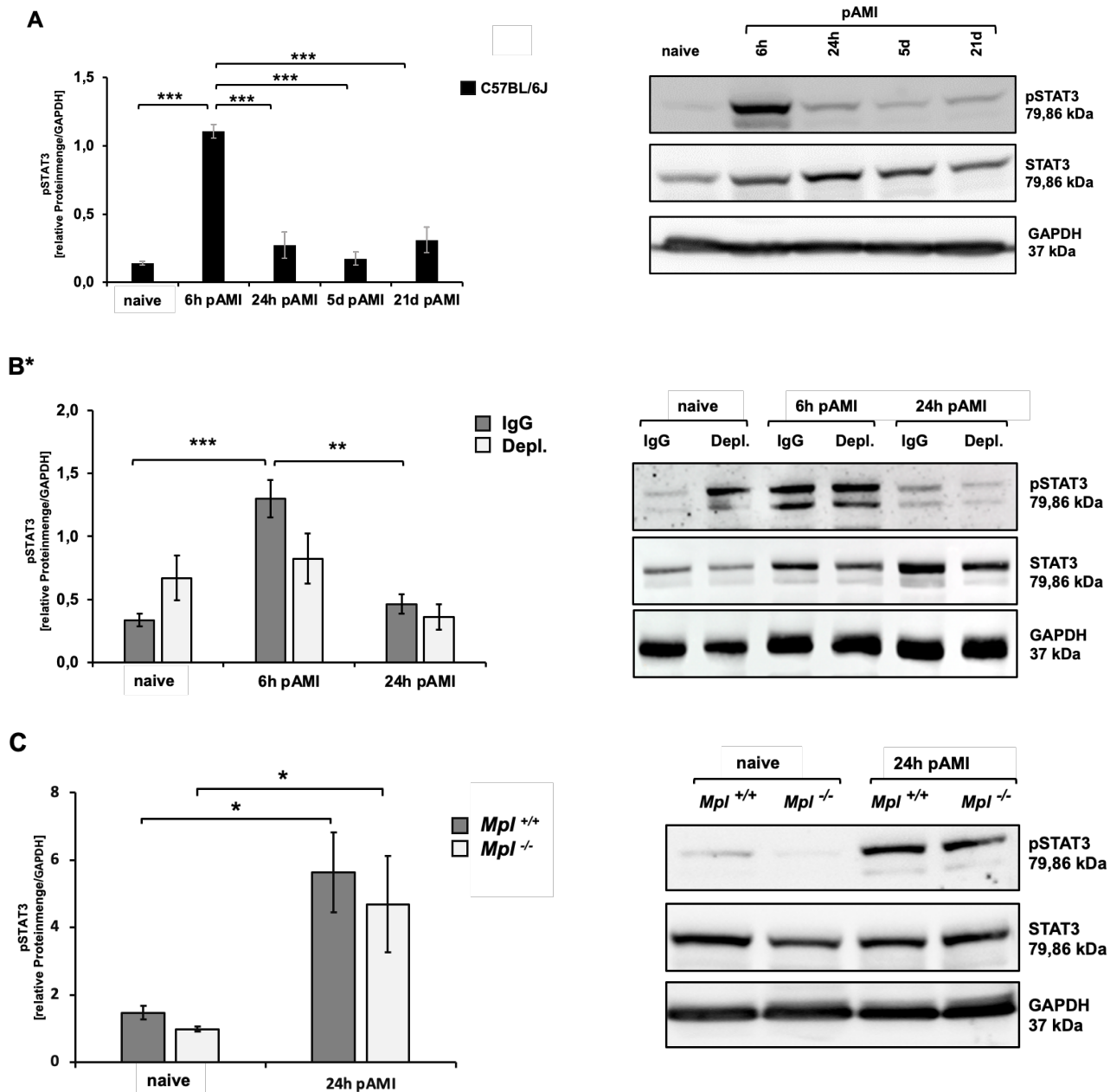
Studien haben gezeigt, dass sowohl desialylierte Thrombozyten als auch IL-6 über die AMR-JAK2- beziehungsweise IL-6R-JAK1-Signalkaskaden in Leberzellen zur Phosphorylierung von STAT3 führen. Dies bewirkt die Translokation von STAT3 in den Zellkern und stimuliert anschließend die Expression von *Tpo*. Ob STAT3 nach der Translokation direkt an den TPO-Promotor bindet, ist bisher jedoch nicht abschließend geklärt [25, 71].

Der Vergleich der Western-Blot-Analysen sowie die statistische Auswertung zeigten bei wildtypischen Tieren (C57BL/6J) eine signifikante Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus von STAT3 (pSTAT3) sechs Stunden nach AMI im Vergleich zu naiven Mäusen. Im Gegensatz dazu

waren 24 Stunden, 5 Tage und 21 Tage nach AMI keine signifikanten Veränderungen im Phosphorylierungsniveau von STAT3 im Vergleich zu naiven Mäusen nachweisbar (Abb. 12A).

Vor AMI war die Phosphorylierung von STAT3 bei mit IgG-Kontrollantikörpern behandelten Mäusen geringer als bei Mäusen, die mit Depl.-Antikörpern behandelt wurden. Sechs Stunden nach AMI zeigte sich bei den mit IgG-Kontrollantikörpern behandelten Mäusen ein signifikanter Anstieg der STAT3-Phosphorylierung, die 24 Stunden nach AMI im Vergleich zu sechs Stunden nach AMI signifikant zurückging und nahezu das Ausgangsniveau erreichte. Bei den mit Depl.-Antikörpern behandelten Mäusen war die STAT3-Phosphorylierung sechs Stunden nach AMI erhöht und 24 Stunden nach AMI wieder reduziert, wobei diese Veränderungen jedoch statistisch nicht signifikant waren (Abb. 12B\*).

Bei den *Mpl*-Mauslinien zeigte das Phosphorylierungsniveau von STAT3 24 Stunden nach AMI sowohl bei *Mpl*<sup>+/-</sup>- als auch bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den jeweiligen naiven Kontrollgruppen. Die Phosphorylierungsniveaus von STAT3 unterschieden sich jedoch weder vor AMI noch 24 Stunden danach signifikant zwischen den beiden Mauslinien (Abb. 12C).



**Abbildung 12. Western-Blot-Analyse der STAT3-Phosphorylierung (pSTAT3) in Lebergewebe nach akutem Myokardinfarkt (AMI).** Leberlysate wurden mittels Western Blot analysiert, um phosphoryliertes STAT3 (pSTAT3) und Gesamt-STAT3 (STAT3) nachzuweisen. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Untersucht wurden Wildtypmäuse (C57BL/6J), Mäuse nach Antikörper-vermittelter Depletion (Depl.) im Vergleich zu IgG-behandelten Mäusen sowie *Mpl*-defiziente Mäuse (*Mpl*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Kontrollgruppen (*Mpl*<sup>+/+</sup>). **(A)** Sechs Stunden nach AMI ist in Wildtypmäusen eine signifikante Zunahme der STAT3-Phosphorylierung erkennbar; zu späteren Zeitpunkten (24 h, 5 d, 21 d pAMI) liegen die Werte nahe dem Niveau naiver Tiere (n = 3). **(B\*)** Bei IgG-behandelten Mäusen wird 6 h pAMI ein signifikanter Anstieg der STAT3-Phosphorylierung beobachtet, gefolgt von einem signifikanten Rückgang auf nahezu Ausgangsniveau nach 24 h pAMI. Depletierte Mäuse zeigen 6 Stunden nach AMI ebenfalls eine

erhöhte STAT3-Phosphorylierung, die nach 24 Stunden wieder abnimmt; diese Veränderungen erreichen jedoch keine statistische Signifikanz ( $n = 3$ ). (C) In beiden *Mpl*-Genotypen (*Mpl*<sup>+/+</sup> und *Mpl*<sup>-/-</sup>) ist 24 h pAMI ein signifikanter Anstieg der STAT3-Phosphorylierung im Vergleich zu den jeweiligen naiven Kontrollen sichtbar ( $n = 3$ ). Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ). \*In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Friedrich Reusswig.

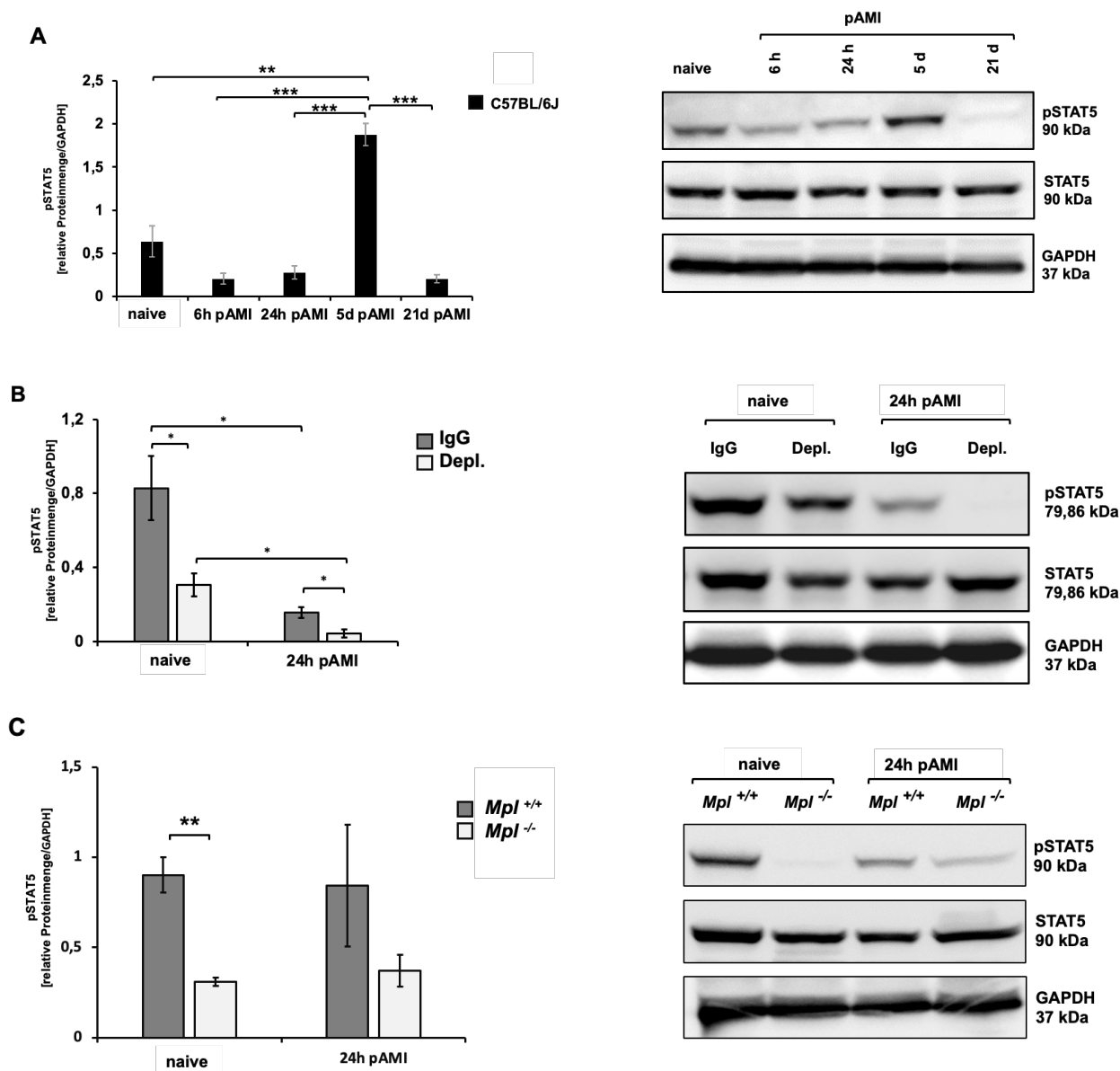
## 5.2.2 STAT5-Signalweg

Studien haben gezeigt, dass viele Proteine, deren Expression in der Leber nach der Translokation von phosphoryliertem STAT3 in den Zellkern induziert wird, auch mit STAT5 verknüpft sind. Folglich werden nach der Translokation von phosphoryliertem STAT5 in den Zellkern dieselben Proteine exprimiert wie bei phosphoryliertem STAT3 [27, 93].

Die statistische Auswertung der Western-Blot-Daten zeigte bei wt-Tieren (C57BL/6J) eine signifikante Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus von STAT5 am 5. Tag nach AMI im Vergleich zu naiven Tieren. Im Gegensatz dazu wurden sechs Stunden, 24 Stunden und 21 Tage nach AMI keine signifikanten Veränderungen der STAT5-Phosphorylierung im Vergleich zu naiven Tieren beobachtet (Abb. 13A).

Die Auswertung der Western-Blot-Daten ergab sowohl bei mit IgG-Kontrollantikörpern als auch bei mit Depl.-Antikörpern behandelten Mäusen eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung von STAT5 24 Stunden nach AMI im Vergleich zu den jeweiligen Werten vor AMI. Zum gleichen Zeitpunkt (vor und 24 Stunden nach AMI) war das Phosphorylierungsniveau von STAT5 bei mit Depl.-Antikörpern behandelten Mäusen signifikant geringer als bei mit IgG-Kontrollantikörpern behandelten Tieren (Abb. 13B)

Das Phosphorylierungsniveau von STAT5 war bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäusen sowohl vor AMI als auch 24 Stunden nach AMI niedriger. Dieser Unterschied war vor AMI statistisch signifikant. Zudem zeigte die STAT5-Phosphorylierung 24 Stunden nach AMI weder bei *Mpl*<sup>+/+</sup>- noch bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikante Regulation im Vergleich zu den jeweiligen naiven Tieren (Abb. 13C).



**Abbildung 13. Western-Blot-Analyse der STAT5-Phosphorylierung (pSTAT5) in Lebergewebe nach akutem Myokardinfarkt (AMI).** Leberlysate wurden mittels Western Blot analysiert, um phosphoryliertes STAT5 (pSTAT5) und Gesamt-STAT5 (STAT5) nachzuweisen. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Untersucht wurden Wildtypmäuse (C57BL/6J), Mäuse nach Antikörper-vermittelter Depletion (Depl.) im Vergleich zu IgG-behandelten Mäusen sowie *Mpl*-defiziente Mäuse (*Mpl*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Kontrollgruppen (*Mpl*<sup>+/+</sup>). **(A)** In Wildtypmäusen ist am 5. Tag pAMI eine signifikante Zunahme der STAT5-Phosphorylierung sichtbar, während zu den übrigen Zeitpunkten (6 h, 24 h und 21 d pAMI) nur geringe Veränderungen im Vergleich zu naiven Tieren erkennbar sind (n = 3). **(B)** Naive depletierte Mäuse weisen eine signifikant geringere STAT5-Phosphorylierung auf als IgG-behandelte Mäuse. 24 h pAMI zeigen beide Gruppen eine signifikante Abnahme der pSTAT5-Werte im Vergleich zu ihren naiven Ausgangswerten, wobei depletierte Mäuse signifikant niedrigere Werte aufweisen (n = 3–4). **(C)** Naive *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen eine geringere STAT5-Phosphorylierung als *Mpl*<sup>+/+</sup>-Tiere, sowohl vor AMI als auch 24 Stunden danach. 24

Stunden pAMI ist bei beiden Mauslinien keine signifikante Veränderung der STAT5-Phosphorylierung im Vergleich zu den jeweiligen naiven Kontrollen erkennbar ( $n = 3$ ). Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ).

## 5.3 Histologie

Im Rahmen dieses Projekts wurde die Megakaryopoese in der Milz sowie im Knochenmark des Femurs der verschiedenen Versuchsgruppen mittels Hämalaun-Eosin-Färbung untersucht. Ziel war es, die Anzahl der Megakaryozyten im Milzparenchym und im Knochenmark mikroskopisch zu quantifizieren und die Ergebnisse zwischen den Versuchsgruppen vor und nach dem AMI vergleichend auszuwerten. Diese Analyse diente dazu, potenzielle Unterschiede in der Megakaryozytenzahl sowie deren Veränderungen als Reaktion auf den MI systematisch zu erfassen und zu bewerten. Die histologische Untersuchung von Knochenmark und Milz verfolgte das Ziel, Unterschiede in der Megakaryozytenzahl zwischen verschiedenen Mausmodellen und Behandlungsgruppen zu identifizieren.

### 5.3.1 Histologische Analyse von Knochenmark

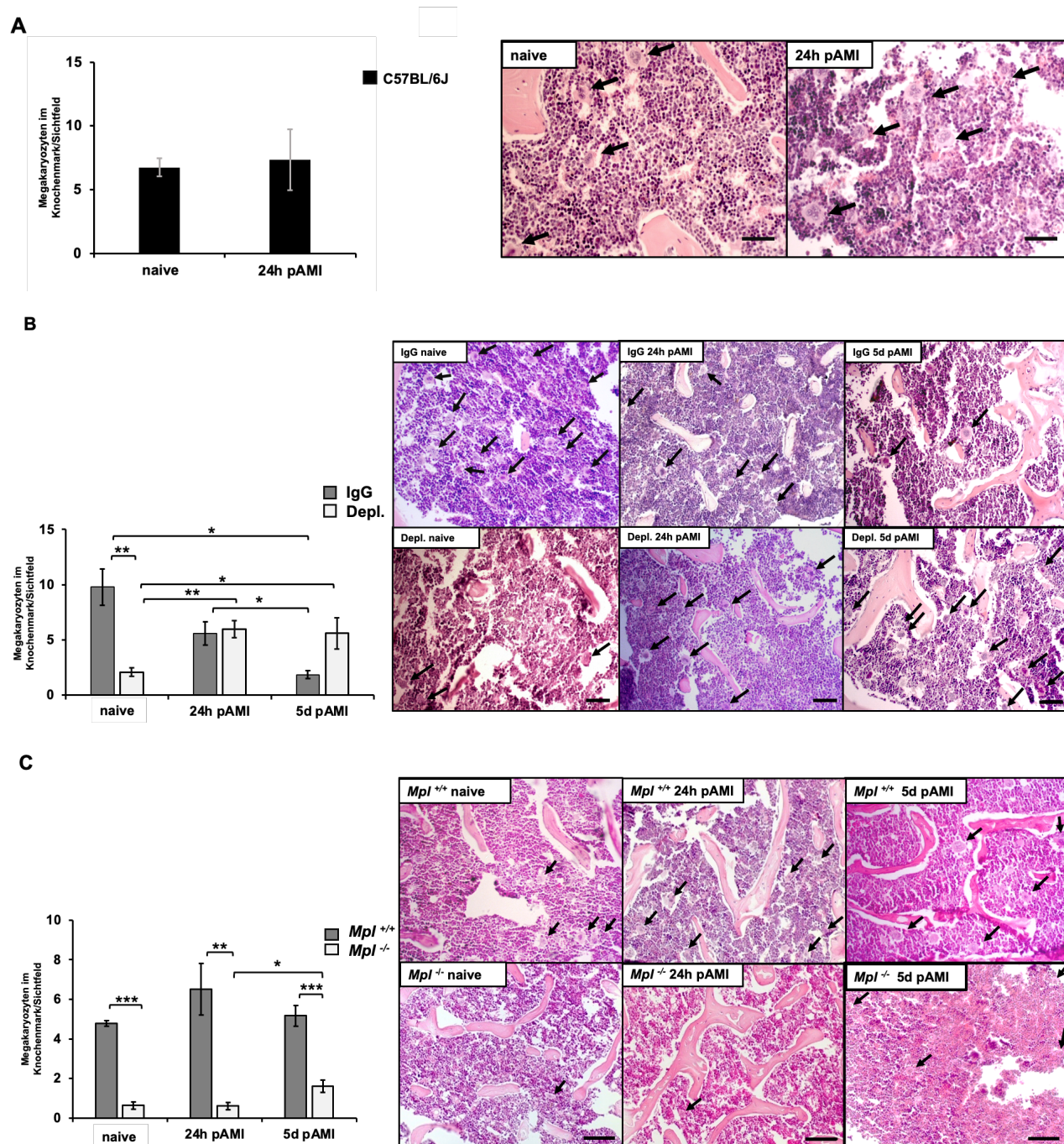
Das in der Leber synthetisierten TPO werden unmittelbar nach ihrer Produktion ohne Zwischenspeicherung in den Blutkreislauf freigesetzt. Die Interaktion zwischen IL-6, Thrombozyten und Hepatozyten in der Leber führt zu einer TPO-vermittelten Regulation, die direkt auf die Megakaryozyten im Knochenmark einwirkt und somit die Thrombopoese stimuliert [27, 77, 78, 86, 89, 105].

Mittels Hämalaun-Eosin-(HE-)Färbung konnte die Anzahl der Megakaryozyten vor und nach dem AMI analysiert werden. Die statistische Auswertung repräsentativer mikroskopischer Aufnahmen zeigte bei wt-Tieren (C57BL/6J) 24 Stunden nach AMI keine signifikanten Veränderungen der Megakaryozytenzahl im Vergleich zu naiven Kontrolltieren (Abb. 14A).

Bei mit IgG-Kontrollantikörpern behandelten Mäusen war die Megakaryozytenzahl vor AMI signifikant höher als bei mit Depl.-Antikörper behandelten Tieren. Am 5. Tag nach AMI zeigte

sich bei IgG-behandelten Mäusen ein signifikanter Rückgang der Megakaryozytenzahl im Vergleich zu naiven Mäusen. Im Gegensatz dazu war die Megakaryozytenzahl bei mit Depl.-Antikörpern behandelten Mäusen am 5. Tag nach AMI signifikant höher als bei naiven Kontrolltieren (Abb. 14B).

Bei den *Mpl*-defizienten Mauslinien zeigte sich, dass *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäuse durchgehend eine signifikant höhere Megakaryozytenzahl im Vergleich zu *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen aufwiesen. Während sich die Megakaryozytenzahl bei *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäusen vor und nach AMI nicht signifikant veränderte, stieg sie bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen am 5. Tag nach AMI signifikant an (Abb. 14C).



**Abbildung 14. Histologische Analyse der Megakaryopoese im Knochenmark nach akutem Myokardinfarkt (AMI).** Knochenmarkpräparate wurden mittels Hämatoxylin-Eosin-(HE-)Färbung untersucht. Megakaryozyten wurden anhand ihrer charakteristischen Größe und Morphologie identifiziert und in definierten Gesichtsfeldern quantifiziert. Untersucht wurden Wildtypmäuse (C57BL/6J), Mäuse nach Antikörper-vermittelter Depletion (Depl.) im Vergleich zu IgG-behandelten Mäusen sowie *Mpl*-defiziente Mäuse (*Mpl*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Kontrollgruppen (*Mpl*<sup>+/+</sup>). **(A)** In Wildtypmäusen zeigen sich 24 Stunden nach AMI keine auffälligen Veränderungen der Megakaryozytenzahl im Vergleich zu naiven Tieren (n = 3–4). **(B)** Naive depletierte Mäuse weisen signifikant weniger

Megakaryozyten auf als naive IgG-behandelte Mäuse. Am 5. Tag pAMI zeigt die IgG-Gruppe eine signifikant reduzierte Megakaryozytenzahl, während depletierte Mäuse zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Zunahme der Megakaryozytenzahl aufweisen (n = 3–6). (C) *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäuse zeigen in allen Zeitpunkten signifikant mehr Megakaryozyten als *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen ist am 5. Tag pAMI eine Zunahme der Megakaryozytenzahl erkennbar, während sich bei *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäuse keine deutlichen Änderungen zeigen (n = 3–7). Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 µm. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001).

### **5.3.2 Histologische Analyse der Milz**

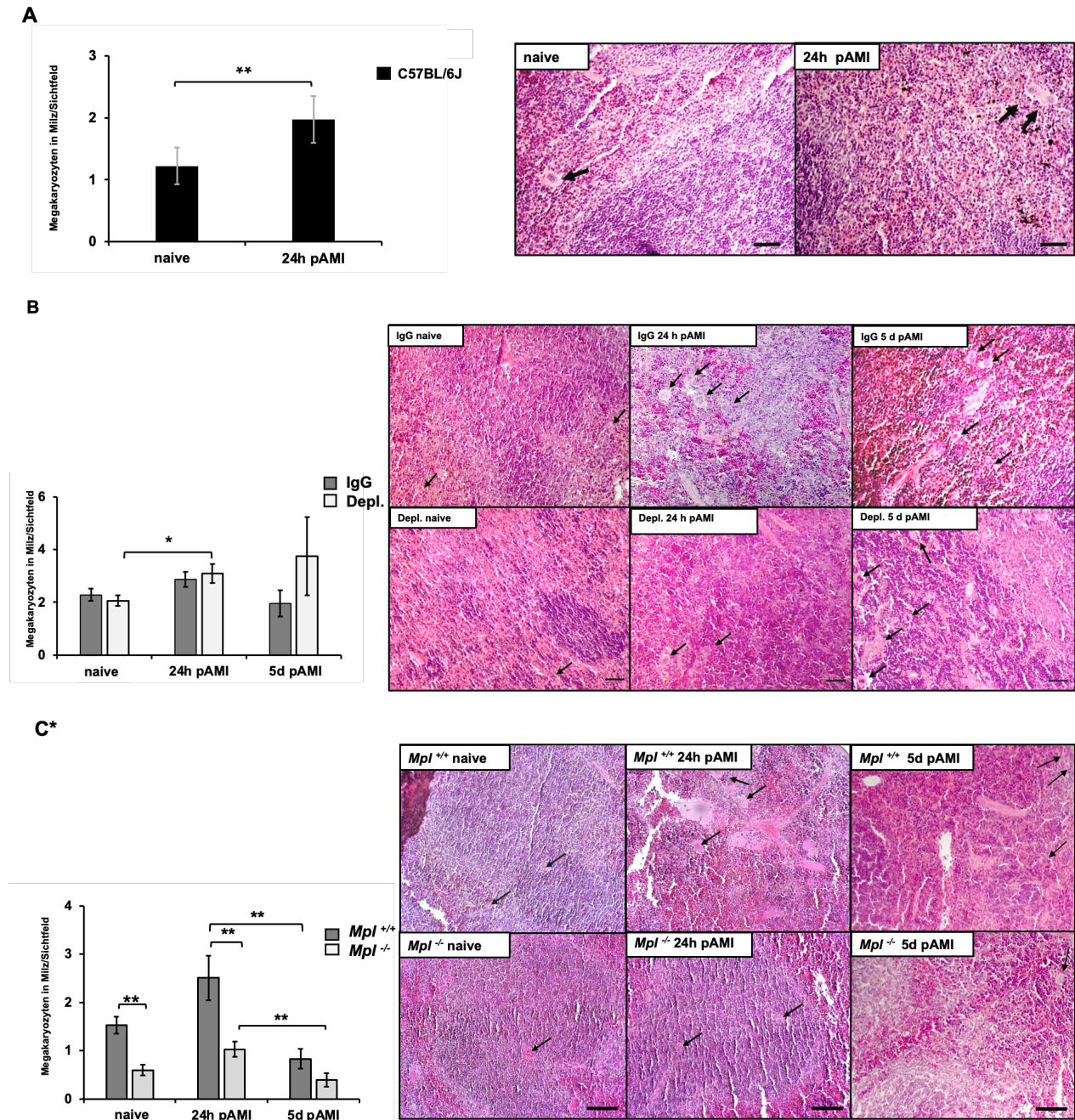
Die Milz ist als Speicherorgan für Thrombozyten bekannt und kann diese bei Bedarf freisetzen. Aktuelle Studien legen nahe, dass die Mobilisierung von Thrombozyten aus der Milz maßgeblich zur Erhöhung der zirkulierenden Thrombozytenanzahl beiträgt - insbesondere im Kontext eines AMI und der damit verbundenen kardialen inflammatorischen Reaktion. Im Gegensatz dazu führt eine Splenektomie zu einer signifikanten Reduktion der Akkumulation von Leukozyten und Thrombozyten im Myokard des Infarktareals. Dadurch kann sowohl die Ausdehnung des Infarktareals verringert als auch eine kardiale Dilatation und Funktionseinschränkung abgemildert werden [38, 48, 49].

Mittels HE-Färbung und anschließender statistischer Auswertung repräsentativer Bildausschnitte konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Megakaryozyten im Milzparenchym bei wt-Tieren 24 Stunden nach AMI signifikant höher war als bei naiven Tieren (Abb. 15A).

24 Stunden nach AMI zeigte sich bei mit Depl.-Antikörpern behandelten Mäusen ein signifikanter Anstieg der Megakaryozytenzahl im Vergleich zu naiven Tieren. Auch bei mit IgG-Kontrollantikörpern behandelten Mäusen wurde ein leichter Anstieg beobachtet, dieser erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Am fünften Tag nach AMI war in der IgG-Gruppe eine leichte Reduktion der Megakaryozytenzahl festzustellen, während in der Depl.-Gruppe ein tendenzieller Anstieg beobachtet wurde. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abb. 15B).

Die Untersuchung der *Mpl*-Mäuse zeigte, dass *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäuse sowohl vor als auch 24 Stunden nach AMI eine signifikant höhere Megakaryozytenzahl aufwiesen als *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Bei beiden Gruppen stieg die Anzahl der Megakaryozyten 24 Stunden nach AMI im Vergleich zu naiven

Tieren an. Am fünften Tag nach AMI nahm die Megakaryozytenzahl in beiden Gruppen signifikant ab, blieb jedoch bei *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäusen weiterhin höher als bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 15C\*).



**Abbildung 15. Histologische Analyse der Megakaryozyten im Milzparenchym nach akutem Myokardinfarkt (AMI).** Milzgewebe wurden mittels Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung untersucht. Megakaryozyten wurden anhand ihrer charakteristischen Größe und Morphologie identifiziert und in definierten Gesichtsfeldern quantifiziert. Untersucht wurden Wildtypmäuse (C57BL/6J), Mäuse nach Antikörper-vermittelter Depletion (Depl.) im Vergleich

zu IgG-behandelten Mäusen sowie *Mpl*-defiziente Mäuse (*Mpl*<sup>-/-</sup>) im Vergleich zu Kontrollgruppen (*Mpl*<sup>+/+</sup>). **(A)** In Wildtypmäusen ist 24 h pAMI eine erhöhte Anzahl von Megakaryozyten im Milzparenchym nachweisbar (n = 5–7). **(B)** In der Depl.-Gruppe ist 24 h pAMI eine signifikant erhöhte Megakaryozytenzahl erkennbar (n = 3–5). **(C\*)** *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäuse weisen sowohl im naiven Zustand als auch 24 h pAMI eine signifikant höhere Megakaryozytenzahl auf als *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse. In beiden Genotypen steigt die Megakaryozytenzahl 24 h pAMI an und nimmt am 5. Tag pAMI wieder ab. (n = 3–6). Die Maßstabsbalken entsprechen einer Länge von 50 µm. Die Daten werden als Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (\*P < 0,05; \*\*P < 0,01). \*In Zusammenarbeit mit Frau Dr. Meike Klier.

## 6 Diskussion

### 6.1 Thrombozyten in der Pathophysiologie des akuten Myokardinfarkts

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des AMI. Studien zeigen, dass Thrombozyten während der ischämischen Phase sowie der frühen Reperfusion aktiviert werden, was sowohl lokale, als auch systemische inflammatorische Reaktionen verstärkt. Diese Aktivierung führt zur Rekrutierung von Leukozyten und zur Bildung von Thromben, wodurch der Schaden im ischämischen Gewebe potenziert wird. Diese Mechanismen verdeutlichen, warum eine gesteigerte Aktivität der Thrombozyten mit einer schlechteren Prognose bei AMI-Patienten korreliert [1-6, 138]. Durch eine akute Thrombozytendepletion im Mausmodell wird nach MI bzw. I/R eine deutlich geringere Infarktgröße beobachtet. Ebenso wird eine Verbesserung der frühen und späten kardialen Funktion festgestellt. Diese Effekte werden mit einer Reduktion thrombozytenvermittelter Entzündungsreaktionen, einer geringeren Apoptoserate im ischämischen Myokardareal sowie einer abgeschwächten Ausprägung fibrotischer Umbauprozesse in Verbindung gebracht. Insgesamt wird durch die akute Verminderung der Thrombozyten eine Abschwächung jener pathophysiologischen Mechanismen erreicht, die typischerweise zur Progression des Gewebeschadens beitragen [140]. Im Gegensatz dazu wird in chronisch thrombozytopenen Modellen, wie etwa in *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen, trotz dauerhaft niedriger Thrombozytenzahlen keine konsistente Verringerung der Infarktgröße und kein eindeutig verbessertes strukturelles Remodeling festgestellt. Die funktionellen und morphologischen Parameter bleiben dabei häufig nahezu unverändert im Vergleich zu *Mpl*<sup>+/+</sup>-Kontrolltieren. Dieses divergente Muster lässt darauf schließen, dass bei chronischer Thrombozytopenie langfristige hämatopoetische und immunologische Kompensationsmechanismen entstehen, die die protektiven Effekte einer kurzfristigen Depletion abschwächen oder neutralisieren können. Damit wird hervorgehoben, dass akute und chronische Thrombozytenreduktion unterschiedliche biologische Konsequenzen entfalten. Für die Interpretation der experimentellen Befunde ist daher die strikte Unterscheidung zwischen einer zeitlich eng begrenzten Depletion und einer genetisch bedingten, dauerhaft bestehenden Thrombozytopenie von zentraler Bedeutung [138, 140].

## 6.2 Hintergrund und bisherige Erkenntnisse

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass Störungen in der Mpl-Regulation entweder zu Thrombozytose oder Thrombozytopenie führen können. *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen trotz erhöhter TPO-Plasmaspiegel eine ausgeprägte Thrombozytopenie auf, da ihnen Megakaryozyten fehlen. In diesen Mäusen beträgt die Thrombozytenzahl 10-15 % der Werte von wt-Mäusen. Eine Transfusion von desialylierten Thrombozyten zeigt bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen keinen Einfluss auf die Thrombozytenzahl, was darauf hinweist, dass die Regulation der Thrombozyten vollständig von TPO und seinem Rezeptor (Mpl) abhängig ist [21, 25, 27, 107, 118-123].

Bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) konnte eine signifikante Herunterregulation der *Mpl*-Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Zudem zeigen Untersuchungen, dass die Überexpression von *Mpl* zur Entwicklung akuter myeloischer Leukämie (AML) beitragen kann. Insgesamt deuten diese Daten darauf hin, dass die Fehlregulation der Mpl-Signalübertragung eine entscheidende Rolle bei der Entstehung hämatologischer Malignitäten spielt [124, 125].

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse lässt sich vermuten, dass bei *Mpl*-Mausmodellen durch die Über- bzw. Unterexpression von *Mpl* und die daraus resultierende Leukämie [126] nicht nur die Thrombopoese erheblich beeinflusst wird, sondern auch weitere regulatorische Faktoren moduliert werden, die eine direkte oder indirekte Rolle in der Regulation der Thrombozyten spielen. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die spezifischen molekularen Mechanismen zu identifizieren, die bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen verändert sind, sowie deren Interaktionen mit der Regulation der Thrombozyten zu verstehen.

## 6.3 Dynamik der *Asgr1*- und *Asgr2*-Expression als Marker des AMI

Aktuelle Studien zeigen, dass neben Hepatozyten auch Kupffer-Zellen auf ihrer Zellmembran den AMR mit *Asgr1*-Untereinheiten exprimieren. In Mäusen werden desialylierte Thrombozyten überwiegend von Kupffer-Zellen phagozytiert, was diese Zellen als primäre Akteure bei der Elimination von Thrombozyten identifiziert. Es wurde festgestellt, dass Mäuse, denen der AMR

fehlt, desialylierte Thrombozyten nicht effektiv eliminieren können, sodass diese weiter im Kreislauf zirkulieren. Dies führt bei diesen Tieren zu einer erhöhten Thrombozytenzahl [27, 76, 117, 127].

Darüber hinaus führt ein globales IL-6R-Defizit bei Mäusen zu einer kompensatorischen Hochregulierung des AMR in der Leber, was eine gesteigerte *Tpo*-Expression und eine signifikant erhöhte Thrombozytenzahl im Vergleich zu wt-Mäusen zur Folge hat. Studien mit *Asgr2*-Knockout-Mäusen zeigten zudem einen erhöhten *Il-6r*-mRNA-Spiegel in der Leber, was auf eine enge Verbindung zwischen dem AMR und dem IL-6R hinweist [87, 128].

Die akute Phase nach Auftreten eines akuten MI die typischerweise 24 bis 48 Stunden andauert, ist von einer Hochregulierung der *Asgr*-Genexpression und einer erhöhten Konzentration inflammatorischer Parameter begleitet. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der AMR in der akuten Phase nach einem MI eine zentrale Rolle bei der Regulation der Thrombozyten und der inflammatorischen Reaktion spielt [18, 38, 41, 129].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die *Asgr1*- und *Asgr2*-Genexpression im Verlauf der Zeit dynamisch reguliert wird, was eine zentrale Rolle in der Inflammatorischen Reaktion und Regulation von Thrombozyten nach einem MI einnimmt. In den Leberzellen der wt-Tieren wurde sowohl für *Asgr1* als auch für *Asgr2* eine dynamische Hochregulierung beobachtet, die ihr Maximum 6 Stunden (*Asgr1*) bzw. 24 Stunden (*Asgr2*) nach akutem Myokardinfarkt erreichte. Die Expression sank jedoch nach 5 bzw. 21 Tagen deutlich ab, was auf die Rückkehr zur Homöostase nach der akuten Phase hinweist. Dieser Befund unterstreicht, dass die zeitabhängige Regulation von *Asgr1* und *Asgr2* sowie die funktionelle Kopplung von AMR und IL-6R zentrale Mechanismen der Thrombozytenhomöostase und der entzündlichen Reaktion in der akuten Phase nach MI darstellen.

Sowohl die Depletions- als auch die IgG-Kontrollgruppen zeigten eine signifikante Hochregulierung der *Asgr1*- und *Asgr2*-Genexpression 6 Stunden nach AMI in den Leberzellen. 24 Stunden nach AMI zeigte sich jedoch in der Depletionsgruppe eine stärkere Herabregulierung im Vergleich zur IgG-Gruppe. Dies deutet darauf hin, dass die Abwesenheit von Thrombozyten die zeitliche Dynamik der *Asgr*-Genexpression beeinflusst.

Zwischen *Mpl*<sup>+/+</sup>- und *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten sich vor AMI keine signifikanten Unterschiede in der *Asgr1*- und *Asgr2*-Genexpression. 24 Stunden nach AMI war jedoch in *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine höhere Expression von *Asgr1* und *Asgr2* zu beobachten, was auf eine mögliche kompensatorische Hochregulierung in den Leberzellen hinweist, um die fehlende *Mpl*-Signalübertragung auszugleichen. Obwohl in *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine höhere *Asgr1*- und *Asgr2*-Expression festgestellt wurde, war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant.

Der Vergleich der akut depletierten Mausmodelle mit den chronisch thrombozytopenen *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen verdeutlicht, dass akute Thrombozytendepletion direkte Auswirkungen auf die Dynamik der *Asgr*-Genexpression hat, während chronische Thrombozytopenie durch langfristige kompensatorische Mechanismen ausgeglichen wird. Dies unterstreicht, dass die zeitliche Präsenz und Signalübertragung von Thrombozyten entscheidend für die Regulation von *Asgr1* und *Asgr2* nach AMI ist.

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse, dass die Regulation der *Asgr1*- und *Asgr2*-Genexpression die Rolle dieser Gene als Marker der akuten Phase nach einem MI unterstützt. Dies untermauert die Hypothese, dass der AMR ein kritischer Regulator der entzündungsbedingten Thrombopoese nach einem akuten Myokardinfarkt ist.

#### **6.4 Zeitabhängige Regulation der *IL-6R*-Genexpression**

Studien belegen, dass bei Mäusen nach einem MI innerhalb der ersten drei bis vier Tage eine ausgeprägte inflammatorische Phase einsetzt. Diese ist gekennzeichnet durch eine deutliche Hochregulation inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) sowie durch eine Infiltration von Immunzellen in das Myokardinterstitium. Frühere Untersuchungen zeigen zudem, dass eine systemische Immunaktivierung, wie sie beispielsweise in septischen Zuständen auftritt, thrombotische Ereignisse induzieren kann. Ein chronisch erhöhter IL-6-Spiegel im Blut wird mit dem Auftreten eines ACS assoziiert. IL-6 stimuliert unter inflammatorischen Bedingungen die Expression der *Tpo* in der Leber und führt so zu einer gesteigerten Thrombopoese [18, 38, 128-132]. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein MI bereits innerhalb von 24 Stunden einen signifikanten Anstieg inflammatorischer Parameter induziert, die sowohl systemisch als auch lokal eine zentrale Rolle in der Reaktion auf ischämisch geschädigtes Gewebe spielen. Thrombozyten

können über ihre Interaktion mit Leukozyten eine Aktivierung dieser Zellen bewirken, was zur Freisetzung von Zytokinen wie IL-6 führt. Gleichzeitig wirkt IL-6 auf die Leber und steigert dort die *Tpo*-Expression, wodurch die Thrombopoese angeregt wird [138, 139].

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine dynamische Regulation der *Il-6r*-Expression nach AMI in den Leberzellen, die sowohl vom genetischen Hintergrund als auch von immunmodulatorischen Interventionen beeinflusst wird. Besonders die Veränderungen innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Infarkt liefern entscheidende Einblicke in die zugrunde liegenden inflammatorischen Signalwege.

In wt-Mäusen wurde sechs Stunden nach AMI eine ausgeprägte Hochregulation der *Il-6r*-Expression beobachtet, was auf eine starke Aktivierung entzündlicher Signalwege in der akuten Phase hinweist. Bereits nach 24 Stunden fiel die Expression auf nahezu basale Werte zurück. Dieses transiente Muster ist typisch für eine kurzzeitige Aktivierung proinflammatorischer Signaltransduktionswege. Die ausgeprägte Hochregulation in der Frühphase unterstreicht die zentrale Rolle von IL-6 sowohl in der Inflammationsantwort als auch in der Thrombopoese.

Auch in der IgG-Kontrollgruppe wurde sechs Stunden nach AMI eine signifikante Hochregulation der *Il-6r*-Expression festgestellt. In der mit Depletionsantikörpern behandelten Gruppe war die Expression ebenfalls erhöht, jedoch ohne statistische Signifikanz. 24 Stunden nach dem Infarkt war die *Il-6r*-Expression in beiden Gruppen reduziert, wobei der Rückgang in der Depletionsgruppe signifikant stärker ausgeprägt war. Dies deutet darauf hin, dass die Abwesenheit von Thrombozyten die zeitliche Dynamik der *Il-6r*-Expression beeinflusst.

Bereits vor AMI wiesen *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikant niedrigere *Il-6r*-Expression im Vergleich zu *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäusen auf, was darauf hindeutet, dass die chronische Abwesenheit von Thrombozyten die Expression von *Il-6r* in Leberzellen reduziert. 24 Stunden nach dem Infarkt blieb die *Il-6r*-Expression in *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäusen stabil, während sie in *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant anstieg. Diese Beobachtung lässt auf eine kompensatorische Hochregulation schließen, die durch das Fehlen der *Mpl*-vermittelten Signalübertragung ausgelöst wird.

Zusammenfassend bestätigen die Daten eine zeitabhängige Regulation der *Il-6r*-Genexpression nach AMI. Während *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäuse eine stabile *Il-6r*-Expression aufweisen, zeigen *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine kompensatorische Hochregulation möglicherweise als Reaktion auf eine gestörte

Thrombopoese. Die bei *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtete kompensatorische Hochregulation der *Il-6r*-Expression weist darauf hin, dass eine gestörte Thrombopoese die IL-6-abhängigen Entzündungswege nach akutem Myokardinfarkt wesentlich moduliert. Dies unterstreicht die aktive immunregulatorische Rolle der Thrombozyten im postischämischen Gewebe und legt nahe, dass thrombozytäre Dysfunktionen eine verstärkte oder dysregulierte inflammatorische Antwort begünstigen können. Die ausgeprägte Reduktion der *Il-6r*-Expression 24 Stunden nach AMI in der Depletionsgruppe weist zudem auf eine gezielte Modulation inflammatorischer Signalwege. Bereits in der frühen Phase nach einem STEMI steigt IL-6 im Plasma deutlich an; Studien zeigen einen dreifachen Anstieg innerhalb der ersten 24 Stunden, der mit größerem Infarkt volumen korreliert. Gleichzeitig setzen aktivierte Thrombozyten IL-6 frei, was in vitro die NO-Produktion in Endothelzellen reduziert und somit die lokale Entzündungsreaktion unterstützt [140, 141]. Diese Befunde legen nahe, dass eine gestörte Thrombopoese etwa bei *Mpl*-Defizienz nicht nur die Thrombozytenzahl, sondern auch die IL-6-Signalwege beeinflusst.

## 6.5 Expression des *Tpo*-Gens und Regulation nach Myokardinfarkt

Bei Patienten mit Thrombozytopenie ist die Dichte des *Mpl*-Rezeptors auf der Oberfläche von Megakaryozyten und Thrombozyten signifikant reduziert. Dies führt zu einer verminderten Bindung und Aufnahme von TPO sowie zu erhöhten TPO-Plasmaspiegeln. Die Gabe von IL-6 induziert eine Thrombozytose, begleitet von einem Anstieg der TPO-Konzentration, was darauf hindeutet, dass die Thrombozytenzahl allein nicht ausschlaggebend für die Regulation der TPO-Spiegel und der Thrombopoese ist. Vielmehr scheint die Elimination des zirkulierenden TPO von mehreren Faktoren abzuhängen insbesondere von der Thrombozytenanzahl, der Megakaryozytenmasse sowie der *Mpl*-Rezeptordichte auf deren Zelloberflächen [25, 99, 118, 130]. Wie bereits beschrieben, führt eine IL-6R-Defizienz bei Mäusen zu einer kompensatorischen Hochregulation des AMR. Dies resultiert in einer gesteigerten *Tpo*-Expression in der Leber und einer signifikanten Zunahme der Thrombozytenzahl. In *Asgr2*-Knockout-Mäusen wurde zudem ein erhöhter *Il-6r*-mRNA-Spiegel in der Leber festgestellt, was auf eine enge funktionelle Verbindung zwischen AMR und IL-6R hinweist. Dieser Rückkopplungsmechanismus verdeutlicht, dass die *Tpo*-Expression in Hepatozyten einer regulierten Steuerung unterliegt und nicht konstitutiv erfolgt.

Zahlreiche Studien anderer Arbeitsgruppen belegen, dass der Metabolismus von Thrombozyten und TPO bei Menschen und Maus durch komplexe Regulationsmechanismen gesteuert wird. Obwohl die Leber die primäre Quelle für TPO im Körper darstellt, tragen auch andere Organe wesentlich zu dessen Regulation bei. So produziert die Niere TPO und leistet damit einen wichtigen Beitrag zur zirkulierenden Gesamtmenge, während das Knochenmark Thrombopoetin lokal synthetisiert und so eine gezielte Steuerung der Megakaryopoese ermöglicht. Diese Produktion aus mehreren Quellen verdeutlicht die Komplexität der TPO-Homöostase und erklärt, weshalb Störungen in unterschiedlichen Organen die Thrombozytenproduktion erheblich beeinflussen können [27, 79-81, 86, 111].

In wt-Mäusen zeigte sich 24 Stunden nach einem AMI eine signifikante Hochregulation der hepatischen *Tpo*-Expression. Dieses frühe Ansprechen deutet auf eine akute, systemische Reaktion auf den Infarkt hin, bei der die erhöhte TPO-Produktion die Thrombozytenbildung stimuliert, um die hämostatische und entzündliche Reaktion in der initialen Phase zu unterstützen. Nach fünf Tagen normalisierte sich die hepatische *Tpo*-Expression wieder auf das Ausgangsniveau un behandelter Tiere.

Diese zeitliche Dynamik zeigt, dass TPO nicht nur für die Aufrechterhaltung der Thrombozytenzahl, sondern auch für die Koordination der akuten inflammatorischen Antwort nach MI eine zentrale Rolle spielt. In der frühen Phase könnte die erhöhte TPO-Produktion insbesondere die Aktivität von Thrombozyten verstärken, die wiederum zur initialen Zytokinfreisetzung und zur Modulation der lokalen Entzündungsreaktion im Herzgewebe beitragen. Die anschließende Rückkehr zur Homöostase stellt sicher, dass die Thrombozytenzahl und die inflammatorische Aktivität nicht übermäßig ansteigen, wodurch eine Dysregulation oder ein sekundärer Gewebeschaden verhindert wird [141, 142].

Auch in der IgG-Kontrollgruppe wurde sechs Stunden nach AMI eine signifikante Hochregulation der *Tpo*-Expression festgestellt, die sich 24 Stunden später deutlich verringerte. Im Vergleich dazu zeigten mit Depletionsantikörpern behandelte Mäuse sowohl vor als auch 24 Stunden nach AMI eine höhere *Tpo*-Expression als Tiere der Kontrollgruppe. Zu beiden Zeitpunkten - sechs und 24 Stunden nach AMI - war die *Tpo*-Expression in der Depletionsgruppe erhöht. Diese Befunde deuten darauf hin, dass eine akute, antikörpervermittelte Thrombozytendepletion eine unmittelbare kompensatorische Aktivierung der hepatischen *Tpo*-Expression auslöst, die unabhängig vom AMI

persistiert. Im Gegensatz zu Modellen mit chronisch gestörter Thrombopoese wie *Mpl*-defizienten Mäusen spiegeln Depletionsgruppe somit eine ausgeprägte Frühreaktion des TPO-Signalwegs wider, die die schnelle Wiederherstellung der Thrombozytenzahl nach akutem Verlust unterstützt.

*Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten bereits vor dem AMI eine signifikant erhöhte *Tpo*-Expression im Vergleich zu *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäusen, was auf eine verminderte *TPO-Clearance* infolge fehlender *Mpl*-Rezeptoren hindeutet. 24 Stunden nach AMI kam es bei *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäusen zu einer signifikanten Hochregulation der *Tpo*-Expression, während in *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen keine signifikante Veränderung beobachtet wurde. Diese Beobachtungen unterstreichen die zentrale Rolle von *Mpl* sowohl in der Regulation der TPO-Aufnahme als auch in der inflammationsbedingten Thrombopoese.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die *Tpo*-Expression in der Leber durch genetische Faktoren wie den *Mpl*-Status als auch durch Veränderungen der Thrombozytenzahl reguliert wird. Ein akuter Thrombozytenverlust wie in der Depletionsgruppe führt zu einer unmittelbaren kompensatorischen Steigerung der *Tpo*-Expression, während bei chronisch gestörter Thrombopoese, wie in *Mpl*-defizienten Mäusen, eine dauerhaft veränderte Rückkopplung zwischen Megakaryopoese, Thrombozytenzahl und TPO-Signalweg vorliegt. Dadurch unterscheiden sich die dynamischen Anpassungsmechanismen deutlich je nach Art und Dauer der Thrombozytenreduktion. Während *Mpl* eine Schlüsselrolle in der Steuerung der TPO-Aufnahme und -Regulation einnimmt, zeigen Depletions- und Kontrollantikörper differenzielle Effekte auf die hepatische *TPO*-Expression. Die Korrelation zwischen *TPO*-Expression und Veränderungen in *Asgr1/2* sowie *Il-6r* bei wt- und Depletionsmäusen spricht für eine entzündungsinduzierte Regulation über diese Signalwege. Insgesamt verdeutlichen die vorliegenden Daten die zeit- und modellspezifische Steuerung der hepatischen *Tpo*-Expression nach AMI, die eng mit inflammatorischen Prozessen, der Thrombopoese und der Funktion des *Mpl*-Rezeptors verknüpft ist.

## 6.6 STAT3-Phosphorylierung als Schlüsselregulator für *Tpo*-Expression

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass sowohl desialylierte Thrombozyten als auch IL-6 eine STAT3-vermittelte Expression der hepatischen *Tpo*-mRNA induzieren [77]. Damit beeinflusst der Signalweg der AMR–JAK2–STAT3-Kaskade über desialylierte Thrombozyten inflammatorische Prozesse. Die Elimination dieser Thrombozyten löst über AMR die Synthese von Akute-Phase-Proteinen aus, sodass sie als Bestandteil der Akutphasenreaktion interpretiert werden kann [25, 62]. Eine chronische Aktivierung des IL-6-Signalwegs kann hingegen Leberschäden und die Entwicklung hepatischer Neoplasien begünstigen. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, induziert STAT3 die Expression des *Suppressors of Cytokine Signaling 3* (SOCS3), welcher wiederum die gp130-vermittelte Signaltransduktion negativ reguliert und die gp130-abhängige Signaltransduktion begrenzt. Diese Rückkopplung stellt einen Schutzmechanismus gegen übermäßige inflammatorische Reaktionen dar [87, 88, 133].

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die zentrale Rolle von STAT3 in der inflammatorischen Antwort und in der Regulation der *Tpo*-Expression nach MI. In wt-Mäusen war die STAT3-Phosphorylierung sechs Stunden nach AMI signifikant erhöht, was auf eine Aktivierung inflammatorischer Signalwege in der akuten Phase hinweist. Zu späteren Zeitpunkten - 24 Stunden, fünf Tage und 21 Tage nach AMI - war die pSTAT3-Aktivität nicht mehr nachweisbar. Dies unterstreicht den transitorischen Charakter der STAT3-Aktivierung in der initialen Entzündungsphase.

Bereits vor dem AMI wiesen die Leberzellen von thrombozytendepletierten Mäusen eine höhere STAT3-Phosphorylierung auf als die Kontrollgruppe, was auf die grundsätzliche Rolle von Thrombozyten in der akuten Phase der inflammatorischen Signalregulation hindeutet. Nach AMI zeigte sich in der IgG-Gruppe sechs Stunden nach dem Ereignis ein signifikanter Anstieg der pSTAT3, gefolgt von einer signifikanten Abnahme nach 24 Stunden, die das Ausgangsniveau nahezu wieder erreichte. Auch in der Depletionsgruppe war sechs Stunden nach AMI eine erhöhte pSTAT3-Aktivität nachweisbar; jedoch fiel der Rückgang nach 24 Stunden weniger ausgeprägt aus und war statistisch nicht signifikant.

Bei *Mpl*<sup>+/+</sup>- und *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde 24 Stunden nach AMI eine signifikant erhöhte pSTAT3-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Tieren festgestellt. Zwischen den beiden Genotypen bestanden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede hinsichtlich der pSTAT3-Niveaus. Dies weist darauf hin, dass *Mpl* nicht direkt die Aktivierung von STAT3 beeinflusst, jedoch maßgeblich in die nachgelagerte Regulation der *Tpo*-Expression involviert ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass STAT3 eine Schlüsselrolle in der frühen inflammatorischen Antwort nach AMI einnimmt. Die STAT3-Phosphorylierung erfolgt zeitlich streng reguliert und ist auf die initiale Entzündungsphase begrenzt. Unterschiede in der pSTAT3-Dynamik zwischen Depletions- und IgG-behandelten Mäusen unterstreichen, dass Thrombozyten wesentlich zur zeitlichen Steuerung der frühen inflammatorischen Signalwege beitragen. Gleichzeitig verdeutlichen die Befunde aus dem *Mpl*-defizienten Modell, dass eine intakte *Mpl*-Signalgebung weniger für die Aktivierung von STAT3 selbst, sondern vielmehr für die korrekte Regulation der nachgeschalteten *Tpo*-Expression erforderlich ist. Die gleichzeitige Hochregulation von *Il-6 $\alpha$*  und *Asgr1/2* korreliert mit der Aktivierung von STAT3, was auf eine koordinierte Regulation dieser Signalwege hinweist. Die gewonnenen Erkenntnisse erweitern das Verständnis der STAT3-vermittelten Steuerung von Entzündungs- und Thrombopoese Prozessen und könnten potenzielle therapeutische Ansatzpunkte für inflammatorische und hämatologische Erkrankungen liefern.

## 6.7 Regulation der STAT5-Phosphorylierung nach Myokardinfarkt

STAT5-Phosphorylierung führt zur Dimerisierung und Translokation in den Zellkern, wo STAT5 die Transkription zahlreicher Gene aktiviert, die unter anderem Zellproliferation, Differenzierung und Überleben von Megakaryozyten steuern. Viele dieser Zielgene etwa solche der akuten Phase oder der hämatopoetischen Regulation werden ebenfalls durch STAT3 moduliert, sodass beide Signalwege funktionell miteinander verknüpft sind [27, 93].

In wt-Mäusen zeigte sich am fünften Tag nach AMI eine signifikante Erhöhung der STAT5-Phosphorylierung, was auf eine mögliche Rolle von STAT5 in der regenerativen Phase hindeutet. Zu früheren Zeitpunkten (sechs und 24 Stunden nach AMI) sowie am Tag 21 blieb die pSTAT5-

Aktivität unverändert. Dies legt nahe, dass STAT5 nicht primär an der initialen inflammatorischen Antwort beteiligt ist.

Nach Thrombozyten-Depletion war die pSTAT5-Aktivität sowohl vor als auch 24 Stunden nach AMI signifikant geringer als in der IgG-Kontrollgruppe. In beiden Gruppen war zudem 24 Stunden nach AMI eine Reduktion der pSTAT5 im Vergleich zu unbehandelten Tieren festzustellen. Diese Beobachtung weist auf eine Abschwächung der STAT5-vermittelten Signalwege nach der frühen inflammatorischen Phase hin und unterstreicht, dass STAT5 in diesem Zeitfenster keine dominante Rolle in der akuten Immunantwort spielt.

In *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen war die pSTAT5-Aktivität sowohl vor als auch 24 Stunden nach AMI geringer als in *Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass *Mpl* eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von STAT5 spielt. Gleichzeitig war in beiden Genotypen 24 Stunden nach AMI keine signifikante Veränderung der pSTAT5 im Vergleich zu unbehandelten Tieren zu erkennen, was erneut darauf hindeutet, dass STAT5 nicht maßgeblich in die akute Entzündungsphase eingebunden ist.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die STAT5-Phosphorylierung nach AMI phasenabhängig reguliert ist und vor allem in späteren, eher regenerativen Prozessen eine Rolle spielt. Die abgeschwächte STAT5-Aktivität nach Thrombozytendepletion sowie im *Mpl*-defizienten Modell verdeutlicht, dass Thrombozyten und eine intakte *Mpl*-Signalachse erforderlich sind, um STAT5-abhängige Reparatur- und Regenerationsprogramme vollständig zu aktivieren. Im Kontext des AMI deutet dies darauf hin, dass Thrombozyten nicht nur an der frühen Inflammation beteiligt sind, sondern auch für eine korrekte Aktivierung von Signalwegen essenziell sind, die die spätere Gewebeheilung unterstützen.

## **6.8 Differenzielle Regulation der Anzahl der Megakaryozyten im Knochenmark**

Klinische Beobachtungen zeigen, dass Größe und Reife von Megakaryozyten bei Patienten mit AMI signifikant erhöht sind. Studien belegen zudem, dass ein AMI die Reifung von Megakaryozyten und die Thrombopoese im Knochenmark fördert, was zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl im Blutkreislauf führt [35, 134, 135].

Die Differenzierung und Reifung von Megakaryozyten im Knochenmark nimmt etwa vier bis fünf Tage in Anspruch, wobei die anschließende Thrombozytenproduktion und -freisetzung zusätzlich etwa 24 Stunden erfordert. Vor diesem Hintergrund erscheint es unwahrscheinlich, dass der rasche Anstieg der Thrombozytenzahl unmittelbar nach einem AMI allein durch eine gesteigerte Produktion im Knochenmark erklärbar ist. Der unmittelbare postinfarktbedingte Anstieg der Thrombozytenzahl resultiert primär aus einer akuten, katecholaminvermittelten Mobilisierung des splenischen Thrombozytenpools sowie der raschen Freisetzung reifer proplatelets, während eine gesteigerte Megakaryopoese aufgrund der erforderlichen Differenzierungszeit erst nach mehreren Tagen zur Thrombozytenerhöhung beitragen kann [38, 136, 137].

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die Anzahl der Megakaryozyten im Knochenmark von wt-Mäusen 24 Stunden nach AMI im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren unverändert blieb. Dies spricht dafür, dass die schnelle hämatologische Reaktion auf den AMI nicht primär durch eine akute Zunahme der Megakaryopoese vermittelt wird - im Einklang mit dem bekannten mehrtägigen Reifungsprozess der Megakaryozyten.

Vor dem AMI war die Megakaryozytenzahl in der IgG-Kontrollgruppe signifikant höher als in der Depletionsgruppe, was die Effektivität der antikörpervermittelten Depletion von Megakaryozyten und Thrombozyten bestätigt. Da die zur Depletion eingesetzten Antikörper die gleichen Oberflächenantigene auf Thrombozyten und Megakaryozyten erkennen, führt die antikörpervermittelte Thrombozytendepletion auch zu einer Reduktion der Megakaryozytenzahl im Knochenmark. 24 Stunden nach AMI zeigte sich in der IgG-Gruppe eine Abnahme der Megakaryozytenzahl, wohingegen die Zellzahl in der Depletionsgruppe signifikant anstieg. Dies könnte einerseits auf eine durch die vorausgegangene Depletion induzierte kompensatorische

Aktivierung der Megakaryopoese zurückzuführen sein. Andererseits könnte die anhaltend erhöhte Megakaryozytenzahl in der Depletionsgruppe darauf hindeuten, dass reife Megakaryozyten weniger effizient in die zirkulierende Thrombozytenproduktion übergehen bzw. verzögert ausgeschleust werden. Die Abnahme in der IgG-Gruppe spricht hingegen für eine effektive Differenzierung und Thrombozytenfreisetzung sowie einen erhöhten Verbrauch im Rahmen der inflammatorischen Prozesse.

*Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäuse wiesen zu allen Zeitpunkten eine signifikant höhere Megakaryozytenzahl im Knochenmark auf als *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen. In *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäusen blieb die Zellzahl sowohl vor als auch nach AMI konstant, was auf eine stabile, funktionell regulierte Megakaryopoese hindeutet. In *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen hingegen war die Megakaryozytenzahl im unbehandelten Zustand stark reduziert, stieg jedoch fünf Tage nach AMI signifikant an. Dieser verzögerte Anstieg könnte eine adaptive Kompensation über alternative Signalwege oder eine Folge eingeschränkter Mobilisierung bzw. Reifung sein. Trotz dieser Reaktion blieb die Megakaryozytenzahl in *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich unter dem Niveau von *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäusen, was die essenzielle Rolle von *Mpl* für eine effiziente Megakaryopoese unterstreicht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Regulation der Megakaryozytenzahl im Knochenmark nach AMI durch mehrere Faktoren beeinflusst wird - darunter *Mpl*-abhängige Signalwege sowie die antikörpervermittelte Depletion von Thrombozyten und Megakaryozyten. Während *wt*- und *Mpl*<sup>+/+</sup>-Mäusen eine stabile Megakaryopoese aufweisen, deuten die Veränderungen in *Depl.*- und *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf kompensatorische Mechanismen oder gestörte Mobilisierungs- und Reifungsprozesse hin.

## 6.9 Milz als Schlüsselorgan nach akutem Myokardinfarkt

Die Milz speichert etwa 30 % der zirkulierenden Thrombozyten und kann diese bei Bedarf rasch freisetzen. In Tiermodellen sind die in der Milz sequestrierten Thrombozyten um etwa 20-30 % größer als zirkulierende Thrombozyten. Ein AMI führt zur schnellen Mobilisierung dieser Thrombozyten-Reserven, was mit einer schnelleren Zunahme sowohl der Größe als auch der Aktivität zirkulierender Thrombozyten einhergeht. Dieser Mechanismus trägt wesentlich zur systemischen und kardialen Entzündungsreaktion bei. Studien zeigen, dass eine Splenektomie

diese durch den AMI induzierten Veränderungen signifikant abschwächt. Dies legt nahe, dass die Freisetzung splenischer Thrombozyten eine zentrale Rolle bei der postischämischen Zunahme der Thrombozytengröße sowie den daraus resultierenden proinflammatorischen und prothrombotischen Effekten spielt [38].

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen eine dynamische Anpassung der Megakaryozytenzahl in der Milz in den ersten Tagen nach einem AMI und unterstreichen die Funktion der Milz als regulatorisches Schlüsselorgan. Zusammengenommen weisen diese Daten sowie frühere Studien zur Rolle von Milz und Knochenmark beim AMI darauf hin, dass die Milz für den initialen, raschen Anstieg der Thrombozytenzahl nach einem Infarkt ereignis verantwortlich ist, während das Knochenmark ab dem vierten bis fünften Tag die nachfolgende Erhöhung der Thrombozytenzahl im Blutkreislauf übernimmt [38, 48, 49, 136, 137].

Bei wt-Mäusen war 24 Stunden nach AMI ein signifikanter Anstieg der Megakaryozytenzahl in der Milz zu beobachten. Da dieser Anstieg nicht durch eine Neuproduktion im Knochenmark erklärbar ist, spricht dies für eine Mobilisierung von Megakaryozyten aus dem Knochenmark und deren Umsiedlung in die Milz. Diese schnelle Zunahme könnte die Rolle der Milz als aktives Zentrum der frühen Immun- und Thrombozytenantwort auf die durch den AMI ausgelöste Entzündung widerspiegeln.

In den Thrombozyten-depletierten Mäusen zeigte sich sowohl 24 Stunden als auch am fünften Tag nach AMI eine signifikante Erhöhung der Megakaryozytenzahl in der Milz. Im Gegensatz dazu war die Anzahl in der IgG-Kontrollgruppe nach 24 Stunden unverändert und nach fünf Tagen sogar reduziert. Diese Abnahme könnte auf eine verstärkte Umwandlung reifer Megakaryozyten in Thrombozyten und damit eine erhöhte Thrombozytenfreisetzung hindeuten. Die persistierende Erhöhung in der Depletionsgruppe hingegen könnte auf eine eingeschränkte Differenzierung oder eine verzögerte Umsetzung der Megakaryozyten in Thrombozyten zurückzuführen sein.

*Mpl*<sup>+/-</sup>-Mäuse wiesen sowohl vor als auch 24 Stunden nach AMI eine signifikant höhere Megakaryozytenzahl in der Milz auf als *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse, was die entscheidende Rolle von *Mpl* in der Regulation der Megakaryopoese unterstreicht. Die schnelle Erhöhung der Megakaryozytenzahl nach AMI deutet darauf hin, dass diese initiale Phase überwiegend durch systemische Faktoren wie die inflammatorisch bedingte Freisetzung von TPO gesteuert wird. Die signifikante Abnahme der

Megakaryozytenzahl am fünften Tag nach AMI in beiden Genotypen könnte eine Phase verstärkter Verbrauchstätigkeit im Rahmen der Thrombopoese reflektieren.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die schnelle Erhöhung der Megakaryozytenzahl in der Milz nach einem AMI einen schnellen physiologischen Anpassungsmechanismus darstellt, der wahrscheinlich durch TPO und entzündliche Mediatoren vermittelt wird. Das Fehlen des TPO-Rezeptors (Mpl) sowie die Depletion von Thrombozyten beeinflussen diesen Prozess auf unterschiedliche Weise, was deren Bedeutung für die langfristige Regulation der Thrombopoese unterstreicht.

## 6.10 Zusammenfassende Beurteilung der Ergebnisse

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese und Progression des AMI, indem sie sowohl proinflammatorische als auch prothrombotische Prozesse fördern. Ziel dieser Arbeit war es, die Regulation der Thrombozytenzahl sowie die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen in den ersten 24 Stunden nach myokardialer I/R zu untersuchen. Hierzu wurden verschiedene Mausmodelle eingesetzt, darunter wt-Mäusen, *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse sowie Mäusen mit antikörpervermittelter Thrombozytendepletion. In einigen Mauslinien wurden darüber hinaus erweiterte Zeitpunkte (6 Stunden, 5 Tage und 21 Tage nach AMI) berücksichtigt, um zeitliche Dynamiken differenzierter erfassen zu können.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl Veränderungen im Thrombopoetin-Rezeptor (Mpl) als auch die Aktivierung zentraler Signalwege wie der AMR, IL-6-R und STAT3 eine entscheidende Rolle in der Regulation der Thrombopoese und der systemischen Inflammationsreaktion spielen. Diese Erkenntnisse erweitern das Verständnis der schnellen pathophysiologischen Reaktionen nach AMI und eröffnen neue Perspektiven für therapeutische Interventionen.

*Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen eine deutlich reduzierte Thrombozyten- und Megakaryozytenzahl auf, was die essenzielle Rolle des Mpl-Rezeptors für die Thrombopoese unterstreicht. Der erhöhte TPO-Plasmaspiegel bei diesen Mäusen konnte die fehlende Rezeptorfunktion nicht kompensieren, was auf eine gestörte negative Rückkopplung in der TPO-Regulation hinweist. Dies verdeutlicht, dass

die Mpl-vermittelte Signaltransduktion nicht nur für die TPO-Aufnahme, sondern auch für die adaptive Regulation der Thrombopoese nach AMI unverzichtbar ist.

In Thrombozyten-depletierten Mäusen zeigten sich spezifische Veränderungen in der Regulation der Thrombozytenhomöostase. Die durch Antikörper zerstörten Thrombozyten wurden infolge ihrer Desialylierung über den hepatischen AMR eliminiert, was durch die verstärkte Genexpression von *Asgr1* und *Asgr2* in der Leber gestützt wird. Diese Befunde betonen die Bedeutung der hepatischen Clearancemechanismen bei der akuten Thrombozytendepletion.

Ein zentrales Element der inflammatorischen Signalweiterleitung stellt die Phosphorylierung von STAT3 dar. In wt-Mäusen war pSTAT3 bereits sechs Stunden nach AMI signifikant erhöht - ein Hinweis auf die Aktivierung akuter inflammatorischer Prozesse. Dieser Effekt war jedoch transitorisch und normalisierte sich innerhalb von 24 Stunden. Die pSTAT3-Spiegel waren sowohl in *Mpl*<sup>+/-</sup> als auch in *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäusen 24 Stunden nach AMI erhöht, was nahelegt, dass die STAT3-Aktivierung unabhängig von Mpl erfolgt, jedoch durch nachgeschaltete Signalwege moduliert sein könnte.

Die Regulation der STAT5-Phosphorylierung zeigte hingegen ein verzögertes Muster: Während in der Frühphase (6 bzw. 24 Stunden) keine signifikanten Veränderungen beobachtet wurden, war pSTAT5 am fünften Tag nach AMI in wt-Mäusen deutlich erhöht. Dies spricht für eine spätere, vermutlich regenerativ-adaptive Rolle von STAT5 in der Thrombopoese nach AMI.

Ein weiterer zentraler Befund betrifft die Rolle der Milz. In wt-Mäusen stieg die Megakaryozytenzahl in der Milz bereits 24 Stunden nach AMI signifikant an. Da die Reifung von Megakaryozyten im Knochenmark mehrere Tage benötigt, ist dieser rasche Anstieg am ehesten durch die Mobilisierung bereits gebildeter Megakaryozyten aus dem Knochenmark und deren Umlagerung in die Milz zu erklären. Damit fungiert die Milz als Schlüsselorgan der frühen Thrombozytenantwort auf AMI, während das Knochenmark in den späteren Phasen (ab Tag 4-5) für die nachhaltige Thrombopoese verantwortlich ist - wie durch den verzögerten Anstieg der Megakaryozytenzahl im Knochenmark belegt.

## 6.11 Klinische Bedeutung

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse liefern wertvolle Einblicke in die Regulation der Thrombozytenhomöostase sowie der inflammatorischen Signalwege nach einem AMI und eröffnen potenziell neue therapeutische Zielstrukturen. Die identifizierten molekularen Mechanismen könnten in unterschiedlichen klinischen Kontexten - insbesondere im Rahmen der Sekundärprävention und Akuttherapie des AMI von hoher Relevanz sein.

### 6.11.1 Thrombopoese und TPO-Regulation als therapeutisches Ziel

Die zentrale Rolle von TPO und dessen Rezeptor Mpl in der Thrombopoese konnte eindrucksvoll bestätigt werden. *Mpl*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die trotz erhöhter Plasmakonzentrationen von TPO eine ausgeprägte Thrombozytopenie aufweisen, unterstreichen die Abhängigkeit der Thrombopoese von einer intakten Signaltransduktion über Mpl. Diese Erkenntnis eröffnet klinische Perspektiven für die Entwicklung gezielter Therapien zur Regulation der Thrombopoese, insbesondere bei Patientinnen und Patienten mit Thrombozytopenie oder Thrombozytose.

Ein potenzieller therapeutischer Ansatz ist der Einsatz rekombinanter TPO-Agonisten oder Mpl-Analoga, um die Thrombopoese bei Patienten mit eingeschränkter biologischer Funktion von TPO zu stimulieren. Umgekehrt könnten TPO-Antagonisten bei Erkrankungen wie der essenziellen Thrombozythämie oder anderen myeloproliferativen Neoplasien eingesetzt werden, um die Thrombopoese zu dämpfen.

### 6.11.2 Rolle der Milz und Leber bei der Regulation von Thrombozyten

Die Milz wurde als Schlüsselorgan für die rasche Mobilisierung von Thrombozyten in der frühen Phase nach einem AMI identifiziert. Diese Erkenntnis verdeutlicht, dass die Milz nicht nur als Speicherort für Thrombozyten fungiert, sondern auch eine zentrale Rolle in der Immunantwort einnimmt. Eine gezielte Modulation milzspezifischer Signalwege könnte dazu beitragen, die frühe inflammatorische Antwort nach AMI zu regulieren und die Thrombozytenfreisetzung kontrolliert

zu steuern, ohne die regenerative Funktion der Megakaryozyten und Thrombozyten zu beeinträchtigen.

Darüber hinaus übernimmt die Leber durch die Genexpression von *Tpo* und die Aktivierung intrazellulärer Signalwege eine zentrale Rolle in der Thrombopoese und damit indirekt in der Versorgung des Blutkreislaufs mit funktionellen Thrombozyten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass hepatoprotektive Strategien nach einem AMI von klinischer Bedeutung sein könnten, insbesondere bei Patientinnen und Patienten mit vorbestehenden Lebererkrankungen, da eine gestörte Leberfunktion die frühe Thrombozytenreaktion und die Regeneration nach Infarkt beeinträchtigen könnte.

### **6.11.3 Modulation entzündlicher Signalprozesse durch IL-6R und STAT**

Die zeitabhängige Regulation der IL-6R- und STAT-Signalwege (STAT3 und STAT5) zeigt eine deutliche Trennung zwischen der akuten Entzündungsphase und den nachfolgenden regenerativen Prozessen. Therapeutische Ansätze, die auf die Modulation dieser Signalwege abzielen, könnten die Prognose von Patienten nach AMI verbessern, indem sie inflammatorische Reaktionen dämpfen und regenerative Prozesse fördern.

Die Hemmung des IL-6-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionswegs durch monoklonale Antikörper wie Tocilizumab, das bereits bei rheumatoider Arthritis eingesetzt wird, könnte auch im Kontext eines AMI von Vorteil sein. Eine solche Therapie könnte helfen, inflammationsbedingte Myokardschäden zu begrenzen und die kardiale Funktion langfristig zu erhalten. Daher erscheint es vielversprechend, den Einsatz von Tocilizumab gezielt für die Behandlung des AMI in zukünftigen Studien intensiver zu untersuchen.

### **6.11.4 Bedeutung für kardiovaskuläre Prävention und Nachsorge**

Die enge Verbindung zwischen Thrombozyten, Entzündungsprozessen und Myokardschäden unterstreicht die Notwendigkeit, bei der Prävention und Nachsorge kardiovaskulärer Erkrankungen entzündungshemmende und antithrombotische Strategien in Einklang zu bringen. Die Erkenntnisse

dieser Arbeit könnten dazu beitragen, präzisere diagnostische Marker für die Überwachung der Entzündungs- und Thrombozytenaktivierung bei Patienten nach AMI zu entwickeln.

Zukünftige Studien sollten darauf abzielen, die molekularen Mechanismen weiter aufzuklären und die hier beschriebenen Ansätze in klinischen Studien zu evaluieren. Die gewonnenen Ergebnisse legen nahe, dass die gezielte Modulation von AMR, IL-6R, TPO, Mpl und STAT-abhängigen Signalwegen potenzielle therapeutische Strategien bietet, um Entzündungen und Thrombosen bei AMI-Patienten effektiv zu kontrollieren.

## Literaturverzeichnis

1. Zarbock, A., R.K. Polanowska-Grabowska, and K. Ley, *Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation*. Blood Reviews, 2007. **21**(2): p. 99-111.
2. Aurigemma, C., et al., *Persistent enhanced platelet activation in patients with acute myocardial infarction and coronary microvascular obstruction: clinical implications*. Thrombosis and Haemostasis, 2014. **111**(1): p. 122-130.
3. Xu, Y.Q., et al., *Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2006. **290**(2): p. H692-H699.
4. Fitzgerald, D.J., et al., *Platelet Activation in Unstable Coronary-Disease*. New England Journal of Medicine, 1986. **315**(16): p. 983-989.
5. Massberg, S., et al., *Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3829-3838.
6. Ault, K.A., et al., *Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial. Thrombolysis in Myocardial Infarction*. J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(3): p. 634-9.
7. Naghavi, M., et al., *Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013*. Lancet, 2015. **385**(9963): p. 117-171.
8. Townsend, N., et al., *Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016 (vol 37, pg 3232, 2017)*. European Heart Journal, 2019. **40**(2): p. 189-189.
9. Mendis, S., et al., *World Health Organization (WHO) and International Society of Hypertension (ISH) risk prediction charts: assessment of cardiovascular risk for prevention and control of cardiovascular disease in low and middle-income countries*. J Hypertens, 2007. **25**(8): p. 1578-82.
10. Roth, G.A., et al., *Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017*. Lancet, 2018. **392**(10159): p. 1736-1788.
11. Townsend, N., et al., *Cardiovascular disease in Europe 2015: epidemiological update*. European Heart Journal, 2015. **36**(40): p. 2673-2674.

12. Nichols, M., et al., *Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update*. European Heart Journal, 2014. **35**(42): p. 2950-2959.
13. Nichols, M., et al., *Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update*. European Heart Journal, 2013. **34**(39): p. 3028-3034.
14. Roffi, M., et al., [2015 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation]. *Kardiol Pol*, 2015. **73**(12): p. 1207-94.
15. O'Gara, P.T., et al., *2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *Circulation*, 2013. **127**(4): p. e362-425.
16. Amsterdam, E.A., et al., *2014 AHA/ACC Guideline for the Management of Patients with Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndromes: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **64**(24): p. e139-e228.
17. Sattler, S.M., et al., *Ventricular Arrhythmias in First Acute Myocardial Infarction: Epidemiology, Mechanisms, and Interventions in Large Animal Models*. *Front Cardiovasc Med*, 2019. **6**: p. 158.
18. Walsh, T.G. and A.W. Poole, *Do platelets promote cardiac recovery after myocardial infarction: roles beyond occlusive ischemic damage*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2018. **314**(5): p. H1043-H1048.
19. Murray, C.J.L. and A.D. Lopez, *Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study*. *Lancet*, 1997. **349**(9061): p. 1269-1276.
20. Junt, T., et al., *DynAMic visualization of thrombopoiesis within bone marrow*. *Science*, 2007. **317**(5845): p. 1767-1770.
21. Ng, A.P., et al., *Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014. **111**(16): p. 5884-5889.
22. Stegner, D., et al., *Thrombopoiesis is spatially regulated by the bone marrow vasculature*. *Nature Communications*, 2017. **8**.
23. den Dekker, E., et al., *Cell-to-cell variability in the differentiation program of human megakaryocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1643**(1-3): p. 85-94.

24. Plo, I., et al., *Genetic Alterations of the Thrombopoietin/MPL/JAK2 Axis Impacting Megakaryopoiesis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 234.
25. Grozovsky, R., et al., *Regulating billions of blood platelets: glycans and beyond*. Blood, 2015. **126**(16): p. 1877-84.
26. van der Meijden, P.E.J. and J.W.M. Heemskerk, *Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives*. Nat Rev Cardiol, 2019. **16**(3): p. 166-179.
27. Grozovsky, R., et al., *The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling*. Nature Medicine, 2015. **21**(1): p. 47-54.
28. Bender, M., et al., *Microtubule sliding drives proplatelet elongation and is dependent on cytoplasmic dynein*. Blood, 2015. **125**(5): p. 860-868.
29. Grozovsky, R., et al., *Novel mechanisms of platelet clearance and thrombopoietin regulation*. Current Opinion in Hematology, 2015. **22**(5): p. 445-451.
30. Joshi, S. and S.W. Whiteheart, *The nuts and bolts of the platelet release reaction*. Platelets, 2017. **28**(2): p. 129-137.
31. Patrono, C., et al., *Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition)*. Chest, 2008. **133**(6 Suppl): p. 199S-233S.
32. Xu, Y., et al., *Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(2): p. H692-9.
33. Kohler, D., et al., *Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein prevents platelet-neutrophil complex formation and dampens myocardial ischemia-reperfusion injury*. Circulation, 2011. **123**(22): p. 2579-90.
34. Liu, Y., et al., *Novel Role of Platelets in Mediating Inflammatory Responses and Ventricular Rupture or Remodeling Following Myocardial Infarction*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2011. **31**(4): p. 834-U260.
35. Fu, W.W., et al., *Myocardial infarction induces bone marrow megakaryocyte proliferation, maturation and platelet production*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019. **510**(3): p. 456-461.
36. Franco, A.T., A. Corken, and J. Ware, *Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer*. Blood, 2015. **126**(5): p. 582-588.
37. Anderson, J.L. and D.A. Morrow, *Acute Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2017. **376**(21): p. 2053-2064.

38. Gao, X.M., et al., *Splenic release of platelets contributes to increased circulating platelet size and inflammation after myocardial infarction*. European Heart Journal, 2016. **37**: p. 520-521.
39. Nieswandt, B., C. Kleinschnitz, and G. Stoll, *Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease?* J Physiol, 2011. **589**(17): p. 4115-23.
40. 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. 1533-1537.
41. Hawkins, H.K., et al., *Acute inflammatory reaction after myocardial ischemic injury and reperfusion - Development and use of a neutrophil-specific antibody*. American Journal of Pathology, 1996. **148**(6): p. 1957-1969.
42. Huo, Y.Q., et al., *Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E*. Nature Medicine, 2003. **9**(1): p. 61-67.
43. Boilard, E., et al., *Platelets Amplify Inflammation in Arthritis via Collagen-Dependent Microparticle Production*. Science, 2010. **327**(5965): p. 580-583.
44. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
45. de Jong, J.S. and L.R. Dekker, *Platelets and cardiac arrhythmia*. Front Physiol, 2010. **1**: p. 166.
46. Pierce, G.F., et al., *Platelet-Derived Growth-Factor and Transforming Growth Factor-Beta Enhance Tissue-Repair Activities by Unique Mechanisms*. Journal of Cell Biology, 1989. **109**(1): p. 429-440.
47. Travers, J.G., et al., *Cardiac Fibrosis The Fibroblast Awakens*. Circulation Research, 2016. **118**(6): p. 1021-1040.
48. Jackson, S.R. and J.M. Carter, *Platelet Volume - Laboratory Measurement and Clinical-Application*. Blood Reviews, 1993. **7**(2): p. 104-113.
49. Chamberlain, K.G., M. Tong, and D.G. Penington, *Properties of the Exchangeable Splenic Platelets Released into the Circulation during Exercise-Induced Thrombocytosis*. American Journal of Hematology, 1990. **34**(3): p. 161-168.
50. Quach, M.E., W. Chen, and R. Li, *Mechanisms of platelet clearance and translation to improve platelet storage*. Blood, 2018. **131**(14): p. 1512-1521.

51. Cohen, J.A. and C.H. Leeksa, *Determination of the life span of human blood platelets using labelled diisopropylfluorophosphate*. J Clin Invest, 1956. **35**(9): p. 964-9.
52. Odell, T.T., Jr. and D.T. Mc, *Life span of mouse blood platelets*. Proc Soc Exp Biol Med, 1961. **106**: p. 107-8.
53. Pleines, I., et al., *Extended Platelet In Vivo Survival Results in Exhausted Platelets*. Blood, 2015. **126**(23).
54. Stratton, J.R., et al., *Platelet Destruction in Autoimmune Thrombocytopenic Purpura - Kinetics and Clearance of Indium-111-Labeled Autologous Platelets*. Journal of Nuclear Medicine, 1989. **30**(5): p. 629-637.
55. Elvevold, K., et al., *Liver Sinusoidal Endothelial Cells Depend on Mannose Receptor-Mediated Recruitment of Lysosomal Enzymes for Normal Degradation Capacity*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 2007-2015.
56. Male, R., et al., *Organ distributions of liposome-loaded rat platelets*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **195**(1): p. 276-81.
57. McArthur, K., S. Chappaz, and B.T. Kile, *Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage*. Blood, 2018. **131**(6): p. 605-610.
58. Kodama, T., et al., *BH3-only activator proteins Bid and Bim are dispensable for Bak/Bax-dependent thrombocyte apoptosis induced by Bcl-xL deficiency: molecular requisites for the mitochondrial pathway to apoptosis in platelets*. J Biol Chem, 2011. **286**(16): p. 13905-13.
59. Zhang, H., et al., *Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival*. Cell Death Differ, 2007. **14**(5): p. 943-51.
60. Park, S.Y., et al., *Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor*. Cell Death and Differentiation, 2008. **15**(1): p. 192-201.
61. Simon, D.I., et al., *Platelet glycoprotein Ib alpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. Journal of Experimental Medicine, 2000. **192**(2): p. 193-204.
62. Grewal, P.K., et al., *The Ashwell-Morell Receptor Mitigates the Lethal Coagulopathy of Sepsis*. Glycobiology, 2008. **18**(11): p. 952-952.
63. McMillan, R., *The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura*. Seminars in Hematology, 2007. **44**(4): p. S3-S11.

64. Grewal, P.K., *The Ashwell-Morell Receptor*. Methods in Enzymology, Vol 479: Functional Glycomics, 2010. **479**: p. 223-241.
65. Morell, A.G., et al., *The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation*. J Biol Chem, 1971. **246**(5): p. 1461-7.
66. Paietta, E., R.J. Stockert, and J. Racevskis, *Alternatively Spliced Variants of the Human Hepatic Asialoglycoprotein Receptor, H2, Differ in Cellular Trafficking and Regulation of Phosphorylation*. Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**(16): p. 11078-11084.
67. Drickamer, K., et al., *Primary Structure of the Rat-Liver Asialoglycoprotein Receptor - Structural Evidence for Multiple Polypeptide Species*. Journal of Biological Chemistry, 1984. **259**(2): p. 770-778.
68. Monroe, R.S. and B.E. Huber, *The Major Form of the Murine Asialoglycoprotein Receptor - Cdna Sequence and Expression in Liver, Testis and Epididymis*. Gene, 1994. **148**(2): p. 237-244.
69. Bider, M.D., et al., *High-Affinity Ligand-Binding to Subunit H1 of the Asialoglycoprotein Receptor in the Absence of Subunit H2*. European Journal of Biochemistry, 1995. **230**(1): p. 207-212.
70. Loeb, J.A. and K. Drickamer, *The Chicken Receptor for Endocytosis of Glycoproteins Contains a Cluster of N-Acetylglucosamine-Binding Sites*. Journal of Biological Chemistry, 1987. **262**(7): p. 3022-3029.
71. Grewal, P.K., *The Ashwell-Morell receptor*. Methods Enzymol, 2010. **479**: p. 223-41.
72. Ashwell, G. and J. Harford, *Carbohydrate-Specific Receptors of the Liver*. Annual Review of Biochemistry, 1982. **51**: p. 531-554.
73. Rumjantseva, V., et al., *Dual roles for hepatic lectin receptors in the clearance of chilled platelets*. Nature Medicine, 2009. **15**(11): p. 1273-U68.
74. Grewal, P.K., et al., *The Ashwell receptor mitigates the lethal coagulopathy of sepsis*. Nature Medicine, 2008. **14**(6): p. 648-655.
75. Grewal, P.K., et al., *Inducing host protection in pneumococcal sepsis by preactivation of the Ashwell-Morell receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(50): p. 20218-20223.
76. Grozovsky, R., et al., *The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling*. Nat Med, 2015. **21**(1): p. 47-54.

77. Eulendorf, R., et al., *Interleukin-6 signalling: More than Jaks and STATs*. European Journal of Cell Biology, 2012. **91**(6-7): p. 486-495.
78. Rumjantseva, V. and K.M. Hoffmeister, *Novel and unexpected clearance mechanisms for cold platelets*. Transfusion and Apheresis Science, 2010. **42**(1): p. 63-70.
79. Qian, S.G., et al., *Primary role of the liver in thrombopoietin production shown by tissue-specific knockout*. Blood, 1998. **92**(6): p. 2189-2191.
80. Sungaran, R., B. Markovic, and B.H. Chong, *Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization*. Blood, 1997. **89**(1): p. 101-107.
81. McCarty, J.M., et al., *Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count*. Blood, 1995. **86**(10): p. 3668-75.
82. Wang, J.C., et al., *Blood thrombopoietin levels in clonal thrombocytosis and reactive thrombocytosis*. American Journal of Medicine, 1998. **104**(5): p. 451-455.
83. Gwechenberger, M., et al., *Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions*. Circulation, 1999. **99**(4): p. 546-551.
84. Mihara, M., et al., *IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions*. Clinical Science, 2012. **122**(3-4): p. 143-159.
85. Kishimoto, T., *IL-6: from its discovery to clinical applications*. International Immunology, 2010. **22**(5): p. 347-352.
86. Hoffmeister, K.M. and H. Falet, *Platelet clearance by the hepatic Ashwell-Morrell receptor: mechanisms and biological significance*. Thrombosis Research, 2016. **141**: p. S68-S72.
87. Schmidt-Arras, D. and S. Rose-John, *IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy*. Journal of Hepatology, 2016. **64**(6): p. 1403-1415.
88. Kishimoto, T., *Interleukin-6: From basic science to medicine - 40 years in immunology*. Annual Review of Immunology, 2005. **23**: p. 1-21.
89. Wolber, E.M. and W. Jelkmann, *Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep3B*. Journal of Interferon and Cytokine Research, 2000. **20**(5): p. 499-506.
90. Hitchcock, I.S. and K. Kaushansky, *Thrombopoietin from beginning to end*. Br J Haematol, 2014. **165**(2): p. 259-68.

91. Rawlings, J.S., K.M. Rosler, and D.A. Harrison, *The JAK/STAT signaling pathway*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(8): p. 1281-1283.
92. Aittomaki, S. and M. Pesu, *Therapeutic Targeting of the JAK/STAT Pathway*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2014. **114**(1): p. 18-23.
93. Bousoik, E. and H.M. Aliabadi, "*Do We Know Jack*" About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. Frontiers in Oncology, 2018. **8**.
94. Harrison, D.A., *The JAK/STAT Pathway*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2012. **4**(3).
95. Liu, L., K.M. McBride, and N.C. Reich, *STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha 3*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(23): p. 8150-8155.
96. Zhang, X., et al., *Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(10): p. 7138-46.
97. Ivanov, V.N., et al., *Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription*. Mol Cell, 2001. **7**(3): p. 517-28.
98. Yang, J., et al., *Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation*. Cancer Res, 2005. **65**(3): p. 939-47.
99. Kaushansky, K., *The molecular mechanisms that control thrombopoiesis*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(12): p. 3339-3347.
100. Cohen-Solal, K., et al., *Constitutive expression of Mpl ligand transcripts during thrombocytopenia or thrombocytosis*. Blood, 1996. **88**(7): p. 2578-84.
101. Stoffel, R., A. Wiestner, and R.C. Skoda, *Thrombopoietin in thrombocytopenic mice: Evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets*. Blood, 1996. **87**(2): p. 567-573.
102. Foster, D.C., et al., *Human Thrombopoietin - Gene Structure, Cdna Sequence, Expression, and Chromosomal Localization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(26): p. 13023-13027.
103. Desauvage, F.J., et al., *Stimulation of Megakaryocytopoiesis and Thrombopoiesis by the C-Mpl Ligand*. Nature, 1994. **369**(6481): p. 533-538.
104. Bartley, T.D., et al., *Identification and Cloning of a Megakaryocyte Growth and Development Factor That Is a Ligand for the Cytokine Receptor Mpl*. Cell, 1994. **77**(7): p. 1117-1124.

105. Kuter, D.J., D.L. Beeler, and R.D. Rosenberg, *The Purification of Megapoietin - a Physiological Regulator of Megakaryocyte Growth and Platelet Production*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(23): p. 11104-11108.
106. Drachman, J.G., J.D. Griffin, and K. Kaushansky, *The C-Mpl Ligand (Thrombopoietin) Stimulates Tyrosine Phosphorylation of Jak2, Shc, and C-Mpl*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(10): p. 4979-4982.
107. Lannutti, B.J., et al., *Incomplete restoration of Mpl expression in the mpl(-/-) mouse produces partial correction of the stem cell-repopulating defect and paradoxical thrombocytosis*. Blood, 2009. **113**(8): p. 1778-1785.
108. Kuter, D.J., *The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists*. International Journal of Hematology, 2013. **98**(1): p. 10-23.
109. Murone, M.M., D.A. Carpenter, and F.J. de Sauvage, *Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice*. Stem Cells, 1998. **16**(1): p. 1-6.
110. Li, J.Z., Y.P. Xia, and D.J. Kuter, *Interaction of thrombopoietin with the platelet c-mpl receptor in plasma: binding, internalization, stability and pharmacokinetics*. British Journal of Haematology, 1999. **106**(2): p. 345-356.
111. Kuter, D.J. and R.D. Rosenberg, *The Reciprocal Relationship of Thrombopoietin (C-Mpl Ligand) to Changes in the Platelet Mass during Busulfan-Induced Thrombocytopenia in the Rabbit*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2720-2730.
112. Bender, M., et al., *DynAMIn 2-dependent endocytosis is required for normal megakaryocyte development in mice*. Blood, 2015. **125**(6): p. 1014-1024.
113. Staerk, J., et al., *An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor*. Blood, 2006. **107**(5): p. 1864-1871.
114. Qian, H., et al., *Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(6): p. 671-684.
115. Drachman, J.G., P. Rojnuckarin, and K. Kaushansky, *Thrombopoietin signal transduction: Studies from cell lines and primary cells*. Methods, 1999. **17**(3): p. 238-249.
116. Staerk, J., et al., *Orientation-specific signalling by thrombopoietin receptor dimers*. Embo Journal, 2011. **30**(21): p. 4398-4413.
117. Deppermann, C., et al., *Macrophage galactose lectin is critical for Kupffer cells to clear aged platelets*. J Exp Med, 2020. **217**(4).

118. Besancenot, R., et al., *A Senescence-Like Cell-Cycle Arrest Occurs During Megakaryocytic Maturation: Implications for Physiological and Pathological Megakaryocytic Proliferation*. Plos Biology, 2010. **8**(9).
119. Gurney, A.L., et al., *Thrombocytopenia in C-Mpl-Deficient Mice*. Science, 1994. **265**(5177): p. 1445-1447.
120. 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.
121. Ihara, K., et al., *Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(6): p. 3132-3136.
122. Ballmaier, M., et al., *c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia*. Blood, 2001. **97**(1): p. 139-146.
123. Plo, I., et al., *Genetic Alterations of the Thrombopoietin/MPL/JAK2 Axis Impacting Megakaryopoiesis*. Frontiers in Endocrinology, 2017. **8**.
124. Zuo, S.M., et al., *Establishment of a novel mesenchymal stem cell-based regimen for chronic myeloid leukemia differentiation therapy*. Cell Death & Disease, 2021. **12**(2).
125. Landrette, S.F., et al., *The transcription factor PlagL2 activates Mpl transcription and signaling in hematopoietic progenitor and leukemia cells*. Leukemia, 2011. **25**(4): p. 655-662.
126. Wicke, D.C., et al., *Gene therapy of MPL deficiency: challenging balance between leukemia and pancytopenia*. Mol Ther, 2010. **18**(2): p. 343-52.
127. Jiang, Y.Z., et al., *Kupffer cell receptor CLEC4F is important for the destruction of desialylated platelets in mice*. Cell Death and Differentiation, 2021. **28**(11): p. 3009-3021.
128. Reusswig, F., et al., *Efficiently Restored Thrombopoietin Production by Ashwell-Morell Receptor and IL-6R Induced Janus Kinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription Signaling Early After Partial Hepatectomy*. Hepatology, 2021. **74**(1): p. 411-427.
129. Burmester, H., et al., *Thrombopoietin production in wild-type and interleukin-6 knockout mice with acute inflammation*. Journal of Interferon and Cytokine Research, 2005. **25**(7): p. 407-413.

130. Kaser, A., et al., *Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2720-2725.
131. Adamzik, M., et al., *Whole blood impedance aggregometry as a biomarker for the diagnosis and prognosis of severe sepsis*. Critical Care, 2012. **16**(5).
132. Empana, J.P., et al., *C-Reactive Protein, Interleukin 6, Fibrinogen and Risk of Sudden Death in European Middle-Aged Men: The PRIME Study*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2010. **30**(10): p. 2047-2052.
133. Schaper, F. and S. Rose-John, *Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2015. **26**(5): p. 475-487.
134. Bath, P.M.W., et al., *Megakaryocyte DNA Content Is Increased in Patients with Coronary-Artery Atherosclerosis*. Cardiovascular Research, 1994. **28**(9): p. 1348-1352.
135. Trowbridge, E.A., et al., *Platelet Production in Myocardial-Infarction and Sudden Cardiac Death*. Thrombosis and Haemostasis, 1984. **52**(2): p. 167-171.
136. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Does size matter in platelet production?* Blood, 2012. **120**(8): p. 1552-1561.
137. Machlus, K.R. and J.E. Italiano, *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation*. Journal of Cell Biology, 2013. **201**(6): p. 785-796.[3]
138. Kral, J.B., et al., *Platelet Interaction with Innate Immune Cells*. Transfus Med Hemother, 2016. **43**(2): p. 78-88.
139. Kaser, A., et al., *Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2720-5.
140. Reusswig, F., et al., *Only Acute but Not Chronic Thrombocytopenia Protects Mice against Left Ventricular Dysfunction after Acute Myocardial Infarction*. Cells, 2022. **11**(21).
141. Groot, H. E., et al. *Plasma interleukin 6 levels are associated with cardiac -function after ST-elevation myocardial infarction*. Clin Res Cardiol **108**(6): 612-621.
142. Arauna, D., et al. *Platelet Content from Acute Myocardial Infarction Patients: Elevated Levels of IL-6 and IL-8 and their impact on Endothelial Nitric Oxide Production*. Atherosclerosis **403**: 119119.

## **Danksagungen**

An dieser Stelle möchte ich Frau Prof. Dr. Margitta Elvers meinen aufrichtigen Dank aussprechen - für die Vergabe dieses spannenden Dissertationsthemas, ihre fachkundige, stets wertschätzende Betreuung sowie ihre wertvollen Anregungen und Hilfestellungen bei aufkommenden Herausforderungen. Ihre Diskussionsbereitschaft und kontinuierliche Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt zudem Frau Prof. Dr. Martina Krüger, die sich freundlicherweise bereit erklärt hat, als Zweitgutachterin meiner Dissertation zu fungieren.

Ein ebenso herzliches Dankeschön richte ich an die Mitglieder der Arbeitsgruppe - Dr. Meike Klier, Dr. Friedrich Reusswig, Dr. Evelyn Krüger, Frau Agnes Bosbach, Herr Tobias Feige, Frau Lena Hollmann sowie die technische Assistentin Frau Martina Spelleken - für die hervorragende Unterstützung und die stets angenehme sowie kollegiale Arbeitsatmosphäre im Labor. Mein Dank gilt ebenso allen weiteren Kolleginnen und Kollegen, die mich auf diesem Weg begleitet haben.

Darüber hinaus danke ich dem Sonderforschungsbereich 1116 (SFB 1116) „Master Switches bei kardialer Ischämie“ für die Vergabe eines Stipendiums und die finanzielle Unterstützung meiner experimentell ausgerichteten Dissertation.

Schließlich gilt mein tief empfundener Dank meiner Familie, die mich in jeder Phase meines Werdegangs mit Rat, Tat und unerschütterlicher Zuversicht begleitet hat. Ihre beständige Unterstützung und Ermutigung waren eine unschätzbare Quelle der Motivation.