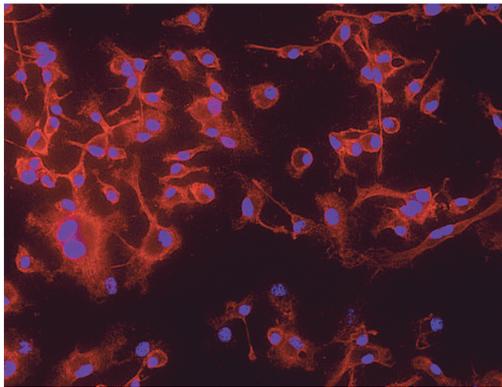


Jenine Hang-Ni Nguyen

Die Rolle des NF- κ B-Signalwegs bei der
Aktivierung muriner Makrophagen durch
das N-terminale Fragment des kardialen
Myosin-bindenden Proteins C (C0C1f)



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFBENGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Die Rolle des NF- κ B-Signalwegs bei der Aktivierung muriner
Makrophagen durch das N-terminale Fragment des kardialen
Myosin-bindenden Proteins C (C0C1f)**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Jenine Hang-Ni Nguyen

aus Berlin

Gießen 2020

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Abt. experimentelle Kardiologie
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. C.W. Hamm

Gutachter: PD Dr. C. Troidl

Gutachter: Prof. Dr. Kracht

Tag der Disputation: 27. August 2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Myokardinfarkt	1
1.2	Makrophagen und ihre Rolle im angeborenen Immunsystem.....	3
1.3	Makrophagen und ihre Rolle beim Myokardinfarkt.....	3
1.4	NF- κ B Signalweg	7
1.5	Inflammation vermittelnde Rezeptoren beim Myokardinfarkt.....	10
1.6	Das kardiale Myosin-Bindende Protein C (cMyBP-C).....	10
1.7	Auswirkung von cMyBP-C auf die Immunantwort.....	15
2	Fragestellung.....	16
3	Materialien und Methoden	17
3.1	Materialien	17
3.2	Geräte	18
3.3	Zellkultur Mediumkomponenten.....	19
3.4	Antikörper und Primer.....	19
3.5	Inhibitoren	19
3.6	Primersequenzen für die quantitative Real-Time-PCR.....	19
3.7	Chemikalien und Reagenzien	20
3.8	Software.....	21
3.9	Kits.....	21
3.10	Angesetzte Lösungen.....	22
3.11	Methoden.....	24
3.12	Statistische Analyse	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Aktivierung von Makrophagen durch C0C1f in vitro	39
4.2	qRT-PCR mit verschiedenen C0C1f Konzentrationen.....	39
4.3	Zeitlicher Verlauf der durch C0C1f stimulierten murinen Makrophagen für inflammatorische Zielgene mittels qRT-PCR	42
4.4	qRT-PCR Analyse der Zytokin- und Chemokinexpression muriner Makrophagen nach C0C1f Behandlungen für 3h und 6h	45

4.5	Proteinnachweis im Western Blot nach Stimulation mit C0C1f.....	50
4.6	C0C1f induziert die Immunantwort über den NF-κB-Signalweg	53
5	Diskussion.....	70
5.1	Die Wahl des Zellmodells	70
5.2	C0C1f und seine physiologisch relevanten Konzentrationen im Blut	72
5.3	Die Auswirkungen des abgespaltenen N-terminalen Fragmentes C0C1f.....	73
5.4	Der NF-κB Signalweg.....	74
6	Fazit und Ausblick.....	78
7	Zusammenfassung	79
8	Summary	80
9	Abkürzungsverzeichnis.....	81
10	Literaturverzeichnis	84
11	Veröffentlichung	97
12	Erklärung zur Dissertation	98
13	Danksagung	99

1 Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt zählt trotz zunehmend weiterentwickelten Therapiemöglichkeiten zu den häufigsten Todesursachen in den Industriestaaten^{21,32}. Auch wenn die Sterblichkeitsrate vom akuten Myokardinfarkt rückläufig ist, bleibt nach stattgefundenen Infarkt die Morbidität und Mortalität hoch^{21,28}. Zurzeit liegt die Überlebensrate eines akuten Myokardinfarkts bei etwa 90%, wobei laut einer Studie ein weiterer Infarkt bei 54% der bereits betroffenen Patienten innerhalb des ersten Jahres auftrat⁴⁰. Als Ursache geht man vor allem von Atherosklerose, einer inflammatorischen Erkrankung, aus, die durch endotheliale Läsionen, oxidativen Stress und Lipidablagerungen gefördert wird, was wiederum zur Entstehung von Plaques und Thromben führt³³. Werden diese in Koronargefäßen gebildet, kommt es zu einer Volumenverengung oder gar zur Ruptur des Plaques⁵⁵. Dies mündet in einen erniedrigten Blutdurchfluss und einer herabgesetzten Sauerstoffversorgung im betroffenen Myokardareal⁵⁵. Ein Plaque ist genauer genommen eine asymmetrische Wandverdickung der Intima⁵⁵. Diese besteht aus Lipidtröpfchen, Makrophagen und T-Zellen im Zentrum, das von glatten Muskelzellen und einer Kollagenmatrix zum Gefäßlumen hin begrenzt wird⁵⁵. Makrophagen, die sich durch Aufnahme von rezeptorvermittelten oxidiertem LDL zu Schaumzellen entwickeln, werden somit zum zentralen Bestandteil des sogenannten Atheroms¹¹⁹. Reißt die umhüllende Schicht davon ein, kommt es zu einer Plaqueruptur⁵⁵. Zu 76 % ist eine Plaqueruptur für fatale kardiovaskuläre Ereignisse verantwortlich¹¹³.

Aufgrund der durch den Infarkt ausgelösten Ischämie kommt es zu Zellnekrosen und Apoptose der Kardiomyozyten^{28,29}. Dabei werden intrazelluläre Kompartimente freigesetzt, die zur inflammatorischen Aktivierung des Immunsystems führen²⁸. Infolge dessen durchläuft die kardiale Muskulatur mittels eingewanderter Leukozyten einen Umbauprozess, der sowohl im nekrotischen als auch im anliegenden gesunden Gewebe stattfindet^{28,29}. Makrophagen spielen hierbei eine entscheidende Rolle, welche die inflammatorische Antwort nach einem Myokardinfarkt modulieren⁸¹. Es konnte festgestellt werden, dass die Injektion von humanen aktivierten Makrophagen nach Myokardinfarkt bei Rattenmodellen für eine bessere Myokardheilung, ein geringes

Ausmaß am sogenannten „Ventrikel-Remodelling“ und eine Aufrechterhaltung der linksventrikulären Funktion sorgt⁸³.

Den Myokardheilungsprozess kann man in drei Phasen unterteilen: (i) die Inflammationsphase, in der Zytokine und Chemokine ausgeschüttet werden, wodurch Makrophagen und neutrophile Granulozyten einwandern und das geschädigte Gewebe von Zelltrümmern säubern; (ii) die Proliferationsphase, in der die inflammatorischen Faktoren gedämpft werden und aktivierte Myofibroblasten und Endothelzellen extrazelluläre Matrixproteine bilden; (iii) die Narbenbildungsphase, in der die Fibroblasten und Gefäßzellen in die Apoptose übergehen und hauptsächlich aus Kollagen eine Narbe bilden²⁵. Der Heilungsprozess des entstandenen Ischämieareals resultiert aus der komplexen Immunantwort, die in ihrem Prozess im „Ventrikel-Remodelling“ mündet⁶⁷. Dies führt zu Veränderung des Ventrikelvolumens, seiner Form und Funktion mit einer oftmals schlechten Prognose⁶⁷. Das defizitäre Remodelling nach einem Myokardinfarkt mag auf kurze Sicht und nach dem plötzlichen Verlust der kontraktilen Funktion ein guter Kompensationsmechanismus sein²⁵, doch nach geraumer Zeit weisen viele Patienten eine Ausdünnung der myokardialen Muskulatur und eine Expansion der Infarktzone auf³⁵. Dies kann zu Kardiomyopathien und Herzrhythmusstörungen führen¹²⁸. Die effektivste Therapie, um diesen Konsequenzen vorzubeugen, ist die schnellstmögliche Herstellung einer Reperfusion zur Wiederherstellung der Blut- und Sauerstoffversorgung¹⁵³. Das Mittel der Wahl dafür ist die perkutane Koronarintervention, die leitliniengemäß innerhalb von zwölf Stunden (optimaler Weise 30 bis 90 Minuten nach Myokardinfarkt) durchgeführt werden sollte¹⁵³. Gleichzeitig kommt es jedoch zu einem durch eine schnelle Reperfusion hervorgerufenen Kardiomyozytenuntergang⁵⁷. Weitere Folgen sind reperfusion-induzierte Arrhythmien⁵⁹, mikrovaskuläre Obstruktion⁷⁵, die unter anderem zu einer vermehrten Myokardinfarktgröße führen¹⁴⁵, und kontraktile Dysfunktion⁷⁴. Dem gegenüber steht die Beschleunigung und Zunahme der Inflammationsantwort unter Reperfusion⁸¹. Paradoxerweise sorgt die Inflammation für eine bessere Gewebsreparatur⁸¹. Denn unter Inhibition der inflammatorischen Komponente wurde ein drastischer Mortalitätsanstieg als Folge von Ruptur des linken Ventrikels beobachtet⁵⁴.

Eine suffiziente Therapie steht, um Reperfusionsschäden zu verhindern, zurzeit noch aus⁵⁷. Es gibt allerdings Überlegungsansätze, durch eine Inhibition des Monozyten

aktivierenden Faktors „monocyte chemotactic protein“ (MCP-1) dem entgegen zu wirken⁶⁹. Die Annahme resultiert aus der Beobachtung, dass in Rattenmodellen Reperfusionsschäden unter anderem der frühen Rekrutierung von Monozyten und frühen Präsenz von MCP-1 zugeschrieben wurden⁶⁹.

1.2 Makrophagen und ihre Rolle im angeborenen Immunsystem

Makrophagen zählen zu den Hauptzellen des angeborenen/nativen Immunsystems, das im Körper fremde Mikroorganismen schnell und effektiv erkennt, um diese zu beseitigen²¹. Deshalb sind Makrophagen ebenfalls im gesunden „Steady State“-Zustand zahlreich vorhanden²¹. Elie Mitchnikoff beobachtete die Aufnahme von pathogenen Faktoren über Makrophagen und neutrophile Granulozyten bei Inflammation und entwickelte dadurch die Theorie der Immunität durch Phagozytose⁴¹. Im Jahre 1968 zeigten van Furth und Cohn, dass die meisten Makrophagen sich aus im Blut zirkulierenden Monozyten differenzieren¹³⁸. Darauf aufbauend erweiterten sie ihre Theorie um das „Mononuclear phagocyte system“ (MPS), in dem sich Knochenmarksvorläuferzellen in Monozyten differenzieren, von denen wiederum die Gewebemakrophagen abstammen¹³⁷.

1.3 Makrophagen und ihre Rolle beim Myokardinfarkt

Innerhalb der ersten ein bis zwei Wochen nach stattgefundenem Myokardinfarkt spielen aus Milz und Knochenmark eingewanderte Monozyten eine zentrale Rolle^{16,21,32}. Sie sind verantwortlich für die Reparatur und Vernarbung des ischämischen Gewebes²¹. Es konnte im Allgemeinen an Tiermodellen beobachtet werden, dass Monozyten aus Myeloidvorläuferzellen aus primär lymphatischen Organen hervorgehen, wie der fetalen Leber und dem Knochenmark, wobei die Entwicklung und das Überleben von Monozyten in Mäusen komplett abhängig von „Macrophage colony-stimulation factor“ (M-CSF) sind³⁹. Fehlt der Rezeptor für den Wachstumsfaktor, unterliegen die betroffenen Mäuse einer Monozytopenie^{12,17,39}. Besonders nach Myokardinfarkten innerhalb der ersten Tage, in denen Reperfusion einsetzt, konnte man eine Hochregulation von M-CSF beobachten¹⁹. Bereits ein bis drei Stunden nach Reperfusion konnte man das vermutlich von der Monozyten-Makrophagen-Zellpopulation selbst gebildete M-CSF mit einem Gipfel auf mRNA-Ebene bei 24 Stunden nachweisen²⁶. Behandlungen mit dem „Macrophage colony-stimulating factor“

nach Myokardinfarkten in Tiermodellen zeigte eine vermehrte Markophageninfiltration, was wiederum zu einer schnelleren Infarktrepaur führte^{111,149}.

Ein Mangel an Monozyten führt zu verstärkter Thrombenbildung im kardiovaskulären System³¹. Eine weitere Folge stellt eine herabgesetzte Bereiniung von Zelltrümmern dar, welche nach vier Wochen noch vorhanden sind und zu verminderter Gewebseuerung führt¹³³. Dies wiederum führt zu einer erhöhten Mortalität, begleitet von Wandausdünnung und Ventrikeldilatation¹³³. Etwa zwei bis drei Wochen nach Myokardinfarkt, in denen sich der linke Ventrikel in Form und Funktion verändert, findet man kaum Monozyten/Makrophagen im betroffenen Gewebe; stattdessen reift Granulationsgewebe zur Gewebnarbe³¹. Die Balance und das Zusammenspiel zwischen inflammatorischer Zelltrümmerbeseitigung und antiinflammatorischem Reparaturmechanismus über Monozyten nach Myokardinfarkt spielt dabei eine entscheidende Rolle^{22,30}.

1.3.1 Klassifikation von Monozyten/Makrophagen

Während die Mehrzahl an Makrophagen von lokalen Vorläuferzellen im „Steady State“ abstammt, ändert sich die Makrophagenquelle bei Gewebsentzündung. Die meisten inflammatorischen Monozyten (Ly6C^{high} bei Mäusen und CD14⁺ bei Menschen) kommen aus dem Blut; ursprünglich entspringen sie aus hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark³².

Die im Blut zirkulierenden humanen Monozyten wurden bisher hauptsächlich in drei Subpopulationen unterteilt: (i) die klassischen CD14⁺⁺CD16⁻, (ii) die ebenfalls proinflammatorischen intermediären CD14⁺⁺CD16⁺ und (iii) die antiinflammatorischen CD14⁺CD16⁺⁺ Monozyten, während es bei Mäusen die Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyteneinteilung gibt, die trotz einiger Unterschiede mit den humanen vergleichbar sind^{37,126}. Die CD14⁺⁺ CD16⁻ und Ly6C^{hi} Monozyten gehören zu den „klassischen Monozyten“, die vermehrt bei Inflammation vorkommen und als Vorläufer von peripheren mononuklearen Phagozyten dienen¹⁵⁴. Es wird angenommen, dass die Aufgabe der Ly6C^{low} im „Steady State“, die wahrscheinlich aus Ly6C^{hi} Monozyten hervorgehen, hauptsächlich darin besteht, die luminale Endothelschicht auf Schäden zu kontrollieren und zu überwachen¹¹. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Überlebenszeiten: Während die inflammatorisch wirksamen Monozyten eine Halbwertszeit von zwanzig Stunden haben, beträgt die der Ly6C^{low} bzw. CD14⁺CD16⁺⁺

Zellen fünf Tage³⁹. Des Weiteren existiert die spezifische Einteilung der ausdifferenzierten Monozyten in 2 Typen, die M1-Makrophagen, die einen proinflammatorischen Phänotyp aufweisen, und die M2-Makrophagen, die eine antiinflammatorische Wirkung besitzen³³. Die genaue Abstammung von Ly6C^{high} und Ly6C^{low} Monozyten im Zusammenhang mit M1- und M2-Makrophagen ist noch unklar³². Man vermutet, dass innerhalb der ersten Tage nach Myokardinfarkt inflammatorische Ly6C^{high} Monozyten M1-Makrophagen hervorbringen³². Kommt es wie bei einem Myokardinfarkt zum Verschluss einer Koronararterie, resultiert daraus eine Ischämie mit Untergang von Zellen als Folge, was wiederum zu einer Inflammation führt und Ly6C^{high} Monozyten rekrutiert³². Es konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass Monozyten schon fünf bis dreißig Minuten nach einem Gefäßverschluss vor Ort sind⁶⁸. Die zahlreichen Monozyten werden zunächst aus der Zirkulation im Blut und nach fünfzehn bis dreißig Minuten aus der Milz rekrutiert⁶⁸. Über das Profil von Chemokinexpressionen scheint das kardial ischämische Gewebe die Einwanderung von Ly6C^{high} Monozyten zu regulieren, die in der ersten Phase für Phagozytose und Proteolyse abgestorbener Zelltrümmer zuständig sind¹⁰⁵. Außerdem wurde über denselben Mechanismus die Rekrutierung von Ly6C^{low} Monozyten festgestellt, die die Gewebsreparatur über Myofibroblastenakkumulation, Angiogenese und Kollagenablagerung herbeiführen¹⁰⁵. Unter anderem ist auch MCP-1 für die Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten verantwortlich^{20,89}.

Vergleichbar mit dem Infarktmodell in Mäusen kommt es ebenso im humanen kardialen Gewebe zur Einwanderung von CD14⁺16⁻ Monozyten, die in der inflammatorischen Phase nach Myokardinfarkt akkumulieren¹³⁴. CD14⁺16⁺ Monozyten wiederum konnten vor allen in der postmyokardialen Zeit während der Proliferationsphase detektiert werden¹³⁴.

1.3.2 Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten über

Inflammediatoren

Die Rekrutierung der zwei Monozytentypen scheint über verschiedene Aktivierungsstoffe zu laufen: In den ersten vier Tagen nach Myokardinfarkt fand man die klassische (inflammatorische) Aktivierung von Monozyten über Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF α)¹³¹. TNF α leitet über die Aktivierung des NF- κ B Signalweges die inflammatorische Immunantwort nach Myokardinfarkt ein⁹². Eine Überexpression von TNF α hat bei Mäusen zu Herzversagen geführt⁸, während bei TNF α Rezeptor knock-out Mäusen nach Myokardinfarkt vermehrt Apoptosen beobachtet werden können und auch die Infarktgröße zunimmt, was eine ebenso kardioprotektive Funktion von TNF α impliziert⁷⁸. Es konnte beobachtet werden, dass die Produktion von IL-6 bei Inflammation primär in Monozyten⁵, bei kardialer Ischämie ebenfalls in erhöhter Menge in Kardiomyozyten stattfindet⁵¹. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt konnte dementsprechend eine erhöhte IL-6 Konzentration im Serum gemessen werden⁶⁴. Nach einem induzierten Myokardinfarkt in Tiermodellen, konnte man beobachten, dass in IL-6 knock-out Mäusen der Heilungsprozess im Vergleich zu Wildtypmäusen verzögert einsetzt, was vermuten lässt, dass IL-6 für die Gewebsreparatur von großer Bedeutung ist³⁴.

Ein weiterer Schlüsselmediator bei der inflammatorischen Immunantwort ist Interleukin-1 β (IL-1 β), das als inaktive Vorläuferform (pro-IL-1 β) exprimiert wird und bei bestimmten Signalen wie „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) oder „danger associated molecular patterns“ (DAMPs) in seine aktive Form übergeht und ausgeschüttet wird⁸⁷. DAMPs werden unter anderem nach Ischämiegeschehen von zugrunde gehenden Zellen freigesetzt⁸⁷.

Zusätzlich zu den Zytokinen vermutet man, dass Adhäsionsmoleküle, besonders „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM-1) und „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1), die Monozyten-Endothelzellen-Interaktion erleichtern⁷². Bei Patienten nach Myokardinfarkt konnte eine erhöhte VCAM-1 Expression in Endothelzellen von atherotischen Koronararterien gemessen werden¹⁰⁷. Zu den VCAM-1 exprimierenden Zellen zählen glatte Muskelzellen und Makrophagen^{107,116}.

Beide Adhäsionsmoleküle werden ebenfalls mit einer vermehrten Leukozytenakkumulation und damit auch Monozytenrekrutierung assoziiert¹⁰⁸.

In einem Kaninchenmodell konnte man im ischämischen und reperfundierten Zustand nach Myokardinfarkt eine erhöhte Expression an dem antiinflammatorischen Zytokin Interleukin-10 (IL-10) bei fünf Stunden und folgend nach Reperfusion auf mRNA- sowie Proteinebene nachweisen²⁷. Nach IL-10 Applikation bei Mausmodellen konnte eine signifikant erhöhte Reperfuionsverbesserung nach einer Arterienligatur festgestellt werden¹³². Insgesamt stellte man ohne das Einwirken von IL-10, welches die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-1 β und TNF α verringert, eine verstärkte inflammatorische Immunantwort fest^{25,27,148}. Daher könnte IL-10 in Zukunft als therapeutischer Ansatz bei kardiovaskulären Erkrankungen infrage kommen⁶⁵.

1.4 NF- κ B Signalweg

Den Transkriptionsfaktor „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells“(NF- κ B), der aus zwei Mitgliedern der Rel-Familie besteht und zu den DNA-Bindungsproteinen gehört, findet man in allen Zelltypen⁷⁰. Er kann durch zahlreiche Stimuli inklusive Zytokinen wie TNF α und IL-1 β , bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) sowie freien Radikalen aktiviert werden². Es gibt verschiedene Gene, die von NF- κ B reguliert werden wie beispielsweise inflammatorische Zytokinen wie TNF α und IL-1 β , Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 und Chemokine wie MCP-1⁸². Sie werden in zahlreichen stressinduzierten Situationen, die eine rasche Reprogrammierung der Genexpression benötigen, aktiviert^{4,70,82}. In nicht aktivierten Zellen liegt NF- κ B in seiner inaktiven Form, gebunden an seine inhibitorischen Untereinheit „Inhibitor of kappa B“ (I κ B), im Zytoplasma vor²⁵. Durch Phosphorylierung, Ubiquitinierung und proteolytische Degradation von I κ B kann NF- κ B in seine aktive Form übergehen²⁵. Diese gelangt durch Translokation in den Zellkern und bindet dort an Promotor- oder Enhancerregionen von Zielgenen, wodurch deren Gentranskription initiiert wird²⁵. Zur I κ B-Familie zählen verschiedene inhibitorische Proteine wie beispielsweise I κ B α , welches eine Großzahl der I κ B Familie in den meisten Zellen auszumachen und vor allem an die Untereinheit p65 zu beeinflussen scheint^{60,101,139}. Experimentelle Studien demonstrierten die NF- κ B-Aktivierung, vor allem über den kanonischen Signalweg, bei myokardialer Ischämie und Reperfusion^{13,14,77}. Die Inhibierung von NF- κ B mithilfe von Bindungselementen zur Verhinderung von inflammatorischen Genaktivierung in vivo reduzierte das Ausmaß

des Myokardinfarkts nach Reperfusion¹⁰³. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass ein Defekt in der NF- κ B-Aktivierung in Mäusen zu einer erhöhten Anfälligkeit von Gewebsschäden nach Koronararterienokklusion führt¹⁰⁰. NF- κ B nimmt damit einen hohen Stellenwert in der inflammatorischen Immunantwort nach Myokardinfarkt und ebenso eine kardioprotektive Funktion ein¹⁰³.

Der NF- κ B-Signalweg ist ein multikomplexes Zusammenspiel und soll hier nur kurz und vereinfacht erläutert werden. Bis heute sind vor allem zwei Signalwege bekannt, die zu einer NF- κ B-Aktivierung führen⁸². Beide Wege verfügen über eine aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzte Kinase von I κ B (IKK), die über Phosphorylierung von I κ B für die Induktion derselben verantwortlich ist⁸². Der sogenannte kanonische Signalweg (**Abb. 1**) wird hauptsächlich durch TNF α , IL-1, bakterielle Produkte wie LPS und die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren ausgelöst^{42,70}. Hier besteht der NF- κ B-Komplex aus RelA/p65 und p50, während sich der IKK Komplex aus den zwei Untereinheiten IKK α (IKK1) und IKK β (IKK2) und der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO) zusammensetzt^{123,151}. IKK β ist für die Phosphorylierung von I κ B zuständig und benötigt dafür IKK γ ^{123,151}. Die Aktivität der beiden Untereinheiten IKK α und IKK β hängt von ihrer Fähigkeit ab, über ihre Leuzinzipper-Motive zu dimerisieren^{42,98}. Sobald es zur Dimerisierung gekommen ist, können beide Untereinheiten über ein kurzes Motiv ihres C-Terminus an IKK γ binden^{63,96}. Wird dieses Motiv blockiert, findet keine Komplexaktivierung statt⁹⁶. Die Heterodimere werden über zwei IKK γ -Moleküle zusammengehalten und bilden gemeinsam den großen IKK-Komplex^{99,120}. IKK γ bindet zusätzlich über seinen C-Terminus an „Upstream“ Aktivatoren des NF- κ B-Signalweges⁴².

Beim alternativen Signalweg bilden RelB und p100, welche die Vorläuferform des aktiven p52 ist, den NF- κ B-Komplex, während der IKK-Komplex sich aus einem IKK α -Dimer zusammensetzt, der für die Prozessierung und damit verbundenen Aktivierung von der NF- κ B-Untereinheit p100 zuständig ist¹²⁴. Beide Untereinheiten p50 und p52 werden als lange Vorläuferproteine, p105 bzw. p100 synthetisiert und sind in ihrer Funktion I κ B-ähnlich, indem sie die mit ihnen verbundene Untereinheit des NF- κ B-Komplexes im Zytoplasma zurückhalten und deren Aktivität inhibieren⁵⁸. Der alternative Signalweg wird unter anderem über CD40 Liganden und B-Zell Faktoren aus der TNF-Superfamilie aktiviert^{7,58,123}. Es folgt eine Signalkaskade über die NF- κ B

induzierende Kinase (NIK), die ihrerseits den IKK α -Komplex aktiviert^{7,58,124}. Über den Einsatz von Bay 11-7082, einem irreversiblen Inhibitor der I κ B α -Phosphorylierung, kann die NF- κ B-Aktivität in experimentellen Ansätzen inhibiert werden^{36,102}.

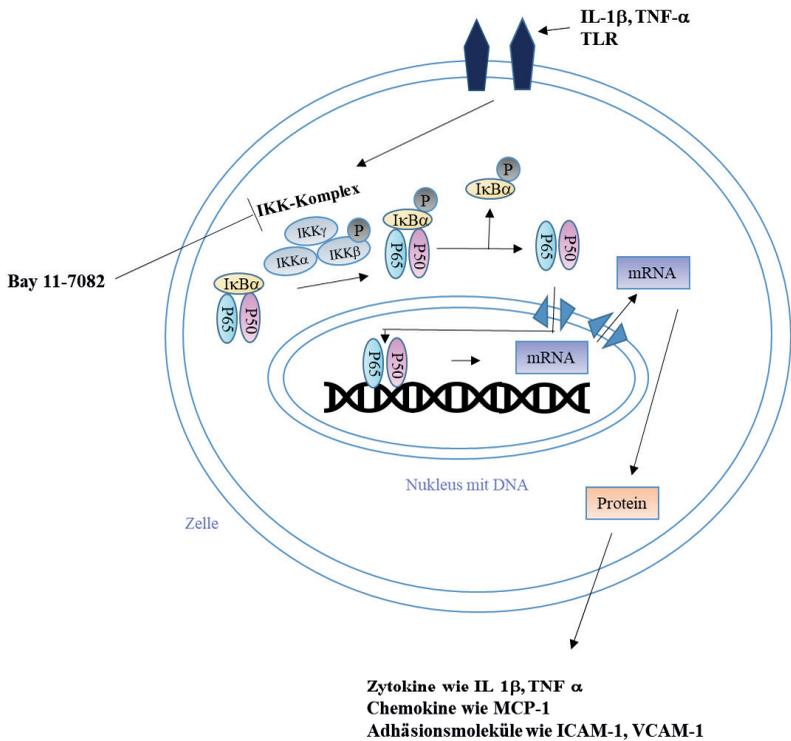


Abb. 1 Schematische Darstellung des kanonischen NF- κ B Signalweges. Abbildung modifiziert aus ⁸⁵

1.5 Inflammation vermittelnde Rezeptoren beim Myokardinfarkt

DAMPs können das native Immunsystem über „Pathogen recognition receptors“ (PRR) aktivieren und während eines Myokardinfarkts somit eine sterile Inflammation unter Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen initiieren⁵². Bei Kardiomyozytenschädigungen und Nekrosen kommt es zur Ausschüttung von DAMPs wie extrazellulären Matrixprodukten, mitochondrialer DNA und „High mobility box 1“ (HGMB1) Proteinen, die als Liganden für PRR dienen⁵². Die Toll-like Rezeptoren (TLR), die über Ligandenbindung wie durch beispielsweise DAMPs zur NF- κ B-Aktivierung führen, gelten als die meist erforschten Rezeptoren unter den PRR⁵². Besonders TLR 2 und TLR 4 spielen bei der Inflamationsantwort während Myokardinfarkten eine große Rolle^{1,112}. Der „Receptor for Advanced Glycation End-Products“ (RAGE) scheint ebenso als NF- κ B-Initiator im Rahmen der Inflammation bei Myokardinfarkten bedeutend zu sein, da RAGE knock-out Mäuse einen verminderten Gewebsschaden und eine herabgesetzte Inflamationsantwort aufwiesen¹⁴⁰.

1.6 Das kardiale Myosin-Bindende Protein C (cMyBP-C)

1973 wurde das Myosin-Bindende-Protein C erstmals als Unreinheit in Skelettmuskelpräparaten beschrieben¹¹⁰. Drei Jahre später wurde die kardiale Isoform, cMyBP-C entdeckt¹⁰⁴ und 1983 erstmals charakterisiert¹⁴⁶. Besonders Saul Winegard trug Anfang der 2000er einen Großteil zu der Entdeckung von cMyBP-C sowie zur Aufklärung über dessen Funktion und Struktur bei^{97,141,143}. Das cMyBP-C unterscheidet sich unter anderem von der Skelettmuskulaturform (MyBP-C) durch die zusätzliche C0-Domäne am N-terminalen Ende¹⁵⁰. Sadayappan und Tombe beschreiben den Aufbau des kardialen Sarkomers wie folgt¹²²: Es ist zusammengesetzt aus langen, fibrösen Proteinen, die aneinander vorbeigleiten, wenn der Muskel kontrahiert und sich wieder entspannt. Kardiale Myofibrillen bestehen aus Sarkomeren, die von Mitochondrien und Zytoplasma in den Kardiomyozyten umgeben sind. Ein einzelnes Sarkomer ist per Definition der Bereich zwischen zwei Z-Scheiben mit einer Länge zwischen 1,6 μ m und 2,4 μ m. Jedes Sarkomer besteht aus einem dicken (Myosin) und dünnen Filamentprotein (Aktin), deren Interaktion zur Kraftentwicklung und Verkürzung des Sarkomers führt. Das dünne Filament beinhaltet Aktin, α -Tropomyosin und den Troponinkomplex mit Troponin C, I und T. Das dicke Filament setzt sich zusammen aus Titin, Myosin und dem regulatorischen cMyBP-C, das physiologischerweise eine Schlüsselrolle in der Kontraktilität des Herzmuskels einnimmt und mit über 200

möglichen Mutationen im cMyBP-C Gen direkt mit der Entwicklung von Kardiomyopathien und Herzinsuffizienzen in Zusammenhang steht. Das cMyBP-C ist ein 150 kDa schweres Protein, das zur Superfamilie der intrazellulären Immunglobuline gehört und aus acht Immunglobulin- und drei Fibronectin Typ 3 (FN3)-Domänen besteht, die vom N-terminalen Ende von C0 bis C10 Motiven nummeriert sind. Zwischen dem C0- und C1-Element findet man eine Prolin-Alanin reiche Region und ein Phosphorylationsmotiv (M-Domäne) zwischen C1 und C2 (Abb. 2).

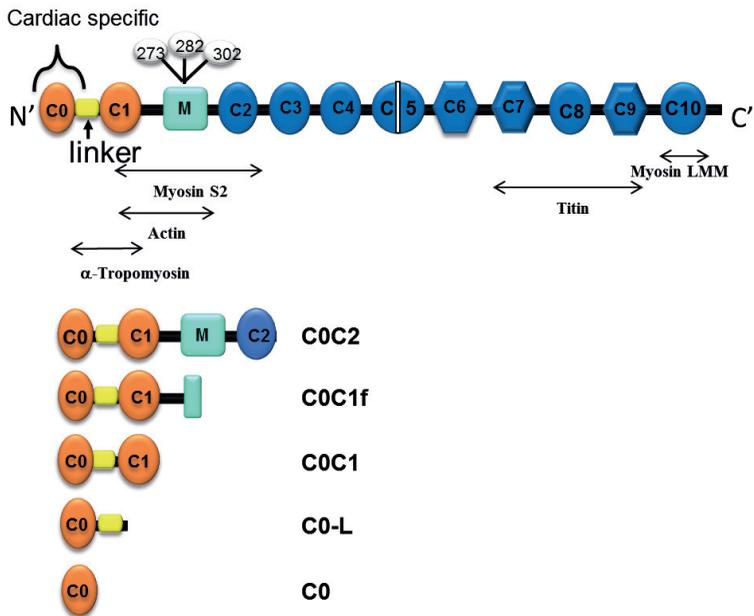


Abb. 2 Darstellung des Proteins cMyBP-C mit verschiedenen N-terminalen Fragmenten und dem Interaktionsverhältnis zum dicken und dünnen Filament. Modifiziert aus^{84,90}

Es wird vermutet, dass cMyBP-C über seinen C-Terminus mit der leichten Meromyosinkette und Titin des dicken Filaments interagiert, während der N-Terminus, der ein Schlüsselement der Kontraktion darstellt, über das Subfragment-2 des Myosins mit dem dünnen Filament in Verbindung steht^{24,56}. Genau genommen interagiert die C1-M-C2-Region mit dem dünnen Filament und bindet am S2-Fragment des Myosins, wodurch direkt die Kalziumsensitivität des Myofilaments, die myofibrilläre

Spannungsentwicklung, das „Cross-bridging“ und die Sarkomerlängenspannung beeinflusst werden^{56,61,117}.

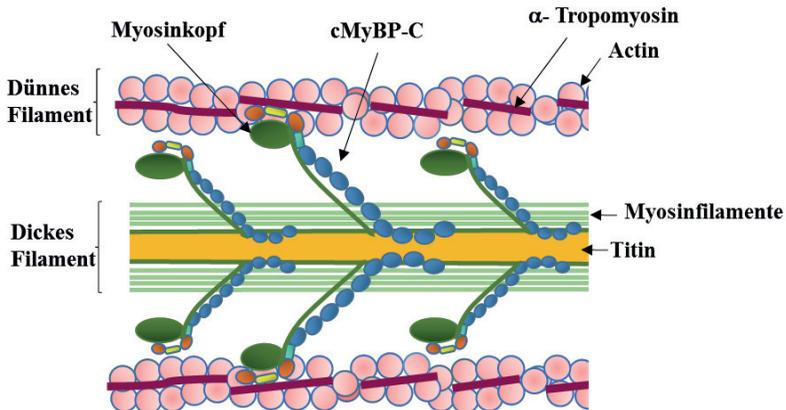


Abb. 3 Struktur von cMyBP-C im kardialen Sarkomer. Das kardiale Sarkomer besteht sowohl aus einem dicken Filament mit Myosin und Titin als auch aus einem dünnen Filament mit Aktin, α -Tropomyosin. Die Troponine I, C, und T sind hier übersichtshalber nicht mit abgebildet. cMyBP-C ist ein sarkomerisches Protein, das an der Stabilisation der Sarkomerstruktur und der Regulation von „Crossbridging“ über die Kontrolle der Aktin-Myosin-Filament-Interaktion beteiligt ist. Die Farben der einzelnen cMyBP-C Elemente entsprechen denen der Abb. 2. Abbildung modifiziert aus^{90,144}

Es wurde festgestellt, dass durch die Phosphorylierung der M-Domäne über die „cAMP-dependent-Protein-Kinase“ (cAPK) sowohl die Anbindung zum Aktin als auch zum S2-Teil des Myosins reduziert wird¹²⁵. Die Phosphorylierungsregionen liegen in der Nähe der Motordomäne des Myosins⁴⁹. Demnach wird dort die regulatorische Funktion des Proteins impliziert, da die Phosphorylation durch die cAPK rasch bei adrenerger Stimulation zusammen mit der Phosphorylierung von Troponin stattfindet, was zu einer erhöhten Inotropie führt⁴⁹.

1.6.1 Rolle des cMyBP-C beim Myokardinfarkt

Im gesunden kardialen Gewebe wird die Kontraktion über ein gekoppeltes System von elektrischer Erregung und erhöhtem intrazellulären Kalziumspiegel, das für die Interaktion von Aktin und Myosin verantwortlich ist, gewährleistet⁶. Dies führt zum „Crossbridging“ und zur Sarkomerverkürzung⁶. Bei kardialer Ischämie kommt es durch den Verlust vom kardialen Gewebe zu veränderten Kontraktionseigenschaften der Myozyten¹⁵². Dies führt zu vermehrtem Zelluntergang und kardialer Dysfunktion, während das Herz versucht, durch eine Erhöhung der Kalziumkonzentration die

eingeschränkte Kontraktilität und Pumpleistung zu kompensieren¹⁵². Unter Ischämien und einer frühen Reperfusion führt ein erhöhter Kalziumspiegel zur Aktivierung von kalzium-abhängigen Calpainproteasen, die intrazelluläre und auch kontraktile Proteine während Myokardnekrosen degradieren⁸⁰. Ischämische Schäden nach Myokardinfarkten haben auch eine phosphorylierungsabhängige Spaltung des cMyBP-C zufolge, wodurch das 40 kDa schwere N-terminale Fragment (C0C1f) in die Blutbahn freigesetzt wird^{43,45,118}. Die Dephosphorylierung von cMyBP-C macht dieses für Proteolyse anfällig, was zur Calpainspaltung innerhalb der M-Domäne und Abspaltung von C0C1f führt^{45,115,121}. Es konnte sowohl das C0C1f-Fragment als auch das cMyBP-C in seiner gesamten Länge in Patientenserum und in Tiermodellen bereits eine halbe Stunde nach Myokardinfarkt detektiert werden⁴³. Innerhalb des kardialen Gewebes wurde gezeigt, dass C0C1f signifikante kontraktile Dysfunktionen und Herzversagen herbeiführte^{45,144}. In einer Studie mit humanen Gewebeproben von Herzinsuffizienzpatienten konnte gezeigt werden, dass C0C1f sowohl bei ischämischen als auch bei nicht ischämischen Herzerkrankungen im entnommenen Gewebe erhöht vorzufinden war¹¹⁸. In einer weiteren Studie wurde rekombinantes humanes C0C1f in humanen permeabilisierten Herzen eingesetzt, was eine erniedrigte Calciumsensitivität im Myofilament und eine direkte Interaktion zwischen Aktin und α -Tropomyosin zur Folge hatte¹⁴⁴. Dies blockiert die Bindungsstellen für das intakte cMyBP-C, sodass keine Kontraktion mehr gewährleistet werden konnte, was die regulatorische Funktion von C0C1f nochmals unterstreicht¹⁴⁴ (**Abb. 4**).

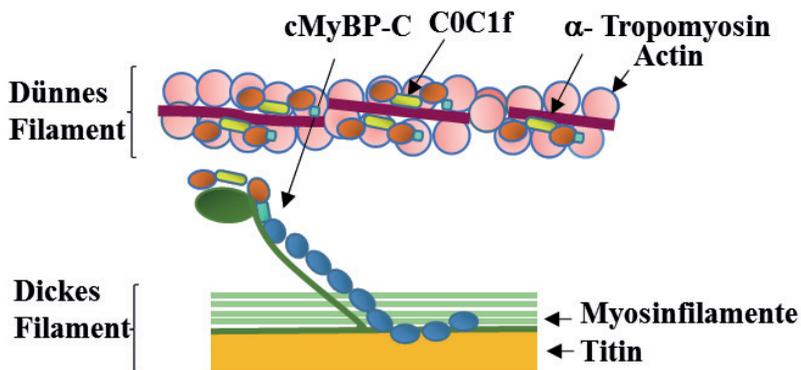


Abb. 4 C0C1f unterbricht die native cMyBP-C Interaktion mit dem dünnen Filament durch Binding an Aktin und α -TM an multiplen Stellen. Es wird vermutet, dass die Anwesenheit von C0C1f im Sarkomer die Interaktion von dünnen und dicken Filamentproteinen unterbricht und dadurch die regulatorische Rolle von cMyBP-C in seiner vollen Länge unterbindet, was wiederum in einer Kraftverminderung sichtbar wird. (Abbildung modifiziert aus¹⁴⁴)

Postischämische Dysfunktionen stehen ebenso in Zusammenhang mit Kalzium-abhängiger Degradation von α -Aktin⁹⁵, kardialem Troponin I⁹⁵, kardialem Troponin T und der Myosinleichtkette-1¹³⁶.

Ein nach mehr als zwanzig Minuten einsetzender Koronararterienverschluss resultiert in einer irreversiblen myokardialen, sich vom Endokard zum Myokard und Epikard ausbreitenden, Nekrose, die schon nach wenigen Stunden ein komplettes Areal betreffen kann¹³⁰. Dies ist abhängig davon, wie ausgeprägt das Kollateralsystem und der Sauerstoff- inklusive dem Nährstoffbedarf ist¹³⁰. Da das Ausmaß der Gewebsnekrose abhängig von der Dauer des Gefäßverschlusses ist, wird eine schnellstmögliche Eröffnung des Gefäßes sowie eine frühe Diagnose des Myokardinfarkts angestrebt¹²⁹. Kardiale Troponine bilden zurzeit den aktuellen Goldstandard an Biomarkern nach einem Myokardinfarkt. Große transmurale Infarkte können typischerweise über ST-Hebungen im EKG erkannt werden⁷³; bei Nicht-ST-Hebungsinfarkt- (NSTEMI) Patienten werden Biomarker für die Diagnose herangezogen⁵³. Bei einem Gefäßverschluss ist der erhöhte kardiale Troponin I Spiegel erst nach sechs bis zwölf Stunden im Blut vorzufinden⁹⁰. Somit kommt C0C1f und das cMyBP-C als neuwertige frühe Biomarker für Myokardinfarkte infrage⁴³.

1.7 Auswirkung von cMyBP-C auf die Immunantwort

Immunologisch zeigt cMyBP-C seine Wirkung durch Aktivierung von Autoantikörpern, die für die Autoimmunmyokarditis und dilatative Kardiomyopathien verantwortlich sind^{71,93,94}. Unsere Arbeitsgruppe konnte in Zellkultorexperimenten die Aktivierung von Makrophagen und die damit verbundene inflammatorische Zytokinausschüttung von IL-6, TNF α und IL-1 β durch das nach Myokardinfarkt freigesetzte Fragment C0C1f nachweisen. Dies lässt vermuten, dass C0C1f auch eine Schlüsselrolle bei der Induktion von inflammatorischen Prozessen haben sowie bedeutend beim Myokardinfarkt sein könnte⁸⁴.

2 Fragestellung

Im Rahmen des Myokardinfarkts sind Makrophagen sowohl für die Modulation der durch die Ischämie hervorgerufenen Inflammation als auch für den daraus resultierendem Heilungsprozess von großer Bedeutung. Kürzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe festgestellt, dass die inflammatorische Immunantwort von Makrophagen ebenso durch das beim Myokardinfarkt freigesetzte Fragment C0C1f induziert wird. In der folgenden Arbeit wird der intrazelluläre Mechanismus unter C0C1f Stimulation von Makrophagen genauer untersucht. Es soll geklärt werden, inwieweit der NF- κ B-Signalweg in der inflammatorischen Immunantwort von murinen Makrophagen unter C0C1f Stimulation involviert ist und ob es auch ohne NF- κ B-Aktivierung zu einer vermehrten inflammatorischen Zytokinausschüttung durch Makrophagen kommt, d.h. ob NF- κ B für eine inflammatorische Antwort essenziell ist. Des Weiteren sollen die für die Aktivierung durch C0C1f erforderlichen Rezeptoren identifiziert werden.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Generelle Labormaterialien

35 x 10 mm Zellkulturschalen	Cellstar, Greiner Bio-One, Germany, Ref. Nr. 627160
6 cm Zellkulturschalen	Nunclon Surface, Nunc, Denmark
6 Well Platte, Ultra-Low Attachment Surface	Corning, USA, 3471
96-Well-Plate	Nunclon, Nunc Denmark, Cat.No. 167008 und Greiner bio-one Cellstar
Cell Strainer	Falcon Corning, USA
Destilliertes Wasser	Braun, Germany
Durapore 3M	
Falcon Röhrchen	Corning Science Mexico
Glass Pipetten	Greiner Bio-One, Germany
Glass Pipetten 5ml	Falcon, Becton Dickinson, USA, 35-7543
Insulinspritze 1ml	Braun
Kanülen 27G	BD Microlance, Ireland
Messbecher	
Mini-Protean Stain-Free Gels 10 Wells and 15 Wells	Biorad, US
Multiplate PCR Plates 96-Well, clear	Biorad, UK, Cat.No. MLL9601
Nitril Handschuhe	Vaso Braun, Germany
Optical Flat 8-Cap Strips	BioRad, US, Cat. No. TCS0803
Parafilm	PM-996, USA
Pipetboy	Integra
Pipetten Spitzen	Nerbe plus, Biozym, Griner-Bio one
Zellkulturschalen für Bakterien	Greiner Bio-one, Ref. 663102, Kat.nr. 10646
Zellschaber	Falcon Becton Dickinson Labware Europe, France

3.2 Geräte

-80°C Gefrierschrank	Thermo Electron Corporation, Hera freeze Thermo Scientific, Heraeus
Autoklav	HMC, Hiclive, HV-25
Blottinggerät (Western Blot)	Trans-blot Turbo Transfer System BioRad, Singapore
CO ₂ -Kammer	HERA cell
Drucker	Epson LX-800
Eismaschine	Scottsman
ELISA-Reader	SLT Spectra, Germany
Fluoreszenzmikroskop	Biorevo, Keyence, BZ-9000
Kühlschrank	Bosch
Lichtmikroskop	Leica DMIL Microsystems, Germany
Magnetrührer	IKA Labortechnik
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5417R Eppendorf, Germany
Mini Plate Spinner	Labnet, USA
Neubauer Zählkammer	Mariendfeld & Assistent
Real-Time System CFX96	BioRad C1000 Thermal Cycler, Singapore
Schüttler	Heidolph Titramax 100, Germany
Schwenker	Heidolph Polymas 2040
Spektralphotometer	NanoDrop™ Thermo Scientific
Stoppuhr	Eurochron
Thermoblock	Thermomixer comfort, Eppendorf 0.5ml, Germany
Thermocycler (cDNA Synthese)	Biometra T Gradient Thermoblock
Vortexer	Janke&Kunkel IKA Labortechnik und peqlab
Waage	Sartorius, Germany
Wasserbad, Lauda 006T	Julabo Labortechnik GmbH Seelbach, Germany
Western Blot Imaging	BioRad ChemiDoch MP, Imaging System
Western Blot Netzteil	Biorad Power Pac 3000, USA
Zellkulturbank	Hera safe, Heraeus, Germany
Zentrifuge	Rotina 420R, Hettich Zentrifugen

3.3 Zellkultur Mediumkomponenten

DMEM (1x) Dulbecco's Modified	Gibco, Germany
Eagle Medium ([+] 4,5g/L D-Glucose, L-Glutamin, [-] Pyruvate)	
MEM Non-Essential Amino Acid 100x	Gibco, Germany
DPBS w/o Calcium & Magnesium	PAN Biotech
Penicillin/Streptomycin	Gibco, UK und PAA
Fetal Calb Serum	Amphotericin B Solution Sigma, UK
Recombinant Murine M-CSF	PeptoTech, USA

3.4 Antikörper und Primer

NF- κ B p65	C-20, Santa Cruz, sc-372, rabbit-polyclonal
I κ B	C-21, Santa Cruz, sc-371, rabbit polyclonal
IL-1 β	H-153, Santa Cruz, sc-7884
ICAM-1	H-108, Santa Cruz, sc-7891
GAPDH	FL-335, Santa Cruz, sc-2778
TNF α	L-19, Santa Cruz, sc-1351
6X His tag	Abcam, ab9108
CD68	AbD Serotec, MCA1957GA, rat- monoclonal
Donkey Anti-goat IgG HRP	Santa Cruz, sc-2020
Goat Anti-rabbit IgG HRP	Santa Cruz, sc-2004
Goat anti-mouse IgG HRP	Santa Cruz, sc-2005
Alexa fluor goat anti-rabbit	546 (Cy3), ThermoFisher Scientific

3.5 Inhibitoren

Bay 11-7082 (NF κ B-Inhibitor)	InvivoGen, tlr1-b82
CLI-095 (TLR4-Inhibitor)	InvivoGen, tlr1-cli95
Cu CPT22 (TLR2/TLR1-Inhibitor)	Tocris Bioscience, # 4884
FPS-ZM1 (RAGE-Inhibitor)	Calbiochem, # 553030

3.6 Primersequenzen für die quantitative Real-Time-PCR

Gene	5'primer	3'primer
GAPDH	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	AAGATGGTGATGGGCTTCCCG
ICAM	GCCTTGGTAGAGGTGACTGAG	GACCGGAGCTGAAAAGTTGTA

IL10	TTTGAATTCCTGGGTGAGAA	GGAGAAATCGATGACAGCGC
IL-1β	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
IL-6	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC	GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG
MCP-1	GGCTCAGCCAGATGCAGTTAA	CCTACTCATTGGGATCATCTTGGT
TNFα	CCAGTGTGGGAAGCTGTCTT	AAGCAAAAGAGGAGGCAACA
NF-κB	ATGGCAGACGATGATCCCTAC	TGTTGACAGTGGTATTTCTGGTG
VCAM	TGCCGAGCTAAATTACACATTG	CCTTGTGGAGGGATGTACAGA

3.7 Chemikalien und Reagenzien

10x Tris/Glycine/SDS Buffer	Bio-rad Cat. No. 161-0732, Germany
Aprotinin	Fluka Cat. No. 10820, Switzerland
BSA-Albumin Fraktion V	Roth
Chloroform	Fluka, UK
Clarity ECL Substrate	Biorad
DAPI, Dihydrochloride	Calbiochem, CAS 28718-90-3 Germany
DPBS (10x) Dulbecco's Phosphate	Gibco, UK
Buffered Saline, [-] CaCl ₂ , [-] MgCl ₂	
DTT (1,4 Dithiothreitol)	Sigma
EDTA	Sigma
Ethanol >99,8%	Sigma, USA
Glycerol >99 %	Fa.Sigma, Art. Nr. G6279
Hepes	
IGEPAL CA-630 (NP 40)	Sigma, Germany
Leupeptin	Sigma
Milchpulver	Roth, Germany
Mowiol	Fa. Fluka, Art. Nr. 81381
Na ₂ M004	
Natriumchlorid >99,5 %	p.a., Fa. Roth, Art. Nr. 3957.1
Normal Goat Serum 10 % ready to use	Fa.7ymed
PFA (Paraformaldehyd)	
PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluorid)	Sigma
Protein Assay Standard II	BioRad, Cat. 500-0007
Protein Marker IV	PeqLab, Cat. No. 27-2110
Qiazol Lysis Reagent	Qiagen

RC DC™ Protein Assay Reagent A	Biorad, Cat. No. 500-0113, US
RC DC™ Protein Assay Reagent B	Biorad, Cat. No. 500-0114, US
RC DC™ Protein Assay Reagent S	Biorad, Cat. No. 500-0115, US
RPE Buffer	Qiagen
RWT Buffer	Qiagen
Sso Fast™ Eva Green® Supermix	Biorad, Cat. 172-5201, Singapore
Tris Puffer >99,9%	p.a., Fa. Roth, Art.Nr. 4855.2
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma, USA
Tween 20	Sigma, Cat. No. 9005-64-5, France

3.8 Software

ND-100 V3.81	Thermo Fisher Scientific
ImageLab	Bio-Rad
BioRad CFX Manager	Bio-Rad
Microsoft Office	Microsoft
GraphPad Prism 5.0	Graphad Software
Image Lab 5.2.1	Bio-Rad

3.9 Kits

iScript™ cDNA Synthesis Kit	Biorad, Cat. No. 170-8891, US
NF-κB (p65) Transcription Factor Assay Kit	Cayman Chemical, Item No. 10007889
RC DC™ Protein Assay II	Biorad, Cat. No. 5000122
RNeasy® Mini Kit (250)	Qiagen, Cat.No. 74106

3.10 Angesetzte Lösungen

3.10.1 Proteinisolation

WCE-Puffer:

0,2 ml 1M Hepes pH 7,8
0,2 ml 1M Hepes pH 7,8
0,9 ml 5M NaCl
4 µl 0,5 M EDTA
0,1 ml 1M Na₂M004
2,5 ml Glycerin
Mit Aqua Dest auf 15ml auffüllen

WCE-Puffer Plus:

1 ml WCE Puffer
10µl 100 mM DTT oder
1µl 1M DTT
5µl Leupeptin
5µl Aprotinin
5µl PMSF

3.10.2 Proteinbestimmung

Lösung A:

20 µl RC DC™ Protein Assay Reagent S
1 ml RC DC™ Protein Assay Reagent A

3.10.3 Western Blot

Ladepuffer A:

20 ml 1M Tris pH 6,8 = 100 mM
80 ml 10 % SDS = 4 % SDS
0,4g Brom Phenolblau = 0,2 %
40ml Glycerin=20% Glycerol

Ladepuffer B:

200 µl Ladepuffer 1
50 µl 1 MDTT

Laufpuffer:

100 ml 10x Tris/Glycine/SDS Buffer
900 ml Aqua Dest

WB-Waschpuffer:

5 L Aqua Dest
500 ml 10x PBS
5 ml Tween 20

Stripping Puffer:

10 ml 1M Glycerin
90 ml Aqua Dest
1 ml HCl

WB-Blockingpuffer:

12 g Magermichpulver
200 ml Waschpuffer

3.10.4 Ansatz zum Splitten der Zellen:

50 ml PBS (1x)
500 µl 1M Glucose = 10mM
60 µl 2,5 M EDTA = 3mM

3.10.5 Immunhistochemie

10x TBS Puffer:

5 L Aqua Dest
121 g Tris Pufferan
400 g Natriumchlorid

Mowiol:

12 g Glycerol
4,8 g Mowiol
12ml Aqua Dest
24 ml Tris Puffer 0,2 M

Sekundärantikörper-Lösung:

Alexa fluor goat anti-rabbit
1:200 verdünnt mit AK Diluent
1%-iges Goat Serum

IHC-Waschpuffer:

10x TBS Puffer 1:10 mit Aqua Dest
verdünnt (einfach-TBS)

IHC-Blockingpuffer:

10 ml Goat Serum
0,5 g Albumin Fraktion V (BSA) = 5 %

4,6-Diamidino-2-phenylindol

Dihydrochlorid (DAPI) Bestellnr.:
6335.1, Carl Roth

3.11 Methoden

3.11.1 Isolierung von Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen

Die Isolation von Stammzellen wurde an männlichen C57Bl/6-Mäusen im Alter zwischen acht und 15 Wochen durchgeführt. Die Tötung erfolgte über eine Isofluran (4-5%) Begasung. Nach der Begasung wurde der Verlust der Zehenreflexe getestet und ein Genickbruch veranlasst. Die Maus wurde auf einer sauberen Unterlage in Rückenlage fixiert, die Hinterbeine mit 80 % Ethanol desinfiziert und die Haut über einen Einschnitt am Fußgelenk entfernt. Die Tibia- und Femurknochen wurden freigelegt und durch einen Scherenschnitt am Hüftgelenk vom restlichen Körper abgetrennt. Am unteren Teil der Tibia wurde der Knochen distal des oberen Sprunggelenks abgeschnitten.

Die Methode der Knochenmarksisolation erfolgte in modifizierter Form nach Alka Madaan und Kollegen⁹¹. Durch Ertasten des Kniegelenkes wurden Femur und Tibia voneinander getrennt, ohne den jeweiligen Knochen zu schädigen. Die Fibula wurde entfernt. Von den Enden der frei präparierten Knochen wurden ca. 3mm abgetrennt und das vorhandene Knochenmark herausgespült, indem einfach-PBS mit einer Insulinspritze und einer aufgesetzten 27G Kanüle in den Röhrenknochen injiziert wurde. Das Knochenmark wurde am gegenüberliegenden offenen Ende des Knochens in einer kleinen Petrischale aufgefangen. Anschließend wurde die Zellsuspension resuspendiert. Diese wurde durch ein Zellsieb (70 µm) in ein 50 ml Röhrchen gegeben und mit 1 ml Lysepuffer versetzt, das zuvor im Verhältnis 3:1 mit PBS verdünnt worden war. Der Lysepuffer sorgt dafür, dass möglichst viele Erythrozyten lysiert werden, um die Stammzellenfraktion anzureichern. Nach 15-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Lysereaktion durch Zugabe einer gleichen Menge an PBS angehalten und für 10 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 10 ml DMEM (10% FCS) für die Zellzählung resuspendiert.

3.11.2 Zellzählung

Zur Zellzählung wurde die Zellsuspension in Verhältnis 1:1 mit Trypan blue Solution versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Dazu wurden 0,1 µl der Zellsuspension entnommen und mit Trypan blue Solution vermischt. Tote Zellen wurden durch Trypanblau blau markiert und nicht in die Auszählung einbezogen. Der Zellzahlmittelwert wurde aus der Summe von den einzelnen vier Quadranten bestimmt und die Zellzahl pro ml berechnet.

3.11.3 Kultivierung und Differenzierung der Zellen

Pro Zellkulturschale wurden 4 Mio. Zellen auf 10 ml DME-Medium (5%FCS) zuzüglich 10 µl M-CSF (100 ng/µl) kultiviert. Die Zugabe von M-CSF veranlasste eine Ausdifferenzierung der Knochenmarkszellen zu Makrophagen¹⁴². Je nach Knochenmarksisolation variierte die Zellzahl von 24 Mio. bis zu 48 Mio. Drei Tage nach der Zellisolation wurden zu den einzelnen Zellkulturschalen 5 ml Medium plus 5 µl M-CSF gegeben. Nach ca. einer Woche waren die Zellen zu etwa 80% konfluent und konnten gesplittet werden.

3.11.4 Passagieren der Zellen

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit warmem PBS (37°C) gewaschen. Die am Boden adhärenen Zellen zum Passagieren wurden mit 5ml/Schale PBS-Glucose-EDTA Lösung jeweils versetzt und für 10 Minuten im CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 ml bei 4°C gekühltem Medium wurde die PBS-Glucose-EDTA Lösung inaktiviert. Im Anschluss wurden die Zellsuspensionen zusammen in ein 50 ml Röhrchen überführt. Das Röhrchen wurde bei 4°C und 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Darauffolgend wurde das Pellet mit DME Medium (2,5% FCS) wieder aufgenommen und eine Zellzählung durchgeführt. Je nach Versuch wurden die Zellen auf 6-Well Platten (1 Mio Zellen und 1,5 ml DMEM/Well), „Chamberslides“ (60.000 Zellen mit 200 µl DMEM/Chamber) und/oder Petrischalen (3 Mio. Zellen mit 3 ml DMEM/6 cm Schale, 5 Mio. Zellen mit 5 ml DMEM/10 cm Schale) ausgesät.

3.11.5 Reinheitsbestimmung der Proben

Nach dem Splitten wurde eine Reinheitsbestimmung der Zellen mithilfe des Durchflusszytometers (FACS Calibur, BD, USA) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen mit einem CD11b-APC Antikörper gefärbt. Anhand der Größenverteilung und

Oberflächenstruktur (FSC/SSC) sowie der Anfärbung durch CD11b wurde die Reinheit der Makrophagenpopulation bestimmt (**Abb. 5**). Dafür wurde 1-3 ml Medium zum Zeitpunkt des Zellsplittens abgenommen. Das FACS ergab anhand der Größenverteilung eine 99%ige Reinheit an Makrophagen (**Abb. 5 A**). Das Ergebnis unter Verwendung von CD11b-APC Antikörper erbrachte eine Reinheit von über 90% (**Abb. 5B**).

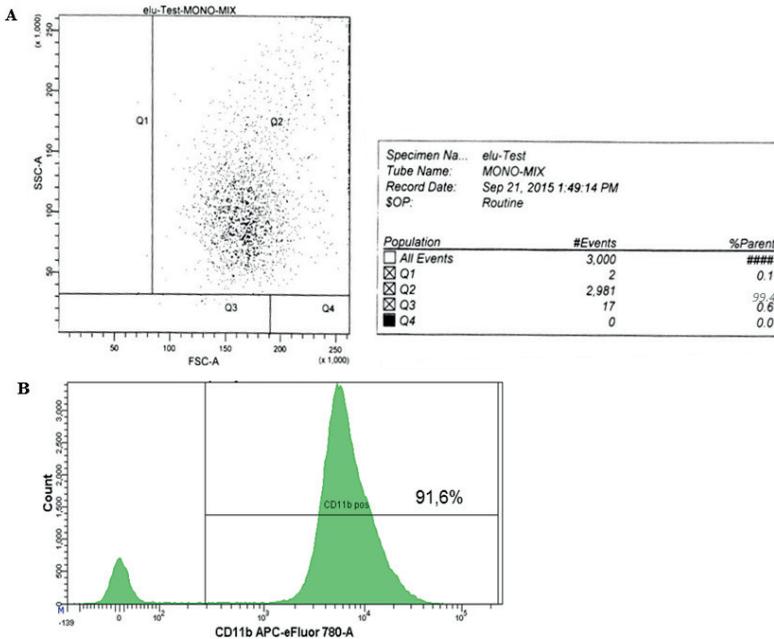


Abb. 5: FACS Analyse von Makrophagen. **A)** Mit dem FACS Calibur gemessene murine Knochenmarkszellen, die für ca. eine Woche mit M-CSF stimuliert wurden, weisen eine Makrophagen-Reinheit von 99,4 Prozent auf. **B)** FACS Analyse der Makrophagenpopulation. Durch Färbung der differenzierten Zellen mit einem CD11b Antikörper kann im APC-Kanal des Durchflusssytometers eine Reinheit von 91,6% detektiert werden⁸⁴

Zudem erfolgte eine Reinheitsbestimmung mithilfe der Immunofluoreszenzfärbung. Hierfür wurden die ausdifferenzierten Zellen auf 8-Well Chamberslides ausgesät und am nächsten Tag für die Färbung vorbereitet. Durch einen spezifischen CD68 Antikörper erschienen somit Makrophagen unter dem Fluoreszenzmikroskop rot, der mit DAPI gefärbte Kern blau (**Abb. 6**). Es ist deutlich zu erkennen, dass nahezu alle Zellen CD68 positive Markierung aufweisen.

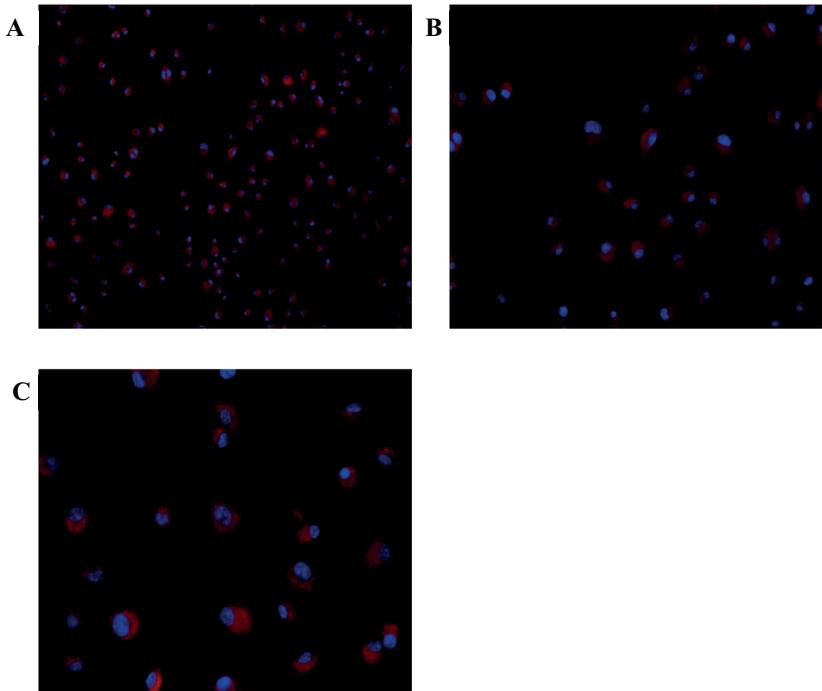


Abb. 6 Identifikation der Makrophagen im Immunfluoreszenzmikroskop. Murine Makrophagen wurden nach der Differenzierung auf Objektträgern ausgesät und mit CD68 (rot) markiert. Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt. A) 20x Vergrößerung, B) 40x Vergrößerung, C) 60x Vergrößerung.

3.11.6 Stimulation der Makrophagen

Bei einer augenscheinlichen Konfluenz von ca. 80 % wurde ein Mediumwechsel mit reduziertem FCS (2,5%) durchgeführt und dieses über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 9h und 24h mit C0C1f (500 ng/ml), LPS (100 ng/ml) oder C0-Linker (500 ng/ml) stimuliert. Kontrollen erhielten keine Stimulation.

3.11.7 Vorbehandlung der stimulierten Makrophagen unter Verwendung von Inhibitoren

Die kultivierten Makrophagen wurden mit dem irreversiblen IKK-Inhibitor Bay 11-7082 (10 μ M), dem TLR4 Inhibitor CLI-095 (10 nM), dem TLR2/TLR1 spezifischen Inhibitor Cu CPT22 (5 μ M) oder dem RAGE-Antagonisten FPS-ZM1 (10 μ g/ml) für 18h vor der eigentlichen Stimulation behandelt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit C0C1f.

3.11.8 Proteinisolation

Zur Isolation von Proteinen aus kultivierten Makrophagen wurden 3-4 Millionen Zellen mit je 120 μ l WCE Puffers Plus lysiert. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden 30 μ l 10 % NP40 zum Lysat gegeben. Die Zellen wurden anschließend durch Vortexen gemischt und die Zellmembran mittels eines Ultraschall-Homogenisators aufgeschlossen. Nach 10 Min. Zentrifugation bei 1600 x g wurde der proteinreiche Überstand abgenommen und auf 30 μ l aliquotiert.

3.11.9 Proteinbestimmung

Die quantitative Ermittlung der Proteinkonzentration nach Lowry erfolgte mittels Reagenzien von Bio-Rad Laboratories GmbH. Das Prinzip des Lowry Tests beruht auf der Bildung eines blauen Farbstoffkomplexes zwischen Proteinen und Kupferionen in alkalischer Lösung. Im nächsten Schritt erfolgt eine Reduktion der Kupferionen durch die Proteine, was zu einer weiteren Reduktion von Phosphorsäuren und im Endeffekt zu einem blauen Farbumschlag führt. Die Intensität der Blaufärbung kann photometrisch bestimmt werden und verhält sich linear proportional zur Proteinkonzentration⁸⁸. Eine Standardkurve wurde mit Rinderserumalbumin (Protein Assay Standard II, Biorad) bei bekannten Proteinkonzentrationen zur Kalibrierung herangezogen. Die Proben und der Standard wurden in Duplikaturen mit jeweils 5 μ l auf eine 96-Wellplatte aufgetragen. Dazu wurden 25 μ l Lösung A, hergestellt aus dem RC DC™ Protein Assay Reagent A und S (Biorad), und 200 μ l RC DC™ Protein Assay Reagent B (Biorad) pro Well hinzu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit im Dunkeln von 15 Min. bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Proteinbestimmung mittels eines ELISA-Readers (SLT-Spectra) bei 650nm.

3.11.10 Western Blot

Western Blots dienen der Auftrennung von Proteinen nach bestimmten Eigenschaften wie Größe oder Ladungen. Dazu wurden zunächst die Proteinproben in der Gelelektrophorese mittels einer Trägermatrix in Proteinbanden aufgetrennt. Der nächste Schritt bestand aus dem Transfer (sog. „blotting“) der Proteine auf eine Trägermembran (PVDF-Membran) mittels eines zweidimensionalen elektrischen Feldes, das senkrecht zum Gel angeschlossen wurde. Aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen bleiben die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden auf der Membran haften. Unter Anwendung von spezifischen Primärantikörpern und enzymmarkierten Sekundärantikörpern können im Anschluss die untersuchten Proteinbanden visualisiert werden.

3.11.10.1 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Mini-PROTEAN® TGX Stain-free™ Gele (Biorad) und eine korrespondierende Elektrophoresekammer angewendet. Die Taschen wurden mit entsprechendem Laufpuffer vor der Applikation der Proben gespült. 20 µg Proteinlysate wurde im gleichen Verhältnis mit Ladepuffer B und ggf. zur Verdünnung mit WCE-Puffer aufgenommen und in die jeweiligen Taschen des Gels überführt. Zur Orientierung für die Proteingrößen wurde als Referenz ein bekannter Molekulargewicht-Marker verwendet. Die Kammer wurde mit Eiswasser umgeben und mit Laufpuffer aufgefüllt. Insgesamt ließ sich die Gelelektrophorese in 30 Min. bei 80V und im Anschluss in 30 Min bei 120 V einteilen.

3.11.10.2 Proteintransfer auf Membran

Zum Transfer der untersuchten Proteine wurden Filterpapier in Laufpuffer und die PVDF-Membran zunächst in 99%iges Ethanol eingelegt. Dies dient dazu, die hydrophobischen Eigenschaften der Membran zu mindern, sodass der Transferpuffer besser in Kontakt mit der PVDF-Membran kommen kann. Im Anschluss dazu wurde das Gel auf die PVDF-Membran aufgetragen und zusammen mit Filterpapierlagen in Sandwich-Technik in einer Transferkammer (Trans-Blot® Turbo™, Biorad) geschichtet.

3.11.10.3 Darstellung der Proteinbanden

Die geblottete Membran wurde mit 50 ml des WB-Blockingpuffers bestehend aus 5%iger Magermilch- und WB-Waschpufferlösung für 1h bei Raumtemperatur

inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für die anschließende Primärantikörperbindungen zu vermeiden. Über Nacht wurde die Membran bei 4°C unter der Zugabe des Primärantikörpers, der zuvor nach Herstellerangaben verdünnt worden war, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit 150 ml WB-Waschpuffer für jeweils 15 Min. wurde die Membran erneut mit 30 ml WB-Blockinpuffer mit dem Sekundärantikörper im Verhältnis 1:3000 für 1h inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschvorgang und eine anschließende Ablichtung der Membran mittels Entwicklungslösungen nach dem Bioradprotokoll von Clarity™ Western ECL Substrate (Biorad) unter Verwendung des digitalen ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). Zur Quantifizierung und Evaluation der Proteinbanden in Relation zum Referenzprotein GAPDH wurde die Bio-Rad Image Lab Software herangezogen.

3.11.10.4 Nachweis der genutzten Peptide C0C1f und C0-Linker im Western Blot

Die rekombinanten Peptide C0C1f und C0-Linker wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Sakthivel Sadayappan aus Chicago/Cincinnati mittels pET (aus E. Coli T7 stammende Expressionsvektoren) Expressionssysteme bereitgestellt⁴⁶. Die Peptide wurden jeweils mit einem Polyhistidin-Tag (HIS-Tag), einer Kette aus Histidin, versehen. Um die Peptide selbst und ihre Reinheit zu überprüfen, wurden diese in aufsteigender Konzentration dem Ladepuffer B im Verhältnis 1:1 zur Probe auf ein Gel aufgetragen. Im abgeleitetem Gel erkennt man ähnlich wie bei einer Coomassie Färbung aufgrund der „Stain-free“ Technologie in aufsteigender Konzentration die Zunahme der Bandendichte sowohl bei C0C1f als auch bei C0-Linker (**Abb. 7A**). Dabei entsprach die C0C1f Bande der erwarteten Größe bei 40 kDa und die C0-Linker Bande einer geringen Proteingröße.

Der Western Blot, bei dem der spezifische HIS-Tag Antikörper angewendet wurde, zeigte entsprechend der aufgetragenen Konzentration von C0C1f eine aufsteigend ausgeprägte Bandenfärbung (**Abb. 7B**), während das C0-Linker Peptid durch den HIS-Tag Antikörper nicht detektiert werden konnte. Bereits unter Einsatz von 100 ng C0C1f ließ sich dieses im Western Blot nachweisen. Eine zweite Bande oder gar ein Schmierfilm ließ sich nicht visualisieren, was auf eine hohe Reinheit schließen lässt.

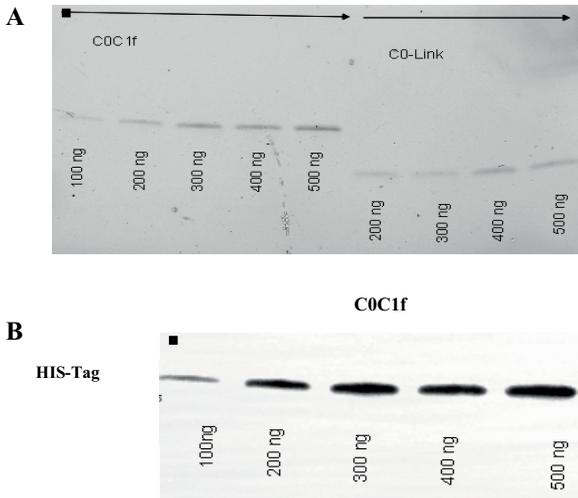


Abb. 7: Analyse der rekombinanten Proteine. A) Westernblotgel vom rekombinanten COC1f und CO-Linker in aufsteigender Konzentration bis 500 ng unter Verwendung der „Stain-free“ Technologie. B) Western Blot bei 40 kDa zum Nachweis des rekombinanten COC1f, das über einen HIS-Tag Antikörper markiert wurde. Aufgetragen wurde eine Konzentrationsreihe von 100 ng bis 500 ng.

3.11.11 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolierung aus Zellkulturlysats wurde das RNeasy®-Mini-Kit angewendet. Das Prinzip des Kits ist es, über Silikat-Membranen als RNA-bindende Komponente und die Verwendung von Mikrozentrifugation geeigneten Säulen mit integriertem Auffanggefäß aufgereinigtes RNA-Material zu erhalten.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst mit 600 µl QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) versetzt und im Anschluss direkt auf die QIAhredder™-Säule mit einem 2ml Eppendorf Tube® überführt. Pro Auffanggefäß wurde jeweils 140 µl Chloroform hinzu pipettiert und für 15 Min. 14000 rpm mikrozentrifugiert. Nach der Zentrifugation ließen sich drei unterschiedlich wässrige Schichten des Homogenisats ausmachen. Die oberste Schicht wurde abpipettiert und mit 600 µl 100 % Ethanol vermischt. Die übrigen Schichten wurden verworfen. Anschließend wurde das gewonnene Material auf RNeasy®-Mini-Kit-Säulen aufgetragen und 15s bei 10000 rpm zentrifugiert. Dadurch wurde das Homogenisat durch die Silikanmembran gefiltert, wobei RNA und weitere Zellbestandteile in der Membran verblieben. Der Durchsatz wurde verworfen. Zur Eliminierung von Rest- DNA erfolgte der Zusatz von DNase des RNase-Free DNase

Sets und mehrere Waschstritte. Zuerst wurden die Säulen mit 350 µl RWT Puffer versetzt und nochmals 30s bei 1300 rpm mikrozentrifugiert. Der entstandene Durchsatz wurde verworfen. Daraufhin wurden 10µl DNase I stock Lösung und 70 µl RDD Puffer auf die Säulen aufgetragen und für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Ein erneuter Waschvorgang mit 350µl RWT Puffer und 30s Mikrzentrifugation bei 13.000 rpm folgte. Der Durchsatz und das Auffanggefäß wurden verworfen. Die Säulen wurden auf neue Auffanggefäße gesetzt. Es folgte ein erneuter Waschvorgang mit 500 µl RPE Puffer und anschließender Mikrozentrifugation für 30s bei 13.000 rpm. Nachdem der Durchsatz erneut verworfen wurde, wurde der eben genannte Waschvorgang für 2 Min. Mikrozentrifugation bei 13.000 rpm wiederholt. Den Säulen wurden anschließend neue Auffanggefäße zugeordnet und für 1 Min. bei 13.000 rpm trocken mikrozentrifugiert. Im letzten Schritt der RNA-Eluierung wurden die Auffanggefäße gegen neue ausgetauscht und in die Säulen 30 µl RNase-freies Wasser pipettiert. Daraufhin wurde bei 13000 rpm 1 Min. mikrozentrifugiert und das RNase freie Wasser mit der gewonnenen RNA erneut auf die Säulen aufgetragen. Abschließend wurde der Mikrozentrifugationsschritt wiederholt und die Säulen verworfen, während die gewonnen RNA in der 30 µl Lösung verblieb.

Mit dem Nanodrop™ Spektralphotometer wurde die Konzentration und Qualität der gewonnenen RNA bei 260nm und 280nm gemessen. Nukleinsäuren absorbieren Strahlung mit einer Wellenlänge von 260nm. Diese Eigenschaft wird beim Spektralphotometer zunutze gemacht. Dieser ermittelt die Differenz der Absorptionen zwischen RNase freiem Wasser und der RNA-Lösung innerhalb einer Küvette. Dabei gilt: je höher die Absorption bei 260nm Wellenlänge, desto höher der RNA-Gehalt der Lösung im proportionalen Verhältnis. Weiterhin gibt das Spektralphotometer Auskunft über die Reinheit der gewonnenen RNA-Lösung bei einer photometrischen Bestimmung von 280nm Wellenlänge. Der Absorptionsgrad von reinen RNA-Lösungen ist anders als bei kontaminierten Lösungen bei 280nm Wellenlänge nur sehr gering. Eine Abschätzung des Reinheitsgrades kann mit einem Koeffizienten, der sich aus dem Quotienten des 260nm und 280nm Werts zusammensetzt (E_{260}/E_{280}), ermittelt werden. Dabei sollte der Wert für eine ausreichend reine Probe bei zwei liegen. Werte darunter deuten auf eine starke Kontamination.

3.11.11.1 Transkription der RNA zu cDNA

In Vorbereitung auf die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde aus der erhaltenen RNA cDNA gewonnen. Das Prinzip dahinter beruht auf der Polymerasekettenreaktion, bei der DNA in vitro mithilfe einer DNA-Polymerase und Primern vervielfältigt wird. Primer sind kurze, komplementäre DNA-Abschnitte, die an der RNA bzw. DNA binden, um für die DNA-Polymerase einen Start- und Anbindungspunkt zu gewährleisten. Für die Synthese von cDNA aus RNA wird eine reverse Transkriptase verwendet. Diese spezifische RNA-abhängige DNA-Polymerase erstellt zunächst zur RNA komplementäre cDNA-Stränge, die in weiteren Schritten über eine DNA-abhängige DNA-Polymerase ebenfalls deren komplementären cDNA Stränge bilden. Über das Enzym RNase H wird RNA abgebaut, sodass im Ergebnis cDNA verbleibt.

Die reverse Transkription der RNA zu cDNA erfolgte bei allen Proben mit einer RNA-Menge von 1 µg in einem Volumen von 20 µl. Zu den 20 µl zählen jeweils 4 µl des 5x iScript™ Reaction Mix, das als Primer Oligo-dT-Nukleotide und random Hexamer Oligonukleotide beinhaltet, sowie 1 µl der iScript™ Reverse Transkriptase, das zusätzlich noch die RNAase H besitzt. Je nach Konzentration der RNA wurde der Mix mit RNase freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

Nach Protokoll wurden die Proben im Biometra T Gradient Thermoblocks 5 Min. bei 25 °C zum Primer-Annealing erhitzt. Es folgte eine Inkubation von 30 Min bei 42°C zur Aktivierung der reversen Transkription und eine 5 Min. Inkubation bei 85°C zur Inaktivierung der Transkriptase. Im Anschluss wurden die Proben auf 4°C abkühlt. Abschließend wurden zu den Proben 80 µl RNase freies Wasser hinzu pipettiert, sodass das Gesamtvolumen 100 µl betrug.

3.11.12 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Das Prinzip der qRT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR. Sie ist eine Vervielfältigungsmethode für Nucleinsäuren, mit der man zusätzlich eine Quantifizierung der gewonnenen DNA erhält. Die Quantifizierung wird über Fluoreszenz-Messungen während eines Echtzeit-PCR-Zyklus erfasst, wobei die Fluoreszenz proportional zu der Menge der PCR-Produkte ist⁷⁶. Nach mehreren Zyklen, die ein Lauf beinhaltet, wird mithilfe der Fluoreszenzsignale die Quantifizierung zum Anfang der exponentiellen Phase der PCR durchgeführt. In dieser Phase sind die

optimalen Reaktionsbedingungen gegeben, sodass eine korrekte Quantifizierung ermöglicht wird. In dieser Arbeit beruhen die durchgeführten Messungen auf der von EvaGreen® (ähnlich wie SYBR Green I) emittierten Fluoreszenzfarbstoffs, der in doppelsträngiger DNA interkaliert.

Zunächst wurden die verwendeten Primer nach Herstellerangaben in destilliertem Wasser gelöst und bei Verwendung 1:100 mit einer Endkonzentration von 10mM verdünnt. Die Proben wurden jeweils als Triplikat auf einer 96-Well PCR-Platte auspipettiert. Jede Platte enthielt ein Negativkontroll-Triplikat mit destilliertem Wasser. Als endogene Normalisierungsgene wurde GAPDH verwendet. In jedes Well wurde 1 µl des Forward Primers, 1µl des Backward Primers, 6 µl destilliertes Wasser, 2 µl cDNA und 10 µl des sSoFast™ EvaGreen® Supermix pipettiert, das den EvaGreen® fluoreszierenden Farbstoff und weitere Komponenten wie die Polymerase und Nucleosidtriphosphate für die Amplifikation enthält. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie abgedeckt und bei 1000 rpm zentrifugiert. Für die Durchführung wurde das Real-Time PCR-Gerät CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Biorad) verwendet. Der Fluoreszenzanstieg wurde am Ende von jedem PCR-Zyklus gemessen. Die quantitative Messung basiert auf dem Zyklus, der in der Fluoreszenz einen gewissen Hintergrundwert überschreitet. Dieser Zyklus befindet sich am Anfang der exponentiellen Phase. Er wird als Threshold Cycle (C_T -Wert) bezeichnet und numerisch dargestellt. Nach einem exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz wird eine Plateauphase erreicht, in der die Produktsynthese stagniert.

Am Ende eines PCR-Laufs wird die Temperatur schrittweise bis auf ca. 95°C erhöht. Somit denaturieren die DNA-Stränge wieder in ihre Einzelstränge. Bei diesem Schritt kann abschließend eine Schmelzkurve erstellt werden. Die Schmelzkurve ermöglicht eine Überprüfung der Spezifität von den Amplifikaten, da jedes PCR-Produkt aufgrund seiner Länge und Nucleinsäurezusammensetzung bei einer charakteristischen Temperatur denaturiert. Amplifikationsartefakte denaturieren im Vergleich dazu schon bei niedrigeren Temperaturen⁹.

Die Betrachtung der Daten erfolgte über die CFX-Manager Software (Bio-Rad). Die Auswertung der Daten wurde nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode mithilfe von Microsoft® Office Excel durchgeführt und mit GraphPad® Prism 5.0 ausgewertet⁸⁶. Dabei wurden die jeweiligen C_t -Werte der untersuchten PCR-Produkte auf den C_t -Wert der endogenen

Kontrolle kalibriert und im Anschluss verglichen. Rechnerisch zeigte sich folgende Analyse:

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Behandlung}} - \Delta CT_{\text{Kontrolle}}$$

Da angenommen wird, dass sich die Anzahl der Amplifikate mit jedem Zyklus verdoppelt, errechnet sich der Expressionsunterschied wie folgt:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

3.11.13 EMSA-ELISA

Der Cayman's NF- κ B (p65) Transkription Factor Assay ist ein sensitiver Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), der Transkriptionsfaktoren, die an der DNA binden, detektiert. Die Grundidee entsprang ursprünglich dem Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA), bei dem über eine Affinitätsselektrophorese der Nachweis von DNA- oder RNA-Proteinen wie Transkriptionsfaktoren erbracht werden kann. Dabei werden Proteine mit einem bekannten DNA-Fragment inkubiert und im Anschluss auf ein Gel zusammen mit reinen DNA-Fragmenten zur Gelelektrophorese aufgetragen. Je nach Ladung, Konformation und Proteinligandenkomplex ließ sich eine Laufweitenverschiebung („band shift“) feststellen. Angelehnt an diese Grundidee bildet der ELISA, der hier verwendet wurde, eine Variation der Methode mit Verzicht der Gelelektrophorese.

Das Cayman NF- κ B (p65) Transcription Factor Assa Kit enthielt eine 96-Well Platte, die mit spezifischer doppelsträngiger DNA (dsDNA) beschichtet war. Die dsDNA wies dabei eine passende Bindungsdomäne für das Protein p65 auf. P65 gehört zu der NF- κ B/Rel-Familie, die aus mehreren Transkriptionsfaktoren bestehen und bei Aktivierung untereinander homodimere wie auch heterodimere Komplexe bilden. Liegt der ungebundene NF- κ B-Komplex mit p65 im Zellkernlysate vor, so bindet dieser an die vorgesehene Domäne der dsDNA und wird durch einen spezifischen Erstantikörper gebunden. Mithilfe eines HRP-konjugiertem Zweitantikörpers, der spezifisch an den Erstantikörper bindet, wird die kolorimetrische Absorption bei 450 nm gemessen und somit die optische Dichte bestimmt. Dabei korreliert die optische Dichte proportional mit der Menge an DNA-gebundenem p65. Zur Kontrolle wurden die im Kit enthaltene Positivkontrolle, „Competitor“-Kontrolle und Negativkontrolle herangezogen.

Zur Isolation der Zellkernproteine wurden die Zellen (3-4 Mio.) zunächst mit 120 µl WCE Puffer versetzt und bei 14000 rpm 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde 120 µl WCE Puffer und 30 µl 10% NP40 hinzu pipettiert und auf Eis 5 Min. inkubiert. Es folgte eine dreimalige für jeweils 5s lange Ultraschallbehandlung der Zellen. Daraufhin wurden die Proben erneut 5 Min. bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Kernmembran setzte sich am Boden ab, sodass sich die benötigten Zellkernlysate im Überstand befanden.

Die Kernlysate wurden nach den bei der Proteinbestimmung beschriebenen Verfahren aufbereitet und nach dem Cayman Protokoll aufgetragen. Alle folgenden Reagenzien wurden aus dem Kit nach Anleitung verwendet. Zur Aufbereitung der Kernlysate wurde gemäß dem Cayman Protokoll ein Puffer angesetzt, der unter anderem Phosphatase- und Proteaseinhibitoren beinhaltet. 90 µl des Puffers wurden mit 10 µl der jeweiligen Probe in jede Kammer pipettiert. Als Positiv- und Negativkontrollen dienten vorgegebene Proben des Kits. Die Platte wurde für 1h abgedeckt bei Raumtemperatur leicht geschüttelt und anschließend fünfmal mit 200 µl Waschlösung pro Kammer gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper, der 1:100 verdünnt worden war, erfolgte 1h in Raumtemperatur. Im Anschluss wurde der Waschlösungsschritt wiederholt und der Zweitantikörper in gleicher Verdünnung hinzugefügt sowie in gleicher Weise inkubiert. Daraufhin wurde die Platte erneut fünfmal mit 200 µl Waschlösung je Kammer gewaschen. Pro Kammer wurden anschließend 100 µl der Entwicklungslösung hinzu pipettiert. Nachdem die Platte für 30 Min. bei Raumtemperatur geschwenkt worden war, wurden jeder Kammer 100 µl der Stop-Lösung zugeführt. Abschließend wurde die photometrische Messung bei 450 nm vorgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad® Prism 5.0

3.11.14 Immunfluoreszenzfärbung

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Detektion von Proteinen oder anderen Strukturen, die mithilfe von markierten Antikörpern visualisiert werden können. Die Markierung basiert auf ein Fluorochrom, das bei einer bestimmten Wellenlänge des Lichts zur Fluoreszenz angeregt wird und über das Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird.

In dieser Arbeit wurde für die Detektion von NF-κB und IκB in Makrophagen ein Primär- in Kombination mit einem fluoreszierendem Sekundärantikörper verwendet.

Für die in Kapitel 3.11.5 bereits aufgeführte spezifische Makrophagenmarkierung zur Bestimmung der Probenreinheit wurde der Antikörper CD68 benutzt. Bei jedem Färbedurchgang wurden Negativkontrollen zum Ausschluss falsch-positiver Markierung durch Sekundärantikörper und unspezifischer Autofluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dazu wurde für die Negativkontrolle des Sekundärantikörpers anstelle des Primärantikörpers einfach-TBS und 1% BSA aufgetragen. Zur Negativkontrolle der Autofluoreszenzfärbung wurde anstatt des Primär- und Sekundärantikörpers einfach-TBS und 1% BSA angewandt. Zur sichtbaren Darstellung der Zellkerne wurde der Fluoreszenzkernfarbstoff DAPI (4,6-diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid, Carl Roth) in einer angesetzten Mowiol-DAPI-Lösung verwendet.

Die auf den Chamberslides kultivierten Makrophagen wurden bei -20 °C für 15 Min. mit einer 1:1 Acteon/Methanol-Lösung vorfixiert und bei -20°C aufbewahrt. Am Tag der Färbung wurden die Slides erneut zur Fixierung für 7 Min. in die Aceton/Methanol-Lösung getaucht. Es folgte ein dreimal durchgeführter Waschvorgang mit einfach-TBS für jeweils 10 Min. bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden die Slides für 1h bei Raumtemperatur mit dem IHC-Blocking-Puffer zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Die Proben wurden daraufhin mit dem Primärantikörper (NF-kB p65, sc-372 und IκB sc-371 bzw. CD 68 MCA1957GA), in einer Verdünnung von 1:200, und IHC-Blockingpuffer bei 4°C über Nacht inkubiert. Der dreifache Waschschritt mit einfach-TBS wurde wiederholt und der Sekundärantikörperlösung (Alexa fluor goat anti-rabbit) aufgetragen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur von 1h. Abschließend wurden die Slides erneut dreimal mit einfach-TBS gewaschen und mit der Mowiol-DAPI-Lösung sowie einem Deckgläschen verschlossen. Um eine Aushärtung des Mowioms zu gewährleisten und ein Ausbleichen der Proben zu vermeiden, wurden die Slides bei 4°C dunkel gelagert. Die Präparate wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Keyence, BZ-9000) bei 20-, 40-, und 60-facher Vergrößerung analysiert. Entsprechende Farbfilter sorgten für die Erzeugung von Licht geeigneter Wellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffs. Die digitalen Bilder wurden mit einem Kamerasystem und dem Softwareprogramm Imagelab erstellt.

3.12 Statistische Analyse

Die Messergebnisse wurden mit einem Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Zur Erfassung von Gruppenunterschieden wurde das Softwareprogramm GraphPad Prism® 5.0 verwendet. Zur Überprüfung einer vorliegenden Signifikanz im Vergleich

von Versuchsgruppen zur Kontrollgruppe wurde die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test verwendet. Bei nicht gegebenen Voraussetzungen (Normalverteilung, homogene Varianzen) wurde der Kruskal-Wallis-Test mit multiplen Vergleichen und anschließendem Dunn's-Test durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Der Vergleich zweier Gruppen wurde mittels Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde der Wert als statistisch signifikant angesehen und entsprechend mit Asterisken (* bis ***) gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Aktivierung von Makrophagen durch C0C1f in vitro

Unter dem Verschluss eines Koronargefäßes kommt es zur Ischämie der kardialen Muskelzellen und somit zum Myokardinfarkt. Hierunter findet die spezifische Peptidspaltung des cMyBP-C am N-terminalen Ende statt, das eine Größe von etwa 40 kDa besitzt und in die freie Blutbahn gelangen kann. Es wurde vermutet, dass das abgetrennte Peptid (C0C1f) eine sterile, inflammatorische Immunantwort durch die Einwanderung ins ischämische Gewebe und eine Aktivierung von Monozyten/Makrophagen initiiert.

Die aus Stammzellen gewonnenen Makrophagen wurden zu dieser Fragestellung für verschiedene Zeiträume mit rekombinatem C0C1f stimuliert. Als Kontrolle wurden unbehandelte Makrophagen herangezogen.

4.2 qRT-PCR mit verschiedenen C0C1f Konzentrationen

Bis heute ist noch nicht genau geklärt, in welchen Konzentrationen C0C1f im Blut von Patienten vor oder nach einer Erkrankung vorliegt. Die Studien beschränken sich meist auf das vollständige Protein cMyBP-C. Aufgrund dieser Studien kann man davon ausgehen, dass die erhöhte Plasmakonzentration von C0C1f zwischen 100ng/ml und 500 ng/ml liegt^{47,79}. Daher wurden murine Makrophagen mit C0C1f-Konzentrationen von 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml für 3h behandelt (**Abb. 8**). Jeder Versuchsansatz beinhaltete eine unbehandelte Kontrollgruppe, die bei der Normalisierung der experimentellen Daten auf „eins“ gesetzt wurde. Aus den Zellen wurde mRNA isoliert, um mittels qRT-PCR über deren cDNA die mRNA Transkriptionen verschiedener Zielgene zu messen. Die mRNA Abundanz des inflammatorischen Zielgens NF- κ B wurde durch die Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f um das Vierfache signifikant ($4,439 \pm 2,105$ -fache Änderung; $p=0,0119$; $n=3$) im Vergleich zur Kontrolle erhöht, während sich die mRNA Level von NF- κ B nach Stimulation mit 100 ng/ml C0C1f ($1,092 \pm 0,102$ -fache Änderung; $p=0,9999$; $n=3$) und 250 ng/ml C0C1f ($1,254 \pm 0,2613$ -fache Änderung; $p=0,9914$; $n=3$) kaum von der unbehandelten Kontrollgruppe ($1,056 \pm 0,2517$ -fache Änderung) unterschieden (**Abb. 8A**). Bei den proinflammatorischen Zytokinen konnte man bei allen drei Konzentrationen einen Expressionsanstieg erkennen (**Abb. 8B-D**). Die IL-6 mRNA Level waren durch Stimulation mit 100 ng/ml C0C1f auf das 4-Fache ($3,874 \pm 1,231$ -

fache Änderung; $p=0,9245$; $n=3$), durch 250 ng/ml C0C1f auf das 6-Fache ($6,184\pm 0,58$ -fache Änderung; $p=0,124$; $n=3$) und durch 500 ng/ml C0C1f sehr signifikant auf das 25-Fache ($25,17\pm 11,67$ -fache Änderung; $p=0,0067$; $n=3$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,036\pm 0,202$ -fache Änderung) angestiegen. Die mRNA Level des Zytokins TNF α zeigten noch deutlichere Unterschiede mit der 7-fachen Erhöhung durch 100 ng/ml C0C1f ($6,865\pm 1,447$ -fache Änderung; $p>0,9245$; $n=3$), durch 250 ng/ml C0C1f einen 10-fachen Anstieg ($10,25\pm 1,31$ -fache Änderung; $p=0,1246$; $n=3$) und durch 500 ng/ml C0C1f eine sehr signifikante Erhöhung auf das 30-Fache ($28,47\pm 8,809$ -fache Änderung; $p=0,0067$; $n=3$). Ebenso zeigte sich bei IL-1 β eine Vervielfachung der mRNA durch Stimulation mit 100ng/ml C0C1f auf das 6-Fache ($5,934\pm 0,2562$ -fache Änderung; $p=0,9245$; $n=3$), eine mRNA Transkriptions-Erhöhung auf das 10-Fache ($10,68\pm 2,932$ -fache Änderung; $p=0,1245$; $n=3$) durch 250 ng/ml C0C1f Zugabe und ein sehr signifikanter Anstieg der Transkriptionen auf das 20-Fache ($19,99\pm 3,994$ -fache Änderung; $p=0,0067$; $n=3$) nach 500 ng/ml C0C1f Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Ebenso wies die quantitative Analyse der MCP-1 mRNA eine konzentrationsabhängige Induktion auf (**Abb. 8E**). Nach Stimulation mit 100 ng/ml C0C1f konnte ein Anstieg der MCP-1 mRNA Abundanz um das Doppelte ($2,34\pm 0,09$ -fache Änderung; $p=0,6388$; $n=3$) verzeichnet werden. Die Stimulation mit 250 ng/ml C0C1f erreichte nahezu das 3-Fache ($2,735\pm 1,445$ -fache Änderung; $p=0,3388$; $n=3$) der MCP-1 mRNA Abundanzen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Stimulation mit 500 ng/ml C0C1f führte zu einer signifikanten Erhöhung der mRNA Transkriptionen um das 5-Fache ($4,72\pm 0,97$ -fache Änderung; $p=0,0139$; $n=3$).

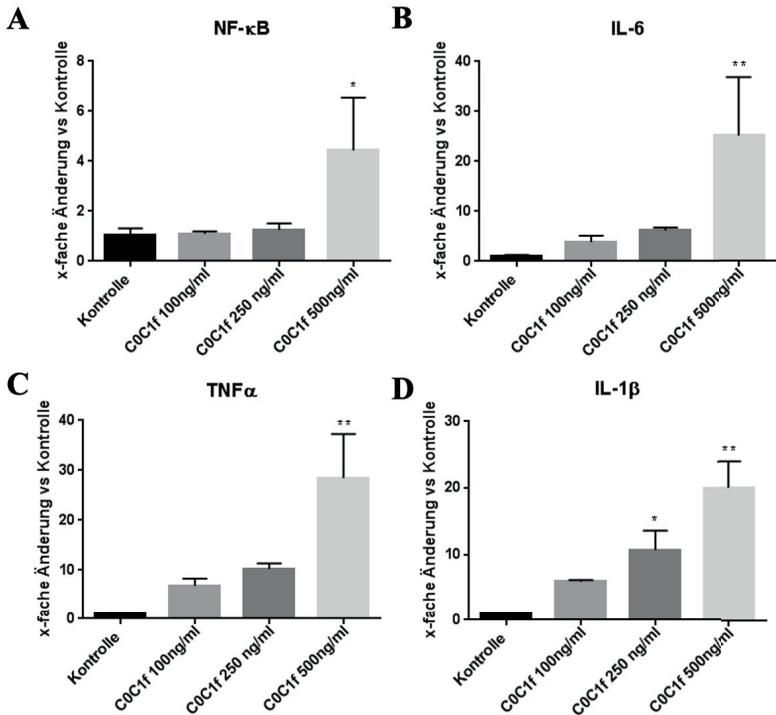
Die mRNA Mengen der Adhäsionsmoleküle lagen für ICAM-1 nach dreistündiger Stimulation mit 100 ng/ml C0C1f bei $1,325\pm 0,3401$ -Fachem ($p>0,9999$; $n=3$) der unstimulierten Kontrolle und bei dem $2,068\pm 0,772$ -Fachen ($p=0,5227$; $n=3$) nach 250 ng/ml C0C1f Stimulation. Bei der Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f konnte eine signifikante Änderung beobachtet werden ($5,715\pm 2,622$ -fach; $p=0,0276$; $n=3$) (**Abb. 8F**).

Die mRNA Mengen von VCAM-1 wiesen vergleichbare Werte um das 3- bis 4-Fache bei 100 ng/ml ($3,449\pm 1,438$ -fache Änderung; $p=0,4231$; $n=3$) und 250 ng/ml ($3,982\pm 1,023$ -fache Änderung; $p=0,2683$; $n=3$) C0C1f Konzentrationen auf. Eine 6-

fache ($5,712 \pm 1,136$ -fache Änderung; $p=0,0097$; $n=3$) Erhöhung wurde nach 500 ng/ml C0C1f Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar (**Abb. 8G**).

Auch das anti-inflammatorische Zielgen IL-10 wurde analysiert (**Abb. 8H**). Die Änderung der IL-10 mRNAs beliefen sich auf das $2,239 \pm 0,559$ -Fache ($p=0,5227$; $n=3$) nach Stimulation mit 100 ng/ml C0C1f, das $2,189 \pm 1,246$ -Fache ($p=0,6388$; $n=3$) nach Stimulation mit 250 ng/ml C0C1f und auf eine signifikante Änderung vom $3,574 \pm 0,7264$ -Fachen ($p=0,0276$; $n=3$) nach Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Aus allen Daten wird ersichtlich, dass lediglich bei einer C0C1f-Konzentration von 500 ng/ml eine signifikante Induktion der Expressionen von inflammatorischen Faktoren im Vergleich zur Kontrolle zu sehen ist.



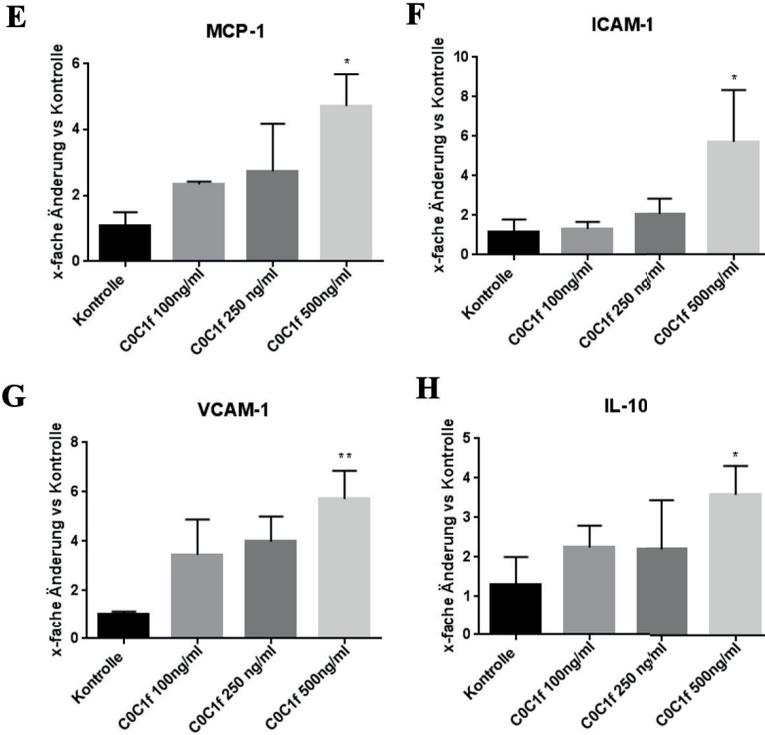


Abb. 8: Konzentrationsabhängige Induktion von inflammatorischen Markern auf murinen Makrophagen. Murine Makrophagen wurden für 3h mit 100 ng/ml, 250 ng/ml und 500 ng/ml C0C1f stimuliert. Nach mRNA Isolation wurden die mRNA Mengen von **A) NF- κ B, B) IL-6, C) TNF α , D) IL-1 β , E) MCP-1, F) ICAM-1, G, VCAM-1 und H) IL-10** mittels qRT-PCR quantifiziert (n=3) Signifikanzen sind als * $p < 0,05$ und ** $p < 0,009$ angegeben.

4.3 Zeitlicher Verlauf der durch C0C1f stimulierten murinen

Makrophagen für inflammatorische Zielgene mittels qRT-PCR

Es wurde eine Zeitreihe zur Abbildung der inflammatorischen Antwort von Makrophagen durch die Behandlung mit C0C1f erstellt. Die verwendeten Makrophagen wurden 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 3h, 4h, 5h, und 6h nach Stimulation mit 500 ng/ml C0C1f untersucht und auf die Abundanzen der proinflammatorischen Targets IL-6, IL-1 β , TNF α und MCP-1 mittels qRT-PCR getestet (**Abb. 9**). Bei allen untersuchten Targets lässt sich ein signifikanter Anstieg der Genexpressionen innerhalb der 6h erkennen (IL-

6: $334,2 \pm 216,2$ -fache Änderung; IL-1 β : $383,6 \pm 414,7$ -fache Änderung; TNF α : $135,2 \pm 95,3$ -fache Änderung; MCP-1: $58,9 \pm 17,56$ -fache Änderung).

Bei der quantitativen Analyse der IL-6 mRNA ließ sich ein Anstieg der Genexpression bereits nach einer einstündigen Stimulation mit C0C1f erkennen (**Abb. 9A**). Zu diesem Zeitpunkt stieg die mRNA Menge um das 40-Fache ($46,4 \pm 21,03$ -fache Änderung; $p > 0,9999$; $n=4$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle an. Der höchste und zugleich erste sehr signifikante Anstieg wurde nach 3h ($334,2 \pm 216,2$ -fache Änderung; $p=0,0063$; $n=4$) erreicht. Die Änderung war bei den Zeitpunkten von 4h ($195,9 \pm 108$ -fache Änderung; $p=0,0278$; $n=4$) und 5h ebenfalls ($281,6 \pm 27,39$ -fache Änderung; $p=0,0037$; $n=4$) signifikant bis sehr signifikant erhöht – trotz einer sichtbaren Reduzierung der Genexpression bei 4h im Vergleich zu den früheren Zeiträumen. Die quantifizierten Mengenänderungen der mRNA beliefen sich bei 30 Min. auf das $1,81 \pm 0,34$ -Fache ($p > 0,9999$; $n=4$), bei 1,5h auf das $39,32 \pm 16,37$ -Fache ($p > 0,9999$; $n=4$), bei 2h auf das $109,1 \pm 94,8$ -Fache ($p=0,371$; $n=4$) und bei 6h auf das $294,7 \pm 334,2$ -Fache ($p=0,0583$; $n=4$).

IL-1 β wies bereits 1h eine signifikante Änderung ($391,2 \pm 52,03$ -fache Änderung; $p=0,0151$; $n=4$) der mRNA Mengen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle auf (**Abb. 9B**). Einen Tiefpunkt erreichte die Expression nach 4h ($234,3 \pm 176,9$ -fache Änderung, $p=0,3089$, $n=4$) und stieg daraufhin zum Zeitpunkt 5h wieder auf das etwa 300-Fache der unstimulierten Kontrolle an ($323 \pm 227,7$ -fache Änderung; $p=0,0964$; $n=4$). Nach 30 Minuten ($11,27 \pm 3,44$ -fache Änderung; $p > 0,9999$; $n=4$) war ein minimaler Anstieg zu erkennen. Bei den Zeiträumen von 1,5h ($333,1 \pm 56,62$ -fache Änderung; $p=0,0809$; $n=4$), 2h (signifikant) ($336,1 \pm 181,2$ -fache Änderung; $p=0,043$; $n=4$), 3h ($280,9 \pm 192,2$ -fache Änderung; $p=0,1146$; $n=4$) und 6h ($383,6 \pm 414,7$ -fache Änderung; $p=0,2064$; $n=4$) war ein deutlicher Anstieg im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu sehen.

Ebenfalls nach 1h konnte man bei TNF α den Höchstwert mit einer sehr signifikanten Erhöhung um das 130-Fache ($135,2 \pm 95,3$ -fache Änderung; $p=0,0015$; $n=4$) im Vergleich zur Kontrolle erkennen (**Abb. 9C**). Die Expressionsänderung belief sich danach bis zum 6h Zeitpunkt ($44,37 \pm 21,15$ -fache Änderung; $p=0,9517$; $n=4$) um das 40-Fache. Dabei bildeten die Zeitpunkte 3h und 5h eine Ausnahme mit einer signifikanten Erhöhung um das bis zu 74-Fache im Vergleich zur unbehandelten

Kontrolle (3h: $64,47 \pm 12,52$ -fache Änderung; $p=0,0183$; $n=4$; 5h: $74,02 \pm 21,56$ -fache Änderung; $p=0,0112$; $n=4$).

MCP-1 mRNA Mengen stiegen innerhalb der 6h stetig an (**Abb. 9D**). Bereits nach 30 Minuten war ein leichter Anstieg im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu verzeichnen ($1,59 \pm 0,67$ -fache Änderung; $p > 0,9999$; $n=4$). Die MCP-1 mRNA Menge nahm über 1h ($6,54 \pm 2,2$ -fache Änderung; $p=0,9999$; $n=4$), 1,5h ($8,48 \pm 3,75$ -fache Änderung; $p > 0,9999$; $n=4$) und 2h ($8,83 \pm 4,5$ -fache Änderung, $p > 0,9999$, $n=4$) weiterhin zu. Nach 3h konnte eine mRNA Menge vom 20-Fachen ($20,65 \pm 9,33$ -fache Änderung; $p=0,3907$; $n=4$) und nach 4h vom 30-Fachen ($28,8 \pm 4,47$ -fache Änderung; $p=0,148$; $n=4$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gemessen werden. Das Maximum der signifikant erhöhten MCP-1 mRNA Abundanzen wurde nach 5h ($58,9 \pm 17,56$ -fache Änderung; $p=0,0136$; $n=4$) und 6h ($57,37 \pm 19,1$ -fache Änderung; $p=0,0166$; $n=4$) C0C1f Stimulation mit einer Signifikanz erreicht. Somit unterschied sich die Kinetik der MCP-1 mRNA mit ihrer kontinuierlichen mRNA-Zunahme von den proinflammatorischen Zytokinen, welche bereits nach kürzerer Stimulationszeit ihren höchsten Anstieg aufwiesen. Ebenso konnte bei den Zytokinen innerhalb der 6h anders als beim MCP-1 ein erneuter Anstieg der mRNA Transkriptionen beobachtet werden.

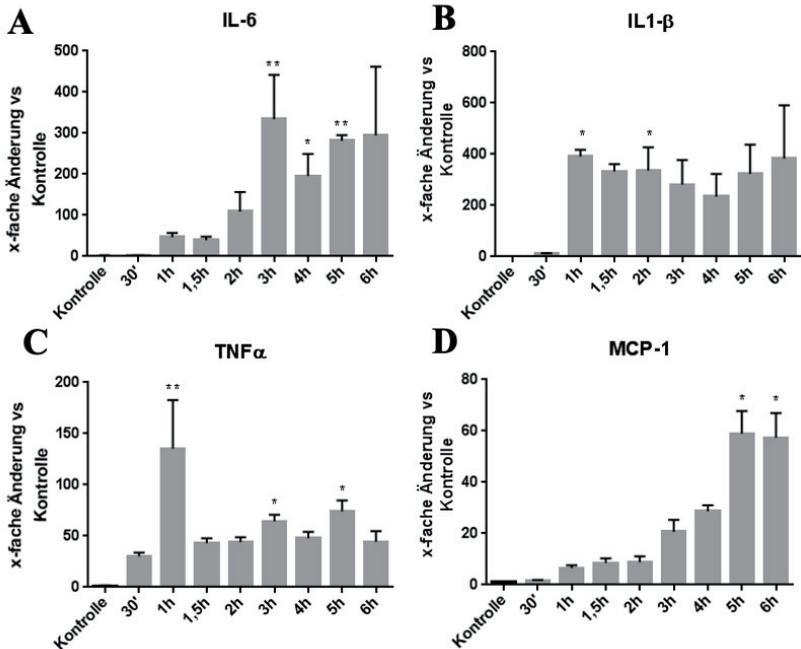


Abb. 9 A-D): Kinetik der Induktion proinflammatorischer Zytokin- und Chemokinexpression durch C0C1f. Murine Makrophagen, die für die Zeitspannen 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 3h, 4h, 5h und 6h mit C0C1f stimuliert und deren mRNA isoliert wurden, wurden für die mRNA Expressionsmessung von IL-6, IL-1β, TNFα und MCP-1 in der qRT-PCR verwendet. P Werte mit $p < 0,05$ werden als signifikant erachtet, wobei * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ bedeuten. (n=4)

4.4 qRT-PCR Analyse der Zytokin- und Chemokinexpression muriner Makrophagen nach C0C1f Behandlungen für 3h und 6h

Auf Grundlage der Zeitreihe wurden die kultivierten Makrophagen für 3h bzw. 6h mit C0C1f behandelt. Um festzustellen, ob C0C1f einen spezifischen Effekt in den Makrophagen auslöst, wurden LPS als Positivkontrolle und C0-Linker zusätzlich zur unbehandelten Kontrollgruppe als Negativkontrolle verwendet. Nach 3-stündiger Stimulation zeigten sich erneut die mRNA Expressionslevel der Zytokine IL-6 hoch signifikant ($119,6 \pm 184,6$ -fach erhöht; $p=0,0001$; $n=11$), IL-1β ebenso hoch signifikant ($254,3 \pm 298,9$ -fach erhöht; $p=0,0004$; $n=11$) TNFα sehr signifikant ($40,7 \pm 27,33$ -fach erhöht; $p=0,0005$; $n=11$), die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 ($11,8 \pm 6,9$ -fach erhöht; $p=0,0016$; $n=11$), VCAM-1 ($26,11 \pm 21,22$ -fach erhöht; $p < 0,0001$; $n=11$) sehr bis höchst

signifikant und das Chemokin MCP-1 signifikant ($13,8 \pm 11,82$ -fach erhöht; $p=0,0025$; $n=11$) erhöht (**Abb. 10A, C, E**;

Abb. 11A, C, E). C0-Linker hingegen führte zu keiner signifikanten Änderung der mRNA Abundanzen. LPS induzierte die Expression aller gemessenen proinflammatorischen Targets.

Auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wurde untersucht. Trotz einer signifikanten Abundanzsteigerung unter LPS Stimulation ($46,96 \pm 22,43$ -fache Änderung; $p=0,0027$), konnte nach Stimulation mit C0C1f ($4,14 \pm 2,51$ -fach erhöht; $p=0,19$; $n=11$) und C0-Linker kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden (**Abb. 12A**).

Ähnlich konnte nach 6h Stimulation mit C0C1f für den Großteil der proinflammatorischen Zielgene eine signifikante Induktion der Genexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Eine Induktion durch C0-Linker wurde nicht beobachtet. Dies lässt vermuten, dass auch nach 6h die proinflammatorische Antwort spezifisch durch C0C1f induziert wird und der Aktivierung durch LPS ähnelt. IL-6 ($319,7 \pm 372,7$ -fache Änderung; $p<0,0001$; $n=15$), IL-1 β ($337,9 \pm 388,5$ -fache Änderung; $p<0,0001$; $n=15$), TNF α ($10,29 \pm 2,85$ -fache Änderung; $p<0,0001$; $n=12$) und das Adhäsionsmoleküle ICAM-1 ($3,85 \pm 0,5213$ -fache Änderung; $p=0,007$; $n=12$) zeigten eine signifikante bis höchst signifikante Erhöhung der mRNA Abundanzen nach C0C1f Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (**Abb. 10B, D, F**,

Abb. 11 D). VCAM-1 hingegen konnte trotz hoher Werte keine Signifikanzen aufweisen ($19,73 \pm 12,61$ -fache Änderung; $p=0,0034$; $n=12$) (

Abb. 11F). Hierbei wurde die Auswertung von TNF α , ICAM-1 und VCAM-1 bei gegebenen Voraussetzungen mittels einfaktorieller Varianzanalyse ANOVA mit anschließendem Dunnett-Test durchgeführt. MCP-1 Abundanzen hingegen zeigten sich erhöht, ließen jedoch keine Signifikanzen erkennen ($20,11 \pm 6,23$ -fache Änderung; $p=0,5974$; $n=6$) (

Abb. 11B). Im Gegensatz zu den proinflammatorischen Faktoren ist die mRNA Abundanz des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zwar durch LPS sichtlich erhöht, kaum jedoch durch C0C1f ($1,514 \pm 0,572$ -fache Änderung, $p>0,05$, $n=6$) (**Abb. 12B**). Die mRNA Expression unter der C0-Linker Behandlung belief sich auf unterhalb des Kontrollwertes.

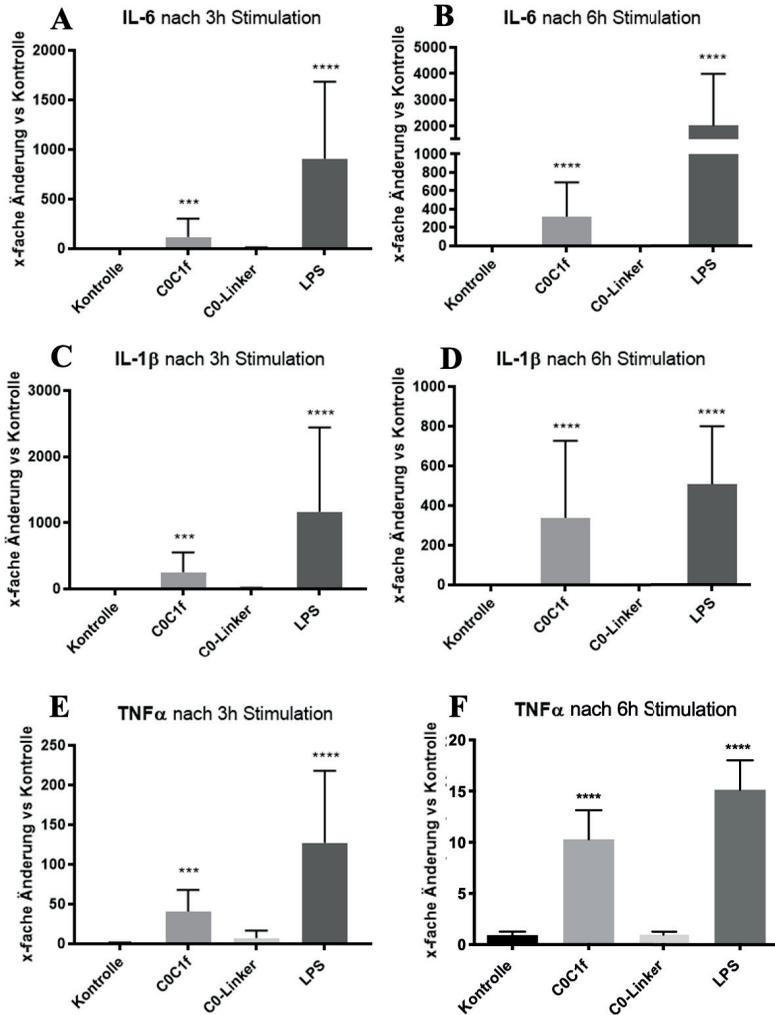


Abb. 10 A)-F): Zytokinexpressionen von murinen Makrophagen nach 3h bzw. 6h Stimulation. Makrophagen, differenziert aus isolierten murinen Knochenmarkszellen, wurden für 3h (A, C, E) bzw. 6h (B, D, F) mit 500 ng/ml COC1f, 500 ng/ml C0-Linker und 100ng/ml LPS stimuliert. Nach mRNA Isolation wurde die mRNA Abundanz von den Zytokinen IL-6, IL-1 β , TNF α mittels qRT-PCR gemessen. IL-6, IL-1 β , TNF α 3h (A, C, E); n=11, IL-6, IL-1 β 6h (B, F) n=15; TNF α 6h mit einfaktorieller Varianzanalyse ANOVA und anschließendem Dunett-Test ausgewertet

(F) $n=12$. Der Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen, wobei die Signifikanzen sich auf * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0009$, **** $p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle berufen. Nicht-signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

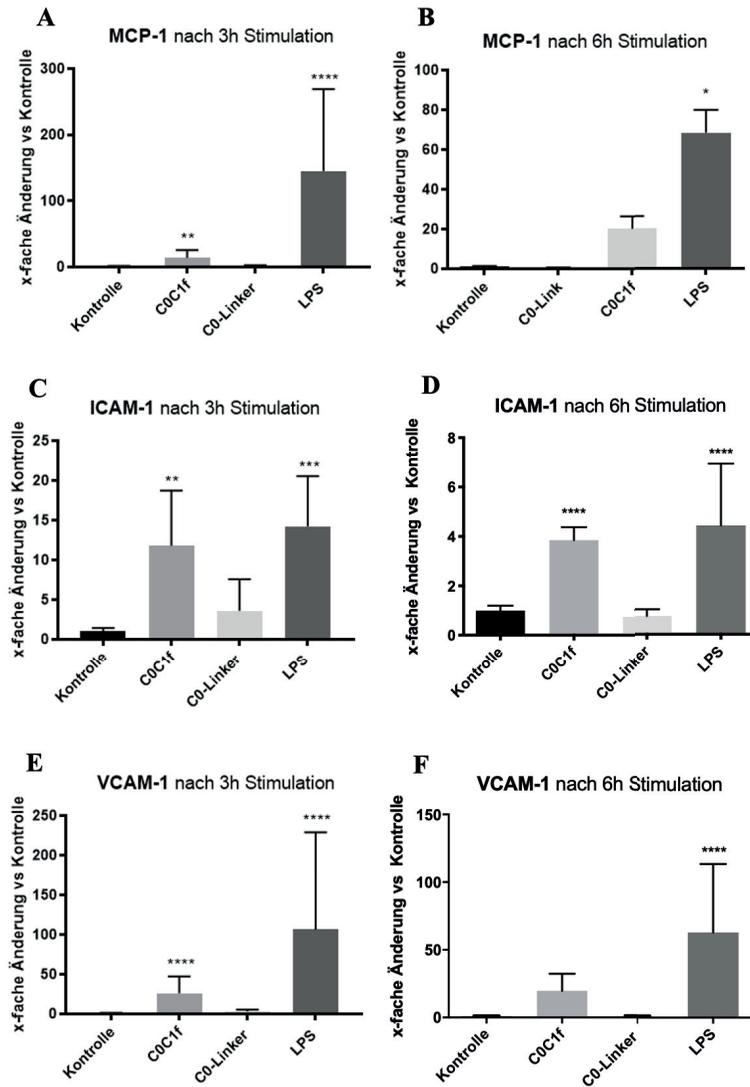


Abb. 11 A)-F): Chemokin- und Adhäsionsproteinexpressionen von murinen Makrophagen nach 3h bzw. 6h Stimulation. Makrophagen, differenziert aus isolierten murinen Knochenmarkszellen, wurden für 3h (A, C, E) bzw.

6h (B, D, F) mit 500 ng/ml C0C1f, 500 ng/ml C0-Linker und 100ng/ml LPS stimuliert. Nach mRNA Isolation wurde die mRNA Abundanz von dem Chemokin MCP-1 und den Adhäsionsproteinen ICAM-1 und VCAM-1 mittels qRT-PCR gemessen. MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 3h (A, C, E); n=11. MCP-1 (B) n=6, ICAM-1(D) n=12, VCAM-1 (F) 6h, n=12. Die Auswertung von ICAM-1 6h und VCAM-1 6h erfolgte einfaktorielles ANOVA-Test und anschließendem Dunnett-Test. Der Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen, wobei die Signifikanzen sich auf * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0009$, **** $p < 0,0001$ im Vergleich zur Kontrolle berufen. Nicht-signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

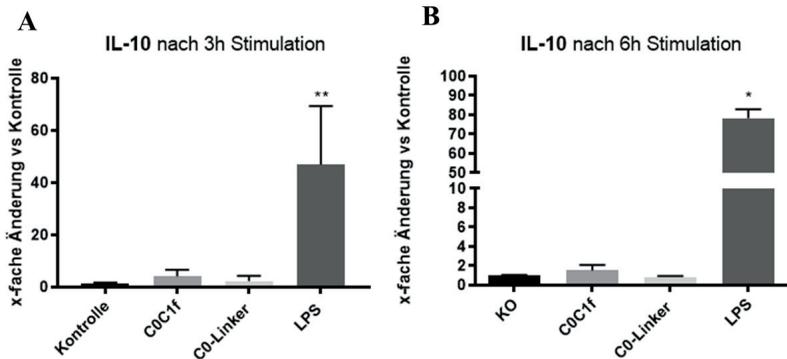


Abb. 12 A)-B) Zytokinexpression IL-10 von murinen Makrophagen nach 3h bzw. 6h Stimulation. Makrophagen, differenziert aus isolierten murinen Knochenmarkszellen, wurden für 3h (A, n=11) bzw. 6h (B, n=6) mit 500 ng/ml C0C1f, 500 ng/ml C0-Linker und 100ng/ml LPS stimuliert. Nach mRNA Isolation wurde die mRNA Abundanz von IL-10 mittels qRT-PCR gemessen. Der Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen, wobei die Signifikanzen sich auf * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ zur Kontrolle berufen. Nicht-signifikante Ergebnisse wurden nicht markiert.

4.5 Proteinnachweis im Western Blot nach Stimulation mit C0C1f

Auf Proteinebene wurden die Targets IL-1 β , TNF α und ICAM-1 untersucht. Dazu wurden die aus Stammzellen gewonnenen murinen Makrophagen für verschiedene Zeiträume (3h, 6h, 9h, 24h) unter Zugabe von C0C1f, LPS und C0-Linker kultiviert. Für die Proteinisolation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit WCE-Puffer versetzt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von den Kulturschalen gelöst und in Eppendorf Tubes® überführt. Nach einer Inkubation mit 10%igen NP40 und kurzer Zentrifugation wurde der Überstand in neue Eppendorf Tubes® abgetragen. Die Proteinmengen wurden mithilfe des „Protein Standard Assays“ ermittelt.

Für den Western Blot wurden jeweils 20 μ g der Proben auf das Gel aufgetragen. Für die Auswertung wurde die Kontrollgruppe auf den Wert eins normalisiert und entsprechend der Relation die übrigen Werte berechnet. Bei allen drei Inflammationsmediatoren konnte eine deutliche Erhöhung auf Proteinebene im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden.

Es zeigte sich bei IL-1 β (**Abb. 13**) ein deutlicher Anstieg der Proteinmenge nach Stimulation mit C0C1f im Vergleich zur Kontrolle. Bereits nach drei Stunden befand sich die messbare Ausprägung der Bande bei dem 14-Fachen der normalisierten Kontrolle. Eine zyklusähnliche Beobachtung ließ sich feststellen: Die Proteinmenge verringerte sich nach 6h und war nach 9h bei einem Wert von 16-fach wieder erhöht. Beim Zeitpunkt von 24h war eine leichte Erhöhung der IL-1 β -Proteinmenge (2-fach) im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen. Die Behandlung mit dem C0-Linker Peptid führte zu einer Reduktion der IL-1 β Proteine (0,3-Fach) im Vergleich zur Kontrollgruppe. LPS, die Positivkontrolle, induzierte nach 6h einen 35-fachen IL-1 β -Proteingehalt zur Kontrollgruppe.

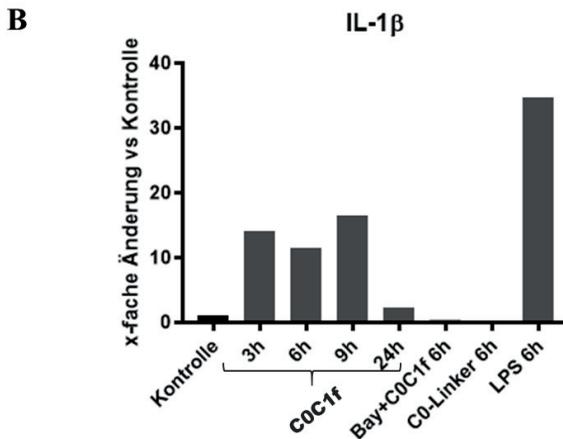
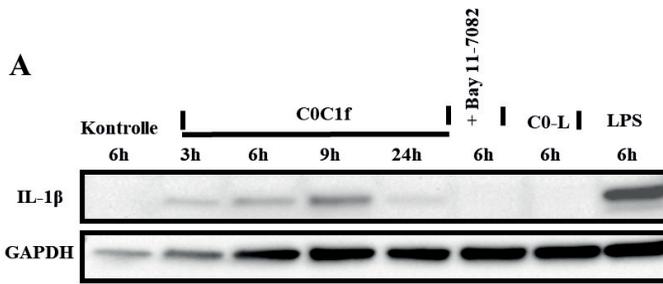


Abb. 13 Analyse von IL-1 β nach C0C1f Behandlung auf Proteinebene. A) IL-1 β Induktion der Makrophagen nach C0C1f Behandlung auf Proteinebene. Murine Makrophagen wurden für 3h, 6h, 9h und 24h mit C0C1f stimuliert. Zur Negativ- bzw. Positivkontrolle wurden murine Makrophagen 6h mit C0-Linker bzw. LPS behandelt. Eine Gruppe von murinen Makrophagen wurde sowohl 6h mit C0C1f behandelt als auch mit dem NF- κ B Inhibitor Bay 11-7082 zuvor 1h inkubiert. Nach Proteinisolierung wurden die Proteine über die Bindung mit IL-1 β Antikörpern auf einer Membran geblotet und anhand der Bandenausprägung ausgewertet. B) Quantitative Analyse des Western Blots

Auch bei TNF α (**Abb. 14**) konnte mittels des Western Blot Verfahrens eine zyklusähnliche Induktion der Proteinausschüttung nach Stimulation mit C0C1f in murinen Makrophagen festgestellt werden. Nach 3h wurde eine 13-fache Erhöhung der Proteine im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt. Es kam nach 6h zu einer Abflachung der Werte auf das 11-Fache der Kontrollgruppe und nach 9h abermals zu einem Anstieg auf das 16-Fache. Nach 24h belief sich der Proteingehalt von TNF α auf das 2,5-Fache im Vergleich zur Kontrolle. Die Stimulation mit dem C0-Linker Peptid

erreichte das 0,15-Fache im Vergleich zur Kontrolle. LPS induzierte die höchste Proteinexpression mit einem 19-fachen Wert.

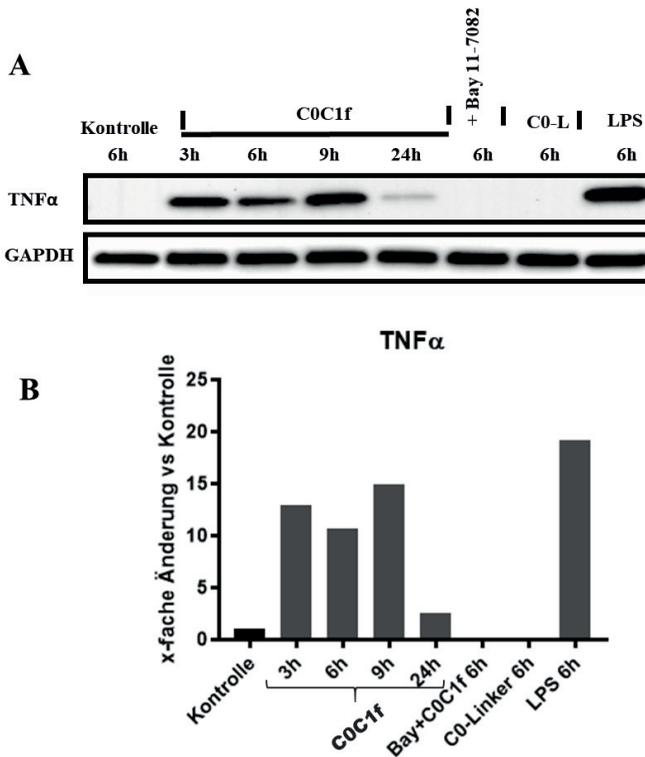


Abb. 14 Analyse von TNF α nach C0C1f Behandlung auf Proteinebene. A) TNF α Induktion der Makrophagen nach C0C1f Behandlung auf Proteinebene. Murine Makrophagen wurden für 3h, 6h, 9h und 24h mit C0C1f stimuliert. Zur Negativ- bzw. Positivkontrolle wurden murine Makrophagen 6h mit C0-Linker bzw. LPS behandelt. Eine Gruppe von murinen Makrophagen wurde sowohl 6h mit C0C1f behandelt als auch mit dem NF- κ B Inhibitor Bay 11-7082 zuvor 1h inkubiert. Nach Proteinisolierung wurden die Proteine über die Bindung mit TNF α Antikörpern auf einer Membran gebロットet und anhand der Bandenausprägung ausgewertet. **B)** Quantitative Analyse des Western Blots

Bei dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 (**Abb. 15**) stieg die gemessene Proteinmenge angefangen bei 3h auf das 122-Fache und bei 9h auf das 344-Fache an. Nach 24h gab es einen Rückgang auf ein vergleichbares Niveau wie nach 3h (123-Fache). Die Behandlung mit dem C0-Linker Peptid führte zu keiner Induktion der ICAM-1

Proteinexpression (0,12-Fache). Die Positivkontrolle LPS führte zu einem 47-fachen Anstieg der ICAM-1 Proteinmenge im Vergleich zur Kontrolle.

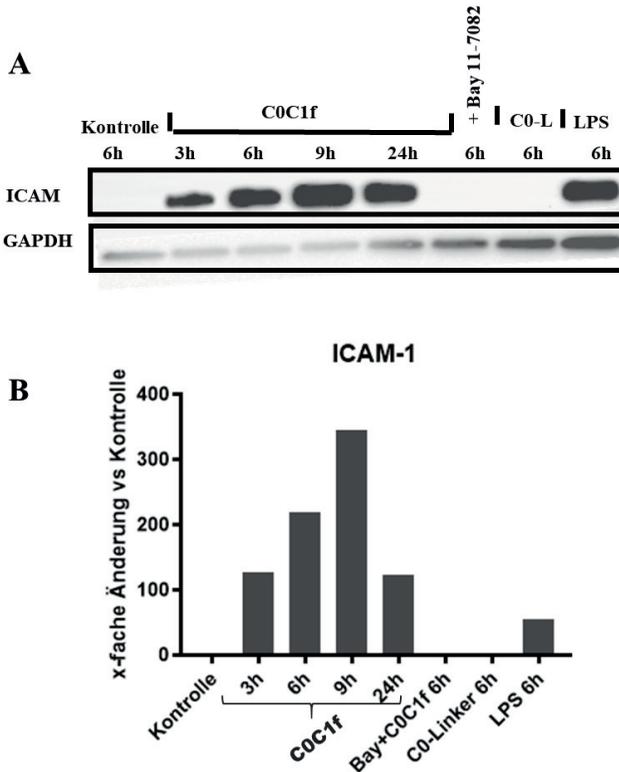


Abb. 15 Analyse von ICAM-1 nach C0C1f Behandlung auf Proteinebene. A) ICAM-1 Induktion der Makrophagen nach C0C1f Behandlung auf Proteinebene. Murine Makrophagen wurden für 3h, 6h, 9h und 24h mit C0C1f stimuliert. Zur Negativ- bzw. Positivkontrolle wurden murine Makrophagen 6h mit C0-Linker bzw. LPS behandelt. Eine Gruppe von murinen Makrophagen wurde sowohl 6h mit C0C1f behandelt als auch mit dem NF- κ B Inhibitor Bay 11-7082 zuvor 1h inkubiert. Nach Proteinisolierung wurden die Proteine über die Bindung mit ICAM-1 Antikörpern auf einer Membran geblotet und anhand der Bandenausprägung ausgewertet. **B)** Quantitative Analyse des Western Blots

4.6 C0C1f induziert die Immunantwort über den NF- κ B-Signalweg

Vermehrte inflammatorische Zytokinexpressionen und erhöhte Proteinmengen konnten in murinen Makrophagen nach C0C1f Stimulation wie oben beschrieben nachgewiesen werden (Kapitel 4.2-4.5). Um den intrazellulären Mechanismus dieser Immunantwort

zu ergründen, wurde der NF- κ B-Signalweg im Zusammenhang mit der C0C1f Stimulation untersucht. Wie in Kapitel 1.4 erwähnt, finden in Immunzellen zahlreiche inflammatorische Reaktionen über die Aktivierung von NF- κ B auch im Rahmen von myokardialer Ischämie und Reperfusion statt.

4.6.1 Inhibition der NF- κ B-vermittelten inflammatorischen Antwort von murinen Makrophagen durch Bay 11-7082

Um in Erfahrung zu bringen, inwiefern NF- κ B eine Rolle in der Aktivierung von Makrophagen durch C0C1f einnimmt, wurde der NF- κ B-Signalweg in den kultivierten Makrophagen über die Behandlung mit dem Inhibitor Bay 11-7082 unterbunden. Zu diesem Zweck wurden murine Makrophagen zunächst mit 10 μ M Bay11-7082 1h vorbehandelt. Im Anschluss erfolgte die Gabe von C0C1f für die Dauer von 2h, 3h, 4h und 6h. Bei allen Targets und zu allen untersuchten Zeitpunkten wiesen die mit Bay 11-7082 behandelten Zellen eine deutlich geringere Induktion der proinflammatorischen mRNAs auf (**Abb. 16**).

Durch die Vorbehandlung mit Bay 11-7082 kam es zu einer reduzierten Induktion vom 100-Fachen durch alleinige C0C1f Stimulation (109,1 \pm 94,8-fache Änderung; $p=0,371$; $n=4$) auf das 20-Fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (21,15 \pm 20,51-fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$) zum Zeitpunkt von 2h (**Abb. 16A**). Am prägnantesten zeigte sich der Unterschied nach 3h, bei dem der sehr signifikante Wert vom 300-Fachen (334,2 \pm 216,2-fache Änderung; $p=0,0063$; $n=4$) auf das 8-Fache unter Bay 11-7082 Behandlung (8,29 \pm 4,77-fache Änderung, $p>0,9999$, $n=4$) gesunken ist. Auch nach 6h konnte ein deutlicher Unterschied mit einer Differenz vom 270-Fachen zwischen alleiniger C0C1f Stimulation (294,7 \pm 334,2-fache Änderung; $p=0,0583$; $n=4$) und der zusätzlichen Inhibition durch Bay 11-7082 (22,51 \pm 22,11-fache Änderung; $p<0,9999$; $n=4$) beobachtet werden.

Bei der Untersuchung von IL-1 β mRNA (**Abb. 16B**) konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die mRNA-Gehalte zu den Zeitpunkten von 2h (30,48 \pm 15,33-fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$), 3h (8,46 \pm 3,18-fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$), 4h (3,3 \pm 0,22-fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$) und 6h (19,67 \pm 12,93-fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$) nach Behandlung mit Bay 11-7082 im Gegensatz zu einer Behandlung mit C0C1f allein bei signifikanter Erhöhung unter 2h (336,1 \pm 181,2-fache Änderung; $p=0,043$; $n=4$), 4h (234,3 \pm 176,9-fache Änderung; $p=0,3089$; $n=4$) und 6h

(383,6±414,7-fache Änderung; $p=0,2064$; $n=4$) eine weitaus niedrigere Abundanz aufwiesen.

Die Expression von TNF α (**Abb. 16C**) zu den jeweiligen Zeitpunkten wies einen um mindestens die Hälfte minimierten Wert nach Inhibition auf. Am deutlichsten zeigte sich der Unterschied nach 3h Inhibition, wobei die signifikante Expressionserhöhung von über 60-Fachem bei alleiniger C0C1f Stimulation (64,47±12,52-fache Änderung; $p=0,0183$; $n=4$) auf das etwa 10-Fache unter Bay 11-7082 Vorbehandlung (11,14±3,47-fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$) sank. Zum Zeitpunkt von 2h und 6h unter zusätzlicher Bay 11-7082 Behandlung lagen die Werte bei der Hälfte (2h: 22,31±6,42-fachen Änderung; $p>0,9999$; $n=4$; 6h: 18,97±10,97-fachen Änderung; $p>0,9999$; $n=4$) vom ursprünglichen Wert der alleinigen C0C1f Stimulation (2h: 44,12±9,33-fache Änderung; $p=0,7137$; $n=4$; 6h: 44,37±21,15-fache Änderung; $p=0,517$; $n=4$). Ähnlich verhielt es sich bei 4h (15±9,2-fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$) unter der Co-Behandlung mit Bay 11-7082. Nach 4h lagen die Werte um das 30-Fache niedriger als bei der C0C1f Stimulation ohne Bay (47,8±12,68-fache Änderung; $p=0,2853$; $n=4$).

Die Analyse der mRNA des Chemokins MCP-1 wies die gleiche Tendenz mit deutlich geringeren Werten durch den Inhibitor Bay 11-7082 auf (**Abb. 16D**). Die größte Reduzierung von signifikanten Abundanzen konnte nach 6h vom signifikant erhöhten 60-Fachen (57,37±19,1-fache Änderung; $p=0,0166$; $n=4$) unter alleiniger C0C1f Stimulation auf ein insignifikantes Niveau vom 5-Fachen (5,51±6,28-fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$) unter der Bay 11-7082-Vorbehandlung beobachtet werden. Zu den Zeitpunkten 2h (1,49±0,88-fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$) und 3h (1,29±0,51-fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$) wiesen die Abundanzen vergleichbare Werte mit der unbehandelten Kontrollgruppe auf. Im Vergleich dazu wurden unter alleiniger C0C1f Stimulation deutlich höhere Werte vom 8-Fachen (2h: 8,83±4,487; $p>0,9999$; $n=4$) bis 20-Fachem (3h: 20,65±9,33-fache Änderung; $p=0,3907$; $n=4$) verzeichnet. Ebenso war nach 4h ein deutlicher Rückgang der Expression vom 30-Fachen (28,8±4,47-fache Änderung; $p=0,148$; $n=4$) auf das 5-Fache (5,3 ± 5,89-fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$) unter der Bay 11-7082 Vorbehandlung zu erkennen. Letztendlich konnte man, nachdem die Zellen mit Bay 11-7082 behandelt wurden, bei allen untersuchten Inflammationsmediatoren eine Reduktion der mRNA-Abundanzen um mindestens die Hälfte der Induktionswerte durch C0C1f beobachten.

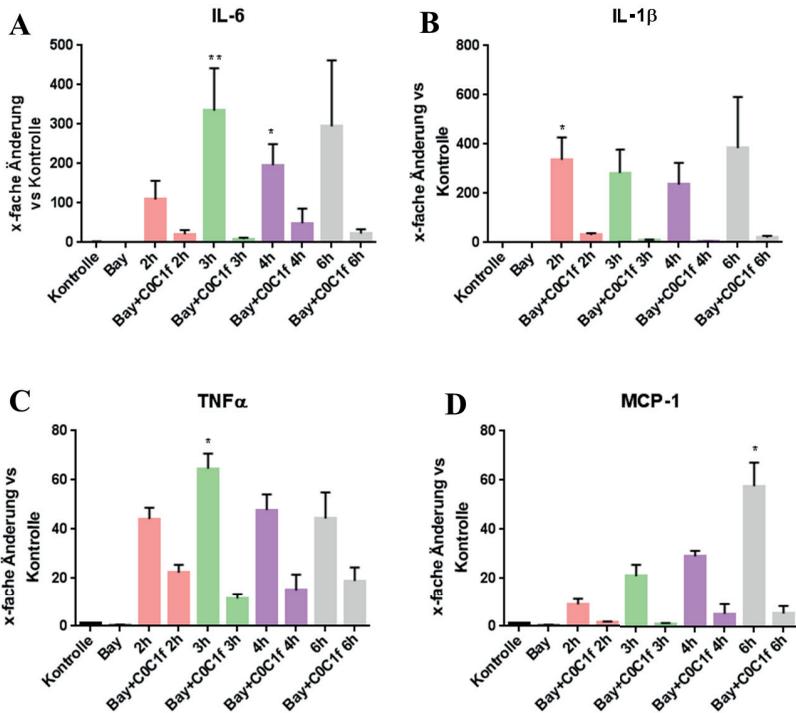


Abb. 16 A-D: Inhibition der NFκB-vermittelten inflammatorischen Antwort von murinen Makrophagen. Murine Makrophagen wurden vor der Stimulation mit C0C1f für 2h, 3h, 4h, 6h für 1h mit Bay 11-7082 vorbehandelt. Nach der mRNA Isolation wurde die mRNA Abundanz von IL-6, IL-1β, TNFα und MCP-1 in der qRT-PCR analysiert. Dabei wurde ein Wert von $p < 0,05$ als signifikant angesehen, wobei * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ bedeuten. ($n=4$).

4.6.2 Zytokinexpressionen muriner Makrophagen nach dreistündiger Behandlung mit C0C1f und Bay 11-7082

Da bei den aufgeführten Targets in den Zeitreihen nach 3h ein deutlicher Unterschied zur Kontrollgruppe zu erkennen war, nahm dieser Zeitraum für die Folgeversuche eine größere Relevanz ein. Nach Isolation muriner Stammzellen und deren Ausdifferenzierung zu Makrophagen, wurden diese für 3h mit C0C1f bzw. 1h mit Bay 11-7082 vorbehandelt. Aus den kultivierten Makrophagen wurde mRNA isoliert und über cDNA mittels qRT-PCR der mRNA Gehalt von IL-6, IL-1β, TNFα, MCP-1, ICAM-1 und VCAM-1 quantifiziert (Abb. 17).

Alle gemessenen mRNA-Gehalte waren unter einer C0C1f Behandlung signifikant erhöht. Ein deutlich geringerer Messwert der Expressionen konnte bei allen mRNA-Gehaltswerten nach Vorbehandlung mit Bay 11-7082 beobachtet und im Folgenden untereinander sowie in Relation zur unbehandelten Kontrolle verglichen werden. C0-Linker induzierte keine vermehrte mRNA-Expression. Eine LPS Stimulation diente als Positivkontrolle und induzierte die mRNA-Expression aller proinflammatorischen Zytokine inklusive IL-10 signifikant.

Der gemessene IL-6 mRNA Gehalt vom hoch signifikanten $119,6 \pm 184,6$ -Fachem bei C0C1f Stimulation ($p=0,0001$; $n=10$) war auf das $3,56 \pm 3,48$ -Fache ($p>0,9999$; $n=11$) unter der Bay 11-7082 Vorbehandlung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle reduziert und damit auf drei Prozent des ursprünglichen C0C1f Wertes. Den größten Unterschied verzeichnete IL-1 β mit einer mRNA Abundanzreduzierung auf nahezu ein Prozent der ursprünglich hoch signifikanten Expressionserhöhung unter C0C1f Stimulation ($254,3 \pm 289,9$ -fache Änderung; $p=0,0004$; $n=10$) bei einer Bay 11-7082 Vorbehandlung ($3,19 \pm 3,5$ -Fache, $p<0,9999$, $n=11$). Die TNF α ($4,49 \pm 4,52$ -fache Änderung; $p>0,9999$; $n=11$) und MCP-1 Expression ($1,3 \pm 0,43$ -fache Änderung; $p>0,9999$; $n=11$) reduzierte sich unter der Vorbehandlung mit Bay 11-7082 auf zehn Prozent des hoch signifikanten bzw. sehr signifikanten Wertes der C0C1f Stimulation allein (TNF α : $40,71 \pm 27,33$ -fache Änderung; $p=0,0005$; $n=10$; MCP-1: $13,81 \pm 11,82$ -fache Änderung; $p=0,0025$; $n=10$). Ein deutlicher Rückgang auf siebzehn Prozent der durch C0C1f Stimulation gemessenen Werte wurde auch bei ICAM-1 ($2,04 \pm 2,82$ -fache Änderung; $p>0,9999$; $n=11$) in Relation zur sehr signifikanten $11,8 \pm 6,94$ -fache Änderung, $p=0,0016$, $n=10$) und IL-10 ($0,74 \pm 0,5$ -fache Änderung; $p>0,9999$; $n=11$) in Relation zur $4,14 \pm 2,51$ -fache Änderung; $p=0,1878$; $n=10$) durch die Bay 11-7082 Vorbehandlung sichtbar. Bei VCAM-1 belief es sich auf etwa fünfzehn Prozent des mRNA Gehalts von der durch C0C1f allein höchst signifikant erhöhten Änderung unter der Bay 11-7082 Vorbehandlung ($3,86 \pm 6,53$ -fache Änderung; $p>0,9999$; $n=11$) in Relation zur $26,11 \pm 21,22$ -fache Änderung; $p<0,0001$; $n=10$).

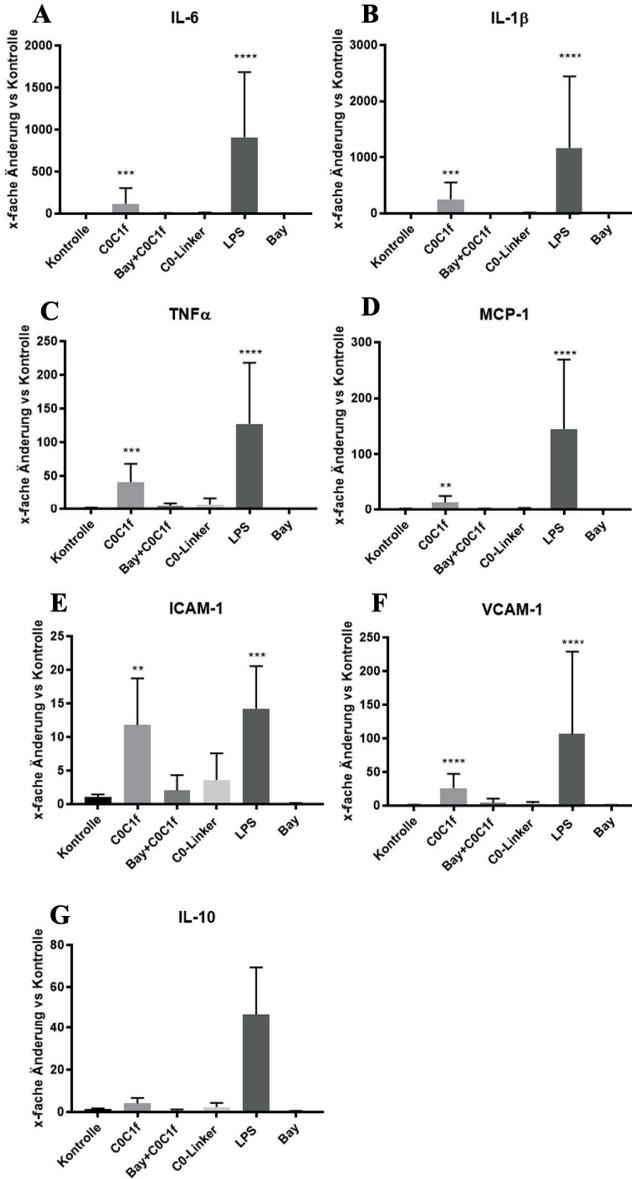


Abb. 17 A)-G): Inhibition der NF- κ B-vermittelten inflammatorischen Antwort von murinen Makrophagen.

Murine Makrophagen wurden für 3h mit COC1f, CO-Link oder LPS stimuliert und zuvor für 1h mit Bay 11-7082

*behandelt. Nach Isolation der mRNA wurden die mRNA Mengen von IL-6, IL-1 β , TNF α und MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 und IL-10 in der qRT-PCR quantifiziert. Dabei ein P-Wert von $p < 0,05$ als signifikant angesehen, wobei ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0009$, **** $p < 0,0001$ bedeuten. (C0C1f n=10, C0-Linker n=3, LPS n=3, Bay 11-7082 +C0C1f n=11)*

4.6.3 Proteinnachweis nach Behandlung mit C0C1f und Bay 11-7082

Auf Proteinebene wurde nun untersucht, ob die inflammatorische Antwort der Makrophagen, induziert durch C0C1f, über die Aktivierung von NF- κ B vermittelt wird. Hierzu wurde die Wirkung des NF- κ B-Inhibitors Bay 11-7082 auf die inflammatorische Antwort der murinen Makrophagen mittels Western Blot bestimmt. Aus murinen Stammzellen differenzierte Makrophagen wurden zunächst mit 10 μ M Bay 11-7082 vor der 6-stündigen C0C1f Stimulation für 1h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen nach den entsprechenden Zeiträumen geerntet und zur Proteinisolation herangezogen. Die in den Abbildungen 13 – 15 aufgeführten Western Blots zeigen die qualitative und quantitative Analyse für die Zytokine IL-1 β und IL-6 sowie das Adhäsionsmolekül ICAM-1 auf Proteinebene. Wie bereits in Kapitel 4.5 beschrieben, ließ sich nachweisen, dass alle drei Zielgene auch auf Proteinebene durch C0C1f Behandlung induziert wurden. Unter einer Bay 11-7082 Vorbehandlung zeigte die quantitative Analyse einen deutlich geringeren Wert der Proteinlevels. IL-1 β wies Reduzierung vom 14-Fachen auf das 0,5-Fache der unstimulierten Kontrolle auf (**Abb. 13**). Ebenso wurde bei TNF α ein ähnlicher Rückgang vom 11-Fachen auf das 0,16-Fache der unstimulierten Kontrolle gemessen (**Abb. 14**). ICAM-1 sank auf Proteinebene vom 219-Fachen auf das 0,4-Fache des Kontrollwertes (**Abb. 15**) unter der Bay 11-7082 Vorbehandlung. Somit wurden die Proteinexpressionen der durch C0C1f induzierten proinflammatorischen Zielgene, die untersucht wurden, durch Bay11-7082 nahezu vollständig inhibiert.

4.6.4 Detektion des Transkriptionsfaktors NF- κ B –mittels EMSA-ELISA

Mit dem „EMSA-ELISA NF- κ B Transcription Factor Assay Kit“ kann DNA gebundenes NF- κ B quantitativ nachgewiesen werden. Auf der aufbereiteten 96-Well Platte befindet sich immobilisierte doppelsträngige DNA mit einer NF- κ B Bindungsdomäne. In der NF- κ B Signalkaskade transloziert das aktivierte NF- κ B Molekül in den Zellkern und bildet durch die Bindung an DNA den

Transkriptionsfaktor für inflammatorische Faktoren. Somit gilt das an der DNA gebundene NF- κ B Molekül als die nachweislich aktivierte Form.

In Vorbereitung des EMSA-ELISAs wurden murine Makrophagen mit C0C1f für verschiedene Zeiträume (2 h, 4 h, 6 h, 9 h, 24 h) stimuliert und eine Gruppe von Zellen zuvor für 1h mit Bay 11-7082 inhibiert. Die Makrophagen wurden nach den angegebenen Zeiträumen geerntet und lysiert. Zur Isolation der Zellkerne wurde mithilfe von WCE Puffer und NP40 zunächst die Zellmembran und Zellkernmembran aufgelöst, um nach erfolgter Zentrifugation die Zellkernlysate abzupipettieren. Die Zellkernproteine wurden auf die nach dem Cayman-Protokoll aufbereitete Platte aufgetragen (25 μ g pro Well). Somit wurden möglichst NF- κ B-Moleküle, welche sich im Zellkern befanden, an die für die für NF- κ B spezifische Bindungsdomäne der dsDNA der Platte gebunden. Durch den Waschvorgang wurden alle nicht an der DNA gebundenen Proteine ausgewaschen. NF- κ B wurde zunächst von einem Primärantikörper gebunden, der wiederum von einem spezifischen HRP-konjugierten Sekundärantikörper gebunden wurde. Die somit messbare kolorimetrische Absorption bei 450 nm wurde zur Bestimmung der optischen Dichte herangezogen (**Abb. 18**). Bei der Messung wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den mit C0C1f stimulierten Makrophagen und der entsprechenden Kontrollgruppe sichtbar. Dabei korreliert die gemessene optische Dichte proportional zum detektierten Anteil an aktivierten NF- κ B-Komplexen. Die Daten wurden genormt, indem die Kontrollen auf null gesetzt wurden, um die Unterschiede einfacher darzustellen. Dabei wies C0C1f nach 2h und 4h eine optische Dichte von 0,11 (2h: $0,11 \pm 0,18$; 4h: $0,11 \pm 0,07$) sowie nach 6h den doppelten Wert von $0,2 \pm 0,01$ auf. Nach 24h belief sich der Messwert der optischen Dichte wieder auf $0,2 \pm 0,04$. Unter der Vorbehandlung mit Bay 11-7082 mit nachfolgender C0C1f-Stimulation für 2h und 4h konnten Werte von $0,04 \pm 0,09$ bzw. $-0,01 \pm 0,04$ in Relation zur auf null genormten, unstimulierten Kontrolle gemessen werden. Auch nach dem 6h Zeitraum belief sich der Wert für die optische Dichte nach einer Bay 11-7082 Vorbehandlung auf $0,002 \pm 0,05$ und somit um den des genormten Kontrollwertes. Unter alleiniger Vorbehandlung mit Bay 11-7082 ohne nachfolgende C0C1f Stimulation lag der gemessene Wert ebenfalls bei 0. Die Negativkontrolle C0-Linker lag bei allen Zeitpunkten unterhalb von den C0C1f-Werten, während die Positivkontrolle LPS den Werten von C0C1f ähnelte oder niedrige Werte aufzeigte (24h: 0,18; 6h: $0,14 \pm 0,11$; 4h: $0,01 \pm 0,02$; 2h: $0,2 \pm 0,18$). Demnach lag die optische Dichte unter der Bay 11-7082

Vorbehandlung stets deutlich unterhalb der Werte von den stimulierten Makrophagen, die nur mit C0C1f behandelt wurden.

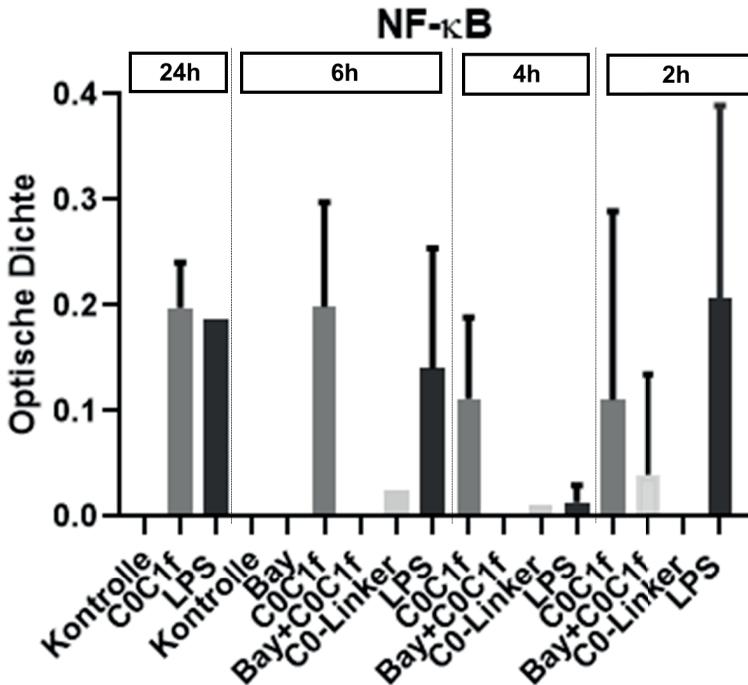


Abb. 18 Nachweis des DNA gebundenen NF-κB Proteins mittels EMSA ELISA. Stimulation muriner Makrophagen mit 500ng/ml C0C1f allein und unter Vorbehandlung mit 10μM von Bay 11-7082 für 2h, 4h, 6h (n=3) und 24h (n=2). Positiv- bzw. Negativkontrolle mittels LPS bzw. C0-Linker Behandlung sowie unbehandelten Kontrollen zu gegebenen Zeiträumen. Nach Proteinisolierung der Makrophagen wurde die aktivierte, an DNA gebundene Form des NF-κB Proteins quantitativ mithilfe des EMSA ELISA's bei 450nm photometrisch bestimmt.

4.6.5 Nachweis von NF-κB und IκB Proteinen durch Immunhistochemie

Um die Induktion von NF-κB unter C0C1f-Stimulation auch immunhistochemisch sichtbar zu machen, wurden murine Makrophagen nach dem Passagieren auf Objektträgern mit Chamber-Slide-System ausgesät und angelehnt an das qRT-PCR Schema für 3h, 6h, 9h sowie 24h mit C0C1f stimuliert (**Abb. 19**). Zur Detektion der

NF- κ B-Aktivierung wurde ein spezifischer NF- κ B-p65- sowie ein I κ B α -Antikörper verwendet. NF- κ B-p65 bildet eine Untereinheit des NF- κ Bs. I κ B α bindet an das inaktivierte NF- κ B-p65-Protein. Durch Aktivierung von IKK wird I κ B α phosphoryliert, wodurch NF- κ B-p65 freigesetzt wird, seine aktivierte Form einnimmt und in den Zellkern transloziert.

Als Positivkontrolle diente die Stimulation mit LPS. Hierfür wurden die murinen Makrophagen für die gleichen Zeiten mit LPS stimuliert. Es ist bekannt, dass LPS bei Inflammation den NF- κ B-Signalweg in Monozyten aktiviert und dies die Zytokinausschüttung induziert⁵⁰. Bei der Färbung nach LPS-Behandlung konnte man bereits nach 3h eine Anreicherung von rotmarkiertem p65 im Zytoplasma erkennen (**Abb. 19D**), die über die Zeit bis 24h nach Stimulation (**Abb. 19F, H**) weiter zunimmt. Die mit DAPI gefärbten Zellkerne sind blau dargestellt. Bei den unbehandelten Negativkontrollen sieht man lediglich vereinzelt ein schwaches p65-Signal in Rot (**Abb. 19B**) bzw. eine Rotfärbung von ca. 50 % der Zellen im Zytoplasma (**Abb. 19A**) im Vergleich zu den behandelten Zellgruppen. Nach 3h und 9h war bei einigen Makrophagen auch ein spezifisches Signal auf Ebene des Zellkerns zu erkennen (**Abb. 20B, C**), was eine Translokation der NF- κ B-Untereinheit vermuten lässt.

Ein ähnliches Muster zeigte sich bei den mit C0C1f stimulierten Makrophagen. In nahezu allen C0C1f stimulierten Makrophagen nach 3h, 9h und 24h hingegen wurden ein rotgefärbtes Zytoplasma und damit eine mutmaßliche Anreicherung von aktivem p65 sichtbar (**Abb. 19C, E, G**). Nach 3h konnte zusätzlich die Rotfärbung von p65 auf Zellkernebene detektiert werden (**Abb. 20A**). Ab dem Zeitpunkt von 3h scheint demnach eine größere Menge an aktiviertem p65 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorhanden zu sein.

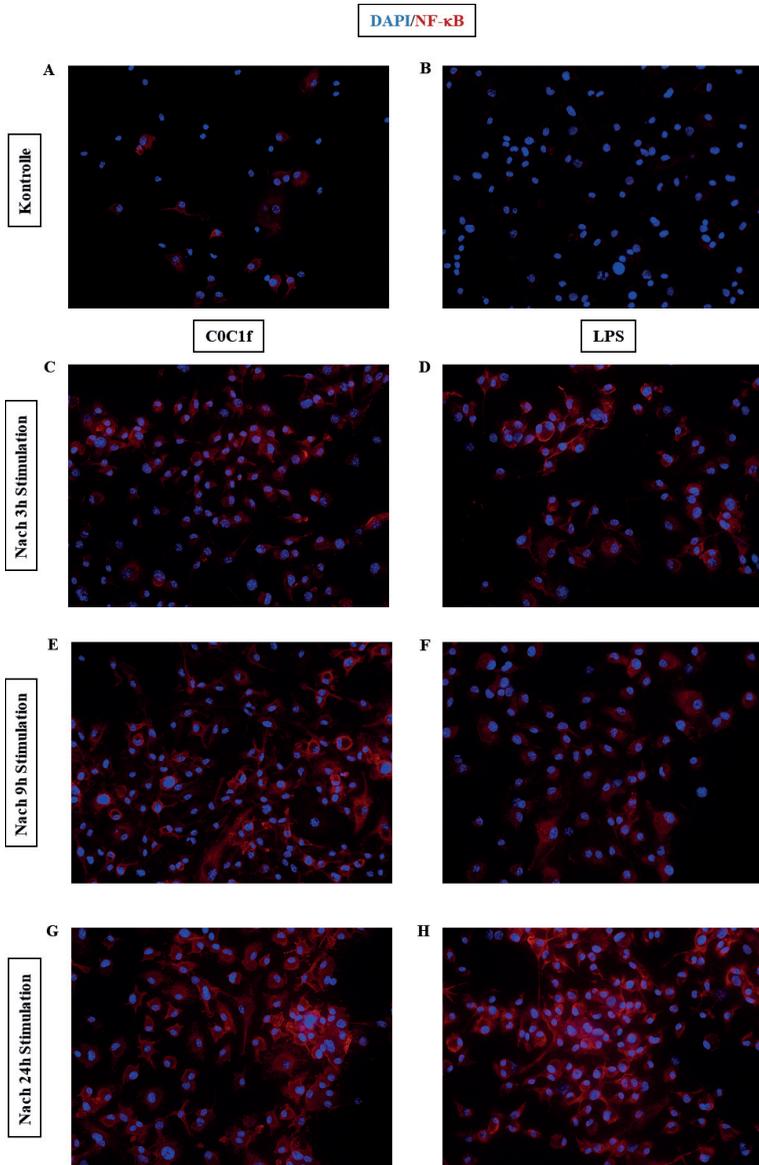


Abb. 19 Nachweis der NF- κ B Aktivierung nach C0C1f bzw. LPS Stimulation mittels Immunfluoreszenz. Murine Makrophagen wurden für verschiedene Zeitspannen mit 500ng/ml C0C1f (C, E, G) bzw. 100ng/ml LPS (D, F, H) stimuliert und mit DAPI (blau) und dem NF- κ B-p65-Antikörper (rot) markiert. 40-Fache Vergrößerung. A)-B) Unstimulierte Kontrollen

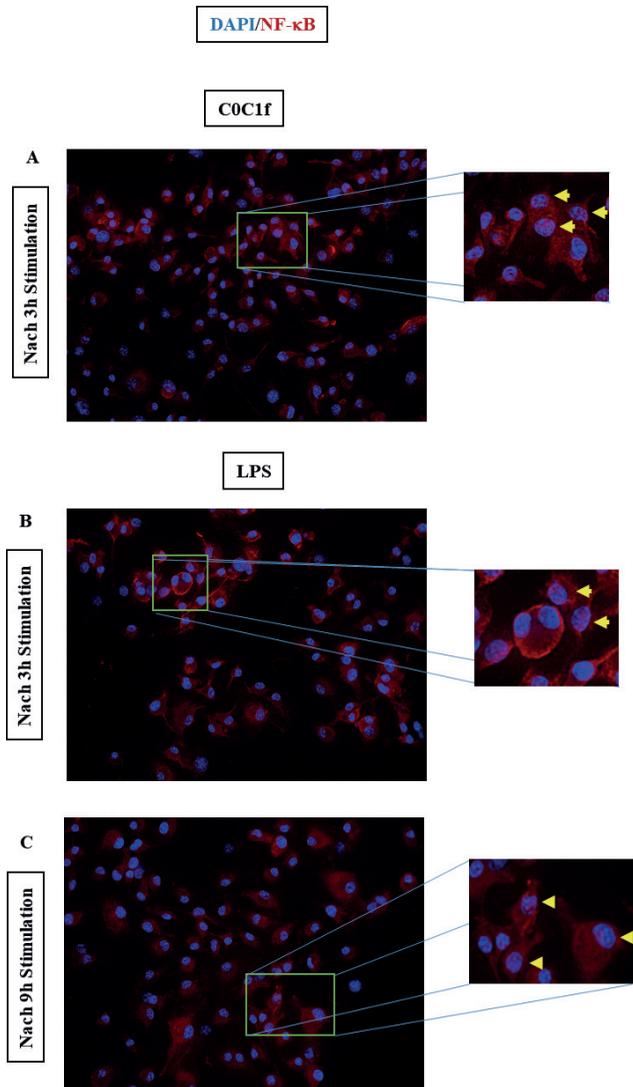


Abb. 20: Nachweis der NF- κ B Aktivierung nach C0C1f bzw. LPS Stimulation mittels Immunfluoreszenz. Ausschnittsvergrößerungen der Abb. 18 C, D, H Murine Makrophagen wurden für verschiedene Zeitspannen mit C0C1f bzw. LPS stimuliert und mit DAPI (blau) sowie dem NF- κ B-Antikörper (rot) markiert. Rotfärbungen auf Zellkernebene erkennbar (Gelbe Pfeilköpfe) **A**) Nach 3h C0C1f Stimulation **B**) Nach 3h LPS Stimulation, **C**) Nach 9h LPS Stimulation.

Die I κ B α -Färbungen wurden ebenfalls nach 3h, 9h und 24h C0C1f- bzw. LPS-Stimulation durchgeführt. In den unstimulierten Kontrollen sollte I κ B α an NF- κ B gekoppelt sein. Das entspricht dem inaktivierten Zustand der Zellen. Wird eine Rotfärbung von I κ B α sichtbar, wurde vermutlich zu dem Zeitpunkt I κ B α phosphoryliert und damit aktiviert.

In einer Kontrollgruppe ließen sich in einigen wenigen Zellen schwache Rotsignale erkennen, welche auch Hintergrundsignale sein könnten (**Abb. 21A**). In der anderen Kontrollgruppe ließen sich schwache Signale des I κ B α -Sekundärantikörpers im Zytoplasma in nahezu allen Zellen ausmachen (**Abb. 21B**). Im Laufe der einzelnen Zeiträume von 3h bis 24h nahm das Signal vom I κ B α -Antikörper unter LPS-Behandlung ab (**Abb. 21D, F, H**). Dies lässt vermuten, dass die Zellen bereits prästimuliert waren und bei diesem Versuch der Abbau von phosphoryliertem I κ B α beobachtet werden kann. Eine erneute Aktivierung durch LPS fand aus diesen Beobachtungen heraus vermutlich nicht statt.

Des Weiteren wurden Makrophagen mit C0C1f stimuliert (**Abb. 21C, E, G**). Nach dreistündiger Stimulation mit C0C1f ließen sich vereinzelt positive Signale (gelbe Pfeile) im Zytoplasma erkennen (**Abb. 21G**). Nach 9h wurden die Signale im Zytoplasma deutlich sichtbar (**Abb. 21E**), während nach 24h die I κ B α -positiven Signale kaum zu erkennen waren (**Abb. 21G**).

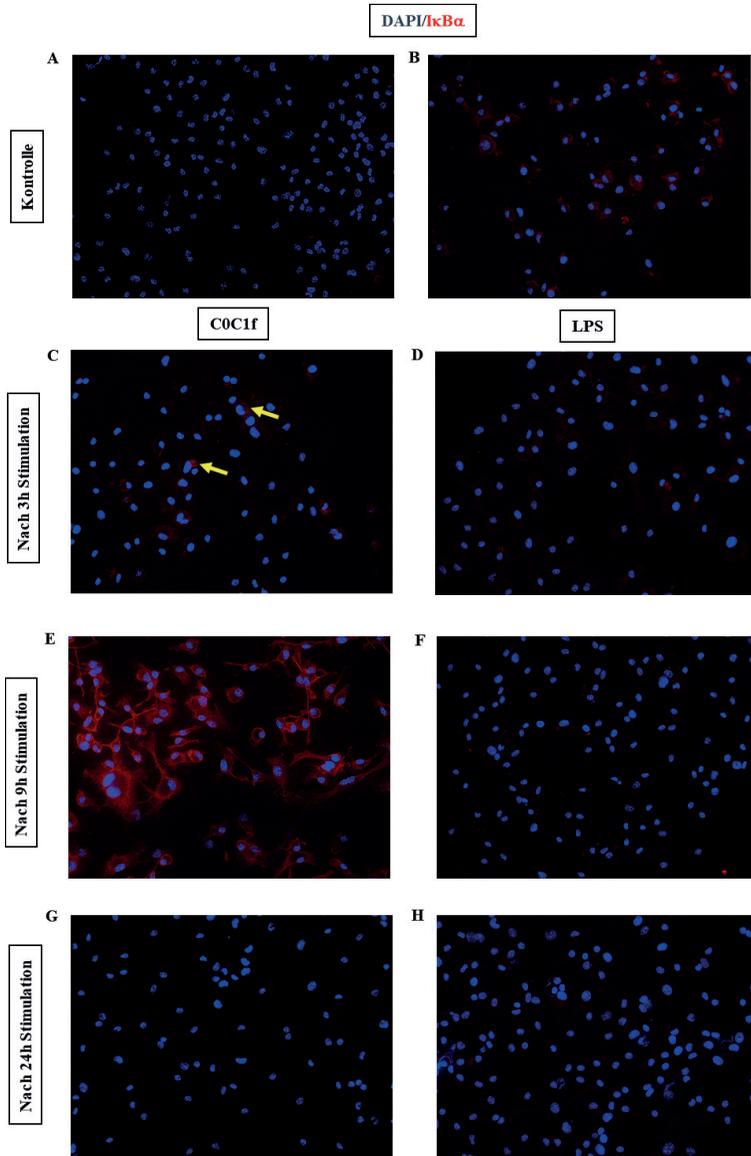


Abb. 21 Nachweis der I κ B α Aktivierung nach C0C1f bzw. LPS Stimulation mittels Immunfluoreszenz. Murine Makrophagen wurden für verschiedene Zeitspannen mit 500ng/ml C0C1f (C, E, G) bzw. 100ng/ml LPS (D, F, H) stimuliert und mit DAPI (blau) sowie mit I κ B α -Antikörpern (rot) markiert. Rotfärbungen im Zytoplasma deutlich (Gelbe Pfeile) A)-B) unstimulierte Kontrollen. C0C1f Abbildungen sind repräsentativ für n=2

4.6.6 Zeitreihe der durch C0C1f stimulierten murinen Makrophagen für NF- κ B mittels qRT-PCR

Im Rahmen dieses Projekts wurde zudem untersucht, ob die Transkription von NF- κ B selbst im Zuge der Aktivierung des NF- κ B-Signalweges durch C0C1f induziert wird. Dazu wurde eine Zeitreihe erstellt (**Abb. 22A**), in der die murinen Makrophagen aufgeteilt auf acht verschiedene Zeiträume (0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h) mit C0C1f stimuliert wurden. Nach Aufreinigung der mRNA wurde mithilfe der qRT-PCR die mRNA-Abundanz der NF- κ B-mRNA zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Eine Kontrollgruppe wurde unstimuliert belassen, normiert ($1,0 \pm 0,08$ -fach erhöht, $n=4$) und die anderen Bedingungen gegen diese Kontrolle relativiert. Nach 30 Minuten C0C1f-Stimulation konnte keine Veränderung in der NF- κ B-mRNA-Abundanz festgestellt werden ($0,96 \pm 0,05$ -fache Änderung; $p>0,9999$; $n=4$), während angefangen bei 1h ($2,23 \pm 0,32$ -fache Änderung; $p<0,9999$; $n=4$) über 1,5h ($3,78 \pm 0,90$ -fache Änderung; $p=0,9077$; $n=4$), 2h ($4,21 \pm 1,02$ -fache Änderung; $p=0,2705$; $n=4$), 5h ($4,437 \pm 0,63$ -fache Änderung; $p=0,2121$; $n=4$) und bis zu 6h ($3,78 \pm 1,12$ -fache Änderung; $p=0,5044$; $n=4$) ein Anstieg in der mRNA-Menge zu erkennen ist (**Abb. 22A**). Nach 3h ($5,99 \pm 1,021$ -fache Änderung; $p=0,0105$; $n=4$) und 4h ($5,17 \pm 1,32$ -fache Änderung; $p=0,0486$; $n=4$) Stimulationszeit zeigten sich signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um den Effekt des NF- κ B-Inhibitors Bay 11-7082 auf mRNA-Ebene sichtbar zu machen, wurden die Makrophagen 1h mit Bay 11-7082 vorbehandelt, bevor diese mit C0C1f stimuliert wurden (**Abb. 22B**). Zu allen gemessenen Zeitpunkten (2h, 3h, 4h) konnte sichtbar eine verminderte NF- κ B-Transkription unter Einfluss von Bay 11-7082 beobachtet werden. Nach 2h zeigte sich eine geringere Transkriptionsausprägung von NF- κ B durch die Vorbehandlung mit Bay 11-7082 vom Zweifachen ($2,47 \pm 0,32$ -fache Änderung, $p>0,9999$, $n=4$) im Vergleich zum Vierfachen ($4,21 \pm 1,02$ -fache Änderung, $p=0,2705$, $n=4$) unter C0C1f-Stimulation in Relation auf die Kontrollgruppe. 3h nach Behandlung mit C0C1f wurde das signifikant erhöhte Sechsfache der NF- κ B-mRNA-Menge im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ($5,99 \pm 1,021$ -fache Änderung, $p=0,0105$, $n=4$) gemessen, wohingegen die vorbehandelte Gruppe mit Bay 11-7082 lediglich eine leichte Induktion ($1,82 \pm 0,37$ -fache Änderung, $p>0,9999$, $n=4$) der mRNA-Abundanz aufzeigte und somit ein Drittel weniger als unter alleiniger C0C1f-Behandlung. Auch nach 4h (bzw. 6h) C0C1f-Behandlung konnte eine um die Hälfte geringere Induktion der NF- κ B-Transkription

durch die Vorbehandlung mit Bay 11-7082 gemessen werden. Bei 4h beliefen sich die Werte auf das signifikant erhöhte $5,17 \pm 1,32$ -Fache ($p=0,0486$; $n=4$) (bzw. 6h: $3,78 \pm 1,12$ -fache Änderung; $p=0,5044$; $n=4$) und im Vergleich dazu nur auf das $1,57 \pm 1,02$ -Fache ($p>0,9999$; $n=4$) bei 4h (bzw. 6h: $2,16 \pm 0,41$ -fach $p>0,9999$, $n=4$) unter der Vorbehandlung mit Bay 11-7082 in Relation zur Kontrolle.

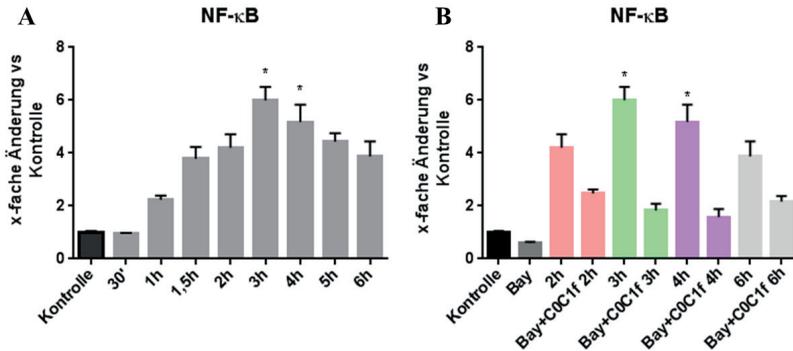


Abb. 22 Nachweis der Selbstinduktion der NF-κB Transkription nach C0C1f Stimulation. A) Murine Makrophagen wurden in einer Zeitreihe für 0,5h, 1h, 1,5h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h mit C0C1f stimuliert. B) Murine Makrophagen wurden für jeweils 2h, 3h, 4h und 6h mit C0C1f stimuliert und in einer Vergleichsgruppe zusätzlich mit Bay 11-7082 1h zuvor inhibiert. Nach mRNA Isolation wurde die mRNA Expression von NF-κB mithilfe der qRT-PCR gemessen. Werte von $*p<0,05$ wurden als signifikant angesehen ($n=4$)

4.6.7 Inhibition der Rezeptoren TLR 2,4 und RAGE von murinen Makrophagen

Um zu eruieren, über welche Rezeptoren C0C1f infolge eines Myokardinfarkts die Makrophagen zur Inflammationsantwort über Zytokinausschüttung anregen, wurden aus murinen Stammzellen differenzierte Makrophagen für 16h vor einer sechsstündigen C0C1f-Behandlung mit verschiedenen Rezeptorinhibitoren versetzt und im Anschluss an die Stimulationsexperimente für die qRT-PCR aufbereitet. Dabei wurden drei Rezeptoren, die sich in verschiedensten Studien als bedeutend für die Inflammationsantwort nach Myokardinfarkt zeigten, herangezogen: der TLR2 (Inhibitor: Cu-CPT22), der TLR4 (Inhibitor: CLI-095) und der RAGE-Rezeptor (Inhibitor: FPS-ZM1). In der qRT-PCR wurden die Abundanzen von IL-6 und IL-1β mit und ohne Inhibition unter C0C1f-Stimulation ausgewertet (**Abb. 23**)⁸⁴. Bei allen drei Rezeptoren konnte man einen signifikanten bis sehr signifikanten Unterschied zwischen den mRNA-Abundanzen unter der Inhibierung der Rezeptoren im Vergleich

zur alleinigen C0C1f-Stimulation feststellen. Die Inhibierung des TLR4 Rezeptors sorgte für eine Reduktion der IL-6 mRNA-Abundanz vom 42-Fachen auf das 2-Fache der unstimulierten Kontrolle ($p < 0,05$; $n = 4$) sowie eine Reduktion der IL-1 β -Abundanz vom 140-Fachen auf das 0.95-Fache der unstimulierten Kontrolle ($p < 0,05$, $n = 4$). Ebenso verhielt es sich bei der Inhibierung des TLR2- (bzw. des RAGE-) Rezeptors: IL-6-mRNA-Abundanzen konnten vom 830-Fachen auf das 34-Fache (bzw. das 115-Fache) der unstimulierten Kontrolle reduziert werden ($p < 0,005$; $n = 6$).

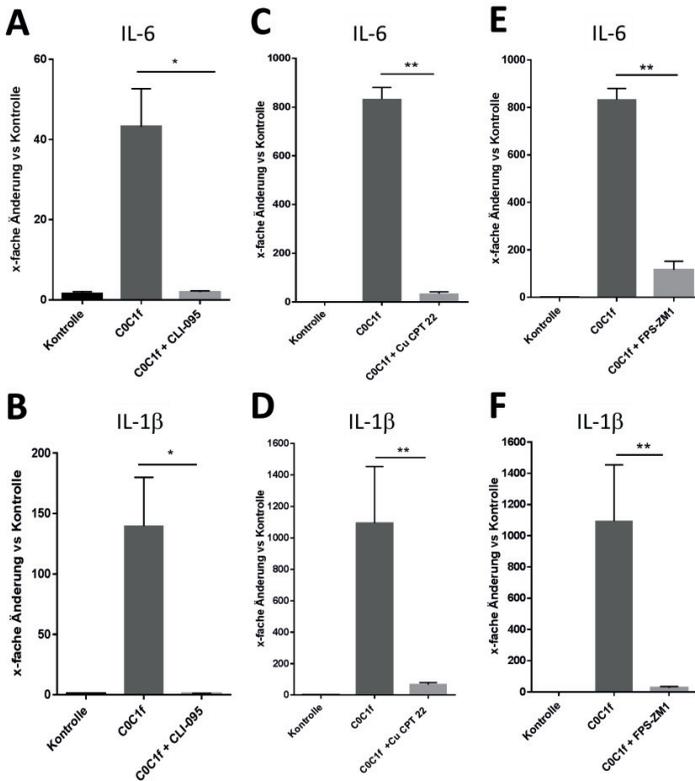


Abb. 23 A-F): Inhibition verschiedener Rezeptoren reduziert die Abundanz pro-inflammatorischer Zytokine über C0C1f⁴. Murine Makrophagen wurden über Nacht mit verschiedenen Inhibitoren behandelt und für 6h mit 500 ng/ml C0C1f co-stimuliert. IL6 und IL-1 β mRNA Abundanzen wurden mittels qRT-PCR unter Verwendung des Mann-Whitney U Tests analysiert, wobei * $p < 0,05$ und ** $p < 0,005$ bedeuten. 16-stündige Vorbehandlung der Makrophagen mit **A-B)** CLI-095, einem TLR4- spezifischen Rezeptor-Inhibitor ($n = 4$), **C-D)** CU CPT22, einem TLR2-spezifischen Inhibitor ($n = 6$), **E-F)** FPS-ZM1, einem RAGE-Inhibitor ($n = 6$) und 6h Co-Stimulation mit C0C1f.

5 Diskussion

Die Aufklärung der molekularen Mechanismen bei kardiovaskulären Erkrankungen ist essenziell für die Entwicklung neuer Therapieansätze und Medikamente, um irreparable Myokardschäden zu verhindern. Besonders die Inflammation nach Myokardinfarkten führt oftmals zu einer überschießenden Immunantwort, die in einem größeren Gewebsschaden mündet als ursprünglich durch die Ischämie verursacht.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Zusammenhänge von C0C1f, dem N-terminalen Fragment des cMyBP-C, und die inflammatorischen Prozesse in Makrophagen aufzudecken. Durch eine C0C1f-Stimulation von primär murinen Makrophagen über verschiedene Zeiträume konnte nicht nur gezeigt werden, dass C0C1f konzentrationsabhängig eine proinflammatorische Antwort in Makrophagen auslöst, sondern auch, dass die aktivierte Signalkaskade durch TLR-Rezeptoren und anschließender Aktivierung von NF- κ B vermittelt wird.

Um diese Mechanismen in Erfahrung zu bringen, wurden *in vitro* Zellkulturrexperimente unter Verwendung von murinen Makrophagen herangezogen. Nach der Isolation von Knochenmarkstammzellen wurden diese mithilfe von M-CSF zu Makrophagen ausdifferenziert. Die Zellen wurden mit Verfahren wie Western Blot, qRT-PCR, Immunhistochemie und EMSA-ELISA Test untersucht.

5.1 Die Wahl des Zellmodells

Für diese Arbeit wurden Knochenmarkszellen aus männlichen C57/BL6-Mäusen für die Kultivierung von Makrophagen isoliert. Die einzelnen Schritte der Knochenmarksisolation erfolgte ähnlich wie bei Alka Madaan und Kollegen (2014) beschrieben⁹¹, wobei aus der eigenen Arbeitsgruppe bewährte Puffer und Lösungen verwendet wurden.

Die Knochenmarkszellisolation wurde der direkten Isolation der im Blut zirkulierenden Makrophagen vorgezogen. Auch wenn die meisten Makrophagen während eines „Steady State“-Zustandes von lokalen Vorläuferzellen hervorgehen, so entwickeln sich bei Inflammationen die meisten Makrophagen aus im Blut zirkulierende, inflammatorischen Monozyten³². Diese werden wiederum aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark rekrutiert, welche bei Gewebsschäden über eine gesteigerte Hämatopoese vermehrt Monozytenvorläuferzellen produzieren³⁸.

Weiterhin ist die aktuelle Immun- und individuelle Stresslage trotz einheitlicher Tierhaltung zum Zeitpunkt der Entnahme bzw. Tötung unbekannt und die isolierten Zellen könnten bereits aktiviert sein. Die Tötung der Mäuse erfolgte durch eine Begasung mit 3-5% Isofluran in einer geschlossenen Kammer. Die durch die Isofluranbegasung eingetretene herabgesetzte Durchblutung und der ausgelöste Stress könnten sich in Form von inflammatorischer Signalinduktion in der kurzen Zeit auf die Immunzellen im Blut ausgewirkt haben. Es ließe sich jedoch mit dieser Methode gezielt eine spezifische Subpopulation von Makrophagen isolieren und mit C0C1f stimulieren. Ob alle Subpopulationen von Makrophagen sich durch C0C1f aktivieren lassen, wurde im Rahmen dieses Projekts nicht untersucht.

Ein Vorteil der Makrophagendifferenzierung aus Knochenmarkszellen ist die geringere Wahrscheinlichkeit, dass diese zuvor von anderen Stimuli als C0C1f aktiviert worden sind. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass der Prozess der Ausdifferenzierung, welche methodisch nach Standard-Protokoll erfolgte, sich zwischen den Experimenten nur geringfügig unterscheidet und somit eine einheitliche Differenzierung zu Makrophagen zu erwarten ist.

5.1.1 Vergleich von murinen Makrophagen und humanen Makrophagen

Ein Vorteil der Zellisolation aus der Maus im Vergleich zu humanen Monozyten aus Donorblut ist der gleiche genetische Hintergrund der ausschließlich gesunden Mäuse und der damit verbundenen Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Störfaktoren wie Vorerkrankungen, genetische Prädispositionen oder Unterschiede von Umwelteinflüssen konnten somit minimiert werden. Zu den humanen Monozyten aus „Buffy Coats“ gibt es meist keine detaillierten klinischen Daten, welche einen Hinweis auf mögliche Donor-zu-Donor-Varianzen der Ergebnisse liefern könnten. Eine Aktivierung der humanen Monozyten durch andere Faktoren neben der C0C1f-Gabe könnte ebenfalls für die Abweichungen der Ergebnisse verantwortlich sein, worüber man im Nachhinein aber keine klaren Aussagen treffen kann.

Doch auch die murinen Knochenmarkszellen weisen geringfügige Streuungen der gemessenen Daten auf, die möglicherweise durch die verschiedene Dauer des Zellwachstums und somit dem unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Makrophagen zuzuordnen ist. Die Kultivierungszeiten bis zur Konfluenz der Zellen lagen zwischen 4 und 8 Tagen. Somit sind verschiedene Faktoren für die Streuung der

Ergebnisse denkbar: Neben der Variationsdauer des Zellsplittens und Unterschiede im Alter der Tiere ist auch eine mögliche Erhöhung des Stresspegels sowie weitere Faktoren nicht auszuschließen. Aber auch der Umgang mit den Zellen in der Zellkultur, z.B. das Umsetzen der Zellen hatte möglicherweise einen Einfluss auf die Zellen selbst. Letztendlich haben Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe demonstriert, dass die grundlegenden Mechanismen der inflammatorischen Immunantwort in Makrophagen von Mäusen auf Menschen übertragbar sind, da die Versuche ebenso mit aus „Buffy Coats“ isolierten humanen Monozyten durchgeführt wurden und vergleichbare Ergebnisse aufwiesen⁸⁴. Die Ergebnisse implizieren, dass die Signalinduktion inflammatorischer Faktoren in humanen Makrophagen/Monozyten ebenso über TLR den NF- κ B-Signalweg durchläuft.

5.2 C0C1f und seine physiologisch relevanten Konzentrationen im Blut

Aufgrund ihres rascheren Anstiegs im Serum im Vergleich zum aktuellem Goldstandard, dem kardialen Troponin, werden das cMyBP-C und sein unter Ischämie freigesetztes Fragment C0C1f in verschiedenen humanen als auch Tiermodellstudien als neuwertige akute Biomarker bei Myokardinfarkten diskutiert. Dabei konnte bereits nach einer halben Stunde nach eingesetztem Ischämieereignis eine erhöhte Konzentration von cMyBP-C im Blut gemessen werden^{3,43,48}.

Auch in Bezug auf das Ausmaß der inflammatorischen Immunantwort über Makrophagen spielt der C0C1f-Gehalt, wie bereits (**Abb. 8**) gezeigt, eine bedeutende Rolle. In einer Studie wurde ersichtlich, dass MI-Patienten einen erhöhten cMyBP-C-Plasmaspiegel von 105 bis 116 ng/ml im Vergleich zu Gesunden (22 ng/ml) aufwiesen⁴⁷. Eine weitere Studie zeigte eine cMyBP-C-Erhöhung von seinem Basalwert (76 ± 68 ng/l) auf 767 ± 211 ng/l nach 3h und bis zu 2.418 ± 780 ng/l nach 6h⁷⁹. Der genaue Plasmaspiegel für C0C1f nach Myokardinfarkten konnte bisher noch nicht bestimmt werden, weil die Messmethoden für die Konzentrationen im Plasmaspiegel bisher noch nicht spezifisch für C0C1f etabliert worden sind. Da der genaue Zeitpunkt des Gefäßverschlusses in den vorangegangenen Studien nicht auszumachen war, bleibt unklar, ob der C0C1f-Spiegel mit dem von cMyBP-C korreliert. Allerdings zeigten Experimente an Kardiomyozten zeitlich gesehen ähnliche Freisetzungsprofile⁴³. Die Konzentration von C0C1f steigt demnach bereits 30 Minuten nach Einsetzen des Brustschmerzes, erreicht seinen Maximalwert nach ca. 1h und fällt nach 1,5 h auf den

Ausgangszustand zurück, während das gesamte Protein cMyBP-C sein Maximum nach 4 – 6h erreicht und anschließend nach 6h wieder auf seine Basalwerte zurückgeht⁹⁰. Weitere Studien und eine Erweiterung der Methoden sind erforderlich, um definitive Aussagen über die Freisetzungskinetik von cMyBP-C und C0C1f machen zu können. Um ein möglichst breites Spektrum der C0C1f-Konzentration abzudecken, wurden für unsere Experimente Konzentrationen von 500 ng/ml, 250 ng/ml und 100 ng/ml verwendet. Da es sich um die Aufklärung grundlegender Mechanismen im Zellkulturmodell handelt, wurde nach Feststellung signifikanter proinflammatorischer Antwort der Makrophagen auf 500 ng/ml C0C1f diese Konzentration für die weiteren Experimente verwendet. Zur Gegenkontrolle wurde auch für C0-Linker eine Konzentration von 500 ng/ml eingesetzt. Es konnte jedoch auch bei niedrigeren Konzentrationen (bei 250ng/ml) zum Teil eine signifikante Induktion der proinflammatorischen Zytokine durch C0C1f beobachtet werden (**Abb. 8**). Die Induktion von Makrophagen durch 500 ng/ml C0C1f zeichnete sich durch eine signifikant erhöhte Expression verschiedener proinflammatorischer Faktoren wie IL-6, IL-1 β , TNF α , MCP-1, ICAM-1 und VCAM-1 aus. Um einen direkten Bezug zu den Mechanismen *in vivo* nach einem Myokardinfarkt herstellen zu können, müssten die physiologisch wirksamen Plasmaspiegel von C0C1f nach Einsetzen des Myokardinfarkts direkt am Tiermodell oder Patienten untersucht werden. Erst mit Hilfe der *in vivo* Experimente ließen sich die Beobachtungen des Einflusses von C0C1f in Bezug auf die Makrophagenaktivierung validieren.

5.3 Die Auswirkungen des abgespaltenen N-terminalen Fragmentes C0C1f

Das N-terminale Fragment C0C1f vom cMyBP-C wurde in anderen Studien vor allem in Zusammenhang mit Ischämie- und Reperfusionsschäden sowie kardialen Dysfunktionen nach Myokardinfarkt untersucht¹¹⁸. Dabei spielt der Phosphorylierungsgrad des cMyBP-C eine entscheidende Rolle. Bei Ischämie kommt es zu einer anhaltenden Dephosphorylierung, welche auch in der Reperusionsphase vorliegt und die Degradierung des Proteins beschleunigt¹⁸. Die Degradierung findet spezifisch Calpain-vermittelt innerhalb der M-Domäne statt und führt zur Freisetzung des C0C1f^{43,121}. Über die Bindung von C0C1f an das dünne Filament des Sarkomers kommt es zu einer Kontraktilitätseinschränkung der Kardiomyozyten bis hin zur kardialen Dysfunktion⁴⁴. Weiterhin konnte an Tiermodellen beobachtet werden, dass

Kardiomyozyten eine signifikant erhöhte LDH-Ausschüttung und Caspase 3 Aktivität sowie eine signifikante Reduktion der Zellvitalität und eingeschränkte Kalziumsensitivität bei C0C1f Anwesenheit aufwiesen⁴⁴. C0C1f in Form einer immunvermittelnden Rolle wurde vor unserer Arbeitsgruppe lediglich in der Übersichtsarbeit von Lynch und Sadyapapan in Zusammenhang mit experimentell autoimmunvermittelter Myokarditis und Dilatativer Kardiomyopathie erwähnt⁹⁰.

5.4 Der NF-κB Signalweg

Eine Inhibierung des NFκB/IκB-Signalwegs mit Bay 11-7082 führte nachweislich zu einem Verlust der proinflammatorische Makrophagenaktivierung nach C0C1f-Stimulation. Unterstützend zu diesem Ergebnis zeigte der EMSA-ELISA eine erhöhte Präsenz an DNA-gebundenen und damit aktivierten NF-κB unter einer C0C1f-Behandlung. Beim EMSA-ELISA wurde die Untereinheit des NF-κBs, p65 aus Zellkernlysaten nachgewiesen, was impliziert, dass C0C1f den klassischen NF-κB Signalweg induziert. Trotz allem kann auf diese Weise nicht ausgeschlossen werden, dass auch alternative Signalwege induziert wurden. Es wurde somit dennoch erstmals festgestellt, dass C0C1f die inflammatorische Aktivierung von Makrophagen über den NF-κB Signalweg induziert. Auch das untersuchte antiinflammatorische Zytokin IL-10 scheint von der Aktivierung von NF-κB abhängig zu sein, da bei der Inhibierung von NF-κB ebenso ein Rückgang der exprimierten mRNA-Menge zu sehen ist, obwohl die IL-10-Expression nicht durch C0C1f signifikant erhöht wurde. Frangogiannis beschreibt 2014 in einer Übersichtsarbeit, dass bereits in den Achtziger- und Neunzigerjahren Experimente mit einer zielgerichteten Eindämmung der von Leukozyten vermittelten Inflammation über Inhibierung von Adhäsionsmolekülen in einer verminderten Infarktgröße mündete^{15,29,127,147}. Doch trotz erfolgreicher Abnahme von Myokardschäden im Rahmen der Tiermodelle, blieben Erfolge einer fokussierten Leukozytenbehandlung von Patienten nach Myokardinfarkt aus^{15,29}.

Eine weitere Möglichkeit die Aktivierung und die Translokation von NF-κB zu detektieren, stellt die Immunhistochemie dar. Für dieses Verfahren wurden NF-κB- und IκB-Komplexe mit Antikörpern, die am C-Terminus der jeweiligen Komplexe binden, markiert und die Zellen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop betrachtet. Der C-Terminus von p65 enthält die Carboxyl-terminale Transaktivierungsdomäne als Besonderheit¹⁰⁹. IκBα kann in drei strukturelle Domänen aufgeteilt werden: (i) einer

70 Aminosäuren langen N-terminalen Region, (ii) einer 205 Aminosäuren langen intermediären Domäne, bestehend aus Ankyrin Repetitionen, und (iii) einer 42 Aminosäuren langen C-terminalen Region. NF- κ B und I κ B α binden quasi in einer Kopf-zu-Fuß-Methode mit der N-terminalen Region von NF- κ B an der C-terminalen Sequenz von I κ B α ^{23,62,66}.

Im Prinzip sind I κ B α und NF- κ B inaktiv im Zytoplasma der Makrophagen im Ruhezustand vorhanden. Vor allem nach 3h, 9h und 24h C0C1f-Stimulation ist eine vermehrte Anfärbung von NF- κ B in Makrophagen in der durchgeführten Immunhistochemie sichtbar (**Abb. 19**, *Abb. 20*).

In der unbehandelten Kontrollgruppe ist dieser Anstieg nicht zu erkennen, eine Aktivierung von NF- κ B ohne Stimulation ist somit nicht zu beobachten. Auch wenn hauptsächlich Signale im Zytoplasma der Makrophagen detektiert werden, kann man auf Höhe des Nukleus einige spezifische rote Fluoreszenzsignale erkennen, was auf die aktivierte Form von NF- κ B, welches vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert ist, schließen lässt. Das von fluoreszierenden Antikörpern markierte I κ B α ist vor allem nach 9h im Zytoplasma zu sehen, wobei keine Unterscheidung zwischen dem vom NF- κ B gelösten I κ B α und der eventuell noch an NF- κ B gebundenen, phosphorylierten Form des I κ B α möglich ist. Es lässt sich hier nicht mit Gewissheit sagen, ob das detektierte I κ B α -Signal tatsächlich direkt durch Aktivierung des NF- κ B hervorgerufen wird. Die Daten lassen jedoch unter Berücksichtigung der zuvor beschriebenen Resultate des EMSA-ELISA darauf schließen, dass NF- κ B durch C0C1f innerhalb der ersten halben Stunde aktiviert wird und innerhalb der ersten 3h in den Kern transloziert und an DNA bindet. Hierdurch wird die proinflammatorische Immunantwort in Form von Gentranskriptionen der Faktoren IL-6, TNF α und IL-1 β sichtbar. Erstmalig wurde gezeigt, dass die mRNA-Expressionen der inflammatorischen Zytokine in Makrophagen nach C0C1f-Stimulation einer Periodik unterliegt. Die Zeitreihen der einzelnen Zytokine weisen nach kurzer Stimulationszeit bis zu 2h einen Anstieg, daraufhin ein Absinken zwischen 3h und 4h und eine erneute Erhöhung der Expressionen bei 5h und 6h auf. Der Rückgang der Zytokinexpression könnte auf ein selbst induziertes negatives Feedback zurückzuführen sein. Beispielsweise wurde zuvor die Expression eines TNF α -Inhibitors zeitgleich zur Induktion des Zytokins in Makrophagen beschrieben¹⁰. Dahingegen wurde gezeigt, dass TNF α seinen antiinflammatorischen Gegenspieler IL-10 induzieren kann, was sich wiederum wie

eine negative Rückkopplung auf die Inflammation auswirkt¹¹⁴. Der erneute Anstieg der inflammatorischen Zytokine könnte auf einem noch nicht geklärten „Second Wave“-Prinzip basieren¹⁰⁶, bei dem es durch eventuelle Selbst- und/oder gegenseitige Aktivierung zu einer erneuten Hochregulation der proinflammatorischen Zytokine kommt. Der tatsächliche Mechanismus müsste jedoch noch weitergehend untersucht werden.

Im Gegensatz zu den proinflammatorischen Zytokinen zeigt das Chemokin MCP-1 einen stetigen Anstieg der mRNA-Abundanz bis zu 6h. In Anbetracht seiner Funktion Monozyten zu rekrutieren, scheint die fortlaufende Zunahme des Chemokins auf eine vermehrte Rekrutierung hinzudeuten. Dies ist für den Ablauf der sterilen Inflammation essenziell. Es wäre weiterhin interessant zu untersuchen, ob der MCP-1 Spiegel auch bei verlängerter Präsenz von C0C1f weiter zunimmt und zu welchem Zeitpunkt die mRNA Abundanz sein Maximum erreicht.

Weiterhin bleibt offen, über welche genauen Mechanismen und welche Rezeptoren C0C1f den NF- κ B Komplex aktivieren. Es konnte jedoch weiterführend beobachtet werden, dass unter Inhibierung von TLR4, TLR2 und RAGE (Receptor for advanced glycation end-products) eine signifikante Unterdrückung der Zytokinexpressionen IL-6 und IL-1 β auszumachen ist, was verdeutlicht, dass C0C1f mit unterschiedlichen Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche interagieren kann und möglicherweise ein Zusammenwirken von verschiedenen Rezeptoren die Signalkaskade aktiviert (**Abb. 24**). Wie dieses Zusammenspiel im Detail aussieht und welche weiteren Faktoren zwischen diesen Rezeptoren und dem NF- κ B-Signalweg eine Rolle bei der Induktion von Makrophagen durch C0C1f spielen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

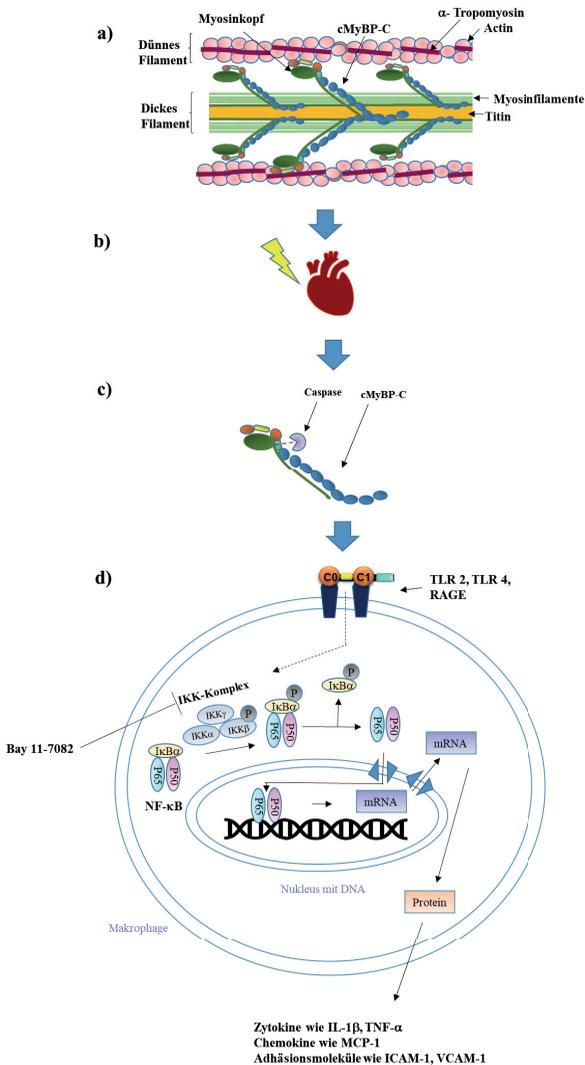


Abb. 24 Schematische Darstellung der cMyBP-C Degradation bis zur proinflammatorischen Aktivierung von Makrophagen über den NF- κ B Signalweg durch C0C1f nach Myokardinfarkt. A) cMyBP-C liegt in seiner physiologischen Form als sarkomerisches Protein und Teil des dicken Filaments vor. (Abb. Modifiziert aus^{90,144}) B) Ischämische Schäden nach Myokardinfarkt führen zu einer C) phosphorylierungsabhängigen Calpainspaltung innerhalb der M-Domäne vom cMyBP-C und zur Freisetzung von C0C1f^{94,115,121} (Abb. Modifiziert aus¹⁴⁴). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das freigesetzte C0C1f über D) TLR2, TLR4 und RAGE Rezeptoren murine Makrophagen zur proinflammatorischen Immunantwort aktiviert. Weiterhin konnte erstmalig beobachtet werden, dass die Aktivierung über den NF- κ B Signalweg stattfindet. (Abb. Modifiziert aus⁸⁵)

6 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass C0C1f über die Aktivierung des NF- κ B Signalweges eine proinflammatorische Antwort über die Freisetzung verschiedener Faktoren in murinen Makrophagen induziert. Weiterführend konnten den Rezeptoren TLR2, 4 und RAGE in Bezug auf die Makrophagenstimulation durch C0C1f eine bedeutende Rolle zugeordnet werden, da unter deren Inhibierung ein deutlicher Rückgang der Zytokinausschüttung nachgewiesen wurde. Die freigesetzten proinflammatorischen Faktoren wie Zytokine, Chemokine und Adhäsionsfaktoren führen zu einer Inflammation, welche auch nach Myokardinfarkten beobachtet wird und dort für die Beseitigung von Zelltrümmern sowie für die Einleitung der Proliferationsphase entscheidend ist. Hier kommt es bei überschießender Immunantwort oft zu größeren Myokardschäden, da auch gesundes Gewebe von den Umbauprozessen betroffen ist²¹. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen erweiterten Einblick in die intrazellulären Mechanismen in murinen Makrophagen nach C0C1f-Stimulation. Bei bisher bekannten, eher negativen Auswirkungen des C0C1f auf Kardiomyozyten könnte eine Verhinderung cMyBP-C Spaltung und Inhibierung der C0C1f-Aktivierung als therapeutischer Ansatz in Frage kommen. Weiterhin gilt zu eruieren, inwieweit die Ergebnisse auch *in vivo* auf den menschlichen Organismus übertragbar sind, um einen möglichen therapeutischen Nutzen zu verdeutlichen.

7 Zusammenfassung

Die Aufklärung der grundlegenden Mechanismen bei kardiovaskulären Erkrankungen ist essenziell für die Entwicklung neuer Therapieansätze und Medikamente, um das Fortschreiten von Myokardschäden zu verhindern. Besonders die Inflammation nach Myokardinfarkt führt oftmals zu einer überschießenden Immunantwort, die in einem größeren Gewebsschaden als ursprünglich verursacht mündet. Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Zusammenhänge des cMyBP-C und der inflammatorischen Prozesse in Makrophagen aufzudecken. Um diese Mechanismen in Erfahrung zu bringen, wurden *in vitro* Zellkulturexperimente unter Verwendung von murinen Makrophagen herangezogen. Nach der Isolation muriner Knochenmarksstammzellen wurden diese mithilfe von M-CSF zu Makrophagen ausdifferenziert und dienten als Modell für Makrophagen des gesunden Körpers. Die Zellen wurden für Verfahren wie Western Blot, qRT-PCR, Immunhistochemie und den EMSA-ELISA Test untersucht. Das cMyBP-C ist Bestandteil des dicken Filaments im Sarkomer und gewährleistet die Interaktion zwischen Aktin und Myosin zur Kontraktion des Muskels. Unter einem Myokardinfarkt kommt es zur Spaltung des cMyBP-C. Dabei entsteht ein Teilfragment, das C0C1f. Durch Stimulation der Makrophagen mit C0C1f über verschiedene Zeiträume konnte gezeigt werden, dass konzentrationsabhängig eine proinflammatorische Antwort, auf mRNA und teilweise auch auf Proteinebene, über IL-6, IL-1 β , TNF α , ICAM-1, VCAM-1 und MCP-1 in Makrophagen ausgelöst wurde. Weiterhin konnte über die Inhibierung von NF- κ B unter Verwendung des Inhibitors Bay 11-7082 verdeutlicht werden, dass die aktivierte Signalkaskade über den Mediator NF- κ B läuft. Es zeigte sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der durch C0C1f ausgelösten Inflammationsantwort und den Rezeptoren TLR 2, TLR 4 und RAGE. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen erweiterten Einblick in die intrazellulären Mechanismen in primär murinen Makrophagen nach C0C1f Stimulation. Bei bisher bekannten eher negativen Auswirkungen des C0C1f auf Kardiomyozyten könnte eine Verhinderung der cMyBP-C-Spaltung und Inhibierung der C0C1f-Stimulation als therapeutischer Ansatz in Frage kommen. Weiterhin gilt zu eruieren, inwieweit die Ergebnisse auch *in vivo* auf den menschlichen Organismus übertragbar sind, um einen möglichen therapeutischen Nutzen zu verdeutlichen.

8 Summary

The elucidation of basic mechanisms upon cardiovascular diseases is essential for the development of novel therapeutic and medical approaches to prevent the progress of myocardial injury. Particularly the inflammation after myocardial infarction frequently leads to an excessive response of the immune system that causes larger tissue damage than initially induced by the infarction. This thesis aimed to reveal the molecular connections between the cardiac Myosin Binding Protein-C (cMyBP-C) and inflammatory processes in macrophages. In order to examine these mechanisms *in vitro* cell experiments with murine macrophages were performed. After the isolation of murine bone marrow stem cells, they differentiated into macrophages due to M-CSF treatment. The macrophages served as a model for macrophages of a healthy state. The cells were harvested and prepared for procedures such as western blotting, qRT-PCR, Immunochemistry and EMSA-ELISA. The cMyBP-C is part of the thick filament in the sarcomere and responsible for the interaction between actin and myosin during a muscle contraction. During myocardial infarctions the cMyBP-C undergoes a cleavage resulting in the release of a fragment called C0C1f. It has been shown that C0C1f stimulation of macrophages over different periods, dependent on the concentration, provoked a pro-inflammatory answer, on mRNA and partly also on protein level, showing higher levels of IL-6, IL-1 β , TNF α , ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1. Furthermore, an inhibition of NF- κ B by applying the inhibitor Bay 11-7082 elucidated that NF- κ B is a mediator of the activated signaling pathway. In addition, it was possible to draw a connection between the C0C1f induced inflammation and the inflammatory receptors TLR2, TLR4 and RAGE.

The results give further insights of the intracellular mechanism in murine macrophages stimulated by C0C1f. By rather common negative effects of C0C1f on cardiomyocytes a prevention of a cMyBP-C cleavage and the inhibition of a C0C1f activation after myocardial infarction could possibly serve as a therapeutic approach. Furthermore, it needs to be determined to what extend those results are applicable *in vivo* as well as to human organisms to clarify the therapeutic benefit

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	-----	Grad Celsius
AK	-----	Antikörper
APC	-----	Anti-Adenomatous Polyposis Coli
Aqua Dest	-----	Aqua destillata
BSA	-----	Bovine serum albumin
cAPK	-----	cyclic Adenosinmonophosphate dependent protein kinase
CD	-----	Cluster of differentiation
cDNA	-----	Complementary desoxyribonucleic acid
cMyBP-C	-----	Cardiac myosin binding protein C
C _T	-----	Threshold Cycle
DAMPs	-----	Danger associated molecular patterns
DAPI	-----	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DC	-----	Detergent compatible
DMEM	-----	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	-----	Desoxiribonucleic acid
DPBS	-----	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
dsDNA	-----	doppelsträngige DNA
DTT	-----	1,4-Dithiothreitol
EDTA	-----	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	-----	Enzym-linked-immunosorbent Assay
EMSA	-----	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FACS	-----	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	-----	Fetal calf serum
FN3	-----	Fibronectin Typ 3
FSC	-----	Forward Scatter
GAPDH	-----	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	-----	Stunde/Stunden
HCl	-----	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HGMB1	-----	High mobility box 1
HIS-Tag	-----	Polyhistidin-Tag
HRP	-----	Horseradish peroxidase
ICAM-1	-----	Intercellular adhesion molecule 1
IgG	-----	Immunglobulin G
IHC	-----	Immunhistochemie
IKK	-----	Inhibitor of kappa B kinase

IL-10	-----	<i>Interleukin-10</i>
IL-1 β	-----	<i>Interleukin-1β</i>
IL-6	-----	<i>Interleukin-6</i>
I κ B	-----	<i>Inhibitor of kappa B</i>
kDa	-----	<i>Kilodalton</i>
LDL	-----	<i>Low Density Protein</i>
LPS	-----	<i>Lipopolysaccharide</i>
M	-----	<i>Mol</i>
MCP-1	-----	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	-----	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
Min	-----	<i>Minuten</i>
Mio	-----	<i>Millionen</i>
ml	-----	<i>Milliliter</i>
mM	-----	<i>Millimol</i>
MPS	-----	<i>Mononuclear phagocyte system</i>
mRNA	-----	<i>messenger RNA</i>
NaCl	-----	<i>Natriumchlorid</i>
NF- κ B	-----	<i>Nuclear factor-'kappa-light-chain-enhancer'of activated B-cells</i>
NP	-----	<i>Nonyl phenoxyethoxyethanol</i>
NSTEMI	-----	<i>Non-ST-elevation myocardial infarction</i>
PAMPs	-----	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	-----	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	-----	<i>Paraformaldehyd</i>
PMSF	-----	<i>Phenylmethylsulfonyl fluorid</i>
PRR	-----	<i>Pathogen recognition receptors</i>
PVDF-Membran	-----	<i>Polyvinylidenfluorid-Membran</i>
qRT-PCR	-----	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RAGE	-----	<i>Receptor for advanced glycation end-products</i>
RC	-----	<i>Reducing agent compatible</i>
RNA	-----	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	-----	<i>Revolutions per minute</i>
s	-----	<i>Sekunden</i>
SDS	-----	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SSC	-----	<i>Sidewards Scatter</i>
TBS	-----	<i>Tris-buffered saline</i>
TLR	-----	<i>Toll-like Rezeptor/en</i>

TNF α ----- *Tumornekrosefaktor α*
Tris----- *Trishydroxymethyl-aminomethan*
V----- *Volt*
VCAM-1 -----*Vascular cell adhesion molecule-1*
WB-----*Western Blot*
WCE-Puffer ----- *Whole cell extraction Puffer*

10 Literaturverzeichnis

1. **Arslan, F. et al.** Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation* **121**, 80–90 (2010).
2. **Bauerle, P. A. & Baltimore, D.** Nfkb: Ten years after. *Cellpress* (1996).
3. **Baker, J. O. et al.** Cardiac myosin-binding protein C: a potential early biomarker of myocardial injury. *Basic research in cardiology* **110**, 23 (2015).
4. **Baltimore, D. & Stancovski, I.** Nf-kB Activation: The IκB Kinase Revealed? *Cellpress* (1997).
5. **Bauer, J. et al.** Regulation of Interleukin 6 Receptor Expression in human Monocytes and Monocyte-derived Macrophages. Comparison with the Expression in Human Hepatocytes (1989).
6. **Bers, M. D.** Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* (2002).
7. **Bonizzi, G. & Karin, M.** The two NF-κB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology* **25**, 280–288 (2004).
8. **Bryant, D. et al.** Cardiac Failure in Transgenic Mice With Myocardial Expression of Tumor Necrosis Factor-. *Circulation* **97**, 1375–1381 (1998).
9. **Bustin, S. A.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* (2000).
10. **Carballo, E.** Feedback Inhibition of Macrophage Tumor Necrosis Factor-Production by Tristetraprolin. *Science* **281**, 1001–1005 (1998).
11. **Carlin, L. M. et al.** Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell* **153**, 362–375 (2013).
12. **Cecchini, M. G. et al.** Role of colony stimulating factor-1 in the establishment and regulation of tissue macrophages during postnatal development of the mouse. *Development* (1994).
13. **Chandrasekar, B. & Freeman, G. L.** Induction of nuclear factor κB and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Letters* **401**, 30–34 (1997).
14. **Chandrasekar, B. & Freeman, G. L.** Induction of nuclear factor κB and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Letters* **401**, 30–34 (1997).

15. **Christia, P. & Frangogiannis, N. G.** Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur.J. Clin. Invest.* (2013).
16. **Couto, G. de et al.** Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation* **125**, 3147–3162 (2015).
17. **Dai, X.-M.** Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**, 111–120 (2002).
18. **Decker, R. S. et al.** Myosin-binding protein C phosphorylation, myofibril structure, and contractile function during low-flow ischemia. *Circulation* **111**, 906–912 (2005).
19. **Dewald, O. et al.** Of Mice and Dogs. *The American journal of pathology* **164**, 665–677 (2004).
20. **Dewald, O. et al.** CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circulation research* **96**, 881–889 (2005).
21. **Dutta, P. & Nahrendorf, M.** Monocytes in myocardial infarction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **35**, 1066–1070 (2015).
22. **Ertl, G. & Frantz, S.** Healing after myocardial infarction. *Cardiovascular research* **66**, 22–32 (2005).
23. **Ferreiro, D. U. & Komives, E. A.** Molecular mechanisms of system control of NF-kappaB signaling by IkappaBalpha. *Biochemistry* **49**, 1560–1567 (2010).
24. **Flashman, E., Redwood, C., Moolman-Smook, J. & Watkins, H.** Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circulation research* **94**, 1279–1289 (2004).
25. **Frangogiannis, N. G.** The Mechanistic Basis of Infarct Healing.
26. **Frangogiannis, N. G. et al.** Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* **30**, 2567–2576 (1998).
27. **Frangogiannis, N. G. et al.** IL-10 Is Induced in the Reperfused Myocardium and May Modulate the Reaction to Injury. *The Journal of Immunology* **165**, 2798–2808 (2000).

28. **Frangogiannis, N. G.** Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation research* **110**, 159–173 (2012).
29. **Frangogiannis, N. G.** The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature reviews. Cardiology* **11**, 255–265 (2014).
30. **Frantz, S., Bauersachs, J. & Ertl, G.** Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovascular research* **81**, 474–481 (2009).
31. **Frantz, S. et al.** Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **27**, 871–881 (2013).
32. **Frantz, S. & Nahrendorf, M.** Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovascular research* **102**, 240–248 (2014).
33. **Gaetano, M. de, Crean, D., Barry, M. & Belton, O.** M1- and M2-Type Macrophage Responses Are Predictive of Adverse Outcomes in Human Atherosclerosis. *Frontiers in immunology* **7**, 275 (2016).
34. **Gallucci, R. M. et al.** Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6–deficient and immunosuppressed mice. *The FASEB Journal* (2000).
35. **Gao, W. D., Atar, D., Liu, Y. & Perez, N. e. a.G.** Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ. Res.* (1997).
36. **Garcia, M. G. et al.** Inhibition of NF-kappaB activity by BAY 11-7082 increases apoptosis in multidrug resistant leukemic T-cell lines. *Leukemia research* **29**, 1425–1434 (2005).
37. **Geissmann, F., Jung, S. & Littman, D. R.** Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* **19**, 71–82 (2003).
38. **Geissmann, F. et al.** Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)* **327**, 656–661 (2010).
39. **Ginhoux, F. & Jung, S.** Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature reviews. Immunology* **14**, 392–404 (2014).
40. **Goldstein, J. A. et al.** Multiple Complex Coronary Plaques in Patients with Acute Myocardial Infarction.
41. **Gordon, S.** Elie Metchnikoff: father of natural immunity. *European journal of immunology* **38**, 3257–3264 (2008).
42. **Gosh, S. & Karin, M.** Missing Pieces in the NF-kB Puzzle. *Cell* (2002).

43. **Govindan, S. et al.** Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* **52**, 154–164 (2012).
44. **Govindan, S. et al.** Pathogenic properties of the N-terminal region of cardiac myosin binding protein-C in vitro. *Journal of muscle research and cell motility* **33**, 17–30 (2012).
45. **Govindan, S. et al.** Pathogenic properties of the N-terminal region of cardiac myosin binding protein-C in vitro. *Journal of muscle research and cell motility* **33**, 17–30 (2012).
46. **Govindan, S. et al.** Pathogenic properties of the N-terminal region of cardiac myosin binding protein-C in vitro. *Journal of muscle research and cell motility* **33**, 17–30 (2012).
47. **Govindan, S. et al.** Increase in cardiac myosin binding protein-C plasma levels is a sensitive and cardiac specific biomarker of myocardial infarction. *Am J Cardiovasc*, 60–70 (2013).
48. **Govindan, S. et al.** Increase in cardiac myosin binding protein-C plasma levels is a sensitive and cardiac-specific biomarker of myocardial infarction. *Am J Cardiovasc* (2013).
49. **Gruen, M., Prinz, H. & Gautel, M.** cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on-off fashion. *FEBS Letters* **453**, 254–259 (1999).
50. **Guha, M. & Mackman, N.** LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular Signalling* **13**, 85–94 (2001).
51. **Gwechenberger, M. et al.** Cardiac Myocytes Produce Interleukin-6 in Culture and in Viable Border Zone of Reperfused Infarctions. *Circulation* **99**, 546–551 (1999).
52. **Haan, J. J. de, Smeets, M. B., Pasterkamp, G. & Arslan, F.** Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators of inflammation* **2013**, 206039 (2013).
53. **Hall, T. S., Hallén, J., Agewall, S., Atar, D. & Jensen, T.** Changes in diagnosing non-ST-segment elevation myocardial infarction after the introduction of a new high-sensitivity cardiac troponin T assay: a single-centre experience. *Clin. Lab* (2012).

54. **Hammerman, H. L., Kloner, R. A., Hale, S., Schoen, F. J. & Braunwald, E.** Dosedependent effects of short-term methylprednisolone on myocardial infarct extent, scar formation and ventricular function. *Circulation* (1983).
55. **Hansson, G. K.** Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease.
56. **Harris, S. P., Rostkova, E., Gautel, M. & Moss, R. L.** Binding of myosin binding protein-C to myosin subfragment S2 affects contractility independent of a tether mechanism. *Circulation research* **95**, 930–936 (2004).
57. **Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M.** Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of clinical investigation* **123**, 92–100 (2013).
58. **Hayden, M. S. & Ghosh, S.** Signaling to NF-kappaB. *Genes & development* **18**, 2195–2224 (2004).
59. **Hearse, D. J. & Tosaki, A.** Free Radicals and Reperfusion-Induced Arrhythmias: Protection by spin tap tgent PBN in the rat heart. *Circ. Res.* (1987).
60. **Henkel, T. et al.** Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Letters to Nature* (1993).
61. **Herron, T. J. et al.** Activation of myocardial contraction by the N-terminal domains of myosin binding protein-C. *Circulation research* **98**, 1290–1298 (2006).
62. **Huxford, T., Huang, D. B., Malek, S. & Ghosh, G.** The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation. *Cell* **95**, 759–770 (1998).
63. **Hu, Y. et al.** IKKalpha controls foramtion of the epidermis independently of NF-kB. *Letter to Natrue* (2001).
64. **Ikeda, U. et al.** Serum Interleukin 6 Levels Became Elevated In Acute Myocardial Infarction. *J Mol Cell Cardiol* (1991).
65. **Ito, T. & Ikeda, U.** Inflammatory Cytokines and Cardiovascular Disease. *CDTIA* **2**, 257–265 (2003).
66. **Jacobs, M. D. & Harrison, S. C.** Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex. *Cell* **95**, 749–758 (1998).
67. **Jivraj, N., Phinikaridou, A., Shah, A. M. & Botnar, R. M.** Molecular imaging of myocardial infarction. *Basic research in cardiology* **109**, 397 (2014).
68. **Jung, K. et al.** Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts. *Circulation research* **112**, 891–899 (2013).

69. **Kakio, T. et al.** Roles and Relationship of Macrophages and Monocyte Chemotactic and Activating Factor/Monocyte Chemoattractant Protein-1 in the Ischemic and Reperfused Rat Heart. *Lab Invest* **80**, 1127–1136 (2000).
70. **Karin, M. & Ben-Neriah, Y.** Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annu. Rev. Immunol.* (2000).
71. **Kasahara, H. et al.** Autoimmune myocarditis induced in mice by cardiac C-protein. Cloning of complementary DNA encoding murine cardiac C-protein and partial characterization of the antigenic peptides. *The Journal of clinical investigation* **94**, 1026–1036 (1994).
72. **Kevil, C. G., Patel, R. P. & Bullard, D. C.** Essential role of ICAM-1 in mediating monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* (2001).
73. **Kim, S. E., Lee, J. H., Park, D. G. & Han, K. R. et al.** Acute myocardial infarction by right coronary artery occlusion presenting as precordial ST elevation on electrocardiography. *Korean Circ.* (2010).
74. **Kloner, R. A., Bolli, R., Marban, E., Reinlib, L. & Braunwald, E.** Medical and Cellular Implications of Stunning, Hibernation, and Preconditioning. An NHLBI Workshop. *Circulation* **97**, 1848–1867 (1998).
75. **Krug, A., Du Mesnil de Rochement, R. & Korb, G.** Blood supply of the myocardium after temporary coronary occlusion. *Circ. Res.* **1966**.
76. **Kubista, M. et al.** The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* **27**, 95–125 (2006).
77. **Kupatt, C. et al.** Tumor Necrosis Factor- Contributes to Ischemia- and Reperfusion-Induced Endothelial Activation in Isolated Hearts. *Circulation research* **84**, 392–400 (1999).
78. **Kurrelmeyer, K. M. et al.** Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Cardiology Research* (2000).
79. **Kuster, D. W. D. et al.** Release kinetics of circulating cardiac myosin binding protein-C following cardiac injury. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **306**, 56 (2014).
80. **Kusuoka, H. & Marban, E.** Cellular Mechanisms of Myocardial Stunning **1992**.

81. **Lambert, J. M., Lopez, E. F. & Lindsey, M. L.** Macrophage roles following myocardial infarction. *International journal of cardiology* **130**, 147–158 (2008).
82. **Lawrence, T.** The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a001651 (2009).
83. **Leor, J. et al.** Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart. *Circulation* **114**, 100 (2006).
84. **Lipps, C. et al.** N-terminal fragment of cardiac myosin binding protein-C triggers pro-inflammatory responses in vitro. *Journal of molecular and cellular cardiology* **99**, 47–56 (2016).
85. **Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S.-C.** NF-κB signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy* **2** (2017).
86. **Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**, 402–408 (2001).
87. **Lopez-Castejon, G. & Brough, D.** Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine & growth factor reviews* **22**, 189–195 (2011).
88. **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.** Protein Measurement with the folin phenol reagent (1951).
89. **Luster, A. D.** Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *The New England journal of medicine* (1998).
90. **Lynch, T. L. & Sadayappan, S.** Surviving the infarct: A profile of cardiac myosin binding protein-C pathogenicity, diagnostic utility, and proteomics in the ischemic myocardium. *Proteomics. Clinical applications* **8**, 569–577 (2014).
91. **Madaan, A., Verma, R., Singh, A. T., Jain, S. K. & Jaggi, M.** A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. *J Biol Methods* **1** (2014).
92. **Maekawa, N. et al.** Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-α. *Journal of the American College of Cardiology* **39**, 1229–1235 (2002).
93. **Matsumoto, Y., Tsukada, Y., Miyakoshi, A., Sakuma, H. & Kohyama, K. C** Protein-Induced Myocarditis and Subsequent Dilated Cardiomyopathy. Rescue from Death and Prevention of Dilated Cardiomyopathy by Chemokine Receptor DNA Therapy. *The Journal of Immunology* **173**, 3535–3541 (2004).

94. **Matsumoto, Y., Park, I.-K. & Kohyama, K.** B-cell epitope spreading is a critical step for the switch from C-protein-induced myocarditis to dilated cardiomyopathy. *The American journal of pathology* **170**, 43–51 (2007).
95. **Matsumura, Y., Kusuoka, H., Inoue, M. & Horie, M. e. a.** Protective Effect of the Protease Inhibitor Leupeptin Against Myocardial Stunning. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* (1993).
96. **May, M. J. et al.** Selective Inhibition of NF-KB Activation by a Peptide That Blocks the Interaction of NEMO with the IKB Kinase Complex. *Science* (2000).
97. **McClellan, G., Kulikovskaya, I. & Winegrad, S.** Changes in Cardiac Contractility Related to Calcium-Mediated Changes in Phosphorylation of Myosin-Binding Protein C. *Biophysical Journal* **81**, 1083–1092 (2001).
98. **Mercurio, F. et al.** IKK-1 And IKK-2: Cytokine-Activated Ikb Kinases Essential for NF-kB Activation. *Science* (1997).
99. **Miller, B. S. & Zandi, E.** Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the complex activity in the absence of stimulation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 36320–36326 (2001).
100. **Misra, A. et al.** Nuclear factor-kappaB protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Circulation* **108**, 3075–3078 (2003).
101. **MIYAMOTO, S., CHIAO, P. J. & VERMA, I. M.** Enhanced IKBa Degradation Is Responsible for Constitutive NF-KB Activity in Mature Murine B-Cell Lines. *molecular and cellular biology* (1993).
102. **Mori, N. et al.** Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* **100**, 1828–1834 (2002).
103. **Morishita, R. et al.** In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kB binding site prevents myocardial infarction. *Nature* (1997).
104. **Murakami, U., Uchida, K. & Hirakatsu, T.** Cardiac Myosin from Pig Heart Ventricle. Purification and Enzymatic Properties. *J Biochem* (1976).
105. **Nahrendorf, M. et al.** The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of experimental medicine* **204**, 3037–3047 (2007).

106. **Nian, M., Lee, P., Khaper, N. & Liu, P.** Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circulation research* **94**, 1543–1553 (2004).
107. **O'Brien, K. D. et al.** Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Is Expressed in Human Coronary Atherosclerotic Plaques. Implications for the Mode of Progression of Advanced Coronary Atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation* (1993).
108. **O'Brien, K. D., McDonald, T. O., Chait, A., Allen, M. D. & Alpers, C. E.** Neovascular Expression of E-Selectin, Intercellular Adhesion Molecule-1, and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Human Atherosclerosis and Their Relation to Intimal Leukocyte Content. *Circulation* **93**, 672–682 (1996).
109. **Oeckinghaus, A. & Ghosh, S.** The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a000034 (2009).
110. **Offer, G., Moos, C. & Starr, R.** A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. Extractions, purification and characterization. *J Mol Biol* (1973).
111. **Okazaki, T. et al.** Macrophage colony-stimulating factor improves cardiac function after ischemic injury by inducing vascular endothelial growth factor production and survival of cardiomyocytes. *The American journal of pathology* **171**, 1093–1103 (2007).
112. **Oyama, J.-i. et al.** Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* **109**, 784–789 (2004).
113. **Pedro R. Moreno, M. D. et al.** Macrophage Infiltration in Acute Coronary Syndromes Implications for Plaque Rupture (1994).
114. **Platzer, C., Meisel, C., Vogt, K., Platzer, M. & Volk H.-D.** Up-regulation of monocytic IL-10 by tumornecrosis factor- α and cAMP elevating drugs. *International Immunology* (1995).
115. **Previs, M. J., Beck Previs, S., Gulick, J., Robbins, J. & Warshaw, D. M.** Molecular mechanics of cardiac myosin-binding protein C in native thick filaments. *Science (New York, N.Y.)* **337**, 1215–1218 (2012).
116. **Radecke, C. E. et al.** Coronary artery endothelial cells and microparticles increase expression of VCAM-1 in myocardial infarction. *Thrombosis and haemostasis* **113**, 605–616 (2015).

117. **Razumova, M. V. et al.** Effects of the N-terminal domains of myosin binding protein-C in an in vitro motility assay: Evidence for long-lived cross-bridges. *The Journal of biological chemistry* **281**, 35846–35854 (2006).
118. **Razzaque, M. A. et al.** An endogenously produced fragment of cardiac myosin-binding protein C is pathogenic and can lead to heart failure. *Circulation research* **113**, 553–561 (2013).
119. **Robbins, C. S. et al.** Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation* **125**, 364–374 (2012).
120. **Rothwarf, D. M. & Karin, M.** The NF- κ B Activation Pathway: A Paradigm in Information Transfer from Membrane to Nucleus. *Science's STKE* (1999).
121. **Sadayappan, S., Greis, K. D. & Robbins, J.** Phosphorylation-dependent proteolysis and pathogenesis of cardiac myosin binding protein-C. Abstracts presented June 18, 2008, ISHR NA. *Journal of molecular and cellular cardiology* **44**, S1-S61 (2008).
122. **Sadayappan, S. & Tombe, P. P. de.** Cardiac myosin binding protein-C as a central target of cardiac sarcomere signaling: a special mini review series. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **466**, 195–200 (2014).
123. **Schmidt-Supprian, M. et al.** NEMO/IKK γ -Deficient Mice Model. Incontinentia Pigmenti. *Cellpress* (2000).
124. **Senftleben, U. et al.** Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF- κ B signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)* **293**, 1495–1499 (2001).
125. **Shaffer, J. F., Kensler, R. W. & Harris, S. P.** The myosin-binding protein C motif binds to F-actin in a phosphorylation-sensitive manner. *The Journal of biological chemistry* **284**, 12318–12327 (2009).
126. **Shi, C. & Pamer, E. G.** Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **11**, 762–774 (2011).
127. **Simpson, P. J. et al.** Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion. *The Journal of clinical investigation* **81**, 624–629 (1988).
128. **Sogaard, P., Gotzsche, C.-O., Ravkilde, Jan, MD, Norgaard, Aage, MD & Thygesen, Krisitian, MD, FACC.** Ventricular Arrhythmias in the Acute and Chronic

- Phases After Acute Myocardial Infarction. Effect of Intervention With Captopril. *Circulation research*, 101–107 (1994).
129. **Sotolongo, R. P., Smith, L. & Margolis, W. S.** Coronary Angioplasty in Emergency Treatment of Myocardial Infarction. in a Community-Hospital Setting. *Heart (British Cardiac Society)* (1990).
130. **Thygesen, K. et al.** Third universal definition of myocardial infarction. *European heart journal* **33**, 2551–2567 (2012).
131. **Troidl, C. et al.** Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine* **13**, 3485–3496 (2009).
132. **Troidl, C. et al.** The temporal and spatial distribution of macrophage subpopulations during arteriogenesis. *Current Vascular Pharmacology* **11**, 5–12 (2013).
133. **van Amerongen, M. J., Harmsen, M. C., van Rooijen, N., Petersen, A. H. & van Luyn, Marja J A.** Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *The American journal of pathology* **170**, 818–829 (2007).
134. **van der Laan, Anja M et al.** Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *European heart journal* **35**, 376–385 (2014).
135. **van der Laan, A., Nahrendorf, M. & Piek, J. J.** Healing and adverse remodelling after acute myocardial infarction: role of the cellular immune response. *Heart (British Cardiac Society)* **98**, 1384–1390 (2012).
136. **van Eyk, J. E. et al.** Breakdown and Release of Myofibrin Proteins During Ischemia and Ischemia/Reperfusion in Rat Hearts. Identification of Degradation Products and Effects on the pCa-Force Relation. *Circ. Res.* (1998).
137. **van Furth, R., Cohn, Z. A., Humphrey, J. H., Spector, W. G. & Langevoort, H. L.** The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells.
138. **van Furth, R. & Cohn, Z. A.** The Origin and Kinetics of Mononuclear Phagocytes (1968).
139. **VERMA, I. M., Stevenson, J. K., Schwarz, E. M., van Antwerp, D. & Myamoto, S.** Rel/NF-KB /IKB familv: intimate tales of association and dissociation. *Laboratory of Genetics* (1995).

140. **Volz, H. C. et al.** S100A8/A9 aggravates post-ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF-kappaB signaling. *Basic research in cardiology* **107**, 250 (2012).
141. **Weisberg, A. & Winegrad, S.** Alteration of myosin cross bridges by phosphorylation of myosin-binding protein C in cardiac muscle. *Cell Biology* (1996).
142. **Weischenfeldt, J. & Porse, B.** Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH protocols* **2008**, pdb.prot5080 (2008).
143. **Winegrad, S.** Cardiac Myosin Binding Protein C. *Circulation research* **84**, 1117–1126 (1999).
144. **Witayavanitkul, N. et al.** Myocardial infarction-induced N-terminal fragment of cardiac myosin-binding protein C (cMyBP-C) impairs myofilament function in human myocardium. *The Journal of biological chemistry* **289**, 8818–8827 (2014).
145. **Wu, K. C. et al.** Prognostic Significance of Microvascular Obstruction by Magnetic Resonance Imaging in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* **97**, 765–772 (1998).
146. **Yamamoto, K. & Moos, C.** The C-proteins of Rabbit Red, White, and Cardia Muscles. *The Journal of biological chemistry* (1983).
147. **Yamazaki, T. et al.** Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 in Rat Heart with Ischemia/Reperfusion and Limitation of Infarct Size by Treatment with Antibodies against Cell Adhesion Molecules. *American Journal of Pathology* (1993).
148. **Yang, Z., Zingarelli, B. & Szabo, C.** Crucial Role of Endogenous Interleukin-10 Production in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* **101**, 1019–1026 (2000).
149. **Yano, T. et al.** Macrophage colony-stimulating factor treatment after myocardial infarction attenuates left ventricular dysfunction by accelerating infarct repair. *Journal of the American College of Cardiology* **47**, 626–634 (2006).
150. **Yasuda, M., Koshida, S., Sato, N. & Obinata, T.** Complete primary structure of chicken cardiac C-protein (MyBP-C) and its expression in developing striated muscles. *Journal of molecular and cellular cardiology* **27**, 2275–2286 (1995).
151. **Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M. & Karin, M.** The Ikb Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKKa and IKKb, Necessary for Ikb Phosphorylation and NF-kB Activation. *Cell* (1997).

152. **Zhang, H. et al.** Increasing cardiac contractility after myocardial infarction exacerbates cardiac injury and pump dysfunction. *Circulation research* **107**, 800–809 (2010).
153. **Zhang, Y. & Huo, Y.** Early reperfusion strategy for acute myocardial infarction: a need for clinical implementation. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **12**, 629–632 (2011).
154. **Ziegler-Heitbrock, L. & Hofer, T. P. J.** Toward a refined definition of monocyte subsets. *Frontiers in immunology* **4**, 23 (2013).

11 Veröffentlichung

C. Lipps, **J. H. Nguyen**, L. Pyttel, T.L.IV Lynch, C. Liebetrau, G. Aleshcheva, S. Voss, O. Dorr, H.M. Nef, H. Mollmann, C.W. Hamm, S. Sadayappan, C. Troidl
N-terminal fragment of cardiac myosin binding protein-C triggers pro-inflammatory responses in vitro, *Journal of molecular and cellular cardiology* (2016) Sep 8;99:47-56.
doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.09.003

12 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den 25.09.2020

Ort, Datum



Unterschrift

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich noch bei einigen Personen bedanken, die mich bei dieser Dissertation unterstützt haben.

Ich danke PD Dr. Christian Troidl, dass er mir diese Dissertation ermöglicht und den Weg dazu gebahnt hat.

Christoph Lipps danke ich ganz herzlich, dass er meinen Anliegen stets zügig nachgekommen ist und mir immer zuversichtlich zur Seite stand.

Ein großer Dank geht an Behnoush Parviz, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand ohne deren Hilfe ich nicht so weit gekommen wäre.

Herzlichen Dank an Antje Weber, die mich geduldig in die Laborarbeiten eingeführt und geholfen hat.

Mein weiterer Dank gilt Henrike Thomas, die stets dafür sorgte, dass ich innerhalb meines Zeitplans Zellkulturen anlegen konnte. Danke an Steffanie Wolfram für die Einführung und den Beistand in die Welt der Immunhistochemie. Ich danke ebenso Sabine Schäfer und Daniela Reitz für die mentale Unterstützung und allen MTAs aus Bad Nauheim für die gute Kooperation. Danke auch an Julia Paul, die auch nach meiner Laborzeit mir den Kommunikationsweg mit allen erleichtert hat.

Meinen Eltern danke ich von ganzen Herzen! Danke für eure Liebe, Zuversicht und Unterstützung!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6887-5



9 783835 196887 5