

**Der proinflammatorische Einfluss von  
N-terminalen Fragmenten  
des kardialen Myosinbindungsproteins-C  
auf murine Makrophagen und humane Monozyten *in vitro***

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sabel, Lukas Peter, geb. Pyttel

aus Oppeln

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik I, Kardiologie-Angiologie,  
Abteilung experimentelle Kardiologie

Gutachter: Herr PD Dr. Christian Troidl

Gutachter: Herr Prof. Dr. Klaus-Dieter Schlüter

Tag der Disputation: 01.03.2022

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Der kontraktile Apparat der quergestreiften Muskulatur</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Die Myofilamente</b>	<b>2</b>
1.2.1 Myosin-II	3
1.2.2 Aktin	5
1.2.3 Tropomyosin und der Troponin-Komplex	5
1.2.4 Titin, Obscurin und Nebulin	6
<b>1.3 Myosinbindungsprotein-C</b>	<b>6</b>
1.3.1 Entdeckung und frühe Forschungsarbeiten	6
1.3.2 Molekulare Struktur und Lokalisation im Sarkomer	7
1.3.3 Protein-Protein-Interaktion des N-Terminus, potentielle Funktion und Regulation durch Phosphorylierung	8
1.3.4 Genetisch determinierte myokardiale Erkrankungen durch Veränderungen im MYBPC-Gen	10
1.3.5 Gradmesser des myokardialen Stresses: Dephosphorylierung und proteolytische Fragmentierung von cMyBP-C	11
1.3.6 cMyBP-C im klinischen Kontext des Myokardinfarkts	13
<b>1.4 Die inflammatorischen Vorgänge in Folge einer myokardialen Ischämie</b>	<b>17</b>
1.4.1 Inflammatorische Phase	18
1.4.2 Proliferative- und Reifungsphase	19
1.4.3 Rolle der Monozyten und Makrophagen im infarzierten Myokard	19
1.4.4 Cardiac remodeling	23
<b>2 Ziel der Arbeit</b>	<b>24</b>
<b>3 Methoden</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Arbeitsvorschriften</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Generierung der cMyBP-C-Fragmente</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Gewinnung von <i>murinen bone marrow-derived macrophages</i> (BMDM)</b>	<b>26</b>
3.3.1 Gewinnung von Knochenmarkzellen der Maus	26

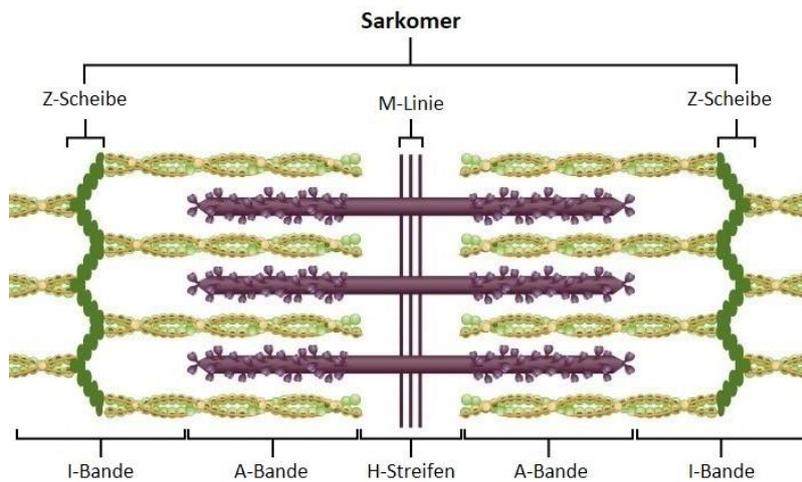
3.3.2	Differenzierung von Stammzellen zu Makrophagen _____	27
<b>3.4</b>	<b><i>In vitro</i> Stimulation von murinen BMDM _____</b>	<b>28</b>
<b>3.5</b>	<b>Gewinnung von humanen Monozyten aus <i>buffy coats</i> _____</b>	<b>30</b>
3.5.1	Vollblutspende und Anfall von <i>buffy coats</i> bei der Aufbereitung _____	30
3.5.2	Isolation von <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (PBMC) aus <i>buffy coats</i> mittels Dichtegradientenzentrifugation _____	31
3.5.3	Monozytenisolation mittels zentrifugaler Gegenstromelutriation (CCE) _____	32
<b>3.6</b>	<b><i>In vitro</i> Stimulation von humanen Monozyten _____</b>	<b>36</b>
<b>3.7</b>	<b>Transkriptionsanalyse _____</b>	<b>37</b>
3.7.1	Isolation von RNA _____	37
3.7.2	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der <i>real-time quantitativ</i> PCR _____	39
3.7.3	Herstellung von cDNA aus isolierter RNA (Reverse Transkription) _____	41
3.7.4	Durchführung der <i>real-time quantitative</i> PCR _____	42
3.7.5	Auswertung der qPCR Analyse _____	44
<b>3.8</b>	<b>Expressionsanalyse auf Proteinebene _____</b>	<b>45</b>
3.8.1	Aufbereitung von Proteinen aus isolierten Zellen _____	45
3.8.2	Prinzip und Durchführung des Western Blot _____	46
<b>3.9</b>	<b>Durchflusszytometrie _____</b>	<b>49</b>
3.9.1	Grundlagen und Funktionsprinzip _____	49
3.9.2	Durchführung der Antikörpermarkierung _____	50
<b>3.10</b>	<b>Datenerfassung und Analyse _____</b>	<b>51</b>
<b>3.11</b>	<b>Identifizierung von BMDM und humanen Monozyten in der Durchflusszytometrie _____</b>	<b>54</b>
<b>3.12</b>	<b>Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung _____</b>	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse _____</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Qualität der Makrophagen Differenzierung _____</b>	<b>56</b>
<b>4.2</b>	<b>Transkriptionsanalyse von murinen BMDM nach Behandlung mit cMyBP-C-Fragmenten _____</b>	<b>58</b>
<b>4.3</b>	<b>Transkriptionsanalyse von murinen BMDM nach Behandlung kardialem Troponin-I _____</b>	<b>67</b>
<b>4.4</b>	<b>Qualität der isolierten humanen Monozyten _____</b>	<b>68</b>
<b>4.5</b>	<b>Abhängigkeit der Reaktion humaner Monozyten auf C0C1f von der verwendeten Dosis und Behandlungsdauer _____</b>	<b>72</b>

4.6	Transkriptions- und Expressionsanalyse von humanen Monozyten nach Behandlung mit cMyBP-C-Fragmenten	76
5	Diskussion	87
5.1	Charakterisierung der verwendeten Zellarten	87
5.2	Reaktion von murinen BMDM und humanen Monozyten auf Behandlung mit N-terminalen Fragmenten des cMyBP-C	90
5.3	Vergleichbarkeit von murinen Makrophagen mit humanen Monozyten	95
5.4	Limitationen der erhobenen Ergebnisse hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit in das <i>in vivo</i> Geschehen	95
5.5	Schlussfolgerung und Relevanz der präsentierten Arbeit	97
5.6	Ausblick	99
6	Zusammenfassung/Abstract	101
6.1	Deutsch	101
6.2	Englisch	102
7	Abkürzungsverzeichnis	103
8	Abbildungsverzeichnis	106
9	Tabellenverzeichnis	108
10	Materialien, Reagenzien, Geräte und Software	109
10.1	Allgemein	109
10.2	Stammzellisolation und BMDM Differenzierung	110
10.3	Isolation von humanen PBMCs und Monozyten	111
10.4	RNA-Isolation, rt-PCR, qPCR	111
10.5	Proteinisolation, Western Blot	113
10.6	Durchflusszytometrie	116
10.7	Zellkulturmedien, selbst hergestellte Pufferlösungen	117
11	Literaturverzeichnis	120
12	Publikationsverzeichnis	133
13	Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation	134
14	Danksagung	135

# 1 Einleitung

## 1.1 Der kontraktile Apparat der quergestreiften Muskulatur

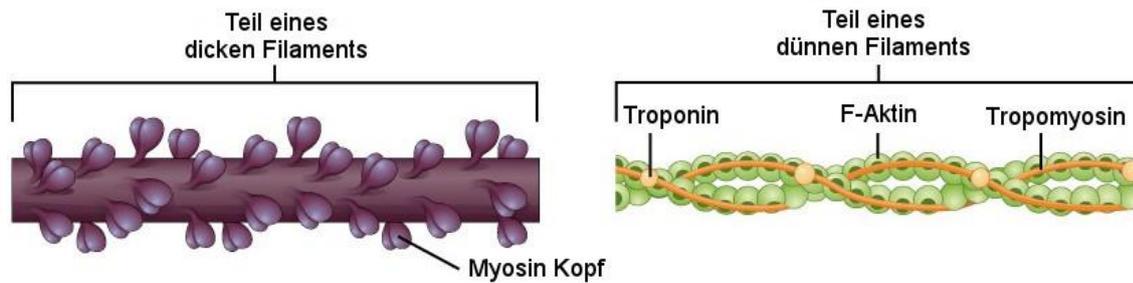
Die Kontraktion der Herzmuskulatur ist die Grundlage des Blutkreislaufs im menschlichen Körper [91]. Der Blutkreislauf gewährleistet durch die Versorgung mit Sauerstoff und Stoffwechselfsubstraten sowie die Entsorgung von Stoffwechselprodukten wie Kohlenstoffdioxid den funktionierenden Stoffwechsel aller Organe [157]. Die Herzmuskulatur wird zur quergestreiften Muskulatur gezählt [91]. Repetitiv und streng strukturiert angeordnete Myofilamente bilden Myofibrillen innerhalb der Herzmuskelzellen. Die regelmäßige Anordnung der unterschiedlichen Myofilamente erzeugt die im Licht- und Elektronenmikroskop sichtbare, namensgebende Querstreifung (Z-Linie, M-Linie, I-Bande, A-Bande, H-Bande, Abb. 1), anhand derer die kleinste funktionelle Einheit einer Myofibrille, das Sarkomer, abgegrenzt wird [91, 181]. Als Sarkomer bezeichnet man den Abschnitt einer Myofibrille zwischen zwei Z-Scheiben (Zwischenlinie, Z-Linie). Die Z-Scheibe liegt in der Mitte der I-Bande (isotrop, einfachbrechend im Polarisationsmikroskop). Im Zentrum des Sarkomers, zwischen zwei I-Banden, befindet sich die dunkle A-Bande (anisotrop, doppelbrechend im Polarisationsmikroskop). In der Mitte der A-Bande zeigt sich eine helle Zone, der H-Streifen (Hensen-Streifen), in dessen Mitte wiederum eine dünne, dunkle Linie, die M-Linie (Mittelstreifen) verläuft [157]. Die kettenartigen Myofilamente sind in der Z-Scheibe sowie in der M-Linie verankert und reichen in die jeweiligen Banden hinein [181]. Die Bandenstruktur ist Ausdruck einer differenzierten Struktur und Verteilung der Myofilamente innerhalb des Sarkomers.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines Sarkomers, mit angrenzenden Teilsarkomeren. Einteilung in Z-Scheibe, M-Linie, I-Bande, A-Bande, H-Streifen (schwarze Klammern), dicke Filamente (lila), dünne Filamente (grün). Modifiziert nach: OpenStax, Anatomy & Physiology, Unit 2, Chapter 10.3, Figure 10.10, *The Sliding Filament Model of Muscle Contraction*, OpenStax CNX, 3. Aug. 2021, <https://openstax.org/apps/archive/20210713.205645/re-sources/1463f0ef934552382ad130bf14cd23dd9e1e779a>, Creative Commons Attribution License 4.0

## 1.2 Die Myofilamente

Zwei Typen von Myofilamenten werden unterschieden: Das dünne Filament ist in der Z-Scheibe, einem strukturgebenden Fasergitter, verankert und reicht über die I-Bande in die A-Bande hinein, bis zum H-Streifen. Es besteht hauptsächlich aus filamentärem Aktin (F-Aktin) mit Troponin (Tn)-Komplexen, Tropomyosin und Nebulin (Abb. 2) [91]. Das dicke Filament hingegen ist in der M-Linie verankert und reicht über den H-Streifen in die A-Bande bis an die I-Bande heran. Den Großteil dieses Filaments bildet Myosin-II. Einen kleineren Anteil haben das Myosinbindungsprotein-C (MyBP-C), Titin und Obscurin [91]. Dünne und dicke Filamente überlappen sich so im Bereich der A-Bande [91, 181]. Diese Überlappung ist Voraussetzung für den Myosin-Aktin-Querbrückenzyklus [91].

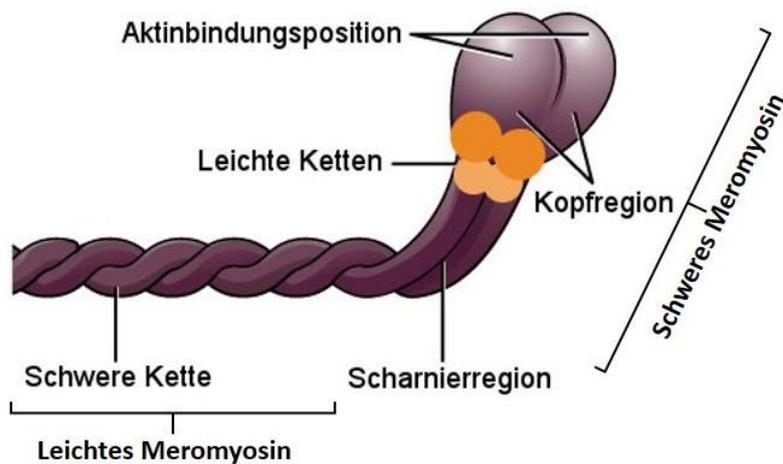


**Abbildung 2:** Vereinfachte, schematische Darstellung eines dicken (lila) und dünnen Filaments (grün). Dickes Filament: Besteht hauptsächlich aus zusammengelagerten Myosin-II-Molekülen, die Myosin Köpfe in regelmäßigen Abständen aus dem Filament heraus. Dünnes Filament: Besteht aus zwei F-Aktin Ketten, dem die regulatorischen Proteine des Troponin-Komplexes sowie Tropomyosin angelagert sind. Modifiziert nach: OpenStax, Anatomy & Physiology, Unit 2, Chapter 10.2, Figure 10.5, *The Sarcomere*, OpenStax CNX, 03. August 2021, <https://openstax.org/apps/archive/20210713.205645/resources/20598ea3cb1cf18c62196a5f93bbe36a1a6d246f>, Creative Commons Attribution License 4.0

Nach der Filament-Gleit-Theorie [71, 72], gleiten die Myofilamente in einer aktiven, Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Bewegung aneinander vorbei, was zu einer Verkürzung des Sarkomers und folglich des gesamten Muskels führt. Dies ist die Grundlage der Kontraktionsfähigkeit und Kraftentwicklung der quergestreifter Muskulatur und im Fall der Herzmuskulatur, auch der Pumpfunktion des Herzens [165]. In den folgenden Kapiteln werden die Struktur und Funktion, der für den Inhalt dieser Arbeit relevanten, Myofilamentproteine beschrieben.

### 1.2.1 Myosin-II

In einem Myosin-II-Molekül werden sechs Untereinheiten unterschieden, die sich bei Denaturierung voneinander trennen: zwei identische schwere Ketten (*myosin heavy chain* - MHC) sowie insgesamt vier leichte Ketten (*myosin light chain* - MLC), welche in regelrechtem Zustand als Dimere vorliegen [133]. Zusätzlich kann das Molekül durch enzymatische Verdauung in funktionelle Fragmente gespalten werden, die als Meromyosine bezeichnet werden. Hierbei unterscheidet man ein schweres Meromyosin (heavy meromyosin - HMM), das eine Kopf- (S1-Subfragment) sowie Hals- oder Scharnierregion (S2-Subfragment) umfasst, von einem leichten Meromyosin (*light meromyosin* - LMM), das einer Schwanzregion entspricht (Abb. 3) [182].



**Abbildung 3:** Vereinfachte, schematische Darstellung eines Myosin-II Moleküls, bestehend aus zwei schweren Myosin Ketten (lila) und vier leichten Myosin Ketten (orange). Modifiziert nach: OpenStax, Anatomy & Physiology, Unit 2, Chapter 10.2, Figure 10.5, *The Sarcomere*, OpenStax CNX, 3. Aug. 2021, <https://openstax.org/apps/archive/20210713.205645/resources/20598ea3cb1cf18c62196a5f93bbe36a1a6d246f>, Creative Commons Attribution License 4.0

Jede einzelne schwere Kette bildet am stabförmigen, C-terminalen Ende eine  $\alpha$ -helikale Struktur aus. Zwei schwere Ketten verwinden sich dann erneut (coiled coil, supercoil) und bilden im Myosinmolekül die Schwanzregion, welche für die Zusammenlagerung und Verankerung im dicken Filament verantwortlich ist [133]. Die Schwanzregion geht in die Halsregion und dann eine N-terminale, globuläre Kopfregion über [182]. Der Myosinkopf ist über eine Scharnierregion („lever arm“) beweglich [173] und besitzt, in Anwesenheit von Aktin, eine erhebliche Adenosintriphosphatase (ATPase)-Aktivität [105]. Unter ATP Verbrauch kann der Myosin-Aktin-Querbrückenzyklus mit Kraftschlag durchgeführt werden, welcher Motor der Muskelkontraktion ist [165]. Die leichten Ketten befinden sich in der Halsregion des Myosinmoleküls, wobei zwei Typen unterschieden werden, die essentielle leichte Kette (*essential light chain* - ELC) und die regulatorische leichte Kette (*regulatory light chain* - RLC) [96]. Beide Ketten interagieren mit anderen Proteinen des dicken Filaments (u.a. cMyBP-C [158]) und sind der Angriffspunkt von Kinasen, sodass ihnen ein regulatorischer Einfluss auf die Stellung des Myosin-S1 und damit auf Kraftentwicklung und Effizienz des Querbrückenzyklus zugesprochen wird [96]. Zur Bildung des Myosinfilaments lagern sich schließlich viele Myosinmoleküle im Bereich des LMM bündelartig aneinander. Die beweglichen Myosin Köpfe ragen hierbei alle 14,3 nm aus der Oberfläche des Filaments heraus, wobei der Teil im Bereich des H-Streifen ausgespart bleibt [55].

### 1.2.2 Aktin

Das im Sarkomer vorkommende Aktinfilament besteht aus zwei F-Aktin Ketten, die in Form einer  $\alpha$ -Doppelhelix verwunden sind. Die F-Aktin Ketten wiederum bestehen aus polymerisierten, globulären Aktin-Monomeren [37, 67]. Das Z-Scheiben Protein CapZ verhindert die spontane Depolymerisation und Polymerisation der globulären Aktin-Monomere im Sarkomer [19]. Jedes Monomer wiederum besteht aus 4 Subdomänen (SD 1-4) [37]. SD-1 ist für die ionische Interaktion mit Myosin (S1-Fragment) während des Querbrückenzyklus verantwortlich [95]. Die Regulation der Aktin-Myosin-Interaktion erfolgt unter anderem über die Interaktion von SD-3 und SD-4 mit Tropomyosin [81], sowie die Interaktion der SD-1 und SD-2 mit cMyBP-C [26]

### 1.2.3 Tropomyosin und der Troponin-Komplex

Tropomyosin ist ein kettenförmiges Heterodimer aus zwei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), angeordnet in einer  $\alpha$ -Doppelhelix. Es ist der Aktin-Doppelhelix in einer Rinne (große Furche) direkt angelagert [129]. Die entscheidende Funktion des Tropomyosins ist die Blockade und somit Regulation der Aktin-Myosin-Interaktion [112].

Der Troponin-Komplex besteht aus drei Untereinheiten, Troponin C, I, T (TnC, TnI, TnT). Er ist dem F-Aktin und Tropomyosin im dünnen Filament angelagert und übernimmt wichtige regulatorische Funktion. TnC fungiert als Calcium Sensor und Transduktor. TnI inhibiert die Aktivität der Myosin-ATPase durch Bindung an Aktin. TnT fixiert alle Teile des Troponin-Komplex untereinander und an das Aktinfilament. Es interagiert aber auch mit Tropomyosin und hält es in Blockade Position [55]. Der Einstrom von Calcium Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in die Muskelzelle, nach entsprechendem Stimulus und Depolarisation der Zellmembran, ist primärer Auslöser der Kontraktion der quergestreiften Muskulatur. Die Detektion und Verarbeitung dieses Kontraktionssignals ist Aufgabe des Troponin-Komplexes. Nach Einstrom in die Zelle bindet  $\text{Ca}^{2+}$  an TnC. Dies führt zu sequentiellen Konformationsänderungen im gesamten Troponin-Komplex [13]. Dadurch verringert sich die Bindungskraft von TnI an Aktin und die Inhibition der Myosin-ATPase-Aktivität lässt nach [55]. Die Bindung von TnT an Tropomyosin wird gelöst, sodass sich Tropomyosin umlagert und die Aktin-Myosin Bindungsstellen freigegeben werden [112]. Dann erst kann der Myosin-Aktin-Querbrückenzyklus mit Kraftschlag erfolgen.

## 1.2.4 Titin, Obscurin und Nebulin

Neben den oben genannten Bestandteilen sind auch die Proteine Titin und Obscurin am Aufbau der Myosinfilamente und Nebulin am Aufbau der Aktinfilamente beteiligt. Vereinfacht handelt es sich um große Strukturproteine, die die Länge, räumliche Anordnung und mechanische Stabilität, aller an der Myofilamentbildung beteiligten Proteine sowie deren feste Anordnung im Sarkomer, gewährleisten. Allerdings vermutet man auch dynamische, regulatorische Eigenschaften zum Beispiel auf die passive Kraftentwicklung bei Muskeldehnung [91]. Sie sind hier der Vollständigkeit halber aufgeführt, da sie in anderen Kapiteln Erwähnung finden.

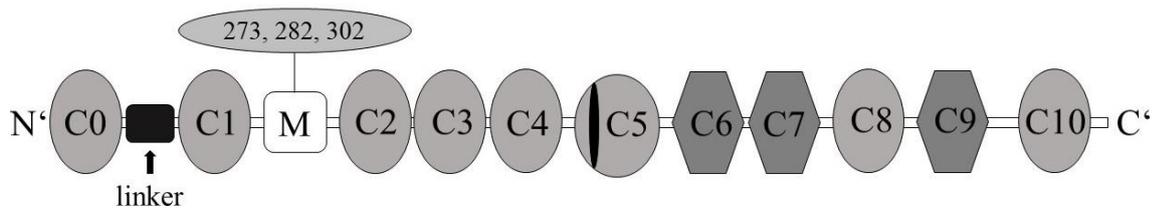
## 1.3 Myosinbindungsprotein-C

### 1.3.1 Entdeckung und frühe Forschungsarbeiten

Von Starr und Offer wurden 1971 Nebenbanden intermediären Gewichts bei der gelelektrophoretischen Auftrennung einer quergestreiften Skelettmuskelzellaufbereitung von Hasen beschrieben. Eine dieser Banden wurde als C-Protein bezeichnet und es wurde die Vermutung geäußert, dass eine Beziehung zu Myosin besteht [162]. Es folgten weitere Untersuchungen, die Hinweise auf die Anordnung dieses Proteins innerhalb des Sarkomers, die Struktur und seine Beziehung zu Myosin gaben [27, 115, 128]. Murakami et al. berichteten 1976 ein entsprechendes Protein in porcinem Ventrikelmyokard nachgewiesen zu haben [122]. Weiterhin zeigten Moos et al. 1978, dass das C-Protein *in vitro*, neben der Myosinbindungs-, auch eine Aktinbindungsfähigkeit besitzt, sodass auch eine C-Protein-Aktin-Interaktion im Sarkomer möglich erschien [114]. Yamamoto und Moos führten 1983 vergleichende Untersuchungen von schnellen sowie langsamen quergestreiften und kardialen Muskelfasern durch. Sie zeigten, dass drei strukturell unterschiedliche Isoformen des C-Proteins existieren, die vermuteten Funktionen aber ähnlich seien [185]. In den folgenden Jahrzehnten folgte eine Vielzahl von Arbeiten, welche die Struktur, Lokalisation, Funktionen und pathophysiologische Eigenschaften des MyBP-C genauer beleuchteten.

### 1.3.2 Molekulare Struktur und Lokalisation im Sarkomer

Das cMyBP-C ist ein modular aufgebautes Protein und besteht aus elf globulären, linear miteinander verbundenen Untereinheiten (Domänen), die vom Amino-Terminus (N-Terminus) zum Carboxy-Terminus (C-Terminus) mit C0-C10 bezeichnet werden. Die Domänen C0-C5, C8 und C10 gehören zur Superfamilie der Immunglobuline (Ig) und C6, C7 und C9 zur Fibronectin-III Familie (Fn3) [187]. Sie haben ein Molekulargewicht von je ca. 10 kDa und eine Abmessung von je ca. 2 x 3 x 4 nm [26]. Das cMyBP-C Gesamtmolekül ist so ca. 40 nm lang und 140,8 kDa schwer [26, 42, 99]. Spezifisch für die kardiale Isoform sind die gesamte C0-Domäne, ein Einschub von 28 Aminosäureresten in der C5-Domäne, eine kurze Prolin- und Alanin-reiche-Sequenz zwischen den Domänen C0 und C1 sowie das sogenannte M-Motiv zwischen C1 und C2 [26, 52, 78, 187]. Durch elektronenmikroskopische Untersuchung von Skelettmuskulatur, mit Antikörpermarkierung des MyBP-C, konnte von Craig und Moss 1976 eine regelmäßige Bänderung nur im mittleren Drittel der A-Bande, links und rechts der M-Linie (C-Zone) des Sarkomers, beobachtet werden. MyBP-C ist dort in Gruppen von zwei bis vier Molekülen, in sieben regelmäßigen, orthogonalen Streifen auf den Myosinfilamenten lokalisiert, welche jeweils 43 nm voneinander entfernt sind [27]. Das gleiche Verteilungsmuster wurde in myokardialen Sarkomeren für cMyBP-C nachgewiesen, wobei es hier in neun Streifen angeordnet ist [89, 98]. Die Myosinköpfe liegen jeweils 14,3 nm voneinander entfernt, sodass MyBP-C auf der Höhe jedes dritten Kopfs zu liegen kommt [27]. Die Bindung von cMyBP-C an das dicke Filament erfolgt über die C-terminalen Domänen (C8-10). Diese lagern sich axial dem Filament an, wobei der C-Terminus in Richtung M-Linie weist [89]. Über Interaktionen von LMM mit C10 [26, 115] sowie Titin mit den Domänen C8-C10 wird eine stabile Verankerung erreicht [42]. Die Bindung an das Titin ist wahrscheinlich für die intervallartige Verteilung des cMyBP-C verantwortlich. Titin ist im Bereich der A-Bande aus Serien, sich wiederholender Elemente der Ig- und Fn3-Superfamilie (*super repeats*) aufgebaut, die 43 nm lang sind und wahrscheinlich als Gerüst für die Verankerung des MyBP-C dienen [91, 170]. Die weiter N-terminal gelegenen Domänen (C0-C7) sind radiär vom Filament abgespreizt [89].



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur von cMyBP-C.

Ovale: Ig-Domänen, Sechsecke: Fn3-Domänen, M: M-Motiv mit Serin Resten 273, 282, 302, Schwarzer Balken, C5: C5 Einschub. Modifiziert nach: 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, 2016. 99: p. 47-56

### 1.3.3 Protein-Protein-Interaktion des N-Terminus, potentielle Funktion und Regulation durch Phosphorylierung

Das cMyBP-C erreicht mit dem N-Terminus andere Teile des gleichen, dicken Filaments aber auch benachbarte dünne Filamente, was zu unterschiedlichen, funktionell entscheidenden Interaktionen führt.

Bei cMyBP-C finden sich im M-Motiv vier Phosphorylierungsstellen an den Serinresten 273, 282, 302 und 307 (Maus Sequenz), die Ziel unterschiedlicher Kinasen (Proteinkinase (PK)-A/C/D, Ca<sup>2+</sup>-abhängige Calmodulinkinase II, ribosomale S6-Kinase [5, 61, 144]) sind. Auch in der Prolin- und Alanin-reichen-Sequenz existiert in Position 133 (Maus Sequenz) ein phosphorylierbarer Serinrest, der das Ziel der Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) ist [87]. Im gesunden Myokard und bei ausgeglichener kardialer Beanspruchung, zeigt sich eine starke Phosphorylierung des M-Motivs [145]. Mittels molekularer bildgebender Verfahren (Elektronenspinresonanz-Spektroskopie, TR-FRET, Rasterkraftmikroskopie) unter Verwendung rekombinanter C0C2- und C0C3-Fragmente konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung zu reversiblen Konformationsänderungen mit Biegung des Moleküls in einer Scharnierregion des M-Motivs [24, 135] führt. Man vermutet, dass diese Umlagerung zur Veränderung der Bindungsaffinitäten des N-Terminus führen könnte und so ein wichtiger Mechanismus zur Regulation der cMyBP-C-Aktivität ist [116].

## **Interaktion mit Myosin**

Neben der bereits in Kapitel 1.3.2 beschriebenen Verankerung am dicken Filament über den C-Terminus, interagiert der N-Terminus des cMyBP-C im Bereich des S1-S2-Myosinfragmentübergangs [60, 163]. Verantwortlich für diese Interaktion scheint hauptsächlich das M-Motiv zu sein [10]. Diese Bindung soll wie ein Federmechanismus wirken [65], der die Position des S1-Kopfs verändert sowie seine Beweglichkeit limitiert und so die Affinität zu Aktin verringert. In Folge wird der Querbrückenzyklus inhibiert [80]. Bei *in vitro*-Versuchen zur Verschiebegeschwindigkeit von einzelnen Aktin- und Myosinproteinen sowie vollständigen Myofilamenten, zeigt sich in Gegenwart von cMyBP-C eine geringere Verschiebegeschwindigkeit von Aktin und Myosin gegeneinander [130], passend zur Überlegung des Federmechanismus. Durch Phosphorylierung im M-Motiv wiederum, wird die cMyBP-C Bindung an Myosin-S2 abgeschwächt [146], sodass der S1-Kopf besser beweglich ist und die Affinität zu Aktin erhöht ist [117], etwa durch  $\beta_1$ -adrenerge Stimulation mit folglich erhöhter PK-A-Aktivität und vermehrte Phosphorylierung des M-Motivs [80, 102].

## **Interaktion mit Aktin und Tropomyosin**

Man vermutet, dass die Aktin-cMyBP-C-Interaktion im Bereich der Aktin-SD1 über das M-Motiv und die C0-Domäne des N-Terminus des cMyBP-C erfolgt [10, 120, 180], so dass sie die Verschiebegeschwindigkeiten von Aktin- und Myosinfilamenten im Sarkomer beeinflussen kann [65]. In einem *in vitro* Sarkomermodell wurde von Previs et al. die Verschiebegeschwindigkeit von einzelnen, beweglichen Aktinfilamenten zu dicken Myofilamenten untersucht. Hierbei konnte eine Herabsetzung der Aktinverschiebegeschwindigkeit im cMyBP-C tragenden Abschnitt des dicken Myofilaments gezeigt werden. Dieser Effekt war nach enzymatischer Abspaltung des N-Terminus von cMyBP-C nicht mehr nachweisbar [134]. Wurden diese N-terminalen Spaltprodukte (Fragmente C0C1f und C0C3) allein wieder zu Aktinfilamenten und isolierten Myosinproteinen hinzugefügt, war der Effekt erneut wie im Sarkomermodell nachweisbar [134]. Auch diese Interaktion des cMyBP-C kann durch Phosphorylierung im M-Motiv reguliert werden. Bei Dephosphorylierung zeigte sich eine stärkere, bei Phosphorylierung eine geringere Reduktion der Aktin-Myosin Verschiebegeschwindigkeit in Folge vermuteter Änderungen der Bindungsaffinitäten des N-Terminus von cMyBP-C [134, 180]. Weiterhin konnte *in vitro* gezeigt werden, dass N-terminale Fragmente des cMyBP-C (COC2, COC3) Einfluss auf

die Calciumsensitivität des dünnen Filaments haben. Tropomyosin wird aus der blockierenden Position am dünnen Filament verdrängt. Dies führt bereits bei niedriger  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer Aktivierung mit Aktin-Myosin-Verschiebung. Bei hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zeigte sich jedoch ein entgegengesetzter Effekt, eine Verringerung der maximalen Aktin-Myosin Verschiebegeschwindigkeit [120, 121, 138].

### **Interaktion mit der RLC**

Weiterhin zeigt sich eine Interaktion zwischen der RLC und der C0-Domäne [137]. In einer älteren Arbeit wird die Aktivität der Aktin-aktivierten Myosin-ATPase durch Hinzufügen von MyBP-C erhöht, was den Myosin-Aktin-Querbrückenzyklus im Sarkomer beeinflussen würde. Dieser Effekt zeigt sich jedoch nicht mehr, wenn die RLC des Myosindimers durch enzymatische Spaltung entfernt wurde [104], was eine Interaktion zwischen MyBP-C und RLC nahelegt [130].

Zusammenfassend vermutet man, dass cMyBP-C die Anzahl der Querbrückenzyklen, die Kontraktionsgeschwindigkeit und die Kraftentwicklung sowie die Motilität der dicken und dünnen Filamente, über dynamische Interaktionen mit Myosin-S2, Aktin und die RLC in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Form, beeinflusst. Diese Interaktionen wiederum sind durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung im M-Motiv reguliert. So entsteht ein fein regulierter Mechanismus zur Anpassung der Sarkomeraktivität an den aktuellen physiologischen Bedarf. Der genaue Mechanismus und Beitrag der einzelnen Protein-Protein Interaktionen hierzu ist Gegenstand laufender Forschung und Diskussion. Abschließend kann man festhalten, dass die Sarkomerfunktion wesentlich von der intakten Funktion des cMyBP-C abhängig ist. Folglich lassen sich bei Erkrankungen des Myokards, Struktur- und Funktionsveränderungen des cMyBP-C nachweisen [113], die in den nächsten Abschnitten genauer beschrieben werden.

### **1.3.4 Genetisch determinierte myokardiale Erkrankungen durch Veränderungen im MYBPC-Gen**

Mutationen im für cMyBP-C codierenden MYBPC3-Gen sind Ursache hypertropher Kardiomyopathien (HCM) [9, 86], eine der häufigsten genetisch determinierten myokardialen Erkrankungen mit einer Prävalenz von 1:500 in der Normalbevölkerung von Nordamerika [86]. Hierbei ist cMyBP-C am C-Terminus verkürzt, sodass die Verankerung am dicken Filament gestört ist. Es kann in der Folge im Sarkomer von erkrankten Patienten

nur in geringem Maße oder gar nicht nachgewiesen werden [86]. Ebenso berichten Lynch et al., dass bei Versuchen mit transgenen, cMyBP-C(t/t)-Mäusen, die eine MYBC3-Mutationen besitzen, welche zum vollständigen Fehlen von cMyBP-C im Myokard führt, eine starke proinflammatorischen Reaktion des Myokards beobachtet werden konnte, die als Ursache einer dilatativen Form der Kardiomyopathie (DCM) vermutet wird [100].

### **1.3.5 Gradmesser des myokardialen Stresses: Dephosphorylierung und proteolytische Fragmentierung von cMyBP-C**

In Myokardgewebe von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz sowie einem Tiermodell der Herzinsuffizienz konnten eine starke Dephosphorylierung von cMyBP-C nachgewiesen werden [25, 41]. Interpretiert wird dies als Folge der anhaltenden  $\beta$ -adrenergen Antwort auf die Verringerung des Herzzeitvolumens im Rahmen Herzinsuffizienz, mit konsekutiver Herunterregulierung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren im Verlauf der Erkrankung und somit letztlich abgeschwächter PK-A-Aktivität [25, 41], sowie erhöhter Phosphataseaktivität im erkrankten Myokard [40, 126]. Aus der Verringerung der Phosphorylierung resultieren Änderungen der cMyBP-C und Sarkomerfunktion und damit auch eine weitere Verschlechterung der systolischen Ventrikelfunktion [84]. Weiterhin zeigt sich auch eine ausgeprägte negative Auswirkung auf die diastolische Ventrikelfunktion im phosphorylierungsdefizienten cMyBP-C Mausmodell [168, 169].

Bei der Erhebung des Phosphorylierungsstatus von Sarkomerproteinen im Gewebe des rechten Vorhofohrs, bei Patienten mit permanentem Vorhofflimmern im Vergleich zu Probanden mit Sinusrhythmus, konnte eine verstärkte Dephosphorylierung von cMyBP-C bei Vorhofflimmern gezeigt werden [39]. Auffällig war insbesondere, dass der Phosphorylierungsstatus von Troponin-I und des Phospholamban unverändert blieb oder bei letzterem sogar erhöht war [39].

Bei Untersuchungen von ischämischem Myokard, in verschiedenen Tiermodellen (Hund - Ischämie/Reperfusion, Ratte - permanente Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* (LAD)) [32, 33, 58] sowie bei Patienten mit einer akuten myokardialen Ischämie [6], war im Infarktbereich sowie in der Grenzzone zum gesunden Gewebe ebenfalls eine verstärkte Dephosphorylierung von cMyBP-C im Vergleich zu gesundem Myokard nachweisbar [6, 32, 33, 58].

Es ist daher möglich, dass die fortschreitende Dephosphorylierung des cMyBP-C ein zentraler Ausdruck und Folge des myokardialen Stresses, unabhängig von der Genese, ist. Die damit einhergehende Veränderung der cMyBP-C Funktion könnte die Verschlechterung der Sarkomerfunktion sowie der systolischen und diastolischen Ventrikelfunktion erklären und ein wichtiger Faktor der Progression der Herzinsuffizienz sein.

Die beschriebene Dephosphorylierung von cMyBP-C führt, im Gegensatz zu anderen Sarkomerproteinen, zu einer besonders starken Anfälligkeit für eine Spaltung durch Proteasen [58, 99, 134]. Der exakte Mechanismus, der zur starken Anfälligkeit für Proteolyse des dephosphorylierten cMyBP-C führt, bleibt bisher allerdings unklar [6]. Wie andere Proteine des Sarkomers ( $\alpha$ -Actinin, cTnI, cTnT, Desmin, MLC-1, Titin) [35, 73, 174] ist cMyBP-C hierbei aber Ziel der calciumabhängig aktivierten Cysteinprotease  $\mu$ -Calpain [6]. Die bei der Proteolyse entstehenden Fragmente bestehen vor allem aus Teilen der N-terminalen Domänen C0-C4, werden rasch aus dem Sarkomer freigesetzt [32, 33, 134] und sind auch in der systemischen Zirkulation von Versuchstieren sowie Patienten mit einer akuten myokardialen Schädigung, etwa einer Ischämie [57, 58, 85], nachweisbar. Besonders hervorzuheben, ist das als C0C1f bezeichnete, 40 kDa-Fragment, das die Domänen C0-C1 und 17 Aminosäuren des M-Motivs (Aminosäuren 1 - 271) enthält [58, 180]. Dieses Fragment weist *in vitro* mehrere pathophysiologisch interessante Eigenschaften auf. Die Transfizierung von C0C1f in Kardiomyozyten von Ratten und Mäusen zeigt zytotoxische Eigenschaften, eine Reduktion der kontraktilen Eigenschaften des Sarkomers (Verkürzungsgeschwindigkeit, Kraftentwicklung) sowie der  $\text{Ca}^{2+}$  Sensitivität sowie die bereits beschriebene Reduktion der Aktin-Myosin Verschiebegeschwindigkeit in *in vitro* Motilitäts Systemen [59, 99, 134, 180]. Witayavantikul et al. konnten in humanem Myokard diese Effekte reproduzieren. Ihre Arbeit erbrachte deutliche Hinweise darauf, dass die Verminderung der Kontraktilität, der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität und der Energieeffizienz der Kontraktion aus einer konstanten Bindung des C0C1f an das dünne Filament (F-Aktin, Tropomyosin) und einer hierdurch bedingten Störung der Aktin-Myosin-cMyBP-C Interaktion resultiert [183]. Diese Erkenntnisse könnten zumindest zum Teil, die kontraktile Dysfunktion des nicht infarzierten Myokards nach einem Myokardinfarkt erklären [183]. Bei Überexpression von C0C1f, in einem transgenen Mausmodell kommt es, trotz Anwesenheit von normal funktionierendem cMyBP-C, zur raschen Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie und Fibrose mit konsekutivem Herzversagen in der 12.-17.

Lebenswoche. Weiterhin konnte COC1f in Myokardproben von Patienten mit ischämischer und nicht-ischämischer, terminaler Herzinsuffizienz nachgewiesen werden [139]. Im Kontext von dilatativen Kardiomyopathien und experimenteller Myokarditis konnten autoreaktive Antikörper gegen cMyBP-C und seine Fragmente nachgewiesen werden [78, 101]. Kasahara et al. gelang hierbei sowohl erstmalig die Induktion einer experimentellen Myokarditis durch Injektion von zwei cMyBP-C-Fragmenten (Aminosäuren 205 - 916, 945 - 1270) sowie der Nachweis einer Auto-Antikörperbildung gegen cMyBP-C im Mausmodell als auch erstmalig der Nachweis von cMyBP-C-Antikörpern im Serum von Patienten mit DCM [78]. Matsumoto et al. konnten wiederum durch Injektion vier verschiedener cMyBP-C-Fragmente eine Myokarditis im Rattenmodell erzeugen. Alle Fragmente führten zu einer Myokarditis. Die schwerste Ausprägung wurde jedoch nach Injektion N-terminaler Fragmente (Aminosäuren 1 - 323, 317 - 647) beobachtet [109].

Verhindert man hingegen die Dephosphorylierung, durch phosphomimetischen Ersatz der Serinreste im M-Motiv durch Aspartat im System transgener Mäuse, so konnten Sadayappan et al. zeigen, dass cMyBP-C vor Proteolyse durch  $\mu$ -Calpain geschützt war sowie, im Vergleich zum dephosphorylierten Wildtyp cMyBP-C, eine Reduktion der Infarktgröße im Ischämie/Reperusionsmodell vorlag [146]. Ähnliche Ergebnisse konnten von der gleichen Arbeitsgruppe, bei Versuchen mit transgenen  $\Delta$ CTS(t/t) Mäusen, welche keine Calpain *target site* im cMyBP-C besitzen und damit keinen Angriffspunkt mehr für die Proteolyse bieten, bestätigt werden [6]. Im Tiermodell zur Untersuchung von *stunned myocardium*, also Myokard, dessen Pumpfunktion sich nach einer akuten Ischämie bei rechtzeitiger Reperfusion wieder erholt [99], zeigt sich ebenfalls eine erhöhte Phosphorylierung des cMyBP-C [188]. Eine starke Phosphorylierung des cMyBP-C könnte zusammenfassend unabhängig von der zur Verschlechterung führenden Ursache zum Erhalt der Myokardfunktion, im Rahmen einer Ischämie zur Verringerung der Infarktgröße beitragen und so kardioprotektiv wirken [146].

### **1.3.6 cMyBP-C im klinischen Kontext des Myokardinfarkts**

Eine epidemiologische Analyse aus dem Jahr 2016 gibt an, dass in Europa jährlich ca. 1,8 Millionen Menschen an den Folgen einer koronaren Herzerkrankung (KHK) versterben [171]. In Deutschland wurden 890/100.000 Einwohnern mit der Diagnose einer ko-

ronaren Herzerkrankung aus Krankenhäusern entlassen, wobei die durchschnittliche Behandlungsdauer in Folge eines Myokardinfarkts bei 10,3 Tagen lag [171]. Dies macht die enorme Bedeutung der KHK für die Individualgesundheit sowie das Gesundheitssystem deutlich [171]. Wenn Herzmuskelgewebe über das Blut in den Koronargefäßen nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird, bezeichnet man dies als Ischämie. Eine anhaltende Ischämie löst bereits nach zwanzig Minuten den subendokardial beginnenden, nekrotischen Untergang der Herzmuskelzellen und damit einen Myokardinfarkt aus [99]. Sowohl der komplette Verschluss eines Koronargefäßes etwa bei atherosklerotischer Plaqueruptur (Myokardinfarkt Typ I) als auch die partielle Stenosierung eines Koronargefäßes durch Atherosklerose oder einen Koronarspasmus, in Kombination mit erhöhtem myokardialen Sauerstoffbedarf oder systemischer Hypoxämie (Tachykardie, Hypertonie, respiratorische Insuffizienz, Anämie), kann einen Myokardinfarkt auslösen (Myokardinfarkt Typ II) [167]. Bei Vorliegen einer klinischen Ischämiesymptomatik (*Angina pectoris*) stehen zur diagnostischen Sicherung eines akuten Myokardinfarkts unterschiedliche Verfahren zur Verfügung. Im Elektrokardiogramm können diverse, nur teilweise spezifische, Veränderungen (ST-Streckenhebung, Q-Zacke, horizontale oder deszendierende ST-Streckensenkung, T-Negativierung) beobachtet werden [167]. Die Bestimmung der Konzentration von Muskelenzymen (Creatinkinase) oder Sarkomerproteinen (kardiale Isoformen des Troponin-Komplexes) im Blutplasma und insbesondere deren Konzentrationskinetik bei sequentiellen Blutentnahmen, kann als Surrogatparameter einer myokardialen Schädigung herangezogen werden [111]. Weiterhin kann die Echokardiographie, durch die Erkennung regionaler Wandbewegungsstörungen, hilfreich sein [167]. Die wichtigste Säule der Diagnostik von Myokardinfarkten, insbesondere derer ohne offensichtliche Veränderungen des Elektrokardiogramms, ist die Bestimmung der Konzentration oben genannter Biomarker im Blutplasma. Im klinischen Alltag wird bisher die hochsensitive Bestimmung der Bestandteile des kardialen Troponin-Komplexes (cTnI und cTnT) als Standard angesehen [127, 167]. Es bestehen jedoch Limitationen in der Beurteilbarkeit von cTnI und cTnT Messungen im klinischen Alltag. Das Konzentrationsmaximum im Blutplasma wird erst 18 h beziehungsweise 24 h nach einem Myokardinfarkt erreicht [111]. Es entsteht so ein Problem bei der sehr frühen Diagnosestellung von Myokardinfarkten, besonders innerhalb der ersten 3 h nach Symptombeginn, was repetitive Troponin-Bestimmungen notwendig macht [77]. Bis sich erhöhte cTn-Werte nach einem Myokardinfarkt wieder normalisieren dauert es bis zu zwei Wochen, was die Diagnose von wiederkehrenden Myokardinfarkten erschwert [111].

Weiterhin besteht das Problem, dass es in Folge einer Vielzahl von myokardialen Erkrankungen zur Freisetzung von Troponinen als Ausdruck einer nicht ischämisch bedingten myokardialen Schädigung kommen kann, etwa in Folge tachykarder Herzrhythmusstörungen, schwerer oder dekompensierter Herzinsuffizienzen, Lungenarterienembolien mit Rechtsherzbelastung und Perimyokarditiden [111]. Ebenso können bei Patienten mit führend extrakardialen Erkrankungen wie Sepsis, ischämischen Schlaganfällen schwerer oder dialysepflichtiger Niereninsuffizienz erhöhte Konzentrationen von cTnI und cTnT gemessen werden [111]. Die Interpretation der Messwerte und damit das Erkennen eines Myokardinfarktes können also unter Umständen deutlich erschwert sein. Lediglich bei der Hälfte der Patienten, die sich mit ischämieverdächtigen Symptomen in einer Notaufnahme vorstellen und ein erhöhtes cTnI oder cTnT aufweisen, liegt letztlich auch ein Myokardinfarkt vor [12].

Wie Kaier et al. bemerkten [76, 77], besteht der Bedarf nach einem Wandel des bisherigen Biomarkerregimes und der Betrachtung möglicher Alternativen. CMyBP-C gilt bereits längere Zeit als potentieller und spezifischer Biomarker einer myokardialen Schädigung [58, 74]. CMyBP-C kommt, wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, spezifisch im Sarkomer des Myokards vor. Weiterhin ist es im Vergleich zu TnI und TnT in größeren Mengen im Sarkomer vorhanden [74]. Auf zellulärer Ebene kommt es während der myokardialen Ischämie und auch zu Beginn der Reperfusion in den Kardiomyozten zu einem raschen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, über die Umkehrung der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauscherfunktion. Diese ist Folge des Zusammenbruchs des Energiestoffwechsels, der Integrität der Zellmembran und der Funktion der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, mit konsekutiver Erhöhung der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration [73]. Wie in Kapitel 1.3.5 beschrieben, führt die erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Aktivierung von  $\mu$ -Calpain [73] und Proteolyse der Sarkomerproteine [35, 73, 174], so auch von cMyBP-C [6, 58]. Im ischämischen Myokard (Infarkt- und Grenzzone) liegt cMyBP-C überwiegend dephosphoryliert vor und ist daher besonders anfällig für eine Proteolyse [6, 32, 33, 58]. CMyBP-C und die so entstehenden Fragmente lösen sich aus dem Sarkomer [32, 33, 134] und sind im systemischen Blutstrom von Versuchstieren und Patienten mit Myokardinfarkt [57, 58] nachweisbar. Passend zu diesen Ergebnissen, konnten wir, gemeinsam mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sadayappan [85], zeigen, dass im Myokardinfarkt Tiermodell (LAD-Ligatur bei Schweinen) cMyBP-C-Fragmente bereits sehr früh (nach 30 min) im Blutstrom messbar und nach 3 h signifikant gegenüber dem Ausgangswert erhöht sind.

Im Vergleich zu cTnI und cTnT steigt die cMyBP-C-Konzentration nach Myokardinfarkt schneller an und fällt schneller wieder ab [85]. Bei Patienten mit hypertroph-obstruktiver Kardiomyopathie, bei denen durch Alkoholinjektion in einen Coronararterienast eine therapeutische myokardiale Nekrose zur Ablation einer Septumhypertrophie (transkoronaren Ablation der Septumhypertrophie - TASH) induziert wurde, war diese rasche Freisetzungskinetik reproduzierbar [85]. Baker et al. konnten bei ähnlicher Methodik im Tiermodell sowie nach TASH und zusätzlich bei Patienten mit akutem ST-Streckenhebungsinfarkt ähnliche Ergebnisse erheben [4]. Im Rahmen der APACE Studie (multizentrische Diagnostikstudie), in die Patienten mit unklaren Thoraxschmerzen zur weiteren Abklärung im Notaufnahmesetting eingeschlossen werden, konnten Grenzwerte für die cMyBP-C-Konzentration im Patientenblut mit ähnlich hoher Sensitivität, Spezifität, negativem sowie positivem prädiktivem Wert für Diagnose und Ausschluss eines Myokardinfarktes wie bei kardialen Troponinen etabliert werden [77]. Schulte et al. untersuchten die Konzentrationen von cMyBP-C, kardialen Troponinen und microRNAs im Blutplasma von 83 Patienten, die sich mit Brustschmerzen im Krankenhaus vorstellten [150]. Bei 38 Patienten wurde im Anschluss die Diagnose eines Myokardinfarktes gestellt. Die Sensitivität von cMyBP-C für die Erkennung eines akuten Myokardinfarktes wurde von den Autoren im Vergleich zu den übrigen gemessenen Biomarkern am höchsten eingestuft [150]. Im Weiteren konnten Kaier et al. zeigen, dass die diagnostische Leistung für Bestätigung und Ausschluss eines akuten Myokardinfarktes durch Bestimmung von cMyBP-C im Blut von 776 Patienten mit ischämieverdächtiger Symptomatik (*Angina pectoris*), der von cTnI und cTnT Messungen nicht unterlegen ist [76]. Besonders früh nach Symptombeginn (innerhalb der ersten 3 h) ist sie der von cTnT und cTnI überlegen, sodass Myokardinfarkte früher laborchemisch festgestellt oder ausgeschlossen werden können als dies mit der Bestimmung von cTnI und cTnT bisher möglich war [76]. Einschränkung ist zu bemerken, dass zwar bereits eine hochsensitive Nachweismethode für cMyBP-C in Blutproben existiert [75, 106], diese aber bisher nicht kommerziell erhältlich ist und so nicht in die im klinischen Alltag angewandten Labor Großgeräte oder in patientennah eingesetzte Geräten (*point of care* Systeme) integriert werden konnte [76, 77]. Weiterhin müssen die erhobenen Grenzwerte der cMyBP-C-Konzentrationen außerhalb von Kohortenanalysen mit ausreichender Patientenzahlen und Studiendesign validiert werden, die eine klinische Routineanwendung begründen können [76, 77].

Nach der Diagnosestellung bestehen wichtige therapeutische Schritte aus der medikamentösen Hemmung der Blutgerinnung (Heparin), der Thrombozytenaggregationshemmung (unter anderem Acetylsalicylsäure, Ticagrelor), der Senkung des myokardialen Sauerstoffbedarfs (Betarezeptorblocker) sowie der Wiederherstellung des Blutflusses, durch intravaskuläre-interventionelle (*percutaneous coronary intervention* - PCI) oder offen-chirurgische Verfahren (*coronary artery bypass grafting* - CABG) [141, 164]. Da der Herzmuskel nur über geringe regenerative Kapazitäten verfügt, kommt es in Folge einer anhaltenden myokardialen Ischämie mit Infarzierung an dieser Stelle zur Ausbildung einer kollagenen Narbe [44]. Jedes Narbengewebe ist jedoch nur eingeschränkt in der Lage die Funktion des ursprünglichen Gewebes zu ersetzen, sodass es häufig zu einer Funktionseinschränkung des Organs kommen kann. Übertragen auf das Herz und den Myokardinfarkt bedeutet dies eine umschriebene Einschränkung der Pumpfunktion, je nach Größe des Areal mit Ausbildung einer Herzinsuffizienz [44], was die Notwendigkeit einer frühen Diagnosestellung unterstreicht.

Zusammenfassend erscheint cMyBP-C ein vielversprechender, sicherer Biomarker zur Erkennung von Myokardinfarkten zu sein, der aufgrund der raschen Freisetzung ins und Elimination aus dem Blut insbesondere für die sehr frühe Diagnostik zum Beispiel im Rahmen von *point of care* Messungen in der Notaufnahme, mit besten diagnostischen Ergebnissen in kombinierter Beurteilung mit cTnI und cTnT Messungen sowie klinischen Parametern wie Alter, Geschlecht und kardiovaskulären Risikofaktoren, geeignet ist [76].

#### **1.4 Die inflammatorischen Vorgänge in Folge einer myokardialen Ischämie**

Das inflammatorische Geschehen nach einer anhaltenden, myokardialen Ischämie wird üblicherweise in einem Drei-Phasen-Modell dargestellt, wobei man von einer inflammatorischen, einer proliferativen Phase und einer Reifungsphase spricht [21, 45]. Grundsätzlich bestehen hierbei speziesspezifische Unterschiede: Etwa benötigen die genannten Vorgänge in einem menschlichen Herzen etwa acht Wochen, wohingegen murine Herzen die Phasen in etwa 14 Tagen durchlaufen [66]. Das Drei-Phasen-Modell soll im Folgenden kurz dargestellt werden und bezieht sich auf Erkenntnisse im Tiermodell (in der Regel Maus oder Hund). Ob dieses auf den Menschen extrapoliert werden kann, ist letztlich unklar. Es entspricht jedoch dem aktuellen Stand der Forschung dies anzunehmen.

### 1.4.1 Inflammatorische Phase

Der Verschluss eines Koronargefäßes führt zum überwiegend nekrotischen Untergang der im Versorgungsgebiet liegenden Kardiomyozyten und zum Abbau der extrazellulären Matrix [45]. Hierbei werden unter anderem intrazelluläre Bestandteile, wie ATP, *heat shock* Proteine (HSPs), Ribonukleinsäuren (RNA), das intranukleäre *High-Mobility Group Protein 1* (HMGB-1), mitochondriale Desoxyribonukleinsäuren (DNA), Sarkomerproteine wie Myosin sowie Abbauprodukte der extrazellulären Matrixproteine (Hyaluronsäure, Osteopontin, Galektin) in den Extrazellularraum freigesetzt [20, 29, 153]. Man geht davon aus, dass diese Moleküle von Zellen des Herzmuskelgewebes, zu denen auch Teile des angeborenen Immunsystems gehören (residente Makrophagen stellen ca. 5-10 % aller Zellen des Herzmuskelgewebes [131] dar), als Alarmsignal einer Organschädigung erkannt werden können [153]. Man spricht daher bei den genannten Substanzen in diesem Zusammenhang auch von Alarminen oder *danger associated molecular patterns* (DAMPs) [110, 153]. Die Rolle der Sensoren auf der Zelloberfläche übernehmen hierbei, *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) [30, 47, 103], der Rezeptor für fortgeschrittene Glykierungsendprodukte (RAGE) [2, 21] und der P2X<sub>7</sub>-Rezeptor [153]. Es erfolgt die proinflammatorische Aktivierung der betreffenden Zellen, bei dem der NF- $\kappa$ B-Signalweg zentrales Element ist [56]. Folglich kommt es zur Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [16, 48, 62, 172] und der Chemokine Interleukin-8 (IL-8) und *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) [34, 83], wobei offen bleibt, welche Zelltypen in wie großem Umfang an der Freisetzung beteiligt sind. Anteil haben Endothelzellen, Kardiomyozyten, Fibroblasten, residente neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen [45]. Weiterhin kommt es zur Aktivierung der Adhäsionsmoleküle *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und *vascular cell adhesion protein-1* (VCAM-1) auf der Oberfläche der Leukozyten und Endothelien [79, 136]. Ziel des gesamten Vorganges der Zytokinfreisetzung und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen ist es, eine rasche und gerichtete Migration von frischen Leukozyten aus dem Blutstrom in das geschädigte Areal einzuleiten. Zunächst kommt es hauptsächlich zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, welche Zelltrümmer und zerstörte Teile der extrazellulären Matrix entfernen, diesen folgen inflammatorische Monozyten, die sich im Gewebe zu Makrophagen differenzieren können [172]. Weiterhin kommt es zur Einwanderung von Lymphozyten [20].

### 1.4.2 Proliferative- und Reifungsphase

Durch Interaktion der unterschiedlichen Zellpopulationen, kommt es dann zur Abschwächung der initial vorherrschenden proinflammatorischen Einflüsse und einem Übergang in die proliferative Postinfarktphase mit der Ausbildung von Granulationsgewebe [44]. Dies wird durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt: Die von apoptotischen Granulozyten freigesetzten Mediatoren Annexin A1 und Laktoferrin inhibieren die weitere Migration von Granulozyten in das Infarktgebiet [14]. Die Phagozytose der apoptotischen Granulozyten [155, 178] sowie von degradierten Matrixproteinen (Hyaluronsäure-Fragmente) [69] durch Monozyten und Makrophagen wiederum, steigert die Expression von inhibierenden, intrazellulären Mediatoren (*interleukin-1 receptor-associated kinase-M*) [149], Köder-Rezeptoren für IL-1 $\beta$  (IL-1R2) [148], Interleukin-10 (IL-10) und *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) [31, 172, 191], die in ihrer Gesamtheit eine antiinflammatorische Wirkung vermitteln. Die inflammatorische Aktivität und die Anzahl der im heilenden Myokard vorhandenen Leukozyten nehmen in der Konsequenz langsam ab. In diesem Mikromilieu wird die Differenzierung und Aktivierung von Myofibroblasten möglich, hauptsächlich durch die Wirkung von TGF- $\beta$  [44-46]. Diese produzieren und sezernieren Matrixproteine, vor allem Kollagen, Fibronectin und Proteoglykane [7, 22], aber auch Proteinaseinhibitoren (PAI-1 und TIMP-1) [17], und sorgen hierdurch für die strukturelle Stabilisierung des Granulationsgewebes. Ebenso beginnt eine stark ausgeprägte Angiogenese [90, 140].

In der sich anschließenden Reifungsphase kommt es überwiegend zur Apoptose der zellulären Komponenten des Narbengewebes (Leukozyten, Myofibroblasten) [45], zur stabilen Quervernetzung der Kollagenfasern [22] sowie zur Reifung der neuen Blutgefäße [140] und damit zur langsamen Ausbildung eines stabilen Narbengewebes.

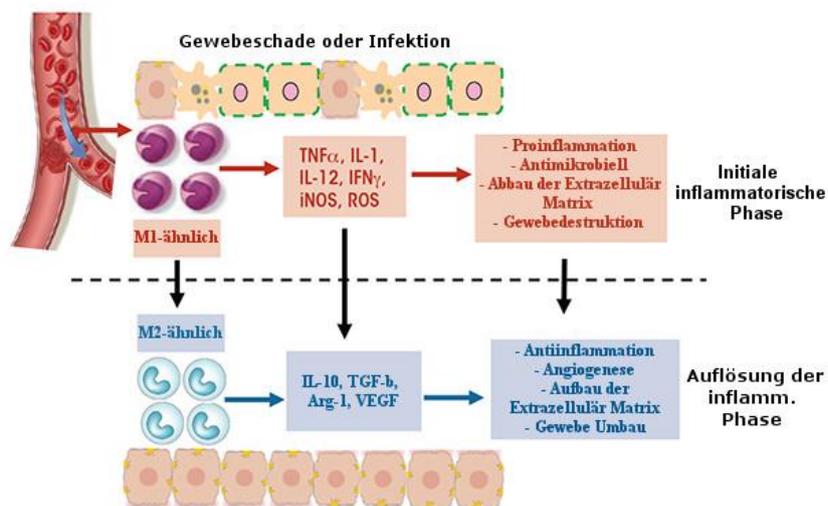
### 1.4.3 Rolle der Monozyten und Makrophagen im infarzierten Myokard

Nach den neutrophilen Granulozyten wandern Monozyten, aus dem Blutstrom heraus, in das Infarktareal ein. Dabei geht man von einer phasenhaften Rekrutierung von unterschiedlichen Subpopulationen aus dem bestehenden Monozytenpool, dem Milzreservoir sowie dem Knochenmark [123, 124] aus. Im Mausmodell begeben sich zunächst, als Ly-6c<sup>high</sup>/CCR2<sup>high</sup>/CX3CR1<sup>low</sup> beschriebene Monozyten in das Infarktgebiet. Diese sind charakterisiert durch eine hohe Expression der Oberflächenproteine des Lymphozyten-

Antigen-6c-Komplexes (Ly6c) sowie des CC Chemokinrezeptors Typ-2 (CCR2) [124]. Eng verwandt mit diesem Zelltypen sind beim Menschen die Monozyten mit der Oberflächenproteinverteilung CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> (klassische Monozyten) [38, 118, 152]. Die Migration dieser Subpopulationen ist in großem Maße abhängig von MCP-1 und MCP-3, den Liganden des CCR2 [34, 190]. Klassische humane Monozyten selbst produzieren hauptsächlich MCP-1 und sind damit der Motor der Monozytenrekrutierung [161]. Zudem besteht eine hohe phagozytische Aktivität. Weiterhin zeigen murine Ly6c<sup>high</sup> Monozyten eine ausgeprägte Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 und IL-8 [123, 152], was weniger stark für die klassischen humanen Monozyten sondern mehr für die CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> (intermediäre Monozyten) gilt [161]. Als Teil der inflammatorischen Phase ist die Aufgabe aller dieser Monozytenpopulationen die Phagozytose von Zelltrümmern sowie der Abbau der zerstörten extrazellulären Matrix und die Chemotaxis weiterer Leukozyten [20]. Anschließend kommt es im Mausmodell zur Rekrutierung von Ly-6c<sup>low</sup>/CCR2<sup>low/neg</sup>/CX3CR1<sup>high</sup> Monozyten. Besonders hervorgehoben werden muss die hohe Expression des CX3C-Chemokinrezeptors Typ-1 (CX3CR1) [124, 161]. Der CX3CR1-Ligand Fraktalkin gilt als Motor der Rekrutierung dieser Monozytensubpopulation, die aufgrund der Expression von IL-10, TGF- $\beta$  und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) als reparativ bezeichnet werden kann [21, 123, 124]. Beim Menschen wiederum werden in dieser Phase CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup> (nicht klassisch) und ebenfalls CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> (intermediäre) Monozyten rekrutiert [38, 118, 152]. Sie zeichnen sich im Gegensatz zu ihrem Maus-Konterpart durch die Expression von einerseits proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-6 [161] sowie andererseits antiinflammatorischen Zytokine, wie IL-10 [123, 154], aus. Aufgrund der Mobilisation in inflammatorisch aktive Gewebe und des genannten Zytokinprofils können diese Monozyten auch als inflammatorisch bezeichnet werden. Sie modulieren und steuern die initial prädominant inflammatorische Reaktion und bahnen den Übergang in die proliferative Phase der Infarktheilung [20]. Die Rekrutierung dieser Subpopulation fällt insgesamt jedoch schwach aus [38]. Ergänzend sei aber erwähnt, dass eine Arbeit von Hilgendorf et al. [64] die Frage nach einer Überarbeitung, des oben beschriebenen Modells der phasenhaften, sequentiellen Mobilisierung zweier Monozytensubpopulationen aufwirft. Demnach können bei Nr4a1<sup>-/-</sup> Mäusen, die keine Ly-6c<sup>low</sup> Monozyten im peripheren Blut ausbilden, dennoch Ly-6c<sup>low</sup> Makrophagen im infarzierten Myokard nachgewiesen werden. Die Schlussfolgerung hieraus ist eine lokal ablaufende Konversion von eingewanderten Ly-6c<sup>high</sup> in Ly-6c<sup>low</sup> Monozyten mit anschließender Differenzierung in Makrophagen

[64]. Der Hypothese der lokalen Konversion der Subpopulationen auf dem Boden der eingewanderten klassischen Monozyten ( $\text{Ly6c}^{\text{high}}$  und  $\text{CD14}^{++}/\text{CD16}^{-}$ ) wird eine Bedeutung neben oder teilweise sogar Anstelle der phasenhaften Rekrutierung eingeräumt, wobei zu bedenken ist, dass diese Beobachtungen aus einem Mausmodell stammen [70, 82, 161]. Nach Migration in unterschiedlichste Gewebe differenzieren sich Monozyten, abhängig vom *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), zu Makrophagen, so auch im infarzierten Myokard [49]. Subpopulationen finden sich auch hier: Typischerweise erfolgt die Einteilung in klassisch (M1) und nicht klassisch aktivierte (M2) Makrophagen, mit sich unterscheidenden Phänotypen [172].

M1 entspricht einem inflammatorischen und zytotoxischen Phänotyp, mit Expression entsprechender Zytokine wie  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-23 sowie Produktion direkt zytotoxisch wirkender Substanzen wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO) (Abb. 5) [118, 152, 172]. Die M1-Aktivierung erfolgt über  $\text{IFN-}\gamma$ , welches von aktivierten  $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen gebildet wird,  $\text{TNF-}\alpha$ , welches autokrin wirken kann oder von anderen antigenpräsentierenden Zellen gebildet wird und über TLR-Liganden wie Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien (LPS), HMGB-1 und HSPs [118]. Der M2-Phänotyp hingegen zeichnet sich durch eine hohe Phagozytoseaktivität aus. In diesem Sinne zeigt sich eine hohe Expression des Mannose Rezeptors-C Typ-1 (MRC-1), der für die Endozytose von Glykoproteinen, die etwa auf der Oberfläche von pathogenen Keimen vorkommen, verantwortlich ist [159, 160]. Weiterhin ist die Expression antiinflammatorischer Mediatoren wie IL-10, dem IL-1R2, des IL-1-Rezeptorantagonisten und des Zytokins  $\text{TGF-}\beta$  erhöht, welche antiinflammatorische aber auch profibrotische Wirkungen entfalten [11, 36, 118, 152, 186]. Weiterhin bilden sie wichtige proangiogenetische Faktoren wie den *platelet derived growth factor-}\beta (PDGF), *insulin like growth factor* (IGF) und den VEGF [54]. Zudem exprimiert der M2-Phänotyp in hohem Maße das Enzym Arginase-1 (ARG-1), welches L-Arginin zu Harnstoff sowie L-Ornithin abbaut und so der NO-Produktion durch die NO-Synthase (NOS) den Ausgangsstoff entzieht und so ebenfalls antiinflammatorisch wirkt [166, 172]. Die M2-Aktivierung erfolgt über Zytokine IL-4 und IL-13, die von aktivierten  $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen gebildet werden [152]. Die Funktionen des M2 Phänotyps liegen also zusammenfassend im Bereich der Regulation, zum einen der Inflammation und Narbenbildung zum anderen des Gewebeumbaus und der Angiogenese (Abb. 5) [118, 152].*



**Abbildung 5:** Zusammenfassende, schematische Darstellung des M1- und M2-phänotypischen Zytokinprofils und die daraus resultierende Wirkung im Gewebe.

Modifiziert nach: Ju, C. and Mandrekar, P., *Schematic representation of macrophage plasticity and its involvement in tissue injury*, 03. August 2021, [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e9/Schematic\\_representation\\_of\\_macrophage\\_plasticity\\_and\\_its\\_involvement\\_in\\_tissue\\_injury.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e9/Schematic_representation_of_macrophage_plasticity_and_its_involvement_in_tissue_injury.png), Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International

Die molekularen Mechanismen, die zur Veränderung der Expressionsprofile und damit zur Differenzierung in unterschiedliche Subpopulationen im Infarktareal führen sind komplex und die jeweiligen Auslöser nicht vollständig aufgeklärt [152, 172]. Die Phagozytose apoptotischer Granulozyten, scheint ein antiinflammatorisches Programm in Makrophagen mit der Expression von IL-10 und TGF- $\beta$  zu induzieren und essentiell für die Dämpfung der inflammatorischen Reaktion nach Gewebeschädigung, wie zum Beispiel einem ischämischen Myokardschaden, zu sein [155, 178]. Weiterhin scheint die Expression des Zellkern Hormon Rezeptors Nr4a1 einen wesentlichen, inhibierenden Einfluss auf das Ausmaß der von Monozyten und Makrophagen gesteuerten, inflammatorischen Reaktion zu haben [64]. Die Einteilung in diese zwei Subtypen (M1 vs. M2) wird zwar als stark vereinfacht angesehen [44], eignet sich jedoch gut, um die phänotypischen Extreme zu beschreiben. Wahrscheinlicher erscheint die Vorstellung, dass sich viele verschiedene Subtypen (M1-ähnlich, M2-ähnlich) entwickeln, die zwischen den beiden oben beschriebenen Extremen liegen und eine hohe Plastizität besitzen [118]. Gegenstand weiterer Forschung ist daher, wie diese Phänotypen beschaffen sind, ob etwa reparative, regenerative [3, 88] oder kardioprotektive [28] Phänotypen, im Infarktgebiet

existieren oder sich dort, im experimentellen Setting, ausbilden lassen. Abschließend bleibt festzustellen, dass Monozyten und Makrophagen eine zentrale, regulatorische Rolle im komplexen, inflammatorischen Geschehen nach einem Myokardinfarkt spielen, die bisher nicht vollständig ausgeleuchtet werden konnte.

#### **1.4.4 Cardiac remodeling**

Es gilt die Auffassung, dass das Gleichgewicht zwischen Inflammation, Antiinflammation und profibrotischen Einflüssen zu einem großen Teil die Qualität der physiologischen Narbenbildung nach einem ischämischen, Myokardschaden bestimmt, sodass ein optimaler Ablauf zur Ausbildung einer auf das infarzierte Gebiet begrenzten, stabilen Narbe führt (*cardiac remodeling*) [23, 123]. Störungen des beschriebenen Prozesses, wie zu starke, zu schwache oder angrenzende, gesunde Gebiete des Myokards betreffende, myokardiale Umbauvorgänge sind pathologisch (*adverse cardiac remodeling*) und stören die Integrität und Funktion des Myokards [23]. Aus überschießenden, räumlich unkontrollierten Umbauvorgängen resultieren langfristige Folgeerscheinungen eines Myokardinfarktes wie Ventrikeldilatation, -hypertrophie, -fibrose und letztlich eine Einschränkung der Ventrikelfunktion sowie eine Herzinsuffizienz. Aus einer unzureichenden Narbenbildung andererseits resultieren Ventrikelrupturen und die Ausbildung von Ventrikelaneurysmen [23, 44].

## 2 Ziel der Arbeit

Das cMyBP-C ist zentraler Regulator der Sarkomerfunktion, wobei die Regulation über Protein-Protein-Interaktionen erfolgt. In unterschiedlichen Tiermodellen und in der Folge beim Menschen, konnte gezeigt werden, dass sich die Phosphorylierung des cMyBP-C bei unterschiedlichen myokardialen Erkrankungen verändert und damit die Funktion sowie Stabilität des Proteins beeinflusst wird. In Zusammenhang mit einer myokardialen Ischämie und dem anschließenden nekrotischen Zelluntergang, kommt es, in Folge der Dephosphorylierung und  $\mu$ -Calpain abhängigen Fragmentierung, zur Freisetzung der cMyBP-C-Fragmente in den extrazellulären Raum sowie in die Blutzirkulation. Die freigesetzten Fragmente haben negative Einflüsse auf die myokardiale Funktion, ebenso werden zytotoxische Effekte beschrieben. Weiterhin konnte ein immunogenes Potential einzelner Fragmente von cMyBP-C, im Sinne der Induktion einer experimentellen Autoimmunmyokarditis sowie Auto-Antikörperbildung bei DCM, gezeigt werden. Die rasche Freisetzung nach ischämischer, myokardialer Zellschädigung sowie das immunogene Potential veranlassten uns dazu die Rolle der cMyBP-C-Fragmente während des immunologischen Geschehens, welches dem Myokardinfarkt unmittelbar folgt, zu untersuchen. Hierbei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Beeinflusst die Exposition mit N-terminalen Fragmenten des cMyBP-C die Transkription und Expression inflammatorischer und antiinflammatorischer Gene bei Makrophagen, im *in vitro*-Mausmodell?
- 2) Lässt das erhobene Expressionsprofil eine Einordnung in das polare Aktivierungsmodell von Makrophagen (M1- und M2-Aktivierung) zu und welche Aktivierung liegt vor?
- 3) Können die Erkenntnisse aus dem Mausmodell, unter Verwendung von Monozyten, in einem humanen *in vitro*-Modell nachvollzogen werden?

## 3 Methoden

### 3.1 Arbeitsvorschriften

Zu Beginn der Arbeit wird der Abzug der Sicherheitswerkbank eingeschaltet und das Arbeitsfenster bis zur vorgegebenen Maximalstellung geöffnet. Es werden Nitrilhandschuhe angelegt und diese sowie die Arbeitsfläche, Pipetten und Ständer entsprechend gereinigt. Dann wird überprüft ob alle Verbrauchsmaterialien in ausreichender Menge vorhanden sind. Die Sicherheitswerkbank bleibt bei eingeschaltetem Abzug für 30 min unbenutzt, um ein möglichst steriles Arbeitsumfeld zu erzeugen. Im Allgemeinen wird im sterilen Raum der Sicherheitswerkbank möglichst vorsichtig und langsam gearbeitet. Während der Vorbereitungszeit werden die zu bearbeitenden Proben und alle benötigten Geräte, Gefäße und Lösungen bereitgestellt und je nach Herstellerangaben gelagert.

### 3.2 Generierung der cMyBP-C-Fragmente

Die rekombinanten N-terminalen cMyBP-C Proteinfragmente (C0, C0-L, C0C1, C0C1f, C0C2) werden mittels pET-Expressionssystem (Novagen, San Diego, Kalifornien, USA) wie bereits zuvor beschrieben [59] hergestellt und wurden uns von Herrn Prof. Sadayappans Labor (Department of Internal Medicine, Heart, Lung and Vascular Institute, Cardiovascular Center, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, USA) zur Verfügung gestellt. Die für die C0, C0-L, C0C1, C0C1f und C0C2 Proteinfragmente kodierende *complementary* DNA (cDNA) wird jeweils einzeln in einen pET-28a(+) Expressionsvektor kloniert. Der N-Terminus jedes Fragments ist dabei mit einem 6x-Histidin-Tag (His-Tag) markiert. Mittels DNA-Sequenzierung wird die erfolgreiche Klonierung nachgewiesen (ACGT, Inc. Wheeling, Illinois, USA). Die Plasmide werden dann in den *Escherichia coli* (E. coli) Expressionsstamm BL21 (DE3) (Katalog-Nr.: C6010-03, Invitrogen, Schwerte, Deutschland) transformiert, welcher das Gen für die T7-RNA-Polymerase, unter einem Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG; Katalog-Nr.: 10724815001, Roche, Indianapolis, USA) induzierbaren Promoter, enthält. Durch SDS-PAGE und Western Blotting wird dann die Expression der rekombinanten Proteinfragmente bestätigt. Zur Herstellung großer Mengen der einzelnen Proteinfragmente werden 500 ml LB-Medium mit 1 % E. coli BL21-Zellen des jeweiligen Klons beimpft und für 12 h bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,6 inkubiert. Es erfolgt dann

die Zugabe von 1 mM IPTG mit anschließender Inkubation für 5 h. Anschließend werden die Zellen für 30 min bei 4000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die Aufreinigung der exprimierten Proteinfragmente erfolgt mittels Affinitätschromatography auf einer Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose-Matrix (Katalog-Nr.: 1018244, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die His-Tags der Proteinfragmente werden hierbei durch die immobilisierten Nickelionen gebunden. Anschließend werden die Proteinfragmente gegen 5 l 1x *Phosphate buffered saline* (PBS) (Katalog-Nr.: IB70166, MidSci, Valley Park, Missouri, USA) dialysiert, wobei eine Dialysemembran mit 15 kDa Grenzwert (Katalog-Nr.: 132124, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, Kalifornien, USA) genutzt wird. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt nach Bradford (Katalog-Nr.: 500-0205, biorad, Hercules, Kalifornien, USA). Die Qualität der generierten, rekombinanten Proteinfragmente wird mittels Western Blotting, unter Verwendung von bereits etablierten Antikörpern gegen die cMyBP-C Domänen 2-14 [25, 183] sowie gegen das N-terminale 6x-His-Tag (Katalog-Nr.: 11922416001, Sigma Aldrich) überprüft.

### **3.3 Gewinnung von *murinen bone marrow-derived macrophages* (BMDM)**

#### **3.3.1 Gewinnung von Knochenmarkzellen der Maus**

Die Tiertötungen und Organentnahmen wurden ausschließlich von Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für Herz- und Lungenforschung (Bad Nauheim) durchgeführt, die im Umgang mit Versuchstieren ausführlich geschult und erfahren sind. Alle Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch die dafür zuständige Behörde (Regierungspräsidium Darmstadt, Hessen, AZ B2/312). Die Unterbringung der Tiere erfolgte in der Versuchstieranlage des Max-Planck-Institutes für Herz- und Lungenforschung (Bad Nauheim) in dafür vorgesehen Käfigen mit einem konstanten 12 h Tag-Nacht-Rhythmus und uneingeschränkter Ernährung. Bei der Tierhaltung wurde auf größtmögliche Keimfreiheit geachtet. Es wurden C57BL/6 Wildtyp Mäuse beider Geschlechter verwendet, die zum Zeitpunkt der Tötung etwa zehn Wochen alt und 20-25 g schwer waren. Nach Erreichen einer ausreichend tiefen Narkotisierung durch ein Isofluran-Luft-Gemisch (5 % Forene) in einer Narkosekammer, wird der Tod der Versuchstiere durch Luxation der Halswirbelsäule herbeigeführt. Durch Überprüfung der Atembewegung, des Herzschlages und der Muskelspannung wird der Todeseintritt sicher festgestellt und erst danach mit den weiteren

Arbeitsschritten fortgefahren. Zunächst werden die Versuchstiere zur Desinfektion mit 80 % Ethanol besprüht. Dann erfolgt, durch scharfe Präparation mit Hilfe einer Schere, die Entfernung der Haut des Hinterlaufs von proximal nach distal. Der Fuß wird gemeinsam mit der präparierten Haut entfernt und verworfen. Anschließend wird der Hinterlauf abgetrennt, indem der Hüftknochen proximal des Hüftgelenks durchtrennt wird. Danach wird der Oberschenkelknochen, durch Präparation mit Schere und Pinzette, von Unterhautfettgewebe und Muskeln befreit. Danach erfolgt, mit Hilfe einer Schere, die Abtrennung der übrigen Knochen im Hüft- und Kniegelenk, sodass der Oberschenkelknochen allein verbleibt. Nun wird der Markraum durch Entfernung der proximalen und distalen Epiphysen eröffnet. Man setzt eine 26 G Kanüle auf eine sterile 5 ml Spritze und zieht damit 5 ml eisgekühltes 1x PBS auf. Der Markraum wird nun mit 2-5 ml 1x PBS durchspült und die zellhaltige Flüssigkeit in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Um Zellaggregate aus der Zellsuspension zu entfernen wird diese erneut mit einer 5 ml Spritze aufgenommen, auf einen Zellfilter (70 µm Porengröße) gegeben und im gleichen Röhrchen aufgefangen. Anschließend erfolgt zur Reduzierung der Verunreinigung mit Erythrozyten ein Zellyse mit 1x Lyse-Puffer. Dazu wird 1 ml des Lyse-Puffers zur Zellsuspension pipettiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beendigung des Lysevorgangs erfolgt durch Hinzufügen von 2 ml 1x PBS. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 10 min bei 400 x g und Raumtemperatur.

### 3.3.2 Differenzierung von Stammzellen zu Makrophagen

Die Differenzierung von Makrophagen aus Stammzellen des Knochenmarks der Maus (*bone marrow-derived macrophages*) basiert auf der Methode von Warren und Vogel aus dem Jahre 1985. Hierbei wird durch Zugabe von M-CSF zu Stammzellen aus dem Knochenmark, die Differenzierung zu Makrophagen erreicht [179].

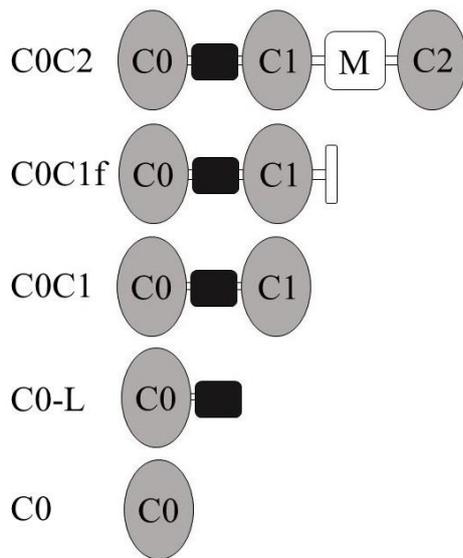
Der Überstand der zentrifugierten Zellsuspension wird mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wird in 1 ml des vorbereiteten Zellkulturmedium-1 (Kap. 10.7) aufgenommen. Dann erfolgt die Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer. Hierfür werden 10 µl der erhaltenen Zellsuspension zwischen das Deckglas und die Kammer gegeben. Es werden alle vier Quadranten der Kammer, à 16 Kleinquadrate, ausgezählt. Die Berechnung der Gesamtzellzahl der ursprünglichen Isolationssuspension erfolgt

nach der Formel  $\frac{\sum \text{Zellzahl aller vier Quadranten}}{4} * 10^4 *$

*Volumen Isolationssuspension [ml] = Gesamtzellzahl.* Anschließend wird so viel Zellkulturmedium hinzugefügt, dass eine Zellkonzentration von  $4 \times 10^5/\text{ml}$  erreicht wird. Danach werden 10 ml Zellsuspension auf 10 cm Zellkulturschalen verteilt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  M-CSF zur Einleitung der Zelldifferenzierung. Nun werden die Zellkulturschalen in den Inkubator gebracht und dort bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % Kohlenstoffdioxid-Gehalt ( $\text{CO}_2$ ) inkubiert. Nach 3 Tagen Inkubation erfolgt pro Zellkulturschale die Zugabe von 5 ml frischen Zellkulturmediums und 5  $\mu\text{l}$  M-CSF. Die Zellen werden weiter inkubiert, bis sie zu ca. 80 % konfluent sind (ca. nach 7 Tagen). Sie werden dann auf 6-Well Platten passagiert. Zur Passagierung wird vorsichtig das Zellkulturmedium abgesaugt und verworfen. Zum Entfernen nicht adhärenter Zellen erfolgt die Zugabe von 5 ml 1x PBS. Nach mehrfachem durchspülen der Zellkulturschalen wird die Flüssigkeit abgesaugt und verworfen. Die Ablösung der adhärenter Zellen (BMDM) erfolgt durch Zugabe von 5 ml Lösungs-Puffer (Kap. 10.7) je Zellkulturschale und eine Inkubation für 10 min im Inkubator. Anschließend werden den Zellkulturschalen jeweils 5 ml Zellkulturmedium-2 (Kap. 10.7) hinzugefügt und die Flüssigkeit mehrfach auf und ab pipettiert, um die Zellkulturschalen gründlich zu spülen und die Zellen zu resuspendieren. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 400 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wird in 1 ml Zellkulturmedium-2 resuspendiert und anschließend in die benötigte Gesamtmenge Zellkulturmedium aufgenommen. Hiervon werden je 12 ml auf eine 6-Well Platte ausgebracht.

### **3.4 *In vitro* Stimulation von murinen BMDM**

Die wie in Kapitel 3.3.2 aufbereitete Zellsuspension wird nun auf die 6-Well Platten verteilt, wobei jedes Well mit 2 ml befüllt wird. Die 6-Well Platten werden vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen. Anschließend werden die Zellen mit cMyBP-C-Fragmenten (C0, C0-L, C0C1, C0C1f, C0C2; Abb. 6) oder murinem cTnI in einer Konzentration von 500 ng/ml behandelt.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der rekombinanten cMyBP-C-Fragmente.

C0C1f besteht neben der C0, Linker und C1-Domäne aus den ersten 17 Aminosäuren des M-Motivs. Modifiziert nach: 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*, 2016. 99: p. 47-56

Als negative Kontrollsubstanz wird ein äquivalentes Volumen 1x PBS verwendet. Als positive Kontrollsubstanz dient LPS von *E. coli* in einer Konzentration von 100 ng/ml. Auf einer 6-Well Platte findet jeweils nur eine Substanz Verwendung. Die Rückgewinnung der Zellen findet nach Inkubation für einen Zeitraum von 3 h, 6 h, 9 h, 24 h oder 72 h im Brutschrank bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt statt. Nach der Inkubationszeit werden die Überstände mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Weiter werden die Wells mit 1x PBS gründlich gespült. Diese Schritte dienen der Entfernung von nicht oder schwach adhärenen Zellen. Abhängig von den geplanten Analyseverfahren ist eine spezifische Aufbereitung der Zellen zur Isolation von RNA oder Proteinen notwendig. Für die Rückgewinnung der Zellen zur RNA-Isolation wird zunächst der Gesamtansatz des RNA-Lysepuffers aus RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1 hergestellt. Von diesem Puffer wird jedem Well 350 µl hinzugefügt und durch vorsichtiges Schwenken der 6-Well Platte gleichmäßig verteilt. Nun wird die Flüssigkeit jedes Wells sorgfältig aufgenommen und separat auf je eine QIAshredder Säulen gegeben. Die Säulen befinden sich in 2 ml Eppendorf *Tubes* und werden nun, zur Homogenisierung und Lyse der Zellen, in einer Tischzentrifuge für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Säule wird entfernt und verwor-

fen. Das Zelllysat befindet sich nun im Eppendorf *Tube* und wird zügig bei - 80 °C eingefroren. Für die Rückgewinnung der Zellen zur Proteinisolation werden jedem Well 200 µl des RIPA-Puffers (Kap. 10.7) hinzugefügt und durch vorsichtiges Schwenken der 6-Well Platte gleichmäßig verteilt. Die Flüssigkeit wird zum Spülen auf und ab pipettiert, dann sorgfältig abgenommen und auf 0,5 ml Eppendorf *Tubes* verteilt und zügig bei - 80 °C eingefroren.

### **3.5 Gewinnung von humanen Monozyten aus *buffy coats***

#### **3.5.1 Vollblutspende und Anfall von *buffy coats* bei der Aufbereitung**

Die *buffy coats* wurden unserer Arbeitsgruppe nach der Durchführung und Aufarbeitung einer Vollblutspende dankenswerterweise vom Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen (Leiter: Herr Prof. Dr. G. Bein) zur Verfügung gestellt. Ein entsprechendes Ethikvotum (Az. 05/00) zur Verwendung dieser Materialien liegt vor. Die Zulassung eines Menschen zur Vollblutspende und die Durchführung der Blutspende erfolgt nach den Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) der Bundesärztekammer in der zum Spendezeitpunkt gültigen Fassung (Zweite Richtlinienanpassung 2010) und sind dieser zu entnehmen. Besonders ist hier hervorzuheben, dass bei der Beurteilung der Spendetauglichkeit darauf geachtet wird, dass der Spender sich subjektiv gesund fühlt, kein Fieber hat und des Weiteren keine schweren Grunderkrankungen und keine Infektionserkrankungen aufweist. Der Spender ist darüber aufgeklärt, dass Restmengen von Blut oder Blutbestandteilen, die nicht zur Anwendung am Menschen geeignet sind, in anonymisierter Form für nicht kommerzielle, wissenschaftliche Zwecke verwendet werden können und hat hierzu schriftlich seine Einwilligung erteilt.

Bei der Vollblutspende werden einem Spender 450-500 ml Blut in einem Blutbeutel mit integriertem Schlauchsystem entnommen. In dem verwendeten Beutel befindet sich ein Antikoagulans. Der Blutbeutel wird anschließend zentrifugiert. Dabei entstehen, entsprechend des Gewichts der Blutbestandteile, drei Schichten. Die oberste Schicht bildet das Blutplasma, darunter bildet sich der weißliche *buffy coat*, der Leukozyten und Thrombozyten enthält. Die unterste Schicht bilden die Erythrozyten. Mittels Separatoren können

über das Schlauchsystem transfusionsmedizinisch relevante Bestandteile (Erythrozyten, Plasma) abgetrennt werden. Der *buffy coat* fällt als Nebenprodukt an.

### **3.5.2 Isolation von *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) aus *buffy coats* mittels Dichtegradientenzentrifugation**

Im Folgenden werden die Arbeitsschritte zur Bearbeitung eines Blutbeutels beschrieben. Diese werden für jeden der drei verwendeten Blutbeutel in gleicher Weise simultan, aber zunächst in separaten Zentrifugenröhrchen durchgeführt.

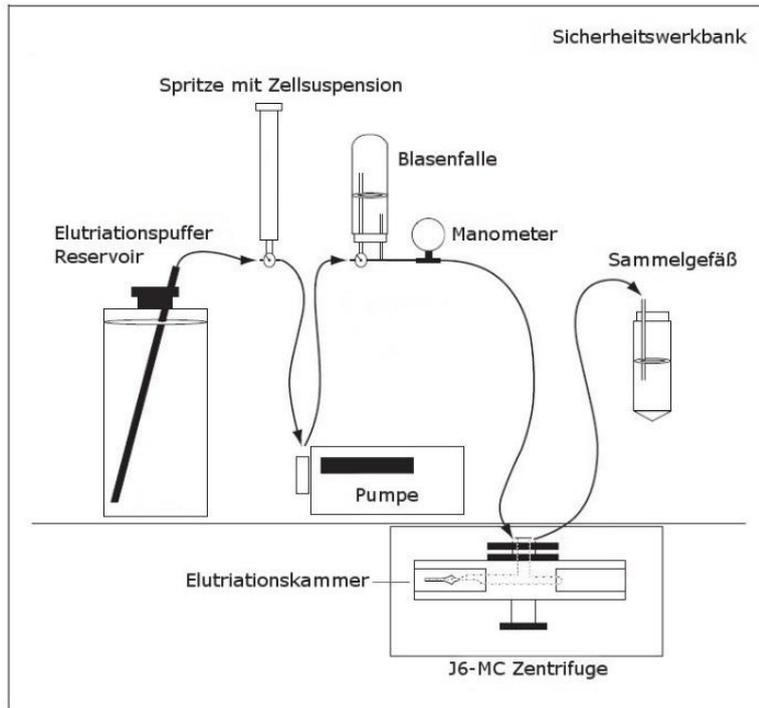
Zunächst wird der Blutbeutel mit einem in 80 % Methanol getränkten Papiertuch abgewischt und unter die Sicherheitswerkbank gelegt. Anschließend wird der Verbindungsschlauch des Blutbeutels durchtrennt und der Inhalt (*buffy coat*) in vier 50 ml Zentrifugenröhrchen zu je 12,5 ml gefüllt. Zur besseren Verarbeitungsfähigkeit fügt man den *buffy coats* in jedem Zentrifugenröhrchen 1x PBS im Verhältnis 1:1 hinzu. Nun erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation die Auftrennung, der in Suspension befindlichen Zellen, in Granulozyten und Erythrozyten, die sich am Boden des Röhrchens absetzen und in lympho-monozytäre Zellen (PBMCs), die sich an der Grenzschicht zwischen Trennmedium und wässriger Phase anreichern (Interphase) [50]. Hierzu wird in vier frischen 50 ml Zentrifugenröhrchen 25 ml Histopaque 1077 vorsichtig mit 25 ml der vorbereiteten Zellsuspensionen überschichtet und für 20 min bei 700 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, wobei die Zentrifuge frei ausläuft, ohne aktiv abgebremst zu werden. Die Interphase ist als weißlich-gelbliches Band in der Mitte der Zentrifugenröhrchen sichtbar und kann vorsichtig mit einer 10 ml Serumpipette und einer elektrischen Pipettierhilfe abgenommen und in zwei frische 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben werden. Zur Entfernung von Zelltrümmern und Blutserum Resten erfolgt nun ein Waschvorgang, bei dem der Inhalt beider Zentrifugenröhrchen mit Waschpuffer-1 (Kap. 10.7) auf 50 ml aufgefüllt und für 10 min bei 350 x g und Raumtemperatur zentrifugiert wird. Der Überstand wird mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Die am Röhrchenboden befindlichen Zellen werden in 5 ml Waschpuffer-1 resuspendiert und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen zusammengeführt. Der Waschvorgang wird noch zweimal wiederholt. Nach dem dritten Waschvorgang erfolgt die Resuspension der am Röhrchenboden befindlichen Zellen in 5 ml Elutriationspuffer (Kap. 10.7). Wie eingangs erwähnt, sind die Arbeitsschritte für jeden der drei verwendeten Blutbeutel gleich, sodass man am Ende der Zellisolationvorgänge drei 50 ml Zentrifugenröhrchen mit je 5 ml Zellsuspension erhält.

Nun werden 500 µl jeder Zellsuspension in ein 5 ml *round bottom tube* überführt. Zur Erfolgs- und Reinheitskontrolle der durchgeführten Zellisolation wird eine durchflusszytometrische Analyse an einem FACScan (BD Biosciences, San Jose, California, USA) vorgenommen. Es werden die Parameter des *side scatter* (SSC) und *forward scatter* (FSC) herangezogen, die eine Aussage über Granularität (SSC) und Größe (FSC) der Zellen zulassen. Ausführliche Erläuterungen hierzu finden sich in Kapitel 3.9. So lassen sich einfach der Monozyten-Gehalt sowie der Anteil einer Verunreinigung mit Granulozyten bestimmen. Das Analyseergebnis wird als qualitativ ausreichend betrachtet, wenn die Verunreinigung durch Granulozyten unter 3 % der Gesamtereignisse liegt. Aus den drei durchgeführten Zellisolationen werden nun die beiden herausgesucht, die die geringste Verunreinigung aufweisen. Die Übrige wird verworfen. Um Zellaggregate aus der Isolationssuspension zu entfernen, wird abschließend ein frisches 50 ml Zentrifugenröhrchen mit einem Zellfilter (70 µm Porengröße) versehen. Die beiden ausgewählten Zellsuspensionen werden auf den Zellfilter gegeben und so in einem Zentrifugenröhrchen zusammengeführt. Zuletzt wird diese Zellsuspension in eine 10 ml Spritze aufgenommen und steril mit einem Combi-Stopper verschlossen.

### **3.5.3 Monozytenisolation mittels zentrifugaler Gegenstromelutriation (CCE)**

Die zentrifugale Gegenstromelutriation (CCE - *counterflow centrifugal elutriation*), nach Sanderson et al. aus dem Jahr 1976 [147], ist eine Methode zur Auftrennung unterschiedlicher, in Lösung befindlicher Zellpopulationen, nach deren Masse und Größe. Sie wird von uns mit der Dichtegradientenzentrifugation kombiniert sodass eine PBMC-Suspension verwendet wird, mit dem Ziel reine Monozytenisolate zu erhalten [176, 177]. Hierbei befindet sich eine Elutriationskammer, als Teil eines Schlauchsystems, in einer, sich mit gleichbleibender Geschwindigkeit drehenden, Zentrifuge (Abb. 7). Mit einer Pumpe wird nun ein Flüssigkeitsstrom innerhalb der Kammer erzeugt. Dieser ist der, durch die Zentrifuge erzeugten Zentrifugalkraft, entgegen gerichtet (Gegenstrom). Das Zellgemisch wird dann in das Elutriationssystem eingebracht (Abb. 8). Nun kann die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsstroms so gewählt werden, dass die Zellen sich in der Elutriationskammer sammeln, diese jedoch nicht verlassen (Gleichgewichtszentrifugation).

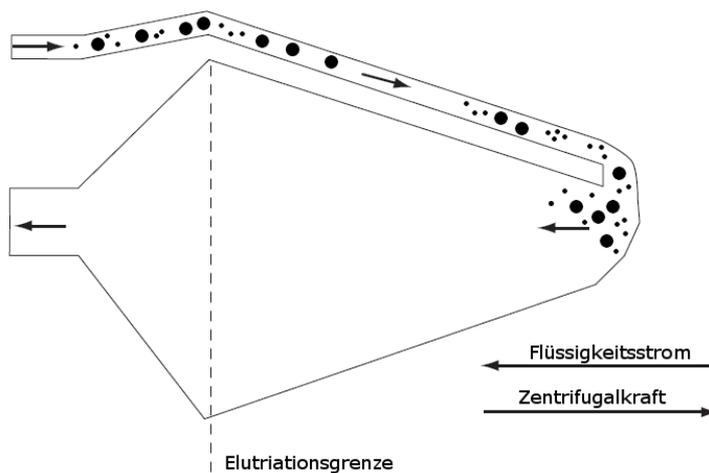
Innerhalb dieses Gleichgewichtszustands ordnen sich die Zellen, zonal geordnet nach Masse und Größe, in der Kammer an (Abb. 9 A).



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des zentrifugalen Gegenstromelutriationsystems.

Modifiziert nach: Wahl, A.F. and Donaldson, K.L., *Centrifugal elutriation to obtain synchronous populations of cells*. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.], 2001.

**Chapter 8:** p. Unit 8 5.

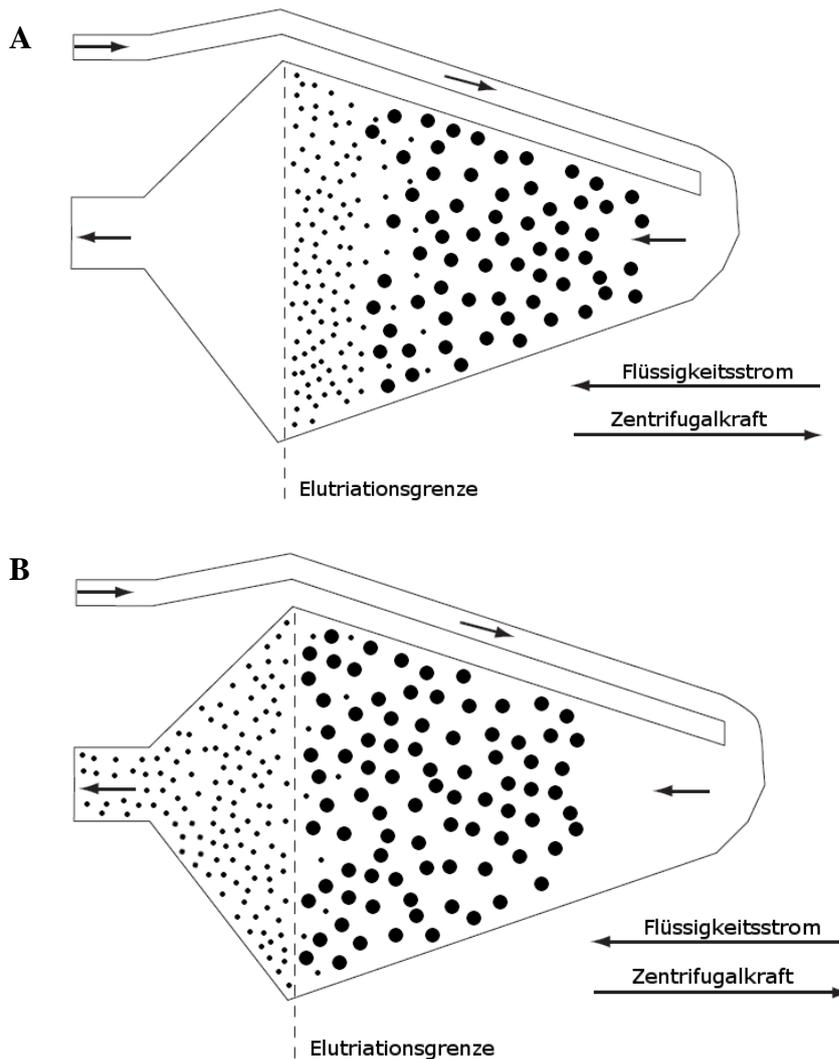


**Abbildung 8:** Einbringen der Zellsuspension in die Elutriationskammer,

Modifiziert nach: Wahl, A.F. and Donaldson, K.L., *Centrifugal elutriation to obtain synchronous populations of cells*. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.], 2001.

**Chapter 8:** p. Unit 8 5.

Kleinere, leichtere Zellen (Thrombozyten, Erythrozyten, Lymphozyten) wandern mit dem Flüssigkeitsstrom weiter in Richtung des Auslasses der Kammer. Größere, schwerere Zellen (Monozyten, Granulozyten) legen eine geringere Strecke innerhalb der Kammer zurück und finden sich näher am Einlass (Abb. 9 A). Wird nun die Geschwindigkeit des Flüssigkeitsstromes stufenweise erhöht und dann kurzzeitig konstant gehalten, elutriieren die Zellen, fraktioniert nach Größe und Masse, aus der Kammer und können in separaten Röhren aufgefangen werden (Abb. 9 B).



**Abbildung 9 A und B:** A: Zonale Anordnung der Zellen nach Masse und Größe während der Gleichgewichtszentrifugation, B: Bei Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit elutriieren kleinere und leichtere Zellen zuerst aus der Kammer.

Modifiziert nach: Wahl, A.F. and Donaldson, K.L., *Centrifugal elutriation to obtain synchronous populations of cells*. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.], 2001.

**Chapter 8:** p. Unit 8 5.

Bei Nichtgebrauch ist das Elutriationssystem mit Reinigungslösung gefüllt. Diese wird durch Spülen mit sterilem, apyrogenem Wasser, mit einer Flussgeschwindigkeit von 4 ml/min für 10 min, rückstandslos entfernt. Um eine Verdünnung des anschließend eingebrachten Elutriationspuffers zu vermeiden, wird nun alle Flüssigkeit aus dem Elutriationssystem entfernt. Dann wird es luftblasenfrei mit Elutriationspuffer aufgefüllt, wobei die Zentrifuge, bestückt mit einer Standard Elutriationskammer, auf 2400 x g bei Raumtemperatur eingestellt wird. Die Flussgeschwindigkeit wird auf 1,3 ml/min reduziert. Nun kann das, wie zuvor beschrieben gewonnene, PBMC-Isolat in das Elutriationssystem eingespritzt werden. Die Flussgeschwindigkeit wird anschließend stufenweise erhöht. Hieraus ergeben sich in Tabelle 1 genannte Fraktionen.

**Tabelle 1:** Elutriationsfraktionen mit Flussgeschwindigkeiten, aufgefangenen Volumina und Zellsorten

Fraktion	Flussgeschwindigkeit	Volumina	Zellesorten
1	13 ml/min	100 ml	-
2	15 ml/min	200 ml	Thrombozyten, Erythrozyten
3	16 ml/min	100 ml	Lymphozyten
4	17 ml/min	50 ml	Lymphozyten, Monozyten
5	19 ml/min	50 ml	Monozyten
6	21 ml/min	50 ml	Monozyten
7	23 ml/min	50 ml	Monozyten
8	25 ml/min	50 ml	Monozyten, Granulozyten

Diese Fraktionen werden in dreizehn 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Den Fraktionen 4-8 werden mit einer 5 ml Pasteurpipette je ein Tropfen 20 % humanes Serum Albumin hinzugefügt. Nun werden 1000 µl der Fraktionen 4-8 in je ein 5 ml *round bottom tube* überführt. Zur Erfolgs- und Reinheitskontrolle der durchgeführten Elutriation wird eine neuerliche durchflusszytometrische Analyse im FACScan durchgeführt. Es werden erneut die Basisparameter (SSC, FSC) herangezogen, um den Monozytengehalt sowie den Anteil der Verunreinigung mit Granulozyten zu bestimmen. Das Analyseergebnis wird als qualitativ ausreichend betrachtet, wenn die Verunreinigung durch Granulozyten unter 3 % der Gesamt Ereignisse liegt. Es werden nun die Fraktionen gewählt, die die geringsten Verunreinigungen aufweisen, die Übrigen werden verworfen. Es er-

folgt eine Zentrifugation der ausgewählten Fraktionen für 10 min bei 350 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wird mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Die am Röhrchenboden befindlichen Zellen werden in je 1 ml Zellkulturmedium-3 (Kap 10.7) resuspendiert und anschließend in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen zusammengeführt. Anschließend werden der Isolationssuspension 10 µl entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf *Tube* gegeben. Es werden 190 µl 1x PBS hinzugefügt und das Eppendorf *Tube* kurz im Schüttelmixer durchmischt. Dann erfolgt die Zellzählung wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Zum Aussäen wird, durch Hinzufügen einer errechneten Menge von Zellkulturmedium-3, dann eine Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$ /ml erzeugt.

### **3.6 *In vitro* Stimulation von humanen Monozyten**

Die wie in Kapitel 3.5 aufbereitete Zellsuspension wird noch am Tag der Isolation in Zellkultur genommen. Zur RNA-Isolation erfolgt dies auf 6-Well Platten, mit je 2 ml pro Well, zur Proteinisolation auf 15 cm Zellkulturschalen, mit je 5 ml pro Schale. Anschließend werden die Zellen bis zum nächsten Morgen bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wird lichtmikroskopisch die Qualität der Zellen beurteilt und überprüft, dass der überwiegende Teil der Zellen am Schalenboden adhärent geworden ist. Das Medium wird nun vorsichtig mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt, verworfen und durch die gleiche Menge frischen Zellkulturmediums-3 ersetzt. Hierdurch werden nicht adhärente Zellen (Lymphozyten) aus der Kultur entfernt. Nun werden die Zellen mit cMyBP-C-Fragmenten (C0-L, C0C1f) in einer Konzentration von 50 ng/ml oder 500 ng/ml behandelt. Weiterhin wurde C0C1f auch in einer Konzentration von 1000 ng/ml eingesetzt. Eine weitere Verwertung war für die so behandelten Zellen jedoch nicht möglich, da sie bereits nach 3 - 6 h avital waren. Als negative Kontrollsubstanz wird ein äquivalentes Volumen 1x PBS verwendet. Als positive Kontrollsubstanz dient LPS von *E. coli* in einer Konzentration von 100 ng/ml. Auf einer 6-Well Platte findet jeweils nur eine Substanz Verwendung. Jede Substanz wird hierbei, in zwei bis drei Wells verwendet, abhängig von der anfänglich zur Verfügung stehenden Gesamtzellzahl einer Isolation. Die Rückgewinnung der Zellen findet nach Inkubation für einen Zeitraum von 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 120 min, 3 h, 6 h, 9 h oder 24 h im Brutschrank bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt statt. Hierfür werden die Überstände der Wells mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen.

Dann werden die Wells mit 2 ml 1x PBS gründlich gespült und die Spüllösung anschließend sorgfältig abgesaugt und verworfen. Dieser Schritt dient wiederum der Entfernung von nicht oder schwach adhärenen Zellen (Lymphozyten). Zuletzt werden die 6-Well Platten und Zellkulturschalen auf ein Papiertuch ausgeklopft, um letzte Flüssigkeitsrückstände zu entfernen und anschließend bei -80 °C eingefroren.

## **3.7 Transkriptionsanalyse**

### **3.7.1 Isolation von RNA**

#### *Isolation aus murinen Zellen*

Vor Beginn der RNA-Isolation werden die bei -80 °C gelagerten Proben für ungefähr 5 min auf Eis zum Tauen gebracht. Anschließend wird jeder Probe 350 µl 70 % Ethanol hinzugefügt und das Lysat durch gründliches auf und ab pipettieren durchmischt. Nun wird der gesamte Inhalt der Eppendorf *Tubes* auf jeweils eine RNeasy Mini Säule gegeben, die sich in einem neuen 1,5 ml Eppendorf *Tube* befindet. Die Säule wird nun für 15 s bei 8000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die in den Eppendorf *Tubes* aufgefangene Flüssigkeit wird verworfen. Die RNA befindet sich nun in den jeweiligen Säulen und ist an eine Silicagel-Membran gebunden. Es folgen nun mehrere Wasch- und Verdauschritte zur Entfernung von Verunreinigungen (Elektrolyte, Proteine, DNA). Die in den Eppendorf *Tubes* aufgefangene Flüssigkeit wird jeweils verworfen. Zunächst werden jeweils 350 µl RW1-Puffer auf die Säulen pipettiert und diese anschließend für 15 s bei 8000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nun erfolgt die Zugabe der Desoxyribonuklease (DNase). Der Ansatz der Verdauung für jede einzelne Probe setzt sich aus 10 µl DNase-1 Stocklösung und 70 µl RDD-Puffer zusammen und wird für alle zu bearbeitenden Proben gemeinsam, frisch angesetzt und auf Eis gelagert. Es werden nun jeweils 80 µl der Verdauung auf eine RNeasy Mini Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird, wie oben beschrieben, der Waschschrift mit RW1-Puffer wiederholt. Dann werden jeweils 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen pipettiert und diese anschließend für 15 s bei 8000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Waschschrift mit RPE-Puffer wird direkt mit einer Zentrifugation für 2 min wiederholt. Anschließend erfolgt eine erneute Zentrifugation für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C, um die Silicagel-Membran zu trocknen und die Eluation der RNA zu erleichtern. Hierzu wird jede Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf *Tube* gesteckt und jeweils 30 µl Ribonuklease (RNase)-freies Wasser

hinzu pipettiert und die Säule für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C zentrifugiert. Das im Eppendorf *Tube* aufgefangene Eluat wird nochmals auf die Säule pipettiert und gleichermaßen ein zweites Mal zentrifugiert.

### ***Isolation aus humanen Zellen***

Vor Beginn der RNA-Isolation werden die bei -80 °C gelagerten 6-Well Platten für ungefähr 5 min auf Eis zum Tauen gebracht. Anschließend wird jedem Well 700 µl QIAzol hinzugefügt und die Zellen durch gründliches auf und ab pipettieren resuspendiert. Die Zellsuspension wird je Well auf eine separate QIAshredder Säulen gegeben. Die Säulen befinden sich in 2 ml Eppendorf *Tubes* und werden zur Homogenisierung und Lyse der Zellen in einer Tischzentrifuge für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Säulen werden entfernt und verworfen. Die Lysate werden in 1,5 ml Eppendorf *Tubes* überführt und jeweils mit 140 µl Chloroform versetzt. Die Eppendorf *Tubes* werden sorgfältig verschlossen und der Inhalt mit Hilfe eines Vortexmischers für mindestens 30 s kräftig durchmischt. Alle Proben werden dann zur Dissoziation für 5 min ruhen gelassen. Während dieser Zeit sollte keine Phasentrennung stattfinden, was weiteres, kurzes Durchmischen erforderlich machen kann. Dann erfolgt eine Zentrifugation für 15 min bei 300 x g und 4 °C. Anschließend sind in den Eppendorf *Tubes* drei Phasen zu erkennen: Zuerst die aquatische Phase, in der die RNA eluiert ist. In der Mitte eine kompakte Phase aus Proteinen und DNA und zuunterst die Lösungsmittelphase. Ungefähr 400 µl der RNA-reichen, aquatischen Phase werden vorsichtig abgenommen und jeweils in vorbereitete, 1,5 ml Eppendorf *Tubes* überführt. Anschließend wird dem Eluat jeweils 600 µl 100 % Ethanol hinzugefügt und die Flüssigkeit durch auf und ab pipettieren durchmischt. Nun werden je 500 µl der Eluat-Ethanol Ansätze auf jeweils eine RNeasy Mini Säule gegeben, die sich in einem 1,5 ml Eppendorf *Tube* befindet. Die Säule wird nun für 15 s bei 8000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die im Eppendorf *Tube* aufgefangene Flüssigkeit wird verworfen. Dieser Schritt wird mit den übrigen 500 µl der Eluat-Ethanol Ansätze wiederholt. Die RNA befindet sich nun in den Säulen und ist an eine Silicagel-Membran gebunden. Es folgen nun mehrere Waschschriffe zur Entfernung von Verunreinigungen (Elektrolyte, Proteine, DNA). Die in den Eppendorf *Tubes* aufgefangene Flüssigkeit wird jeweils verworfen. Zunächst werden jeweils 700 µl RWT-Puffer auf die Säulen pipettiert und diese anschließend für 15 s bei 8000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nun werden 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen pipettiert und diese anschließend für 15 s bei 8000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Waschschriff mit RPE-Puffer

wird einmal wiederholt. Anschließend erfolgt eine erneute Zentrifugation für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C, um die Silicagel-Membran zu trocknen und Eluation der RNA zu erleichtern. Hierzu wird dann jede Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf *Tube* gesteckt und 25 µl RNase-freies Wasser hinzu pipettiert. Das im Eppendorf *Tube* aufgefangene Eluat wird nochmals auf die Säule pipettiert und gleichermaßen ein zweites Mal zentrifugiert.

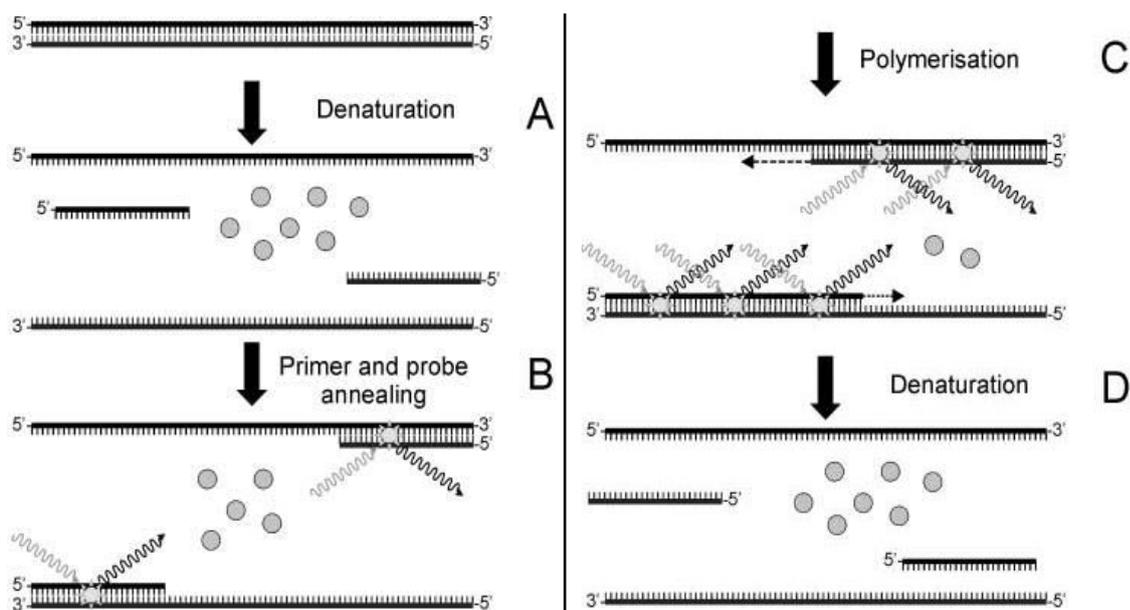
### ***Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration und Qualität***

Nach Abschluss der Isolationsvorgänge wurde die Konzentration (ng/µl) der isolierten RNA durch photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>) ermittelt. Eine weitere Messung wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm (OD<sub>280</sub>) durchgeführt, um die Verunreinigung der Probe mit Proteinen zu bestimmen. Die Reinheit wurde anhand des Quotienten der OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> abgeschätzt. Zur Erzeugung von *complementary* DNA (cDNA) wurde RNA verwendet, bei der der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> zwischen 1,9 und 2,1 lag. Anschließend werden die Eppendorf *Tubes* zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80 °C gelagert.

### **3.7.2 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und der *real-time quantitative* PCR**

Die *real-time quantitative* PCR ist eine verbreitete Methode zur Analyse von genomischer DNA oder aus RNA hergestellter cDNA. Sie beruht auf dem Konzept der von K. B. Mullis 1983 wieder entdeckten und 1987 veröffentlichten Polymerase-Kettenreaktion [119]. Bei dieser kann der zu untersuchende DNA-Zielabschnitt (*Template*), durch die Anlagerung von spezifischen Oligonukleotid Paaren (*Primern*) und unter Zugabe von Nukleotiden sowie einer hitzestabilen DNA-Polymerase, rasch vervielfältigt werden. In einem PCR-Thermocycler läuft ein voreingestelltes Temperaturprogramm ab. Bei hoher Temperatur (ca. 95 °C) wird der DNA-Doppelstrang getrennt (Denaturierung, Abb. 10 A). Die Temperatur wird abgesenkt (ca. 60 °C), sodass sich das *Primer* Paar an die 5'-Enden der Zielsequenz der DNA-Einzelstränge anlagern kann (*Annealing*, Abb. 10 B). Die DNA-Polymerase kann, ausgehend vom *Primer*, einen dem Einzelstrang komplementären DNA-Strang erzeugen (Polymerisation, Abb. 10 C). Der Reaktionszyklus von Denaturierung, Annealing und Polymerisation wird 20-40-mal wiederholt. Nach mehreren Reaktionszyklen vervielfältigt sich der durch die *Primer*

eingegrenzte DNA-Abschnitt annähernd exponentiell. Die *real-time quantitative PCR* (qPCR) kombiniert dieses Prinzip mit dem Einsatz eines in doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoffs (beispielsweise SYBR Green), der zur Fluoreszenz angeregt werden kann und dessen Fluoreszenzsignal an DNA gebunden zunimmt (Abb. 10 C und D). Das Fluoreszenzsignal steigt daher mit der Menge der amplifizierten, doppelsträngigen DNA proportional an. Eine andere Methode ist im TaqMan-Prinzip verwirklicht. Hierbei wird neben den *Primern* eine Oligonukleotidsonde verwendet, die direkt an die *Template*-DNA-Sequenz bindet. Die Sonde ist am 5' Ende mit einem Reporter-Farbstoff und am 3' Ende mit einem so genannten *quencher*-Farbstoff versehen, der das Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffs unterdrückt. Während die DNA-Polymerase vom *Primer* ausgehend das Amplifikat herstellt, kommt es zum Kontakt mit der Sonde, die hierbei durch eine 5'-3' Exonukleaseaktivität der Polymerase hydrolysiert wird.



**Abbildung 10 A bis D:** Ablauf einer mit SYBR Green durchgeführten qPCR.

A: Denaturierung, B: Annealing, C: Polymerisation und Anlagerung des Fluoreszenz Farbstoffes an amplifizierten, doppelsträngigen *Template* DNA-Abschnitt, D: Denaturierung und Rückgang des Fluoreszenzsignales in ungebundenem Zustand. Modifiziert nach: Bustin, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 2000. 25(2): p. 169-93.

Dabei wird der Reporter-Farbstoff frei sowie zur Fluoreszenz angeregt und dieses Signal kann detektiert werden. Da nur eine gebundene Sonde hydrolysiert und hierdurch der Reporter Farbstoff freigesetzt werden kann, steigt das Fluoreszenzsignal nur mit zunehmender Menge der vervielfältigten *Template*-DNA an. Bei beiden Methoden misst das *real-time* PCR-Thermocycler das Fluoreszenzsignal nach jedem Reaktionszyklus. Während der Analyse wird für jede Probe ein Diagramm erzeugt, bei der die Intensität des Fluoreszenzsignals gegen die Zykluszahl aufgetragen wird. Es ist nötig einen Schwellenwert (*Threshold*) zu definieren, ab dem sich die Fluoreszenzsignale aller Proben signifikant vom Hintergrundsignal abheben. Die Anzahl der abgelaufenen Reaktionszyklen, ab dem das Fluoreszenzsignal einer Probe diesen *Threshold* überschreitet, wird als *Threshold*-Zyklus (Ct) bezeichnet. Das Fluoreszenzsignal einer Probe, in der zu Beginn der Reaktion mehr *Template*-DNA vorhanden war, steigt nach wenigen Vervielfältigungszyklen an. Das Signal einer Probe, die weniger *Template*-DNA enthielt, entsprechend später. Das bedeutet, dass der Ct Wert einer Probe mit viel *Template*-DNA kleiner ist als der einer Probe mit wenig *Template*-DNA. Anhand des Ct-Wertes kann also auf die Ausgangsmenge der *Template*-DNA geschlossen und Proben miteinander verglichen werden. Am Ende der Reaktion wird eine Dissoziationskurve (*Melt curve*) erstellt. Dabei wird durch das qPCR Gerät die Temperatur kontinuierlich erhöht. Zu dem Zeitpunkt, da die doppelsträngige DNA des am häufigsten amplifizierten Produkts dissoziiert, wird der Fluoreszenzfarbstoff frei und das Fluoreszenzsignal nimmt dann einmalig sprunghaft ab. So kann überprüft werden, ob ein spezifisches *Template* amplifiziert wurde oder ob viele unspezifische Amplifikate vorliegen. Die Anfertigung einer Dissoziationskurve ist bei der TaqMan PCR nicht notwendig.

### 3.7.3 Herstellung von cDNA aus isolierter RNA (Reverse Transkription)

Zunächst werden alle zu bearbeitenden Proben zum langsamen Auftauen auf Eis gelagert und anschließend in einer Tischzentrifuge für 2 s zentrifugiert. Nun werden 0,2 ml PCR-*Tubes* vorbereitet und pro Probe 1 µl Random *Primer* (200 ng/µl) sowie 1 µl dNTP-Mix in die *Tubes* pipettiert. Anschließend wird die aufgetaute RNA hinzugefügt. Da eine Menge von 500 ng cDNA hergestellt werden soll, errechnet sich das hinzugefügte RNA-Volumen in µl nach der Formel  $\frac{500 [ng]}{C_{RNA} [\frac{ng}{\mu l}]}$ . Wenn nötig wird das Probenvolumen mit RNase-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Anschließend wird

der PCR-Thermocycler mit den Proben beladen und am Gerät das Programm zur reversen Transkription gestartet. Nach einer Inkubation von 5 min bei 65 °C wird das Programm unterbrochen, die Proben herausgenommen und auf Eis gekühlt gelagert. Nun wird eine Stocklösung für die reverse Transkription angesetzt. Für jede Probe werden 1 µl RNase-Out, 2 µl DTT-Puffer und 4 µl 5x *First-Strand*-Puffer in ein neues Eppendorf *Tube* pipettiert. Es werden jedem PCR-*Tube* 7 µl dieser Stocklösung hinzugefügt und der Ansatz durch auf und ab pipettieren durchmischt. Die *Tubes* werden anschließend wieder in den PCR-Thermocycler geladen und das Protokoll wiederaufgenommen. Nach einer Inkubation von 2 min bei 25 °C wird das Programm erneut unterbrochen, die Proben herausgenommen und auf Eis gekühlt gelagert. Es werden jeder Probe 1 µl SuperScript-II reverse Transkriptase hinzugefügt und die PCR-*Tubes* zurück in den PCR-Thermocycler geladen. Das Programm wird fortgesetzt und es folgen 10 min bei 25 °C, 50 min bei 42 °C und abschließend 15 min bei 70 °C zum Stoppen der Polymerase-Kettenreaktion. Anschließend werden die PCR-*Tubes* aus den Thermocycler genommen und auf Eis gekühlt gelagert. Zur weiteren Verwendung wird die synthetisierte cDNA mit sterilem, apyrogenem Wasser im Verhältnis 1:10 in 1,5 ml Eppendorf *Tubes* verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### 3.7.4 Durchführung der real-time quantitative PCR

Zur Quantifizierung der Transkription werden qPCRs in einem CFX96 real-time PCR Detection System der Firma Bio-Rad in speziellen 96-Wellplatten durchgeführt. Es werden sowohl für humane als auch murine Proben konventionelle *Primer* der Firma Sigma-Aldrich (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase - GAPDH, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, ICAM-1, VCAM-1, IL-10, TGF- $\beta$ ) genutzt. Ausgenommen hiervon ist das humane TGF- $\beta$ , für das ein TaqMan Kit verwendet wurde. Die *Primer* sind mittels NCBI *Primer-BLAST* (*Primer3* und BLAST) erstellt worden und waren bereits in der Arbeitsgruppe etabliert. Die Sequenzen der 5' und 3' *Primer* sind in Kapitel 10.4, Tabelle 12 aufgelistet. Zu Beginn wird für alle Proben eine gemeinsame PCR Stocklösung hergestellt. Der Einzelansatz eines Wells für eine SYBR Green PCR setzt sich aus 0,5 µl 5' *Primer*, 0,5 µl 3' *Primer*, 12,5 µl 2x PCR *Master Mix* und 10,5 µl RNase-freiem Wasser zusammen. Der Einzelansatz eines Wells für eine TaqMan PCR setzt sich aus 1 µl 20x TaqMan *Gene Expression Assay*, 10 µl TaqMan *Gene Expression Master Mix* und 8 µl RNase-

freiem Wasser zusammen. Da jede Probe als Triplikate untersucht und eine Pipettiergenauigkeit angenommen werden muss, ergibt sich aus der Formel Einzelansatz \* Anzahl der Proben \* 3 \* 1,14, die benötigte Gesamtmenge der Stocklösung. Nach Ansatz der Stocklösung werden, der Anzahl der zu untersuchenden Proben entsprechend, 1,5 ml Eppendorf *Tubes* bereitgestellt, in die für die SYBR Green PCR je 81,6 µl und für die TaqMan PCR 65 µl der Stocklösung pipettiert werden. Zur Komplettierung des qPCR-Ansatzes werden dann jeweils 3,4 µl der im Verhältnis 1:10 verdünnten cDNA hinzu pipettiert. Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden werden für jede Probe frische, sterile, DNA und RNA freie, *Safe-Seal* Pipettenspitzen verwendet. Anschließend werden die Proben mit Hilfe eines Vortexmischers gemischt und danach in einer Tischzentrifuge für 10 s bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nun wird eine sterile 96-Wellplatte auf einem Kühlständer bereitgestellt und je 25 µl des vollständigen SYBR Green PCR-Ansatzes beziehungsweise 20 µl des vollständigen TaqMan PCR-Ansatzes einer Probe in drei Wells pipettiert. Dies geschieht mit allen vorbereiteten Proben, sowie einer Negativkontrolle, die einem qPCR Ansatz ohne cDNA entspricht. Die Negativkontrolle dient dem Nachweis verunreinigter Arbeitsmaterialien und unspezifischer Amplifikationsprodukte der verwendeten *Primer*. Anschließend wird die 96-Wellplatte mit einer sterilen, selbstklebenden Folie versiegelt, zur Entfernung von Luftblasen für 30 s bei 300 x g bei 4 °C zentrifugiert und in das qPCR Gerät gestellt. Nach Abschluss des qPCR Laufes werden die 96-Wellplatten bei -40 °C zur weiteren Verwendung eingefroren. Die qPCRs werden nach den Protokollen in den Tabellen 2 - 3 angefertigt.

**Tabelle 2:** Protokoll eines SYBR Green qPCR Laufs

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
Initiale Denaturierung	95	10 min
Denaturierung	95	15 s
Annealing und Elongation	60	1 min
Denaturierung	95	15 s
Annealing und Elongation	60	1 min
Schmelzkurve	65 → 95	1 s/0,5 °C
Kühlen	20	Bis Ende

↻ 39x

**Tabelle 3:** Protokoll eines TaqMan qPCR Laufs

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
UNG Verdau	50	2 min
Polymerase Aktivierung	95	10 min
Denaturierung	95	15 s
Annealing und Elongation	60	1 min
Kühlen	20	Bis Ende



### 3.7.5 Auswertung der qPCR Analyse

Die Betrachtung und Auswertung der Daten erfolgt mit der CFX Manager Software der Firma Bio-Rad. Der *Threshold* wurde von der Software ermittelt. Um die Transkription der behandelten und unbehandelten Zellgruppen miteinander zu vergleichen wurde eine relative Quantifizierung nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode [94] durchgeführt. Es wird hierfür zunächst die Transkription der Zielgene auf ein konstitutiv transkribiertes Gen (Haushaltsgen) normiert. Dies ermöglicht methodische Faktoren (abweichend eingesetzte RNA-Gesamtmenge, verschiedene qPCR-Läufe), die die Transkriptionsanalyse beeinflussen können, zu minimieren. Daraus ergibt sich der  $\Delta Ct$ -Wert. Anschließend erfolgt der Vergleich der behandelten Gruppen und der nicht behandelten Gruppe ( $\Delta\Delta Ct$ ) sowie die Errechnung der *relativen Expression* der behandelten Gruppen in Bezug auf die nicht behandelte Gruppe, zusammenfassend nach folgenden Formeln:

$$\Delta Ct = Ct_{Zielgen} - Ct_{Haushaltsgen}; \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Behandelt} - \Delta Ct_{Nicht\ behandelt};$$

$$Relative\ Expression = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

## 3.8 Expressionsanalyse auf Proteinebene

### 3.8.1 Aufbereitung von Proteinen aus isolierten Zellen

#### *Aufbereitung aus murinen Zellen*

Vor Beginn der Proteinisolation werden die bei  $-80\text{ °C}$  gelagerten Proben für ungefähr 5 min auf Eis zum Tauen gebracht. Anschließend erfolgt die Behandlung des Lysates für 25 s mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei  $16000 \times g$  und  $4\text{ °C}$ . In den *Tubes* bildet sich nun am Boden ein Pellet aus Zellresten und darüber eine proteinreiche wässrige Phase, die mit einer Mikropipette abgenommen und in ein neues 0,5 ml Eppendorf *Tube* überführt wird.

#### *Aufbereitung aus humanen Zellen*

Vor Beginn der Proteinisolation werden die bei  $-80\text{ °C}$  gelagerten 15 cm Zellkulturschalen für ungefähr 5 min auf Eis zum angetaut. Nun werden mit einer Mikropipette jeweils  $120\text{ }\mu\text{l}$  des WCE-Puffers (Kap. 10.7) in die Schale pipettiert und die Flüssigkeit durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Mit einem Zellschaber schabt man nun die lysierten Zellen vom Rand her beginnend, auf einen Punkt an der gegenüberliegenden Seite der Schale hin, gründlich zusammen. Die Zellen werden durch mehrfaches auf und ab pipettieren vollständig aus einer Schale abgenommen und die Lysate anschließend in jeweils ein 1,5 ml Eppendorf *Tube* überführt. Nun wird den Lysaten jeweils  $30\text{ }\mu\text{l}$  10 % NP-40 hinzugefügt und die Eppendorf *Tubes* für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden sie mit einem Vortexmischer für 90 s gemischt. Dann erfolgt eine Zentrifugation für 30 min bei  $16000 \times g$  und  $4\text{ °C}$ . Es kann nun die wässrige, proteinreiche Phase abgenommen und auf 0,5 ml Eppendorf *Tubes* verteilt werden.

#### *Messung der Proteinkonzentration*

Die Messung erfolgt abgewandelt nach der 1951 von O. H. Lowry et al. etablierten Methode [97]. Zunächst wird je  $1\text{ }\mu\text{l}$  einer Probe mit dem jeweils verwendeten Puffer (WCE- und RIPA-Puffer) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Danach werden je  $5\text{ }\mu\text{l}$  der verdünnten Proben in zwei nebeneinander liegende Wells einer 96-Well Platte pipettiert. Weiterhin wird eine vierstufige Verdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) und sterilem, apyrogenem Wasser angefertigt. Die Proteinkonzentrationen liegen hierbei zwischen  $0,17\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und  $1,4\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Die im Weiteren verwendeten Materialien stammen aus dem Bio-Rad DC *protein assay Kit* und werden nach Herstellerangaben angesetzt und verwen-

det. Zunächst wird mit einer Mikropipette jedem Well 25 µl Lösung A (Kap. 10.7) hinzugefügt, anschließend 200 µl des Reagenz B. Die Platte wird lichtundurchlässig abgedeckt und für 15 min auf einem Mikrotitterplattenschüttler inkubiert. Nach Zugabe des Reagenz B entsteht in den einzelnen Wells, je nach enthaltener Proteinkonzentration, eine Farbreaktion unterschiedlicher Intensität. Die Transmission jedes einzelnen Wells kann nun in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt werden. Anhand der BSA-Verdünnungsreihe kann eine Standardkurve erstellt werden, wobei der Transmission einer Verdünnungsstufe deren bekannte Proteinkonzentration zugeordnet wird. Mit Hilfe der Standardkurve kann dann die Proteinkonzentration der übrigen Proben bestimmt werden.

### **3.8.2 Prinzip und Durchführung des Western Blot**

Der Western Blot ist eine semiquantitative Methode zum Nachweis von Proteinen. Sie wurde aus einer von E. M. Southern [156] etablierten Methode (Southern Blot) zum DNA-Nachweis entwickelt und 1981 von W. N. Burnette [18] veröffentlicht. Nach der Isolation der zu untersuchenden Proteine findet zunächst eine Behandlung mit SDS-haltigem Puffer statt. Hierdurch wird die Eigenladung der Proteine neutralisiert und eine negative Gesamtladung erzeugt. So wandern alle Proteine gleichermaßen zur positiven Anode. Weiterhin werden mittels reduzierender Pufferbestandteile und Erhitzung die Proteine denaturiert um eine Beeinflussung der Laufeigenschaften im Gel, durch unterschiedliche sekundär und tertiär Strukturen der Proteine, zu minimieren. Die wie oben vorbereiteten Proben werden auf ein Elektrophoresegel aufgetragen. Die durch Anlage eines Gleichstroms stattfindende elektrophoretische Auftrennung erfolgt so hauptsächlich nach dem Molekulargewicht. In der Zeit der Elektrophorese laufen leichtere Proteine schneller und weiter Richtung Anode, wohingegen schwere Proteine näher an der Kathode zu finden sind. Anschließend wird das Elektrophoresegel zusammen mit einer Membran (Nitrocellulose oder Polyvinylidenfluorid (PVDF)) und Filterpapier in eine Blotting Kammer gegeben. Durch Anlegen eines Gleichstroms findet nun in feuchtem Milieu die Übertragung der Proteine auf die Membran statt. Auf dieser Membran wird anschließend der eigentliche Proteinnachweis durchgeführt. Zunächst werden Antikörper gegen das Zielprotein (z.B. IL-1 $\beta$ ) aufgetragen (Erstantikörper). Danach wird ein Antikörper hinzugegeben, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist (Zweitantikörper). Dieser Zweitantikörper ist mit einer Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert. Die HRP führt

nach Zugabe einer Entwicklerlösung zu einer Farbreaktion. Da der Zweitantikörper spezifisch am Erstantikörper gebunden ist, ermöglicht diese Farbreaktion den Nachweis des mit dem Erstantikörper markierten Zielproteins. Weiterhin hilft der Vergleich des Molekulargewichts der dargestellten Proteinbande mit einem zusätzlich aufgetragenen Komigrationsstandard (Größenmarker) bei der Identifikation des Zielproteins.

Vor Beginn der weiteren Arbeiten werden die bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Protein Isolate für ungefähr 2 min auf Eis zum Tauen gebracht. Es werden  $35\text{ }\mu\text{g}$  Protein pro Probe in ein neues  $0,5\text{ ml}$  Eppendorf *Tube* überführt und anschließend mit Ladepuffer (Kap. 10.7) versetzt. Dann werden die Proben zur Denaturierung für 5 min in ein kochendes Wasserbad gegeben. Während dessen kann die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (Kap. 10.7) gefüllt werden. Danach wird das Elektrophoresegel vorbereitet und in die Kammer eingesetzt. Es wurden kommerziell vorgefertigte Bis-Tris- oder Tris-Glycin-Gele verwendet. Zunächst werden die Geltaschen mit Laufpuffer gespült. Danach wird in die 1. Tasche ein Komigrationsstandard aufgetragen, dessen Bestandteile definierte Molekulargewichte aufweisen. Nach dem Lauf kann anhand dieser Größenmarker, das Molekulargewicht der übrigen aufgetragenen Proteine abgeschätzt werden. Anschließend werden die übrigen Taschen mit den zu untersuchenden Proben befüllt. Es wird ein Gleichstrom an die Elektrophoresekammer angelegt und die Auftrennung der Proteine wird für 30 min bei 60 V und anschließend für 40 min bei 160 V durchgeführt. Danach findet der Blot-Vorgang statt. Dieser wird mit dem bio-rad Trans-Blot Turbo Transfer System durchgeführt. Weiterhin werden bio-rad Trans-Blot Turbo Transfer Packs genutzt, die vollständig vorbereitete PVDF-Membranen ( $0,2\text{ }\mu\text{m}$  Porengröße), Filterpapierstapel und Puffer enthalten. Die Geltaschen werden abgetrennt und das Gel anschließend auf die Membran gelegt, die sich über dem ersten Filterpapierstapel befindet. Darauf wird der zweite Filterpapierstapel gelegt und die Blot-Kammer geschlossen. Der Blot-Vorgang wird mit den vom Hersteller vorgeschlagenen Einstellungen (5-10 min bei 1,3-2,5 A; bis 25 V), abhängig von der Größe des verwendeten Gels sowie der Molekülmasse des Zielproteins, durchgeführt. Zur Erfolgskontrolle des Blot-Vorgangs wird die Membran für 5 min mit Ponceau-Farbstoff gefärbt. Das Gel wird mit Coomassie-Blau-Farbstoff gegengefärbt, um mögliche Proteinrückstände nachzuweisen. Anschließend werden Fotoaufnahmen der Ponceau gefärbten Membranen in einem Bio-Rad ChemiDoc MP System angefertigt. Ist der Blot-Vorgang erfolgreich und die Membran gleichmäßig mit Proteinen beladen, wird der Größenmarker von der übrigen Membran abgetrennt und separat weiterbehandelt. Es

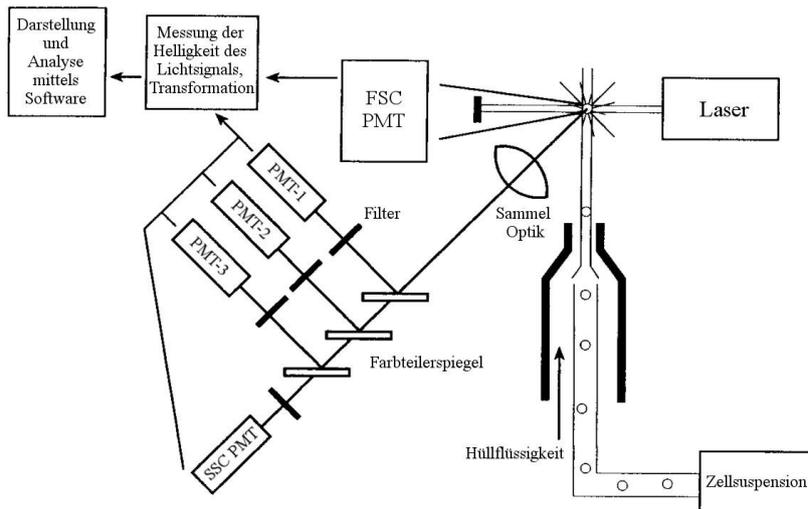
folgt nun die Antikörpermarkierung der Zielproteine. Um unspezifische Bindungsstellen für die verwendeten Antikörper zu blockieren, wird die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit Blockpuffer (Kap. 10.7) behandelt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem Erstantikörper in 10-20 ml Blockpuffer über Nacht bei 4 °C. Am folgenden Tag wird die Membran mindestens fünfmal für 7 min mit 15 ml Waschpuffer-2 (Kap. 10.7) gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem HRP-konjugierten Zweitantikörper, der 1:1000 in Blockpuffer gelöst ist, für 1 h bei Raumtemperatur. Die verwendeten Erst- und Zweitantikörper sind in Kapitel 10.5, Tabellen 10 - 11 aufgelistet.

Der Komigrationsstandard enthält Strep-Tag-konjugierte Proteine und wird hingegen mit einem Strep-Tactin-HRP-Konjugat für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird die Membran und der Komigrationsstandard erneut mindestens fünfmal für 7 min mit 15 ml Waschpuffer-2 gewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe von 600 µl Chemilumineszenzsubstrat, die Inkubation für 5 min und direkt im Anschluss die Bildaufnahme. Nach der Anfertigung der Bilder des Zielproteins werden die Membran und der Komigrationsstandard erneut mindestens fünfmal für 7 min mit 15 ml Waschpuffer-2 gewaschen, um überschüssige Antikörper und Entwicklerlösung zu entfernen. Anschließend erfolgt, analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise, die Inkubation der Membran mit einem Erstantikörper gegen das Haushaltsgen GAPDH, anschließend mit dem Zweitantikörper und die erneute Bildaufnahme. Die Betrachtung und Bildaufnahme der angefertigten Western Blots erfolgte mit dem Bio-Rad ChemiDoc MP System und der Bio-Rad *Image Lab* Software. Die Auswertung der Western Blots erfolgte ebenfalls mit der Bio-Rad *Image Lab* Software, wobei die mittleren optischen Dichten der Banden gemessen und auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert wurden.

## 3.9 Durchflusszytometrie

### 3.9.1 Grundlagen und Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie findet Verwendung zur Charakterisierung einzelner Partikel, in unserem Falle einzelner Zellen, anhand ihrer physikalischen Eigenschaften wie Größe, Form, DNA- und RNA-Gehalt. Zusätzlich können intrazelluläre oder an der Zelloberfläche gelegene Proteine mit Antikörpern markiert werden, an die fluoreszierende Stoffe (Fluorophore) gekoppelt sind. So können die markierten Proteine in die Charakterisierung der Zellen miteinbezogen werden [15, 143]. Hierfür wird ein laminarer Flüssigkeitsstrom (Hüllstrom) erzeugt, in den die zu untersuchende Zellsuspension injiziert wird. Der Hüllstrom sorgt dafür, dass sich die Zellen einzeln, hintereinander (wie bei einer Perlenkette) und zentriert im Probenstrom bewegen. Der Probenstrom wird dann an einer monochromatischen Lichtquelle, üblicherweise einem oder mehreren Lasern, vorbeigeführt. Das Laserlicht schneidet dabei rechtwinklig den Probenstrom. Hierbei wird es zum einen an den Zellen gestreut, zum anderen versetzt es die zur Proteinmarkierung verwendete Fluorophore in einen energiereichen, angeregten Zustand. Direkt im Anschluss bildet sich der angeregte Zustand spontan zurück. Dabei emittiert jedes Fluorophor Fluoreszenzlicht eines spezifischen Wellenlängenbereichs (Emissionsspektrum). Das Streulicht und das Fluoreszenzlicht breiten sich in alle Richtungen aus und werden über optische Linsen gesammelt. Das Licht wird dann über verschiedene Photomultiplerröhren (*photomultiplier tube* - PMT) detektiert, die Intensität des Lichtsignals gemessen und in elektrische Signale transformiert. Über Farbteilerspigel und Bandpassfilter können zuvor die Emissionsspektren mehrerer Fluorophore voneinander getrennt und auf unterschiedliche PMTs geleitet werden. Jedes PMT detektiert so ein unterschiedliches Lichtspektrum, also folglich die Emission eines Fluorophors. Das Fluoreszenzlicht wird ebenfalls im 90°-Winkel detektiert. Die Fluorophore sind an Antikörper gegen intrazelluläre oder Oberflächenproteine der Zellen gekoppelt. Bei jeder Zelle, für die ein Fluoreszenzsignal eines bestimmten Fluorophors detektiert wird, kann eine Aussage über das Vorkommen des markierten Proteins getroffen und so kann die Zelle charakterisiert werden.



**Abbildung 11:** Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise eines Durchflusszytometers.

Die Zellen werden durch die Hüllflüssigkeit fokussiert und im  $90^\circ$  Winkel in ein Laserlicht geleitet. Die Streuung des Lichts an den Zellen wird als erstes im FSC-PMT detektiert. Anschließend werden Streulicht und Fluoreszenzlicht gesammelt. Es erfolgt die Detektion des SSC sowie nach spektraler Auftrennung durch Farberteilerspiegel und Bandpassfilter die Detektion der Signale einzelner Fluorophore in einzelnen PMTs. Modifiziert nach: Brown, M. and Wittwer, C., Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clinical chemistry, 2000. **46**(8 Pt 2): p. 1221-9

Durch die geeignete Auswahl der markierten Proteine kann eine genaue Klassifizierung der Zelle erfolgen. Das Streulicht hingegen kann detektiert und zur Erfassung der physikalischen Eigenschaften der Zellen herangezogen werden. Das im spitzen Winkel ( $< 90^\circ$ ) gestreute Licht wird als erstes erfasst und als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* - FSC) bezeichnet. Es dient der Abschätzung der Zellgröße. Das im  $90^\circ$ -Winkel gestreute Licht wird als Seitwärtsstreulicht (*side scatter* - SSC) bezeichnet und dient der Abschätzung der inneren Struktur und Granularität der Zellen. Die Daten werden für jede Zelle einzeln erfasst und zur Analyse gespeichert.

### 3.9.2 Durchführung der Antikörpermarkierung

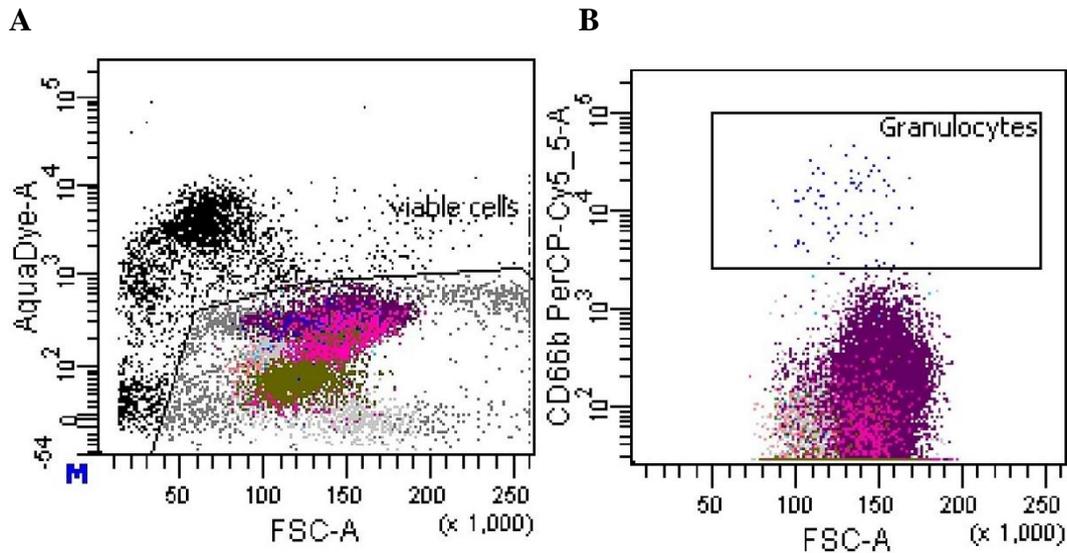
Die murinen Zellen wurden nach siebentägiger Behandlung mit M-CSF untersucht. Die humanen Zellen wurden direkt nach Isolation (Tag 0) und nach Inkubation über Nacht (Tag 1) untersucht. Die Zellen werden aus der Zellkultur abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zunächst erfolgt ein Waschschrift zur Entfernung des

Mediums. Es werden 25 ml 5 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in 1x PBS, zur Zellsuspension hinzugegeben und eine Zentrifugation für 10 min bei 350 x g und 4 °C durchgeführt. Der Überstand wird mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt. Das Zellpellet wird in 25 ml 5 mM EDTA in *Cell Staining Buffer*, resuspendiert. Anschließend erfolgt die Zählung der Zellen wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 350 x g und 4 °C und Absaugen des Überstandes, wird das Zellpellet in 5 mM EDTA in *Cell Staining Buffer* so resuspendiert, dass eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml erreicht wird. Es erfolgt zunächst die Sättigung der unspezifisch antikörperbindenden Fc-Rezeptoren mittels Zugabe von 50 µl/ml *Fc-Receptor Blocking Reagent* und einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur. Die Zellsuspension wird nun zu je 100 µl auf 5 ml *round bottom tubes* verteilt. Dann erfolgt die Zugabe der fluorophorgekoppelten Antikörper und die Inkubation für 20 min bei 4 °C im Dunkeln. Für die Kompensation wird pro verwendetem Antikörper eine Einzelfärbung sowie einmalig jeweils eine Färbung von *compensation beads* durchgeführt. Ebenso wird als negative Kontrolle eine Probe ohne Antikörper bereitgestellt. Die Zielproteine der verwendeten Antikörper, die gekoppelten Fluorophore, die verwendeten Volumina sowie eine kurze Beschreibung der Funktion der Oberflächenproteine sind in Kapitel 10.6, Tabellen 13 - 14 aufgelistet. Nach der Inkubation erfolgt die Zugabe von 2 ml 5 mM EDTA in *Cell Staining Buffer* und eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 350 x g und 4 °C. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet anschließend zur Vitalitätsfärbung in 1 ml 1 % Gebrauchslösung des *LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit* (Kap. 10.7) resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur, im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml 5 mM EDTA in *Cell Staining Buffer* erfolgt eine erneute Zentrifugation des *Tubes* für 10 min bei 350 x g und 4°C. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl 5mM EDTA in *Cell Staining Buffer* resuspendiert. Anschließend kann die Messung erfolgen, wobei je 50.000 *events* aufgezeichnet werden.

### **3.10 Datenerfassung und Analyse**

Die Datenerfassung am Durchflusszytometer erfolgt mit der BD FACSuite Software. Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgt mit der BD FACSDiva Software. Aus logistischen Gründen wurde während der Erstellung dieser Arbeit an zwei Durchflusszy-

tometern gearbeitet. Die durchflusszytometrische Analyse während der PBMC- und Monozytenisolation erfolgt an einem BD FACScan (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Die Analyse zur Kontrolle der BMDM-Differenzierung und genaueren Klassifizierung der isolierten humanen Monozyten erfolgt mit einem BD FACSVerse (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Die Ergebnisse einer durchflusszytometrischen Analyse werden dann üblicherweise auf zwei Arten dargestellt. Die Punktwolkendarstellung (*dot plot*) stellt jede Zelle einzeln dar, charakterisiert anhand zweier Parameter in einem Koordinatensystem. Welche Parameter auf der x- und y-Achse abgebildet werden ist dabei frei wählbar (SSC, FSC, Fluoreszenzintensität eines bestimmten Fluorophors/Proteins). Im Histogramm hingegen wird eine Signalintensität (x-Achse) gegen die Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Durch Auswahl von Proteinen, die typisch für bestimmte Zellen oder Zelllinien sind (Marker), können etwa Leukozytensubpopulationen voneinander unterschieden werden [63]. Dieser Vorgang wird im Folgenden beispielhaft erläutert. Untersucht wurde das Isolat eines humanen *buffy coat*, direkt nach Aufnahme in das Zellkulturmedium. Es wurde ein *dot plot* erstellt, bei dem das FSC gegenüber der Vitalitätsfärbung dargestellt wird (Abb. 12 A). Alle intakten Zellen liegen im unteren Bereich des *plots* und werden mit einem Rahmen (*gate*) markiert und farblich kodiert. Die Zellen innerhalb dieses *gates* können nun weiter analysiert werden. Granulozyten exprimieren CD66b auf der Zelloberfläche und lassen sich so gut von anderen Leukozyten unterscheiden. Daher wird als nächstes die Fluoreszenzintensität eines fluoreszenzmarkierten CD66b-Antikörpers, dem FSC gegenüber gestellt, um den Granulozytenanteil der zuvor ausgewählten Zellen zu bestimmen. Die CD66b exprimierenden Zellen liegen gut abgrenzbar im oberen Teil des *plots* (Abb. 12 B). Man bezeichnet die Granulozyten in der Folge als CD66b<sup>+</sup>, die übrigen Zellen als CD66b<sup>-</sup>. Zellen, die ein intermediäres Signal emittieren, werden als CD66b<sup>low</sup> bezeichnet.



**Abbildung 12:** Dot Plots einer durchflusszytometrischen Analyse eines *buffy coat*, [links](#): x-Achse: FSC, y-Achse: Vitalitätsfärbung; rechts: x-Achse: FSC, y-Achse: CD66b.

Exemplarische Darstellung des *Gating* Vorgangs. Es werden im linken *plot* zunächst die vitalen Zellen mit einem *Gate* markiert. Diese Zellen werden dann im rechten *plot* weiter analysiert, wobei durch das mit Antikörpern markierte Oberflächenprotein CD66b Granulozyten (blau) identifiziert werden können.

Der beschriebene Vorgang kann mit unterschiedlichen Zellpopulationen und unterschiedlichen Markern wiederholt werden und mündet in einer exakten Klassifizierung der untersuchten Zellpopulation anhand der markierten Oberflächenproteine. So kann eine genaue Charakterisierung der Zellpopulation erfolgen. Bei Verwendung mehrerer Fluorophore müssen diese so ausgewählt werden, dass sich die Emissionsspektren wenig oder gar nicht überlappen. Dies gelingt nicht immer und kann dazu führen, dass ein Fluorophor in zwei PMTs detektiert wird. Eine Zelle wird für zwei Fluorophore positiv erkannt, obwohl nur eines gebunden ist (falsch positiver Messwert). Durch manuelle Einstellung der PMTs und digitale Nachbearbeitung der Messwerte, kann die Überschneidung der Spektren reduziert und die Anzahl falsch positiver Messwerte verringert werden. Dieser Vorgang wird als Kompensation bezeichnet. Weiterhin besteht die Möglichkeit zur automatischen Kompensation. Diese beruht darauf, dass vor der simultanen Messung mehrere Fluorophore, für jedes eingesetzte Fluorophor Einzelfärbungen durchgeführt werden. Hierbei kommen *compensation beads* zum Einsatz. Diese Kunststoffpartikel binden die eingesetzten Antikörper einer Donor-Spezies vollständig oder gar nicht. Hierdurch kann für jedes verwendete Fluorophor ein maximal positives sowie ein stark negatives Signal

erzeugt und gemessen werden. Die Software des Durchflusszytometers kann dann automatisch aus den Ergebnissen der Einzelfärbungen errechnen, welcher Anteil des detektierten Fluoreszenzsignals an jedem PMT auf überlappende Signale zurückzuführen ist.

### **3.11 Identifizierung von BMDM und humanen Monozyten in der Durchflusszytometrie**

Zur Identifizierung von murinen Makrophagen wird das von Zhang et al. [189] vorgeschlagene Drei-Marker-Konzept, mit fluorophorkonjugierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenproteine von murinen myeloischen Zellen (CD11b) und Makrophagen (F4/80), angewendet. Als dritten Marker verwenden wir den auf Makrophagen vorkommenden *major histocompatibility complex-II* (MHC-II) [8].

Zur Charakterisierung der humanen Zellen werden fluorophorkonjugierte Antikörper gegen spezifische Oberflächenproteine unterschiedlicher Zellarten genutzt, da wir nicht von einem absoluten Erfolg der Monozyten Zellisolation ausgehen konnten. Die Strategie zur Identifizierung der Zellpopulationen lehnt sich an die von Abeles et al. publizierte Methode aus dem Jahr 2012 an [1]. Untersucht werden der Marker neutrophiler und eosinophiler Granulozyten CD66b, der B-Zell-Marker CD19, der T-Zell-Marker CD3, der Marker natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) CD56 sowie die Monozyten-Marker HLA-DR, CD14 und CD16. Ebenso finden die Parameter FSC und SSC Anwendung.

### **3.12 Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung**

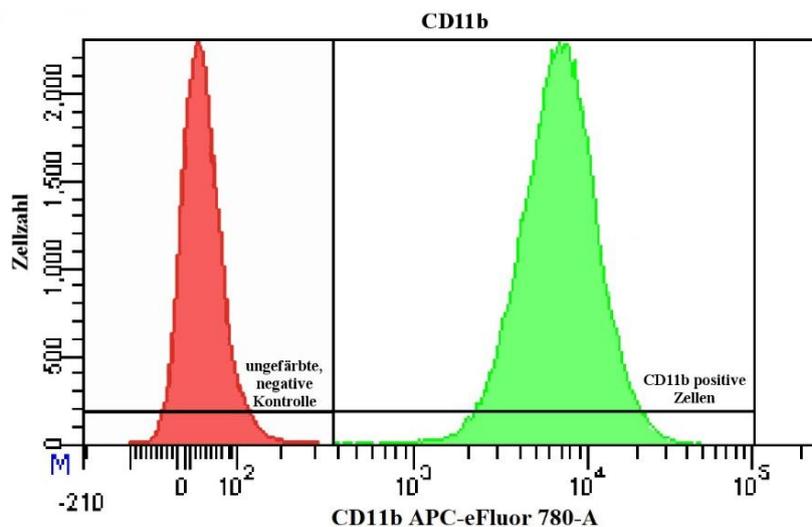
Die grafische Darstellung und die statistische Auswertung der erhobenen Messwerte erfolgten mit der Graph Pad Prism® 5 Software. Vor der statistischen Analyse erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung der Messwerte. Hierfür wurde der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Waren die Messwerte normalverteilt erfolgte der statistische Vergleich mehrerer Messwertgruppen gegeneinander mittels One-Way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test. Der Vergleich zweier Messwertgruppen gegeneinander erfolgte mit dem unpaarten t-Test. Konnte keine Normalverteilung der Messwerte angenommen werden, wurden nicht parametrische Tests verwendet, sodass der statistische Vergleich mehrerer Messwertgruppen gegeneinander mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunns-Test erfolgte. Der Vergleich zweier Messwertgruppen gegeneinander erfolgte

dann mit dem Mann-Whitney-Test. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von kleiner 5 % ( $p < 0,05$ ) wurde das Ergebnis der Testung als statistisch signifikant angesehen und in den Abbildungen mit einem Asterisk (\*) gekennzeichnet.

## 4 Ergebnisse

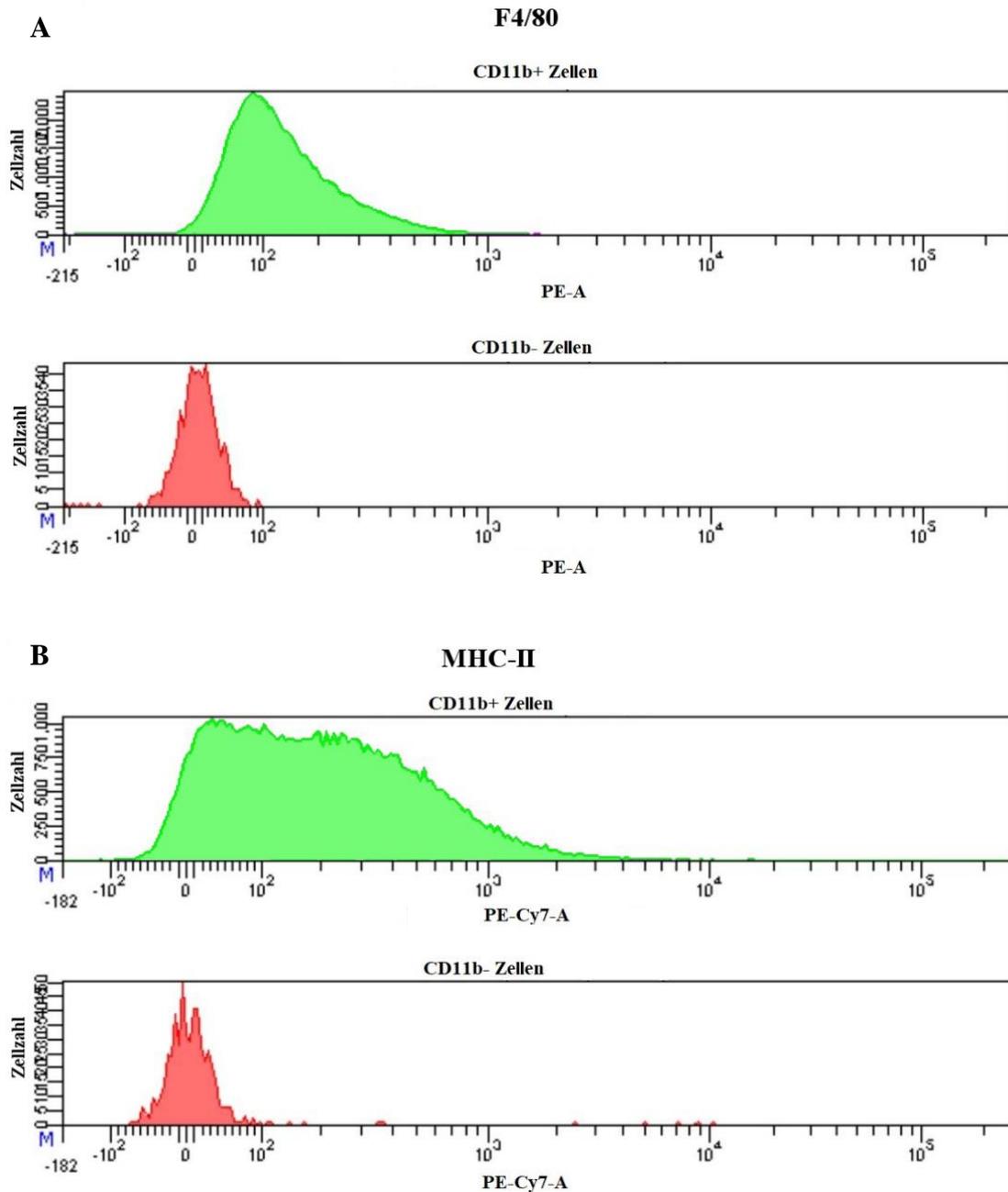
### 4.1 Qualität der Makrophagen Differenzierung

Es wurde exemplarisch die Qualität der erzeugten Zellen nach siebentägiger Behandlung mit M-CSF mittels Durchflusszytometrie kontrolliert. Nach Kompensation der Signale und Kalibrierung des Gerätes wurde der Anteil der CD11b<sup>+</sup> Zellen an allen vitalen Zellen bestimmt (Abb. 13), der in den für die Zellkultur verwendeten Proben durchschnittliche 99 % betrug. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten (MFI – *Mean fluorescence intensity*) für die Makrophagen-Marker F4/80 und MHC-II. Im Vergleich der MFIs von F4/80 (Abb. 14 A) und MHC-II (Abb. 14 B) der CD11b<sup>+</sup> Zellen mit denen der CD11b<sup>-</sup> Zellen zeigten sich die MFIs der CD11b<sup>+</sup> Zellen positiver. Die untersuchten Zellen trugen also Oberflächenproteine von myeloischen Zellen sowie Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>/MHC-II<sup>+</sup>), sodass die Differenzierung zu Makrophagen als erfolgreich angesehen werden konnte.



**Abbildung 13:** Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse muriner Knochenmarkzellen nach sieben Tagen M-CSF Behandlung.

*Ordinate:* Zellzahl. *Abszisse:*  $\log_{10}$  der Fluoreszenzintensität im Kanal APC-eFluor 780-A. Dargestellt wird die Anzahl der gezählten Zellen sowie die Intensität des Fluoreszenzsignals für einen Marker der myelischen Zellreihe CD11b (grün) der gezählten Zellen. Zum Vergleich ist das Fluoreszenzsignal einer ohne CD11b Antikörper inkubierten Probe im gleichen Kanal dargestellt (rot).

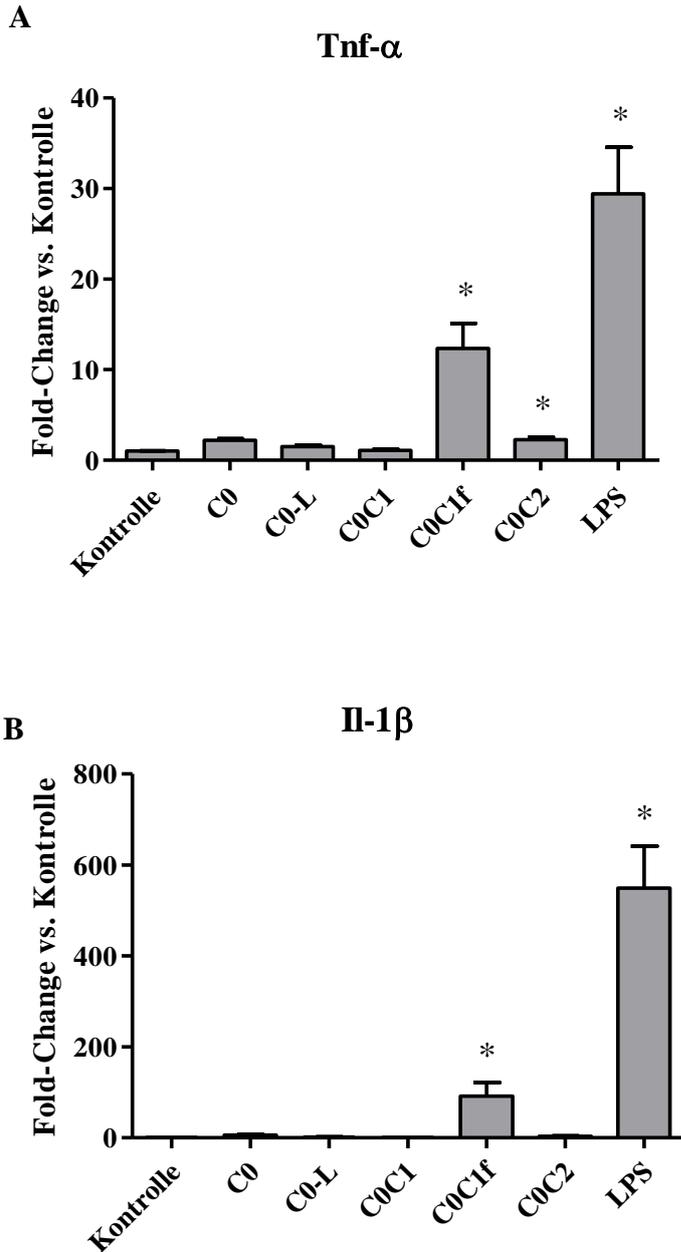


**Abbildung 14 A und B:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse muriner Knochenmarkzellen nach sieben Tagen M-CSF Behandlung.

*Ordinate:* Zellzahl. *Abszisse:*  $\log_{10}$  der Fluoreszenzintensität im jeweiligen Kanal. Dargestellt wird die Anzahl der gezählten Zellen sowie die Intensität des Fluoreszenzsignals für die Makrophagenmarker F4/80 (A, PE-A) und MHC-II (B, PE-Cy7-A) der gezählten Zellen. Es werden alle CD11b<sup>+</sup> (grün) mit allen CD11b<sup>-</sup> (rot) Zellen verglichen. Es zeigt sich im Median bei F4/80 und MHC-II eine höhere Fluoreszenzintensität der CD11b<sup>+</sup> Zellen gegenüber der CD11b<sup>-</sup> Zellen (MFI: A: F4/80: CD11b<sup>+</sup>: 114; CD11b<sup>-</sup>: 5; B: MHC-II: CD11b<sup>+</sup>: 180; CD11b<sup>-</sup>: 3).

## 4.2 Transkriptionsanalyse von murinen BMDM nach Behandlung mit cMyBP-C-Fragmenten

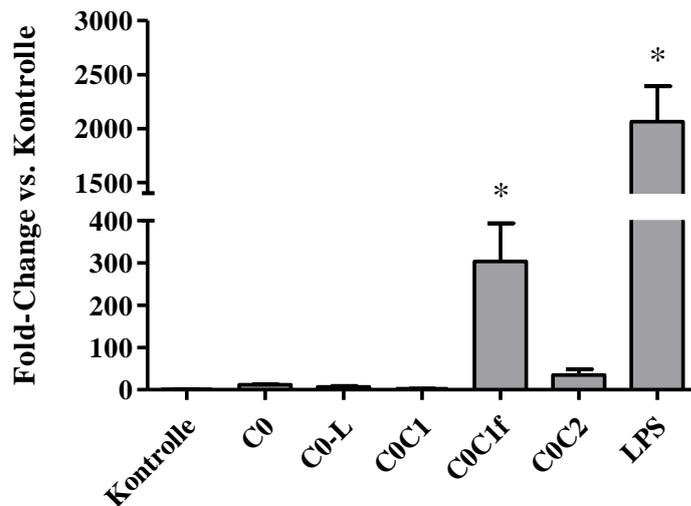
Zunächst untersuchten wir, ob cMyBP-C-Fragmente einen Einfluss auf die Transkription von ausgewählten Zytokinen und Adhäsionsmolekülen bei BMDM haben. Hierzu wurden die Zellen für 6 h mit 500 ng/ml der Fragmente C0, C0-Linker (C0-L), C0C1, C0C1f und C0C2 sowie 100 ng/ml LPS und einem äquivalenten Volumen PBS behandelt. Anschließend wurde die Transkription der proinflammatorischen Zytokine Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Il-6, der profibrotischen beziehungsweise anitnflammatorischen Zytokine Tgf- $\beta$ , Il-10, der Adhäsionsmolekülen Icam-1, Vcam-1, des M2-typischen Mannose Rezeptor Mrc-1 sowie des M2-typischen Enzyms Arg-1 anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR bestimmt. Es zeigte sich, dass die Transkription proinflammatorischer Gene, durch die Behandlung der Zellen mit C0C1f sowie LPS, gegenüber des Kontrollniveaus deutlich anstieg (C0C1f: Tnf- $\alpha$ :  $12,4 \pm 2,8$ -fach,  $p < 0,0001$ ; Il-1 $\beta$ :  $91,5 \pm 29,9$ -fach,  $p < 0,0001$ ; Il-6:  $303,5 \pm 90,2$ -fach,  $p < 0,0001$ ; Abb. 15 und 16). Bei der Behandlung mit den Fragmenten C0, C0-L und C0C1 sowie mit PBS konnte keine Veränderung der Transkription gemessen werden (Abb. 15 und 16). Eine Ausnahme stellte hier die gesteigerte Tnf- $\alpha$ -Transkription bei Behandlung mit C0C2 dar (Abb. 15 A), da hier ebenfalls eine signifikante Veränderung gemessen werden konnte ( $p < 0,0001$ ), doch diese im Vergleich zu C0C1f wesentlich geringer ausfiel (C0C2:  $2,3 \pm 0,3$ -fach vs. C0C1f:  $12,4 \pm 2,8$ -fach).



**Abbildung 15 A und B:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ ) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit PBS (Kontrolle), 500 ng/ml C0, C0-L, C0C1, C0C1f, C0C2 und 100 ng/ml LPS für 6 h. Es zeigt sich eine deutliche Steigerung der Transkription durch Behandlung mit C0C1f und LPS. Geringe Steigerung der Transkription bei Tnf- $\alpha$  durch Behandlung mit C0C2. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. A:Tnf- $\alpha$ : Kontrolle: 1,0 ± 0,05; C0: 2,2 ± 0,2; C0-L: 1,5 ± 0,2; C0C1: 1,1 ± 0,1; C0C1f: 12,4 ± 2,8; C0C2: 2,3 ± 0,3; LPS: 29,4 ± 5,1; B:Il-1 $\beta$ : Kontrolle: 1,0 ± 0,1; C0: 6,7 ± 0,5; C0-L: 2,0 ± 0,3; C0C1: 1,2 ± 0,1; C0C1f: 91,5 ± 29,9; C0C2: 3,6 ± 0,7; LPS: 549,2 ± 91,8; (Kontrolle: n = 12; C0: n = 4, C0-L, C0C2: n = 11; C0C1: n = 18; C0C1f: n = 21; LPS: n = 6)

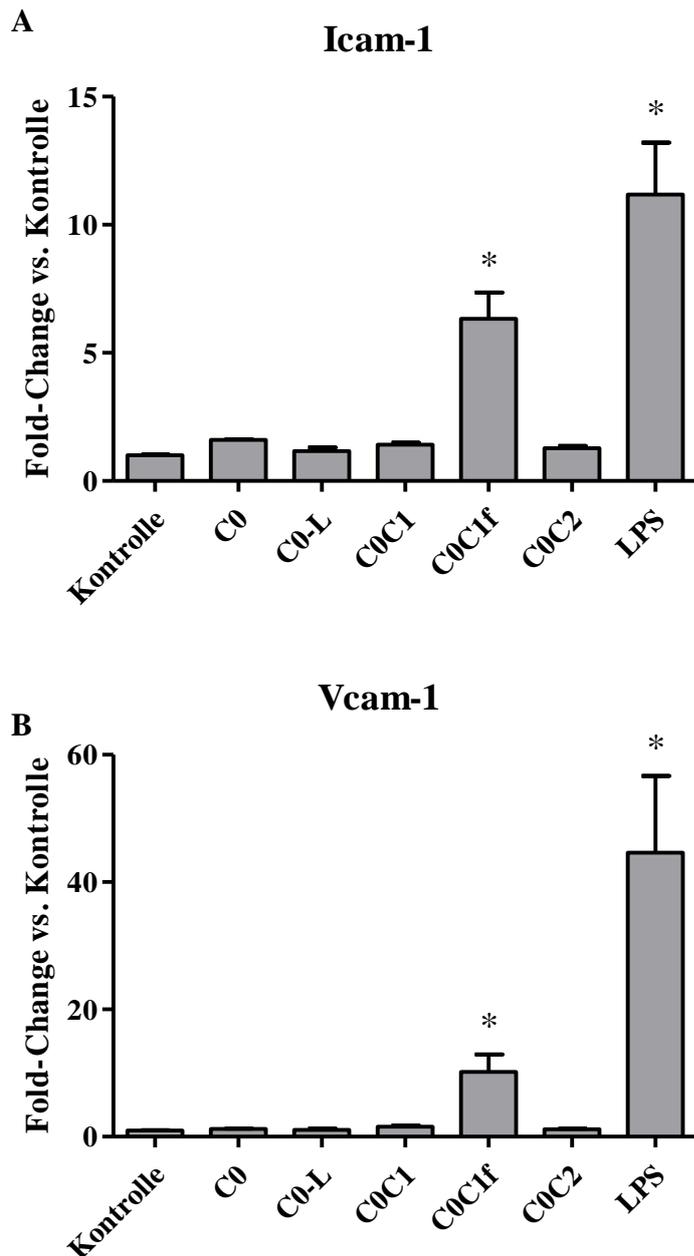
## II-6



**Abbildung 16:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des inflammatorischen Zytokins Il-6 anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit PBS (Kontrolle), 500 ng/ml C0, C0-L, C0C1, C0C1f, C0C2 und 100 ng/ml LPS für 6 h. Es zeigt sich eine deutliche Steigerung der Transkription durch Behandlung mit C0C1f und LPS. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. Il-6: Kontrolle:  $1,0 \pm 0,3$ ; C0:  $11,8 \pm 0,5$ ; C0-L:  $7,0 \pm 1,6$ ; C0C1:  $2,2 \pm 0,6$ ; C0C1f:  $303,5 \pm 90,2$ , C0C2:  $35,1 \pm 13,6$ ; LPS:  $2065 \pm 327,5$ ; (Kontrolle:  $n = 12$ ; C0:  $n = 4$ , C0-L, C0C2:  $n = 11$ ; C0C1:  $n = 18$ ; C0C1f:  $n = 21$ ; LPS:  $n = 6$ )

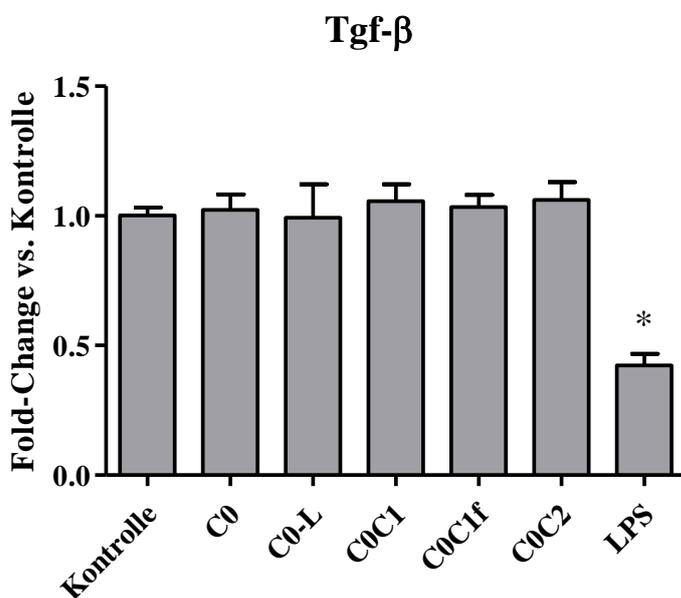
Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Transkription der Adhäsionsmoleküle Icam-1 (C0C1f:  $6,3 \pm 1,0$ -fach,  $p < 0,0001$ ) und Vcam-1 (C0C1f:  $10,2 \pm 2,7$ -fach,  $p < 0,0001$ ), welche nach Behandlung mit C0C1f und LPS stiegen. Die Behandlung mit den übrigen Fragmenten führte hingegen zu keiner Veränderung (Abb. 17).



**Abbildung 17 A und B:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Adhäsionsmoleküle (Icam-1, Vcam-1) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit PBS (Kontrolle), 500 ng/ml C0, C0-L, C0C1, C0C1f, C0C2 und 100 ng/ml LPS für 6 h. Es zeigt sich eine Steigerung der Transkription durch Behandlung mit C0C1f und LPS. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. **A: Icam-1:** Kontrolle:  $1,0 \pm 0,03$ ; C0:  $1,6 \pm 0,02$ ; C0-L:  $1,2 \pm 0,1$ ; C0C1:  $1,4 \pm 0,1$ ; C0C1f:  $6,3 \pm 1,0$ ; C0C2:  $1,3 \pm 0,1$ ; LPS:  $11,2 \pm 2,0$ ; **B: Vcam-1:** Kontrolle:  $1 \pm 0,03$ ; C0:  $1,2 \pm 0,1$ ; C0-L:  $1,1 \pm 0,2$ ; C0C1:  $1,6 \pm 0,2$ ; C0C1f:  $10,2 \pm 2,7$ ; C0C2:  $1,2 \pm 0,1$ ; LPS:  $44,6 \pm 12,0$ ; (Kontrolle:  $n = 12$ ; C0:  $n = 4$ , C0-L, C0C2:  $n = 11$ ; C0C1:  $n = 18$ ; C0C1f:  $n = 21$ ; LPS:  $n = 6$ )

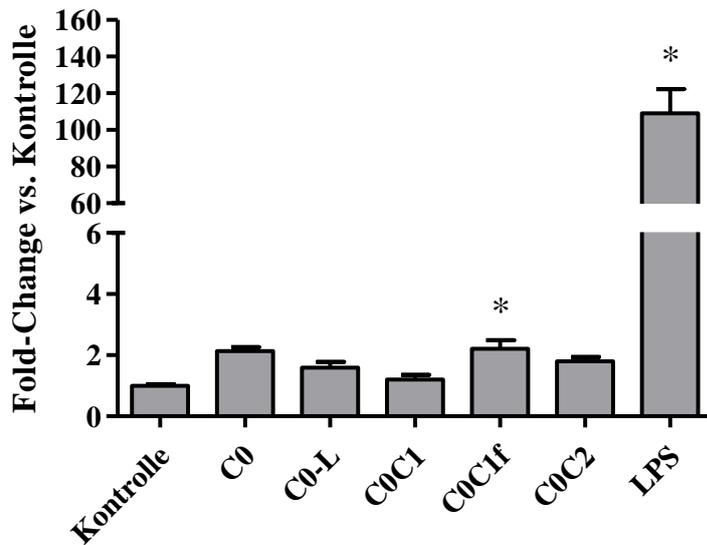
Eine Veränderung der Transkription von Tgf- $\beta$  konnte durch keines der Fragmente induziert werden. Die Behandlung mit LPS führte jedoch zu einer signifikanten Verringerung von Tgf- $\beta$  ( $p=0,0005$ , Abb. 18). Bei der Analyse der Il-10-Transkription zeigte sich ein anderes Bild. Die Behandlung mit C0C1f führte zu einer geringen, aber signifikanten Steigerung der Transkription ( $2,2 \pm 0,3$ -fach,  $p=0,0028$ ), bei den übrigen Fragmenten zeigte sich hingegen keine Veränderung. Die Behandlung mit LPS führte zu einer deutlichen Steigerung der Transkription (Abb. 19).



**Abbildung 18:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des profibrotischen beziehungsweise antiinflammatorischen Zytokins Tgf- $\beta$ , anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit PBS (Kontrolle), 500 ng/ml C0, C0-L, C0C1, C0C1f, C0C2 und 100 ng/ml LPS für 6 h. Bei Tgf- $\beta$  konnte lediglich eine Verringerung der Transkription durch LPS gezeigt werden. Die cMyBP-C-Fragmente bewirkten hier keinerlei Veränderung. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. Tgf- $\beta$ : Kontrolle:  $1,00 \pm 0,03$ ; C0:  $1,02 \pm 0,06$ ; C0-L:  $0,99 \pm 0,13$ ; C0C1:  $1,06 \pm 0,06$ ; C0C1f:  $1,03 \pm 0,05$ ; C0C2:  $1,06 \pm 0,07$ ; LPS:  $0,42 \pm 0,05$ ; (Kontrolle:  $n = 12$ ; C0:  $n = 4$ , C0-L, C0C2:  $n = 11$ ; C0C1:  $n = 18$ ; C0C1f:  $n = 21$ ; LPS:  $n = 6$ )

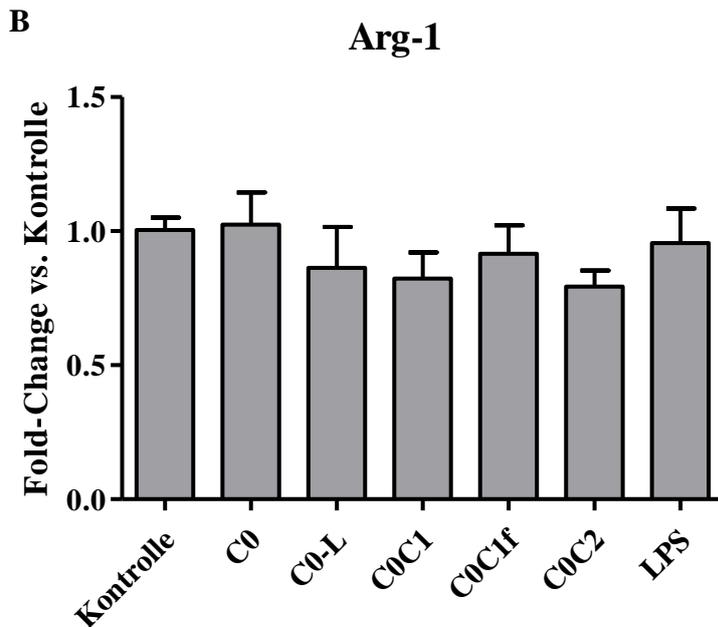
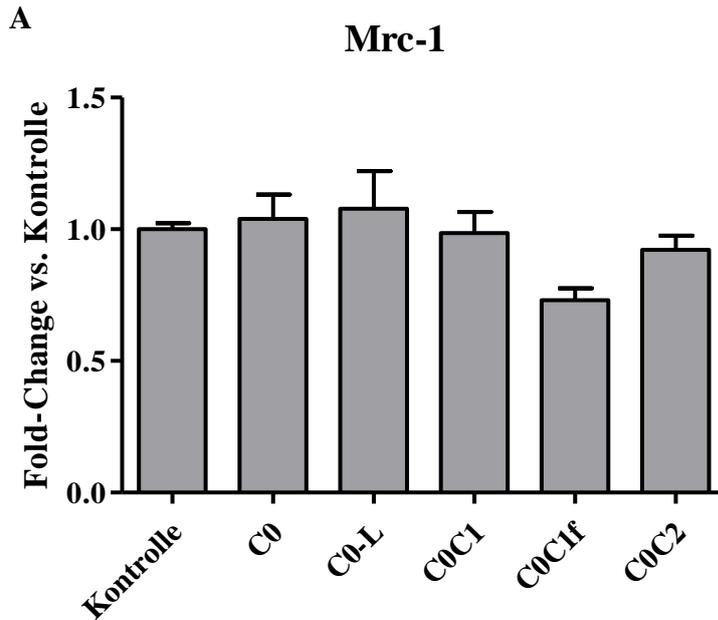
## Il-10



**Abbildung 19:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des antiinflammatorischen Zytokins Il-10 anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit PBS (Kontrolle), 500 ng/ml C0, C0-L, C0C1, C0C1f, C0C2 und 100 ng/ml LPS für 6 h. Bei Il-10 zeigt sich eine Steigerung der Transkription durch Behandlung mit C0C1f und LPS. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. *Il-10*: Kontrolle:  $1,0 \pm 0,1$ ; C0:  $2,1 \pm 0,1$ ; C0-L:  $1,6 \pm 0,2$ ; C0C1:  $1,2 \pm 0,2$ ; C0C1f:  $2,2 \pm 0,3$ ; C0C2:  $1,8 \pm 0,1$ ; LPS:  $109,1 \pm 13,2$ ; (Kontrolle:  $n = 12$ ; C0:  $n = 4$ , C0-L, C0C2:  $n = 11$ ; C0C1:  $n = 18$ ; C0C1f:  $n = 21$ ; LPS:  $n = 6$ )

Bezüglich der für den M2-Makrophagen typischen Proteine Mrc-1 und Arg-1 konnte durch keines der Fragmente eine signifikante Änderung der Transkription hervorgerufen werden (Abb. 20).

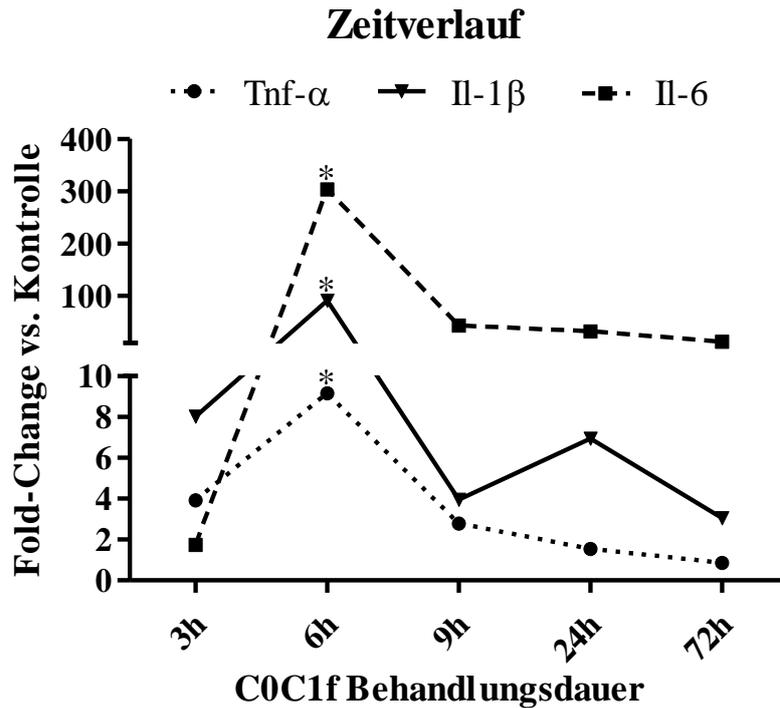


**Abbildung 20 A und B:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des M2-typischen Mannose Rezeptors Mrc-1 und des M2-typischen Enzyms Arg-1 anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit PBS (Kontrolle), 500 ng/ml C0, C0-L, C0C1, C0C1f, C0C2 und 100 ng/ml LPS für 6 h. Es zeigt sich bei keiner der verwendeten Substanzen eine Veränderung der Transkription. *Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus.* A: Mrc-1: Kontrolle:  $1,0 \pm 0,02$ ; C0:  $1,0 \pm 0,1$ ; C0-L:  $1,0 \pm 0,1$ ; C0C1:  $1,0 \pm 0,1$ ; C0C1f:  $0,7 \pm 0,05$ ; C0C2:  $0,9 \pm 0,1$ ; B: Arg-1: Kontrolle:  $1,00 \pm 0,05$ ; C0:  $1,0 \pm 0,1$ ; C0-L:  $0,9 \pm 0,2$ ; C0C1:  $0,8 \pm 0,1$ ; C0C1f:  $0,9 \pm 0,1$ ; C0C2:  $0,8 \pm 0,1$ ; LPS:  $1,0 \pm 0,1$ ; (Kontrolle:  $n = 12$ ; C0:  $n = 4$ , C0-L, C0C2:  $n = 11$ ; C0C1:  $n = 18$ ; C0C1f:  $n = 21$ ; LPS:  $n = 6$ )

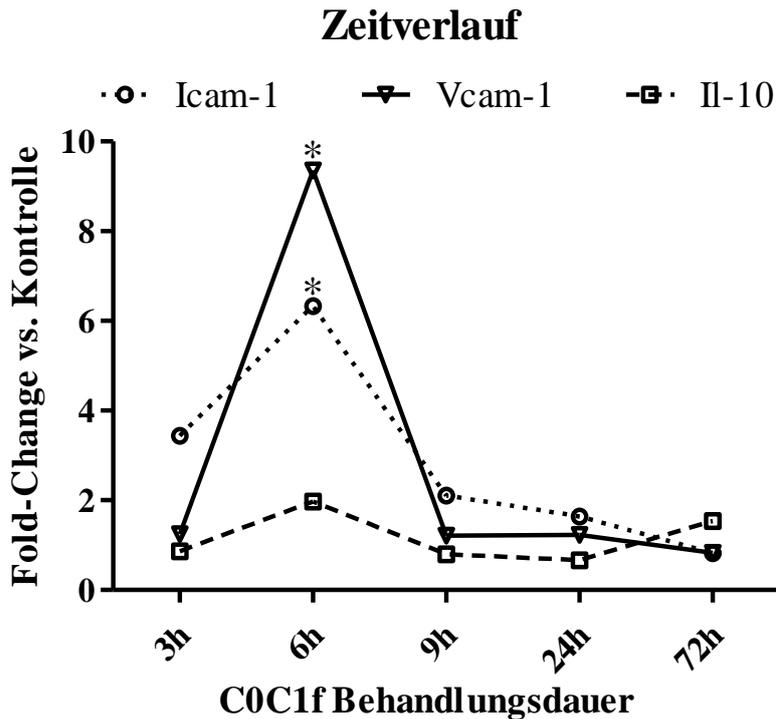
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass lediglich das C0C1f-Fragment als potenter proinflammatorischer Aktivator von BMDM fungiert. Die weiteren Versuche fokussierten sich daher auf das C0C1f-Fragment. C0-L wurde als Kontrollsubstanz verwendet, repräsentativ für alle übrigen cMyBP-C-Fragmente.

Als nächstes sollte die Frage nach einer Abhängigkeit der Makrophagenreaktion von der Behandlungsdauer mit C0C1f untersucht werden. Die Zellen wurden mit dem Fragment in einer Konzentration von 500 ng/ml behandelt und nach einer Dauer von 3 h, 6 h, 9 h, 24 h und 72 h wurde die Transkription der bereits zuvor untersuchten Gene mittels qPCR bestimmt. Da sich bei den vorherigen Versuchen keine relevante Veränderung bei Tgf- $\beta$  zeigte, wurde keine erneute Untersuchung durchgeführt. Bereits nach 3 h Behandlungsdauer stieg die Transkription der proinflammatorischen Gene, Il-1 $\beta$  und Il-6 gegenüber dem Kontrollniveau an. Es zeigte sich dann, dass nach 6 h Behandlungsdauer bei Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$  und Il-6 (Abb. 21) sowie den Genen für Adhäsionsmoleküle Icam-1 und Vcam-1 (Abb. 22) die höchste Transkription des Untersuchungszeitraums erreicht wurde. Nach 9 h konnte wieder eine Reduktion der Transkription gemessen werden. Nur die Transkription von Il-1 $\beta$  und Il-6 zeigte sich über diesen Zeitraum hinaus gesteigert, wobei die Transkription von Il-1 $\beta$  nach 24 h erneut anstieg (Abb. 21). Nach 72 h war lediglich noch die Transkription von Il-6 gesteigert zu messen. Die Transkription des antiinflammatorischen Zytokins Il-10 ließ sich nur nach 6 h gering gesteigert messen (Abb. 22).



**Abbildung 21:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Il-6) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f für den genannten Zeitraum. Anstieg der Transkription aller gemessenen Zielgene, mit dem Maximum zum 6 h Zeitpunkt. Absinken auf das Kontrollniveau spätestens nach 24 h. Ausnahmen stellen hier Il-1 $\beta$  und Il-6 dar, die zu diesem Zeitpunkt weiterhin gesteigert sind. Die Il-6 Transkription bleibt auch zum 72 h Zeitpunkt weiter gesteigert. Symbole entsprechen dem Mittelwert des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. Tnf- $\alpha$  (Kreis, gepunktete Linie): 3h: 3,9 ± 0,6; 6h: 9,2 ± 2,0; 9h: 2,8 ± 0,4; 24h: 1,5 ± 0,3; 72h: 0,9 ± 0,1; Il-1 $\beta$  (Dreieck, durchgezogene Linie): 3h: 8,0 ± 1,7; 6h: 91,5 ± 29,9; 9h: 4,0 ± 0,5; 24h: 6,9 ± 2,0; 72h: 3,1 ± 0,2; Il-6 (Rechteck, gestrichelte Linie): 3h: 1,7 ± 0,8; 6h: 303,5 ± 90,2; 9h: 43,6 ± 8,8; 24h: 32,1 ± 9,7; 72h: 12,4 ± 6,6; (3h, 9h, 72h: n = 6; 6h, 24h: n = 18)



**Abbildung 22:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Adhäsionsmoleküle (Icam-1, Vcam-1) und des antiinflammatorischen Zytokin (Il-10) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

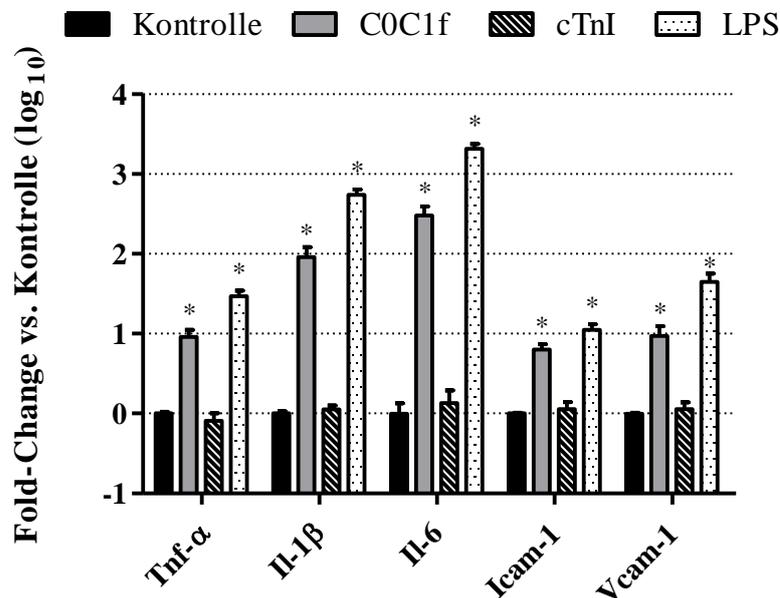
Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f für den genannten Zeitraum. Anstieg der Transkription aller gemessenen Zielgene, mit dem Maximum zum 6 h Zeitpunkt. Absinken der Transkription auf das Kontrollniveau spätestens nach 24 h. Symbole entsprechen dem Mittelwert des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus.

Icam-1 (leerer Kreis, gepunktete Linie): 3h:  $3,4 \pm 0,3$ ; 6h:  $6,3 \pm 1,0$ ; 9h:  $2,1 \pm 0,2$ ; 24h:  $1,6 \pm 0,2$ ; 72h:  $0,8 \pm 0,1$ ; Vcam-1 (leeres Dreieck, durchgezogene Linie): 3h:  $1,2 \pm 0,05$ ; 6h:  $9,35 \pm 3,0$ ; 9h:  $1,2 \pm 0,1$ ; 24h:  $1,2 \pm 0,2$ ; 72h:  $0,8 \pm 0,1$ ; Il-10 (leeres Rechteck, gestrichelte Linie): 3h:  $0,9 \pm 0,2$ ; 6h:  $2,0 \pm 0,3$ ; 9h:  $0,8 \pm 0,1$ ; 24h:  $0,7 \pm 0,05$ ; 72h:  $1,5 \pm 0,1$ ; (3h, 9h, 72h: n = 6; 6h, 24h: n = 18)

### 4.3 Transkriptionsanalyse von murinen BMDM nach Behandlung kardialen Troponin-I

Nachfolgend wurde der etablierte Myokardinfarktbiomarker cTnI und das C0C1f-Fragment verglichen. Hierbei sollte untersucht werden, ob 500 ng/ml cTnI ähnliche, aktivierende Wirkung auf Monozyten aufweist wie 500 ng/ml C0C1f. Es kam nach 6 h Behandlungszeit zu einer Steigerung der Transkription der bereits zuvor untersuchten Gene Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Il-6, Icam-1 und Vcam-1 durch Behandlung mit C0C1f. Die Zellen, die mit cTnI behandelt wurden, zeigten hingegen keine Änderung der Transkription der untersuchten

Gene (Abb. 23). Als positive Kontrolle wurde eine Behandlung mit 100 ng/ml LPS durchgeführt, die ebenfalls eine Steigerung der Transkription der untersuchten Gene hervorrief.



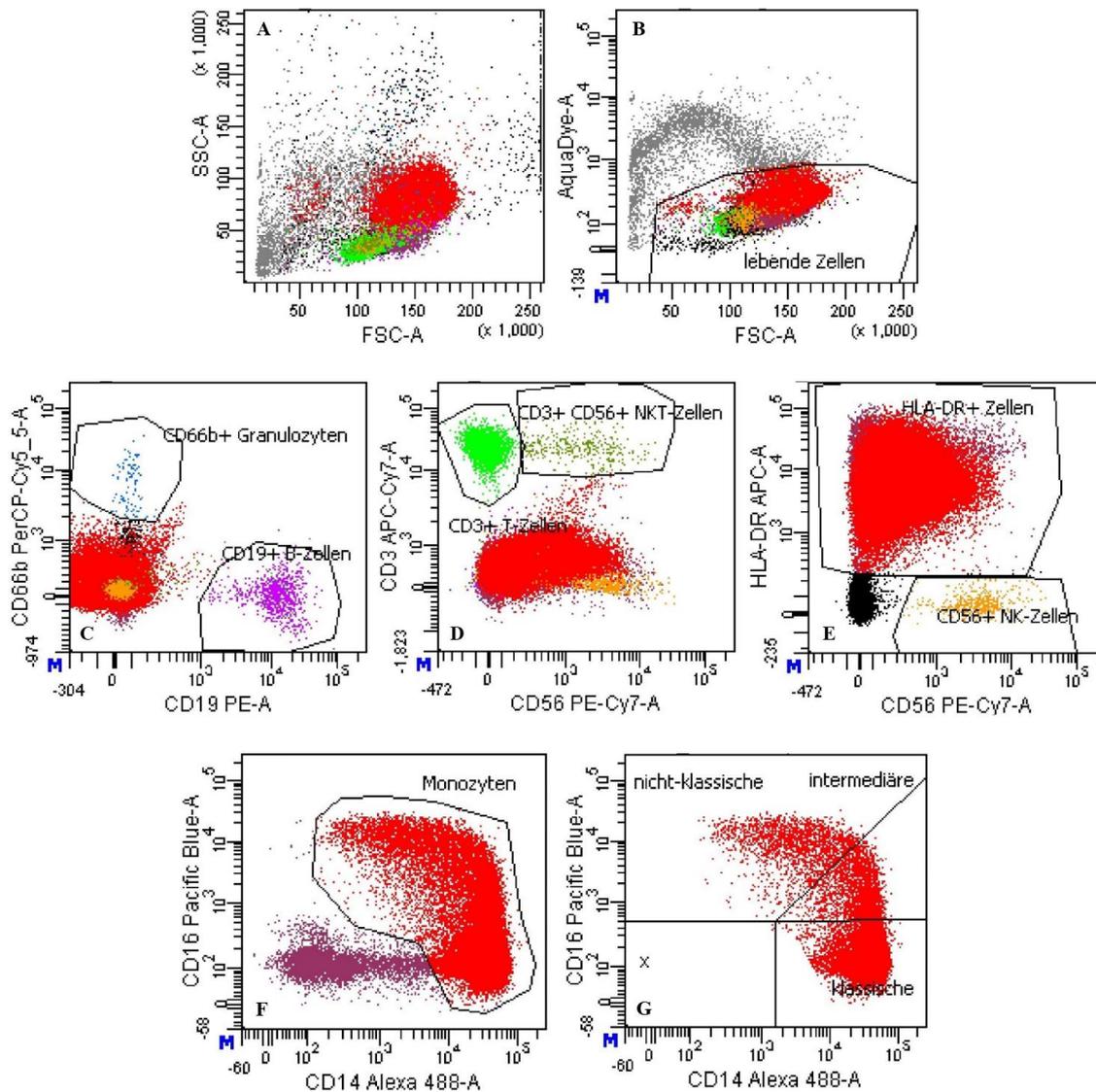
**Abbildung 23:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (Tnf-α, Il-1β, Il-6) und Adhäsionsmoleküle (Icam-1, Vcam-1) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit PBS (Kontrolle), 500 ng/ml COC1f, 500 ng/ml cTnI und 100 ng/ml LPS für 6 h. Es zeigt sich eine deutliche Steigerung der Transkription durch Behandlung mit COC1f und LPS. Die Behandlung mit cTnI bewirkt hingegen keine Änderung der Transkription der gemessenen Zielgene. *Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus.* Kontrolle (schwarz): Tnf-α:  $1,0 \pm 0,05$ ; Il-1β:  $1,0 \pm 0,06$ ; Il-6:  $1,0 \pm 0,3$ ; Icam-1:  $1,0 \pm 0,3$ ; Vcam-1:  $1,0 \pm 0,3$ ; COC1f (grau): Tnf-α:  $9,2 \pm 2,0$ ; Il-1β:  $91,5 \pm 29,9$ ; Il-6:  $303,5 \pm 90,2$ ; Icam-1:  $6,3 \pm 1,0$ ; Vcam-1:  $9,4 \pm 3,1$ ; cTNI (schwarz, weiß schraffiert): Tnf-α:  $0,8 \pm 0,2$ ; Il-1β:  $1,1 \pm 0,1$ ; Il-6:  $1,4 \pm 0,6$ ; Icam-1:  $1,1 \pm 0,2$ ; Vcam-1:  $1,1 \pm 0,2$ ; LPS (weiß, schwarz gepunktet): Tnf-α:  $29,4 \pm 5,1$ ; Il-1β:  $549,2 \pm 91,8$ ; Il-6:  $2065,2 \pm 327,5$ ; Icam-1:  $11,2 \pm 2,0$ ; Vcam-1:  $44,6 \pm 12,0$ ; (Kontrolle: n = 12, COC1f: n = 18; cTnI: n = 13; LPS: n = 6)

#### 4.4 Qualität der isolierten humanen Monozyten

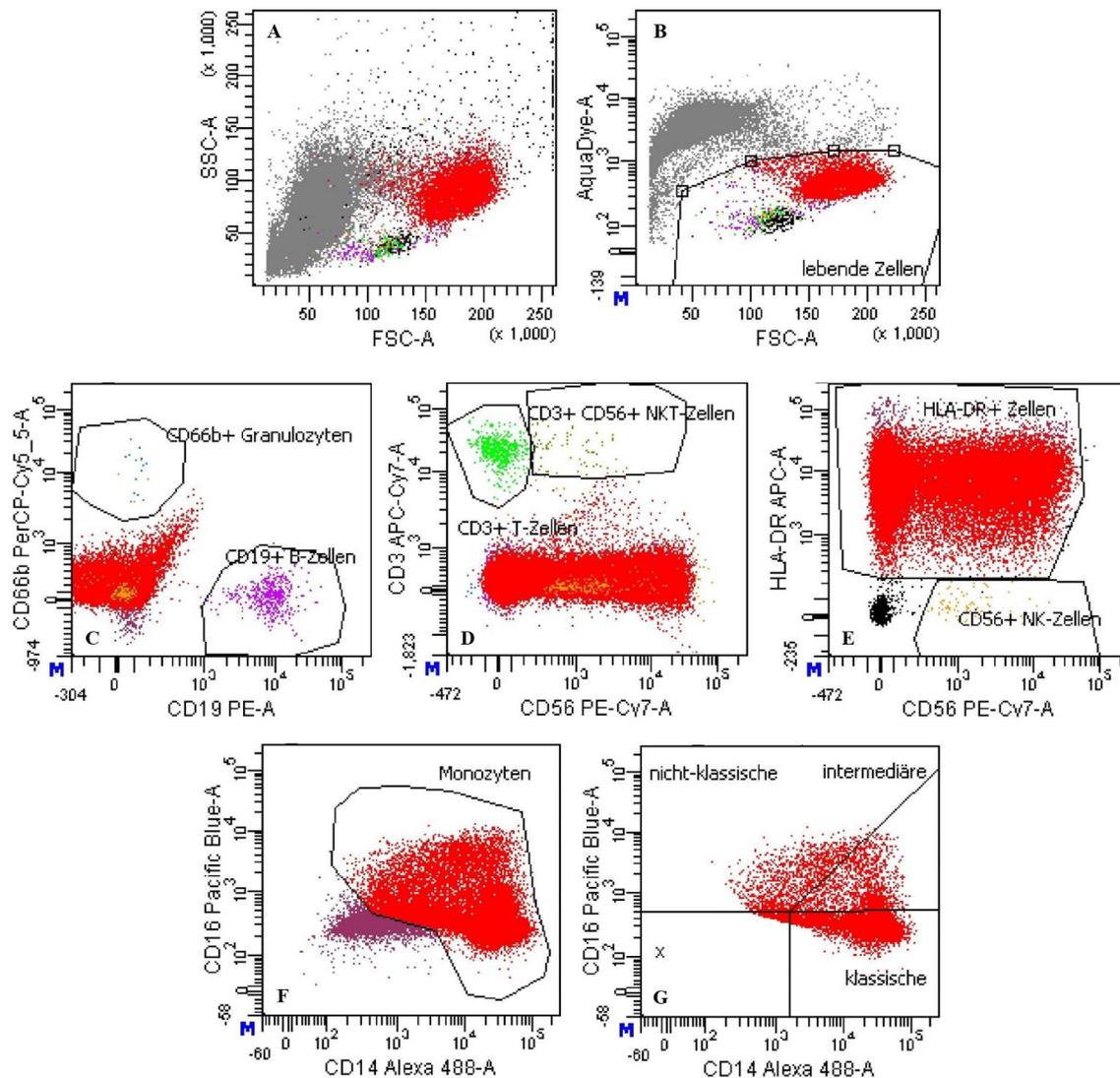
Da wir nicht von einem absoluten Erfolg der Zellisolation ausgehen konnten, wurde sofort nach der Isolation (Tag 0) und nach Inkubation über Nacht, vor Behandlung mit den unterschiedlichen Substanzen (Tag 1), die Qualität der Monozytenisolation analysiert. Nach Kompensation der Signale und entsprechender Einstellung des Gerätes, können an Tag 0 unter den vitalen Zellen (94,1 %, Abb. 24 B) insgesamt sechs unterschiedliche

Zellpopulationen identifiziert werden. Es wurden zunächst CD66b<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup> Zellen als Granulozyten (0,1 %, Abb. 24 C), CD66b<sup>-</sup>/CD19<sup>+</sup> Zellen als B-Lymphozyten (0,9 %, Abb. 24 C), CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup> Zellen als T-Lymphozyten (3,7 %, Abb. 24 D) und CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup> Zellen als NK-Zellen (0,9 %, Abb. 24 D und E) definiert. Zusammenfassend lag der Anteil der genannten, nicht-monozytären Zellen an allen lebenden Zellen bei 2,4 - 9,7 %. Die übrigen Zellen wurden als CD66b<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> charakterisiert und können so als Monozyten definiert werden (Abb. 24 F). Es zeigten sich in den untersuchten Proben auch Zellen die als CD66b<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>low</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> charakterisiert werden können und den Monozyten zugeteilt wurden (Abb. 24 E). Im Weiteren konnte in CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> (klassische Monozyten), CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> (intermediäre Monozyten) und CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup> (nicht klassische Monozyten) unterschieden werden (Abb. 24 G). In allen für die Zellkultur verwendeten Isolaten lag der Monozytenanteil an den lebenden Zellen bei 78 - 83 %, an den HLA-DR<sup>+</sup> Zellen bei 88 - 94 %. An Tag 1 zeigte sich, nach abschaben der adhärennten Zellen primär eine deutlich eingeschränkte Vitalität (26,1 %) sowie große Mengen an Zelltrümmern im Probenmaterial (Abb. 25 B). Es konnten dennoch, nach dem oben beschriebenen Vorgehen, in geringer Zahl Granulozyten (0,1 %), B- und T-Lymphozyten (1,4 % und 0,8 %), NK-Zellen (0,4 %) (Abb. 25 C - E) nachgewiesen werden. Zusammenfassend lag der Anteil der genannten, nicht-monozytären Zellen an allen lebenden Zellen bei 2,6 - 5,7 %. Der größte Anteil der Zellen, durchschnittlich 73,9 % aller lebenden Zellen, konnte als Monozyten identifiziert werden (Abb. 25 F). Im Vergleich zu Tag 0 stellten die als CD66b<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> charakterisierten Monozyten einen geringeren Anteil der HLA-DR<sup>+</sup> Zellen (durchschnittlich 58,3 %) dar. Bei einem großen Teil der HLA-DR<sup>+</sup> Zellen (durchschnittlich 41,7 %, Abb. 25 F) konnten nach Inkubation und Abschaben eine Reduktion der Menge der Oberflächenproteine CD14 und CD16 gemessen werden.



**Abbildung 24 A bis G:** Repräsentative Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Monozytenisolate an Tag 0, dargestellt als *dot plots*.

Das *Gating* erfolgt in jeder Zeile von links nach rechts anhand der an den Achsen aufgeführten Parameter bzw. Oberflächenproteine. Anteil der Zellsorten in Prozent in Bezug auf alle lebenden Zellen. A: Darstellung aller aufgezeichneten Messereignisse mittels FSC/SSC. B: Darstellung aller lebenden Zellen mittels FSC/Aqua Dye. C: Ausschluss der CD66b<sup>+</sup> Granulozyten (0,1 %) und CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten (0,9 %) aus allen lebenden Zellen. D: Ausschluss der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten (3,7 %) und CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (0,4 %) aus den CD66b<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup> Zellen. E: Ausschluss der HLA-DR<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (0,5 %) aus den CD66b<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> Zellen. Einschluss aller HLA-DR<sup>+</sup> Zellen (87,8 %). F: Darstellung aller HLA-DR<sup>+</sup> Zellen mittels CD14/CD16, Ausschluss aller CD14<sup>-</sup>/CD16<sup>-</sup> Zellen G: Darstellung der isolierten Monozyten (82,7 %) mit Subpopulationen.

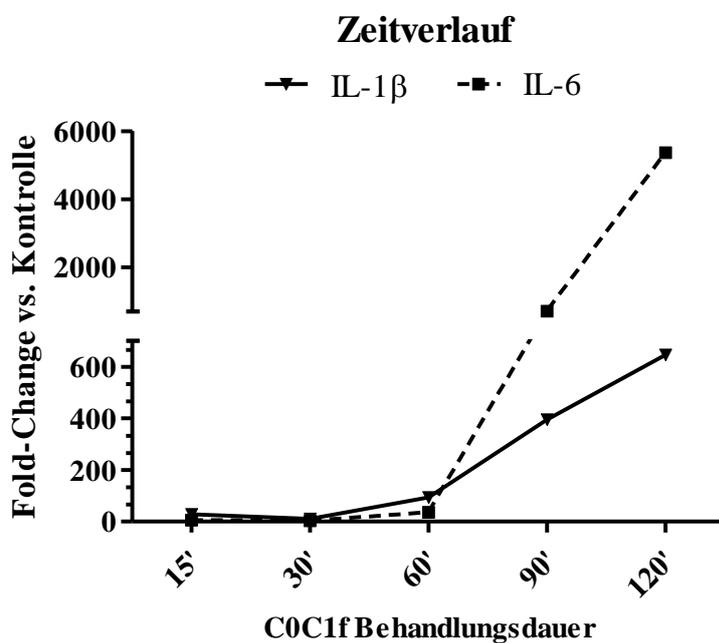


**Abbildung 25 A bis G:** Repräsentative Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Monozytenisolate an Tag 1, dargestellt als *dot plots*.

Das *Gating* erfolgt in jeder Zeile von links nach rechts anhand der an den Achsen aufgeführten Parameter bzw. Oberflächenproteine. Anteil der Zellsorten in Prozent in Bezug auf alle lebenden Zellen. A: Darstellung aller aufgezeichneten Messereignisse mittels FSC/SSC. B: Darstellung aller lebenden Zellen mittels FSC/Aqua Dye. C: Ausschluss der CD66b<sup>+</sup> Granulozyten (0,1 %) und CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten (1,4 %) aus allen lebenden Zellen. D: Ausschluss der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten (0,8 %) und CD3<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (0,1 %) aus den CD66b<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup> Zellen. E: Ausschluss der HLA-DR<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (0,3 %) aus den CD66b<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD3<sup>-</sup> Zellen. Einschluss aller HLA-DR<sup>+</sup> Zellen (95,5 %). F: Darstellung aller HLA-DR<sup>+</sup> Zellen mittels CD14/CD16, Ausschluss aller CD14<sup>-</sup>/CD16<sup>-</sup> Zellen G: Darstellung der isolierten Monozyten (84,3 %) mit Subpopulationen.

## 4.5 Abhängigkeit der Reaktion humaner Monozyten auf C0C1f von der verwendeten Dosis und Behandlungsdauer

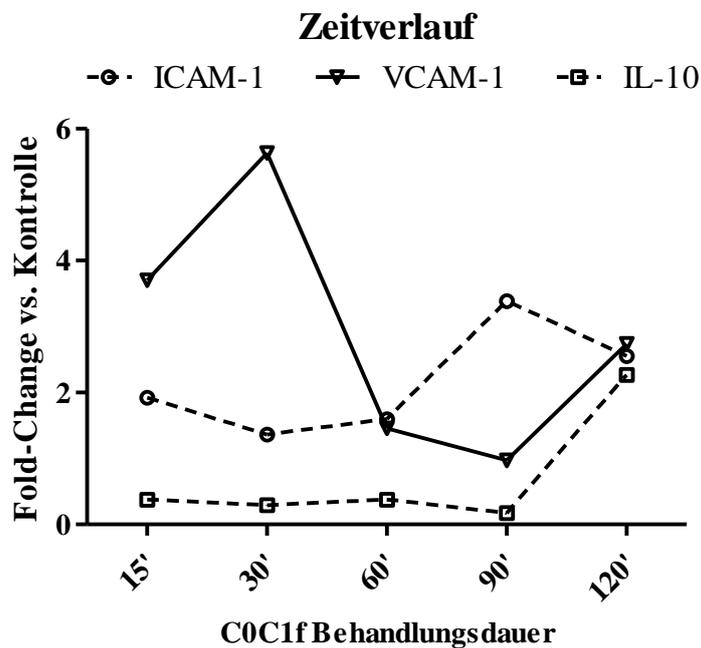
Da sich bei den zuvor durchgeführten Versuchen mit murinen BMDM bei IL-1 $\beta$  und IL-6 bereits nach 3 h eine deutlich gesteigerte Transkription nachweisen ließ, schlossen wir vor der Durchführung der Hauptversuchsreihe mit humanem Probenmaterial eine kleine Versuchsreihe mit kürzeren Behandlungsdauern an. Hierbei wurden die Zellen für lediglich 15 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min mit 500 ng/ml C0C1f behandelt. Die Transkriptionsanalyse erfolgte analog zu den obigen Versuchen mittels qPCR.



**Abbildung 26:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f für den genannten Zeitraum. Anstieg der Transkription von IL-1 $\beta$  und IL-6 zum 120 min Zeitpunkt hin. Symbole entsprechen dem Mittelwert des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. IL-1 $\beta$  (Dreieck, durchgezogene Linie): 15': 28,2 ± 21,4; 30': 10,6 ± 2,7; 60': 93,9 ± 83,6; 90': 395,5 ± 197,2; 120': 646,7 ± 151,8; 4h: 1506,2 ± 543,4 IL-6 (Rechteck, gestrichelte Linie): 15': 5,2 ± 5,0; 30': 3,7 ± 0,9; 60': 36,5 ± 29,7; 90': 716 ± 623,8; 120': 5362 ± 883,9; 4h: 33157,7 ± 28358,2; (15' – 120': n = 2)

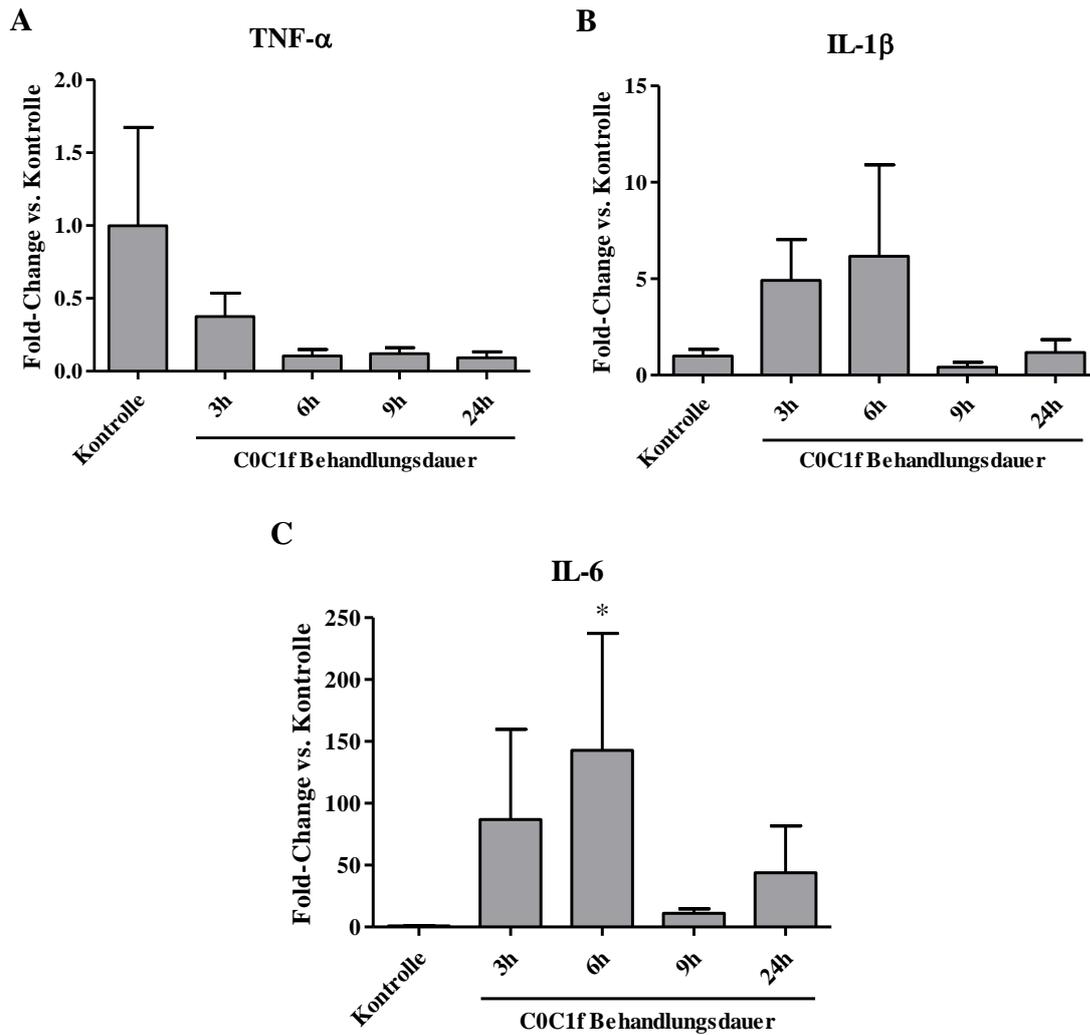
Es zeigte sich bei IL-1 $\beta$  und IL-6 bereits nach 60 min eine Steigerung der Transkription, die bis zum 120 min Zeitpunkt weiter anstieg (Abb. 26), passend zu den nach 3 h erhobenen Ergebnissen. Bei ICAM-1, VCAM-1 und IL-10 zeigten sich weniger eindeutige Ergebnisse. ICAM-1 und IL-10 zeigten nach 90 min beziehungsweise 120 min einen geringen Anstieg der Transkription, die dann wieder auf Kontrollniveau sank. Bei VCAM-1 konnte bereits nach 15 und 30 min eine gesteigerte Transkription gemessen werden, die zum 60 min Zeitpunkt wieder sank, zum 120 min Zeitpunkt hin jedoch erneut anstieg (Abb. 27).



**Abbildung 27:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) und des antiinflammatorischen Zytokins (IL-10) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

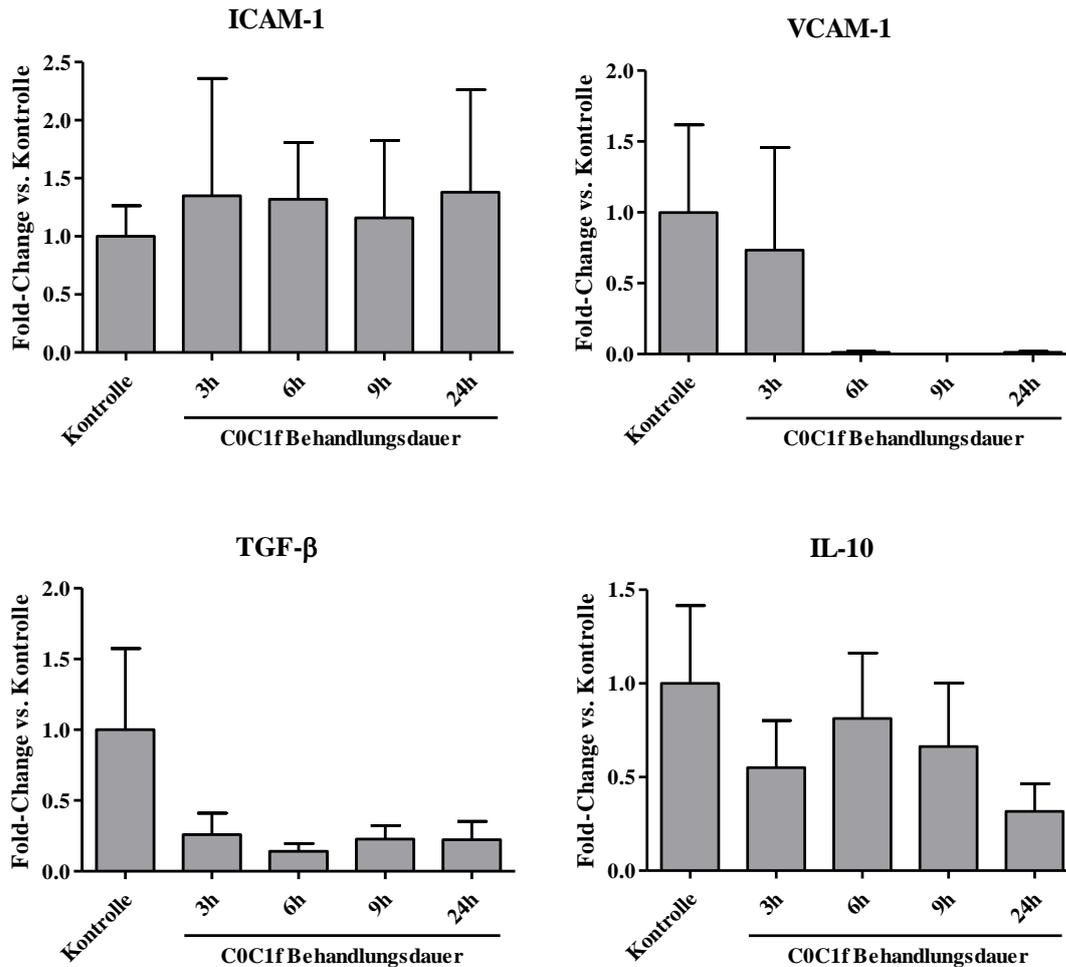
Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f für den genannten Zeitraum. Geringe Veränderung der Transkription bei allen Zielgenen mit nicht sicher festzustellender Tendenz. *Symbole entsprechen dem Mittelwert des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus.* ICAM-1 (leerer Kreis, gepunktete Linie): 15': 1,9  $\pm$  1,0; 30': 1,4  $\pm$  0,02; 60': 1,6  $\pm$  0,5; 90': 3,4  $\pm$  1,3; 120': 2,55  $\pm$  0,06; 4h 2,3  $\pm$  0,8; VCAM-1 (leeres Dreieck, durchgezogene Linie): 15': 3,7  $\pm$  1,5; 30': 5,6  $\pm$  0,9; 60': 1,5  $\pm$  0,7; 90': 1,0  $\pm$  0,4; 120': 2,7  $\pm$  0,4; 4h: 4,7  $\pm$  0,1; IL-10 (leeres Rechteck, gestrichelte Linie): 15': 0,4  $\pm$  0,1; 30': 0,3  $\pm$  0,02; 60': 0,4  $\pm$  0,1; 90': 0,2  $\pm$  0,03; 120': 2,3  $\pm$  2,0; 0,6  $\pm$  0,3 (15' – 120': n = 2)

Es erfolgte ebenso eine Versuchsreihe, bei der die verwendete C0C1f-Konzentration von 500 ng/ml auf 50 ng/ml reduziert wurde. Hierbei zeigte sich, dass trotz einer Reduktion der C0C1f-Konzentration bei IL-6 und IL-1 $\beta$  ein Anstieg der Transkription gemessen werden konnte, beginnend jeweils zum 3 h Zeitpunkt (Abb. 28 B und C). Insbesondere bei IL-6 zeigte sich bereits nach 3 h eine deutliche Steigerung der Transkription, die nach 6 h weiter zunahm und hier statistisch signifikant ist ( $43,8 \pm 38,0$ -fach,  $p=0,0106$ , Abb. 28 C). Bei IL-1 $\beta$  zeigten sich die Veränderungen der Transkription weniger stark ausgeprägt, aber mit gleicher Tendenz (Abb. 28 B). Bei den übrigen Zielgenen, TNF- $\alpha$  (Abb. 28 A), ICAM-1, VCAM-1, TGF- $\beta$  und IL-10 (Abb. 29) zeigt sich keine Änderung der Transkription im Vergleich zum Kontrollniveau.



**Abbildung 28 A bis C:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit PBS für 6 h (Kontrolle) und 50 ng/ml C0C1f für den genannten Zeitraum. Anstieg der Transkription von IL-1 $\beta$  und IL-6 bereits nach 3 h. Bei den übrigen Zielgenen zeigt sich kein Anstieg der Transkription. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. TNF- $\alpha$ : Kontrolle:  $1,0 \pm 0,7$ ; 3h:  $0,38 \pm 0,16$ ; 6h:  $0,11 \pm 0,04$ ; 9h:  $0,12 \pm 0,04$ ; 24h:  $0,09 \pm 0,04$ ; IL-1 $\beta$ : Kontrolle:  $1,0 \pm 0,3$ ; 3h:  $4,9 \pm 2,1$ ; 6h:  $6,2 \pm 4,7$ ; 9h:  $0,4 \pm 0,2$ ; 24h:  $1,2 \pm 0,7$ ; IL-6: Kontrolle:  $1,0 \pm 0,4$ ; 3h:  $86,9 \pm 73,0$ ; 6h:  $142,9 \pm 94,5$ ; 9h:  $11,2 \pm 3,6$ ; 24h:  $43,8 \pm 38,0$ ; (Kontrolle:  $n = 10$ ; 3h – 24h:  $n = 3$ )



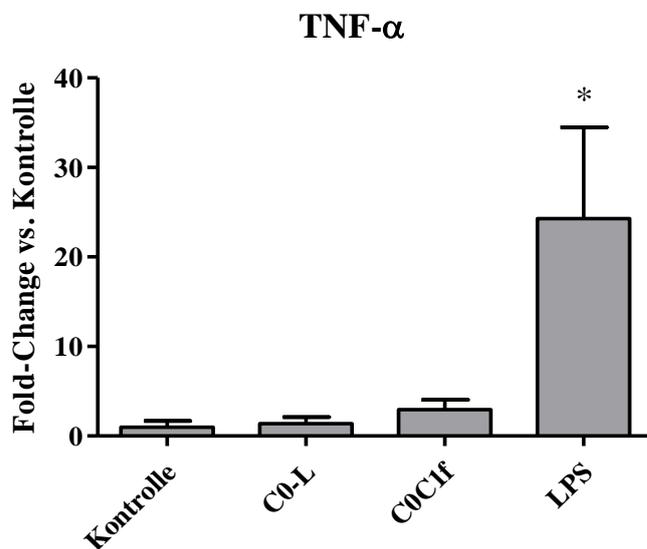
**Abbildung 29:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) und der profibrotischen beziehungsweise antiinflammatorischen Zytokine (TGF-β, IL-10) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit PBS für 6 h (Kontrolle) und 50 ng/ml C0C1f für den genannten Zeitraum. Bei den untersuchten Zielgenen zeigt sich kein relevanter Anstieg der Transkription nach Behandlung mit C0C1f. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. ICAM-1: Kontrolle:  $1,0 \pm 0,3$ ; 3h:  $1,3 \pm 1,0$ ; 6h:  $1,3 \pm 0,5$ ; 9h:  $1,2 \pm 0,7$ ; 24h:  $1,4 \pm 0,9$ ; VCAM-1: Kontrolle:  $1,0 \pm 0,62$ ; 3h:  $0,73 \pm 0,72$ ; 6h:  $0,01 \pm 0,01$ ; 9h: 0; 24h:  $0,01 \pm 0,01$ ; TGF-β: Kontrolle:  $1,0 \pm 0,6$ ; 3h:  $0,3 \pm 0,2$ ; 6h:  $0,1 \pm 0,1$ ; 9h:  $0,2 \pm 0,1$ ; 24h:  $0,2 \pm 0,1$ ; IL-10: Kontrolle:  $1,0 \pm 0,4$ ; 3h:  $0,6 \pm 0,3$ ; 6h:  $0,8 \pm 0,3$ ; 9h:  $0,7 \pm 0,3$ ; 24h:  $0,3 \pm 0,1$ . (Kontrolle:  $n = 10$ ; 3h – 24h:  $n = 3$ )

#### 4.6 Transkriptions- und Expressionsanalyse von humanen Monozyten nach Behandlung mit cMyBP-C-Fragmenten

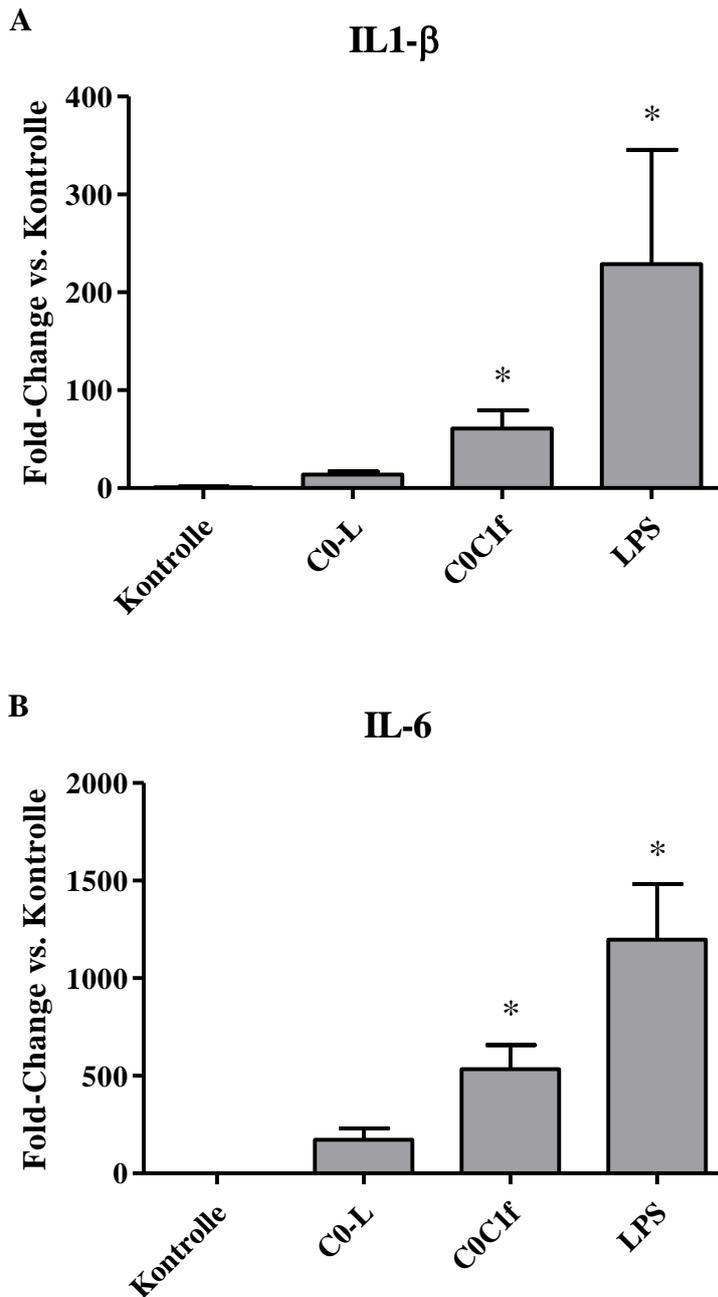
Die zuvor mit murinen BMDM gewonnenen Ergebnisse sollten nun in einem humanen *in vitro*-Modell reproduziert werden. Hierfür erfolgt die Isolation von humanen Monozyten

aus *buffy coats*. Wie bereits erwähnt, zeigten die BMDMs nach Behandlung mit C0C1f die stärkste proinflammatorische Reaktion, sodass die Versuche lediglich mit C0C1f und C0-L durchgeführt wurden. Es erfolgte dann die Ermittlung des mRNA-Gehalts der Zellen für die entsprechenden Zielgene mittels qPCR. Es zeigte sich nach Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f und 100 ng/ml LPS für 6 h, wie in den vorangegangenen Versuchen mit BMDM, eine gesteigerte Transkription der proinflammatorischen Gene TNF- $\alpha$  ( $2,9 \pm 1,1$ -fach; Abb. 30), IL-1 $\beta$  ( $60,9 \pm 18,5$ -fach,  $p=0,0001$ ; Abb. 31 A) und IL-6 ( $533,5 \pm 123,7$ -fach,  $p=0,0001$ ; Abb. 31 B) Bei TNF- $\alpha$  zeigte sich zu diesem Zeitpunkt jedoch nur ein geringer, statistisch nicht signifikanter Effekt. Bei Behandlung mit C0-L konnte keine signifikant verstärkte Transkription der oben genannten Gene gemessen werden.



**Abbildung 30:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$ , anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

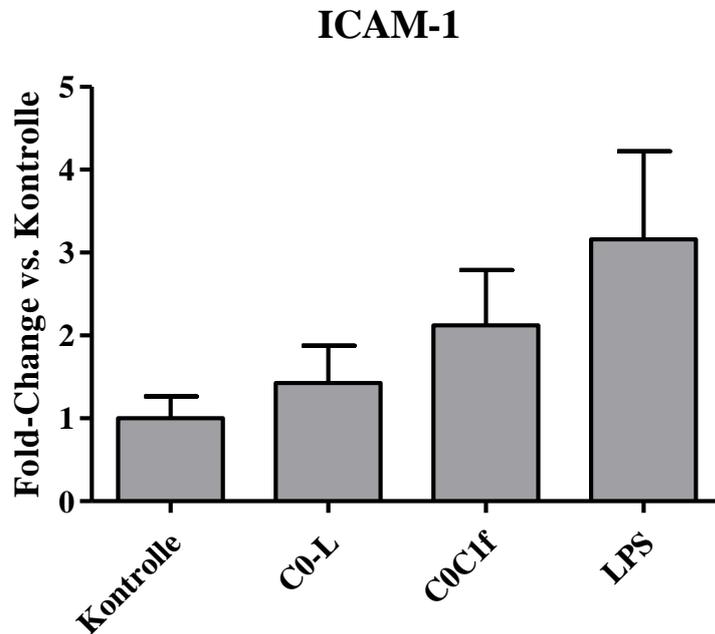
Behandlung mit PBS (Kontrolle), 500 ng/ml C0-L und C0C1f sowie 100 ng/ml LPS für 6 h. Es zeigt sich eine geringe Steigerung der Transkription bei Behandlung mit C0C1f. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. TNF- $\alpha$ : Kontrolle:  $1,0 \pm 0,7$ ; C0-L:  $1,4 \pm 0,8$ ; C0C1f:  $2,9 \pm 1,1$ ; LPS:  $24,3 \pm 10,2$ ; (Kontrolle:  $n = 10$ ; C0-L:  $n = 9$ ; C0C1f:  $n = 11$ ; LPS:  $n = 6$ )



**Abbildung 31 A und B:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der proinflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

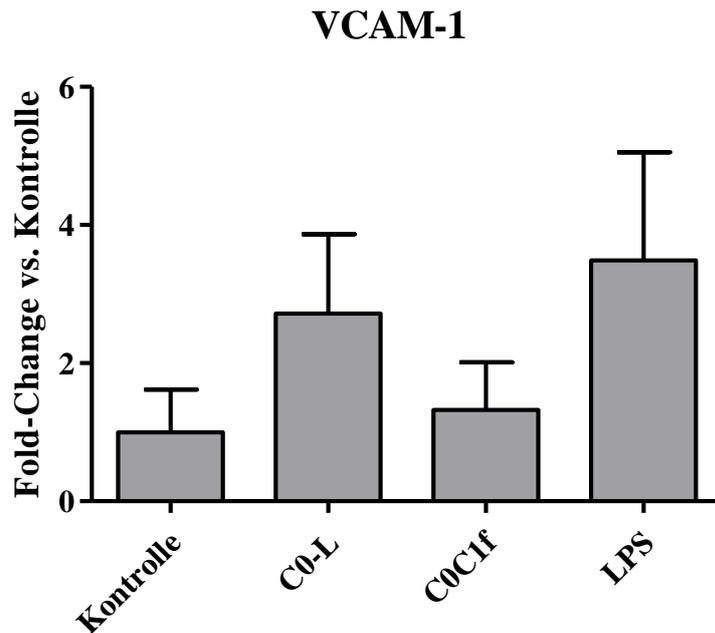
Behandlung mit PBS (Kontrolle), 500 ng/ml C0-L und C0C1f sowie 100 ng/ml LPS für 6 h. Es zeigt sich bei IL-1 $\beta$  und IL-6 eine deutliche Steigerung der Transkription durch Behandlung mit C0C1f und LPS. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. IL-1 $\beta$ : Kontrolle: 1,0 ± 0,3; C0-L: 13,8 ± 3,0; C0C1f: 60,9 ± 18,5; LPS: 228,8 ± 116,6; IL-6: Kontrolle: 1,0 ± 0,4; C0-L: 171,9 ± 58,8; C0C1f: 533,5 ± 123,7; LPS: 1198,2 ± 283,6; (Kontrolle: n = 12; C0-L: n = 10; C0C1f: n = 10; LPS: n = 6)

Bei der Untersuchung der Transkription der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (Abb. 32) und VCAM-1 (Abb. 33) zeigte sich weder nach der Behandlung mit C0-L, C0C1f noch LPS eine signifikante Änderung gegenüber des Kontrollniveaus.



**Abbildung 32:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

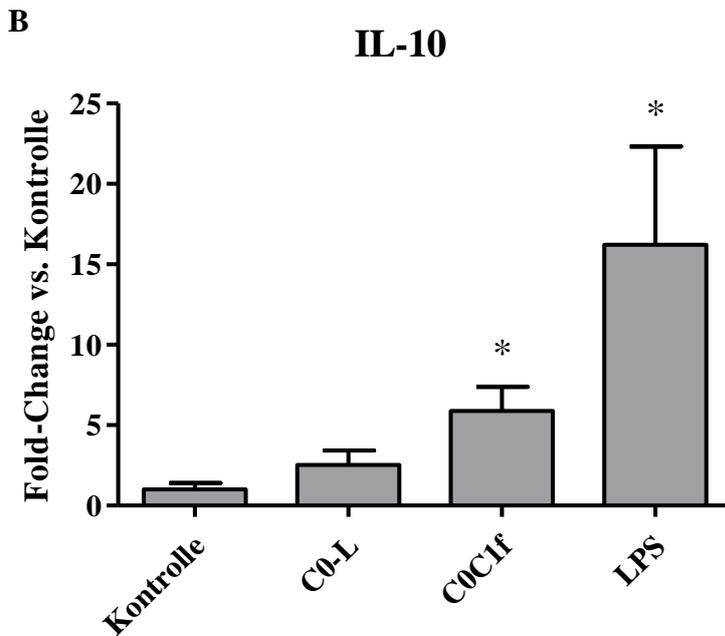
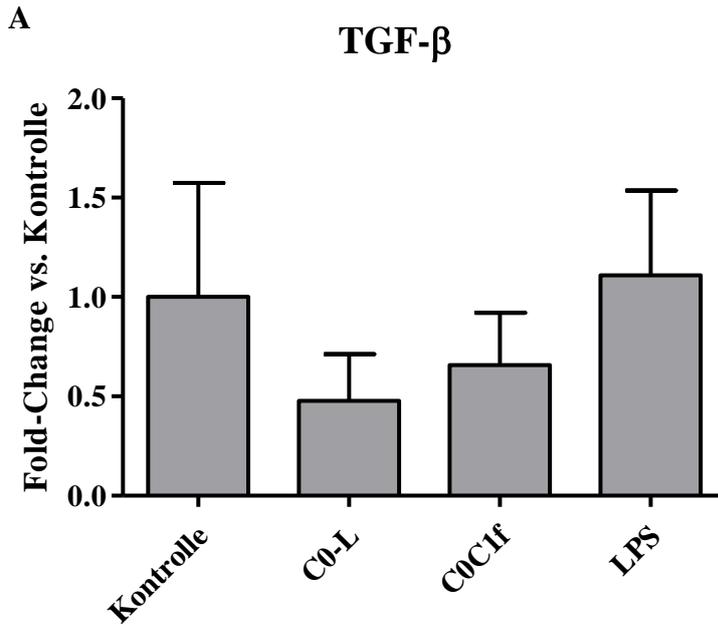
Behandlung PBS (Kontrolle), 500 ng/ml C0-L und C0C1f sowie 100 ng/ml LPS für 6 h. Es zeigt sich Veränderung der Transkription nach Behandlung mit den genannten Substanzen. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. ICAM-1: Kontrolle:  $1,0 \pm 0,3$ ; C0-L:  $1,4 \pm 0,4$ ; C0C1f:  $2,1 \pm 0,7$ ; LPS:  $3,2 \pm 1,1$ ; (Kontrolle:  $n = 12$ ; C0-L:  $n = 9$ ; C0C1f:  $n = 10$ ; LPS:  $n = 6$ )



**Abbildung 33:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

Behandlung mit PBS (Kontrolle), 500 ng/ml C0-L und C0C1f sowie 100 ng/ml LPS für 6 h. Es zeigt sich keine statistisch signifikante Veränderung der Transkription nach Behandlung mit den genannten Substanzen. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. VCAM-1: Kontrolle:  $1,0 \pm 0,6$ ; C0-L:  $2,7 \pm 1,2$ ; C0C1f:  $1,3 \pm 0,7$ ; LPS  $3,5 \pm 1,6$ ; (Kontrolle:  $n = 12$ ; C0-L:  $n = 9$ ; C0C1f:  $n = 10$ ; LPS:  $n = 6$ )

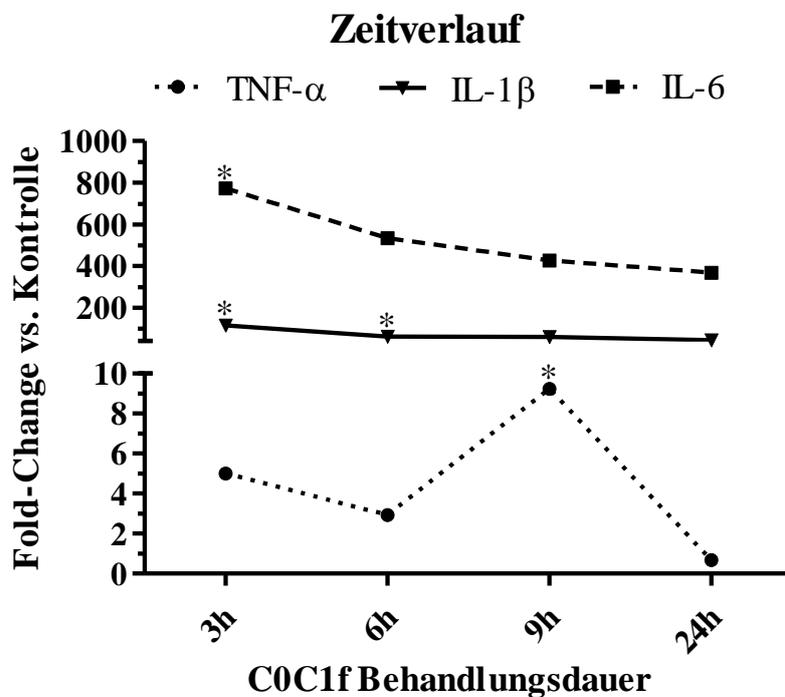
Bezüglich der profibrotischen beziehungsweise antiinflammatorischen Gene zeigte sich keine Veränderung der Transkription bei TGF- $\beta$  (Abb. 34 A), jedoch eine signifikante Steigerung der Transkription von IL-10 (Abb. 34 B) in Folge der Behandlung mit C0C1f ( $5,9 \pm 1,5$ -fach,  $p=0,001$ ) und LPS. Die Behandlung mit C0-L bewirkte für beide Gene wiederum keinen vergleichbaren Effekt.



**Abbildung 34 A und B:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der profibrotischen beziehungsweise anti-inflammatorischen Zytokine (TGF- $\beta$ , IL-10) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

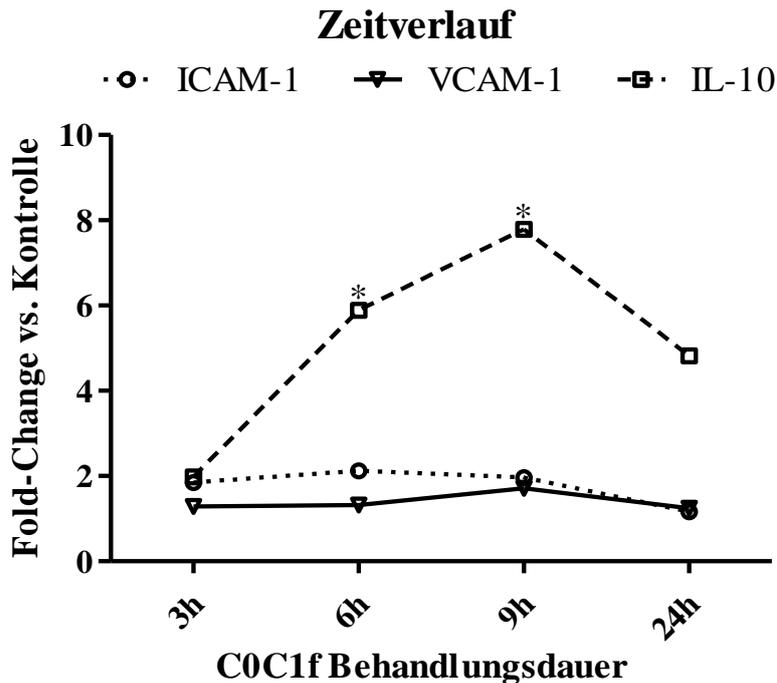
Behandlung mit PBS (Kontrolle), 500 ng/ml C0-L und C0C1f sowie 100 ng/ml LPS für 6 h. Bei TGF- $\beta$  konnte keine Veränderung der Transkription durch Behandlung mit den genannten Substanzen gemessen werden. Bei IL-10 zeigt sich eine Steigerung der Transkription durch Behandlung mit C0C1f und LPS. Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. TGF- $\beta$ : Kontrolle:  $1,0 \pm 0,6$ ; C0-L:  $0,5 \pm 0,2$ ; C0C1f:  $0,7 \pm 0,3$ ; LPS  $1,1 \pm 0,4$ ; (TGF- $\beta$ : Kontrolle: n = 12; C0-L: n = 7; C0C1f: n = 9; LPS: n = 5). IL-10: Kontrolle:  $1,0 \pm 0,4$ ; C0-L:  $2,5 \pm 0,9$ ; C0C1f:  $5,9 \pm 1,5$ ; LPS:  $16,2 \pm 6,1$ ; (Kontrolle: n = 12; C0-L: n = 10; C0C1f: n = 10; LPS: n = 6)

Im Weiteren erfolgte, analog zum Vorgehen bei den BMDM, die Variation der Behandlungsdauer. Die Zellen wurden für 3 h, 6 h, 9 h und 24 h mit C0C1f behandelt und anschließend die Transkription anhand des mRNA-Gehalts der Zellen mittels qPCR analysiert. Bereits nach 3 h konnte eine gesteigerte Transkription von IL-1 $\beta$  sowie IL-6 (Abb. 35) gemessen werden. Diese blieb, mit sinkender Tendenz, bis zu 24 h bestehen. Bei TNF- $\alpha$  (Abb. 35) zeigte sich innerhalb von 6 h nur ein geringer Effekt, erst nach 9 h konnte eine signifikante Steigerung der Transkription festgestellt werden, die sich innerhalb von 24 h wieder zurückbildete. Bezüglich IL-10 (Abb. 36) ließ sich eine gesteigerte Transkription nach 6 h und 9 h darstellen, die sich mit fallender Tendenz auch nach 24 h zeigte. Bei ICAM-1 und VCAM-1 (Abb. 36) zeigten sich keine relevanten Veränderungen.



**Abbildung 35:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

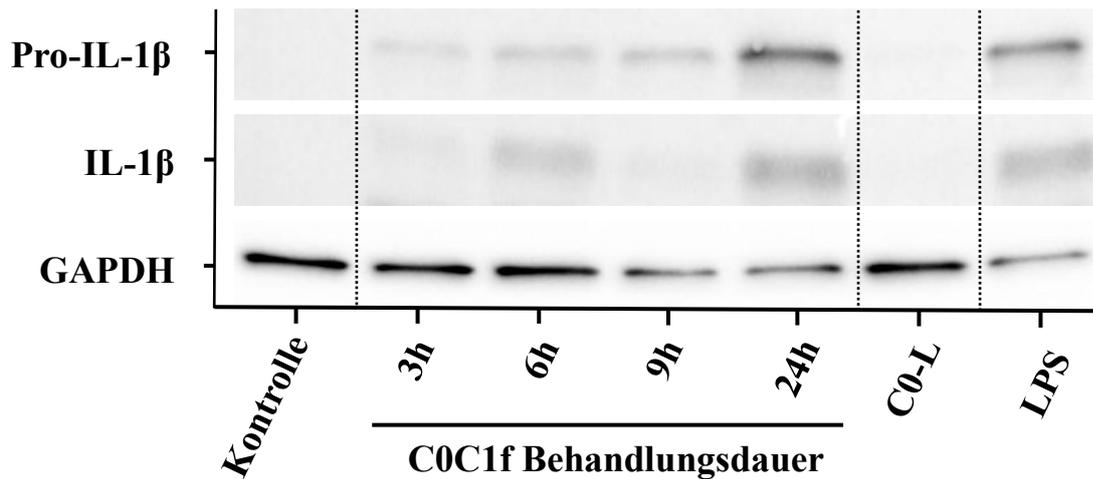
Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f für den genannten Zeitraum. Symbole entsprechen dem Mittelwert des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. TNF- $\alpha$  (Kreis, gepunktete Linie): 3h: 5,0 ± 2,1; 6h: 2,9 ± 1,1; 9h: 9,2 ± 3,8; 24h: 0,7 ± 0,3; IL-1 $\beta$  (Dreieck, durchgezogene Linie): 3h: 116,1 ± 44,8; 6h: 60,9 ± 18,5; 9h: 59,9 ± 19,1; 24h: 44,7 ± 10,9; IL-6 (Rechteck, gestrichelte Linie): 3h: 773,0 ± 199,8; 6h: 533,5 ± 123,7; 9h: 426,8 ± 94,7; 24h: 368,1 ± 95,2; (3h, 6h: n = 10; 9h: n = 9; 24h: n = 11)



**Abbildung 36:** Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) und des antiinflammatorischen Zytokin (IL-10), anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.

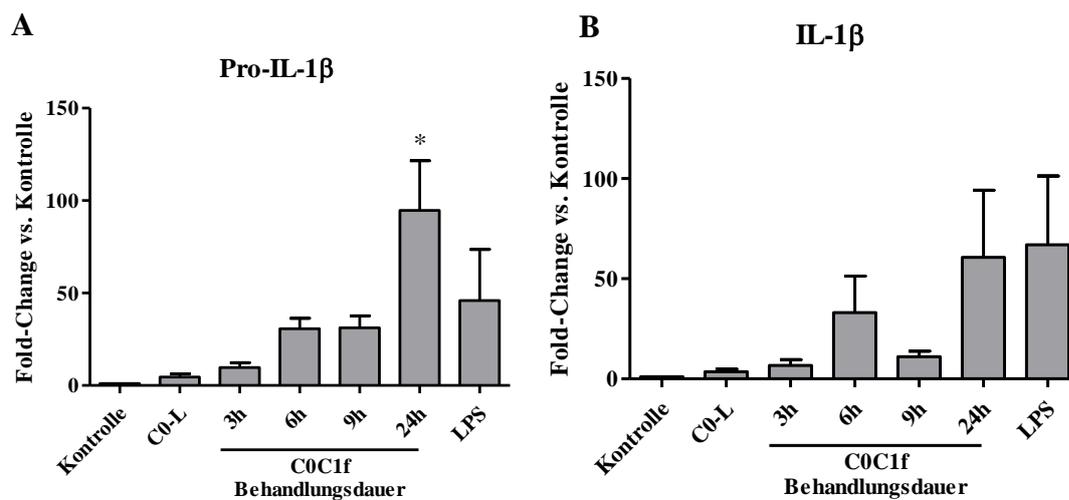
Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f für den genannten Zeitraum. Symbole entsprechen dem Mittelwert des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus. ICAM-1 (leerer Kreis, gepunktete Linie): 3h:  $1,8 \pm 0,5$ ; 6h:  $2,1 \pm 0,7$ ; 9h:  $2,0 \pm 0,7$ ; 24h:  $1,2 \pm 0,4$ ; VCAM-1 (leeres Dreieck, durchgezogene Linie): 3h:  $1,3 \pm 0,7$ ; 6h:  $1,3 \pm 0,7$ ; 9h:  $1,7 \pm 0,9$ ; 24h:  $1,2 \pm 0,6$ ; IL-10 (leeres Rechteck, gestrichelte Linie): 3h:  $2,0 \pm 0,6$ ; 6h:  $5,9 \pm 1,5$ ; 9h:  $7,8 \pm 1,8$ ; 24h:  $4,8 \pm 1,6$ ; (3h, 6h: n = 10; 9h: n = 9; 24h: n = 11)

Im Weiteren sollten mittels Western Blot, die mit der qPCR auf mRNA-Ebene erhobenen Ergebnisse, auf Proteinebene reproduziert werden. Es erfolgte erneut die Behandlung von humanen Monozyten mit 500 ng/ml C0C1f für 3 h, 6 h, 9 h und 24 h sowie mit 500 ng/ml C0-L für 6 h. Als positive Kontrolle erfolgte wiederum die Behandlung mit 100 ng/ml LPS für 6 h. Es ließ sich bei dem Vorläuferprotein pro-IL-1 $\beta$ , aus dem das biologisch aktive IL-1 $\beta$  durch proteolytische Spaltung gebildet wird, eine Erhöhung der Proteinmenge bereits nach 3 h C0C1f-Behandlung feststellen. Die höchste Proteinmenge konnte nach 24 h gemessen werden (Abb. 37 und 38 A). Die Behandlung mit LPS führte ebenfalls zu einer Erhöhung der pro-IL-1 $\beta$  Proteinmenge. Keinen solchen Effekt hatte die Behandlung mit C0-L. Bei IL-1 $\beta$  zeigte sich ein ähnlicher, zeitlicher Verlauf, jedoch mit einer Abnahme der Proteinmenge nach 9 h (Abb. 37 und 38 B).



**Abbildung 37:** Exemplarische Abbildung der Western Blot Ergebnisse.

Dargestellt sind jeweils die ausgeschnittenen Banden des Propeptids pro-IL-1β, des proinflammatorischen Zytokins IL-1β sowie des Haushaltgens GAPDH. Die Kontrollen wurden für 6 h mit PBS behandelt. Die Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f erfolgte für die angegebene Dauer. Die Behandlung mit C0-L und LPS erfolgte für 6 h.

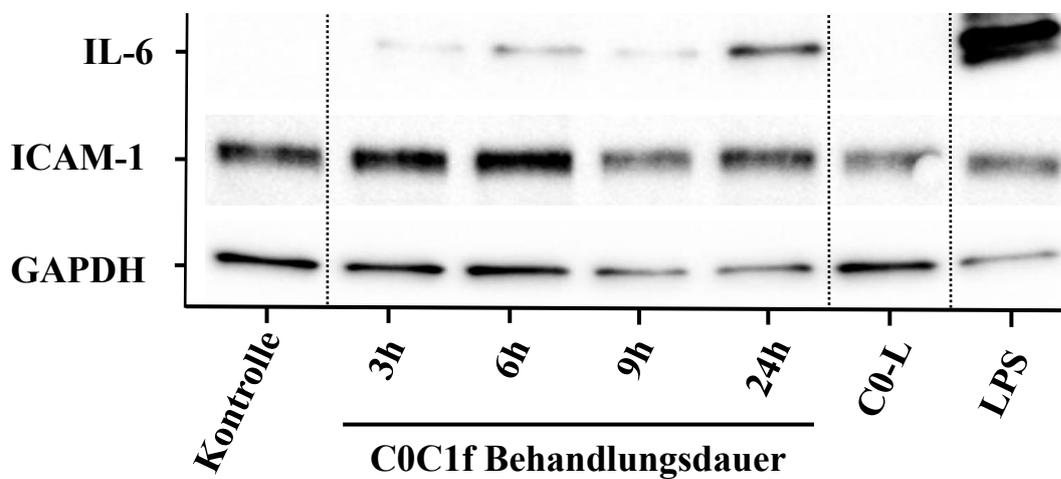


**Abbildung 38 A und B:** Quantifizierung der obenstehenden Western Blot Ergebnisse.

Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus (Kontrollniveau = 1). Pro-IL-1β: C0-L:  $4,6 \pm 1,8$ ; 3h:  $9,7 \pm 2,7$ ; 6h:  $30,7 \pm 5,6$ ; 9h:  $31,2 \pm 6,5$ ; 24h:  $94,7 \pm 26,9$ ; LPS:  $46,0 \pm 27,6$ ; IL-1β: C0-L:  $3,5 \pm 1,3$ ; 3h:  $6,7 \pm 2,9$ ; 6h:  $33,1 \pm 18,2$ ; 9h:  $11,1 \pm 2,8$ ; 24h:  $60,7 \pm 33,5$ ; LPS:  $67,0 \pm 34,4$ ; ( $n = 3$ ).

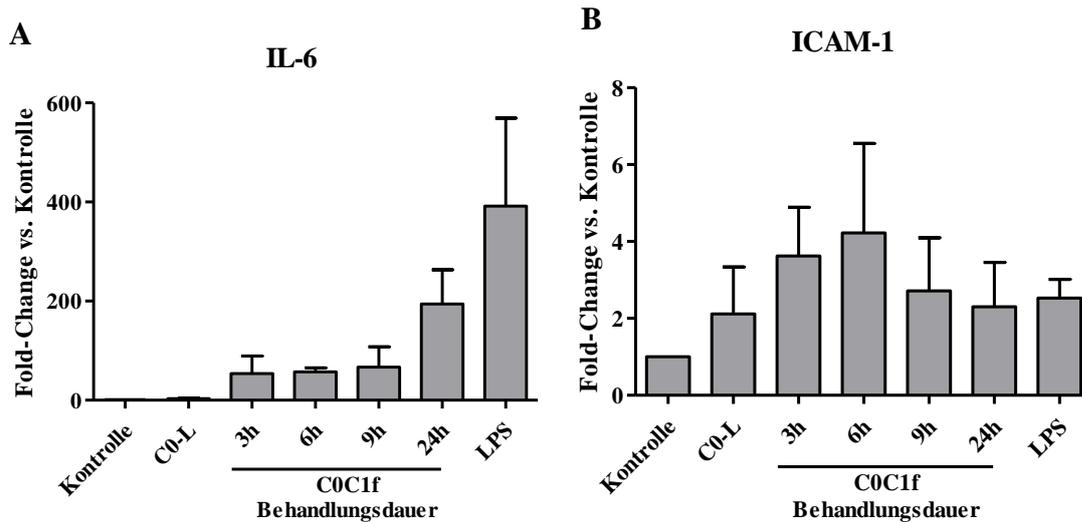
Bei IL-6 konnte durch die Behandlung mit C0C1f ebenfalls bereits nach 3 h eine deutliche Erhöhung der Proteinmenge gemessen werden, die nach 24 h ihren Maximalwert im Untersuchungszeitraum erreichte (Abb 39 und 40 A). Die Behandlung mit LPS führte ebenfalls zu einem Anstieg der IL-6 Proteinmenge. Die Behandlung mit C0-L zeigte auch hier keinen vergleichbaren Effekt.

Beim Adhäsionsmolekül ICAM-1 zeigte sich nach 6 h Behandlung mit C0C1f eine leichte Erhöhung der Proteinmenge (Abb. 39 und 40 B). Die Behandlung mit LPS und C0-L hatten keinen Effekt.



**Abbildung 39:** Exemplarische Abbildung der Western Blot Ergebnisse.

Dargestellt sind jeweils die ausgeschnittenen Banden des proinflammatorischen Zytokins IL-6, des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 sowie des Haushaltgens GAPDH. Die Kontrollen wurden für 6 h mit PBS behandelt. Die Behandlung mit 500 ng/ml C0C1f erfolgte für die angegebene Dauer. Die Behandlung mit C0-L und LPS erfolgte für 6 h.



**Abbildung 40:** Quantifizierung der oben stehenden Western Blot Ergebnisse.

Säulen mit Fehlerindikatoren entsprechen Mittelwert + Standardfehler (SEM) des Fold-Change gegenüber des Kontrollniveaus (Kontrollniveau = 1). IL-6: C0-L:  $3,1 \pm 1,2$ ; 3h:  $53,8 \pm 35,5$ ; 6h:  $57,1 \pm 8,1$ ; 9h:  $66,8 \pm 40,8$ ; 24h:  $194,5 \pm 68,6$ ; LPS:  $392,0 \pm 177,5$ ; ICAM-1: C0-L:  $3,6 \pm 1,3$ ; 3h:  $4,2 \pm 2,3$ ; 6h:  $2,7 \pm 1,4$ ; 9h:  $2,3 \pm 1,2$ ; 24h:  $2,1 \pm 1,2$ ; LPS  $2,5 \pm 0,5$ ; ( $n = 3$ ).

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der verwendeten Zellarten

Grundlage der präsentierten Versuche sind zum einen die Verwendung von aus murinen Knochenmarkstammzellen differenzierten Makrophagen (BMDM), zum anderen aus humanen *buffy coats*, mittels Dichtegradientenzentrifugation und Gegenstromelutriation, isolierten Monozyten. Die Differenzierung von murinen Knochenmarkstammzellen durch Behandlung mit M-CSF ist eine gängige Methode zur Gewinnung von murinen Makrophagen [179] und wurde in unserer Arbeitsgruppe, in Anlehnung an das von Fortier und Falk [43] beschriebene Vorgehen, durchgeführt. Mittels Durchflusszytometrie erfolgt die Charakterisierung der erzeugten Zellen anhand der vorhandenen Oberflächenproteine. Hierbei wurde der Marker der myeloischen Zellreihen CD11b und der Makrophagen-Marker F4/80 sowie MHC-II mittels fluorophorkonjugierter Antikörpern markiert und untersucht [8, 189]. Es konnten 99 % der Zellen als CD11b<sup>+</sup> identifiziert werden. Auf diesen CD11b<sup>+</sup> Zellen konnten ebenfalls die Oberflächenproteine F4/80 sowie MHC-II nachgewiesen werden. Die Zellen können so als CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>/MHC-II<sup>+</sup> bezeichnet werden. Auffällig war ein breites Intensitätsspektrum für MHC-II (Abb. 14 B), was darauf hinweist, dass auf den einzelnen Zellen unterschiedlich viel MHC-II vorhanden ist. Es ist bekannt, dass mit M-CSF differenzierte BMDM MHC-II auf der Zelloberfläche in geringerem Maße exprimieren als mit GM-CSF differenzierte BMDM [175]. Hieraus könnte eine größere Variabilität der MHC-II-Expression auf der Zelloberfläche resultieren und somit die Verteilungsbreite der MHC-II-Signalintensität erklären. In Bezug auf die von Zhang et al [189] sowie Becker et al. [8] vorgeschlagenen Vorgehensweisen, können die von uns erzeugten Zellen als Makrophagen identifiziert werden. Die Differenzierung der Zellen kann daher als erfolgreich angesehen und die erhobenen Ergebnisse der Transkriptionsanalysen murinen Makrophagen zugeordnet werden.

Ebenfalls ist die Kombination von Dichtegradientenzentrifugation und Gegenstromelutriation eine gängige Methode zur Gewinnung von humanen Monozyten [50, 177]. Bei kombinierter Anwendung beider Methoden erreicht der Anteil der HLA-DR<sup>+</sup> Monozyten im Isolat nach Wahl et al. durchschnittlich 88 % [177]. Es erfolgte direkt nach der Isolation (Tag 0) mittels Durchflusszytometrie die Charakterisierung der Zellen, anhand der Oberflächenproteine, nach dem von Abeles et al. [1] vorgeschlagenen Vorgehen. Hierbei

wurden fluorophorkonjugierte Antikörper gegen einen Marker neutrophiler und eosinophiler Granulozyten CD66b, den B-Zell-Marker CD19, den T-Zell-Marker CD3, den Marker der NK-Zellen CD56 sowie die Monozyten-Marker HLA-DR, CD14 und CD16 verwendet. Monozyten werden als CD66b<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> definiert [1, 63]. Es konnten von uns weiterhin Zellen identifiziert werden, die den als Monozyten definierten Zellen entsprechen, sich für CD56 jedoch schwach positiv zeigen (CD66b<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>low</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup>). Eine solche Zellpopulation wurde von Sconocchia et al. [151] bei gesunden Spendern ebenfalls identifiziert und weiter untersucht. Es handelt sich bei dieser Population phänotypisch und funktionell um Monozyten [151]. Sie wird daher von uns anteilmäßig den Monozyten zugeschlagen. Der Anteil der identifizierten, nicht-monozytären Zellen an allen lebenden Zellen, lag durchschnittlich bei 5,9 %, wobei der Hauptteil dieser Zellen von T-Lymphozyten gebildet wurde. Der Anteil der Monozyten an allen HLA-DR<sup>+</sup> Zellen lag durchschnittlich bei 91 %, wobei die HLA-DR<sup>+</sup> Zellen durchschnittlich 86 % aller lebenden Zellen darstellten. Die anteilmäßig größte Verunreinigung des Zellisolates, durchschnittlich 4,3 % der lebenden Zellen, bildeten T-Lymphozyten. Aus diesem Grund erfolgte, vor der Behandlung mit den cMyBP-C-Fragmenten, eine Inkubation des Isolates in Zellkulturmedium über Nacht. Das erste verwendete Zellkulturmedium wurde am Folgetag abgesaugt und verworfen. Da die Lymphozyten im Gegensatz zu Monozyten nicht vollständig an der Oberfläche der Zellkulturflasche adhären, sollten sie überwiegend, gemeinsam mit dem Medium, aus der Zellkultur entfernt werden [125]. Im umgekehrten Sinne wird die Effektivität dieses Vorgehens dadurch unterstrichen, dass bei Versuchsreihen, für die Lymphozytenisolate benötigt werden, die Adhärenz der Monozyten an den Kunststoffoberflächen der Zellkulturflaschen genutzt wird, um diese von den benötigten Lymphozyten zu trennen, wie von Fuss et al. beschrieben [50]. Die vor Inkubation in der Zellkultur, direkt nach Isolation gemessene Verunreinigung mit Lymphozyten sollte daher an Tag 1 geringer ausfallen. Zur noch exakteren Charakterisierung, der für die Versuche verwendeten Zellpopulation, wäre die direkte durchflusszytometrische Analyse der in Zellkultur befindlichen, über Nacht inkubierten, adhären Zellen denkbar. Diese ist jedoch methodisch schwierig, da hierfür ein Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche notwendig ist und dies, in ausreichender Zellzahl, nur mechanisch (*Cell-Scraping*) gelang. Es entstanden hierbei viele avitale Zellen sowie große Mengen von Zelltrümmern, welche das spezifische Färben von Oberflächenproteinen sowie die korrekte Interpretation der Ergebnisse erschweren. Es erfolgte dennoch eine Analyse mit den bereits verwendeten Antikörpern.

Es zeigte sich ein Anteil an nicht-monozytären Zellen von durchschnittlich 4 % an allen noch lebenden Zellen, von denen durchschnittlich 2,1 % als T-Lymphozyten identifiziert werden konnten, was geringer ist als in den Zellisolaten an Tag 0 und für die Effektivität der Entfernung nicht adhärenter Zellen über den beschriebenen Wechsel des Zellkulturmediums spricht. Den größten Anteil, der noch lebenden Zellen bildeten die CD66b<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> Monozyten. Die Nachweisbarkeit der Oberflächenproteine CD14 und CD16 war jedoch bei einem großen Teil der Monozyten deutlich geringer. Der Verlust von CD14 spricht für eine beginnende Differenzierung hin zu einem Makrophagen Phänotyp, wie von Gantner et al. beschrieben [51]. Es kann jedoch angenommen werden, dass es sich bei den durchflusszytometrisch untersuchten und für die Zellkultur verwendeten Zellen nicht um vollständig differenzierte Makrophagen handelt. Es wurden bei unseren Versuchen keine externen, differenzierenden Stimuli, wie etwa autologes, humanes Serum, M-CSF oder GM-CSF, hinzugefügt, was bei Versuchen mit vollständig differenzierten, humanen Makrophagen eine gängige Methode ist [51, 68, 107, 175]. Es soll angemerkt werden, dass Hou et al. [68] die Verwendung eines mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  angereicherten Zellkulturmediums als weitere Möglichkeit beschrieben haben, humane Monozyten in Makrophagen-ähnliche Zellen zu differenzieren. Anhand dieser Ergebnisse postulierten sie, dass *in vivo* die Freisetzung der genannten Zytokine autokrin die Differenzierung von Monozyten in Richtung eines Makrophagen Phänotypen anstoßen kann. Durch Behandlung mit C0C1f kam es, bei den durchgeführten *in vitro*-Versuchen, zu einer Steigerung der Transkription und mutmaßlich auch Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . In Bezug auf die von Hou et al. bei Ihren Versuchen verwendeten Inkubationszeiten erscheint es jedoch unwahrscheinlich, dass die Freisetzung der genannten Zytokine innerhalb der bei unseren Versuchen maximal vorliegenden Kulturdauer von 48 Stunden eine vollständige Differenzierung zu Makrophagen ausgelöst haben könnte [68]. Hinweise auf eine vollständige, spontane Differenzierung von humanen Monozyten zu Makrophagen *in vitro*, innerhalb der hier vorliegenden maximalen Kulturdauer von 48 Stunden, lassen sich in der Literatur nicht finden. Auch wenn man eine geringe Verunreinigung mit anderen Zellpopulationen nachgewiesen werden kann, darf davon ausgegangen werden, dass die erhobenen Ergebnisse der Transkriptionsanalysen sowie der Analyse der exprimierten Proteine, humanen Monozyten beziehungsweise sich zu Makrophagen differenzierenden Monozyten, allerdings nicht vollständig differenzierten Makrophagen, zuzuordnen sind.

## 5.2 Reaktion von murinen BMDM und humanen Monozyten auf Behandlung mit N-terminalen Fragmenten des cMyBP-C

Die Wirkung von cMyBP-C-Fragmenten als Antigen und Immunogen mit nachfolgender Bildung von Auto-Antikörpern konnte bereits 1994 von Kasahara et al. [78] beschrieben werden. Im Gegensatz zur Auto-Antikörperbildung, die auf Ebene des adaptiven Immunsystems abläuft, geben die von uns vorgestellten Ergebnisse, im *in vitro* Model unter Verwendung von murinen BMDM und humanen Monozyten, erstmals Hinweise auf die immunogenen Eigenschaften von cMyBP-C-Fragmenten auf Ebene des angeborenen Immunsystems. Die BMDM wurden für sechs Stunden mit PBS, den N-terminalen cMyBP-C-Fragmenten C0, C0-L, C0C1, C0C1f, C0C2 sowie cTnI und LPS behandelt. Im Vergleich zu den mit PBS behandelten Negativ-Kontrollen zeigte sich durch die Behandlung mit C0C1f und dem bekanntermaßen inflammatorisch aktivierenden LPS eine deutliche, statistisch signifikante Steigerung der Transkription bei den proinflammatorischen Zytokinen Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$  und Il-6 und den Adhäsionsmolekülen Icam-1 und Vcam-1. In geringem Ausmaß zeigte sich dies ebenso beim antiinflammatorischen Zytokin Il-10, nicht jedoch beim profibrotischen Zytokin Tgf- $\beta$ . Nach Behandlung mit cTnI ließen sich keine vergleichbaren Effekte beobachten. Das Ausmaß der proinflammatorischen Antwort der BMDM zeigte sich weiterhin abhängig von der Behandlungsdauer mit C0C1f, wobei bereits nach drei Stunden eine Steigerung der Transkription der proinflammatorischen Zytokine Il-1 $\beta$  und Il-6 zu erkennen war, die, insbesondere bei Il-6, bis 72 Stunden nach Beginn der Exposition deutlich gesteigert blieb.

Das beschriebene Transkriptionsprofil nach Kontakt mit C0C1f deutet auf eine klassische Aktivierung der BMDM hin, die zur Ausbildung eines M1-ähnlichen Phänotyps führen würde [118, 152]. Es zeigen sich auf mRNA-Ebene keine Hinweise auf eine nicht klassische Aktivierung der Makrophagen, die zur Ausbildung eines M2-Phänotyps führen würde. Diese Schlussfolgerungen basieren auf der einerseits gesteigerten Transkription der proinflammatorischen Zytokine Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$  und Il-6, der Adhäsionsmoleküle Icam-1 und Vcam-1 und andererseits der weitgehend unveränderten Transkription von antiinflammatorischen, beziehungsweise profibrotischen Mediatoren wie Il-10 und Tgf- $\beta$  [118, 152]. Die geringgradige Steigerung der Il-10-Transkription interpretieren wir nicht als direkte antiinflammatorische Antwort oder Zeichen einer M2-Aktivierung auf die Be-

handlung mit C0C1f, sondern im Rahmen eines von Platzer et al. beschriebenen, immunregulatorischen Feedbackmechanismus zur Kontrolle einer überschießenden proinflammatorischen Reaktion, als Folge der Freisetzung von Tnf- $\alpha$  [132]. In diesem Sinne zeigt sich ebenfalls die Transkription der, für die M2-Aktivierung typischen Gene Mrc-1 und Arg-1, unverändert [118, 152]. Für die M2-Aktivierung sind weiterhin Zell-Zell-Interaktion zwischen den Leukozytenpopulationen, insbesondere mit apoptotischen Granulozyten, T<sub>H</sub>-1-Zellen und regulatorischen T-Lymphozyten notwendig [118, 152], so dass in dem gewählten Zellkulturmodell eine solche Aktivierung auch nicht wahrscheinlich gewesen wäre.

In der zweiten Versuchsreihe sollten die bisher gewonnen Erkenntnisse in einem humanen Monozyten-*in vitro*-Modell reproduziert werden, wobei die Zellen nun lediglich mit den Fragmenten C0-L und C0C1f sowie den Kontrollsubstanzen PBS und LPS behandelt wurden. Es zeigte sich nach drei Stunden, tendenziell bereits nach 90 Minuten, eine deutlich gesteigerte Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 durch die Behandlung mit C0C1f, die sich bis 24 Stunden nach Versuchsbeginn nachweisen ließen. Weniger deutlich zeigte sich dies für TNF- $\alpha$ . Es zeigte sich ebenfalls die bereits diskutierte Steigerung der IL-10-Transkription. Durch die Behandlung mit dem C0-L-Fragment wurden keine vergleichbareren Effekte erzielt. Im Western Blot konnten die Ergebnisse auf Proteinebene nachvollzogen werden. Dies gelang mit eindeutiger Tendenz für das proinflammatorische Zytokin IL-6 sowie für das Vorläuferprotein von IL-1 $\beta$ , pro-IL-1 $\beta$ , das nach 24 Stunden die höchste Nachweisbarkeit zeigte, weniger für IL-1 $\beta$  selbst. Aktives IL-1 $\beta$  wird mittels proteolytischer Spaltung durch Caspase-1 aus pro-IL-1 $\beta$  gebildet und aus Monozyten direkt freigesetzt [125], was die nur geringe Nachweisbarkeit von intrazellulärem IL-1 $\beta$  im Western Blot erklärt. Grundsätzlich wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass kein IL-1 $\beta$  nachweisbar ist. Möglicherweise spielt hier die bereits diskutierte Tatsache eine Rolle, dass die untersuchte Zellpopulation aus Zellen besteht, die sich zum Teil bereits auf dem Differenzierungsweg in einen Makrophagen Phänotyp befinden. Wie von Netea et al. [125] gezeigt, benötigen Makrophagen im Gegensatz zu Monozyten zwei Signale zur Freisetzung von IL-1 $\beta$ . Dieses zweite Signal war hier möglicherweise nicht vorhanden, sodass ein Teil des IL-1 $\beta$  intrazellulär verblieben ist und im Western Blot nachgewiesen werden kann.

Eine Steigerung der ICAM-1 und VCAM-1-Transkription bei humanen Monozyten nach Behandlung mit C0C1f konnte nicht gezeigt werden, im Gegensatz zu Ergebnissen von

Kawamura et al., die bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine vermehrte Expression von ICAM-1 auf humanen Monozyten mittels FACS nachweisen konnten [79] und auch im Gegensatz zu unseren Ergebnissen bei BMDM. Für die Vergleichbarkeit mit letzteren Ergebnissen bestehen allerdings Einschränkungen aufgrund des Speziesunterschieds sowie der unterschiedlichen Zellarten. Möglicherweise spielen andere monozytäre Adhäsionsmoleküle (L-Selektin, LFA-1, VLA-4, Mac-1) oder auch andere Zielzellen (koronare Endothelzellen) eine größere Rolle bei der Vermittlung der verstärkten Leukozytenmigration in das Infarktgebiet [53].

Das Transkriptionsprofil der humanen Monozyten lässt im Gegensatz zu den BMDM nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die initiale Verteilung und anschließende Veränderung der Monozytensubpopulationen nach Behandlung mit C0C1f zu. Wie Stansfield und Ingram [161] in ihrer Übersichtsarbeit darstellen, überschneidet sich das von uns untersuchte Zytokinprofil innerhalb der drei Subpopulationen CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> (klassisch), CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> (intermediär) und CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup> (nicht klassisch). Zu vermuten ist, dass wie auch im peripheren Blut, zu Beginn des Versuchs die CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> Monozyten dominieren [161]. Eine mögliche Erklärung für den Anstieg der TNF- $\alpha$  und auch der IL-10-Transkription neun Stunden nach Versuchsbeginn (zusätzlich zum bereits erwähnten immunregulatorischen Feedbackmechanismus), wäre eine beginnende Zunahme der CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> Anzahl, im Sinne einer lokalen Konversion aus CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> Monozyten, wie von Hilgendorf et al. [64] für murine Ly-6C<sup>high</sup> Monozyten beschrieben. Dieser Mechanismus wird in verschiedenen Übersichtsarbeiten, etwa von Stansfield und Ingram [161] und Kratofil et al. [82], auch für humane Monozyten postuliert. Den so entstehenden CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> Monozyten wird eine hohe TNF- $\alpha$  [161] und IL-10 [154] Transkriptionsfähigkeit zugeschrieben, sodass ihre anteilmäßige Zunahme, die kumulativ gemessene Transkriptionsänderung erklären könnte. Dem gegenüber steht etwa eine Arbeit von Wong et al. [184], die den CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup> Monozyten die höchste Transkription von TNF- $\alpha$  und den CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup> Monozyten die höchste Transkription von IL-10 zuschreibt, was die eingangs erwähnte, sich überschneidende Datenlage deutlich macht. Letztlich kann die Frage nach einer Änderung der Subpopulationsverteilung im Rahmen der C0C1f Behandlung, kaum durch die Betrachtung des Transkriptom beantwortet werden, eher durch eine weitere Analyse, der für die Subpopulationen spezifischen Oberflächenproteine. Die Durchführung spezifischer Färbungen für eine durchflusszytometrische Analyse ist jedoch, wie in Kapitel 4.4 und 5.1 beschrieben, nach dem mechanischen

Ablösen der adhärennten Zellen methodisch schwierig. Ein möglicher Lösungsansatz wäre etwa die Kultivierung der Monozyten in Zellkulturbehältnissen mit besonders gestalteter Oberflächenstruktur, die nur eine geringe Zelladhärenz erlaubt (*ultra-low attachment flasks/plates*), sodass keine mechanische Ablösung der Monozyten notwendig ist.

Die erhobenen Ergebnisse bestätigen unsere initiale Vermutung, dass N-terminale Fragmente des cMyBP-C eine proinflammatorische Wirkung auf murine Makrophagen und humane Monozyten *in vitro* haben. Kasahara et al. zeigten bereits 1994, durch Induktion einer experimentellen Myokarditis, die Immunogenität zweier cMyBP-C-Fragmente (Aminosäuren 205 - 916, 945 - 1270) [78]. Matsumoto et al. konnten nach Injektion N-terminaler Fragmente (Aminosäuren 1 - 323, 317 - 647) eine besonders schwer verlaufende experimentelle Myokarditis beobachten [108, 109]. Insbesondere in Bezug auf eine weitere Arbeit von Matsumoto et al., bei der eine Immunogenität auch für ein weiter C-terminal gelegenes Fragment (Aminosäuren 615 - 647) gezeigt werden konnte [108], wurde die Vermutung geäußert, dass bei cMyBP-C mehrere immunogene Proteinabschnitte vorliegen [109]. In einer aktuelleren Arbeit von Lynch et al. [101] konnten im Serum von Patienten mit akutem Koronarsyndrom (AKS), DCM sowie HCM Auto-Antikörper gegen verschiedene cMyBP-C-Fragmente (C0C1f, C0C3, C3C6, C6C8, C8C10) und das komplette Protein nachgewiesen werden. Die meisten dieser Auto-Antikörper waren hierbei wiederum gegen C-terminale Fragmente, von C3 - C10, gerichtet. Interessanterweise zeigten unsere Ergebnisse, in beiden untersuchten Zellarten, die stärkste proinflammatorische Reaktion auf das am N-Terminus gelegene C0C1f-Fragment (Aminosäuren 1 - 271, [134]), welches zum Großteil dem N-terminalen Fragment von Matsumoto et al. (Aminosäuren 1 - 323) entspricht, durch das eine starke, experimentelle Myokarditis induziert werden konnte [109]. Dies unterstreicht damit die Immunogenität des N-Terminus von cMyBP-C. Die übrigen, in unseren Versuchen genutzten Fragmente erstrecken sich maximal bis zur C2-Domäne (C0C2, Aminosäure 1 - 451, [87]). Sie erfassen also nicht die weiter C-terminal gelegenen Fragmente, die von Lynch et al. bezüglich Auto-Antikörperbildung untersucht wurden (C3 - C10) [101] und ebenfalls nicht, die von Matsumoto et al. beschriebene Aminosäuresequenz 615 - 647, welche im Fragment C3C6 enthalten wäre. Die Wirkung der C-terminalen cMyBP-C-Fragmente auf Makrophagen und Monozyten bleibt somit zunächst unbeantwortet. Die Behandlung mit den übrigen N-terminalen Fragmenten C0, C0-L und C0C1 führte zu keinerlei Veränderung der Transkription der untersuchten Zielgene. Eine Ausnahme bildete hierbei das C0C2-Fragment,

welches bei TNF- $\alpha$  in geringem Maße eine statistisch signifikante Steigerung der Transkription auslösen konnte. Eine Gemeinsamkeit der kürzeren N-terminalen Fragmente (C0, C0-L, C0C1) ist das Fehlen des M-Motivs, wohingegen C0C1f und C0C2 zumindest Teile des M-Motivs enthalten. Dem M-Motiv wird als Bindungsstelle bei der Interaktionen von cMyBP-C mit Aktin und Myosin eine wichtige Rolle zugeschrieben [10, 134]. Man könnte mutmaßen, dass das M-Motiv als wichtiges Immunogen wirkt, indem es auch als Bindungsstelle für DAMP erkennende Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Makrophagen und Monozyten wie TLRs oder RAGE [2, 103] fungiert und auf diese Weise die proinflammatorische Wirkung der Fragmente C0C1f und geringer auch C0C2 vermittelt. Im Unterschied zu C0C1f ist bei C0C2 das M-Motiv intakt und zudem beiderseits durch eine C-Domäne flankiert. Möglicherweise wird durch diese zentrale Position im C0C2-Fragment die Bindung an einen DAMP erkennenden Rezeptor erschwert, weshalb sich lediglich eine geringe proinflammatorische Reaktion zeigt. Bei C0C1f hingegen liegen die ersten 17 Aminosäuren des M-Motivs frei und einfach zugänglich an einem Ende des Fragments, da die Abspaltung des restlichen, C-terminalen cMyBP-C im M-Motiv erfolgt [134]. Es könnten so mutmaßliche Rezeptorbindungen leichter als bei C0C2 ablaufen. Dies könnte die beobachtete stärkere proinflammatorische Reaktion erklären. Weiterhin scheint das Vorhandensein der ersten 17 Aminosäuren des M-Motivs ausreichend und essentiell für die Auslösung der beobachteten proinflammatorischen Reaktion zu sein, da das C0C1-Fragment keine vergleichbare Reaktion hervorrufen kann. Weith et al. zeigten bei Versuchen zur Wirkung von cMyBP-C-Fragmenten auf die Aktin-Myosin-Motilität *in vitro* [180], dass Fragmente die wie C0C1 kein M-Motiv enthalten, eine deutlich geringere Bindungsaffinität zu Aktin haben, als Fragmente mit M-Motiv (C0C1f, C0C2, C0C3, C1C2). Weiterhin konnte von Weith et al. gezeigt werden, dass die im C0C1f-Fragment enthaltenen ersten 17 Aminosäuren des M-Motivs, die Bindung an Aktin, über positiv geladene Arginin-Reste, vermitteln und durch Entfernung dieser Arginin-Reste die Bindungsaffinität von C0C1f auf das Niveau von C0C1 gesenkt werden kann [180]. Die diskutierten Schlussfolgerungen könnten ein Erklärungsansatz für die besonders stark ausgeprägte proinflammatorische Reaktion auf das C0C1f-Fragment sein und unterstreichen, zusammen mit unseren Ergebnissen, die vermutete, wichtige Rolle des N-Terminus von cMyBP-C, insbesondere des M-Motivs, bei der Protein-Protein-Interaktion sowie als Immunogen.

### **5.3 Vergleichbarkeit von murinen Makrophagen mit humanen Monozyten**

Ein direkter Vergleich von Art oder Intensität der Antwort von murinen Makrophagen und humanen Monozyten auf die Behandlung mit Fragmenten des cMyBP-C ist nicht Intention dieser Arbeit. Die Interpretation der Schlussfolgerungen, die aus einem solchen Vergleich resultieren würden, wäre durch Interspezies-Differenzen sowie die Tatsache, dass zwei unterschiedliche Zelltypen untersucht wurden, schwierig. Beide Versuchsreihen sind eher als isolierte *in vitro*-Modelle zu betrachten, wobei die definierte und homogene Zellpopulation der BMDM gute Bedingungen für erste Versuche bot. Erst anschließend erfolgte die Anwendung der bereits gewonnenen Erkenntnisse, wie etwa der gewählten Zielgene oder der Verlagerung der Versuche auf das C0C1f-Fragment, auf ein humanes Monozyten-*in vitro*-Modell. In diesem ist aufgrund von unklaren Altersunterschieden, Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme, Nikotin oder Alkoholkonsum mit größeren interindividuellen Schwankungen zu rechnen. Daher waren Vorversuche mit BMDM notwendig und sinnvoll. Es erscheint aber umso interessanter, dass die Antwort von murinen Makrophagen derjenigen von humanen Monozyten in vielen Punkten ähnelt. Ruparelia et al. konnten, in einer auf das Transkriptom von murinen und humanen Monozyten bei akutem Myokardinfarkt fokussierten Untersuchung zeigen, dass für 163 Gene, unter anderem TLR-2, ähnliche Reaktionsmuster bei beiden Spezies existieren [142]. Es könnten also, in Bezug auf diese Arbeit, der von uns beobachteten inflammatorischen Reaktion ebenfalls, über Speziesgrenzen hinweg konservierte Reaktionsmuster, zu Grunde liegen. Weitere Studien sollten diese Mechanismen und Reaktionsmuster tiefergehend untersuchen.

### **5.4 Limitationen der erhobenen Ergebnisse hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit in das *in vivo* Geschehen**

Die durchgeführten Versuche erfolgten *in vitro* mit aus murinen Knochenmarkstammzellen differenzierten Makrophagen sowie aus *buffy coats* isolierten humanen Monozyten. Es wurde dann mit molekularbiologischen Verfahren die grundlegende Antwort einzelner Zelltypen auf die Behandlung mit cMyBP-C-Fragmenten untersucht. Interaktionen der Leukozytensubpopulationen sollten zur Vereinfachung des experimentellen Modells

hierfür zunächst vernachlässigt werden. Der Isolations- sowie der Differenzierungsvorgang können für experimentelle Artefakte verantwortlich sein. Ebenso können Zell-Zell-Interaktionen der Leukozytenpopulationen mit den übrigen myokardialen Zellen (Granulozyten, Lymphozyten, Kardiomyozyten, Fibroblasten, Myofibroblasten, Endothelien) und eine hierdurch bedingte Beeinflussung der proinflammatorischen Reaktion nicht erfasst werden. Dennoch ist die Zellkultur eine gute Methode zur Untersuchung isolierter Zelltypen *ex vivo* und mit guter Kontrolle der Umweltvariablen. Für die zu beantwortende Fragestellung erscheint daher die Zellkultur isolierter, primärer Zellen am Geeignetesten [92]. Die erhobenen Ergebnisse erlauben also grundsätzliche Aussagen über die Reaktion von murinen BMDM und humanen Monozyten auf Kontakt mit cMyBP-C-Fragmenten, jedoch ohne Berücksichtigung des komplexen, physiologischen Interaktionsnetzwerks der Leukozytensubpopulationen, weshalb die Übertragbarkeit in eine *in vivo* Situation als eingeschränkt betrachtet werden muss.

Weiterhin ist unklar, in welcher Menge bzw. Konzentration die Leukozyten im Infarktareal und im systemischen Blutstrom *in vivo* mit C0C1f-Fragmenten konfrontiert werden. Für unsere Versuche wurden Konzentrationen von 50 ng/ml und 500 ng/ml verwendet, wobei die Verwendung der niedrigeren Konzentration ebenfalls eine proinflammatorische Reaktion der humanen Monozyten, jedoch in geringerem Maße, hervorrufen konnte. Die bekannten Messwerte für cMyBP-C bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt wurden in peripheren Blutproben bestimmt und lagen bei Govindan et al. im Mittel bei 227 ng/ml [58] und 116,5 ng/ml [57], also in einer niedrigeren aber mit den von uns verwendeten Konzentrationen vergleichbaren Größenordnung. Der zur Konzentrationsbestimmung verwendete Antikörper war allerdings gegen die C0-Domäne des cMyBP-C gerichtet und detektiert so alle N-terminalen Fragmente und das vollständige Protein [57, 58], sodass die eigentliche C0C1f-Konzentration unklar bleibt. Es wäre jedoch denkbar, dass die lokal im Infarktgebiet vorliegenden C0C1f-Konzentrationen höher sind als die im systemischen Blutstrom. Daher wären residente, myokardiale Makrophagen oder lokal patrouillierende Monozyten möglicherweise auch höheren Konzentrationen von C0C1f, ähnlich unserem Zellkulturmodell, ausgesetzt. Eine weitere Steigerung der C0C1f-Konzentration auf 1000 ng/ml führte zum Untergang der in der Zellkultur befindlichen Monozyten, wobei zytotoxische Eigenschaften von C0C1f durch Govindan et al., über die Induktion von Apoptose in Kardiomyozyten der Ratte *in vitro*, bereits gezeigt

wurden [59]. Ob in unserem Fall der Untergang der Monozyten durch direkte zytotoxische Eigenschaften der hohen Proteinkonzentration, Apoptose oder eine stärkste proinflammatorische Reaktion mit Pyroptose [153] vermittelt wurde, ist unklar.

## 5.5 Schlussfolgerung und Relevanz der präsentierten Arbeit

CMyBP-C gilt als potentieller Biomarker einer myokardialen Schädigung [58, 74] und ist insbesondere sensitiv und spezifisch für die Erkennung eines akuten Myokardinfarkts [76, 77, 150]. Während einer myokardialen Ischämie kommt es in den Kardiomyozten zu einem raschen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration [73], was zur Aktivierung von  $\mu$ -Calpain [73] und bevorzugten proteolytischen Spaltung von cMyBP-C [6, 58] führt, da dieses im ischämischen Myokard (Infarkt- und Grenzzone) überwiegend dephosphoryliert vorliegt und daher besonders anfällig für eine Proteolyse ist [6, 32, 33, 58]. In Folge der cMyBP-C-Dephosphorylierung und des ischämiebedingten  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms entstehen Fragmente, welche sich aus dem Sarkomer lösen [32, 33, 134] und dann im systemischen Blutstrom von Versuchstieren und Patienten mit Myokardinfarkt rasch nachweisbar sind [4, 57, 58, 75-77, 85]. Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass C0C1f, ein N-terminales Fragment des cMyBP-C, eine deutliche, proinflammatorische Reaktion in murinen BMDM sowie in humanen Monozyten *in vitro* auslösen kann. Andere N-terminale Fragmente (C0, C0-L, C0C1, C0C2) weisen diese Eigenschaft nicht in vergleichbarem Ausmaß auf. Wir schließen aus der beschriebenen proinflammatorischen Reaktion der untersuchten Zellen, dass C0C1f potentiell immunogen ist und zur Gruppe der DAMPs gehören könnte, die nach abgelaufener myokardialer Ischämie für die Initiation der nun folgenden sterilen, inflammatorischen Vorgänge verantwortlich sind. Diese münden letztlich in der Ausheilung des infarzierten Myokardareals und der Bildung einer stabilen kollagenen Narbe [45]. C0C1f könnte in diesem Rahmen beispielsweise zur proinflammatorischen Aktivierung der residenten, myokardialen Makrophagen [131] und der neu in das infarzierte Myokardareal rekrutierten Monozyten [123] beitragen. Anhand der beobachteten Steigerung der Transkription von  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL1-}\beta$  und  $\text{IL-6}$  wäre die Vermittlung eines solchen Effektes über den TLR-Signalweg und somit eine M1-ähnliche Aktivierung von Makrophagen denkbar [118, 152, 172]. Zeichen M2-ähnlicher Aktivierung durch Kontakt mit C0C1f ließen sich bei unveränderter Transkription von  $\text{IL-10}$ ,  $\text{TGF-}\beta$ ,  $\text{MRC-1}$  und  $\text{ARG-1}$  nicht beobachten [118, 152]. Ein Ungleichgewicht zwischen

Pro- und Antiinflammation, wie etwa ein prolongierter oder unkontrollierter inflammatorischer Prozess, bei der Ausheilung des infarzierten Myokardareals, wird im Rahmen des *cardiac remodeling* für Spätkomplikationen eines Myokardinfarktes wie Myokardhypertrophie, -dilatation, -fibrose und letztlich Herzinsuffizienz verantwortlich gemacht [23, 44, 123]. Betrachtet man die präsentierten Ergebnisse in diesem Kontext, unter dem Vorbehalt der Übertragbarkeit von *in vitro* generierten Ergebnissen, könnte beispielsweise eine pharmakologische Reduktion der cMyBP-C Dephosphorylierung und damit der Proteinfragmentierung [6, 146] eine überschießende proinflammatorische Makrophagen- und Monozytenreaktion verringern und eine stabile Narbenbildung positiv beeinflussen. Weiterhin betonen die Hinweise auf die Polarität der Makrophagenaktivierung durch C0C1f erneut die Notwendigkeit für die weitere Aufklärung der intrazellulären Mechanismen sowie die Identifizierung externer, therapeutischer Einflussnahme auf das Ausmaß der klassischen und alternativen Makrophagenaktivierung. Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse könnten über die Identifizierung eines potentiell weiteren DAMPs sowie der Betonung der Wichtigkeit zentraler Effektorzellen, der Makrophagen und Monozyten, der immunmodulatorischen Beeinflussung der inflammatorischen Prozesse nach Ablauf einer myokardialen Ischämie, einen neuen, zu verfolgenden Ansatz zur Verfügung stellen.

## 5.6 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern verschiedene Ansatzpunkte für weitere Forschungsarbeiten.

- Wie wird die proinflammatorische Reaktion auf C0C1f Kontakt vermittelt (Zellmembran Rezeptor, intrazellulärer Rezeptor, intrazelluläre Signaltransduktion)? Kann eine pharmakologische Beeinflussung erfolgen? Diese Fragestellung wurde, während der Anfertigung dieser Arbeit, in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen eines Folgeprojekts bearbeitet und aus Gründen der Aktualität, gemeinsamen mit Teilen der hier vorgestellten Ergebnisse, bereits veröffentlicht [93].
- Warum resultiert gerade der C0C1f Kontakt in einer Aktivierung der Immunzellen und andere untersuchte Fragmente zeigen keine vergleichbare Wirkung? Spielt hier das Vorhandensein des M-Motivs, das sonst für die Bindung an Aktin und Myosin verantwortlich ist, für die Bindung an einen Oberflächenrezeptor eine Rolle? Weith et al. zeigten 2013, dass die Aminosäurestruktur mit positiv geladenen, C-terminalen Argininen im verbleibenden M-Motiv des C0C1f für die Vermittlung der inhibierenden Einflüsse auf die Aktin-Myosin Verschiebegeschwindigkeit und damit für die Aktin- und Myosinbindung verantwortlich sind. Ein Ersatz der Arginine durch Alanine (C0C1f<sub>m</sub>) schwächte diese Interaktion fast völlig ab [180]. Wie verhält sich dieses Protein in Kontakt mit BMDM und Monozyten?
- Welche Effekte zeigen die weiter C-terminal gelegenen Fragmente auf Makrophagen und Monozyten, die von Lynch et al. [101] *in vivo* als Immunogene beschrieben wurden und auch die von Matsumoto et al. beschriebene Aminosäuresequenz 615 - 647 [108] beinhalten?
- Wie wirkt C0C1f auf andere Effektorzellen? Wie reagieren Granulozyten, die als erste in das Infarktareal einwandern? Verhalten sich vollständig differenzierte humane Makrophagen ähnliche wie Monozyten und BMDM? Hat C0C1f eine Auswirkung auf T-Lymphozyten? Wie ausgeprägt ist die proinflammatorische Reaktion von Makrophagen, die ins Netzwerk der Zell-Zell-Interaktionen eingebunden sind, etwa in Co-Kultur mit T-Lymphozyten?

- Wie stark ist der Einfluss des C0C1f Kontakt auf die Makrophagen Polarisierung (M1- vs. M2-Aktivierung) bzw. die Verteilung der Monozytensubpopulationen? Hier könnte beispielsweise eine erweiterte Analyse der spezifischen Oberflächenproteine aufschlussreich eingesetzt werden.
- Hat C0C1f nur eine proinflammatorisch-aktivierende Funktion oder wirkt es selbst leukotaktisch? Hier könnte beispielweise eine Intravitalmikroskopie muriner Monozyten eingesetzt werden.

## 6 Zusammenfassung/Abstract

### 6.1 Deutsch

Im Rahmen eines nekrotischen myokardialen Zelluntergangs kommt es zur Dephosphorylierung des kardialen Myosinbindungsproteins-C (cMyBP-C), eines Myosin bindenden Proteins des dicken Filaments [89, 98]. Das Protein wird calciumabhängig, durch das Enzym  $\mu$ -Calpain gespalten und es kommt zur Freisetzung der Fragmente aus dem Sarkomer in den extrazellulären Raum [32, 58, 99, 134]. Im experimentellen Infarktmodell sowie bei Myokardinfarkt Patienten konnte gezeigt werden, dass es bei Ablauf eines Myokardinfarktes zur raschen Ausschüttung dieser Fragmente in die Blutzirkulation kommt [32, 33, 58, 77]. Die Freisetzungskinetik und die Kardiospezifität ist dabei mit der, etablierten Biomarker der myokardialen Zellschädigung, vergleichbar [4, 77, 85]. Eine Anwendung als neuer Myokardinfarkt-Biomarker ist denkbar [76, 106]. Weiterhin haben die Fragmente dramatische, negative Auswirkungen auf die kontraktile Eigenschaften, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität sowie die Vitalität von Kardiomyozyten [59, 183]. Ebenso wurden immunogene Eigenschaften wie die Induktion einer Auto-Antikörper-Bildung und einer experimentellen Autoimmunmyokarditis beschrieben [78, 101, 109].

Aufgrund dieser Charakteristiken bearbeiteten wir die Hypothese, dass cMyBP-C-Fragmente im Rahmen eines Myokardinfarkts als *Danger associated molecular patterns* (DAMPs) fungieren können. Sie würden so eine wichtige Rolle für die Aktivierung von Effektorzellen, wie etwa Makrophagen und Monozyten und damit die Initiation der sterilen, inflammatorischen Vorgänge übernehmen, die in der Ausheilung des infarzierten Myokardareals münden [45]. Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass C0C1f, ein N-terminales Fragment des cMyBP-C, eine proinflammatorische Reaktion in murinen *bone marrow-derived macrophages* (BMDM) sowie in humanen Monozyten *in vitro* auslösen kann, hingegen andere N-terminale Fragmente diese Eigenschaft nicht in vergleichbarem Ausmaß aufweisen. Nach C0C1f Kontakt zeigt sich bereits innerhalb von drei Stunden eine Steigerung der Transkription des Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), des Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und des Interleukin-6 (IL-6), was als proinflammatorische Aktivierung der Zellen *in vitro* interpretiert wird.

Daher erscheint C0C1f als neuer, proinflammatorischer Aktivator von Makrophagen und Monozyten *in vitro* und könnte so auch *in vivo* eine wichtige Rolle im Rahmen der Initiation der Infarktheilung einnehmen.

## 6.2 Englisch

During necrotic myocardial cell death, cardiac Myosin binding Protein-C (cMyBP-C), a thick filament binding Protein [89, 98], is dephosphorylated and therefore becomes susceptible for proteolytic cleavage by the calcium-dependent enzyme  $\mu$ -Calpain [32, 58, 99, 134]. Then cMyBP-C fragments are rapidly released from the sarcomere into extracellular fluids. In a porcine model as well as in patients with myocardial infarction (MI), these fragments can be detected in the circulation quickly after the cardiac event [32, 33, 58, 77]. Because of similar cardio specificity and release kinetics, in comparison to established biomarkers of MI [4, 77, 85], the measurement of cMyBP-C fragments could be employed as a promising new approach for detecting myocardial cell damage [76, 106]. Furthermore, not only have the fragments detrimental effect on cardiomyocyte contractility,  $\text{Ca}^{2+}$  handling, and vitality [59, 183], they also bear immunogenic potential by mediating the generation of autoantibodies in patients with DCM and can induce autoimmune myocarditis [78, 101, 109].

Therefore we hypothesized that cMyBP-C fragments could work as danger-associated molecular patterns (DAMPs) during myocardial infarction, leading to activation of important effector cells, like macrophages and monocytes, and the initiation of sterile inflammatory processes, which lead up to the healing of the damaged myocardium [45]. This work shows for the first time that among the N-terminal fragments of cMyBP-C, only C0C1f triggers robust proinflammatory reactions in murine bone marrow-derived macrophages (BMDM) as well as in human monocytes *in vitro*. Already three hours after C0C1f treatment, an upregulation of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6) was measured.

Thus, C0C1f appears to be a novel, proinflammatory activator of macrophages and monocytes *in vitro* and, therefore, could also play a crucial role in the initiation of cardiac repair after MI *in vivo*.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Ausgeschriebene Bezeichnung</b>
Abb.	Abbildung
AKS	Akutes Koronarsyndrom
Arg-1/ARG-1	Arginase-1 (Maus/Mensch)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BMDM/s	Bone marrow-derived macrophage/s
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium Ion
CABG	Coronary artery bypass grafting
CCE	Counterflow centrifugal elutriation
CCR2	CC Chemokine receptor type 2
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
cMyBP-C	Kardiales Myosinbindungsprotein-C
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct	Threshold cycle
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cTnC, cTnI, cTnT	Kardiales Troponin C, I, T
CX3CR1	CX3C Chemokine Receptor Type 1, Fraktalkin Rezeptor
DAMP/s	Danger associated molecular pattern/s
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELC	Essential light chain

F-Aktin	Filamentäres Aktin
Fn3	Fibronectin 3
FSC	Forward scatter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
His	Histidin
HMGB-1	High-mobility group protein box-1
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP/s	Heat shock Protein/s
Icam-1/ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1 (Maus/Mensch)
iFBS	inaktiviertes, fetales, bovines Serum
Ig	Immunglobulin
Il/IL	Interleukin (Maus/Mensch)
IL-1R2	Interleukin 1 receptor type 2
KHK	Koronare Herzerkrankung
LAD	Left anterior descending (coronary artery)
LMM	Light meromyosin
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6c	Lymphocyte antigen 6 complex
M1	klassisch aktivierter Makrophage
M2	Nicht klassisch aktivierter Makrophage
MCP-1/3	Monocyte chemotactic protein-1/3
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MHC	Myosin heavy chain
MHC-II	Major histocompatibility complex-II
MLC	Myosin light chain
Mrc-1/MRC-1	Mannose receptor C-type-1 (Maus/Mensch)
mRNA	Messenger-RNA
MyBP-C	Myosinbindungsprotein-C
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren

NF- $\kappa$ B	Nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-Cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PBMC/s	Peripheral blood mononuclear cell/s
PBS	Phosphate-buffered saline
PCI	Percutaneous coronary intervention
PCR/s	Polymerase chain reaction/s
PK-A	Proteinkinase A
PMT	Photomultiplier tube
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR/s	Real-time quantitativ polymerase chain reaction/s
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
RLC	Regulatory light chain
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Subdomäne
SDS	Sodium lauryl sulfate
SSC	Side scatter
TBS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-buffered saline
Tgf- $\beta$ /TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$ (Maus/Mensch)
TLR/s	Toll-like receptor/s
TnC, TnI, TnT	Troponin C, I, T
Tnf- $\alpha$ /TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (Maus/Mensch)
TR-FRET	Time-resolved fluorescence energy transfer
Vcam-1/VCAM-1	Vascular cell adhesion protein-1 (Maus/Mensch)
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung eines Sarkomers, mit angrenzenden Teilsarkomeren. ....	2
<b>Abbildung 2:</b> Vereinfachte, schematische Darstellung eines dicken (lila) und dünnen Filaments (grün). ....	3
<b>Abbildung 3:</b> Vereinfachte, schematische Darstellung eines Myosin-II Moleküls .....	4
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der Domänenstruktur von cMyBP-C. ....	8
<b>Abbildung 5:</b> Zusammenfassende, schematische Darstellung des M1- und M2-phänotypischen Zytokinprofils und die daraus resultierende Wirkung im Gewebe. ....	22
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung der rekombinanten cMyBP-C-Fragmente. ....	29
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung des zentrifugalen Gegenstromelutriationssystems. ....	33
<b>Abbildung 8:</b> Einbringen der Zellsuspension in die Elutriationskammer, ....	33
<b>Abbildung 9 A und B:</b> A: Zonale Anordnung der Zellen nach Masse und Größe während der Gleichgewichtszentrifugation, B: Bei Erhöhung der Durchflussgeschwindigkeit elutriieren kleinere und leichtere Zellen zuerst aus der Kammer. ....	34
<b>Abbildung 10 A bis D:</b> Ablauf einer mit SYBR Green durchgeführten qPCR. ....	40
<b>Abbildung 11:</b> Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise eines Durchflusszytometers. ....	50
<b>Abbildung 12:</b> <i>Dot Plots</i> einer durchflusszytometrischen Analyse eines <i>buffy coat</i> , links: x-Achse: FSC, y-Achse: Vitalitätsfärbung; rechts: x-Achse: FSC, y-Achse: CD66b. ....	53
<b>Abbildung 13:</b> Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse muriner Knochenmarkzellen nach sieben Tagen M-CSF Behandlung. ....	56
<b>Abbildung 14 A und B:</b> Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse muriner Knochenmarkzellen nach sieben Tagen M-CSF Behandlung. ....	57
<b>Abbildung 15 A und B:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ ) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	59
<b>Abbildung 16:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des inflammatorischen Zytokins Il-6 anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	60
<b>Abbildung 17 A und B:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Adhäsionsmoleküle (Icam-1, Vcam-1) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	61
<b>Abbildung 18:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des profibrotischen beziehungsweise antiinflammatorischen Zytokins Tgf- $\beta$ , anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	62
<b>Abbildung 19:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des antiinflammatorischen Zytokins Il-10 anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	63
<b>Abbildung 20 A und B:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des M2-typischen Mannose Rezeptors Mrc-1 und des M2-typischen Enzyms Arg-1 anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	64
<b>Abbildung 21:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Il-6) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	66

<b>Abbildung 22:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Adhäsionsmoleküle (Icam-1, Vcam-1) und des antiinflammatorischen Zytokin (Il-10) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	67
<b>Abbildung 23:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (Tnf- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Il-6) und Adhäsionsmoleküle (Icam-1, Vcam-1) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	68
<b>Abbildung 24 A bis G:</b> Repräsentative Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Monozytenisolate an Tag 0, dargestellt als <i>dot plots</i> . ....	70
<b>Abbildung 25 A bis G:</b> Repräsentative Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Monozytenisolate an Tag 1, dargestellt als <i>dot plots</i> . ....	71
<b>Abbildung 26:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.....	72
<b>Abbildung 27:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) und des antiinflammatorischen Zytokins (IL-10) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	73
<b>Abbildung 28 A bis C:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	75
<b>Abbildung 29:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) und der profibrotischen beziehungsweise antiinflammatorischen Zytokine (TGF- $\beta$ , IL-10) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.....	76
<b>Abbildung 30:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$ , anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	77
<b>Abbildung 31 A und B:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der proinflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	78
<b>Abbildung 32:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	79
<b>Abbildung 33:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse des Adhäsionsmoleküls VCAM-1 anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	80
<b>Abbildung 34 A und B:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der profibrotischen beziehungsweise antiinflammatorischen Zytokine (TGF- $\beta$ , IL-10) anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	81
<b>Abbildung 35:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der inflammatorischen Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6), anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR.....	82
<b>Abbildung 36:</b> Ergebnisse der Transkriptionsanalyse der Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) und des antiinflammatorischen Zytokin (IL-10), anhand des mRNA-Gehalts mittels qPCR. ....	83
<b>Abbildung 37:</b> Exemplarische Abbildung der Western Blot Ergebnisse.....	84
<b>Abbildung 38 A und B:</b> Quantifizierung der obenstehenden Western Blot Ergebnisse. ....	84
<b>Abbildung 39:</b> Exemplarische Abbildung der Western Blot Ergebnisse.....	85
<b>Abbildung 40:</b> Quantifizierung der oben stehenden Western Blot Ergebnisse. ....	86

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Elutriationsfraktionen mit Flussgeschwindigkeiten, aufgefangenen Volumina und Zellsorten.....	35
<b>Tabelle 2:</b> Protokoll eines SYBR Green qPCR Laufs .....	43
Tabelle 3: Protokoll eines TaqMan qPCR Laufs .....	44
<b>Tabelle 4:</b> Allgemeine Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien .....	109
<b>Tabelle 5:</b> Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für Maus Tötung und BMDM Differenzierung.....	110
<b>Tabelle 6:</b> Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für die Isolation humaner PBMCs und Monozyten .....	111
<b>Tabelle 7:</b> Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für RNA-Isolation, rtPCR und qPCR .....	111
<b>Tabelle 8:</b> Sequenzen der verwendeten <i>Primer</i> für murine und humane Zielgene .....	113
<b>Tabelle 9:</b> Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für Proteinisolation und Western Blot.....	113
<b>Tabelle 10:</b> Verwendete Erstantikörper für das Western Blotting .....	115
<b>Tabelle 11:</b> Verwendete Zweitantikörper für das Western Blotting .....	115
<b>Tabelle 12:</b> Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für die Durchflusszytometrie .....	116
<b>Tabelle 13:</b> Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie humaner Proben ..	116
<b>Tabelle 14:</b> Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie muriner Proben,...	117

## 10 Materialien, Reagenzien, Geräte und Software

### 10.1 Allgemein

Tabelle 4: Allgemeine Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

	<b>Hersteller-Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>6-Well Platten</b>		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
<b>Analysewaage</b>	Sartorius ENTRIS	Sartorius AG, Göttingen, D
<b>Combi-Stopper</b>	Combi-Stopper-Verschlusskonnent	B. Braun Melsungen AG, D
<b>Dulbecco's 10x PBS</b>		CC pro GmbH, Oberdorla, D
<b>Ethylendiamintetraessigsäure</b>	EDTA	CC pro GmbH, Oberdorla, D
<b>Elektrische Pipettierhilfe</b>	PIPETBOY acu	INTEGRA Biosciences, Biebertal, D
<b>Eppendorf Tube (0,5, 1,5, 2 ml)</b>	Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg, D
<b>Eppendorf PCR Tube 0,5 ml</b>	Eppendorf PCR Tubes	Eppendorf, Hamburg, D
<b>Escherichia coli Lipopolysaccharid</b>	LPS EB Ultrapure	Invivogen, Toulouse, FR
<b>Ethanol (70, 80, 100 %)</b>		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)</b>	Greiner centrifuge tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
<b>Gefrierschrank (-80 °C)</b>	Hera freeze	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Glas Pasteurpipetten</b>	Pasteurpipetten, ohne Wattestopfen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Glukose</b>		CC pro GmbH, Oberdorla, D
<b>Inkubator</b>	HERA cell 150	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Magnetrührer</b>		IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, D
<b>Natrium Chlorid &gt; 99,5 %</b>		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Penicillin/Streptomycin</b>		CC pro GmbH, Oberdorla, D
<b>Pipettenspitzen (10, 20, 50, 200, 1000 µl)</b>	SafeSeal-Tips Professional	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
<b>Plattformschüttler</b>	Heidolph Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
<b>Präzisionspipetten (10, 20, 50, 200, 1000 µl)</b>	Eppendorf Research Plus	Eppendorf, Hamburg, D

<b>Präzisionspipetten (10, 20, 50, 200, 1000 µl)</b>	Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg, D
<b>Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25, 50 ml)</b>	Serologische Pipetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhäusen, D
<b>Sicherheitswerkbank</b>	Hera Safe KSP12	Hereaus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Software</b>	GraphPad Prism V 5.0	Graph Pad, La Jolla, Californien, USA
<b>Software</b>	Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
<b>Software</b>	Microsoft Word 2013	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
<b>Spritze (5, 10 ml)</b>	Injekt Solo	B. Braun Melsungen AG, D
<b>Steriles, apyrogenes Wasser</b>	Aqua B. Braun	B. Braun Melsungen AG, D
<b>Schüttelmischer</b>	Vortex-Genie 1 und 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA
<b>Zählkammer</b>	Neubauer-Zählkammer, verbessert	Brand, Wertheim/Main, D
<b>Zellfilter</b>	Cell Strainer (70 µm)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY, USA
<b>Zentrifuge</b>	Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Zentrifuge</b>	Eppendorf 5804	Eppendorf, Hamburg, D
<b>Zentrifuge</b>	Eppendorf 5402	Eppendorf, Hamburg, D
<b>Zentrifuge</b>	Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg, D

## 10.2 Stammzellisolation und BMDM Differenzierung

**Tabelle 5:** Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für Maus Tötung und BMDM Differenzierung

	<b>Hersteller Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>β-Mercaptoethanol</b>		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>iFBS</b>		CC pro GmbH, Oberdorla, D
<b>Kanüle, 26 G</b>	Sterican	B. Braun Melsungen AG, D
<b>L-Glutamin</b>		CC pro GmbH, Oberdorla, D
<b>Lyse-Puffer</b>	BD Pharm Lyse Lysing Buffer	BD Biosciences, San Jose, California, USA
<b>M-CSF</b>	Mouse M-CSF	Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, D
<b>Murinens kardiales Troponin I</b>	Mouse Cardiac Troponin-I	Life Diagnostics, Inc. West Chester, PA, USA
<b>NEAA</b>		CC pro GmbH, Oberdorla, D

<b>Protease Inhibitor</b>	cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
<b>QIAshredder Säulen</b>	QIAshredder Säulen	QIAGEN GmbH, Hilden, D
<b>RIPA-Puffer</b>	1x RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>RLT-Puffer</b>		QIAGEN GmbH, Hilden, D
<b>Zell Schaber</b>		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
<b>Zellkulturmedium</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	CC pro GmbH, Oberdorla, D
<b>Zellkulturmedium</b>	DMEM + 4,5g/l Glukose + 1 % L-Glutamin	CC pro GmbH, Oberdorla, D
<b>Zellkulturschale, 10 cm</b>		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

### 10.3 Isolation von humanen PBMCs und Monozyten

**Tabelle 6:** Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für die Isolation humaner PBMCs und Monozyten

	<b>Hersteller Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CCE Zentrifuge</b>	J6-MC	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA
<b>CCE Kammer</b>		Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA
<b>Dichte Gradienten Medium</b>	Histopaque 1077	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>Humanes Serum Albumin</b>	Albumin from human serum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>Pyruvat</b>	Sodium Pyruvate (100 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Zellkulturmedium</b>	GIBCO Macrophage-Serum-free Medium	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>Zellkulturschale, 15 cm</b>		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

### 10.4 RNA-Isolation, rt-PCR, qPCR

**Tabelle 7:** Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für RNA-Isolation, rtPCR und qPCR

	<b>Hersteller Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>96-Well Platte</b>	Multiplate PCR Plates 96-Well, clear	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Chloroform</b>		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

<b>DNase 1</b>		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>dNTP Mix</b>		Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>DTT-Puffer</b>	Super Script II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>First-Strand-Puffer, 5x</b>	Super Script II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>iScript cDNA Synthesis Kit</b>		Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Kühlständer</b>	IsoFreeze Tube Rack	Scientific Specialties Inc., Lodi, CA, USA
<b>PCR Tube (0,2 ml)</b>	Eppendorf PCR Tubes	Eppendorf, Hamburg, D
<b>PCR Master Mix, SYBR Green, 2x</b>	Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Warrington, UK
<b>PCR Master Mix, TaqMan</b>	TaqMan Gene Expression Master Mix	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>PCR-Thermocycler</b>	PCR-System Gene Amp 7500	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<b>Photometer</b>	Spektralphotometer Nano-Drop ND-1000	Peqlab – Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
<b>Primer und Sonde, TaqMan-Kit</b>	20x TaqMan Gene Expression Assay	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>QIA Shredder Säule</b>	QIA Shredder Säule	QIAGEN GmbH, Hilden, D
<b>QIAzol</b>	QIAzol	QIAGEN GmbH, Hilden, D
<b>qPCR-Gerät</b>	CFX96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Random Primers</b>	Random Primers	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>RDD-Puffer</b>	RNase-free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden, D
<b>Reverse Transkriptase</b>	Super Script II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>RNase-freies Wasser</b>	RNase free water	QIAGEN GmbH, Hilden, D
<b>RNase-Out</b>	RNase Out	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>RNeasy Mini Kit</b>	RNeasy Mini Säule	QIAGEN GmbH, Hilden, D
<b>RNeasy Mini Kit</b>	RPE-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden, D
<b>RNeasy Mini Kit</b>	RW1-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden, D
<b>RNeasy Mini Kit</b>	RWT-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden, D
<b>Software</b>	Bio-Rad CFX Manager V 3.0	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Software (Internet)</b>	NCBI <i>Primer-Blast</i> <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome</a>	
<b>Versiegelungsfolie</b>		Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Werkbank</b>	PCR Werkbank Captairbio	Erlab, Köln, D

**Tabelle 8:** Sequenzen der verwendeten *Primer* für murine und humane Zielgene

<b>Gen</b>	<b>5' Primer</b>	<b>3' Primer</b>	<b>Spezies</b>
Gapdh	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	AAGATGGTGATGGGCTTCCCG	Maus
GAPDH	TGTGGGCATCAATGGATTTGG	ACACCATGTATTCCGGGTCAAT	Mensch
Tnf- $\alpha$	CCAGTGTGGGAAGCTGTCTT	AAGCAAAAGAGGAGGCAACA	Maus
TNF- $\alpha$	GCCCAGGCAGTCAGATCATCTTC	TGAGGTACAGGCCCTCTGATGG	Mensch
Il-1 $\beta$	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	Maus
IL-1 $\beta$	TCCCCAGCCCTTTTGTGA	TTAGAACCAAATGTGGCCGTG	Mensch
Il-6	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC	GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG	Maus
IL-6	GTACATCCTCGACGGCATCTC	GGTTCAGGTTGTTTTCTGCCA	Mensch
Icam-1	GCCTTGGTAGAGGTGACTGAG	GACCGGAGCTGAAAAGTTGTA	Maus
ICAM-1	TTGGGCATAGAGACCCCGTT	GCACATTGCTCAGTTCATACACC	Mensch
Vcam-1	TGCCGAGCTAAATTACACATTG	CCTTGTGGAGGGATGTACAGA	Maus
VCAM-	GGGAAGATGGTCGTGATCCTT	TCTGGGGTGGTCTCGATTTTA	Mensch
Il-10	TTTGAATTCCCTGGGTGAGAA	GGAGAAATCGATGACAGCGC	Maus
IL-10	GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG	TCACATGCGCCTTGATGTCTG	Mensch
Tgf- $\beta$	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG	GGTTCATGTGATGGATGGTGC	Maus
Mrc-1	TAGTACCGGAGGGTGCAGAC	TTTGCATCAGTGAAGGTGGA	Maus
Arg-1	GGAATCTGCATGGGCAACCTGTGT	AGGGTCTACGTCTCGCAAGCCA	Maus
<b>Taq-</b>	<b>Primer-Sonden Paar</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Spezies</b>
TGF- $\beta$	Hs00998133_m1	Invitrogen	Mensch

## 10.5 Proteinisolation, Western Blot

**Tabelle 9:** Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für Proteinisolation und Western Blot

	<b>Hersteller Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>10x TRIS, Glycin, SDS-Puffer</b>		Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Bildaufnahme System</b>	ChemiDoc MP System	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Bovines Serum Albumin</b>	Protein Standard II	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D

<b>Bromphenolblau</b>		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Coomassie Blau</b>	Brillant Blau G 250	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Chemilumineszenz Substrat Lösung</b>	Clarity™ and Clarity Max™ Western ECL Blotting Sub- strates	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>DTT</b>		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>EDTA</b>		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>Elektrophorese Kammer</b>	Criterion™ Blotter	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Glycerin</b>		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>HEPES</b>		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>Leupeptin</b>		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>Mikrotiterplatten Schüttler</b>	Titramax 100	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwbach, D
<b>Milchpulver</b>		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Komigrationsstan- dard</b>	Precision Plus Protein™ Standard, Unstained	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Na2M004</b>		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>Netzteil</b>	Biorad Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>NP 40</b>	IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>Photometer</b>	SLT Spectra	LabInstruments GmbH Crailsheim, D
<b>PMSF</b>		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>Polysorbat 20</b>	Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>Ponceau Farbstoff</b>	Ponceau S solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
<b>PVDF Membran, Filterpapier</b>	Trans-Blot Turbo™ Transfer Packs	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>RC DC Protein As- say</b>	Reagent A, B, S	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Software</b>	Image Lab V 5.2.1	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Strep-Tactin-HRP Konjugat</b>	Precision Protein™ Strep- Tactin-HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Transfer Kammer</b>	Trans-Blot Turbo™ Transfer Unit	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>TRIS</b>		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

<b>Vorgefertigte Gele</b>	Criterion TGX 4-20 % Tris-Glycine	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D
<b>Vorgefertigte Gele</b>	Criterion XT 4-12 % Bis-Tris	Bio-Rad Laboratories Inc., München, D

**Tabelle 10:** Verwendete Erstantikörper für das Western Blotting

<b>Zielprotein</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Reaktivität</b>	<b>Verdünnung</b>
<b>GAPDH</b>	FL-335	Santa Cruz Biotechnology	Maus, Mensch	1:1000
<b>ICAM-1</b>	H-108	Santa Cruz Biotechnology	Mensch	1:1000
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	H-153	Santa Cruz Biotechnology	Maus, Mensch	1:1000
<b>IL-6</b>	Polyklonal	Abcam (ab6672)	Mensch	1:500
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Polyklonal	Abcam (ab53169)	Mensch	1:1000
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	L-19	Santa Cruz Biotechnology	Mensch	1:500
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	H-156	Santa Cruz Biotechnology	Maus	1:500

**Tabelle 11:** Verwendete Zweitantikörper für das Western Blotting

<b>Zielprotein</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Konjugat</b>
<b>Goat IgG (sc-2020)</b>	Santa Cruz Biotechnology	HRP
<b>Rabbit IgG (sc-2004)</b>	Santa Cruz Biotechnology	HRP
<b>Mouse IgG (sc-2005)</b>	Santa Cruz Biotechnology	HRP

## 10.6 Durchflusszytometrie

**Tabelle 12:** Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien für die Durchflusszytometrie

	<b>Hersteller Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Dimethylsulfoxid</b>	Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
<b>Durchflusszytometer</b>	FACScan	BD Biosciences, San Jose, California, USA
<b>Durchflusszytometer</b>	FACSVerse	BD Biosciences, San Jose, California, USA
<b>Durchflusszytometrie Tube</b>	5ml Round Bottom Polystyrene Test Tube	Corning Inc., Corning, New York, USA
<b>Färbe-Puffer</b>	Cell Staining Buffer	BioLegend Europe, London, UK
<b>Fc-Rezeptor Blocker</b>	Human TruStain FcX™	BioLegend Europe, London, UK
<b>Compensation beads</b>	ArC Amine Reactive Compensation Beads	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<b>Compensation beads</b>	BD ComBead	BD Biosciences, San Jose, California, USA
<b>Software</b>	BD FACSDiva	BD Biosciences, San Jose, California, USA
<b>Software</b>	BD FACSuite	BD Biosciences, San Jose, California, USA
<b>Vitalitäts Färbung</b>	LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit, for 405 nm	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

**Tabelle 13:** Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie humaner Proben

<b>Zielprotein</b>	<b>Funktion</b>	<b>Klon</b>	<b>Fluorophor</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Volumen</b>
<b>CD3</b>	T-Zell Rezeptor assoziiert, Signaltransduktion	UCHT1	APC-Cy7	BioLegend Europe, London, UK	3 µl
<b>CD14</b>	LPS-Rezeptor	M5E2	Alexa 488	BioLegend Europe, London, UK	5 µl
<b>CD16</b>	Fcγ-Rezeptor IIIa	3G8	Pacific blue	BioLegend Europe, London, UK	5 µl
<b>CD19</b>	B-Zell Aktivierung und Differenzierung	HIB19	PE	BioLegend-Europe, London, UK	2,5 µl
<b>CD56</b>	NCAM	MEM-188	PE-Cy7	BioLegend Europe, London, UK	3 µl

<b>CD66b</b>	Glykosylphosphatidyl- inositol-Anker-Protein	G10F5	PerCP-Cy5.5	BioLegend Europe, London, UK	3 µl
<b>HLA-DR</b>	HLA-Klasse-II Rezep- tor	L243	APC	BioLegend Europe, London, UK	3 µl

Modifiziert nach: Sack, U., Tárnok, A. und Rothe, G.H., *Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie*, in *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2007, Karger: Basel. p. pp 27-70

**Tabelle 14:** Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie muriner Proben,

<b>Zielprotein</b>	<b>Funktion</b>	<b>Klon</b>	<b>Fluorophor</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Volu-</b>
<b>CD11b</b>	Mac-1, Untereinheit des Komplement-Rezeptors 3	M1/70	APC- eFluor780	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	0,25 µl
<b>F4/80</b>	EMR1, Zell-Zell-Inter- aktion und Signaltransduktion	BM8.1	PE	Caltag, Buckingham, UK	2 µl
<b>MHC-II</b>	Antigenpräsentation	AF6- 120.1	PE-Cy7	BioLegend Europe, Lon- don, UK	1 µl

Modifiziert nach: Sack, U., Tárnok, A. und Rothe, G.H., *Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie*, in *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2007, Karger: Basel. p. pp 27-70

## 10.7 Zellkulturmedien, selbst hergestellte Pufferlösungen

### 1x PBS - Allgemein:

Aqua B. Braun, Dulbeccos' 10x PBS, Verhältnis 9:1

### Zellkulturmedium-1 - murine Knochenmarkstammzellen:

DMEM, 4,5 g/l Glukose, 1 % Glutamin, 1 % NEAA, 10 % iFBS, 1 % Penicillin-Streptomycin

### Zellkulturmedium-2 - BMDM:

DMEM, 4,5 g/l Glukose, 1 % Glutamin, 2,5 % iFBS, 1 % Penicillin-Streptomycin

#### Lösungspuffer - BMDM:

10 mM Glukose, 3 mM EDTA, 1x PBS

#### RIPA-Puffer (Lysepuffer) - BMDM

10 ml 1x RIPA-Puffer, vor Benutzung wird eine Tablette des cOmplete Mini Protease Inhibitors hinzugefügt.

#### Waschpuffer-1 – Gegenstromelutriation:

400 ml Aqua B. Braun, 50 ml 10x PBS, 25 ml 100mM Pyruvat, 25 ml 1x EDTA, 2,5 ml 20 % Albumin

#### Elutriationspuffer - Gegenstromelutriation:

800 ml Aqua B. Braun, 100 ml 10x PBS, 50 ml 100mM Pyruvat, 50 ml 1 % EDTA, 10 ml 10 % Glukose

#### Zellkulturmedium-3 - humane Monozyten:

1x Macrophage-Serum-free Medium + 1 % Penicillin/Streptomycin

#### WCE-Puffer – Proteinisolation

0,2 ml 1 M HEPES pH 7,8, 0,9 ml 5 M NaCl, 4 µl 0,5 M EDTA,  
0,1 ml 1 M Na<sub>2</sub>M<sub>0</sub>04, 2,5 ml Glycerin, 10 µl 1 M DTT, mit Aqua B. Braun auf 15 ml auffüllen, vor Benutzung werden pro ml hinzugefügt: 2 µl 0,25 M PMSF, 5 µl 1 % Leupeptin, 5 µl Aprotinin

#### Lösung A - Proteinbestimmung

Aus biorad RC DC Protein Assay: 20 µl Reagent S, 1 ml Reagent A

#### Ladepuffer - Western Blot

20 ml 1 M Tris, pH 6,8, 80 ml 10 % SDS, 0,4 g Bromphenolblau, 40 ml Glycerin, je 200 µl Ladepuffer werden vor Verwendung 50 µl 1 M DTT hinzugefügt.

#### Laufpuffer - Western Blot

Aqua B. Braun , 10x TRIS/Glycin/SDS-Puffer, Verhältnis 9:1

#### Blockpuffer - Western Blot

200 ml Waschpuffer, 12 g Milchpulver

Waschpuffer-2 - Western Blot

5 l Aqua B. Braun, 500 ml 10x PBS, 5 ml Tween 20

Gebrauchslösung des LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit - Durchflusszytometrie

Auflösen des Inhaltes eines *vials* in 50  $\mu$ l Dimethylsulfoxid, anschließend Herstellung einer 1 % Gebrauchslösung mit 1x PBS

## 11 Literaturverzeichnis

1. Abeles, R.D., et al., *CD14, CD16 and HLA-DR reliably identifies human monocytes and their subsets in the context of pathologically reduced HLA-DR expression by CD14(hi) /CD16(neg) monocytes: Expansion of CD14(hi) /CD16(pos) and contraction of CD14(lo) /CD16(pos) monocytes in acute liver failure*. Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology, 2012. **81**(10): p. 823-34.
2. Andrassy, M., et al., *High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart*. Circulation, 2008. **117**(25): p. 3216-26.
3. Aurora, A.B., et al., *Macrophages are required for neonatal heart regeneration*. The Journal of clinical investigation, 2014. **124**(3): p. 1382-92.
4. Baker, J.O., et al., *Cardiac myosin-binding protein C: a potential early biomarker of myocardial injury*. Basic research in cardiology, 2015. **110**(3): p. 23.
5. Barefield, D. and Sadayappan, S., *Phosphorylation and function of cardiac myosin binding protein-C in health and disease*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2010. **48**(5): p. 866-75.
6. Barefield, D.Y., et al., *Ablation of the calpain-targeted site in cardiac myosin binding protein-C is cardioprotective during ischemia-reperfusion injury*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2019. **129**: p. 236-246.
7. Bassols, A. and Massague, J., *Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans*. The Journal of biological chemistry, 1988. **263**(6): p. 3039-45.
8. Becker, L., et al., *Unique proteomic signatures distinguish macrophages and dendritic cells*. PloS one, 2012. **7**(3): p. e33297.
9. Behrens-Gawlik, V., et al., *MYBPC3 in hypertrophic cardiomyopathy: from mutation identification to RNA-based correction*. Pflugers Archiv : European journal of physiology, 2014. **466**(2): p. 215-23.
10. Bhuiyan, M.S., et al., *Determination of the critical residues responsible for cardiac myosin binding protein C's interactions*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2012. **53**(6): p. 838-47.
11. Bonocchi, R., et al., *Cytokine decoy and scavenger receptors as key regulators of immunity and inflammation*. Cytokine, 2016. **87**: p. 37-45.
12. Borna, C., et al., *High-sensitivity troponin T as a diagnostic tool for acute coronary syndrome in the real world: an observational study*. European journal of emergency medicine : official journal of the European Society for Emergency Medicine, 2014. **21**(3): p. 181-8.
13. Bou-Assaf, G.M., et al., *Complexation and Calcium-Induced Conformational Changes in the Cardiac Troponin Complex Monitored by Hydrogen/Deuterium Exchange and FT-ICR Mass Spectrometry*. International journal of mass spectrometry, 2011. **302**(1-3): p. 116-124.
14. Bournazou, I., et al., *Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(1): p. 20-32.

15. Brown, M. and Wittwer, C., *Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology*. Clinical chemistry, 2000. **46**(8 Pt 2): p. 1221-9.
16. Bujak, M., et al., *Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling*. The American journal of pathology, 2008. **173**(1): p. 57-67.
17. Bujak, M., et al., *Essential role of Smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling*. Circulation, 2007. **116**(19): p. 2127-38.
18. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Analytical biochemistry, 1981. **112**(2): p. 195-203.
19. Caldwell, J.E., et al., *Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin*. Biochemistry, 1989. **28**(21): p. 8506-14.
20. Chen, B. and Frangogiannis, N.G., *Immune cells in repair of the infarcted myocardium*. Microcirculation, 2017. **24**(1).
21. Chen, B. and Frangogiannis, N.G., *Chemokines in Myocardial Infarction*. Journal of cardiovascular translational research, 2021. **14**(1): p. 35-52.
22. Cleutjens, J.P., et al., *Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart*. The American journal of pathology, 1995. **147**(2): p. 325-38.
23. Cohn, J.N., Ferrari, R., and Sharpe, N., *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling*. Journal of the American College of Cardiology, 2000. **35**(3): p. 569-82.
24. Colson, B.A., et al., *Site-directed spectroscopy of cardiac myosin-binding protein C reveals effects of phosphorylation on protein structural dynamics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016. **113**(12): p. 3233-8.
25. Copeland, O., et al., *Analysis of cardiac myosin binding protein-C phosphorylation in human heart muscle*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2010. **49**(6): p. 1003-11.
26. Craig, R., et al., *Structure, sarcomeric organization, and thin filament binding of cardiac myosin-binding protein-C*. Pflugers Archiv : European journal of physiology, 2014. **466**(3): p. 425-31.
27. Craig, R. and Offer, G., *The location of C-protein in rabbit skeletal muscle*. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 1976. **192**(1109): p. 451-61.
28. de Couto, G., et al., *Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction*. The Journal of clinical investigation, 2015. **125**(8): p. 3147-62.
29. de Haan, J.J., et al., *Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction*. Mediators of inflammation, 2013. **2013**: p. 206039.
30. de Kleijn, D.P.V., et al., *Toll-like receptor 7 deficiency promotes survival and reduces adverse left ventricular remodelling after myocardial infarction*. Cardiovascular research, 2019. **115**(12): p. 1791-1803.

31. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. The Journal of experimental medicine, 1991. **174**(5): p. 1209-20.
32. Decker, R.S., et al., *Myosin-binding protein C phosphorylation, myofibril structure, and contractile function during low-flow ischemia*. Circulation, 2005. **111**(7): p. 906-12.
33. Decker, R.S., et al., *The dynamic role of cardiac myosin binding protein-C during ischemia*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2012. **52**(5): p. 1145-54.
34. Dewald, O., et al., *CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts*. Circulation research, 2005. **96**(8): p. 881-9.
35. Di Lisa, F., et al., *Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation*. The Biochemical journal, 1995. **308** ( Pt 1): p. 57-61.
36. Dobaczewski, M., Chen, W., and Frangogiannis, N.G., *Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2011. **51**(4): p. 600-6.
37. Dominguez, R. and Holmes, K.C., *Actin structure and function*. Annual review of biophysics, 2011. **40**: p. 169-86.
38. Dutta, P. and Nahrendorf, M., *Monocytes in myocardial infarction*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2015. **35**(5): p. 1066-70.
39. El-Armouche, A., et al., *Molecular determinants of altered Ca<sup>2+</sup> handling in human chronic atrial fibrillation*. Circulation, 2006. **114**(7): p. 670-80.
40. El-Armouche, A., et al., *Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts*. Cardiovascular research, 2004. **61**(1): p. 87-93.
41. El-Armouche, A., et al., *Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2007. **43**(2): p. 223-9.
42. Flashman, E., et al., *Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease*. Circulation research, 2004. **94**(10): p. 1279-89.
43. Fortier, A.H. and Falk, L.A., *Isolation of murine macrophages*. Current protocols in immunology, 2001. **Chapter 14**: p. Unit 14 1.
44. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair*. Circulation research, 2012. **110**(1): p. 159-73.
45. Frangogiannis, N.G., *The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities*. Journal of cardiovascular pharmacology, 2014. **63**(3): p. 185-95.
46. Frangogiannis, N.G., *The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling*. Nature reviews. Cardiology, 2014. **11**(5): p. 255-65.
47. Frangogiannis, N.G., *How do endosomal Toll-like receptors sense and extend ischaemic myocardial injury?* Cardiovascular research, 2019. **115**(12): p. 1687-1689.

48. Frangogiannis, N.G., et al., *Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion*. *Circulation*, 1998. **98**(7): p. 699-710.
49. Frangogiannis, N.G., et al., *MCSF expression is induced in healing myocardial infarcts and may regulate monocyte and endothelial cell phenotype*. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 2003. **285**(2): p. H483-92.
50. Fuss, I.J., et al., *Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood*. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]*, 2009. **Chapter 7**: p. Unit7 1.
51. Gantner, F., et al., *In vitro differentiation of human monocytes to macrophages: change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor-alpha release by PDE inhibitors*. *British journal of pharmacology*, 1997. **121**(2): p. 221-31.
52. Gautel, M., et al., *Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction?* *The EMBO journal*, 1995. **14**(9): p. 1952-60.
53. Gerhardt, T. and Ley, K., *Monocyte trafficking across the vessel wall*. *Cardiovascular research*, 2015. **107**(3): p. 321-30.
54. Gombozhapova, A., et al., *Macrophage activation and polarization in post-infarction cardiac remodeling*. *Journal of biomedical science*, 2017. **24**(1): p. 13.
55. Gordon, A.M., Homsher, E., and Regnier, M., *Regulation of contraction in striated muscle*. *Physiological reviews*, 2000. **80**(2): p. 853-924.
56. Gordon, J.W., Shaw, J.A., and Kirshenbaum, L.A., *Multiple facets of NF-kappaB in the heart: to be or not to NF-kappaB*. *Circulation research*, 2011. **108**(9): p. 1122-32.
57. Govindan, S., et al., *Increase in cardiac myosin binding protein-C plasma levels is a sensitive and cardiac-specific biomarker of myocardial infarction*. *American journal of cardiovascular disease*, 2013. **3**(2): p. 60-70.
58. Govindan, S., et al., *Cardiac myosin binding protein-C is a potential diagnostic biomarker for myocardial infarction*. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2012. **52**(1): p. 154-64.
59. 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*, 2012. **33**(1): p. 17-30.
60. Gruen, M. and Gautel, M., *Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin-binding protein-C*. *Journal of molecular biology*, 1999. **286**(3): p. 933-49.
61. Gupta, M.K. and Robbins, J., *Post-translational control of cardiac hemodynamics through myosin binding protein C*. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 2014. **466**(2): p. 231-6.
62. Gwechenberger, M., et al., *Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions*. *Circulation*, 1999. **99**(4): p. 546-51.
63. Heimbeck, I., et al., *Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14+CD16++ monocytes in females*. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2010. **77**(9): p. 823-30.

64. Hilgendorf, I., et al., *Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium*. *Circulation research*, 2014. **114**(10): p. 1611-22.
65. Hofmann, P.A., Greaser, M.L., and Moss, R.L., *C-protein limits shortening velocity of rabbit skeletal muscle fibres at low levels of Ca<sup>2+</sup> activation*. *The Journal of physiology*, 1991. **439**: p. 701-15.
66. Holmes, J.W., Borg, T.K., and Covell, J.W., *Structure and mechanics of healing myocardial infarcts*. *Annual review of biomedical engineering*, 2005. **7**: p. 223-53.
67. Holmes, K.C., et al., *Atomic model of the actin filament*. *Nature*, 1990. **347**(6288): p. 44-9.
68. Hou, F.F., et al., *Phenotypic and functional characteristics of macrophage-like cells differentiated in pro-inflammatory cytokine-containing cultures*. *Immunology and cell biology*, 2000. **78**(3): p. 205-13.
69. Huebener, P., et al., *CD44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response*. *Journal of immunology*, 2008. **180**(4): p. 2625-33.
70. Hulsmans, M., Sam, F., and Nahrendorf, M., *Monocyte and macrophage contributions to cardiac remodeling*. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2016. **93**: p. 149-55.
71. Huxley, A.F. and Niedergerke, R., *Measurement of the striations of isolated muscle fibres with the interference microscope*. *The Journal of physiology*, 1958. **144**(3): p. 403-25.
72. Huxley, H. and Hanson, J., *Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation*. *Nature*, 1954. **173**(4412): p. 973-6.
73. Inserte, J., Hernando, V., and Garcia-Dorado, D., *Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury*. *Cardiovascular research*, 2012. **96**(1): p. 23-31.
74. Jacquet, S., et al., *Identification of cardiac myosin-binding protein C as a candidate biomarker of myocardial infarction by proteomics analysis*. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2009. **8**(12): p. 2687-99.
75. Kaier, T.E., Alaour, B., and Marber, M., *Cardiac Myosin-Binding Protein C-From Bench to Improved Diagnosis of Acute Myocardial Infarction*. *Cardiovascular drugs and therapy*, 2019.
76. Kaier, T.E., et al., *Cardiac Myosin-Binding Protein C to Diagnose Acute Myocardial Infarction in the Pre-Hospital Setting*. *Journal of the American Heart Association*, 2019. **8**(15): p. e013152.
77. Kaier, T.E., et al., *Direct Comparison of Cardiac Myosin-Binding Protein C With Cardiac Troponins for the Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction*. *Circulation*, 2017. **136**(16): p. 1495-1508.
78. 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*, 1994. **94**(3): p. 1026-36.

79. Kawamura, A., et al., *Changes in the expression of leukocyte adhesion molecules throughout the acute phase of myocardial infarction*. Journal of atherosclerosis and thrombosis, 2004. **11**(1): p. 29-34.
80. Kensler, R.W., Craig, R., and Moss, R.L., *Phosphorylation of cardiac myosin binding protein C releases myosin heads from the surface of cardiac thick filaments*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017. **114**(8): p. E1355-E1364.
81. Korman, V.L. and Tobacman, L.S., *Mutations in actin subdomain 3 that impair thin filament regulation by troponin and tropomyosin*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(32): p. 22191-6.
82. Kratofil, R.M., Kubes, P., and Deniset, J.F., *Monocyte Conversion During Inflammation and Injury*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2017. **37**(1): p. 35-42.
83. Kukielka, G.L., et al., *Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo*. The Journal of clinical investigation, 1995. **95**(1): p. 89-103.
84. Kuster, D.W., et al., *Cardiac myosin binding protein C phosphorylation in cardiac disease*. Journal of muscle research and cell motility, 2012. **33**(1): p. 43-52.
85. Kuster, D.W., et al., *Release kinetics of circulating cardiac myosin binding protein-C following cardiac injury*. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2014. **306**(4): p. H547-56.
86. Kuster, D.W. and Sadayappan, S., *MYBPC3's alternate ending: consequences and therapeutic implications of a highly prevalent 25 bp deletion mutation*. Pflugers Archiv : European journal of physiology, 2014. **466**(2): p. 207-13.
87. Kuster, D.W., et al., *GSK3beta phosphorylates newly identified site in the proline-alanine-rich region of cardiac myosin-binding protein C and alters cross-bridge cycling kinetics in human: short communication*. Circulation research, 2013. **112**(4): p. 633-9.
88. Lavine, K.J., et al., *Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**(45): p. 16029-34.
89. Lee, K., et al., *Orientation of myosin binding protein C in the cardiac muscle sarcomere determined by domain-specific immuno-EM*. Journal of molecular biology, 2015. **427**(2): p. 274-86.
90. Li, J., et al., *VEGF, flk-1, andflt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis*. The American journal of physiology, 1996. **270**(5 Pt 2): p. H1803-11.
91. Lin, B.L., Song, T., and Sadayappan, S., *Myofilaments: Movers and Rulers of the Sarcomere*. Comprehensive Physiology, 2017. **7**(2): p. 675-692.
92. Lipps, C., et al., *Eternity and functionality - rational access to physiologically relevant cell lines*. Biological chemistry, 2013. **394**(12): p. 1637-48.
93. 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, 2016. **99**: p. 47-56.

94. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods*, 2001. **25**(4): p. 402-8.
95. Lorenz, M. and Holmes, K.C., *The actin-myosin interface*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010. **107**(28): p. 12529-34.
96. Lowey, S. and Trybus, K.M., *Role of skeletal and smooth muscle myosin light chains*. *Biophysical journal*, 1995. **68**(4 Suppl): p. 120S-126S; discussion 126S-127S.
97. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *The Journal of biological chemistry*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
98. Luther, P.K., et al., *Understanding the organisation and role of myosin binding protein C in normal striated muscle by comparison with MyBP-C knockout cardiac muscle*. *Journal of molecular biology*, 2008. **384**(1): p. 60-72.
99. Lynch, T.L. and 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*, 2014. **8**(7-8): p. 569-77.
100. Lynch, T.L.t., et al., *Cardiac inflammation in genetic dilated cardiomyopathy caused by MYBPC3 mutation*. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2017. **102**: p. 83-93.
101. Lynch, T.L.t., et al., *Cardiac Myosin Binding Protein-C Autoantibodies are Potential Early Indicators of Cardiac Dysfunction and Patient Outcome in Acute Coronary Syndrome*. *JACC. Basic to translational science*, 2017. **2**(2): p. 122-131.
102. Mamidi, R., et al., *Cardiac myosin binding protein-C Ser302 phosphorylation regulates cardiac beta-adrenergic reserve*. *Science advances*, 2017. **3**(3): p. e1602445.
103. Mann, D.L., *The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls*. *Circulation research*, 2011. **108**(9): p. 1133-45.
104. Margossian, S.S., *Reversible dissociation of dog cardiac myosin regulatory light chain 2 and its influence on ATP hydrolysis*. *The Journal of biological chemistry*, 1985. **260**(25): p. 13747-54.
105. Margossian, S.S. and Lowey, S., *Substructure of the myosin molecule. IV. Interactions of myosin and its subfragments with adenosine triphosphate and F-actin*. *Journal of molecular biology*, 1973. **74**(3): p. 313-30.
106. Marjot, J., et al., *The development and application of a high-sensitivity immunoassay for cardiac myosin-binding protein C*. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 2016. **170**: p. 17-25 e1-5.
107. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. *Journal of immunology*, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
108. Matsumoto, Y., Park, I.K., and 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*, 2007. **170**(1): p. 43-51.
109. Matsumoto, Y., et al., *C protein-induced myocarditis and subsequent dilated cardiomyopathy: rescue from death and prevention of dilated cardiomyopathy by chemokine receptor DNA therapy*. *Journal of immunology*, 2004. **173**(5): p. 3535-41.

110. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annual review of immunology, 1994. **12**: p. 991-1045.
111. Maznyczka, A., Kaier, T., and Marber, M., *Troponins and other biomarkers in the early diagnosis of acute myocardial infarction*. Postgraduate medical journal, 2015. **91**(1076): p. 322-30.
112. McKillop, D.F. and Geeves, M.A., *Regulation of the interaction between actin and myosin subfragment 1: evidence for three states of the thin filament*. Biophysical journal, 1993. **65**(2): p. 693-701.
113. McNamara, J.W. and Sadayappan, S., *Skeletal myosin binding protein-C: An increasingly important regulator of striated muscle physiology*. Archives of biochemistry and biophysics, 2018. **660**: p. 121-128.
114. Moos, C., et al., *The binding of skeletal muscle C-protein to F-actin, and its relation to the interaction of actin with myosin subfragment-1*. Journal of molecular biology, 1978. **124**(4): p. 571-86.
115. Moos, C., et al., *Interaction of C-protein with myosin, myosin rod and light meromyosin*. Journal of molecular biology, 1975. **97**(1): p. 1-9.
116. Moss, R.L., *Cardiac myosin-binding protein C: A protein once at loose ends finds its regulatory groove*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016. **113**(12): p. 3133-5.
117. Moss, R.L., Fitzsimons, D.P., and Ralphe, J.C., *Cardiac MyBP-C regulates the rate and force of contraction in mammalian myocardium*. Circulation research, 2015. **116**(1): p. 183-92.
118. Mosser, D.M. and Edwards, J.P., *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nature reviews. Immunology, 2008. **8**(12): p. 958-69.
119. Mullis, K.B. and Faloona, F.A., *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in enzymology, 1987. **155**: p. 335-50.
120. Mun, J.Y., et al., *Electron microscopy and 3D reconstruction of F-actin decorated with cardiac myosin-binding protein C (cMyBP-C)*. Journal of molecular biology, 2011. **410**(2): p. 214-25.
121. Mun, J.Y., et al., *Myosin-binding protein C displaces tropomyosin to activate cardiac thin filaments and governs their speed by an independent mechanism*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014. **111**(6): p. 2170-5.
122. Murakami, U., Uchida, K., and Hiratsuka, T., *Cardiac myosin from pig heart ventricle. Purification and enzymatic properties*. Journal of biochemistry, 1976. **80**(3): p. 611-9.
123. Nahrendorf, M., Pittet, M.J., and Swirski, F.K., *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction*. Circulation, 2010. **121**(22): p. 2437-45.
124. Nahrendorf, M., et al., *The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions*. The Journal of experimental medicine, 2007. **204**(12): p. 3037-47.

125. Netea, M.G., et al., *Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages*. *Blood*, 2009. **113**(10): p. 2324-35.
126. Neumann, J., *Altered phosphatase activity in heart failure, influence on Ca<sup>2+</sup> movement*. *Basic research in cardiology*, 2002. **97 Suppl 1**: p. I91-5.
127. Neumann, J.T., et al., *Application of High-Sensitivity Troponin in Suspected Myocardial Infarction*. *The New England journal of medicine*, 2019. **380**(26): p. 2529-2540.
128. Offer, G., Moos, C., and Starr, R., *A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. Extractions, purification and characterization*. *Journal of molecular biology*, 1973. **74**(4): p. 653-76.
129. Perry, S.V., *Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function*. *Journal of muscle research and cell motility*, 2001. **22**(1): p. 5-49.
130. Pfuhl, M. and Gautel, M., *Structure, interactions and function of the N-terminus of cardiac myosin binding protein C (MyBP-C): who does what, with what, and to whom?* *Journal of muscle research and cell motility*, 2012. **33**(1): p. 83-94.
131. Pinto, A.R., et al., *Revisiting Cardiac Cellular Composition*. *Circulation research*, 2016. **118**(3): p. 400-9.
132. Platzer, C., et al., *Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs*. *International immunology*, 1995. **7**(4): p. 517-23.
133. Preller, M. and Manstein, D.J., *Myosin structure, allostery, and mechanochemistry*. *Structure*, 2013. **21**(11): p. 1911-22.
134. Previs, M.J., et al., *Molecular mechanics of cardiac myosin-binding protein C in native thick filaments*. *Science*, 2012. **337**(6099): p. 1215-8.
135. Previs, M.J., et al., *Phosphorylation and calcium antagonistically tune myosin-binding protein C's structure and function*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016. **113**(12): p. 3239-44.
136. Radecke, C.E., et al., *Coronary artery endothelial cells and microparticles increase expression of VCAM-1 in myocardial infarction*. *Thrombosis and haemostasis*, 2015. **113**(3): p. 605-16.
137. Ratti, J., et al., *Structure and interactions of myosin-binding protein C domain C0: cardiac-specific regulation of myosin at its neck?* *The Journal of biological chemistry*, 2011. **286**(14): p. 12650-8.
138. 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*, 2006. **281**(47): p. 35846-54.
139. 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*, 2013. **113**(5): p. 553-61.
140. Ren, G., et al., *Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts*. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 2002. **50**(1): p. 71-9.

141. Roffi, M., et al., *2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. European heart journal, 2016. **37**(3): p. 267-315.
142. Ruparelia, N., et al., *Acute myocardial infarction activates distinct inflammation and proliferation pathways in circulating monocytes, prior to recruitment, and identified through conserved transcriptional responses in mice and humans*. European heart journal, 2015. **36**(29): p. 1923-34.
143. Sack, U., Tárnok, A., and Rothe, G.H., *Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie*, in *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. 2007, Karger: Basel. p. pp 27-70.
144. Sadayappan, S. and de Tombe, P.P., *Cardiac myosin binding protein-C as a central target of cardiac sarcomere signaling: a special mini review series*. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology, 2013. **466**(2): p. 195-200.
145. Sadayappan, S., et al., *Cardiac myosin-binding protein-C phosphorylation and cardiac function*. Circulation research, 2005. **97**(11): p. 1156-63.
146. Sadayappan, S., et al., *Cardiac myosin binding protein C phosphorylation is cardioprotective*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(45): p. 16918-23.
147. Sanderson, R.J., et al., *Design principles for a counterflow centrifugation cell separation chamber*. Analytical biochemistry, 1976. **71**(2): p. 615-22.
148. Saxena, A., et al., *IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium*. Journal of immunology, 2013. **191**(9): p. 4838-48.
149. Saxena, A., et al., *The role of Interleukin Receptor Associated Kinase (IRAK)-M in regulation of myofibroblast phenotype in vitro, and in an experimental model of non-reperfused myocardial infarction*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2015. **89**(Pt B): p. 223-31.
150. Schulte, C., et al., *Comparative Analysis of Circulating Noncoding RNAs Versus Protein Biomarkers in the Detection of Myocardial Injury*. Circulation research, 2019. **125**(3): p. 328-340.
151. Sconocchia, G., et al., *Phenotype and function of a CD56+ peripheral blood monocyte*. Leukemia, 2005. **19**(1): p. 69-76.
152. Sica, A. and Mantovani, A., *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. The Journal of clinical investigation, 2012. **122**(3): p. 787-95.
153. Silvis, M.J.M., et al., *Damage-Associated Molecular Patterns in Myocardial Infarction and Heart Transplantation: The Road to Translational Success*. Frontiers in immunology, 2020. **11**: p. 599511.
154. Skrzeczynska-Moncznik, J., et al., *Peripheral blood CD14<sup>high</sup> CD16<sup>+</sup> monocytes are main producers of IL-10*. Scandinavian journal of immunology, 2008. **67**(2): p. 152-9.
155. Soehnlein, O. and Lindbom, L., *Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation*. Nature reviews. Immunology, 2010. **10**(6): p. 427-39.

156. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. Journal of molecular biology, 1975. **98**(3): p. 503-17.
157. Speckmann, E.-J., Hescheler, J., and Köhling, R., *Physiologie, 5. Auflage*, 2008, Elsevier, Urban & Fischer München. p. 174-176; 389.
158. Spudich, J.A., *The myosin mesa and a possible unifying hypothesis for the molecular basis of human hypertrophic cardiomyopathy*. Biochemical Society transactions, 2015. **43**(1): p. 64-72.
159. Stahl, P.D. and Ezekowitz, R.A., *The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense*. Current opinion in immunology, 1998. **10**(1): p. 50-5.
160. Staines, K., et al., *Evolution of an expanded mannose receptor gene family*. PloS one, 2014. **9**(11): p. e110330.
161. Stansfield, B.K. and Ingram, D.A., *Clinical significance of monocyte heterogeneity*. Clinical and translational medicine, 2015. **4**: p. 5.
162. Starr, R. and Offer, G., *Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations*. Federation of European Biochemical Societies Letters, 1971. **15**(1): p. 40-44.
163. Starr, R. and Offer, G., *The interaction of C-protein with heavy meromyosin and subfragment-2*. The Biochemical journal, 1978. **171**(3): p. 813-6.
164. Steg, P.G., et al., *ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation*. European heart journal, 2012. **33**(20): p. 2569-619.
165. Sweeney, H.L. and Houdusse, A., *Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism*. Annual review of biophysics, 2010. **39**: p. 539-57.
166. Takeda, N., et al., *Differential activation and antagonistic function of HIF- $\alpha$  isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis*. Genes & development, 2010. **24**(5): p. 491-501.
167. Thygesen, K., et al., *Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018)*. Journal of the American College of Cardiology, 2018. **72**(18): p. 2231-2264.
168. Tong, C.W., et al., *Cardiac myosin-binding protein-C is a critical mediator of diastolic function*. Pflugers Archiv : European journal of physiology, 2014. **466**(3): p. 451-7.
169. Tong, C.W., et al., *Acceleration of crossbridge kinetics by protein kinase A phosphorylation of cardiac myosin binding protein C modulates cardiac function*. Circulation research, 2008. **103**(9): p. 974-82.
170. Tonino, P., et al., *Fine mapping titin's C-zone: Matching cardiac myosin-binding protein C stripes with titin's super-repeats*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2019. **133**: p. 47-56.
171. Townsend, N., et al., *Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016*. European heart journal, 2016. **37**(42): p. 3232-3245.
172. Troidl, C., et al., *Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction*. Journal of cellular and molecular medicine, 2009. **13**(9B): p. 3485-96.

173. Uyeda, T.Q., Abramson, P.D., and Spudich, J.A., *The neck region of the myosin motor domain acts as a lever arm to generate movement*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(9): p. 4459-64.
174. Van Eyk, J.E., et al., *Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa-force relation*. Circulation research, 1998. **82**(2): p. 261-71.
175. Verreck, F.A., et al., *Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation*. Journal of leukocyte biology, 2006. **79**(2): p. 285-93.
176. Wahl, A.F. and Donaldson, K.L., *Centrifugal elutriation to obtain synchronous populations of cells*. Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.], 2001. **Chapter 8**: p. Unit 8 5.
177. Wahl, L.M., et al., *Isolation of human monocyte populations*. Current protocols in immunology, 2006. **Chapter 7**: p. Unit 7 6A.
178. Wan, E., et al., *Enhanced efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes through myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase links acute inflammation resolution to cardiac repair after infarction*. Circulation research, 2013. **113**(8): p. 1004-12.
179. Warren, M.K. and Vogel, S.N., *Bone marrow-derived macrophages: development and regulation of differentiation markers by colony-stimulating factor and interferons*. Journal of immunology, 1985. **134**(2): p. 982-9.
180. Weith, A., et al., *Unique single molecule binding of cardiac myosin binding protein-C to actin and phosphorylation-dependent inhibition of actomyosin motility requires 17 amino acids of the motif domain*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2012. **52**(1): p. 219-27.
181. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie unter Mitarbeit von Thomas Deller, 3. Auflage*, 2010, Elsevier, Urban & Fischer: München. p. 124-139.
182. Winkelmann, D.A., Baker, T.S., and Rayment, I., *Three-dimensional structure of myosin subfragment-1 from electron microscopy of sectioned crystals*. The Journal of cell biology, 1991. **114**(4): p. 701-13.
183. 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, 2014. **289**(13): p. 8818-27.
184. Wong, K.L., et al., *Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets*. Blood, 2011. **118**(5): p. e16-31.
185. Yamamoto, K. and Moos, C., *The C-proteins of rabbit red, white, and cardiac muscles*. The Journal of biological chemistry, 1983. **258**(13): p. 8395-401.
186. Yang, Z., Zingarelli, B., and Szabo, C., *Crucial role of endogenous interleukin-10 production in myocardial ischemia/reperfusion injury*. Circulation, 2000. **101**(9): p. 1019-26.
187. Yasuda, M., et al., *Complete primary structure of chicken cardiac C-protein (MyBP-C) and its expression in developing striated muscles*. Journal of molecular and cellular cardiology, 1995. **27**(10): p. 2275-86.

188. Yuan, C., et al., *Myosin binding protein C is differentially phosphorylated upon myocardial stunning in canine and rat hearts-- evidence for novel phosphorylation sites*. Proteomics, 2006. **6**(14): p. 4176-86.
189. Zhang, X., Goncalves, R., and Mosser, D.M., *The isolation and characterization of murine macrophages*. Current protocols in immunology, 2008. **Chapter 14**: p. Unit 14 1.
190. Zougari, Y., et al., *B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction*. Nature medicine, 2013. **19**(10): p. 1273-80.
191. Zymek, P., et al., *Interleukin-10 is not a critical regulator of infarct healing and left ventricular remodeling*. Cardiovascular research, 2007. **74**(2): p. 313-22.

## 12 Publikationsverzeichnis

Aus Gründen der Aktualität wurden, bereits vor Fertigstellung der vorgelegten Arbeit, Teile in folgenden Formaten veröffentlicht:

### Originalartikel:

Lipps, C., Nguyen, J.H., Pyttel, L., Lynch, T.L. th, Liebetrau, C., Aleshcheva, G., Voss, S., Dörr, O. Nef, H., Möllmann, H., Hamm, C.W., Sadayappan, S., Troidl, C., *N-terminal fragment of cardiac myosin binding protein-C triggers pro-inflammatory responses in vitro*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2016. **99**: p. 47-56.

### Postervorträge:

Lipps, C., Nguyen, J.H., Pyttel, L., Lynch, T.L. th, Liebetrau, C., Aleshcheva, G., Voss, S., Dörr, O. Nef, H., Möllmann, H., Hamm, C.W., Sadayappan, S., Troidl, C., *N-terminal fragment of cardiac myosin binding protein-C triggers proinflammatory responses in vitro*. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V., Mannheim, 21.04.2017

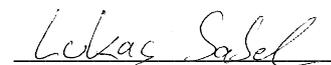
Lipps, C., Nguyen, J.H., Pyttel, L., Lynch, T.L. th, Liebetrau, C., Aleshcheva, G., Voss, S., Dörr, O. Nef, H., Möllmann, H., Hamm, C.W., Sadayappan, S., Troidl, C., *The role of the N-terminal fragment of cardiac myosin binding protein-C in the initiation of inflammation in cardiovascular diseases*, European Society of Cardiology Congress 2016, Rom, 29.08.2016

### 13 Ehrenwörtliche 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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.

Leipzig, 18.05.2022

Ort/Datum



Unterschrift

## 14 Danksagung

Ich danke meinem Betreuer und Laborleiter, Herrn PD Dr. phil. nat. C. Troidl, sehr herzlich für die Möglichkeit dieses interessante Thema im Rahmen meiner Dissertation bearbeiten zu können und die gesamte damit verbundene Zusammenarbeit. Ebenso danke ich Herrn Dr. med. C. Lipps für die maßgebliche Erstellung der Publikation, die Unterstützung bei der Versuchsplanung und den fachlichen Austausch. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. med. C. W. Hamm, Herrn Prof. Dr. med. T. Keller, Herrn Prof. Dr. med. C. Liebetrau und Herrn Prof. Dr. med. H. Nef, den Leitern und Forschungsleitern des Kerckhoff Herzforschungsinstituts, unter deren Dach und mit deren Unterstützung diese Arbeit realisiert werden konnte. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. med. J. Hoffmann, Herrn Prof. Dr. med. C. Liebetrau und Herrn Prof. Dr. med. H. Möllmann für die Betreuung und Förderung meiner allerersten wissenschaftlichen Schritte sowie für die Mitautorenschaft in der entstandenen Publikation sehr danken. Ganz besonders möchte ich Frau O. Bechtgoldt, Frau A. Kirchhof, Frau B. Parviz, Frau M. Rieschel, Frau S. Sass, Frau N. Staubach und Frau A. Weber für die fachlich exzellente, geduldige und zwischenmenschlich wunderbare Unterstützung sowie Anleitung bei der praktischen Laborarbeit danken. Ich danke Herrn Prof. S. Sadayappan und seiner Arbeitsgruppe (University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio, USA) für die zur Verfügung gestellten cMyBP-C-Fragmente sowie für die Möglichkeit, die Ergebnisse persönlich vorzustellen und zu diskutieren. Ich danke Frau Prof. Dr. K. Troidl und ihren Mitarbeitern (Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim) für die zur Verfügung gestellten murinen Knochenmarkstammzellen. Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Bein und seinen Mitarbeitern (Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin des UKGM, Gießen) für die Durchführungen der Blutentnahmen im Rahmen der Blutspende und die zur Verfügung gestellten buffy coats. Weiterhin danke ich allen Doktoranden, insbesondere P. Thiele, für die gute Zeit im und auch außerhalb des Labors.

Abschließend danke ich meiner Ehefrau Magdalena sowie meiner Familie dafür, dass sie unermüdlich geholfen haben mich zu motivieren diese Arbeit fertigzustellen.