

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und  
Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin III  
Schwerpunkt: Kardiologie und Kreislaufkrankungen

**Die Wirkung von HMGB1 auf die Interaktion von Thrombozyten  
und Monozyten in Survival-, Migrations- und Phagozytose-Assays**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Graef, Philipp**

**2019**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. P. Gawaz

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. P. Berg

Tag der Disputation: 15.03.2019

## **Meiner Familie**

„Da es sehr förderlich für die Gesundheit ist,  
habe ich beschlossen, glücklich zu sein.“

Voltaire

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in der Dissertationsschrift das generische Maskulinum verwendet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für Frauen und Männer.

## Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis.....	VII
II	Abkürzungsverzeichnis .....	IX
1	Einleitung .....	1
1.1	Thrombose.....	2
1.2	Myokardinfarkt.....	6
1.3	HMGB1 und sein Einfluss auf die Pathophysiologie kardiovaskulärer Krankheiten ....	11
1.4	Therapie kardiovaskulärer Krankheiten .....	18
1.5	Ziel der Arbeit .....	22
2	Material und Methoden .....	24
2.1	Materialien .....	24
2.2	Methoden.....	37
2.2.1	Monozyten (Kultivierung und Isolierung) .....	37
2.2.2	HT-22-Zellen (Kultivierung und Isolierung) .....	39
2.2.3	Thrombozyten-Isolierung.....	39
2.2.4	Apoptose-Assay .....	41
2.2.5	Migrations-Assay .....	42
2.2.6	Phagozytose-Assay.....	44
2.2.7	Durchflusszytometrie mittels FACS ( <i>fluorescence-activated cell sorter</i> ) .....	44
2.2.8	Gelelektrophorese und Western Blot .....	48
2.2.9	Statistische Auswertung .....	52
3	Ergebnisse .....	53
3.1	Migrations-Assay .....	53
3.1.1	Migrations-Assay Versuchsreihe 1.1 .....	53
3.1.2	Migrations-Assay Versuchsreihe 1.2 .....	55
3.1.3	Migrations-Assay Versuchsreihe 1.3 .....	56
3.1.4	Migrations-Assay Versuchsreihe 2.1 .....	57
3.1.5	Migrations-Assay Versuchsreihe 2.2 .....	59
3.2	Survival-Assay .....	61
3.2.1	Survival-Assay Versuchsreihe 1 .....	61
3.2.2	Survival-Assay Versuchsreihe 2.1 .....	64
3.2.3	Survival-Assay Versuchsreihe 2.2 .....	65
3.2.4	Survival-Assay Versuchsreihe 2.3 .....	66
3.3	Phagozytose-Assay.....	68
3.3.1	Phagozytose-Assay Versuchsreihe 1.1 .....	68
3.3.2	Phagozytose-Assay Versuchsreihe 1.2.....	70

---

3.4 HMGB1-Nachweis .....	72
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	76
4 Diskussion .....	77
4.1 Migration .....	77
4.2 Survival .....	79
4.2.1 Survival allgemein.....	79
4.2.2 Survival mit Überstand apoptotischer HT-22-Zellen.....	80
4.3 Phagozytose-Assay.....	81
4.4 HMGB1-Nachweis.....	83
4.5 HMGB1 in verschiedenen Krankheiten .....	84
4.5.1 Thrombose.....	84
4.5.2 Myokardinfarkt.....	85
4.6 Ausblick .....	86
5 Zusammenfassung .....	88
6 Literaturverzeichnis.....	90
7 Erklärung zum Eigenanteil.....	104
8 Danksagung .....	105

## I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigste Todesursachen des Jahres 2015 in Deutschland.....	1
Abbildung 2: Die thrombozytenbedingte Bildung eines Thrombus an einer atherosklerotischen Plaque .....	3
Abbildung 3: Rolle der Thrombozyten im Rahmen des Akuten Koronarsyndroms.....	4
Abbildung 4: Die NET-Freisetzung .....	5
Abbildung 5: Thrombozyten-Adhäsion an die Endothelzelle .....	9
Abbildung 6: Durch Thrombozyten induzierte Endothel-Entzündung .....	10
Abbildung 7: Die Leukozyten-Adhäsionskaskade .....	10
Abbildung 8: Struktur des menschlichen HMGB1 .....	12
Abbildung 9: Die verschiedenen durch HMGB1 eingeleiteten TLR-Signalwege zur Freisetzung von Zytokinen .....	15
Abbildung 10: Überblick über den TLR-Signalweg .....	15
Abbildung 11: HMGB1-Interaktion.....	16
Abbildung 12: Myokardinfarkt mit ST-Hebung vor, während und nach einer perkutanen Koronarintervention .....	19
Abbildung 13: <i>Coronary artery bypass graft surgery</i> .....	20
Abbildung 14: Struktur des IgG-Moleküls.....	34
Abbildung 15: Thrombozytenaktivierung durch ADP (bzw. Thrombin) .....	36
Abbildung 16: Auftrennung des <i>Buffy Coat</i> nach erstem Zentrifugationsschritt.....	37
Abbildung 17: Schaubild der einzelnen methodischen Schritte des Apoptose-Assays .....	43
Abbildung 18: <i>Boyden chamber</i> Aufbau.....	44
Abbildung 19: Laserbestrahlung einer einzelnen Zelle.....	45
Abbildung 20: Schaubild zur Veranschaulichung des FACS ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )-Prinzips.....	46
Abbildung 21: Analyse der Durchflusszytometrie .....	47
Abbildung 22: Western Blot-„Sandwich“ zur Übertragung der Proteine vom Gel auf die Blot-Membran .....	49
Abbildung 23: Migrations-Assay, Versuchsreihe 1.1 .....	54
Abbildung 24: Migrations-Assay, Versuchsreihe 1.2 .....	55
Abbildung 25: Migrations-Assay, Versuchsreihe 1.3 .....	56
Abbildung 26: Migrations-Assay, Versuchsreihe 2.1 .....	58
Abbildung 27: Migrations-Assay, Versuchsreihe 2.2 .....	60

---

Abbildung 28: Survival-Assay, Versuchsreihe 1, Diagramm A .....	62
Abbildung 29: Survival-Assay, Versuchsreihe 1, Diagramm B .....	63
Abbildung 30: Survival-Assay, Versuchsreihe 2.1 .....	64
Abbildung 31: Survival-Assay, Versuchsreihe 2.2 .....	65
Abbildung 32: Survival-Assay, Versuchsreihe 2.3 .....	67
Abbildung 33: Phagozytose-Assay, Versuchsreihe 1.1 .....	69
Abbildung 34: Phagozytose-Assay, Versuchsreihe 1.2, Diagramm A .....	70
Abbildung 35: Phagozytose-Assay, Versuchsreihe 1.2, Diagramm B.....	71
Abbildung 36: HMGB1-Nachweis mittels Gelelektrophorese und Western Blot .....	73
Abbildung 37: Fluoreszenz-Scan-Aufnahme des HMGB1-Nachweises .....	74

## II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABT	ABT-737
AC	Adenylylcyclase
ACE-Hemmer	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i> -Hemmer
ACD	Acid-Citrate-Dextrose
Acr Bis	Acrylamide/Bis-acrylamide
ACS	Akutes Koronarsyndrom = <i>acute coronary syndrome</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse = <i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat = <i>Ammonium Persulfate</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CABG	Koronararterien-Bypass-Operation = <i>coronary artery bypass graft surgery</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat = <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CD	Unterscheidungsgruppen = <i>cluster of differentiation</i>
Col	Kollagen = <i>collagen</i>
CRP	<i>collagen-related peptide</i>

DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
dest.	destilliert
dL	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure = <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECSIT	<i>evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure = <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EKG	Elektrokardiogramm
EPCs	endotheliale Vorläuferzellen = <i>endothelial progenitor cells</i>
<i>et al.</i>	und andere
Fab	Antigen-bindende Fragment eines Antikörpers = <i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
Fc	kristallisierbares Fragment = <i>crystallisable Fragment</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat = <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht = <i>forward scatter</i>
g	Gramm
G	Guanosintriphosphat-bindendes Protein (G-Protein)
GP	Glycoprotein = <i>glycoprotein</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid = <i>hydrogen peroxide</i>
HDL	Lipoprotein hoher Dichte = <i>high-density lipoprotein</i>

HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonate</i>
HMG-1	<i>High-mobility group 1</i>
HMGB1	<i>High-mobility group box 1</i>
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme = <i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
Ig	Immunglobulin (Antikörper) = <i>immunoglobulin</i>
IKK	IκB-Kinase-Komplex = <i>IκB kinase</i>
IL	Interleukine
INF	Interferone
IRAK	<i>interleukin-1 receptor associated kinase</i>
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte = <i>Low-density-Lipoprotein</i>
LPS	Lipopolysaccharide = <i>lipopolysaccharide</i>
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MALP-2	<i>Macrophage-activating lipopeptide-2</i>
max.	maximal
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEKK1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MPO	Myeloperoxidase = <i>myeloperoxidase</i>
mV	Millivolt
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
Na <sub>3</sub> -Citrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NE	neutrophile Elastase = <i>neutrophil elastase</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NET	neutrophile extrazelluläre Fallen = <i>neutrophil extracellular traps</i>
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NSTEMI	Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt = <i>non-ST-segment-elevation myocardial infarction</i>
PAD4	<i>peptidylarginine deiminase 4</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PaO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PAR	Protease-aktiver Rezeptor
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes = <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung = <i>phosphate buffered saline</i>
PCI	Perkutane Koronarintervention = <i>percutaneous coronary intervention</i>
PDVF	Polyvinylidenfluorid

pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein-Ligand-1
RAGE	<i>receptor for advanced glycation end products</i>
rHMGB1	rekombinantes <i>high-mobility group box 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure = <i>ribonucleic acid</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies = <i>reactive oxygen species</i>
s.	siehe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SpO <sub>2</sub>	pulsoxymetrisch gemessene Sauerstoffsättigung im Blut
SSC	Seitwärtsstreulicht = <i>side scatter</i>
STEMI	ST-Streckenhebungsinfarkt = <i>ST-segment-elevation myocardial infarction</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor b-activated kinase 1</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TIR	<i>Toll-IL-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMRE	Tetramethylrhodamin-Ethylester
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
V	Volt
v.a.	vor allem

---

VCAM-1	vaskulären Zelladhäsionsmoleküls-1 = <i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
vgl.	vergleiche
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WHO	<i>World Health Organization</i>
µl	Mikroliter

## 1 Einleitung

Weltweit führend in den Industrienationen hinsichtlich Mortalität und Morbidität im Erwachsenenalter sind noch immer – trotz des stetigen Fortschritts im Bereich der Kardiologie – das Herz und das Gefäßsystem betreffende (Herz-Kreislauf-/ kardiovaskuläre) Erkrankungen. [1] Europaweit machen kardiovaskuläre Krankheiten einen Anteil von etwa 4 Millionen Tote pro Jahr aus, was etwa 45% im Vergleich mit allen anderen Todesursachen entspricht; dabei macht die koronare Herzkrankheit 1,8 Millionen von diesen 4 Millionen Toten jedes Jahr aus. [2] Diese Empirie findet sich ebenso in Deutschland, [3] wo durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen zugleich auch die höchsten Krankheitskosten mit rund 46,4 Milliarden Euro (im Jahr 2015) anfallen: Das sind etwa 13,7% der gesamten Krankheitskosten in Höhe von 338,2 Milliarden Euro. [4]

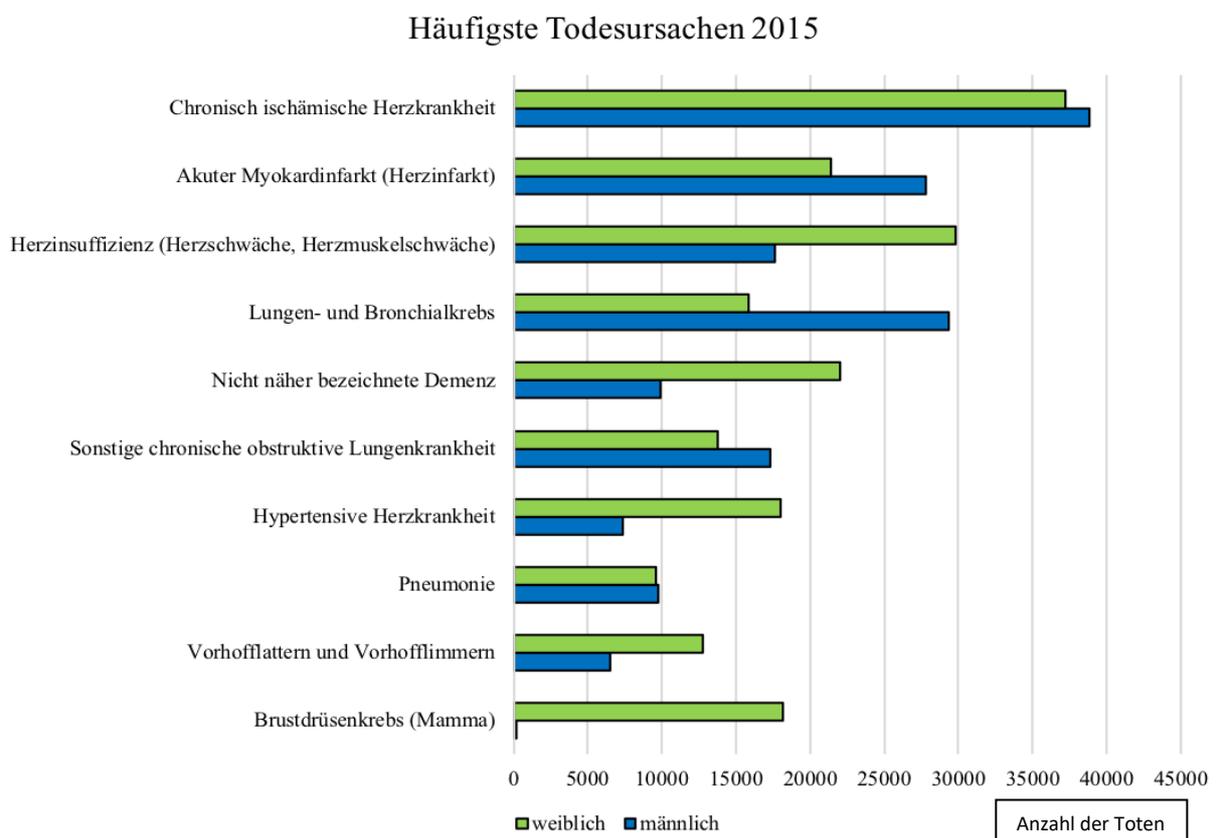


Abbildung 1: Häufigste Todesursachen des Jahres 2015 in Deutschland, nach Statistisches Bundesamt [3]. Die X-Achse gibt die Anzahl der Toten an; die Y-Achse die verschiedenen Todesursachen. Mit blauem Balken sind Männer, mit grünem Balken Frauen dargestellt.

Unter den kardiovaskulären Erkrankungen spielt vor allem die koronare Herzkrankheit (KHK; ICD-10 I25.9) – eine chronische Erkrankung des Herzens, die mit durch Arteriosklerose ausgelösten Engstellen oder Stenosen einer oder mehrerer Koronararterien einhergeht, durch die es zu einer Koronarinsuffizienz des Herzmuskels kommt – eine bedeutende Rolle. [2] Die hierdurch bedingte Ischämie [5] kann sich sowohl als asymptomatische als auch symptomatische KHK äußern; zu Letzterer zählt das akute Koronarsyndrom (ACS = *acute coronary syndrome*) mit seinen drei Entitäten (Instabile Angina pectoris; Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt = *non-ST-segment-elevation myocardial infarction* = NSTEMI; ST-Streckenhebungsinfarkt = *ST-segment-elevation myocardial infarction* = STEMI) sowie die ischämische Herzmuskelschädigung, Herzrhythmusstörungen und der plötzliche Herztod. [6] Eine der häufigsten Komplikationen der KHK stellt der akute Herzmuskelinfarkt (Myokardinfarkt) dar. Auf 100.000 Menschen pro Jahr kommen in etwa 300 Infarkte mit einer Prävalenz für Männer von ca. 30% und Frauen ca. 15% in Deutschland. [6] Nach einem Infarkt kommt es zu Umbauvorgängen (*Remodeling*) – besonders in der Extrazellulären Matrix des Myokards – [7] und damit auch zu chronischen Folgen, wie z.B. Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz oder dem Dressler-Syndrom (Post-myokardinfarktsyndrom), [6] da noch immer nur ungenügende Möglichkeiten zur Verhinderung der Komplikationen zur Verfügung stehen [8].

## 1.1 Thrombose

Die Bildung von Blutgerinnseln, also Thrombosen, spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen der Pathogenese von atherosklerotischen Plaque-Rupturen; diese atherothrombotischen Krankheiten stellen eines der medizinischen Hauptversorgungsprobleme dar und sind für rund 25% aller Tode weltweit verantwortlich. [9] Dass dies heutzutage weltweit die häufigste Ursache nicht nur für Mortalität, sondern auch für langjährige Morbidität ist und die Prävalenz dieser Erkrankungen insbesondere in Entwicklungsländern immer weiter zunimmt, ist vor allem damit zu begründen, dass die Entwicklung eines Gerinnsels gerade in der koronaren Zirkulation meist zu einem akuten Infarktgeschehen mit potentiell tödlichen Folgen führt. [9]

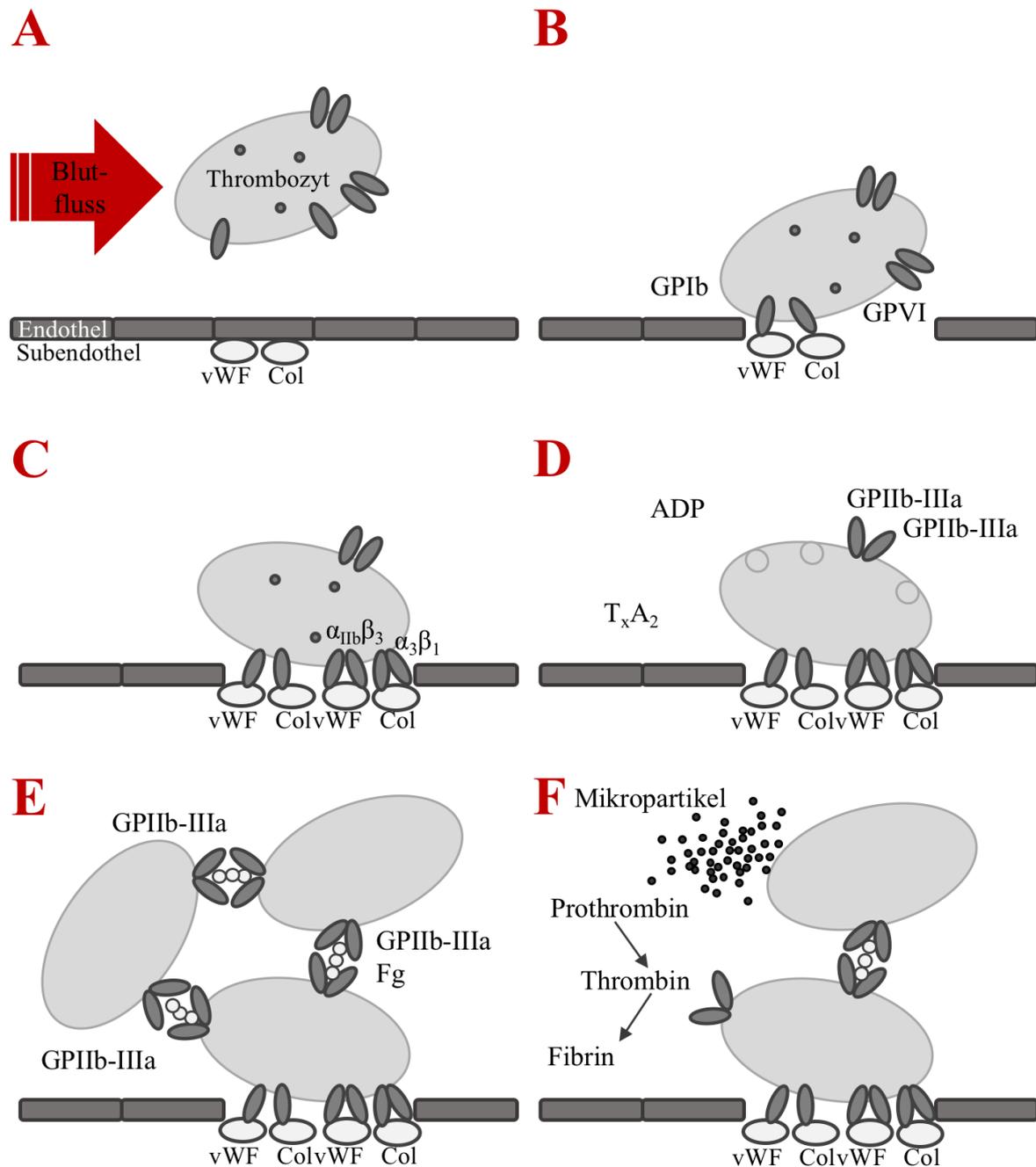


Abbildung 2: Die thrombozytenbedingte Bildung eines Thrombus an einer atherosklerotischen Plaque, modifiziert nach Gawaz M (2004) [10]. A: Unter physiologischen Bedingungen binden Thrombozyten nicht an die Endothelmembran. B: Kommt es allerdings zu einer Gefäßläsion werden unter anderem Proteine, wie der von-Willebrand-Faktor (vWF) sowie Kollagen (Col), zur Gefäßinnenseite ausgerichtet, sodass sich Thrombozyten mittels der Rezeptoren GPIIb-IIIa und GPVI an die Gefäßwand anheften können. C: Dieser erste Anheftungsprozess aktiviert die Thrombozyten und führt *via* Rezeptoren  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Fibrinogen-Rezeptor) und  $\alpha_2\beta_1$  zur Verstärkung der Adhäsion. D: Mithilfe der Freisetzung verschiedener Mediatoren durch den bereits angehefteten Thrombozyten werden weitere Thrombozyten angezogen. E: Durch Fibrinogen-Brückenbildung (Fg) zwischen zwei  $\alpha_{IIb}\beta_3$  kommt es schließlich zur Aggregation der Thrombozyten. F: Diese Aggregation wird daraufhin durch Mikropartikel sowie die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin und schließlich zu Fibrin verstärkt.

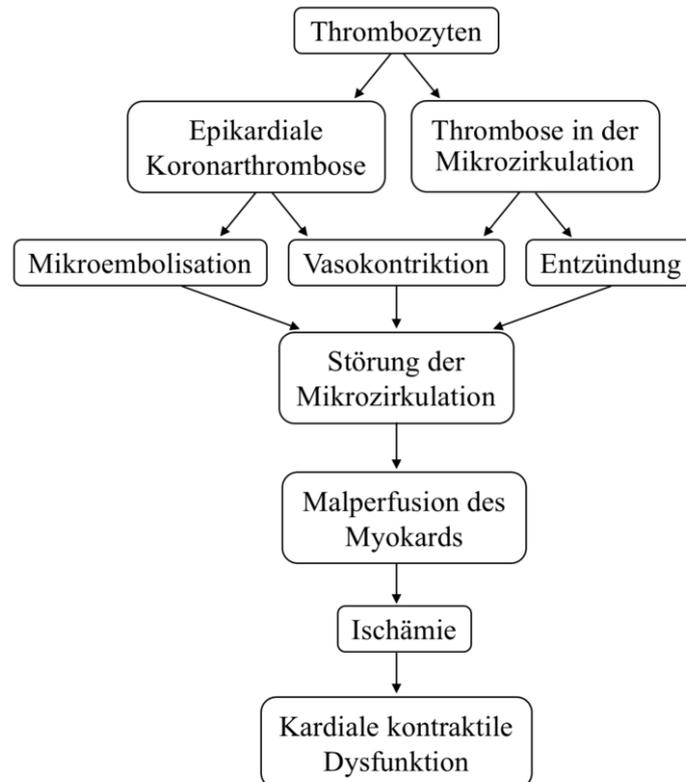


Abbildung 3: Rolle der Thrombozyten im Rahmen des akuten Koronarsyndroms, nach Gawaz M (2004) [10]. Thrombozyten können sowohl über Thrombosen in den epikardialen Koronarien als auch in der Mikrozirkulation zu einer Schlechtersorgung des Herzens und damit einer Ischämie führen. Schließlich folgt bei Reperfusion eine Dysfunktion der Herzkontraktionsleistung.

Wie aus den beiden obigen Abbildungen (Abb. 2 und 3) zu entnehmen ist, sind für die Entstehung von Thromben vor allem die adhäsiven Fähigkeiten und die schnelle Aktivierbarkeit durch Stimuli der Thrombozyten entscheidend; auch wenn der komplette pathophysiologische Prozess auf vielen unterschiedlichen Faktoren beruht, kann mithilfe pharmakologischer Therapien auf verschiedene Weisen eingegriffen werden. [11]

### Neutrophil extracellular traps (NET)

Die NETs werden von neutrophilen Granulozyten bei Kontakt mit Pathogenen (z.B. Bakterien, Pilzen oder Viren) sowie dem Einfluss von aktivierten Thrombozyten, inflammatorischen Stimuli oder chemischen Komponenten gebildet. [12; 13] Es handelt sich dabei um extrazelluläre DNA-Stränge, die aus Histonen und neutrophilen, antimikrobiellen Proteinen bestehen. [12]

Mithilfe der NETosis können so in der Folge die oben genannten Pathogene eliminiert werden; außerdem soll sie an der Pathogenese einer Vielzahl verschiedener Krankheiten beteiligt sein (Systematischer Lupus erythematoses [14], Asthma [15], zystische Fibrose [16]). [17]

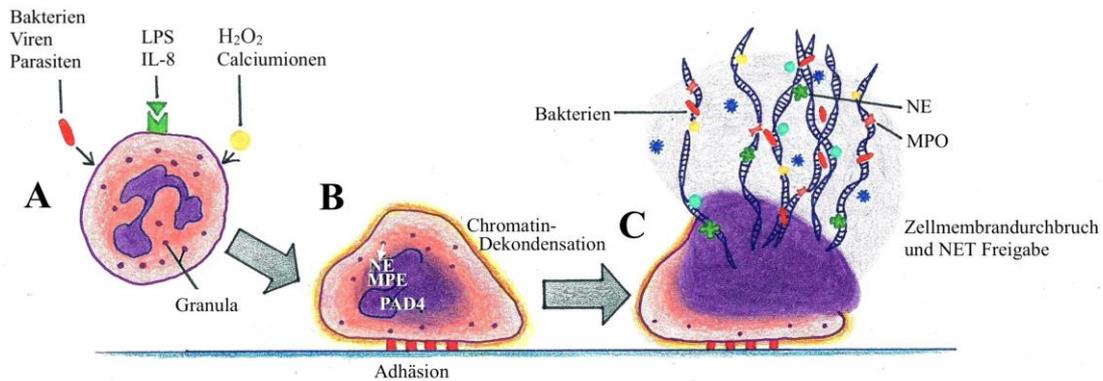


Abbildung 4: Die NET-Freisetzung, nach Zawrotniak M & Rapala-Kozik M (2013) [13]. A: Zunächst kommt es durch Pathogene (Bakterien etc.) oder chemischen Faktoren (LPS etc.) zu einer Stimulierung der neutrophilen Granulozyten. B: Dies führt dazu, dass sie sich an Endothel anheften und es im Inneren zu einer Chromatin-Dekondensation kommt (via *myeloperoxidase* = MPO, *neutrophil elastase* = NE und *peptidylarginine deiminase 4* = PAD4). C: Dies hat schließlich zur Folge, dass NETs freigesetzt und Bakterien dadurch „eingefangen“ werden.

Diese NETs können schließlich aber auch zur Thrombose führen; [18] hierfür wurde eine bedeutsame Rolle des *High-mobility group box 1* (HMGB1) sowohl *via receptor for advanced glycation end products* (RAGE) [19] als auch *Toll-like-receptor 4* (TLR4) bzw. *Toll-like-receptor 9* (TLR9) [20] nachgewiesen. [21] Der Myokardinfarkt wiederum ist sowohl mit Thrombose [10] als auch NETosis [22] assoziiert. [23]

## 1.2 Myokardinfarkt

Allgemein wird hierunter der Untergang von Herzmuskelzellen aufgrund einer anhaltenden Ischämie verstanden. [24] Die Bezeichnung „akuter Myokardinfarkt“ wird verwendet, wenn Hinweise auf eine ischämische Myokardnekrose, meist auf dem Boden einer KHK mit hochgradiger Stenose oder sogar Verschluss einer Koronararterie, bestehen. [24] Nach der Definition der WHO liegt ein Myokardinfarkt vor, wenn bei instabiler Angina pectoris Marker einer Myokardschädigung nachweisbar sind (Troponin T- oder I-Anstieg), zusätzliche ischämische Symptome bestehen, EKG-Veränderungen auftreten oder ein beweisender angiografischer Befund erhoben wird. [6]

Prinzipiell kann zwischen sechs Typen unterschieden werden:

- (1) spontaner Myokardinfarkt aufgrund einer Ischämie durch Plaqueruptur, Einreißen oder Dissektion;
- (2) ischämiebedingter Myokardinfarkt bei u.a. Koronarembolien, Arrhythmien oder Hyper- bzw. Hypotonie;
- (3) plötzlicher Herztod;
- (4) Myokardinfarkt bei perkutaner kardialer Intervention;
- (5) Myokardinfarkt durch dokumentierte Stentthrombose;
- (6) Myokardinfarkt bei koronarer Bypassoperation (CABG). [24]

Das Herz sorgt als muskuläres Hohlorgan durch Druck- und Saugvorgänge für die Zirkulierung des Blutes durch den gesamten Körper. [25] Diese Funktion wird unter anderem durch die Koronarien als Sauerstoffversorger des Herzmuskels ermöglicht. [25] Kommt es nun aufgrund kardiovaskulärer Risikofaktoren, zu denen neben den Hauptrisikofaktoren (LDL-Cholesterin-Erhöhung, HDL-Cholesterin-Erniedrigung, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, KHK/ Herzinfarkte bei erstgradigen Familienangehörigen vor dem 55 Lebensjahr bei Männern und vor dem 65 Lebensjahr bei Frauen, Lebensalter bei Männern über 45 Jahre, bei Frauen über 55 Jahre) auch Adipositas, körperliche Inaktivität und genetische Veranlagung zählen, zur vorzeitigen Arteriosklerose, dann kann diese Gefäßveränderung zur Plaquebildung (arteriosklerotisches Atherom) und schließlich zum Herzinfarkt führen. [26; 6]

Nach einem Myokardinfarkt spielt sich das kardiale *Remodeling*<sup>1</sup> sowohl morphologisch und mechanisch als auch auf zellulärer sowie molekularer Ebene ab und umfasst Heilungsvorgänge im Rahmen von systemischen Anpassungsvorgängen in Form von Inflammation, zellulärer Migration und Narbenbildung. [28; 30]

Dabei werden zuvor prinzipiell drei Infarkttypen unterschieden. Beim sogenannten Innenschichtinfarkt (Mosaikinfarkt, ICD-10 I21.4) handelt es sich um multiple, kleine subendokardiale, kaum sichtbare Nekroseherde in der linken Ventrikelwand, die durch absolute temporäre Ischämie ausgelöst wurden. [31] Schon nach drei Tagen kommt es zu einem „Organisationsmuster“ (Muster, das gebildet wird, wenn nicht mehr lebensfähiges Material eines lebenden Organismus in ein lebensfähiges, gefäßhaltiges Bindegewebe umgewandelt wird) und nach zwei Wochen zu einer Umwandlung der Nekrosebezirke in weißliche Narbenherde. [31] Bleibt die KHK bestehen, geht der Innenschichtinfarkt in einen Transmuralinfarkt über. [31]

Der Außenschichtinfarkt (ICD-10 I 21.9) ist eine beim Menschen bisher noch nie in Autopsien nachgewiesene Form einer mehrere Zentimeter großen subepikardialen Nekrose der linken sowie Teilen der rechten Ventrikelwand. [32] Bei einer Sepsis kann es zum temporären Ausschluss subepikardialer Bezirke der Ventrikelwand von der Blutversorgung und damit zu einem Außenschichtinfarkt kommen. [31]

Der Fokus meiner Arbeit liegt jedoch auf dem Transmuralinfarkt (ICD-10 I21.0). Dieser stellt die typische Erscheinungsform des Herzinfarkts dar, bei der eine mehrere Zentimeter große Nekrose aller drei Myokardschichten der linken Ventrikelwand vorliegt. [31] Im Folgenden werden die verschiedenen Vorgänge und Veränderungen hinsichtlich eines Transmuralinfarkts näher beschrieben.

Im Rahmen der morphologischen Veränderungen nach Infarzierung einer Koronararterie kommt es makroskopisch sofort zu einer akuten Herzdilatation sowie Gefäßverschlüssen, die mikroskopisch als vergrößerte Querstreifung des Myokards zu erkennen sind; in dieser Phase kann es vor allem zu einem sogenannten „Sekundenherztod“ kommen. [5] Durch Reperfusion entsteht ein „Organisationsmuster“, das zunächst zu Infarktgrößenzunahme [33] und anschließend zu einer Übersättigung der schon geschädigten Myokardzellen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen führt, wodurch diese in einen „Dauerkrampf“ verfallen und Kontrakturbandnekrosen sowie Verkalkungen ausbilden. [31]

---

<sup>1</sup> Zwar wird das *Remodeling* auch als eigene Phase angesehen: [27], dennoch wird es hier als Überbegriff für alle Wundheilungsphasen nach einem Infarktgeschehen benutzt, so auch: [28; 29].

Der erste Schritt der Wundheilung (exsudative Phase) ist nun die Hämostase: Thrombozyten werden durch die Extrazellulärmatrix (Kollagene, Fibronectin) aktiviert, wodurch deren Adhäsion an die geschädigte Wunde sowie Aggregation und Freisetzung von zahlreichen Mediatoren (Thromboxan A<sub>2</sub>, Adenosindiphosphat, Serotonin) und Adhäsionsproteinen (Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, Faktor VIII) bewirkt wird. [34] Zusätzlich kommt es zur Koagulation im Rahmen der intrinsischen bzw. extrinsischen Gerinnungskaskade; die Thrombozyten agieren als zentrale Mediatoren, die die Migration von Leukozyten in die Wundareale durch Freisetzung von chemotaktischen Faktoren fördern. [34]

Dieser oben beschriebene Leukozyten-Einstrom besteht hauptsächlich aus Monozyten (nach 12 Stunden) – die sich später in phagozytierende Makrophagen umwandeln – und neutrophilen Granulozyten (nach vier Stunden), die beide in der sogenannten resorptiven Phase geschädigte Zellmatrix-Anteile phagozytieren sowie schädliche Substanzen (Bakterien) töten können. [34; 31] Hierbei hilft unter anderem auch die Matrixmetalloproteinase, durch die die Nekrose proteolytisch aufgeweicht und überhaupt erst phagozytierbar gemacht wird. [31]

Die sich hieran anschließende proliferative Phase wird charakterisiert durch Angiogenese-, Kollagenablagerungs-, Granulationsgewebeformierungs-, Epithelialisierungs- und Wundschrumpfungsprozesse. [27] Die Angiogenese führt zu neuem Gefäßwachstum durch neben der Wunde noch intakte Gefäße; hierzu tragen vor allem die Aktivierung von Endothelzellen, deren Einwanderung und Proliferation sowie die Freisetzung von Zytokinen durch Makrophagen bei. [34] In der Kollagen- und Granulationsgewebeformierungsphase wachsen Fibroblasten (Vorläuferzellen, die Hauptbestandteil des Bindegewebes sind [35]) und bilden eine neue, vorläufige Extrazellulär-Matrix aus Kollagen (Hauptsubstanz der Extrazellulärmatrix, die deren Stärkung und Unterstützung dient und u.a. aus Hydroxyprolin besteht [36]) und Fibronectin (extrazelluläres Protein, das Zellen die Anhaftung an die Matrix erleichtert [37]). [27] Die Epithelialisierung führt dazu, dass Epithelzellen von den Wundrändern rasch zum Infarktgeschehen einwandern, um die Wunde zu bedecken und sich an der darunter liegenden Matrix anzuhängen. [38] Veränderungen der Zytokinkonzentration bewirken, dass die Epithelzellen von einem beweglichen in einen proliferativen Typ „wechseln“, um die Anzahl der Epithelzellen zu erhöhen und damit die Wundheilung zu vollenden. [39] Die Kontraktion der Wunde ist ein wichtiger Teil des Heilungsprozesses, der vor allem durch Myofibroblasten, die aus Aktin-Bündeln bestehen, die ihnen eine Retraktion und Extension ermöglichen, vermittelt wird. [34]

Sechs Wochen nach Infarktgeschehen entwickelt sich das fibroblastenreiche Mesenchym im Rahmen der reparativen Phase zu erst lockerem, dann zugfesten Bindegewebe, das sich als weißgraue, derbe „Schwiele“ mit Neigung zu narbiger Schrumpfung oder narbiger Wandaussackung darstellt. [31] In dieser Phase folgen weiterhin verschiedene zelluläre und molekulare Veränderungen. Vor Infarkt kommt es noch durch die eine akute Thrombusbildung im Bereich der arteriosklerotischen Koronarstenose begünstigenden Turbulenzen und Atheromrupturen mit Kollagenexposition zu einer Aktivierung von Thrombozyten, die zu Aggregation, Adhäsion und Vasokonstriktion durch Thromboxanfreisetzung führt. [40] Zusätzlich wird der vasokonstriktorische Effekt dadurch unterstützt, dass durch Funktionsstörungen des Endothels Vasodilatoren, wie Stickstoffmonoxid oder Prostacyclin, sowie antithrombotische Substanzen, wie der *tissue plasminogen activator*, Antithrombin III oder auch Protein C, weniger ausgeschüttet werden. [40] Nach Myokardinfarkt kommt Thrombozyten im Rahmen der pathophysiologischen Vorgänge der Reperfusion neben ihrer Rolle bei Thromboseprozessen eine zentrale Bedeutung bei eben solchen Entzündungen zu. [10; 41] Hierbei haben die Thrombozyten vor allem durch Chemotaxis einen besonders wichtigen Einfluss auf andere Zellen: Durch Adhäsion – ähnlich wie die Phasen bis zur *Diapedese* der Leukozyten – [42] können Thrombozyten ebenfalls in einem mehrschrittigen Prozess an die Oberfläche von Gefäßendothelzellen anhaften. [10] Hierdurch kommt es zu ihrer Aktivierung, woraufhin sie eine Vielzahl an verschiedenen chemotaktischen Faktoren freisetzen [43]. [10] Ferner können sie durch direkten Zellkontakt chemotaktische Eigenschaften von Leukozyten (u.a. Monozyten) und Endothelzellen regulieren. [44; 45; 46]

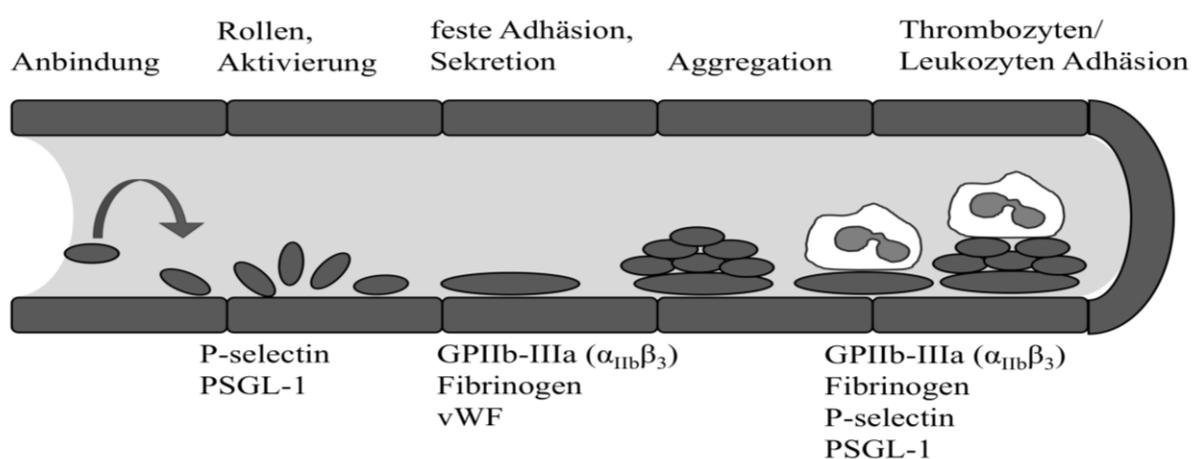


Abbildung 5: Thrombozytenadhäsion an die Endothelzelle, nach Gawaz M (2004) [10]. Zunächst kommt es zum Binden der Thrombozyten an die Endothelzellmembran (Anbindung), daraufhin folgt das Rollen und die Aktivierung der Thrombozyten (bei dem v.a. P-Selectin und PSGL-1 = P-Selektin Glykoprotein-Ligand-1 eine bedeutende Rolle spielen) bis es letztlich durch die feste Adhäsion der Thrombozyten an der Endothelmembran (*via* u.a. GPIIb-IIIa-Rezeptor, Fibrinogen und vWF = von-Willebrand-Faktor) zur Sekretion von Mediatorstoffen, der Aggregation und damit endgültigen Adhäsion kommt.

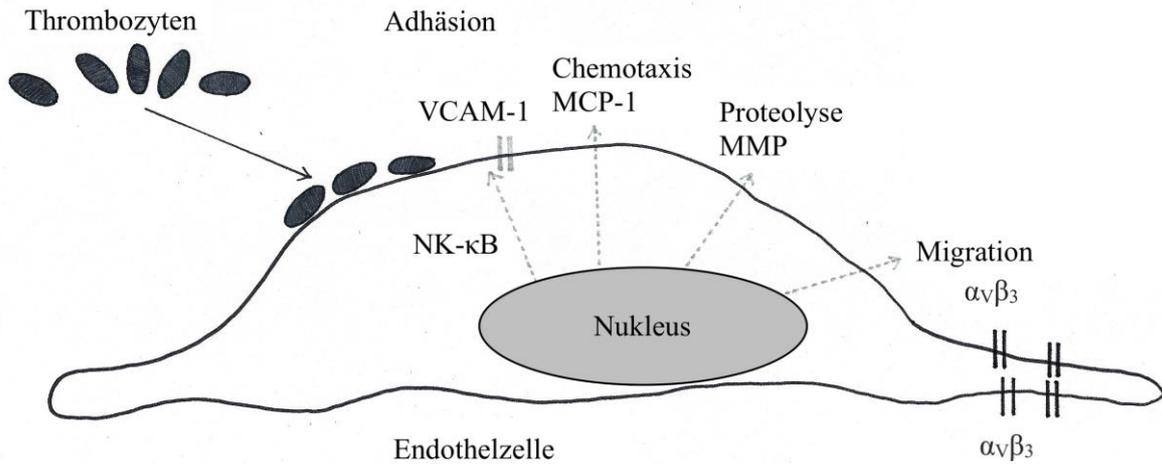


Abbildung 6: Durch Thrombozyten induzierte Endothel-Entzündung, nach Gawaz M (2004) [10]. Nach erfolgreicher Adhäsion der Thrombozyten werden innerhalb der Endothelzelle verschiedene Kaskaden der Entzündungsreaktion (über NF-κB) ausgelöst: Adhäsion (mittels VCAM-1 = *Vascular cell adhesion molecule-1*), Chemotaxis (via MCP-1 = *Monocyte chemoattractant protein-1*), Proteolyse (mittels MMP = Matrix-Metalloproteasen), Migration.

Die ursprünglich im Knochenmark entstandenen Monozyten wandern aus dem peripheren Blut ins Gewebe ein, entwickeln sich dann zu Makrophagen oder dendritischen Zellen und wirken so an der Wundheilung mittels Sezernierung verschiedener Mediatoren und Proteasen sowie Phagozytose mit. [8] Damit die Monozyten die Blutgefäße aber überhaupt verlassen können, müssen sie zunächst eine Adhäsionskaskade am Endothel durchlaufen: „Langsames Rollen“, Verstärkung der Adhäsion, intraluminales „Kriechen“, parazelluläre und transzelluläre Migration und letztlich Transmigration durch die Basalmembran. [47]

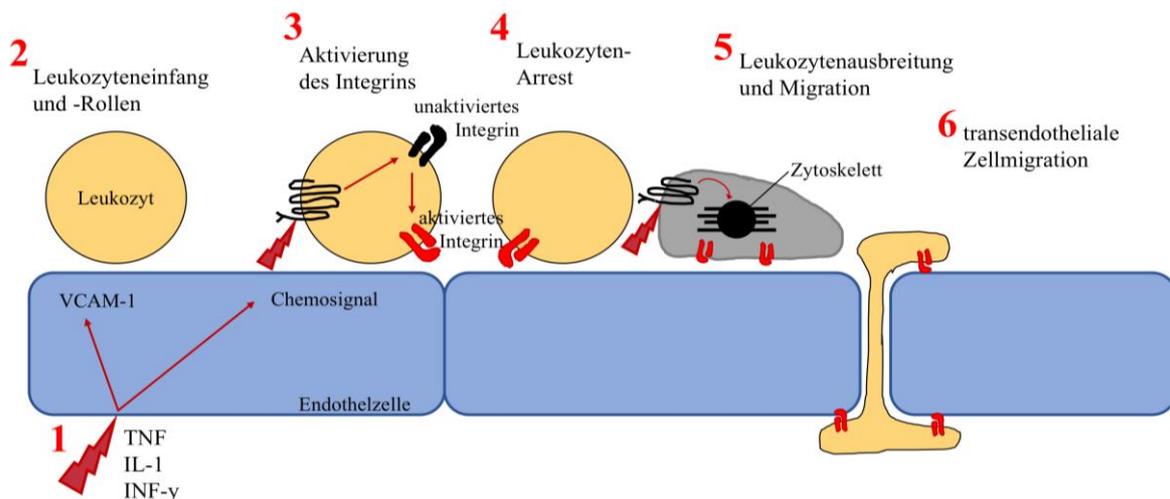


Abbildung 7: Die Leukozyten-Adhäsionskaskade, nach Rainger GE *et al.* (2015) [48]. Die Endothelzellen werden mittels TNF/IL-1/INF-γ aktiviert (1), wodurch es zur Expressierung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen zur Regulierung der Leukozyten-Rekrutierung (2) kommt. Die darauffolgende Integrin-Aktivierung in den bereits „rollenden“ Leukozyten führt zur Stabilisierung der Adhäsion und Festigung derselben zur Endothelzellwand (4). Im Rahmen verschiedener Veränderungsprozesse des Zytoskeletts der Leukozyten (5) kommt es schließlich zur Transmigration (6).

Eine solche Adhäsion ist im physiologischen Zustand des Gefäßendothels normalerweise nicht möglich; erst aufgrund von Läsionen bewirken Selektine, die Immunglobulin Superfamilie (hierzu gehören eine Reihe von Molekülen, die besonders für die antigenspezifische Erkennung und als Kosignale der Lymphozytenaktivierung von Bedeutung sind, wie der T-Zell-Rezeptor, die HLA-Strukturen, CD4/8), [49] Integrine und Muzin-ähnliche Glykoproteine diese Rekrutierung. [50] Besonders auch die Expressierung von VCAM-1 fördert dieses Geschehen nach einem Infarkt. [51] Zu einer Akkumulation der Monozyten, zum Ort der größten Schädigung, führen erhöhte Konzentrationen von z.B. *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) und Wachstumsfaktoren. [50]

Durch die letztlich übrig gebliebene, steife Infarkt Narbe und der damit einhergehenden reduzierten  $Ca^{2+}$ -Pumptrate in diesem Bereich kommt es einerseits zu einer Hypertrophie des Restmyokards und andererseits zu einer diastolischen Dysfunktion. [40] Dadurch und auch durch das nach außen Wölben der Infarkt Narbe in der Systole, wodurch eine vermehrte Volumenbelastung bedingt durch das resultierende Pendelvolumen entsteht, wird die systolische Dysfunktion, die hauptsächlich durch Überbelastung des nicht infarzierten Myokards entsteht, verstärkt. [40]

Normalerweise beginnen die Zytokinspiegel und somit auch die Entzündungsreaktion nach etwa einer Woche rückläufig zu werden; wenn allerdings das Infarktgebiet besonders groß ist oder weiterhin Stressfaktoren vorhanden sind, kann die Zytokinfreisetzung weiterhin erhöht bleiben oder es zu einer erneuten Zytokinaktivierung kommen, was zu einem Teufelskreis mit aufrechterhaltender Schädigung und damit einem besonders nachteiligen *Remodeling* führen kann. [52]

### **1.3 HMGB1 und sein Einfluss auf die Pathophysiologie kardiovaskulärer Krankheiten**

Unter Zytokinen versteht man Proteine (auch teilweise Proteohormone), [53] die grundlegende Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Zellfunktion regulieren. [54; 55] Anders als Hormone, die zwar auch an der extrazellulären Signalübertragung beteiligt und vor allem für die Regulation metabolischer und physiologischer Parameter sowie der Funktion der Erfolgsorgane



Das HMGB1 nimmt seine Rolle im Zellkern insofern wahr, als dass es das Genom [68] vor oxidativem Stress – eine Überschreitung der physiologischen Menge reaktiver Sauerstoffverbindungen – [69; 70] schützt und Transkriptionskomplexen (Moleküle zur Katalyse der Transkription [71]) den Zugang zu ihm erleichtert [72]. [63] Im Zytosol spielt es hauptsächlich im Rahmen der Autophagie (Abgrenzung und Verlagerung in ein eigenes Kompartiment umschriebener Portionen des Zytoplasmas durch Membranen mit anschließender Aufspaltung in kleinere Einheiten [73]) und der Rekrutierung des Myddosom (Proteinkomplex mit Myeloiddifferenzierungsfaktor Myd88 [74]) zum *Toll-like Rezeptor 9* (kurz: TLR; ein Protein, das vom humanen Gen TLR9 kodiert wird und als Rezeptor von dendritischen Zellen [75], Makrophagen [76], natürlichen Killerzellen [77] sowie weiteren antigenpräsentierenden Zellen [78] des Immunsystems exprimiert wird [79]) eine Rolle. [63] Außerhalb der Zelle kann HMGB1 an spezielle Rezeptoren, wie z.B. TLR2 oder TLR 4 sowie an freie DNA, Lipopolysaccharide (funktionelles und strukturelles, pathogenes Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien [80]) und Lipoteichonsäure (Oberflächen-assoziierte Säure grampositiver Bakterien, die als Regulator autolytischer Wandenzyme, Muramidasen, v.a. nach Bakteriolyse dient [81]) binden, um dadurch als Mediator für Zellantworten in bestimmten physiologischen bzw. pathologischen Situationen zu agieren. [63] Setzen absterbende oder gestresste Zellen HMGB1 frei, so wirkt dieses als ein *damage-associated molecular pattern molecule* (DAMP) [82]. [23]

Im Hinblick auf die Effekte und Funktionen bei Lymphoid-Zellen (hiermit sind sowohl die Vorläufer- als auch die adulten Zellen dieser Linie gemeint [83]) ist das Folgende von besonderer Wichtigkeit: HMGB1 wird hauptsächlich von dendritischen Zellen, um sowohl die T-Zell- als auch die B-Zell-Reaktivierung und -Ausbreitung zu fördern, und aktivierten natürlichen Killer-Zellen, um die Reifung dendritischer Zellen, während der afferenten Phase der Immunantwort (damit sind die Bereiche blind endender Gefäße in Lymphknoten gemeint, die die Vermittlung von Lymphozyten und antigenpräsentierenden Zellen in die subkapsillären und medullären Sinus [84] gewährleisten [85]), zu unterstützen, sezerniert. [63] Alles in allem ist HMGB1 ein zentrales Zytokin für alle Lymphoid- sowie ohnehin für Myeloid-Zellen (kollektive Bezeichnung für Granulozyten und Monozyten [86]). [63]

Dabei kommen dem HMGB1 noch weitere wichtige Eigenschaften zu. Als Marker soll der Serum-Anteil des HMGB1 besonders für die Einschätzung der Infarktausdehnung transmural sowie die Restfunktion des linken Ventrikels nach einem Myokardinfarkt ausschlaggebend sein. [87]

Außerdem wird HMGB1 bei nekrotischem Zelltod aufgrund von Gewebeschäden freigesetzt; [88; 89] dies ist bei nekrotischen Kardiomyozyten *in vitro* als auch nach Myokardinfarkt *in vivo* der Fall. [90] Nach einem Myokardinfarkt soll HMGB1 außerdem die Myokardinfarktgröße durch Förderung der Angiogenese mittels Steigerung der Mobilisierung und Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Endothelialen Vorläuferzellen (EPCs = *endothelial progenitor cells* [91]) sowie deren Migration in Randzonen des Infarktbereiches und Heranwachsen als vaskuläre Endothelzelle [92] in neuen Kapillaren und Arteriolen im infarzierten Herzen reduzieren. [93]

Schließlich kann HMGB1 an die Rezeptoren RAGE, TLR2, TLR4 und TLR9 binden, [94; 95] um *in vitro* mittels dieser Interaktion intrazelluläre Signale einzuleiten und die zelluläre Antwort einschließlich chemotaktischer Zellbewegung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (TNF, IL-1) zu vermitteln; *in vivo* führt HMGB1 zu Fieber, epithelialer Barrierefunktionsdysfunktion und akuter Entzündung [67]. [96]

Im Speziellen richten sich die Effekte von HMGB1 als Ligand an den von Kardiomyozyten, Gefäßzellen und Entzündungszellen exprimierten *receptor for advanced glycation end products* (RAGE). [97] Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die vom RAGE ausgehende Signalkaskade sowohl in Endothelzellen als auch mononukleären Phagozyten (Makrophagen, Monozyten und deren Vorläuferzellen [98]) eine ungünstige Auswirkung auf das Herz (besonders bei Reperfusion nach Ischämie) haben kann. [99; 100; 101]

Zur Familie der *Toll-like receptors* gehören keimbahnkodierte *pattern recognition receptors* (PRR), die in der Erkennung von pathogenen Zellen (PAMPs = *pathogen-associated molecular patterns*) und der daraufhin folgenden Immunantwort eine zentrale Rolle spielen; die Rezeptoren sind Transmembranproteine, deren Transmembranregion und die zytosolische *Toll-IL-1 receptor* (TIR)-Domäne die intrazelluläre Signalkaskade aktiviert. [102]

Mittels Formierung von Heterodimeren mit TLR1 und TLR6 leitet der *Toll-like receptor 2* den ersten Schritt der Entzündungskaskade (s. Abb. 9 und 10, S. 15) ein. [103]

Über den *Toll-like receptor 4* hingegen wird vor allem eine lipopolysaccharidinduzierte Aktivierung des IKK-Kinase-Komplexes (= I $\kappa$ B; aus u.a. IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ ; Protein-Kinase-Komplex, der den entscheidenden regulatorischen Schritt bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung einnimmt [104]), Phosphorylierung und Degradierung des I $\kappa$ B, nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B sowie die Expression von NF- $\kappa$ B-abhängigen proinflammatorischen Zytokin-Genen bewirkt. [94]

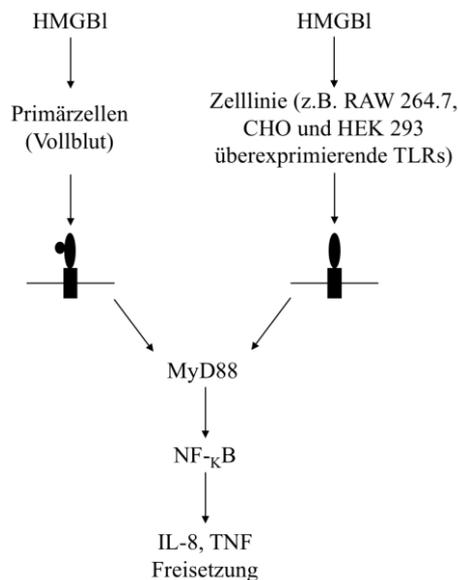


Abbildung 9: Die verschiedenen durch HMGB1 eingeleiteten TLR-Signalwege zur Freisetzung von Zytokinen, nach Yu M *et al.* (2006) [95]. HMGB1 führt über eine Stimulierung verschiedener Zellen (Primärzellen bzw. unterschiedliche Zelllinien: bspw. RAW 264.7) zur Interaktion mit den Rezeptoren TLR4 bzw. TLR2; durch Aktivierung der MyD88 = *Myeloid differentiation primary response 88* kommt es über NF-κB zur Freisetzung von IL-8 oder TNF.

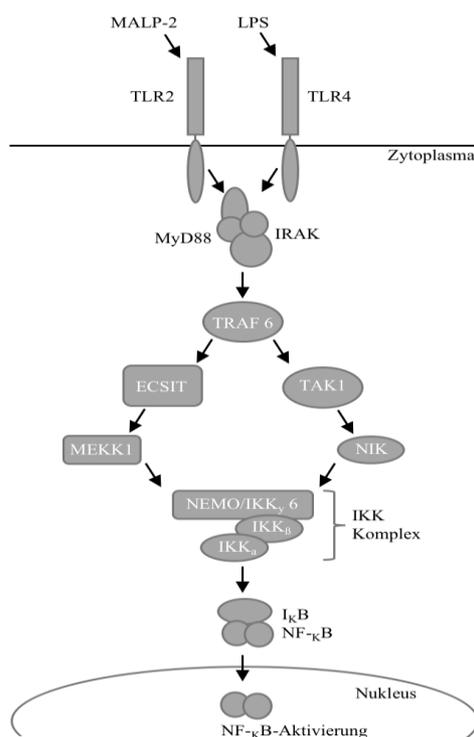


Abbildung 10: Überblick über den TLR-Signalweg, nach Takeuchi O & Akira S (2001) [105]. Die Aktivierung der Kaskade über LPS (bzw. MALP-2 = *Macrophage-activating lipopeptide-2*) führt über komplizierte intrazelluläre Interaktionen (hierbei ist zunächst Myd88 = *Myeloid differentiation primary response 88* im Zusammenspiel mit IRAK = *Interleukin-1 receptor associated kinase* von Bedeutung) über TRAF = *TNF receptor associated factor* und dem IKK-Komplex letztendlich zur nukleären Translokation von NF-κB. ECSIT = *Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway*; TAK1 = *Transforming growth factor b-activated kinase 1*; MEKK1 = *Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*; NIK = *NF-κB-inducing kinase*; NEMO = *NF-κB essential modulator*.

Die gemeinsame Endstrecke beider Rezeptoren (s. Abb. 9 und 10, S. 15) durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B, das eine Familie von Transkriptionsfaktoren, bestehend aus NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel, darstellt, [106] kann schließlich zu:

1. Zellüberleben,
2. Proliferation,
3. Angiogenese,
4. Adhäsion/ Invasion/ Metastasen (*via* VCAM-1, Fibronectin, MMP-2,9) und
5. Immunantwort/ Entzündung (*via* u.a. Zytokine) führen. [107]

In einer Entzündungsreaktion ist HMGB1 ein notwendiger Mediator; erhöhte HMGB1 Level werden aber auch bei Sepsis und dem ischämie-/reperusionsbedingten Gewebeschaden nachgewiesen. [96] Dabei wird HMGB1 sowohl aktiv von Immunzellen wie Makrophagen, Monozyten, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen, Endothelzellen und Thrombozyten [96; 108] als auch passiv von nekrotischen bzw. verletzten Zellen freigesetzt [109; 89; 110].

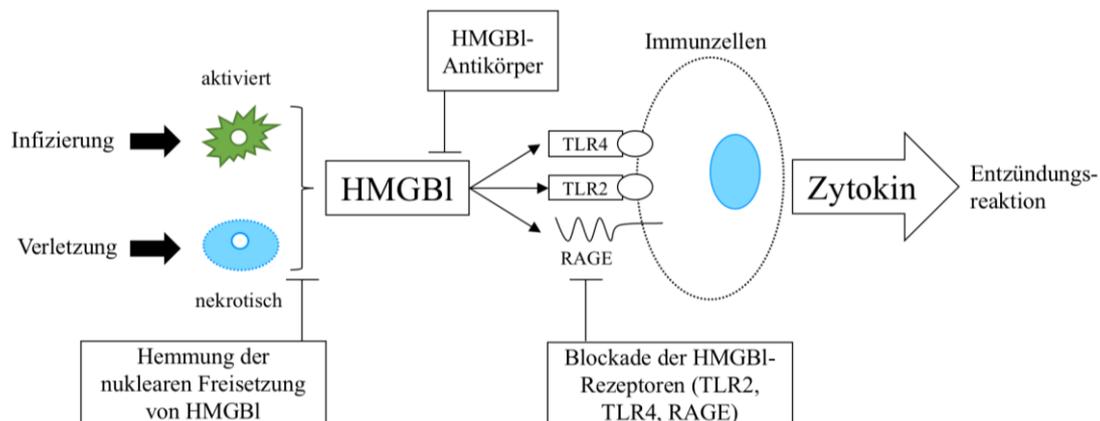


Abbildung 11: HMGB1-Interaktion, nach Yang H & Tracey KJ (2010) [96]. Zu sehen sind multiple Interaktionsmöglichkeiten des HMGB1: begonnen bei der Freisetzung (auf der linken Seite, Infizierung bzw. Verletzung) über Hemmungen, die mit einer T-förmige Linie gekennzeichnet sind (HMGB1 Antikörper) bis zur Stimulierung von Immunzellen über die Rezeptoren TLR2 = *Toll-like receptor 2*, TLR4 = *Toll-like receptor 4* und RAGE = *Receptor for advanced glycation end products* (sowie deren Blockade) und der Freisetzung von Zytokinen (die dann eine Entzündungsreaktion auslösen kann).

Interessant dabei ist, dass apoptotische Zellen zwar ebenfalls signifikante Mengen an HMGB1 sezernieren, dessen inflammatorische Eigenschaft jedoch durch Oxidierung des Cystein an Position 106 durch die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies der Mitochondrien bei Apoptose

der Zelle herabgesetzt wird – es kommt damit also zu einer abgeschwächten Stimulation von Makrophagen und deren TNF-Freisetzung. [88]

Im besonderen Hinblick auf die Pathologie des Myokardinfarkts konnten bereits Kohno *et al.* [111] in einem Herzinfarktmodell bei Ratten bei Blockade von HMGB1 eine Verschlechterung des linksventrikulären *Remodeling* feststellen und folgerten daraus, dass HMGB1 sehr wohl eine bedeutsame Rolle im Heilungsprozess sowie dem Erhalt der strukturellen Integrität des infarzierten Ventrikels spielen könnte. Nur kurz zuvor hatte K. Takahashi *et al.* [112] ebenfalls eine Verbesserung des *Remodeling*-Prozesses zeigen können: Nicht nur die Ejektionsfraktion des mit HMGB1-Injektionen behandelte Herz war im Vergleich zur Kontrollgruppe besser, sondern im Perinfarktbereich kam es zu weniger Kollagenablagerungen, einer abgeschwächten Hypertrophie der Kardiomyozyten und Akkumulation von Entzündungszellen. Diese Erkenntnisse beruhen vor allem auf dem Nachweis, dass HMGB1 grundlegende induzierende Wirkung auf die myokardiale Regeneration hat, insbesondere durch die Interaktion mit dem RAGE-Rezeptor auf c-kit<sup>+</sup>-Zellen, wodurch eine Differenzierung und Proliferation zur Myokardzelllinie angeregt wurde (diese Differenzierung in Herzzellen wurde nur bei infarzierten Herzen festgestellt; die Proliferation nur in mit HMGB1 behandelten Herzen) und eine verbessernde Wirkung auf die Herzfunktion nicht nur durch eine größere Ejektionsfraktion, sondern auch durch eine teilweise Verhinderung der nachteiligen linksventrikulären Dilatation. [113] Neben Effekten hinsichtlich der Verhinderung des kardialen *Remodelings* und der kardialen Dysfunktion konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass mit HMGB1 behandelte Mäuse ein echokardiografisch kleineres Herz-Körper-Verhältnis und ein insgesamt kleineres Infarktgebiet aufwiesen als unbehandelte, sodass die Überlebensraten höher waren; zusätzlich war die Arteriolen- und Kapillarenbildung gesteigert. [114] Limana *et al.* zeigten 2011 [115], dass HMGB1-Injektionen sogar in schon versagenden Mäuseherzen (also mehrere Wochen nach einem Myokardinfarkt) noch die Herzfunktion, das linksventrikuläre *Remodeling*, das allgemeine Überleben verbessern, die kardiale Regeneration induzieren und die Kollagenablagerungen im Infarktgebiet reduzieren.

## 1.4 Therapie kardiovaskulärer Krankheiten

Die bisher etablierte Behandlung der koronaren Herzkrankheit hat das Ziel der Reduzierung der Symptome und der Verbesserung der Prognose; die Therapie beinhaltet deswegen auf der einen Seite eine Lifestyle-Umstellung, die Faktoren wie die Beendigung des Nikotinabusus, eine mediterrane Diät, körperliche Aktivität, Gewichtsnormalisierung, Blutdruck-, Diabetes- und Lipideinstellung umfasst und auf der anderen Seite eine pharmakologische Intervention mit antiischämischen Substanzen, wie Nitraten, Beta-Blockern, Calciumantagonisten, und antikoagulatorischen Mitteln, wie Aspirin, sowie zusätzlich die Lipideinstellung mittels Statinen. [116]

Bei der Behandlung des Myokardinfarkts steht das Prinzip „*time is muscle*“ (alle Zeit, die vergeht bis zur Reperfusion, führt zu weiterem Untergang von Herzmuskelzellen im Bereich des Infarktgebiets) [117] im absoluten Vordergrund; hierdurch soll eine bestmögliche Wiederherstellung des koronaren Blutflusses und die maximale Rettung des noch funktionierenden Myokards möglich sein. [118]

Zu den Standardmaßnahmen bei einem Herzinfarkt gehört die sofortige Schmerzlinderung (intravenös applizierte Opioide wie Morphin [119]), die Gabe von Sauerstoff (bei einer Sauerstoffsättigung,  $SpO_2 < 90\%$  oder einem Sauerstoffpartialdruck,  $PaO_2 < 60\text{mmHg}$ ) und von Beruhigungsmitteln (Benzodiazepine [120]); Grund hierfür ist, dass es stressinduziert zur Aktivierung des Sympathikus kommt, was zur Folge hat, dass die Vasokonstriktion zunimmt [121] und damit die Belastung des Herzens kontraproduktiv weiter steigt. [122]

Eine mechanische oder pharmakologische Reperfusionstherapie ist bei Patienten indiziert, deren Brustschmerz vereinbar mit einem Myokardinfarkt-Geschehen von einer Dauer von 12 Stunden oder weniger ist, in Verbindung mit einer ST-Streckenhebung größer als 0.1 mV in zwei oder mehr Elektrokardiografie-Ableitungen oder einem neu aufgetretenen Linksschenkelblock. [123]

Die perkutane Koronarintervention (PCI = *percutaneous coronary intervention*) sollte bei Patienten eingesetzt werden, wenn ein erfahrener Kardiologe sowie ein geeignetes Katheterlabor zur Verfügung stehen und dieser Eingriff innerhalb von 90 Minuten nach erstem Patientenkon-

takt erfolgen kann; [119] danach kann die PCI aufgrund der Kontraindikationen der fibrinolytischen Therapie, hohen Blutungsrisikos, Patientenalters über 75 Jahre, klinisch hohen Risikos für Komplikationen oder kardiogenen Schocks dennoch indiziert sein (bei Letzterem ganz genau zu überdenken: [124]). [123; 125; 126] Ein beispielhafter Verlauf vom symptomatischen Beginn eines Myokardinfarkts (Brustschmerz) bis zur primären Behandlung mittels perkutaner Koronarintervention und darauffolgender Wiedereinsetzung der Durchblutung in die zuvor minderperfundierte Gefäßbereiche ist schematisch in Abbildung 12 zu sehen.

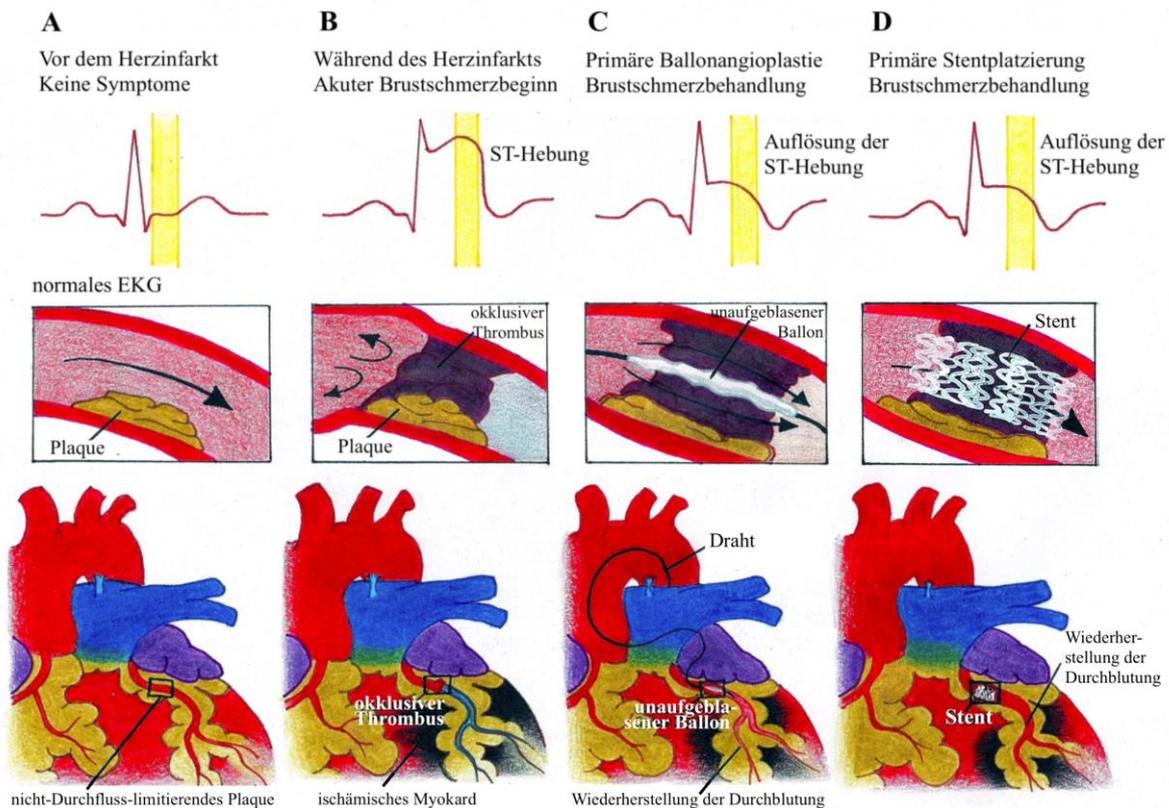


Abbildung 12: Myokardinfarkt mit ST-Hebung vor, während und nach einer perkutanen Koronarintervention, nach Keeley EC und Hillis LD (2007) [123]. A zeigt ein normales EKG und eine asymptotische Plaque in einem Koronargefäß; B zeigt nun eine Okklusionsreaktion durch Thrombozyten, woraufhin das Koronargefäß komplett verlegt wird und es zur Ischämie in den dahinterliegenden Gefäßabschnitten mit akuten Brustschmerzen kommt, im EKG zeigt sich dies in Form einer ST-Hebung; C durch die perkutane Koronarintervention wird nun ein Ballon über die Leiste bis in die betroffene Koronararterie eingeführt, wodurch die Okklusion „gesprengt“ wird, der Blutfluss in die zuvor ischämischen Bereiche wieder einsetzt und im EKG ein Rückgang der ST-Hebung zu sehen ist; D zeigt schließlich die Stent-Implantation, sodass die Koronararterie weiterhin offen bleiben kann.

Eine Bypass-Operation, die sogenannte *Coronary artery bypass graft surgery* (CABG) kommt nur dann in Betracht, wenn:

1. der Patient eine ungeeignete Anatomie für eine perkutane Koronarintervention hat und
2. ein großes Myokardareal in Gefahr ist oder
3. der Patient einen kardiogenen Schock [124; 127] hat. [122]

In Abbildung 13 ist ein solcher *Coronary artery bypass graft* mit der *Arteria mammaria interna sinistra* dargestellt. Neben dem Arterien-Bypass kommt, wie ebenfalls in der Abbildung (links) dargestellt, prinzipiell auch ein Venen-Bypass in Frage.

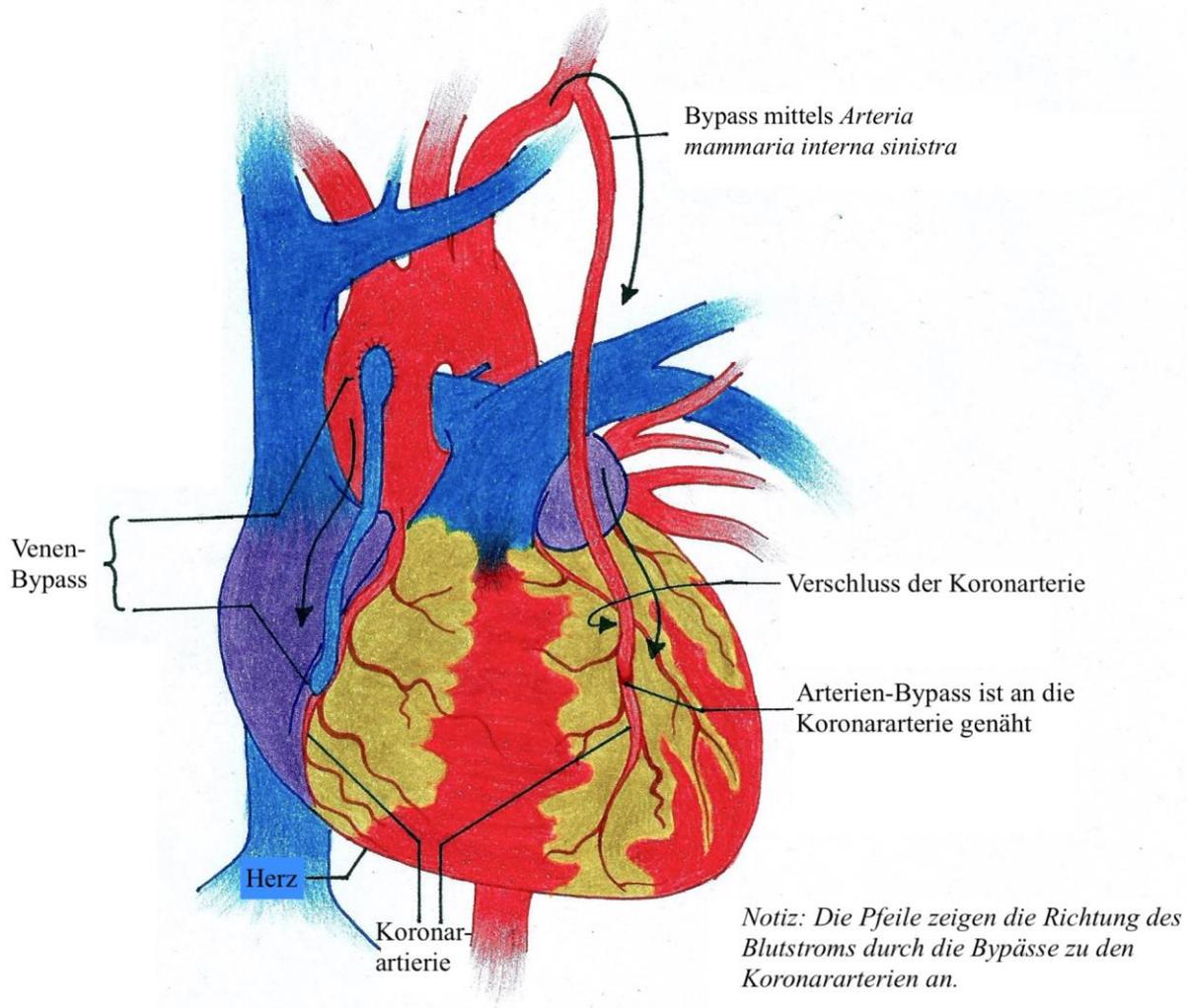


Abbildung 13: *Coronary artery bypass graft surgery*, modifiziert nach *National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI)* [128]. Es ist sowohl die Bypass-Methode mittels Vene (links, meist Vene aus dem Bein) als auch der arterielle Bypass (rechts, hier: *Arteria mammaria interna sinistra*) dargestellt – beide führen zu einem neuen Blutfluss über die verengte Stelle hinweg, sodass die dahinterliegenden Bereiche wieder perfundiert werden.

Bestehen keine Kontraindikationen (vgl. umfassende Liste: [119]), kann eine fibrinolytische Therapie bei Patienten mit ST-Hebungsinfarkt und ischämischen Symptomen (innerhalb der letzten 12 Stunden) durchgeführt werden, wenn eine PCI nicht innerhalb von 120 Minuten nach dem ersten Patientenkontakt vollzogen werden kann. [119] Als mögliche Medikamente kommen die Streptokinase, Alteplase, Reteplase oder Tenecteplase in Betracht. [6] Alle haben gemeinsam, dass sie verstärkend in einen Schritt des fibrinolytischen Systems eingreifen: Plasmin zirkuliert als inaktive Vorstufe, dem Plasminogen, im Blut; durch Aktivierung kann es Fibrin binden und in abbaubare Produkte spalten, sodass der Thrombus aufgelöst wird. [129]

Von Beginn an wird eine unterstützende Antithrombose-Behandlung empfohlen; hierzu sollten P2Y12-Inhibitoren (Prasugrel, Ticagrelor), Aspirin sowie unfraktioniertes Heparin (oder niedermolekulares Heparin wie Enoxaparin) verwendet werden. [122]

Mittels Beta-Blocker (Arrhythmie-Risiko-Senkung), Thrombozytenaggregationshemmern (Acetylsalicylsäure und P2Y12-Inhibitoren wie Ticagrelor/Prasugrel/Clopidogrel duale Plättchenhemmung für 12 Monate, Acetylsalicylsäure danach lebenslang weiter), Cholesterinsenker (z.B. Statine, durch Senkung des *Low-density*-Lipoprotein = LDL < 70 mg/dL) und ACE-Hemmern (Aufhalten des negativen *Remodelings* sowie unabhängige Senkung der Gesamtmortalität) kann die schlechte Prognose (ca. 40% versterben bereits am 1. Postinfarkt-Tag, in den ersten vier Wochen etwa 50%) verbessert werden. [6] Ansonsten gelten auch hier die bereits bei der koronaren Herzkrankheit (s. Seite 18) angesprochenen Einstellungen sowie die Lifestyle-Umstellung als das Outcome begünstigende Faktoren.

Schließlich könnte genau hier HMGB1 in naher Zukunft als etablierte Therapie-Option im Rahmen der unterstützenden bzw. Prognose-verbessernden Postinfarkt-Behandlung eingesetzt werden.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit beruht auf der Untersuchung der Eigenschaft des HMGB1 von apoptotischen bzw. nekrotischen als auch inflammatorischen Zellen freigesetzt zu werden und als Mediator zu dienen. Dabei sind vor allem dessen interaktive Fähigkeiten im Rahmen thrombusbildender und Postinfarkt-Wundheilungs-Prozesse von besonderer medizinischer Bedeutung.

Nach einem Myokardinfarkt kommt es hauptsächlich zu genau diesen zwei Veränderungen (Nekrose/ Apoptose und Entzündung); und wenn nun HMGB1 ein bedeutsamer Vermittler in beiden Prozessen ist, dann könnte dieses wiederum ausschlaggebend an dem nachfolgenden Wundheilungsprozess beteiligt sein. Dies würde bedeuten, dass HMGB1 das Postinfarkt-Outcome des Restgewebes maßgeblich verbessern kann – so wie dies auch bereits von verschiedenen Forschergruppen gezeigt werden konnte [111; 112; 113; 114; 115]. Da Thrombozyten und Monozyten als wichtigste initiale Vertreter bei der Wundheilung eine entscheidende Rolle spielen, soll in dieser Arbeit auf genau diese zwei ein besonderes Augenmerk geworfen werden. Grundsätzlich ergeben sich für die Beantwortung des Umfangs der Wirkung von HMGB1 auf das *Remodeling* zunächst grundlagenbasierte Probleme. Deswegen soll:

1. die Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten auf ihre HMGB1-Abhängigkeit,
2. die Interaktion von HMGB1 mit den verschiedenen Rezeptoren (TLR2, TLR4, RAGE),
3. die Freisetzung von HMGB1 durch Thrombozyten und schließlich
4. die Menge an zirkulierendem HMGB1 untersucht werden.

In meiner Arbeit soll durch die Ergebnisse eine Aussage über die grundlegende vermittelnde Eigenschaft von HMGB1 auf zwei der wichtigsten Zellen der Wundheilung, Thrombozyten und Monozyten, getroffen werden. Hierbei ist vor allem die Differenzierung der HMGB1-Zirkulation aktivierter (mittels ADP/ CRP/ Thrombin) Thrombozyten und nicht aktivierter Thrombozyten ein entscheidender Faktor. Die hierzu durchgeführten Assays sollen neben einer Beurteilung der Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten auch ein tiefergehendes Verständnis der Rolle von HMGB1 durch Deduktion auf die Wundheilungsprozesse bei Thrombose und Myokardinfarkt ermöglichen.

Bei den dazu verwendeten Assays handelt es sich um:

1. Migrations-Assay,
2. Survival-Assay,
3. Phagozytose-Assay.

Besonders mittels des Phagozytose-Assays soll eine Aussage über die durch Monozyten phagozytierten Thrombozyten getroffen und somit der Effekt hinsichtlich der durch HMGB1 vermittelten thrombusverkleinernden Eigenschaften genauer beurteilt werden können. Sowohl der Migrations- als auch der Survival-Assay soll Aufschlüsse über fundamentale Eigenschaften des HMGB1 geben: Durch eine Verbesserung des Überlebens von Monozyten haben diese entscheidend länger die Möglichkeit in das betroffene Entzündungs- (Infarkt-) Gebiet zu migrieren und sich zu adulten Zellen (z.B. Makrophagen) zu differenzieren. Ähnliches gilt auch für eine Verbesserung der Migrationseigenschaft: Die Monozyten gelangen besser bzw. schneller zum pathologisch veränderten Bereich, sodass sie frühzeitig zur Differenzierung angeregt werden können.

Außerdem sollen schließlich mittels kultivierter HT-22-Zellen (von einer primären neuronalen Hippocampus-Kultur von Mäusen geklonte Zelllinie) Rückschlüsse auf die Beeinflussung von Thrombozyten (und dann wiederum Monozyten) bei tatsächlicher Apoptose gemacht werden können. Zum einen sollen die Thrombozyten im Survival- und Migrations-Assay alleine durch Überstände apoptotischer HT-22-Zellen sowie auch in Kombination mit CRP bzw. ADP aktiviert und die Interaktion mit Monozyten untersucht werden. Zum anderen soll per Gelelektrophorese und Western Blot HMGB1 in den jeweiligen Überständen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend soll in der vorliegenden Arbeit alles von der Freisetzung des HMGB1 durch Thrombozyten – als Teil der entzündlichen Wundheilungskaskade – über dessen Wirkung auf Monozyten (Migration, Überleben, Phagozytose; sowie beteiligte Rezeptoren) bis zum qualitativen und quantitativen Nachweis des Zytokins aufgezeigt werden. Mit Blick auf die Geschehnisse nach Infarkt kann eine verbesserte Migration, eine erhöhte Phagozytose-Rate sowie ein verbessertes Überleben von Monozyten zu einem schnelleren und besseren Einsatz sowie einer Steigerung des Wundheilungsprozesses *per se* führen. Dies könnte bedeutenden Einfluss auf den Abbau von Thrombosen und die Leistungsfähigkeit des Herzens nach einem solchen ischämischen Ereignis haben.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

48-well-modified Boyden chamber	von Neuro Probe Inc. in Gaithersburg, Maryland, USA
5% BSA-Lösung	von Carl Roth GmbH und Co. KG in Karlsruhe, Deutschland
5- $\mu$ m pore polycarbonate membrane (Migrationsmembran)	von Neuro Probe Inc. in Gaithersburg, USA
ADP (Adenosindiphosphat)	von Chrono-Log in Havertown, Pennsylvania, USA
Anti-Actin ( <i>polyclonal rabbit antibody</i> ; polyklonaler Antikörper vom Kaninchen, IgG)	von Abcam Biochemicals in Cambridge, Großbritannien
Anti-HMGB1 ( <i>mouse IgG2b kappa</i> ; Maus IgG2b kappa)	von Biolegend in San Diego, Kalifornien, USA
Anti-HMGB1 ( <i>rabbit IgG</i> ; Kaninchen IgG)	bzw. von Sigma-Aldrich in St. Louis, Minnesota, USA
Anti-human RAGE ( <i>polyclonal goat antibody</i> ; polyklonaler Antikörper von der Ziege, IgG)	von R&D Systems in Minneapolis, Minnesota, USA (europäischer Sitz in Abingdon, Großbritannien; deutscher Standort: Wiesbaden)

<i>Anti-human TLR2 (monoclonal mouse IgG2b antibody</i> ; monoklonaler Antikörper von der Maus, IgG2b)	von R&D Systems in Minneapolis, Minnesota, USA (europäischer Sitz in Abingdon, Großbritannien; deutscher Standort: Wiesbaden)
<i>Anti-human TLR4 (polyclonal goat antibody</i> ; polyklonaler Antikörper von der Ziege, IgG)	von R&D Systems in Minneapolis, Minnesota, USA (europäischer Sitz in Abingdon, Großbritannien; deutscher Standort: Wiesbaden)
Aqua dest.	von Millipore Corporation in Billerica, USA
BD FACS Calibur <sup>TM</sup> Flow Cytometer (1995)	von Becton-Dickinson Bioscience in Franklin Lakes, New Jersey, USA (deutscher Standort: Heidelberg)
BH3-mimetic-ABT-737	von Sellekchem in Houston, Texas, USA
Bradford Protein Assay	von Bio-Rad Laboratories, Inc. in Hercules, Kalifornien, USA
Brutschrank	CO <sub>2</sub> Incubator MC0-18AIC der Firma Sanyo Electric Co. Ltd., Hauptsitz in Moriguchi, Präfektur Osaka, Japan
CD14-FITC-Marker (monoklonaler Antikörper)	von Thermo Fisher Scientific Inc., Hauptsitz in Waltham, Massachusetts, USA (deutscher Standort: Osterode)
CD42b-FITC-Marker (monoklonaler Antikörper)	von Thermo Fisher Scientific Inc., Hauptsitz in Waltham, Massachusetts, USA (deutscher Standort: Osterode)

Cellquest pro Version 5.2.1 (FACS-Mess-Software)	von Becton-Dickinson Bioscience in Franklin Lakes, New Jersey, USA (deutscher Standort: Heidelberg)
CRP ( <i>collagen-related peptide</i> )	von Richard Farndale, Universität von Cambridge (Abteilung Biochemie) in Cambridge, Großbritannien
Deckgläschen (rechteckig)	24x60mm von R. Langenbrinck in Emmendingen, Deutschland
DMEM ( <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> ) [130]	von Lonza in Verviers, Belgien
Dulbecco's PBS 500 ml	von PAA Laboratories GmbH in Pausching, Österreich
Durchflusszytometrie FACS Calibur	von Becton Dickinson Biosciences in Franklin Lakes, New Jersey, USA (deutscher Standort: Heidelberg)
Eppendorf-Cup (1,5 ml)	Eppendorf Tubes von Eppendorf AG in Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Fuge ( <i>Microcentrifuge</i> )	von Thermo Fisher Scientific Inc., Hauptsitz in Waltham, Massachusetts, USA (deutscher Standort: Osterode)
FACS Rinse	von Becton-Dickinson Bioscience in Franklin Lakes, New Jersey, USA (deutscher Standort: Heidelberg)

FACS-Röhrchen	von Becton-Dickinson Bioscience in Franklin Lakes, New Jersey, USA (deutscher Standort: Heidelberg)
Falcon (15 ml, 50 ml)	Cellstar Tubes von Greiner Bio-One GmbH in Frickenhausen, Deutschland  bzw. von Becton-Dickinson Bioscience in Franklin Lakes, USA
Ficoll-Paque-Plus-Lösung	von Amersham Bioscience in Buckinghamshire, England  bzw. von GE Healthcare in Uppsala, Schweden
Gibco™ 10% FCS ( <i>fetal calf serum</i> ; fetales Kälberserum) [131]	von der Marke GIBCO von Invitrogen in Carlsbad, California, USA (deutscher Sitz in Karlsruhe; seit 2014 Teil von Thermo Fisher Scientific, Hauptsitz in Weltham, Massachusetts, USA)
Gibco™ RPMI-Medium 1640	von der Marke GIBCO von Invitrogen in Carlsbad, California, USA (deutscher Sitz in Karlsruhe; seit 2014 Teil von Thermo Fisher Scientific, Hauptsitz in Weltham, Massachusetts, USA)
Giensa-Lösung	von Sigma-Aldrich in St. Louis, Minnesota, USA
GloMax <i>Multi-detection</i> System (Fluoreszenz-Platten-Leser, Western Blot)	von Promega Corp. in Madison (Fitchburg), Wisconsin, USA (deutscher Standort in Mannheim)

GraphPad Prism 7	von GraphPad software in La Jolla, Kalifornien, USA
Human HMGB1/HMG-1 Alexa Fluor® 488-conjugated Antibody (Mouse IgG <sub>2B</sub> , Western Blot)	von R&D Systems in Minneapolis, Minnesota, USA (europäischer Sitz in Abingdon, Großbritannien; deutscher Standort: Wiesbaden)
IgG	Maus-IgG von Beckmann Coulter, Krefeld, Germany  oder von Santa Cruz Biotechnologies in Dallas, Texas, USA (deutscher Standort: Heidelberg)  oder: Maus IgG2b kappa Isotyp-Kontrolle von Biolegend in San Diego, Kalifornien, USA
ImageJ Software (Migrationsassay)	National Institutes of Health in Bethesda, Maryland, USA
Immunpräzipitations-Puffer	15 mM Tris pH 7.4 155 mM NaCl 1 mM EDTA 0.08 mM sodium azide + Protease/Phosphatase-Inhibitor-Gemisch von Cell Signaling Technology in Danvers, Massachusetts, USA
Kulturflasche (75 m <sup>2</sup> , 175 m <sup>2</sup> )	Cellstar von Greiner Bio-One GmbH in Frickenhausen, Deutschland
L-Glutamin	von Lonza in Verviers, Belgien

May-Grünwald-Lösung	von Sigma-Aldrich in St. Louis, Minnesota, USA
Methanol	von Sigma-Aldrich in St. Louis, Minnesota, USA
Microplate Manager® 4.0	von Bio-Rad Laboratories, Inc. in Hercules, Kalifornien, USA
Neubauer-Einmalzählkammer	Digital Bio C-Chip NI DHC-N01 von PEQLAB in Erlangen, Deutschland
Objektträger	SuperFrost® Plus Objektträger von R. Langenbrinck in Emmendingen, Deutschland
<i>Odyssey infrared imaging system</i>	von LI-COR Biosciences in Lincoln, Nebraska, USA (deutscher Standort: Bad Homburg)
PBS-Lösung	von Lonza in Verviers, Belgien
Penicillin	von Lonza in Verviers, Belgien
PerfectBlue™ <i>Semi-Dry-Blotter</i> , Sedec™	von der Marke peqlab von VWR (jetzt: Teil von Avantor mit Hauptsitz in Center Valley, Pennsylvania, USA) in Radnor, Pennsylvania, USA (deutscher Standort: Darmstadt)
Pipetten für 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf research sowie Eppendorf research plus von Eppendorf AG in Hamburg, Deutschland

<p>Pipettenspitze</p> <p>10 <math>\mu</math>l</p> <p>200-1000 <math>\mu</math>l</p> <p>200 <math>\mu</math>l</p>	<p>von Biozym Scientific GmbH in Hessisch Oldendorf, Deutschland</p> <p>von Ratiolab GmbH in Dreieich, Deutschland</p> <p>von Sarstedt AG &amp; Co. in Numbrecht, Deutschland</p>
<p>Pipettierhilfe</p>	<p>Brand <i>accu-jet pro pipette controller</i> von Sigma-Aldrich (jetzt: Teil von Merck KGaA mit Hauptsitz in Darmstadt, Deutschland), Hauptsitz in St. Louis, Missouri, USA</p>
<p>Powermac G4/5 (FACS-Computer)</p>	<p>von Apple in Cupertino, USA</p>
<p>PVDF (<i>polyvinylidene difluoride</i>) -Membran (Komatsu 2015: 227f.)</p>	<p>von der Marke Immobilon P von Merck Millipore (jetzt: Merck) in Billerica, Massachusetts, USA (Hauptsitz der Merck KGaA in Darmstadt, Deutschland)</p>
<p>rHMGB1</p>	<p>von R&amp;D Systems in Minneapolis, Minnesota, USA (europäischer Sitz in Abingdon, Großbritannien; deutscher Standort: Wiesbaden)</p>
<p>Roti®-Histofix</p>	<p>von Carl Roth GmbH und Co. KG in Karlsruhe, Deutschland</p>
<p>Roti-Histokit</p>	<p>von Carl Roth GmbH in Karlsruhe, Deutschland</p>

<i>Semi-Dry Transfer Cell System</i>	von PEQLAB in Erlangen, Deutschland
Stangenpipette (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	costar von Corning Inc. in Corning, New York, USA (Europäischer Standort: Amsterdam, Niederlande als Corning Life Sciences B.V.)
Staurosporin	von Calbiochem der Merck KGaA in Bad Soden, Deutschland (Hauptsitz in Darmstadt, Deutschland)
Sterilbank der Klasse II	Herasafe HS18 der Thermo Electron Corporation (jetzt: Thermo Fisher Scientific Inc.), Hauptsitz in Waltham, Massachusetts, USA (Deutscher Standort: Langensebold)
Streptomycin	von Lonza in Verviers, Belgien
<i>Sysmex cellcount</i>	von Sysmex Corp. In Kobe, Präfektur Hyogo, Japan (deutscher Standort: Nordstedt)
Thrombin	von Chrono-Log in Havertown, Pennsylvania, USA
TMRE	von Invitrogen in Carlsbad, Kalifornien, USA (deutscher Sitz in Karlsruhe; seit 2014 Teil von Thermo Fisher Scientific, Hauptsitz in Weltham, Massachusetts, USA)  oder von Molecular Probes, Inc. in Eugene, Oregon, USA

TritonX	von Sigma-Aldrich (jetzt: Teil von Merck KGaA mit Hauptsitz in Darmstadt, Deutschland), Hauptsitz in St. Louis, Missouri, USA
Trypan- <i>blue</i>	von Sigma-Aldrich in St. Louis, Minnesota, USA
Trypsin	von Lonza in Verviers, Belgien
Zeiss LSM 510 Meta, Axioplan 2 <i>Imaging Confocal Laser Scanning Microscope</i> (Migrationsassay)	von Zeiss in Oberkochen, Deutschland
Zellkulturflasche (75 cm <sup>2</sup> ; für Monozyten-Kultur)	von Cellstar der Greiner Bio-One mit Hauptsitz in Kremsmünster, Österreich (deutscher Standort: Nürtingen)
Zellzähler SYSMEX KX-21N	Von Sysmex Corporation in Hyogo, Japan
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3S+ von Thermo Fisher Scientific Inc., Hauptsitz in Waltham, Massachusetts, USA (Deutscher Standort: Osterode)  Heraeus Multifuge 1S von Thermo Fisher Scientific Inc., Hauptsitz in Waltham, Massachusetts, USA (Deutscher Standort: Osterode)
Zentrifuge (Compact Benchtop Centrifuge)	Thermo Fisher Scientific Inc., Hauptsitz in Waltham, Massachusetts, USA (Deutscher Standort: Osterode)

Die Inkubation erfolgte – wenn nicht anders gekennzeichnet – im Brutschrank bei 37 °C mit angefeuchteter Luft und 5% CO<sub>2</sub>

### **RPMI-Medium**

Das erstmals von Moore *et al.* beschriebene RPMI (Roswell Park Memorial Institute in Buffalo, New York, USA) -Medium dient der Kultivierung von Leukozyten; [132] die Serie umfasst die Medien RPMI-1603/1629/1630/1640, wobei Letzteres das am häufigsten verwendete ist [133].

### **TMRE**

Tetramethylrhodamin-Ethylester (Perchlorat) ist ein nicht-zytotoxischer, zelldurchdringender, fluoreszierender Farbstoff, der zur Beurteilung der mitochondrialen Funktion eingesetzt wird, da er aufgrund der Polarisierung der gesunden Mitochondrienmembran aufgenommen werden kann; in apoptotischen Zellen wird aufgrund der depolarisierten Membran TMRE folglich nicht aufgenommen, wodurch schließlich über die unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften bei den Szenarien die Lebensfähigkeit der Zelle(n) bewertet werden kann. [134]

### **IgG**

Das IgG mit seinen vier Untergruppen (IgG1/ 2/ 3/ 4) ist das am häufigsten vorkommende Immunglobulin (80%) der fünf Immunglobuline (IgA, IgM, IgD, IgE) im menschlichen Blut; wie die anderen Immunglobuline auch nimmt es als Antikörper eine bedeutende Funktion im Immunsystem ein. [135]

In Experimenten dient das IgG vor allem als „sekundärer“ Antikörper als Kontrolle für den/ die primär genutzten Antikörper. [136]

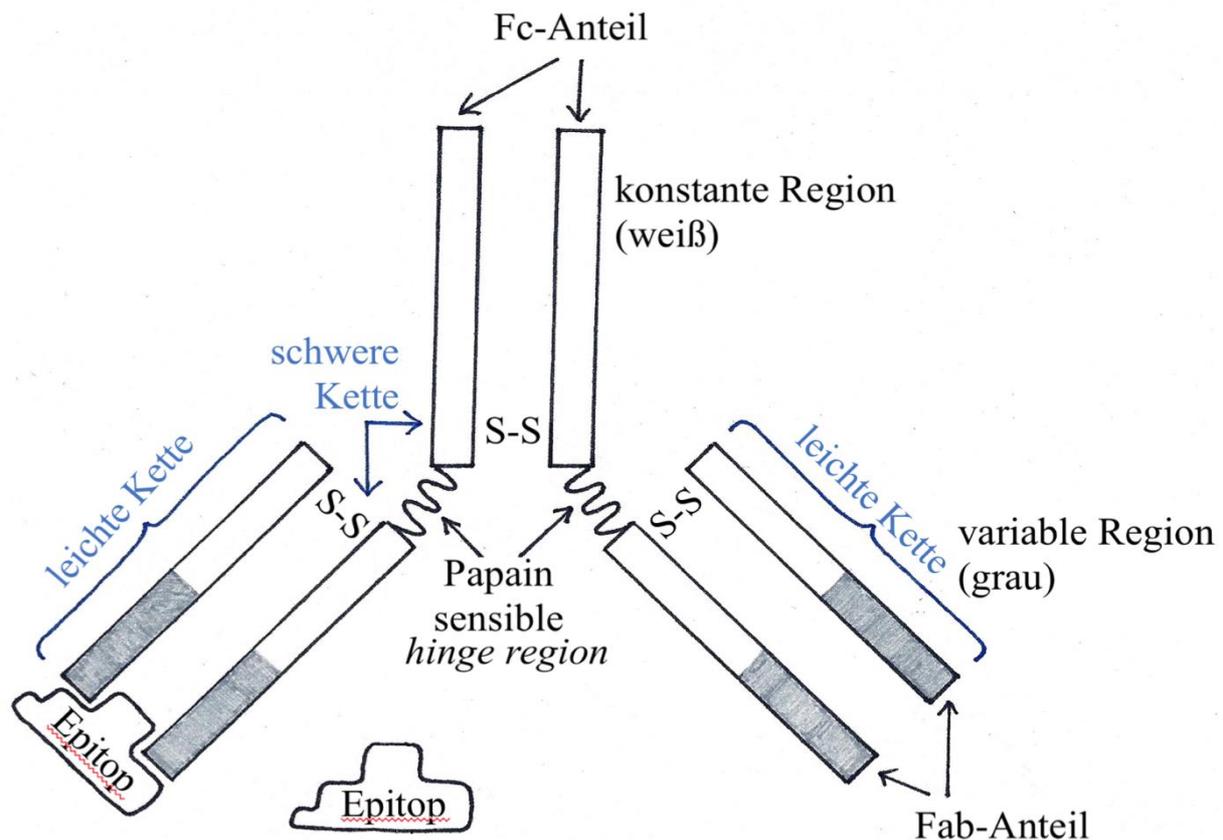


Abbildung 14: Struktur des IgG-Moleküls, modifiziert nach Burry RW (2010) [137]. Der IgG-Antikörper besteht aus einer konstanten Region (weiß) mit einem Fc- (*crystallisable* Fragment) Anteil, der an den Fc-Rezeptor binden kann, der sich u.a. auf Makrophagen und natürlichen Killerzellen befindet, sowie typspezifische Antigene. Die variable Region (grau) enthält den Fab-Anteil, der wiederum den Epitop-Abschnitt des Antigens binden kann (auf der linken Seite des Schaubilds). Das IgG Molekül besteht aus einem Protein, das als schwere Kette bezeichnet wird und über die *hinge-region* verbunden ist (blauer Doppelpfeil); außerdem befindet sich seitlich über Disulfidbrücken (S-S) verknüpft ein Protein, das als leichte Kette bezeichnet wird (im Bild mit Klammer dargestellt). Mittels Papain (Protease-Enzym) kann das Molekül aufgespalten werden; die Ketten werden durch Disulfidbrücken (S-S) zusammengehalten.

## CRP

Das *collagen-related peptide* ist ein selektiver Agonist für den Thrombozyten-Kollagen-Rezeptor Glykoprotein VI, [138] der wiederum eine bedeutende Rolle bei der Thrombozytenanheftung an verletzte Gefäße [139] und deren kollagenabhängigen Aktivierung [140] hat. Die CRPs selbst haben eine Kollagen Typ-1 ähnliche Struktur [141] und sind somit starke Aktivatoren von Thrombozyten. [142] Hierfür ist die dreifach helikale Struktur der CRPs von herausragender Bedeutung [143]. Letztlich kann CRP neben der Aktivierung auch zur Apoptose von Thrombozyten führen. [144]

## ADP

Adenosindiphosphat ist ein Ribonucleosidmonophosphat, dessen 5'-Sauerstoffatom von Adenosin mit einer Kette aus zwei Phosphorylgruppen verbunden ist; ADP wird entweder durch Übertragung einer Phosphorylgruppe von ATP (Adenosintriphosphat) oder auf AMP (Adenosinmonophosphat) in Reaktionen gebildet. [145] Damit hat es eine entscheidende Bedeutung im Rahmen der Prozesse zur chemischen Speicherung von (Wärme-)Energie in Form von ATP in unserem Körper. [146]

Zusätzlich zu dieser bedeutsamen Rolle ist ADP auch ein wichtiger Agonist und damit Aktivator für die Thrombozyten(-Aggregation); dabei bewirkt es nicht nur die primäre Aggregation, sondern vielmehr auch die sekundäre Aggregation, die Gestaltänderung von Thrombozyten sowie die Sekretion verschiedener Mediatoren durch Thrombozyten (vgl. Abb. 15, S. 36). [147]

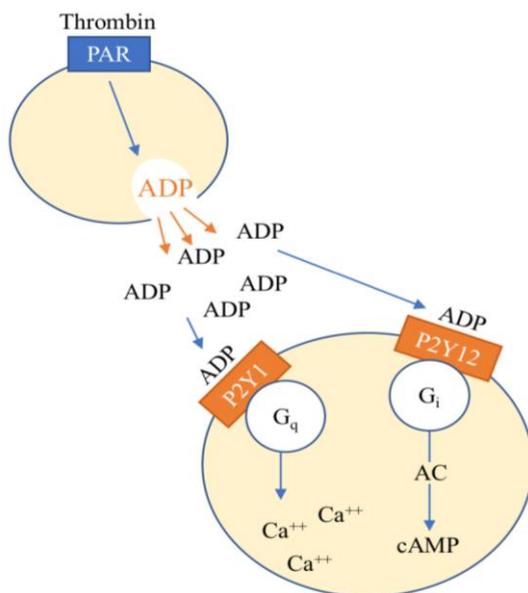


Abbildung 15: Thrombozytenaktivierung durch ADP (bzw. Thrombin), modifiziert nach Woulfe D *et al.* (2001) [148]. Thrombin als potenter Thrombozyten-Aktivator führt (*via* PAR = Protease-aktiver Rezeptor) zu einer Freisetzung von ADP (Adenosindiphosphat). Dieses ADP wiederum kann über die Thrombozyten-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 (Purinerge G-Proteine gekoppelte Rezeptoren, hier G-Proteine  $G_q$  und  $G_i$ ) ebenfalls zu einer Aktivierung weiterer Thrombozyten (durch Calcium-Einstrom bzw. Entstehung von cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat durch AC = Adenylylcyclase) führen.

**Thrombin**

Thrombin ist eine der zentralen Proteasen im menschlichen Körper, die hauptsächlich an den Prozessen der Blutkoagulation bzw. der Thrombozytenaggregation (vgl. Abb. 15) beteiligt ist; hierfür wird zunächst die inaktive Zymogenform Prothrombin von der Leber gebildet, die dann bei Gefäßschädigung in die aktive Form Thrombin umgewandelt wird und die Koagulationskaskade einleitet. [149]

**Trypan-blau**

Trypan-blau ist ein blauer im sauren Milieu aktiver Farbstoff, der zwei Azo-Farbstoffe besitzt und in *exclusion assays* der Unterscheidung lebender und toter Zellen dient [150]. [151]

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Monozyten (Kultivierung und Isolierung)

Monozyten müssen zum einen aus humanem Blut gewonnen und kultiviert werden; zum anderen nach Kultivierung für die Assays isoliert werden.

#### Monozyten-Kultivierung

Nach Blutspende in der Blutspendebank in Tübingen direkt am Uniklinikum werden die *Buffy Coat*-Produkte einzelner freiwilliger Spender nach der Spende in der Blutbank abgeholt und sofort verarbeitet. Diese Verarbeitung erfolgte im Labor unter sterilen Bedingungen.

Zunächst wird der Inhalt der Spendebeutel in eine Zellkulturflasche gegeben. Dabei werden die Proben je nach Volumen mit mehr oder weniger PBS-Lösung verdünnt, sodass am Ende immer ein Volumen von 120 ml entstand. Das gewonnene Blutvolumen wird nun auf acht Falcon-Röhrchen á 30 ml verteilt; in die Falcon-Röhrchen wird zuvor jeweils 20 ml Ficoll-Lösung vorgelegt.

Die Zentrifugation der Röhrchen erfolgte 20 Minuten lang bei 2100 Umdrehungen pro Minute ohne Bremse. Nach der Zentrifugation und der dichteabhängigen Auftrennung der Blutbestandteile waren mehrere verschiedene Phasen im Röhrchen entstanden und sichtbar:

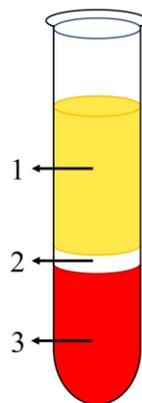


Abbildung 16: Auftrennung des *Buffy Coat* nach dem ersten Zentrifugationsschritt, modifiziert nach Menck K *et al.* (2014) [152]. Der Pfeil mit der Nummer 1 kennzeichnet das Plasma; Nummer 2 das weiße Intermedium oder Pellet, bestehend aus PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*), das Monozyten und Lymphozyten enthält; Nummer 3 die untere rote Phase der Erythrozyten und darüber Granulozyten mit einem oberen etwas hellerem Anteil der Ficoll-Paque-Lösung.

Die in der Abbildung 16 mit Pfeil 2 gekennzeichnete Phase, PBMC (*peripheral blood mononuclear cells* [152]), wird nun sorgfältig abgesaugt und erneut auf 4 Falcon-Röhrchen gleichmäßig verteilt. Diese Röhrchen werden nun wieder mit PBS-Lösung auf 50 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert, allerdings nur für 10 Minuten bei 1600 Umdrehungen pro Minute. Nach diesem Zentrifugationsgang befanden sich die Monozyten schließlich als Pellet auf dem Boden des Röhrchens, sodass der Überstand verworfen werden konnte. Das Pellet wird mittels RPMI-Lösung (3 ml) gelöst und in das nächste Röhrchen gegeben, um auch dort das unten anhaftende Pellet zu lösen. Nachdem dieser Vorgang auch für die restlichen zwei Röhrchen wiederholt wurde, wird das letzte Röhrchen samt Inhalt in eine Kulturflasche gegeben, in die zuvor 15 ml RPMI-Medium vorgelegt worden sind. Schließlich werden die Monozyten in der Kulturflasche im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert.

### **Die Ermittlung der Monozyten-Zahl erfolgte auf zwei Arten:**

1. 245 µl Trypanblau und 5 µl der Monozyten-Lösung werden in ein Eppendorf-Cup gegeben und vermischt. Unter dem Lichtmikroskop konnte dann in einer Neubauer-Zählkammer die Monozytenzahl je Quadrant ermittelt werden; diese musste dann nur noch mit dem Faktor  $1,25 \times 10$  multipliziert werden.
2. 20 µl der Monozyten-Lösung werden wieder in einem Eppendorf-Cup mit 180 µl PBS-Lösung vermischt und dann mittels Zellzähler SYSMEX KX-21N ausgezählt (Zellen pro Mikroliter).

### **Monozyten-Isolierung**

Die Monozyten-Isolierung erfolgt nun zunächst durch Abkippen des Überstands an Medium aus der entsprechenden Kulturflasche und anschließendem Spülen mit PBS. Danach Trypsin dazugeben und für 5 Minuten inkubieren; der Inkubations-Stop erfolgt schließlich mit der gleichen Menge an RPMI-Medium. Der Überstand wird in Falcons gefüllt und diese für 10 Minuten bei 1.600 Umdrehungen mit Bremse zentrifugiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Pellet mit RPMI-Medium resuspendiert. Zuletzt wird die Monozytenzahl bestimmt.

## 2.2.2 HT-22-Zellen (Kultivierung und Isolierung)

Die HT-22-Zellen stellen eine geklonte Zelllinie der parenten unsterblich gemachten HT-4-Zellen dar, die ursprünglich von einer primären neuronalen Hippocampus-Kultur von Mäusen abstammen. [153; 154; 155; 156; 157]

### HT-22-Zell-Kultur

Die HT-22-Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen) werden in DMEM-Medium, das mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin angereichert wurde, bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### HT-22-Zell-Isolierung

Zu 25 ml der kultivierten HT-22-Zellen werden 7,5 µl Staurosporin hinzugegeben und für 3 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgt eine Kontrolle unter dem Mikroskop. Anschließend wird ein Medium-Wechsel (möglichst vorher erwärmtes Medium) durchgeführt. Die Zellen werden dann über Nacht bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> erneut inkubiert. Am nächsten Tag wird das Medium abgesaugt und die Zellen dann für 5 Minuten bei 1.200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend in Eppendorf-Gefäße entsprechend pipettiert und eingefroren oder sofort benutzt.

## 2.2.3 Thrombozyten-Isolierung

ACD-Puffer	12,5 g Na <sub>3</sub> -Citrat 6,82 g Zitronensäure 10 g Glucose Mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen und mit NaOH auf einen pH von 4,69 einstellen Sterilfiltrieren, bei 4 °C aufbewahren
------------	---

Tyrodes 10x	80 g NaCl 10,15 g NaHCO <sub>3</sub> 1,95 g KCl Mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen Sterilfiltrieren, bei 4 °C aufbewahren
Tyrodes pH 7,4 + 0,1% BSA/Glucose	0,2 g BSA 0,2 g Glucose 20 ml Tyrodes 10x (1:10 Verdünnung) 180 ml destilliertes Wasser Mit HEPES auf pH 7,4 einstellen
Tyrodes pH 6,5 + 0,1% BSA/Glucose	150 ml Tyrodes pH 7,4 + 0,1% BSA/Glucose mit 1 N HCL auf einen pH von 6,5 einstellen

Zur Vorbereitung werden eine 20 ml Spritze, eine Kanüle, ein Membranadapter für die Spritze sowie 50 ml Falcons bereitgestellt. Steriler ACD-Puffer wird in ein 50 ml Falcon abgefüllt. Die Kanüle wird nun auf die Spritze gesteckt und 4 ml ACD-Puffer aufgezogen. Anschließend wird Blut abgenommen (langsam, damit die Thrombozyten nicht schon stimuliert werden) und durch Schwenken mit dem ACD-Puffer vermischt. Je 10 ml abgenommenes Blut wird direkt in ein 15 ml Falcon gegeben (schräg halten und langsam reinfließen lassen). Die generierten Falcons werden dann bei 1.000 Umdrehungen pro Minute für 20 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. In der Zwischenzeit wird Tyrodes-Puffer hergestellt. Nach der Zentrifugation hat sich plättchenreiches Plasma abgesetzt; dieses wird vorsichtig mit einer Transferpipette abgenommen und in ein 50 ml Falcon gegeben (max. 10 ml plättchenreiches Plasma pro 50 ml Falcon). In die Falcons werden je 35 ml Tyrodes pH 6,5 vorgelegt. Die Falcons wurden nun erneut bei 2100 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten bei Raumtemperatur und mit Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand abpipettiert und das Pellet in 250 µl Tyrodes pH 6,5 aufgenommen; zur Neutralisation werden nun ebenfalls 250 µl von Tyrodes pH 7,4 dazugegeben und vermischt. Die anschließende Thrombozytenzählung erfolgte

mittels Sysmex; hierzu wird eine 1:10 Verdünnung in einem Eppendorf-Cup (20 µl Zellsuspension und 180 µl Tyrodes pH 7,4) hergestellt.

### **Thrombozytenaktivierung; Überstand-Generierung**

Die Thrombozytenaktivierung wird nach dem letzten Zentrifugationsschritt der Thrombozyten-Isolierung durchgeführt. Hierzu wird der Überstand ebenfalls abpipettiert, das Pellet jedoch mit 500 µl (bzw. 1000 µl für Aktivierung mit CRP und ADP) PBS-Ca<sup>2+</sup> vorsichtig resuspendiert. Die Zellen können jetzt (noch einmal) gezählt werden. Die Pellets werden nun 30 Minuten lang mit CRP (*stock*: 9 mg/ml bzw. 100 µg/ml) oder ADP (*stock*: 1 mM) bei einer Endkonzentration von 5 µg/ml CRP bzw. 50 µM ADP inkubiert. Danach werden die Proben für 4 Minuten bei 2.500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die dabei entstandenen Überstände werden schließlich in neue Eppendorf-Gefäße überführt, beschriftet und sofort auf Eis gelegt bzw. benutzt.

### **2.2.4 Apoptose-Assay**

Der Apoptose-Assay dient der Untersuchung, inwieweit und inwiefern Thrombozyten durch HMGB1 mit Monozyten interagieren, um die Überlebens- bzw. Survivaleigenschaft der Monozyten zu beeinflussen.

Hierfür werden immer 50.000 Monozyten pro *tube* verwendet. Die Monozyten werden dann in die benötigten FACS-Röhrchen hinzugegeben und gegebenenfalls mit Antikörpern für 20 Minuten (Inkubationszeit) vorbehandelt:

1. Antikörper gegen RAGE: der *stock* beträgt 200 µg/ml und die Endkonzentration 15 µg/ml.
2. Antikörper gegen TLR2: der *stock* beträgt 500 µg/ml und die Endkonzentration 2 µg/ml.
3. Antikörper gegen TLR4: der *stock* beträgt 200 µg/ml und die Endkonzentration 10 µg/ml.

In dieser Inkubationszeit (20 Minuten) gegebenenfalls die Überstände der Thrombozyten mit Antikörper gegen HMGB1 vorbehandeln: der *stock* betrug 1000 µg/ml und die Endkonzentration 2 µg/ml. Danach die Überstände zu den Monozyten geben und für 2 Stunden inkubieren. Anschließend wurde ABT-737 zu den entsprechenden FACS-Röhrchen in einer Verdünnung

von 1:40 gegeben und für 1 Stunde inkubiert. Schließlich werden die Ansätze mit TMRE *gelabelt* (5 µl pro FACS-Röhrchen) und nach 30 Minuten mittels Durchflusszytometrie mit dem FACS Calibur Flow Cytometer und CellQuest Software ausgewertet.

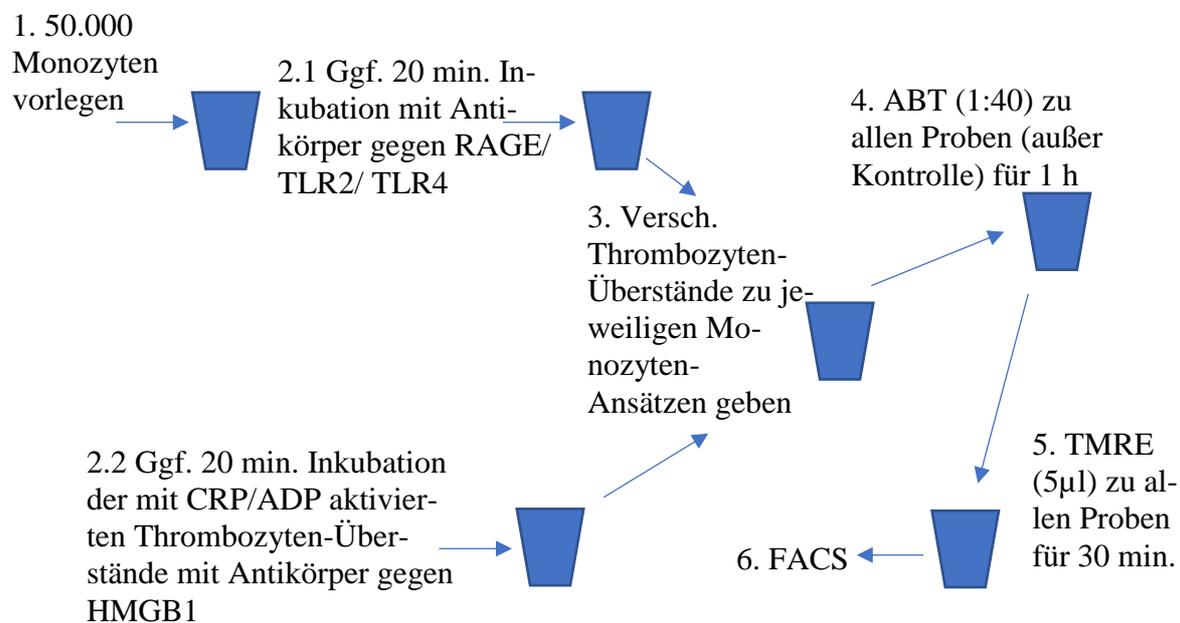


Abbildung 17: Schaubild der einzelnen methodischen Schritte des Apoptose-Assays.

## 2.2.5 Migrations-Assay

Der Migrations-Assay dient der Untersuchung, inwieweit und inwiefern Thrombozyten durch HMGB1 mit Monozyten interagieren, um die Migrationseigenschaft der Monozyten zu beeinflussen.

Der Versuch wird mittels 48-*well*-Kammer (*Boyden chamber*), die in zwei aufeinanderliegende Kompartimente durch eine 5 µm große Polycarbonat-Membran aufgeteilt wird, durchgeführt. Hierfür werden in das obere Kompartiment 20.000 Monozyten unbehandelt oder behandelt pro *well* hinzugefügt (Endvolumen 50 µl); die Behandlung der Monozyten erfolgt mit Antikörpern gegen RAGE (15 µg/ml), TLR2 (2 µg/ml) oder TLR4 (10 µg/ml). Die untere Kammer wird je nach *set up* befüllt (Endvolumen 28 µl; vgl. Abb. 18 „untere Kammer“, S. 43); bei Vorbehandlung der mit CRP bzw. ADP aktivierten Thrombozyten-Überstände wird eine Konzentration von 2 µg/ml des Antikörpers gegen HMGB1 verwendet. Für die Konstruktion wird zunächst die untere Kammer befüllt, dann die Membran nach kurzem „Baden“ in PBS-Ca<sup>2+</sup> über die

untere Kammer gelegt. Schließlich wird die obere Kammer samt zusätzlicher „Zwischenmembran“ aufgelegt und die Konstruktion mit Drehschrauben befestigt. Für die Inkubation wird die gesamte Konstruktion mit Parafilm verschlossen und bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 4 Stunden inkubiert. Danach wird die Kammer samt Kompartimenten getrennt und geöffnet, damit die migrierten Monozyten mittels Methanol (10 ml) für 10 Minuten fixiert werden konnten. Nach der Fixierung wird die Membran in 7ml May-Grünwald-Lösung gelegt; nach 3 Minuten wird für 1 weitere Minute 7 ml destilliertes Wasser dazugegeben. Schließlich wird die Membran noch für 20 Minuten in Giemsa-Lösung (Verhältnis 1:5) gelegt. Die Membran wird dann auf einem Objektträger mit Roti-Histofix und Deckglas befestigt und mehrere Tage getrocknet, sodass schließlich der Objektträger samt Membranabdruck (gefärbte migrierte Monozyten) per Mikroskop ausgezählt werden konnte.

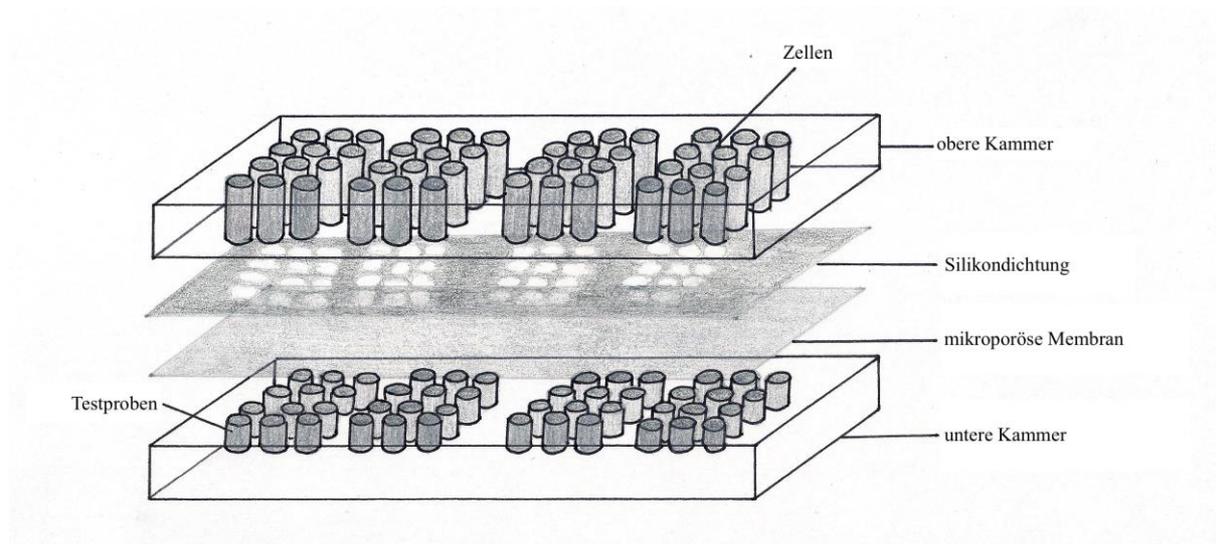


Abbildung 18: *Boyden chamber* Aufbau, nach Chen HC (2005) [158]. Zu sehen ist eine 48-well *Boyden chamber* mit der unteren Kammer, die mit den jeweiligen Testproben (hier z.B.: Überstand CRP bzw. ADP aktivierter Thrombozyten) befüllt wird. Auf diese Kammer wird die Membran (mikroporöse Membran) mit einer zusätzlichen „Dichtungs“-Membran (Silikondichtung) gelegt. Hierauf wird die obere Kammer gelegt und die dortigen wells mit den zu migrierenden Zellen (hier: Monozyten) befüllt.

### 2.2.6 Phagozytose-Assay

Der Phagozytose-Assay dient der Untersuchung, inwieweit und inwiefern Thrombozyten durch HMGB1 mit Monozyten interagieren, um die Phagozytose-Eigenschaft der Monozyten zu beeinflussen.

Für den Assay werden standardmäßig 1.000.000 Thrombozyten pro *tube* verwendet; bei Vorbehandlung erfolgt diese mit Antikörper gegen HMGB1 (2 µg/ml) für 15 Minuten bis schließlich zusätzlich für 30 Minuten gegebenenfalls mit CRP (5 µg/ml) bzw. ADP (50 µM) inkubiert wird. Außerdem werden ebenfalls 50.000 Monozyten pro *tube* bereitgestellt; bei Vorbehandlung erfolgt diese für 30 Minuten mit den Antikörpern gegen RAGE (15 µg/ml), TLR2 (2 µg/ml) oder TLR4 (10 µg/ml). Die Zellen werden danach mit PBS gewaschen und für 10 Minuten bei 2.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. In die Thrombozyten-*tubes* wird nun CD42b-FITC-Marker hinzugegeben (1:10) und für 30 Minuten inkubiert; die Monozyten werden mit 5 µl CD14-FITC-Marker inkubiert. Danach wird erneut mit PBS gewaschen und nochmals bei gleichen Einstellungen wie zuvor zentrifugiert. Nun werden die Monozyten hinzugegeben und der Ansatz für 4 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Auswertung mit (10%) bzw. ohne Trypan-blau mittels Durchflusszytometrie mit dem FACS Calibur Flow Cytometer und CellQuest Software.

### 2.2.7 Durchflusszytometrie mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorter*)

Mithilfe der Analyse der Durchflusszytometrie und dem für die Messungen hierzu nötigen *fluorescence-activated cell sorter* können individuelle Zellen charakterisiert und separiert werden; Zellgröße, Granularität sowie Fluoreszenz (aufgrund der Bindung fluoreszierenden Antikörper an die Zellen) werden für jede einzelne Zelle bei Passieren der Photodetektoren gemessen. [159] Dabei dient das Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*) der Messung der relativen Größe der Zelle, während das Seitwärtsstreulicht (SSC = *side scatter*) der Messung der Zellgranularität dient. [160] Prinzipiell ist es möglich, dass Zellen mehrere fluoreszierende Antikörper binden, [160] daraus ergibt sich schließlich eine Vielzahl an Detektionsmöglichkeiten der verschieden gefärbten Zellen. In der vorliegenden Arbeit werden drei Zellpopulationen, Monozyten, Thrombozyten und „Restzellen“, unterschieden. Durch *gates*, also die Festlegung

eines definierten Bereichs in der Auswertung, kann die jeweilige Zellpopulation noch genauer definiert werden (s. Abb. 21 auf S. 47, „Analyse der Durchflusszytometrie“). [161]

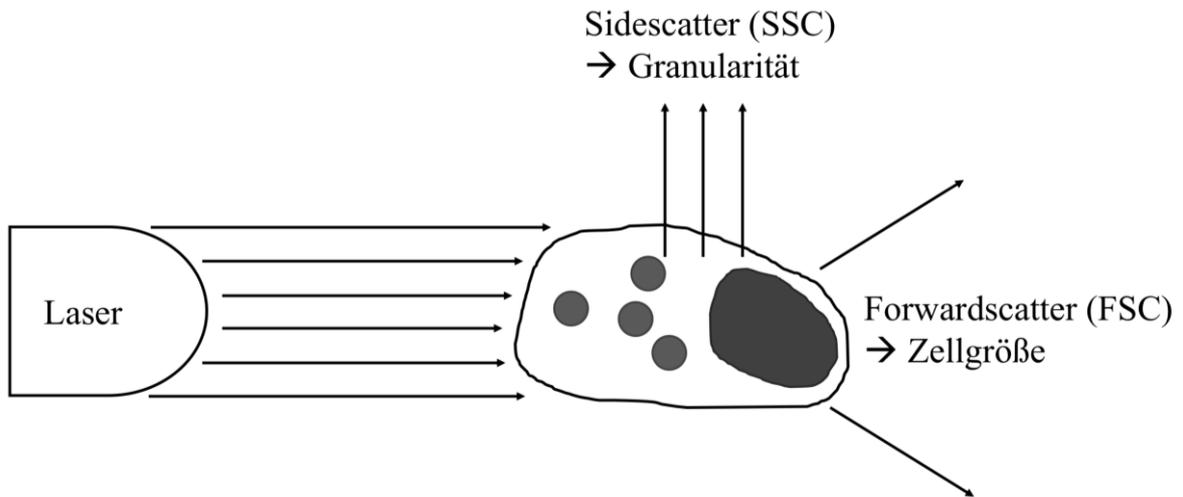


Abbildung 19: Laserbestrahlung einer einzelnen Zelle, nach Luttmann *et al.* (2014) [160]. Das vom Laser ausgehende Licht wird von der Zelle einerseits seitlich (Seitwärtsstreulicht oder *side scatter* = SSC) – daraus lässt sich auf die Granularität schließen – und andererseits vorwärts (Vorwärtsstreulicht oder *forward scatter* = FSC) – daraus lässt sich auf die Zellgröße schließen – abgelenkt.

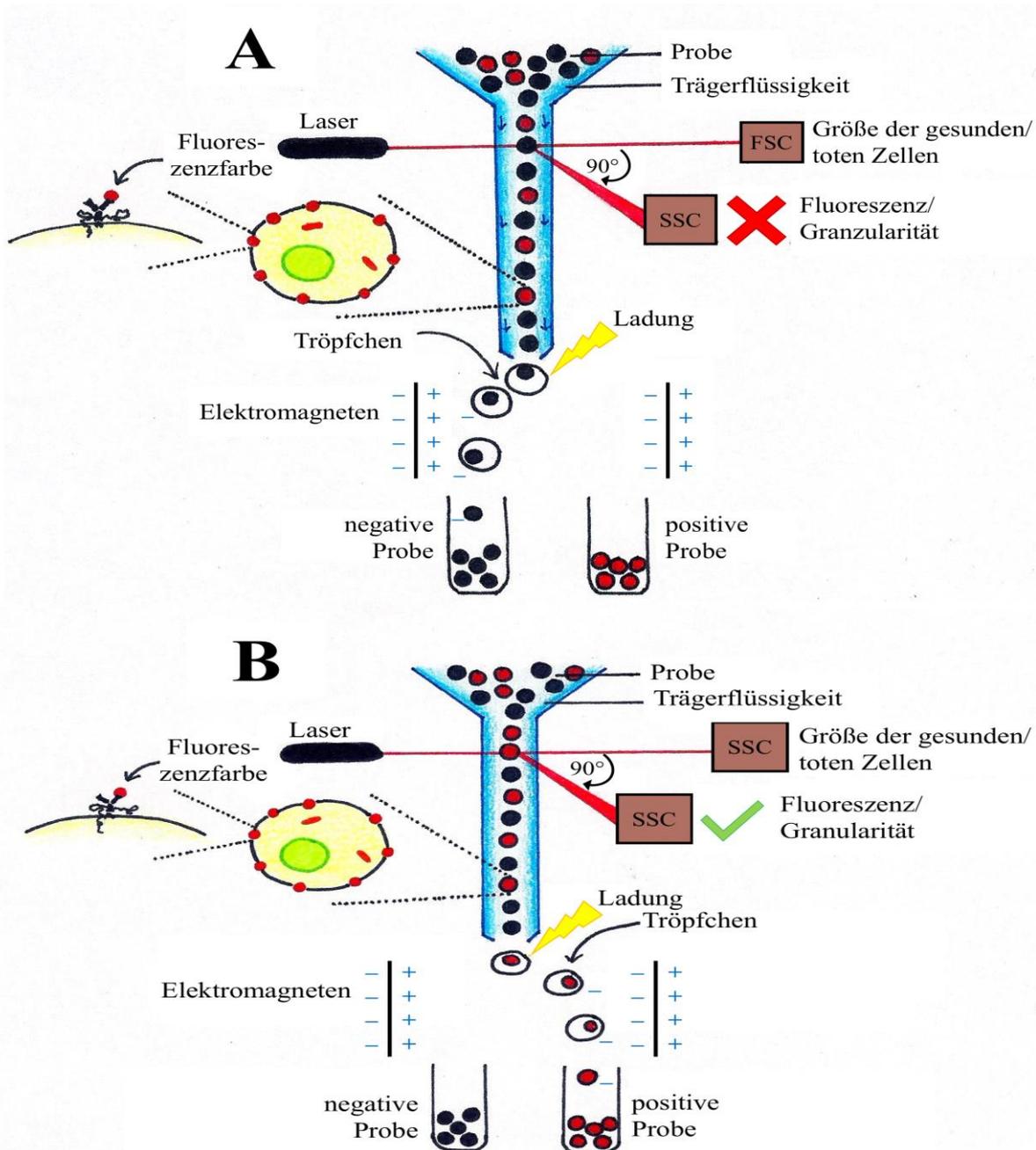


Abbildung 20: Schaubild zur Veranschaulichung des FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Prinzips, nach Sabban S (2011) [162]. A: Die Probe mit Zellen kommt in die Mitte des Flusstrichters und wird dann so geschleust, dass eine einzige Schlange mit einzelnen hintereinander fließenden Zellen entsteht; diese Zellen passieren dann einen Laserstrahl, der sowohl das Vorwärtsstreuungslicht (FSC = *forward scatter*) als auch das Seitwärtsstreuungslicht (SSC = *side scatter*) misst. Im Rahmen der *fluorescence-activated cell sortings* passieren die Zellen eine Art Düse, die vibriert und einzelne „Zelltröpfchen“ generiert, die elektrisch negativ geladen sind. Nun berechnet das System, wann die Zelle den Bereich zwischen den beiden Elektromagneten erreicht; die Ladung der Elektromagneten und der Zellen führt dazu, dass die einzelnen Zellen in dem „richtigen“ Fläschchen landen; im Fall A wird keine Fluoreszenz gemessen, sodass die Zellen in das negative Probenfläschchen gesendet werden. Im Fall von Schaubild B wird die korrekte Fluoreszenz detektiert und die Zelltröpfchen in das positive Probenfläschchen gesendet.

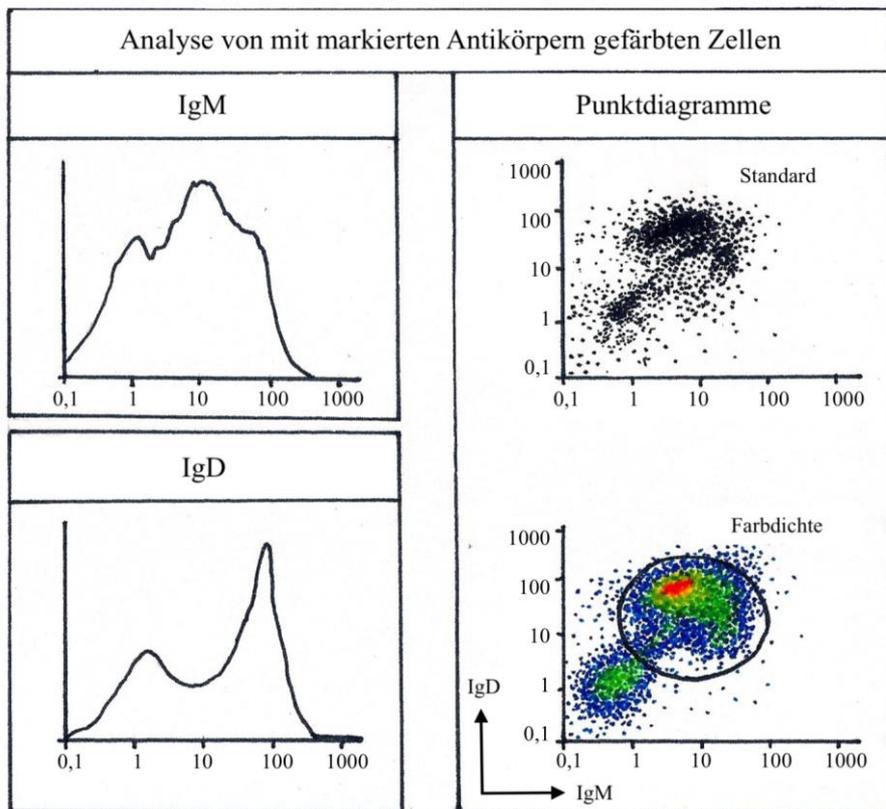


Abbildung 21: Analyse der Durchflusszytometrie, nach Janeway CA Jr. *et al.* (2001) [163]. Die Analyse wird hier mittels IgM und IgD, die mit unterschiedlichen Farbstoffen „gelabelt“ worden sind, veranschaulicht: Auf der linken Seite sind die Immunglobuline IgM und IgD per Histogramm dargestellt, das die Verteilung der Zellen bezüglich lediglich eines bestimmten Parameters zeigt; wenn allerdings zwei oder mehr Parameter für jedes der Immunglobuline gemessen werden soll, dann können die auf der rechten Seite gezeigten *plots* (Punktdiagramme) verwendet werden; dabei wird auf der horizontalen Achse die Intensität der IgM-Fluoreszenz und auf der vertikalen Achse die von IgD angegeben. Auf diese Weise können Zellen unterschiedlicher Farbintensität differenziert werden; außerdem können andere Zelltypen abgegrenzt werden: die in den Schaubildern ganz unten links lokalisierte Fraktion stellt andere nicht Immunglobuline repräsentierende Zellen dar. Genau hierfür kann ein sogenanntes *gate* eingesetzt werden, um nur die Immunglobulinfraktion zu betrachten (schwarzer Kreis). Prinzipiell stellt jeder Punkt eines *plots* eine gemessene Zelle dar.

## 2.2.8 Gelelektrophorese und Western Blot

### Gelelektrophorese

Zunächst erfolgt die Auftrennung des Proteingemisches elektrophoretisch mittels diskontinuierlicher SDS (*sodium dodecyl sulfate* [164]) -Gelelektrophorese, die die Proteine nach deren Molekularmasse trennt. [160] Wichtiger Bestandteil dieses Geles ist Polyacrylamid, ein Polymer, das aus Acrylamidmonomeren und meist N,N'-Methylenbisacrylamid ein dreidimensionales Netzwerk (die Vernetzung wird mittels N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin und Ammoniumsulfat ausgelöst) bildet; durch dieses Netzwerk wandern dann kleine Proteine nach Anlegung einer Spannung schneller, größere eher langsamer, was schließlich zu klar abgrenzbar sichtbaren Proteinbanden auf dem Gel führt. [160] Die diskontinuierliche Variante der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeichnet sich dadurch aus, dass die Proteine zunächst ein Sammelgel passieren, danach erst wandern sie dann durch das Trenngel – hierdurch kann eine gute Auftrennung und hohe Schärfe der Proteinbanden und somit eine Verbesserung zur späteren Übertragung auf eine Membran erreicht werden. [160]

### Western Blot

Ein Proteingemisch wird zunächst normalerweise per Gel-Elektrophorese aufgetrennt (s. o.) und anschließend im Rahmen des Blottings (auch: Immunoblotting) auf eine Membran, hier aus Nitrocellulose, übertragen; mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern können die spezifischen Proteine dann nachgewiesen werden. [159; 163] Das durch die Elektrophorese entstandene Gel wird dann zum Blotting an einen Stromkreis angeschlossen und wie folgt angeordnet:

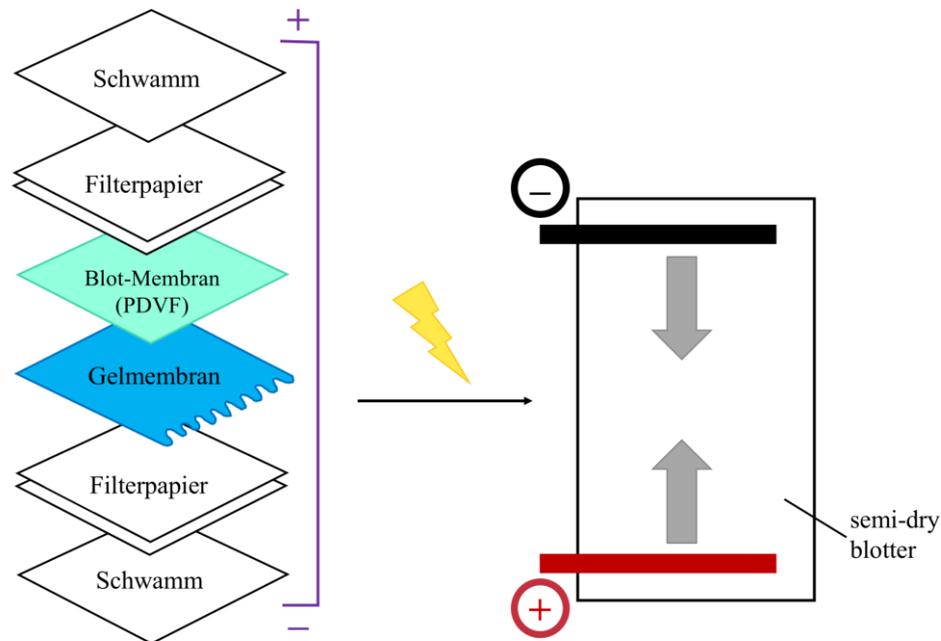


Abbildung 22: Western Blot-„Sandwich“ zur Übertragung der Proteine vom Gel auf die Blot-Membran, nach Mahmood T & Yang P-C (2012) [165]. Auf der linken Seite sind die verschiedenen Teile zu sehen, die letztlich den „Sandwich“ bilden: außen (also oben und unten im Bild) sind Schwämme angeordnet, auf die jeweils oben und unten ein Filterpapier folgt, innen befindet sich letztlich die aus der Gelelektrophorese gewonnene Gelmembran mit den Proteinen, die auf die Blot-Membran (PDVF = Polyvinylidenfluorid) direkt daneben übertragen werden sollen. Durch Anlegen einer Spannung können die Proteine dann entweder unter *semi-dry* oder *wet* Bedingungen auf die Membran übertragen werden.

Nach diesem Vorgang gilt es allerdings die übertragenen Proteine nachzuweisen, zuvor sollte jedoch die Membran „geblockt“ werden: mittels z.B. 5% BSA (*bovine serum albumin*)-Lösung kann verhindert werden, dass die später hinzugegebenen Antikörper wahllos überall binden. [165] Darauf folgt also im ersten Schritt die Bindung eines Primärantikörpers an das Protein und im zweiten Schritt die Bindung eines (fluoreszierenden) Sekundärantikörpers an den Primärantikörper, um das Ergebnis schließlich sichtbar zu machen. [166]

## Gesamtablauf Gelelektrophorese, Western Blot und Immunodetektion

### (1) Proben-Präparation (nach [165])

Mittels des Dreisatzes (Konzentration = Masse/ Volumen) lässt sich zunächst das Volumen der Probe berechnen, sodass genau 50 µg pro *well* hinzugegeben werden können. Nun werden 5 µl der Probe mit doppelt-destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) auf 15 µl pro *well* aufgefüllt und gemixt. Anschließend werden die Proben für fünf Minuten bei 100 °C erhitzt. Als Proben diente der Überstand mit CRP (5 µg/ml), ADP (50 µM), Thrombin (1 U/ml), Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten und die Aktivierung durch die jeweiligen Kombinationen: CRP/ADP/Thrombin und Überstand apoptotischer HT-22-Zellen.

### (2) Gel-Präparation (nach [165]) und Reagenzien-Aufbereitung

10% Sammelgel	Doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O	3 ml
	1 M Tris-HCL (Salzsäure)	2,1 ml (pH 8,9)
	30% Acr Bis	2,8 ml
	10% <i>Sodium dodecyl sulfat</i> (SDS)	80 µl
	10% <i>Ammonium Persulfat</i> (APS)	56 µl
	<i>Tetramethylethylenediamine</i> (TEMED)	6 µl
6% Trenngel	Doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O	2 ml
	1 M Tris-HCL	400 µl (pH 6,7)
	30% Acr Bis	600 µl
	10% SDS	36 µl
	10% APS	24 µl
	TEMED	4 µl

1 M Tris-Puffer (100ml)	Tris (121,14 g/mol)	12,21 g auf 70 ml
	pH 6,8	Mittels HCL (6 M) einstellen
	Doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O	auf 100 ml
Laufpuffer (1x)	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1%
Laufpuffer (10x)	Tris (121,14 g/mol)	30 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	Doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O	auf 1 L
Blot-Puffer (1x)	10x Blot-Puffer	25 ml
	Doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O	175 ml
	Methanol	50 ml
Blot-Puffer (10x)	Tris (121,14 g/mol)	30 g
	Glycin	112,6 g
	Doppelt destilliertes H <sub>2</sub> O	auf 1 L

Das Sammelgel wird als Erstes in das Elektrophorese-Gestell gegeben und mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt; nach etwa 30 Minuten sollte das Gel fest sein. Das H<sub>2</sub>O wird nun abgekippt und das Trenngel auf das Sammelgel gegeben; der „Kamm“, der für die Taschenbildung im Gel verantwortlich ist, wird in das Gel eingeführt und wieder wird gewartet bis das Gel fest geworden ist.

### (3) Gel-Elektrophorese (nach [165])

Der Laufpuffer wird zuerst in das Elektrophorese-Gerät gegeben und dann das Gestell mit dem Gel. Dann wird der „Kamm“ aus dem Gel gezogen und die Taschen nun mit den Proben á 15 µl und einem *load marker* á 6 µl gefüllt. Schließlich wird eine niedrigere Spannung (60 V) an das

Trenngel und eine höhere (140 V) an das Sammelgel angeschlossen; der gesamte Gel-Elektrophorese-Ansatz „läuft“ nun für etwa eine Stunde.

#### **(4) Elektrotransfer (nach [165])**

Hierfür müssen zunächst 6 Filter-Papiere sowie eine *polyvinylidene fluoride* (PDVF)-Membran jeweils in der Größe des Gels ausgeschnitten werden. Sowohl den „Schwamm“ als auch das Filterpapier mithilfe von Blot-Puffer und die PDVF-Membran mithilfe von Methanol anfeuchten. Nun wird der „Sandwich“ (vgl. Abb. 22, S. 49) aus einem Schwamm, drei Filterpapieren, einem Gel, der PDVF-Membran und wieder drei Filterpapieren und einem Schwamm gebildet; dieser „Sandwich“ wird dann in das Transfergerät gegeben und mit Pufferlösung bedeckt. Die Elektroden werden richtig angeschlossen und der Transfer über 90 Minuten begonnen.

#### **(5) Antikörper-Bindung (nach [165])**

Die Membran wird mittels 5% *skim milk* und TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20) -Lösung für eine Stunde geblockt. Danach wird der Primärantikörper (anti-HMGB1 *rabbit* IgG 2 µg/ml bzw. anti-Actin als Kontrolle 1:1000) in 5% BSA-Lösung dazugegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem „Shaker“ inkubiert. Am nächsten Tag wird die Membran mit TBST-Lösung dreimal für fünf Minuten gewaschen. Der Sekundärantikörper wird mit 5% *skim milk* in TBST-Lösung für eine Stunde inkubiert. Anschließend die Membran wieder mit TBST-Lösung dreimal für fünf Minuten waschen. Die Analysierung der Ergebnisse erfolgt schließlich mittels Odyssey infrared imaging system.

### **2.2.9 Statistische Auswertung**

Die im Abschnitt Ergebnisse präsentierten Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standard-Deviation (SD) angegeben. Die statistische Analyse wurde mittels ANOVA und anschließendem *Bonferroni's test* oder *student's t-test* durchgeführt. Nur Werte mit  $p < 0.05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 7.00.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Migrations-Assay

Der Migrations-Assay soll über mehrere Fragen Aufschluss geben: zum einen soll die generelle Wirkung der Überstände von nicht-aktivierten bzw. aktivierten Thrombozyten auf die Migrations-Eigenschaft der Monozyten untersucht werden; zum anderen soll diese Wirkung qualitativ auf die von HMGB1 eingehender betrachtet werden. Schließlich dient der Assay dazu bei nachgewiesener Interaktion von HMGB1 mit den Monozyten auch den hierfür notwendigen Rezeptor der Monozyten aufzuzeigen. Insbesondere sollen etwaige Interaktionen auch nach einer Stimulation von Thrombozyten mit dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen und dem damit gewonnenen Überstand aufgezeigt werden.

Die folgenden Diagramme zeigen die Ergebnisse verschiedener Assays zur Monozyten-Migration. Dabei wurden für die Versuche standardmäßig 50.000 Monozyten (*pro well*) verwendet. Zur Aktivierung der Thrombozyten dienten ADP und CRP; die Überstände hiervon wurden dann in den entsprechenden Ansätzen verwendet. Die Auswertung erfolgte nach Mikroskop-Aufnahme per ImageJ durch Auszählung der migrierten Zellen.

#### 3.1.1 Migrations-Assay Versuchsreihe 1.1

Im Folgenden ist zur besseren Übersicht ein Ausschnitt der ersten Migrations-Assay-Versuchsreihe dargestellt. Dieser umfasst lediglich die Kontrollen (Monozyten + PBS; Monozyten + Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten), Monozyten und der Überstand mit CRP-aktivierter Thrombozyten und Monozyten und der mit Antikörpern gegen HMGB1 geblockte Überstand mit CRP-aktivierten Thrombozyten.

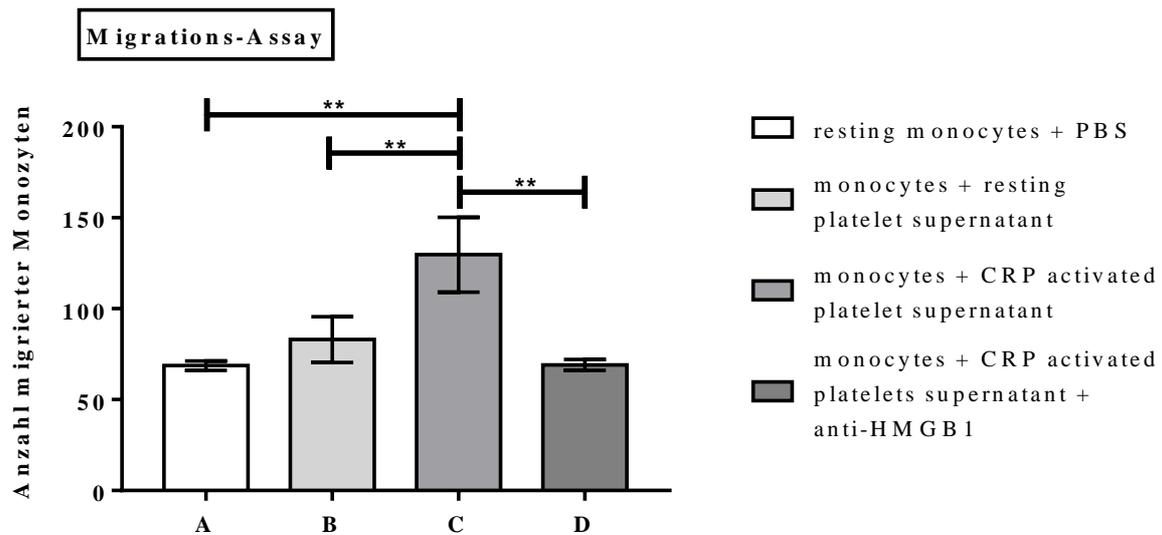


Abbildung 23: Migrations-Assay, Versuchsreihe 1.1. Als Kontrollen wurden sowohl nur Monozyten (A; *resting monocytes + PBS*) als auch Monozyten mit dem Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten (B; *monocytes + resting platelet supernatant*) gefahren. Balken C: Monozyten mit dem Überstand CRP-aktivierter Thrombozyten (*monocytes + CRP activated platelet supernatant*). Balken D: Monozyten mit Überstand CRP-aktivierter Thrombozyten, die mit Antikörpern gegen HMGB1 (*monocytes + CRP activated platelet supernatant + anti-HMGB1*) vorbehandelt worden sind. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0,0008$ , \*\*\*; *Bonferroni's test*  $p < 0,005$  = \*\*;  $n = 3$ ).

Aus dem obigen Diagramm (Abb. 23) ist zu entnehmen, dass Monozyten bei Überstand mit CRP-aktivierter Thrombozyten statistisch signifikant ( $p = 0,0017$ , \*\*) mehr migrieren als Monozyten bei Medium (vgl. Balken C und A). Dieser statistisch signifikante Unterschied ( $p = 0,0095$ , \*\*) der Migrations-Eigenschaft von Monozyten bei Überstand mit CRP-aktivierter Thrombozyten zeigt sich auch in Bezug auf die Kontrolle mit Monozyten und nicht-aktivierten Thrombozyten (vgl. Balken C und B). Außerdem ist dieser ( $p = 0,0018$ , \*\*) auch im Vergleich der migrierten Monozyten bei Überstand mit CRP-aktivierter Thrombozyten und Monozyten bei Überstand mit CRP-aktivierter Thrombozyten und zusätzlicher Vorbehandlung mit Antikörpern gegen HMGB1 zu sehen (vgl. Balken C und D).

### 3.1.2 Migrations-Assay Versuchsreihe 1.2

Im Folgenden ist zur besseren Übersicht ein Ausschnitt der ersten Migrations-Assay-Versuchsreihe dargestellt. Dieser umfasst ebenfalls die Kontrollen (Monozyten + PBS; Monozyten + nicht-aktivierte Thrombozyten) und Monozyten bei Überstand mit CRP-aktivierter Thrombozyten. Zusätzlich sind hier die Ergebnisse der Migration von Monozyten bei Vorbehandlung mit Rezeptorblockaden (RAGE, TLR2, TLR4) bei Überstand mit CRP-aktivierter Thrombozyten dargestellt.

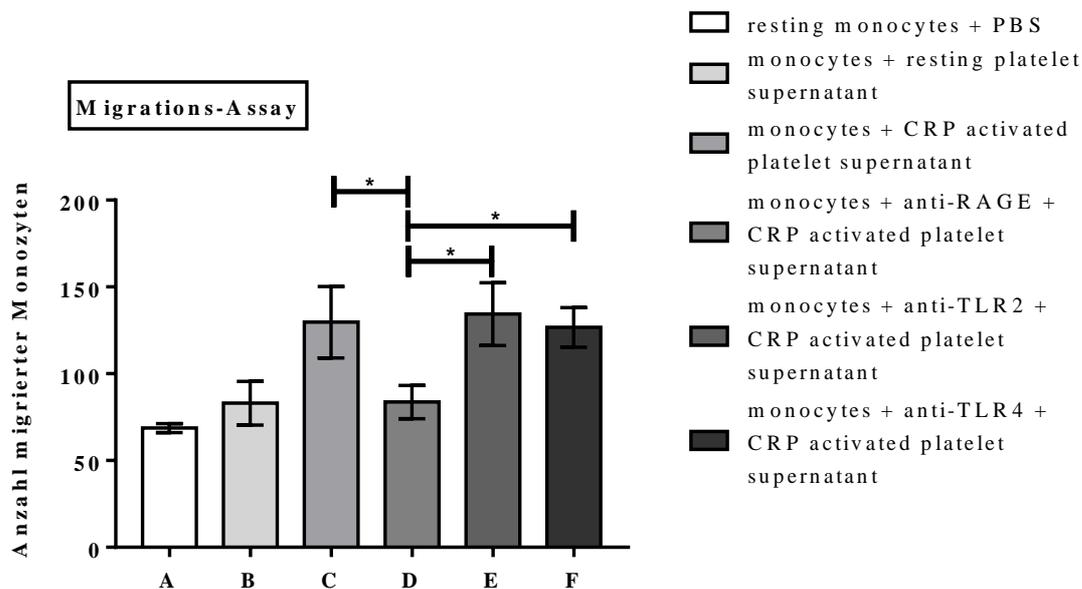


Abbildung 24: Migrations-Assay, Versuchsreihe 1.2. Dabei wurden als Kontrollen sowohl nur Monozyten (*resting monocytes* + PBS) als auch Monozyten mit dem Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten (*monocytes* + *resting platelet supernatant*) gefahren. Balken C: Monozyten mit dem Überstand CRP-aktivierter Thrombozyten (*monocytes* + *CRP activated platelet supernatant*). Balken D-F: vorbehandelte Monozyten mit Antikörpern gegen RAGE, TLR2 bzw. TLR4 mit Überstand CPR-aktivierter Thrombozyten (D, *monocytes* + *anti-RAGE* + *CRP activated platelet supernatant*; E, *monocytes* + *anti-TLR2* + *CRP activated platelet supernatant*; F, *monocytes* + *anti-TLR4* + *CRP activated platelet supernatant*). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0,0002$ , \*\*\*; *Bonferroni's test*  $p < 0,05=*$ ;  $n = 3$ ).

Das Diagramm zeigt, dass die Migration der Monozyten bei Vorbehandlung mit Antikörpern gegen RAGE statistisch signifikant erniedrigt ist im Vergleich zu den anderen beiden Rezeptorblockaden (vgl. Balken D und E,  $p = 0,0108$ , \*; vgl. Balken D und F,  $p = 0,0364$ , \*) und zu dem Ansatz mit Überstand CRP-aktivierter Thrombozyten (vgl. Balken D und C,  $p = 0,0225$ , \*).

### 3.1.3 Migrations-Assay Versuchsreihe 1.3

Das unten gezeigte Diagramm stellt die Zusammenführung der Ergebnisse der Ausschnitte Nr. 1 und 2 zu einer vergleichenden Gesamtübersicht dar.

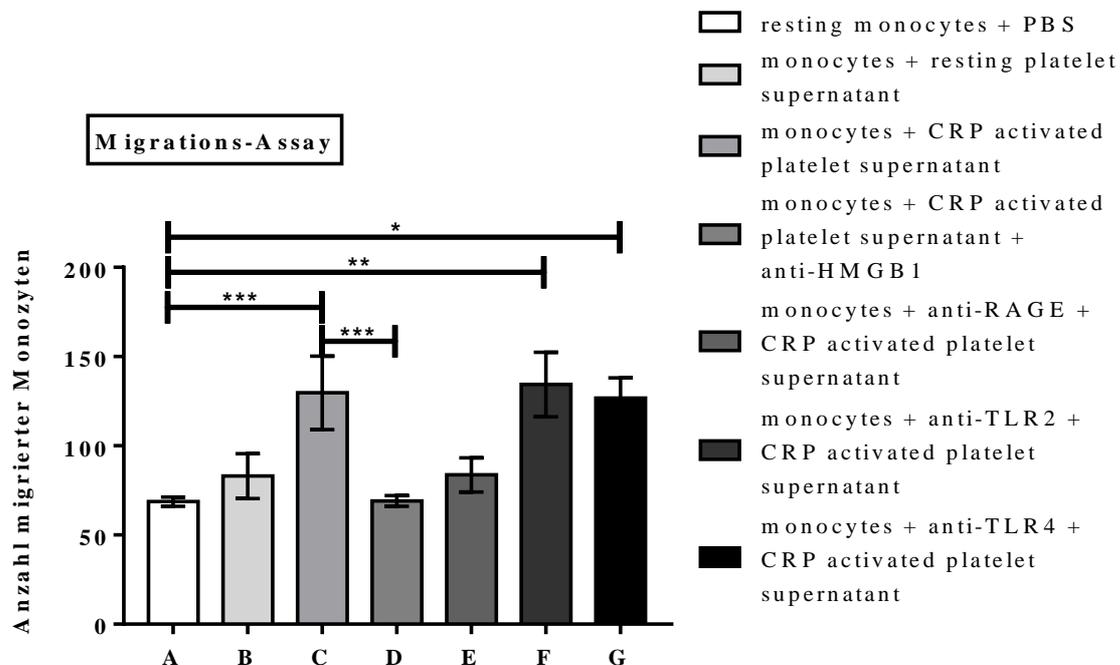


Abbildung 25: Migrations-Assay, Versuchsreihe 1.3. Balken A (*resting monocytes + PBS*) zeigt die Migrations-eigenschaft von nicht-stimulierten Monozyten; der Balken B (*monocytes + resting platelet supernatant*) stellt die Monozyten-Migration zum Überstand nicht aktivierter Thrombozyten dar – beide dienen als Kontrolle. Balken C: unbehandelte Monozyten und CRP-aktivierter Thrombozyten Überstand (*monocytes + CRP activated platelet supernatant*). Balken D (*monocytes + CRP activated platelet supernatant + anti-HMGB1*) dient ebenfalls der Kontrolle: der CRP-aktivierte Thrombozyten Überstand wurde zusätzlich mit Antikörpern gegen HMGB1 behandelt. Balken E-G: mit verschiedenen Rezeptor-Antikörpern behandelte Monozyten und CRP-aktivierter Thrombozyten Überstand (E, *monocytes + anti-RAGE + CRP activated platelet supernatant*; F, *monocytes + anti-TLR2 + CRP activated platelet supernatant*; G, *monocytes + anti-TLR4 + CRP activated platelet supernatant*). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*; *Bonferroni's test*:  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,005 = **$ ,  $p < 0,0005 = ***$ ;  $n = 3$ ).

Diese Migrations-Versuchsreihe wurde mit der Frage durchgeführt, ob der Überstand CRP-aktivierter Thrombozyten Einfluss auf die Migration von Monozyten hat. Dabei hat neben dieser grundlegenden Eigenschaft vor allem der Einfluss des HMGB1 interessiert; spielt HMGB1 überhaupt eine (wichtige) Rolle und wenn ja, über welchen Rezeptor wird diese Interaktion vermittelt. Aus dem obigen Schaubild (Abb. 25) ergeben sich folgende Ergebnisse:

Monozyten ohne Stimulus migrieren zwar auch, aber in nur sehr geringem Maße (Balken A). Die Migration wird nicht durch Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten maßgeblich gesteigert (Balken B im Vergleich mit Balken A). Hingegen migrieren Monozyten mit Stimulus, in diesem Fall durch den Überstand mit zuvor aktivierter Thrombozyten *via* CRP, statistisch signifikant mehr (Balken C im Vergleich zu Balken A,  $p = 0,0009$ , \*\*\*; Balken C im Vergleich zu Balken B,  $p = 0,0112$ , \*). Durch gegen HMGB1 gerichteten Antikörper-Einsatz im Überstand CRP aktivierter Thrombozyten wird die Migrationsrate der Monozyten wiederum statistisch signifikant reduziert (Balken D im Vergleich zu Balken C,  $p = 0,001$ , \*\*\*). Während die Migration von Monozyten, die entweder mit Antikörpern gegen TLR2 oder TLR4 behandelt wurden, bei Stimulus mit dem Überstand CRP-aktivierter Thrombozyten erhöht bleibt (Balken F bzw. G im Vergleich mit Balken C; Balken F bzw. G im Vergleich mit Balken A,  $p = 0,0004$ , \*\*\* bzw.  $p = 0,0015$ , \*\*), sinkt sie bei Monozyten, die zuvor mit Antikörpern gegen RAGE behandelt wurden (Balken E im Vergleich mit C,  $p = 0,0127$ , \*).

### 3.1.4 Migrations-Assay Versuchsreihe 2.1

Im Folgenden ist zur besseren Übersicht ein Ausschnitt der zweiten Migrations-Assay-Versuchsreihe dargestellt. Dieser umfasst lediglich die Kontrollen (Monozyten + PBS; Monozyten + Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten), Monozyten und der Überstand mit ADP-aktivierter Thrombozyten, Monozyten und der mit Antikörpern gegen HMGB1 geblockte Überstand mit ADP-aktivierten Thrombozyten (Balken D) und zusätzlich das Ergebnis der positiv-Kontrolle mit rekombinantem HMGB1 (20 ng/ml).

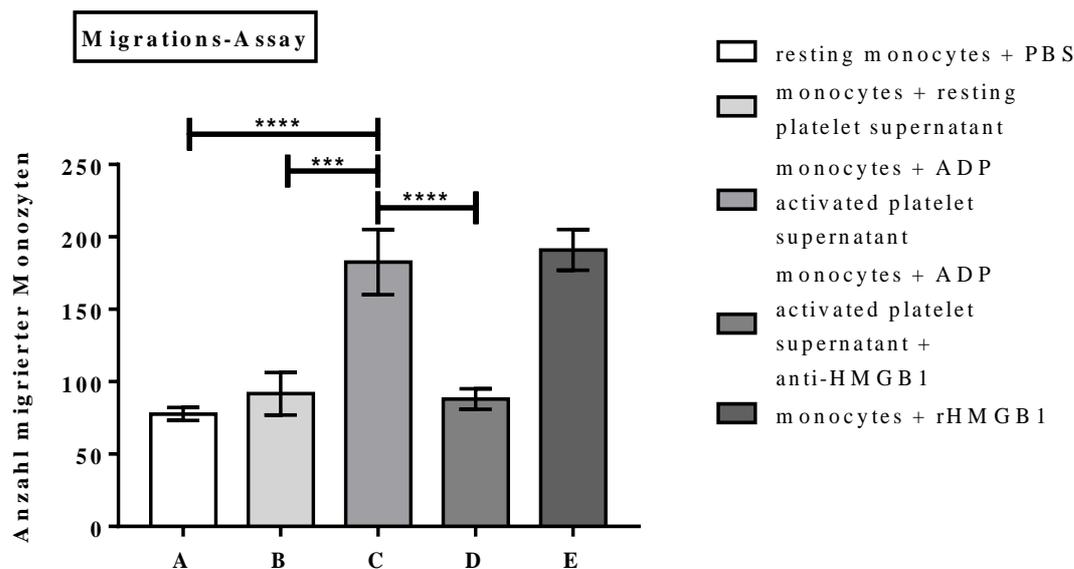


Abbildung 26: Migrations-Assay, Versuchsreihe 2.1. Als Kontrollen wurden sowohl nur Monozyten (A, *resting monocytes + PBS*) als auch Monozyten mit dem Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten (B, *monocytes + resting platelet supernatant*) gefahren. Balken C: Monozyten mit dem Überstand ADP-aktivierter Thrombozyten (*monocytes + ADP activated platelet supernatant*). Balken D: Monozyten mit Überstand ADP-aktivierter Thrombozyten, die mit Antikörpern gegen HMGB1 (*monocytes + ADP activated platelet supernatant + anti-HMGB1*) vorbehandelt worden sind. Balken E: Monozyten mit rekombinanten HMGB1 (*monocytes + rHMGB1*). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*; *Bonferroni's test*:  $p < 0,0005 = ***$ ,  $p < 0,0001 = ****$ ;  $n = 3$ ).

Der letzten Abbildung (Abb. 26) lassen sich die oben bereits für den Überstand CRP-aktivierter Thrombozyten nachgewiesenen Effekte (s. 3.1.1) auf die Monozyten-Migration auch für ADP statistisch signifikant entnehmen (Balken C im Vergleich zu Balken A,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Außerdem konnte auch hier erneut ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen von Monozyten bei Überstand ADP-aktivierter Thrombozyten und Monozyten bei Überstand ADP-aktivierter Thrombozyten mit Antikörpern gegen HMGB1 gezeigt werden (Balken D im Vergleich zu Balken C,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Vielmehr kommt es auch bei Monozyten und rekombinantem HMGB1 zu einer statistisch signifikant erhöhten Migrationsrate (Balken E im Vergleich zu Balken A,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Weiterhin zeigt sich diese statistische Signifikanz auch im Vergleich zu Monozyten bei Überstand ADP-aktivierter Thrombozyten mit Antikörpern gegen HMGB1 (Vgl. Balken E und D,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*).

### 3.1.5 Migrations-Assay Versuchsreihe 2.2

Im Folgenden ist zur besseren Übersicht ein Ausschnitt der zweiten Migrations-Assay-Versuchsreihe dargestellt. Dieser umfasst die Kontrollen (Monozyten + PBS; Monozyten + Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten) sowie die positiv-Kontrolle mit rekombinantem HMGB1 und Monozyten und der Überstand mit CRP bzw. ADP-aktivierter Thrombozyten; außerdem sind auch die Ergebnisse der Überstände von Thrombozyten, die mit dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen (und gegebenenfalls zusätzlich mit CRP bzw. ADP) aktiviert worden sind, abgebildet. Diese Vorbehandlung bedurfte zunächst der Generierung des Überstandes apoptotischer HT-22-Zellen. Dieser Überstand wird dann ebenso wie CRP bzw. ADP (oder in Kombination) zur Aktivierung der Thrombozyten verwendet.

Die Versuchsreihe soll tiefgehendes Verständnis über die Aktivierung von Thrombozyten und die daraus resultierenden Effekte auf die Monozyten-Migration geben. Auf der einen Seite soll Sie der Überprüfung der Wirkung von Überstand CRP bzw. ADP-aktivierter Thrombozyten auf die Migration von Monozyten dienen. Auf der anderen Seite soll nun auch die Wirkung des Überstandes anderweitig aktivierter Thrombozyten untersucht werden; hier mittels Überstand apoptotischer HT-22-Zellen.

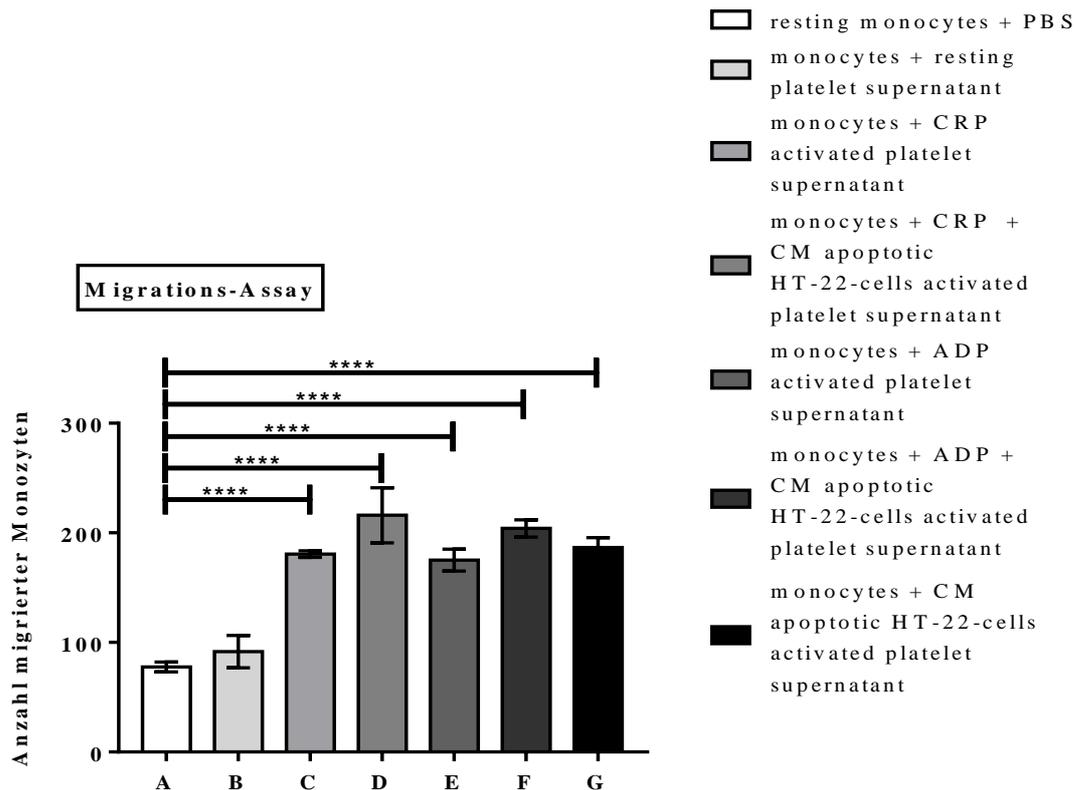


Abbildung 27: Migrations-Assay, Versuchsreihe 2.2. Balken A (*resting monocytes + PBS*): Migrationseigenschaft von nicht-stimulierten Monozyten; Balken B (*monocytes + resting platelet supernatant*): Monozyten-Migration zum Überstand nicht aktivierter Thrombozyten. Balken C: unbehandelte Monozyten und CRP-aktivierter Thrombozyten Überstand (*monocytes + CRP activated platelet supernatant*); Balken E: unbehandelte Monozyten und ADP-aktivierter Thrombozyten Überstand (*monocytes + ADP activated platelet supernatant*). Balken D-F: unbehandelten Monozyten und Überstand durch apoptotischen Überstand von HT-22-Zellen und CRP/ ADP aktivierte Thrombozyten (D *monocytes + CRP + CM apoptotic HT-22-cells activated platelet supernatant*; F *monocytes + ADP + CM apoptotic HT-22-cells activated platelet supernatant*). Balken G: unbehandelte Monozyten und der Überstand durch den apoptotischen Überstand von HT-22-Zellen aktivierte Thrombozyten (*monocytes + CM apoptotic HT-22-cells activated platelet supernatant*). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0,0001$ ; \*\*\*\*; *Bonferroni's test*:  $p < 0,0001 = ****$ ;  $n = 3$ ).

Das obige Diagramm (Abb. 27) bestätigt, dass Monozyten ohne Stimulus zwar auch migrieren, aber in nur sehr geringem Maße (Balken A). Auch dass die Migration nicht schon durch Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten maßgeblich gesteigert wird, kann erneut nachgewiesen werden (Balken B im Vergleich mit Balken A). Monozyten mit Stimulus, in diesem Assay durch den Überstand zuvor mit CRP, ADP oder dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen (oder kombiniert) aktivierter Thrombozyten, migrieren statistisch signifikant mehr (vgl. die Balken C und A,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*; D und A,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*; E und A,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*; F und A,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*; G und A,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Diese Signifikanz zeigt sich auch gegenüber dem Ansatz von Monozyten mit dem Überstand nicht aktivierter Thrombozyten (vgl. die Balken C und B,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*; D und B,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*; E und B,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*; F und B,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*; G und B,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*).

## 3.2 Survival-Assay

Der Survival-Assay soll ebenfalls über mehrere Fragen Aufschluss geben: zum einen soll die generelle Wirkung der Überstände von nicht-aktivierten bzw. aktivierten Thrombozyten auf die Survival-Eigenschaft der Monozyten untersucht werden. Zum anderen soll diese Wirkung qualitativ auf die von HMGB1 eingehender betrachtet werden. Schließlich dient der Assay dazu bei nachgewiesener Interaktion von HMGB1 mit den Monozyten auch den hierfür notwendigen Rezeptor der Monozyten aufzuzeigen. Insbesondere sollen etwaige Interaktionen auch nach einer Stimulation von Thrombozyten mit dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen und dem damit gewonnenen Überstand aufgezeigt werden.

Die folgenden Diagramme zeigen die Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen zum Monozyten-Survival. Dabei wurden für die Versuche standardmäßig 50.000 Monozyten (pro *tube*) verwendet. Zur Aktivierung der Thrombozyten dienten ADP und CRP bzw. der Überstand apoptotischer HT-22-Zellen; die Überstände hiervon wurden dann in den entsprechenden Ansätzen verwendet. Als Kontrolle wurden stets unbehandelte Monozyten ohne ABT verwendet; alle anderen Versuchsansätze wurden mit ABT behandelt. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie am FACS Calibur Flow Cytometer und CellQuest Software.

### 3.2.1 Survival-Assay Versuchsreihe 1

Im Weiteren sind zur besseren Übersicht zwei Ausschnitte (Diagramm A bzw. B, Abb. 29 und 30) der ersten Survival-Assay-Versuchsreihe dargestellt.

Diagramm A umfasst dabei lediglich die Kontrollen (unbehandelter Monozyten + PBS; unbehandelte Monozyten + ABT; unbehandelte Monozyten + Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten + ABT).

Diagramm B führt hingegen die Ergebnisse der Rezeptorblockade der Monozyten zusammen mit den Kontrollen aus Diagramm A (unbehandelter Monozyten + PBS; unbehandelte Monozyten + ABT; unbehandelte Monozyten + Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten + ABT) auf. Die Rezeptorblockaden werden mit Antikörpern gegen RAGE, TLR2 und TLR4 mit jeweils gleichbleibenden Konzentrationen bei 30-minütiger Inkubation vor Zugabe des Überstandes aktivierter Thrombozyten durchgeführt.

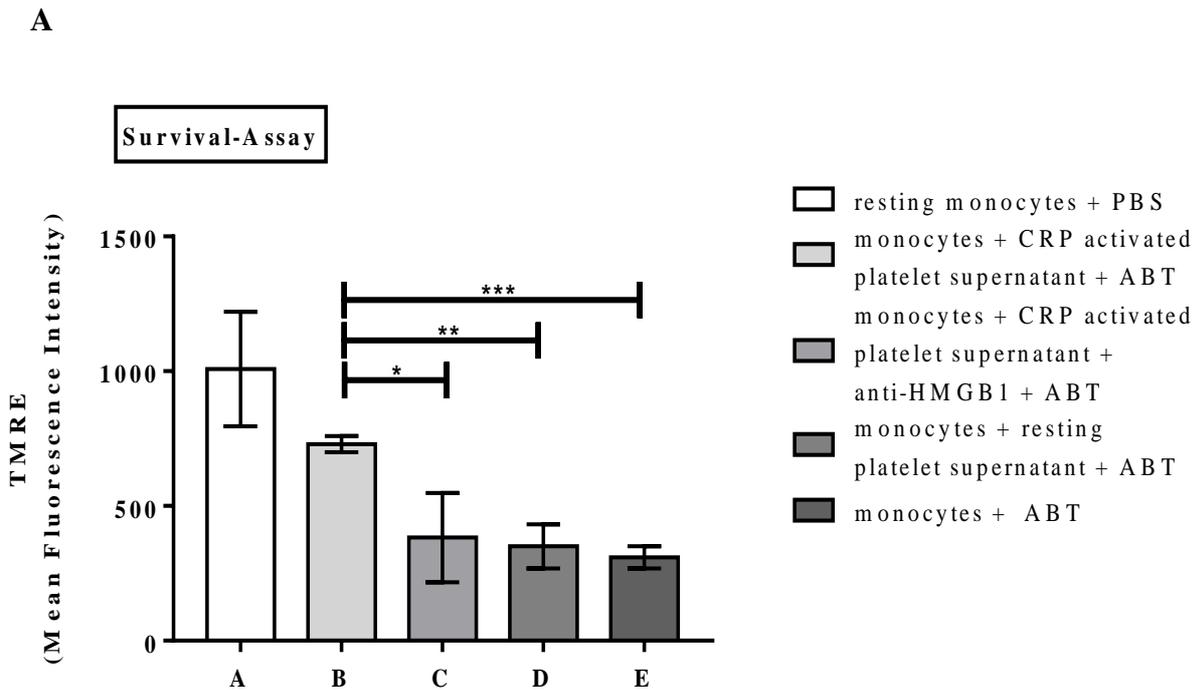


Abbildung 28: Survival-Assay, Versuchsreihe 1, Diagramm A. Balken A (*resting monocytes* + PBS): Survival-Eigenschaft von nicht-stimulierten Monozyten ohne Apoptose-Inducer ABT; Balken E (*monocytes* + ABT): Survival-Eigenschaft un behandelter Monozyten bei Zugabe von ABT. Balken D (*monocytes* + *resting platelet supernatant* + ABT): Monozyten-Surival bei Überstand nicht aktivierter Thrombozyten. Balken C: Monozyten mit dem Überstand mit CRP aktivierter Thrombozyten und zusätzlicher HMGB1-Antikörper-Behandlung (*monocytes* + CRP *activated platelet supernatant* + anti-HMGB1 + ABT). Balken B: Monozyten mit Überstand mit CRP aktivierter Thrombozyten und ABT (*monocytes* + CRP *activated platelet supernatant* + ABT). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0,0002$ ; \*\*\*,  $n = 3$ ) sowie *student's t-test (two-tailed)* innerhalb der Balken ( $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,005 = **$ ,  $p < 0,0005 = ***$ ).

Aus Diagramm A lässt sich entnehmen, dass Monozyten ohne Stimulus und Behandlung mit ABT zwar auch überleben, aber in nur sehr geringem statistisch signifikantem Maße (Balken E im Vergleich mit A, *student's t-test*:  $p = 0,0050$ , \*\*). Der Survival wird nicht durch Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten statistisch signifikant gesteigert (Balken D im Vergleich mit Balken A, *student's t-test*:  $p = 0,0074$ , \*\*). Monozyten mit Stimulus, in diesem Assay durch den Überstand zuvor mit CRP aktivierter Thrombozyten, überleben statistisch signifikant deutlich häufiger (Balken B im Vergleich zu Balken E, *student's t-test*:  $p = 0,0001$ , \*\*\*). Weiter ist der Survival der Monozyten durch gegen HMGB1 gerichteten Antikörper-Einsatz im Überstand CRP aktivierter Thrombozyten statistisch signifikant erniedrigt (Balken C im Vergleich zu Balken A,  $p = 0,0042$ , \*\*). Diese statistische Signifikanz zeigt sich auch im Vergleich mit dem Ansatz Überstand CRP aktivierter Thrombozyten (vgl. Balken B und C, *student's t-test*:  $p = 0,0234$ , \*).

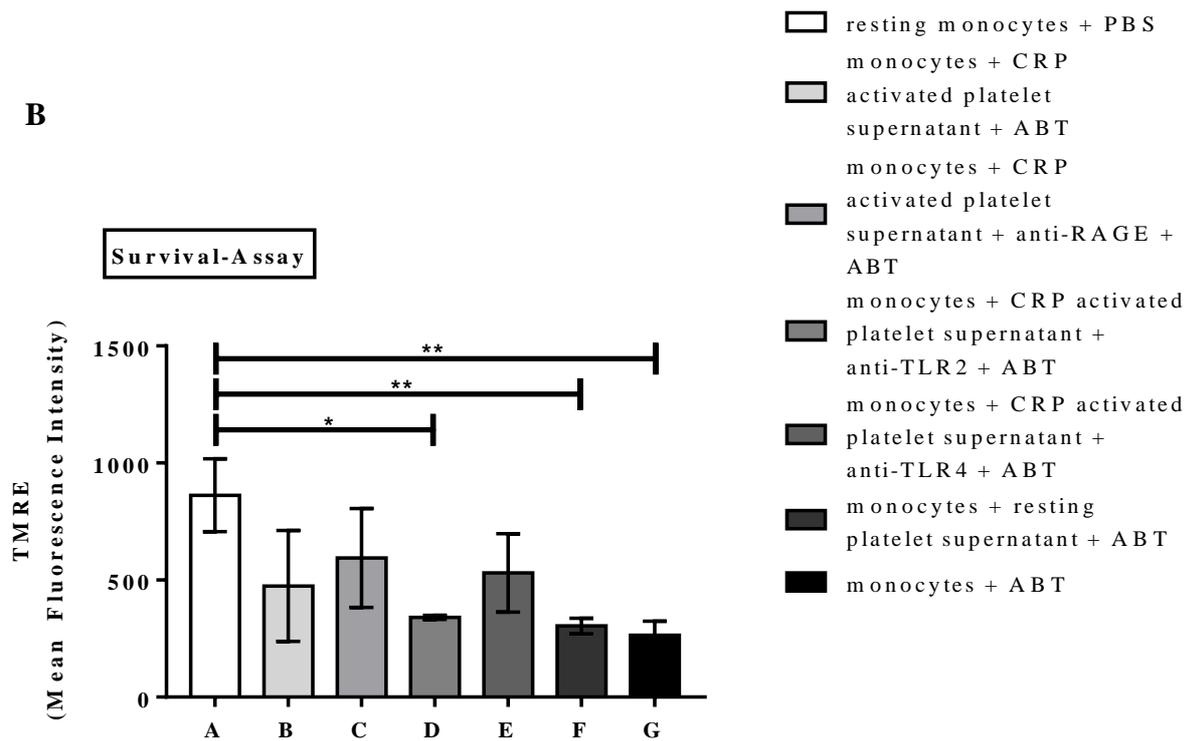


Abbildung 29: Survival-Assay, Versuchsreihe 1, Diagramm B. Balken A (*resting monocytes*): positiv-Kontrolle. Balken B: Wirkung des Überstandes CRP-aktivierter Thrombozyten auf Monozyten bei ABT (*monocytes + CRP activated platelet supernatant + ABT*). Balken C-E: unterschiedliche Rezeptor-Blockaden der Monozyten (Rezeptorblockade für RAGE: C, *monocytes + CRP activated platelet supernatant + anti-RAGE + ABT*; TLR2: D, *monocytes + CRP activated platelet supernatant + anti-TLR2 + ABT*; TLR4: E, *monocytes + CRP activated platelet supernatant + anti-TLR4 + ABT*). Balken F und G: Monozyten-Survival bei Überstand nicht-aktivierter Thrombozyten sowie ABT und nur mit ABT (F, *monocytes + resting platelet supernatant + ABT* bzw. G, *monocytes + ABT*). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0.0034$ , \*\*; *Bonferroni's test*  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,005 = **$ ;  $n = 3$ ).

Diagramm B zeigt, dass der Survival der Monozyten bei Monozyten, die zuvor mit Antikörpern gegen RAGE bzw. TLR4 behandelt worden sind, verglichen mit den beiden negativ-Kontrollen erhöht ist (vgl. Balken C bzw. E und Balken F bzw. G). Bei Monozyten mit Rezeptorblockade von TLR2 hingegen ist ein verminderter Survival erkennbar (vgl. Balken D und C bzw. E). Dieser Unterschied ist jedoch im Unterschied zu CRP nur gering (vgl. Balken D und B). Eine statistische Signifikanz zeigt sich hierbei lediglich gegenüber nicht behandelten Monozyten ohne ABT-Zugabe (vgl. Balken D und A,  $p < 0,0169$ , \*).

### 3.2.2 Survival-Assay Versuchsreihe 2.1

Die zweite Versuchsreihe soll zum einen der Bestätigung der bereits gezeigten (s. 3.2.1) Wirkung des Überstandes mit CRP aktivierter Thrombozyten auf den Monozyten-Survival dienen und zum anderen zusätzlich den Einfluss des Überstandes apoptotischer HT-22-Zellen auf die Aktivierung der Thrombozyten bzw. der daraus resultierenden Wirkung des gewonnenen Überstandes auf die Überlebenseigenschaft der Monozyten darstellen. Die Behandlung der Thrombozyten mit dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen erfolgte wie auch die Aktivierung mittels CRP bzw. ADP für 30 Minuten. Hierbei ist zu beachten, dass die Ergebnisse auf die immer gleichbleibende Kontrolle, die nur aus Monozyten besteht und somit keinen weiteren Einflussfaktor hat, ins Verhältnis gesetzt worden sind.

Im Folgenden ist zur besseren Übersicht ein Ausschnitt der zweiten Survival-Assay-Versuchsreihe dargestellt. Dieser umfasst lediglich die Kontrollen (Monozyten + PBS; Monozyten + ABT) und Monozyten und der Überstand mit CRP bzw. ADP-aktivierter Thrombozyten mit ABT.

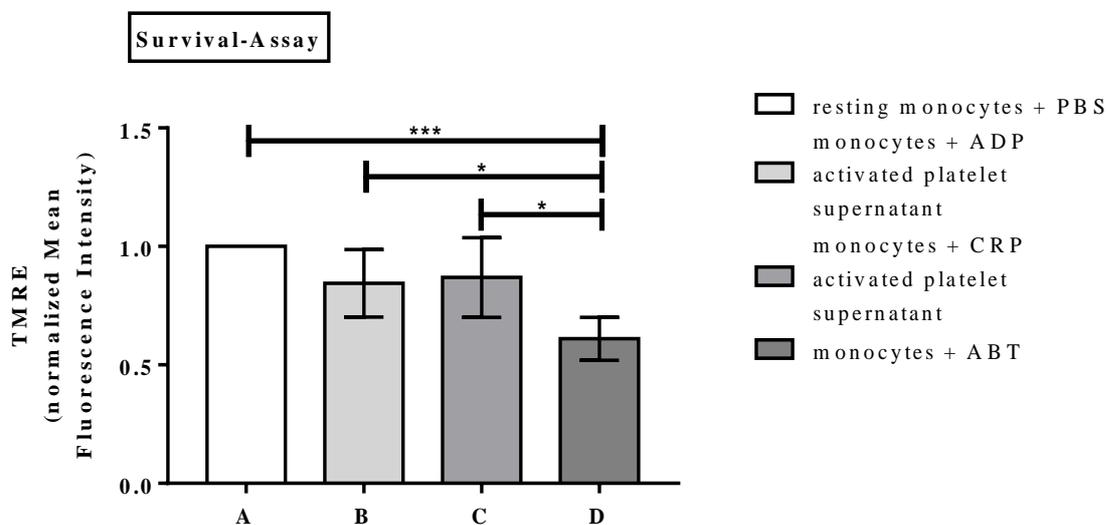


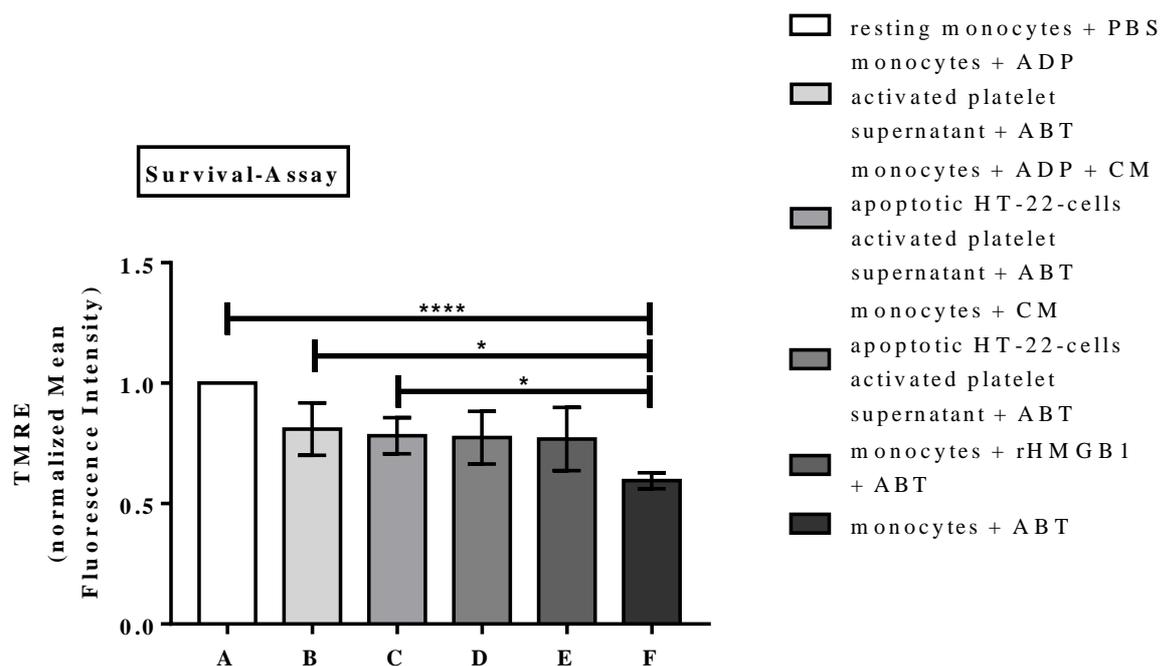
Abbildung 30: Survival-Assay, Versuchsreihe 2.1 Balken A (*resting monocytes + PBS*): positiv-Kontrolle. Balken B (*monocytes + ADP activated platelet supernatant*): Survival-Eigenschaft von Monozyten bei Überstand ADP-aktivierter Thrombozyten und ABT. Balken C: Eigenschaft bei unbehandelten Monozyten und CRP-aktivierter Thrombozyten Überstand (*monocytes + CRP activated platelet supernatant*). Balken D: negativ-Kontrolle mit Monozyten bei ABT (*monocytes + ABT*). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0.0009$ ; \*\*\*, *Bonferroni's test*  $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,0005 = ***$ ;  $n = 3$ ).

Der letzten Abbildung (Abb. 30) lassen sich die oben (s. 3.2.1) bereits für den Überstand CRP-aktivierter Thrombozyten nachgewiesenen Effekte auf den Monozyten-Survival auch für ADP

statistisch signifikant entnehmen (Balken B im Vergleich zu Balken D,  $p = 0,0401$ , \*) und für CRP erneut und statistisch signifikant bestätigen (Balken C im Vergleich zu Balken D,  $p = 0,0203$ , \*). Der Unterschied der Kontrollen unbehandelter Monozyten zu Monozyten, die mit ABT behandelt worden sind, ist statistisch signifikant (vgl. Balken A und D,  $p = 0,0006$ , \*\*\*).

### 3.2.3 Survival-Assay Versuchsreihe 2.2

Nachfolgend ist zur besseren Übersicht ein Ausschnitt der zweiten Survival-Assay-Versuchsreihe dargestellt. Dieser umfasst neben den Kontrollen (Monozyten + PBS; Monozyten + ABT; Monozyten + rHMGB1 [20 ng/ml] + ABT), Monozyten und der Überstand mit ADP aktivierter Thrombozyten mit ABT sowie den Überstand mit zuvor mit dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten und dasselbe in Kombination mit Überstand mittels ADP



aktivierter Thrombozyten.

Abbildung 31: Survival-Assay, Versuchsreihe 2.2; Balken A (*resting monocytes* + PBS): positiv-Kontrolle. Balken B (*monocytes* + ADP *activated platelet supernatant* + ABT): Survival-Eigenschaft von Monozyten bei Überstand ADP-aktivierter Thrombozyten und ABT. Balken C: unbehandelte Monozyten und mit Überstand apoptotischer HT-22-Zellen und ADP aktivierter Thrombozyten bei ABT dar (*monocytes* + ADP + CM *apoptotic HT-22-cells activated platelet supernatant* + ABT). Balken D: Monozyten-Survival bei mit Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten (*monocytes* + CM *apoptotic HT-22-cells activated platelet supernatant* + ABT). Balken E (*monocytes* + rHMGB1 + ABT): positiv-Kontrolle von Monozyten bei rekombinantem HMGB1 und ABT. Balken F: negativ-Kontrolle von Monozyten bei ABT (*monocytes* + ABT). Die Auswertung erfolgte mittels

GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0.0044$ , \*\*;  $n = 3$ ) sowie *student's t-test (two-tailed)* innerhalb der Balken ( $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,0001 = ****$ ).

Dem obigen Diagramm (Abb. 31) ist zu entnehmen, dass sich die beiden Kontrollen statistisch signifikant unterscheiden (vgl. Balken A und F,  $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Der Survival ist bei den Balken B bis E jeweils gleichbleibend erhöht im Vergleich zu Balken F. Untereinander finden sich alle vier Balken (B bis E) auf etwa dem gleichen Niveau. Der Monozyten-Survival ist nach diesen Ergebnissen hier zwar zahlenmäßig erhöht, jedoch ergeben sich nur für die Ansätze mit Überstand mit ADP bzw. ADP und dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten statistische Signifikanzen gegenüber der Kontrolle von Monozyten, die mit ABT behandelt worden sind (vgl. Balken B bzw. C und F,  $p = 0,0312$ , \* bzw.  $p = 0,0168$ , \*).

### 3.2.4 Survival-Assay Versuchsreihe 2.3

Auf der nächsten Seite ist zur besseren Übersicht ein weiterer Ausschnitt der zweiten Survival-Assay-Versuchsreihe dargestellt. Dieser umfasst neben den Kontrollen (Monozyten + PBS; Monozyten + ABT; Monozyten + rHMGB1 [20 ng/ml] + ABT), Monozyten und der Überstand mit CRP aktivierter Thrombozyten mit ABT sowie Überstand mit zuvor mit dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten und den Überstand mit zuvor mit dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten in Kombination mit Überstand mittels CRP aktivierter Thrombozyten.

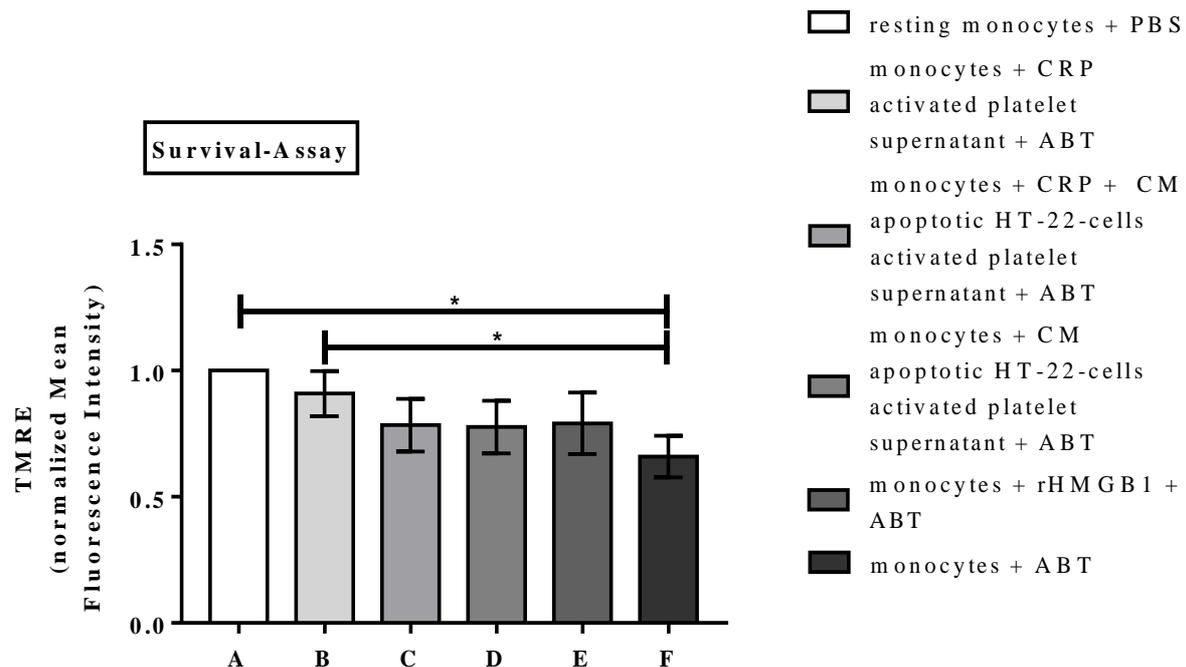


Abbildung 32: Survival-Assay, Versuchsreihe 2.3. Balken A (*resting monocytes* + PBS): positiv-Kontrolle. Balken B (*monocytes* + CRP *activated platelet supernatant* + ABT): Survival-Eigenschaft von Monozyten bei Überstand CRP-aktivierter Thrombozyten und ABT. Balken C: unbehandelte Monozyten und mit Überstand apoptotischer HT-22-Zellen und CRP aktivierter Thrombozyten bei ABT (*monocytes* + CRP + CM *apoptotic HT-22-cells activated platelet supernatant* + ABT). Balken D: Monozyten-Survival bei mit Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten (*monocytes* + CM *apoptotic HT-22-cells activated platelet supernatant* + ABT). Balken E (*monocytes* + rHMGB1 + ABT): positiv-Kontrolle von Monozyten bei rekombinatem HMGB1 und ABT. Balken F: negativ-Kontrolle von Monozyten bei ABT (*monocytes* + ABT). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0.0044$ ; \*\*, *Bonferroni's test*  $p < 0,05 = *$ ;  $n = 3$ ).

Für die Kontrollen untereinander ergibt sich auch hier eine statistische Signifikanz (vgl. Balken A und E,  $p < 0,05$ , \*). Die Ergebnisse der Balken B bis E finden sich ebenfalls auf zahlenmäßig ungefähr gleichem Niveau und jeweils ähnlicher Differenz zu Balken F. Der Monozyten-Survival ist nach diesen Ergebnissen zwar zahlenmäßig erhöht (Balken B bis E im Vergleich zu Balken F), jedoch ergibt sich lediglich eine statistische Signifikanz zwischen den mit Überstand CRP aktivierter Thrombozyten behandelten Monozyten bei ABT und der Kontrolle von Monozyten mit ABT (Balken B im Vergleich mit Balken F,  $p = 0,0240$ , \*).

### 3.3 Phagozytose-Assay

Der Phagozytose-Assay soll über eine weitere Interaktionsmöglichkeit zwischen Thrombozyten und Monozyten Aufschluss geben: Als Erstes wird die generelle Wirkung der Überstände von nicht-aktivierten bzw. aktivierten Thrombozyten auf die Phagozytose-Eigenschaft der Monozyten gegenüber Thrombozyten untersucht. Als zweites soll diese Wirkung qualitativ auf die von HMGB1 eingehender betrachtet werden. Drittens soll der Assay bei nachgewiesener Interaktion von HMGB1 mit den Monozyten auch den hierfür notwendigen Rezeptor der Monozyten aufzeigen.

Die folgenden Diagramme zeigen die Ergebnisse verschiedener Versuchsreihen zum Monozyten-Phagozytose von Thrombozyten. Dabei wurden für die Versuche standardmäßig 50.000 Monozyten (pro *tube*) verwendet. Zur Aktivierung der Thrombozyten dienten ADP und CRP; die Überstände hiervon wurden dann in den entsprechenden Ansätzen verwendet. Als Kontrolle wurden stets unbehandelte Monozyten (CD14 markiert) mit unbehandelten Thrombozyten verwendet. Zur Markierung der Zellen wurde CD42b-FITC-Marker dazugegeben. Die Auswertung erfolgte (mit bzw. ohne Trypan-blau) mittels Durchflusszytometrie am FACS Calibur Flow Cytometer und CellQuest Software.

#### 3.3.1 Phagozytose-Assay Versuchsreihe 1.1

In der nächsten Abbildung ist ein Ausschnitt der Phagozytose-Assay-Versuchsreihe dargestellt. Aufgeführt sind hier neben der Kontrolle (unbehandelte Monozyten + unbehandelte Thrombozyten), Monozyten und mit CRP bzw. ADP aktivierte Thrombozyten sowie Monozyten und mit CRP bzw. ADP aktivierte Thrombozyten, die allerdings zusätzlich mit Antikörpern gegen HMGB1 behandelt worden sind.

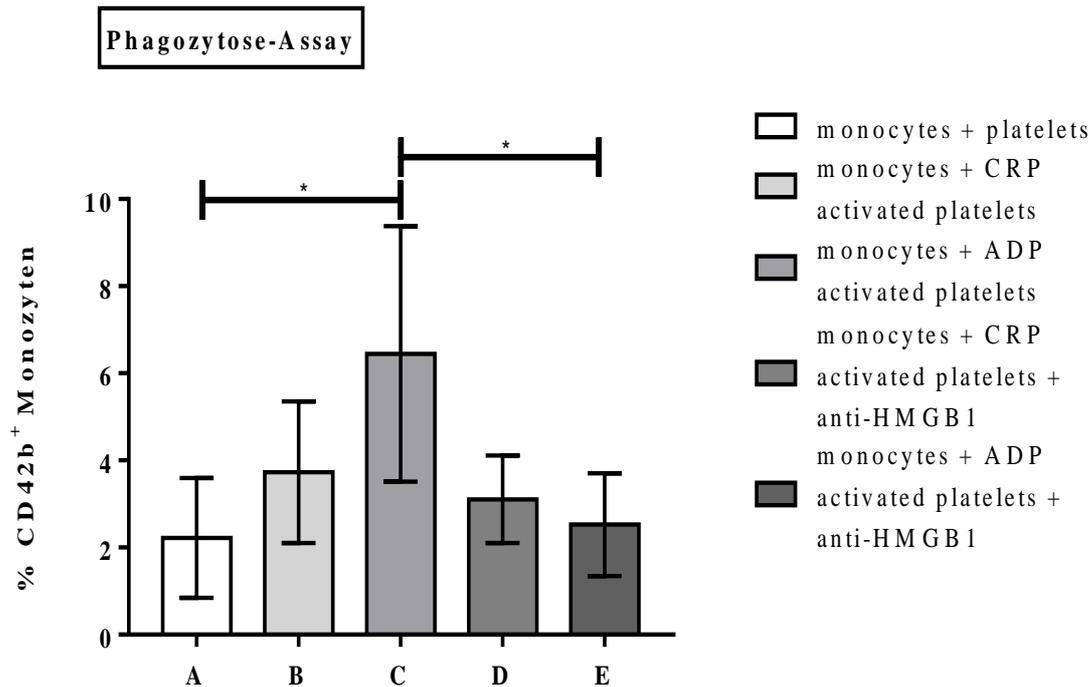


Abbildung 33: Phagozytose-Assay, Versuchsreihe 1.1. Balken A (*monocytes + platelets*): Phagozytose-Rate von Monozyten gegenüber nicht aktivierten Thrombozyten. Balken B (*monocytes + CRP activated platelets*): von Monozyten phagozytierte zuvor mit CRP aktivierte Thrombozyten; Balken C: von Monozyten phagozytierte zuvor mit ADP-behandelte Thrombozyten (*monocytes + ADP activated platelets*). Balken D und E: Phagozytose-Rate bei mit CRP bzw. ADP aktivierten und zusätzlich mittels Antikörper gegen HMGB1 behandelten Thrombozyten (D, *monocytes + CRP activated platelets + anti-HMGB1*; E, *monocytes + ADP activated platelets + anti-HMGB1*). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0.0281$ , \*;  $n = 4$ ) sowie *student's t-test* innerhalb der Balken ( $p < 0,05 = *$ ).

Aus dem obigen Diagramm (Abb. 33) lässt sich entnehmen, dass die Phagozytose-Rate von Monozyten gegenüber aktivierten Thrombozyten (CRP bzw. ADP) höher ist im Vergleich zu nicht aktivierten Thrombozyten (vgl. Balken B bzw. C und A). Eine statistische Signifikanz zeigt sich insbesondere im Vergleich der mit ADP aktivierten Thrombozyten und der Kontrolle mit unbehandelten Monozyten und unbehandelten Thrombozyten (Balken C im Vergleich mit Balken A, *student's t-test*:  $p = 0,0403$ , \*). Weiterhin ist dem Diagramm zu entnehmen, dass die Phagozytose bei Monozyten mit CRP bzw. ADP aktivierten Thrombozyten mit Antikörper gegen HMGB1 jeweils im Vergleich mit den Proben ohne HMGB1-Block erniedrigt ist und insgesamt etwa auf gleichem Niveau mit der Kontrolle liegt (vgl. D bzw. E mit B bzw. C oder A). Hierbei zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Ansätze mit ADP aktivierten Thrombozyten und ADP aktivierten Thrombozyten mit zusätzlichen Antikörpern gegen HMGB1 (vgl. Balken C und E, *student's t-test*:  $p < 0,0479$ , \*).

### 3.3.2 Phagozytose-Assay Versuchsreihe 1.2

Im Folgenden ist zur besseren Übersicht der zweite Ausschnitt der Phagozytose-Assay-Versuchsreihe dargestellt. Aufgeführt sind hier in beiden Diagrammen die Kontrolle (unbehandelte Monozyten + unbehandelte Thrombozyten) sowie unbehandelte Monozyten mit CRP aktivierten Thrombozyten in Diagramm A bzw. ADP aktivierten Thrombozyten in Diagramm B. Außerdem sind in beiden Diagrammen die Rezeptorblockaden der Monozyten mit Antikörpern gegen TLR2 bzw. TLR4 bei CRP (Diagramm A) oder ADP (Diagramm B) aktivierten Thrombozyten aufgeführt.

A

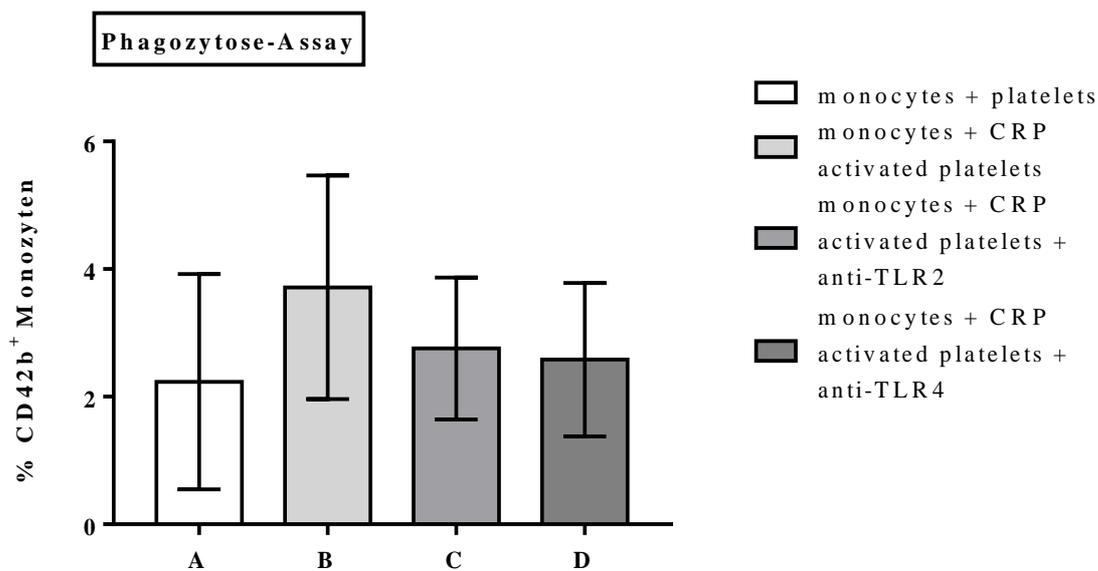


Abbildung 34: Phagozytose-Assay, Versuchsreihe 1.2, Diagramm A. Balken A (*monocytes + platelets*): Phagozytose-Rate von Monozyten gegenüber nicht aktivierten Thrombozyten. Balken B (*monocytes + CRP activated platelets*): von Monozyten phagozytierte zuvor mit CRP aktivierte Thrombozyten. Balken C und D: Phagozytose-Eigenschaft von Monozyten, die zuvor mit Antikörpern gegen TLR2 bzw. TLR4 behandelt worden sind, gegenüber mit CRP-behandelten Thrombozyten (C, *monocytes + CRP activated platelets + anti-TLR2* bzw. D, *monocytes + CRP activated platelets + anti-TLR4*). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p > 0.05$ ;  $n = 3$ ).

## B

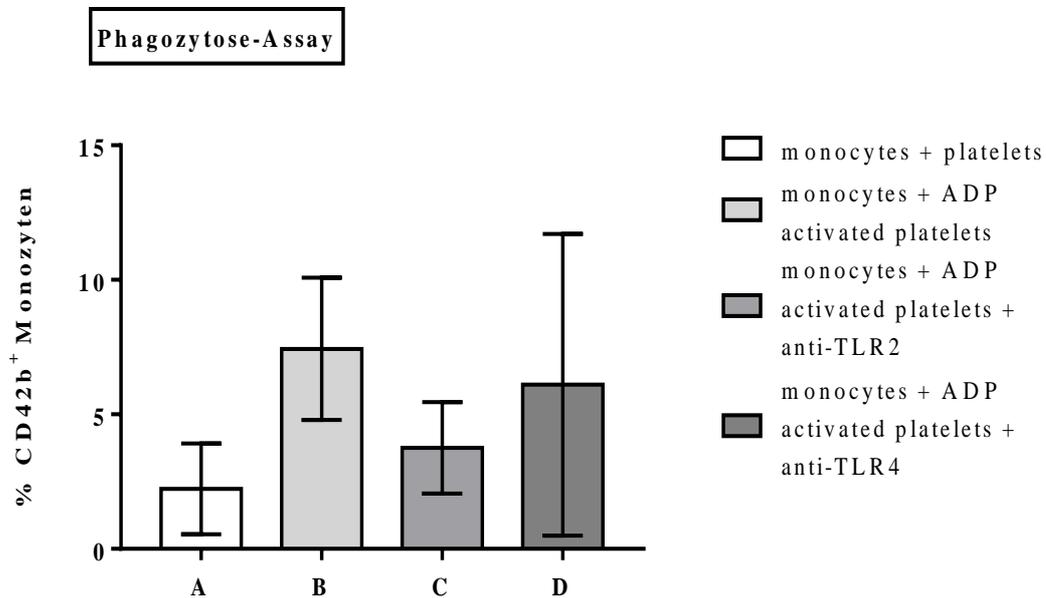


Abbildung 35: Phagozytose-Assay, Versuchsreihe 1.2, Diagramm B. Balken A (*monocytes + platelets*): Phagozytose-Rate von Monozyten gegenüber nicht aktivierten Thrombozyten. Balken B (*monocytes + ADP activated platelets*): von Monozyten phagozytierte zuvor mit ADP aktivierte Thrombozyten. Balken C und D: Phagozytose-Eigenschaft von Monozyten, die zuvor mit Antikörpern gegen TLR2 bzw. TLR4 behandelt worden sind, gegenüber mit ADP-behandelten Thrombozyten (C, *monocytes + ADP activated platelets + anti-TLR2* bzw. D, *monocytes + ADP activated platelets + anti-TLR4*). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p > 0.05$ ;  $n = 3$ ).

Die letzten beiden Diagramme zeigen folgende Ergebnisse: In beiden Diagrammen ergibt sich ein zahlenmäßiger Unterschied der Phagozytose im Vergleich der Monozyten bei CRP (Diagramm A) bzw. ADP (Diagramm B) aktivierten Thrombozyten im Vergleich zu der Kontrolle (vgl. jeweils Balken B und Balken A). Während in Diagramm A beide Rezeptorblockaden eine niedrige Phagozytose-Rate der Monozyten zeigen (vgl. Balken C bzw. D mit B), ist Diagramm B zu entnehmen, dass zwar ebenfalls die Blockade mit Antikörpern gegen TLR2 eine niedrige Phagozytose-Rate zeigt (vgl. Balken C und B), die Blockade mit Antikörpern gegen TLR4 allerdings ebenfalls eine erhöhte Phagozytose-Rate ergeben hat (vgl. Balken D und B).

### 3.4 HMGB1-Nachweis

Der HMGB1-Nachweis soll schließlich vor allem über die Quantität der in den verschiedenen Versuchsansätzen benutzten Überstände Aufschluss geben. Fraglich war zu diesem Zeitpunkt, ob die gemachten Beobachtungen hinsichtlich der kumulativen Eigenschaft von „zweifach“ aktivierten Thrombozyten (z.B. mit CRP und Überstand apoptotischer HT-22-Zellen) sich auch in der Höhe des nachweisbaren HMGB1 widerspiegeln. Dazu müssen natürlich auch die Werte für HMGB1 in den Überständen nur mit CRP (5µg/ml), ADP (50µM/ml) oder Thrombin (1 U/ml) aktivierten Thrombozyten mit solchen Überständen von Thrombozyten, die nur mit dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktiviert worden sind, verglichen werden. Ebenfalls noch unklar und deshalb untersuchungsbedürftig ist die Höhe an freigesetztem HMGB1 in den für die zuvor gezeigten Versuchsreihen verwendeten Aktivatoren CRP und ADP. Die Ergebnisse dieser Assays geben allesamt nur einen qualitativen Überblick über die Interaktion durch HMGB1 *per se*.

Das folgende Diagramm (Abb. 36) zeigt die Ergebnisse nach dem ins Verhältnis-Setzen zu Actin. Dabei wird HMGB1 in Höhe der 28 kDa-Bande detektiert und die Werte mittels Fluoreszenz-Scanner ausgewertet. Hierfür ist beispielhaft auch ein „Scanbild“ (Abb. 37) der Bande für HMGB1 der verschiedenen Proben abgedruckt. Die Thrombozyten wurden für die Ansätze standardmäßig für 30 Minuten mit den entsprechenden Reagenzien aktiviert. Anschließend wurde im Rahmen der Gelelektrophorese dieselben Laufzeiten und für die am Ende durchgeführten Antikörper-Behandlungen für den Nachweis die gleichen Inkubationszeiten eingehalten. Die verschieden nötigen Waschgänge wurden ebenfalls für die gleiche Dauer und an denselben Versuchsschritten durchgeführt.

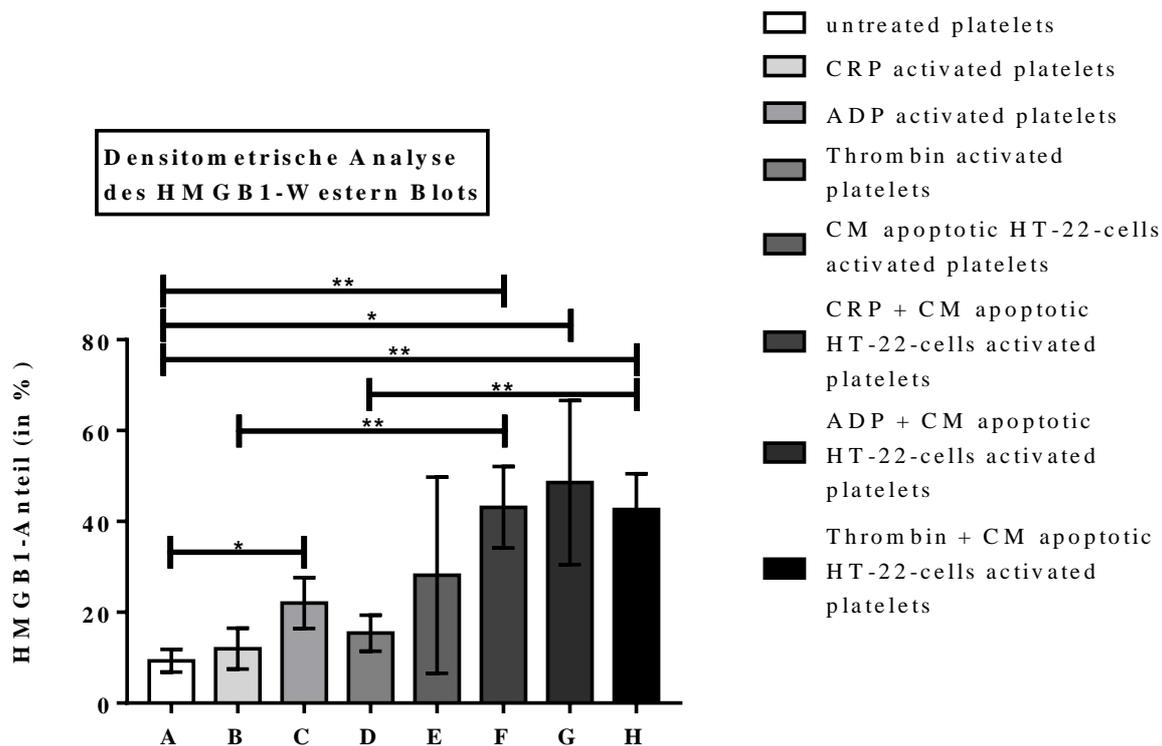
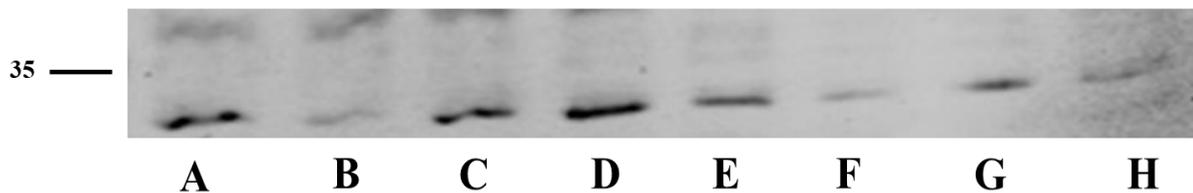


Abbildung 36: HMGB1-Nachweis mittels Gelelektrophorese und Western Blot. Balken A (*untreated platelets*) zeigt das bei nicht-behandelten Thrombozyten nachgewiesene HMGB1; dieser Ansatz diente als Kontrolle. Balken B (*CRP activated platelets*) stellt den Anteil an HMGB1 im Überstand zuvor mit CRP aktivierter Thrombozyten dar; Balken C dasselbe nur mit ADP-behandelten Thrombozyten (*ADP activated platelets*); Balken D bei mit Thrombin-aktivierten Thrombozyten (*Thrombin activated platelets*). Balken E (*CM apoptotic HT-22-cells activated platelets*) dient dem Nachweis von HMGB1 im Überstand zuvor mit dem Überstand apoptotischer HT-22 Zellen aktivierter Thrombozyten. Des Weiteren wurden die Thrombozyten in Kombination (ADP bzw. CRP oder Thrombin) mit dem Überstand apoptotischer HT-22 Zellen aktiviert und auf den Anteil von HMGB1 untersucht (Balken F, *CRP + CM apoptotic HT-22-cells activated platelets*; Balken G, *ADP + CM apoptotic HT-22-cells activated platelets*; Balken H, *Thrombin + CM apoptotic HT-22-cells activated platelets*). Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 7.00 und der statistischen Testauswertung *one-way ANOVA* ( $p < 0.002$ , \*\*;  $n = 3$ ) sowie *student's t-test (two-tailed)* innerhalb der Balken ( $p < 0,05 = *$ ,  $p < 0,005 = **$ ).

Aus dem obigen Diagramm (Abb. 36) ergibt sich, dass HMGB1 von unbehandelten Thrombozyten kaum ausgeschüttet wird (Balken A). Stattdessen kommt es bei aktivierten Thrombozyten zu einer vermehrten Freisetzung von HMGB1 (Balken B, C oder D im Vergleich mit Balken A). Hierbei kann besonders bei ADP-aktivierten Thrombozyten eine signifikante Erhöhung von HMGB1 festgestellt werden (vgl. Balken C und A, *student's t-test*:  $p = 0,0232$ , \*). Weiterhin ist auch ein deutlich vermehrter Nachweis von HMGB1 bei dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen zu erkennen, der im Rahmen des F-Tests eine statistische Signifikanz gegenüber unbehandelten Thrombozyten aufzeigt (Balken E im Vergleich zu Balken A,

$p = 0,0266$ , \*). Die kombinierten Ansätze von aktivierten Thrombozyten (CRP, ADP sowie Thrombin) mit dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen zeigen mehrere Ergebnisse: Zunächst einmal ist eine besonders große Differenz gegenüber der Kontrolle erkennbar, die statistisch signifikant ist (vgl. F und A, *student's t-test*:  $p = 0,0032$ , \*\*; G und A, *student's t-test*:  $p = 0,0203$ , \*; H und A, *student's t-test*:  $p = 0,0022$ , \*\*) Im Vergleich mit den Überständen „einfach“ aktivierter Thrombozyten (CRP bzw. ADP) sind dem Diagramm erhöhte Konzentrationen von HMGB1 zu entnehmen (vgl. Balken C und G), wobei sich statistische Signifikanzen beim Vergleich von CRP bzw. Thrombin mit den Ansätzen, die zusätzlich mittels Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktiviert worden sind, ergeben (vgl. Balken B und F, *student's t-test*:  $p = 0,0057$ , \*\*; Balken D und G, *student's t-test*:  $p = 0,0060$ , \*\*). Diese Beobachtung ist auch im Vergleich mit den nur mit Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten zu machen (vgl. Balken F, G oder H zu Balken E).

#### HMGB1 (28-34kDa)



#### Actin (45 kDa)



Abbildung 37: Repräsentativer Original-Western Blot (8 verschiedene *samples*, hier: Überstände). A: mit apoptotischen HT-22-Zellen aktivierte Thrombozyten. B: nicht-aktivierte Thrombozyten. C: mit CRP und dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten. D: mit ADP und dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten. E: mit Thrombin und dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten. F: mit CRP aktivierte Thrombozyten. G: mit ADP aktivierte Thrombozyten. H: mit Thrombin aktivierte Thrombozyten. Die jeweilige HMGB1-Bande der Proben wurde zur statistischen Auswertung mit der jeweiligen Actin-Bande ins Verhältnis gesetzt.

Der Abbildung 37 können die obigen mittels statistischer Auswertung erhobenen Daten ebenfalls auf visueller Ebene entnommen werden: Während bei B die HMGB1-Bande so gut wie gar nicht sichtbar ist, ist sie bereits bei den Proben „einfach“ aktivierter Thrombozyten (CRP, ADP, Thrombin) in den mit F – H gekennzeichneten Bereichen erkennbar; insbesondere gilt dies für die Probe der zuvor mit ADP aktivierten Thrombozyten, deren Ergebnis unter G dargestellt ist. Dass der Wert des in den Proben befindlichen HMGB1 mit der Breite und „Schwärze“ der HMGB1-Bande in dieser Abbildung korreliert, lässt sich weiter an den Proben A, C, D und E nachweisen. Dabei ist bereits eine deutlich breitere Bande bei A (Aktivierung der Thrombozyten für den Ansatz nur mit Überstand apoptotischer HT-22-Zellen) sichtbar; dies steigert sich über die Proben C (Überstände der mit CRP und Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierte Thrombozyten) und E (Überstände der mit Thrombin und Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierte Thrombozyten) zu einer letztlich sehr breiten und intensiv schwarzen Bande des auch statistisch die höchsten Werte zeigenden Ansatzes der kombinierten Aktivierung mit ADP und Überstand apoptotischer HT-22-Zellen (D).

### **3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse**

#### **Migrations-Assay**

Monozyten migrieren vermehrt bei Einfluss von Überständen mit CRP, ADP oder (in Kombination) dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten. Bei Zugabe von Antikörpern gegen HMGB1 in die Überstände mit CRP bzw. ADP aktivierter Thrombozyten kommt es kaum zu einer Migration. Die Migration wird hauptsächlich durch den RAGE vermittelt.

#### **Survival-Assay**

Monozyten überleben vermehrt bei Einfluss von Überständen mit CRP oder ADP aktivierten Thrombozyten. Bei Zugabe von Antikörpern gegen HMGB1 in den Überstand mit CRP kommt es zu einem deutlich geringeren Überleben. Besonders die Kombination aus mit ADP und dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten zeigt wiederum ein verbessertes Überleben der Monozyten. Ein vermittelnder Rezeptor konnte eruiert werden: Die TLR-2-Blockade führt zu einem deutlich verminderten Überleben der Monozyten.

#### **Phagozytose-Assay**

Die Phagozytose ist im Speziellen bei mit ADP aktivierten Thrombozyten durch Monozyten erhöht. Auch der statistisch signifikante Nachweis der stimulierenden Rolle von HMGB1 wird zumindest für mit ADP aktivierte Thrombozyten gezeigt.

#### **HMGB1-Nachweis**

HMGB1 lässt sich besonders hoch in Überständen zweifach aktivierter Thrombozyten (bspw. CRP und Überstand apoptotischer HT-22-Zellen) nachweisen. Aber auch die Überstände nur mit ADP aktivierten Thrombozyten zeigen erhöhte Werte gegenüber nicht aktivierten Thrombozyten. Schließlich finden sich auch deutliche Differenzen zwischen den Überständen nur mit Thrombin und mit Thrombin und den Überständen apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten: in letzteren findet sich vergleichsweise vermehrt HMGB1.

## 4 Diskussion

### 4.1 Migration

Die Wirkung von HMGB1 führt bei Makrophagen über die Rezeptoren RAGE, TLR2 und TLR4 zu einer Zytokin-Freisetzung; dies konnte zwar schon vor etwa 15 Jahren gezeigt werden, aber die genauen Mechanismen waren noch weitgehend ungeklärt und die Resultate ebenso undifferenziert in Bezug auf die unterschiedlichen Zelleigenschaften der jeweils durch HMGB1 stimulierten Zelle (bspw. dendritische Zellen, Monozyten). [96; 94; 167]

Entgegen der sehr allgemeinen Vermutung von Schiraldi *et al.* im Jahre 2012 „suggesting that the effect of HMGB1 on cell migration is mediated by CXCR4 alone“ [168] zeigen die neuesten Ergebnisse von Vogel *et al.* [169] – genauso wie die vorliegende Arbeit – dass neben der grundsätzlichen Stimulierung der Migration der Monozyten durch aktivierte Thrombozyten vor allem HMGB1 hierbei eine bedeutende Rolle spielt. Weiter konnte aber nachgewiesen werden, dass weder die Blockade des TLR2 noch des TLR4 zu einer nachweislichen Beeinflussung der Migrationsrate führt; die Ergebnisse der Blockierung des RAGE ergeben vielmehr, dass dieser der für die stimulierende Interaktion zwischen HMGB1 und Monozyten zur Migration zuständige Rezeptor ist. Dass eine solche Wechselwirkung zwischen HMGB1 und dem von Monozyten exprimierten RAGE besteht, gelang bereits 2004 Rouhiainen *et al.* [170] zu demonstrieren; dabei zielte die Gruppe schließlich darauf ab, dass die Wirkweise mehr einer auto- bzw. parakrinen als weniger einer chemotaktischen Natur entspricht. Die Testreihe unterscheidet sich allerdings insofern von den in dieser Arbeit aufgeführten Migrations-Assays, als dass besonderes Augenmerk auf die Monozyten-(Monozyten-)Beeinflussung *via* HMGB1 (durch Betrachtung der HMGB1-Freisetzung und Stimulierung durch die Monozyten selbst) und nicht auf eine solche durch die Überstände anderer Zellen gelegt worden ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen: Der Überstand CRP aktivierter Thrombozyten im Vergleich mit demselben und Antikörpern gegen HMGB1 zeigt statistisch signifikante Unterschiede ( $p < 0,005$ , \*\*\*). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass HMGB1 einen bedeutenden Einfluss auf die Migrations-Eigenschaft von Monozyten hat.

Die für die mit Überstand CRP-aktivierter Thrombozyten nachgewiesenen Effekte auf die Monozyten-Migration kann den Ergebnissen auch für ADP statistisch signifikant entnommen werden ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Außerdem kann auch hier erneut ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen von Monozyten bei Überstand ADP-aktivierter Thrombozyten und Monozyten bei Überstand ADP-aktivierter Thrombozyten mit Antikörpern gegen HMGB1 gezeigt werden ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*). Dies bestätigt die entscheidende Rolle des HMGB1 zusätzlich.

Während die Migration von Monozyten, die entweder mit Antikörpern gegen TLR2 oder TLR4 behandelt wurden, bei Stimulus mit dem Überstand CRP-aktivierter Thrombozyten erhöht bleibt, sinkt sie bei Monozyten, die zuvor mit Antikörpern gegen RAGE behandelt wurden – der RAGE hat demnach als Rezeptor für die zur Migration stimulierende Interaktion einen bedeutenden Einfluss.

Hieraus lässt sich weiter schlussfolgern, dass RAGE besonders für die Wirkung des HMGB1 im Rahmen der Monozyten-Migration verantwortlich ist.

Die erhöhte Migrationsrate bei mit Überständen apoptotischer HT-22-Zellen aktivierter Thrombozyten legt die Vermutung nahe, dass apoptotische HT-22-Zellen selbst wohlmöglich durch das von ihnen freigesetzte HMGB1 (diesen Nachweis erbrachten Vogel *et al.* im Jahre 2015 [90]), damit die Thrombozyten aktivieren und somit auf die Monozyten-Migration wirken.

Jedenfalls geben die Ergebnisse einen deutlichen Hinweis darauf, dass der Überstand apoptotischer HT-22-Zellen – zumindest ebenso wie die Aktivatoren CRP und ADP – in der Lage ist, die Thrombozyten selbst zu aktivieren. Hierbei bleiben allerdings eine Reihe weiterer konkreter Aspekte fraglich: Worüber geschieht diese allgemeine Interaktion zwischen apoptotischen HT-22-Zellen und Thrombozyten und resultiert die Aktivierung schließlich in den ähnlichen (bzw. gleichen) Mechanismen und Freisetzungen von Mediatorstoffen wie nach einer Stimulierung mittels CRP oder ADP. Hierüber könnte zunächst eine Versuchsreihe *in vitro* Aufschluss geben, bei der ebenfalls HMGB1-Antikörper zu den Ansätzen gegeben werden. Weiterhin könnte dann wieder eine Behandlung der Monozyten mit Rezeptor-Antikörpern (RAGE, TLR2, TLR4) vorgenommen werden, um auch hier eine genaue Differenzierung der Interaktion zu ermitteln.

## 4.2 Survival

### 4.2.1 Survival allgemein

Erst vor Kurzem konnten Vogel *et al.* [169] den HMGB1-abhängigen Survival von Monozyten *via* TLR4 zeigen. In ihrer Arbeit identifizierten sie schließlich die regulatorischen Eigenschaften des von Thrombozyten ausgeschütteten HMGB1 auf die Monozyten-Migration *via* RAGE sowie -Apoptose *via* TLR4 und wiesen auch auf das mögliche physiologische bzw. therapeutische Potential von HMGB1 bei Thrombose oder Entzündungen hin.

Dass der Rezeptornachweis in der vorliegenden Arbeit nur teilweise statistisch signifikante Ergebnisse zeigt, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen könnten für die Interaktion von HMGB1 und Monozyten mehrere Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen. Zum anderen könnten aber auch noch andere nicht untersuchte Rezeptoren bedeutsam sein, bzw. die Interaktion könnte noch von weiteren Faktoren (an der Zelloberfläche der Monozyten) – abgesehen von der Vielzahl an Kaskaden, die intrazellulär in den Monozyten ablaufen – abhängig sein, sodass über die einzelnen Rezeptoren wohlmöglich nur eine „Teilwirkung“ erfolgt.

Außerdem ist fraglich, ob die Konzentrationen, die für die Blockade der Rezeptoren verwendet worden sind, für die ausreichende Hemmung der Wirkung von HMGB1 geeignet sind. Durch qualitative bzw. quantitative Variation der Wirkung von HMGB1 auf verschiedene Mechanismen (Migration, Survival, Phagozytose) kann es durchaus wahrscheinlich sein, dass geringere (höhere) Konzentrationen für die Verbesserung der Migration im Vergleich zur Verbesserung des Survival nötig sind. Weiterhin sind Kreuzreaktionen der Antikörper möglich; denn im Unterschied zum Migrations-Assay, der wie bereits gezeigt, statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Rezeptorblockaden zeigt (dort werden die beiden Ansätze der mit Antikörpern behandelten Monozyten und der Überstand aktivierter Thrombozyten nicht vermengt, sondern in *wells* gegeben, die durch Membrane getrennt sind), werden im Survival-Assay die Ansätze nach Behandlung vermengt. Hierdurch können nicht nur Kreuzreaktionen ermöglicht, sondern auch die Rezeptorbindungen im Gegensatz zu den Ansätzen beim Migrations-Assay reduziert werden.

Bezüglich der Rezeptoren ist vor allem auch die Expression auf allen Monozyten entscheidend; kommt es in einer Zelllinie zu einer verminderten oder überhaupt keiner Ausbildung eines Rezeptors oder mehrerer der Rezeptoren, führt sowohl der Antikörper-Einsatz als auch die grundlegende Interaktion von HMGB1 mit den Monozyten zu anderen Ergebnissen.

Ferner ist problematisch, dass im Rahmen des Rezeptornachweises der Survival selbst bei den „niedrigeren“ Werten von Monozyten, die mit Antikörpern gegen TLR2 vorbehandelt worden sind, diese aber im Vergleich zu Monozyten und Überstand mit CRP-aktivierter Thrombozyten weitgehend auf gleichem Niveau sind.

Auch wenn die neuesten Ergebnisse [169] erneut in Richtung einer Verantwortlichkeit des TLR4 deuten: Der Survival der Monozyten wird bei Blockade des TLR2 deutlich vermindert (dies zeigt sich besonders im Vergleich mit unbehandelten Monozyten ohne ABT-Zugabe,  $p = 0,0169$ , \*), während er bei den beiden anderen Rezeptoren RAGE und TLR4 erhöht bleibt. Es kann vermutet werden, dass dieser Rezeptor an besonders überlebenswichtigen Vorgängen der Monozyten beteiligt ist.

In Verbindung mit den Ergebnissen bei Zugabe von Antikörpern gegen HMGB1 lässt sich weiter schlussfolgern, dass vor allem HMGB1 auch hier an der Survival-fördernden Interaktion mitwirkt und diese dann per HMGB1 unter anderem über den TLR2 gesteuert wird.

#### **4.2.2 Survival mit Überstand apoptotischer HT-22-Zellen**

Ziel dieser Versuchsreihe war auch hier die Etablierung eines „pathologischen“ Geschehens (Apoptose) und die Untersuchung der darauffolgenden Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten, um so die *in vitro* Experimente besser auf *in vivo* Prozesse übertragbar zu machen. Dass zumindest der Überstand von Thrombozyten, die mit ADP und dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktiviert worden sind, den Survival von Monozyten statistisch signifikant ( $p < 0,0168$ , \*) verbessert, kann gezeigt werden. Allerdings sind in dieser Versuchsreihe kumulative Effekte der doppelten Aktivierung (CRP bzw. ADP und Überstand apoptotischer HT-22-Zellen) nicht zu finden.

Das Hauptproblem dieses Assays war, dass zwar mikroskopisch der tatsächliche Eintritt der Apoptose der HT-22-Zellen stetig kontrolliert werden konnte, der Überstand aber quantitativ

nicht genau bestimmt worden ist. Es konnte lediglich qualitativ festgestellt werden, dass es sich um Überstand apoptotischer HT-22-Zellen handelt. Dies hatte unweigerlich zur Folge, dass keine genaue Aussage über die freigesetzten Stoffe durch die HT-22-Zellen und die Menge gemacht werden konnte. Damit ergibt sich als grundlegendes Problem für die Versuchsreihen, dass es zu einer Varianz unter den verschiedenen generierten Überständen der Zellen kommen kann. Wenngleich der Überstand für mehrere gleiche Versuche verwendet wurde, um damit die Varianz weitgehend zu minimieren, kann dies dennoch die meist nicht statistisch signifikanten Ergebnisse erklären. Es muss bedacht werden, dass bei einer Aktivierung mittels CRP bzw. ADP die *stock*-Angaben vom Hersteller gegeben sind und hierdurch zumindest dieser Schritt hinreichend bestimmt durchgeführt werden kann; es entsteht dann lediglich wieder eine Varianz der so generierten Thrombozyten-Überstände. Hieraus ergeben sich konsequenterweise für die Versuchsreihen mit Überständen apoptotischer HT-22-Zellen bereits vor eigentlicher Assay-Durchführung zwei mögliche Fehlerquellen.

Für weitere Versuchsreihen empfiehlt es sich daher den verwendeten Überstand der HT-22-Zellen zu analysieren, um so eine präzisere Aussage über den Aktivierungsschritt der Thrombozyten zu treffen; hierdurch könnte die erste Fehlerquelle minimiert werden.

### 4.3 Phagozytose-Assay

Schon 1966 wies J. C. F. Poole [171] elektronenmikroskopisch allgemein die Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten nach; Chatterjee *et al.* [172] konnten dann knapp 50 Jahre später zeigen, dass CXCL12 *via* CXCR4 und CXCR7 die Thrombozyten-Phagozytose durch Monozyten sowie Makrophagen fördert. Der Gruppe gelang es damit zum ersten Mal einen bedeutenden molekularen Signalweg für die Förderung der Art Phagozytose nachzuweisen, die auch in meiner Arbeit von Relevanz ist.

Dass HMGB1 als Inhibitor der Phagozytose dienen kann, konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden: unter anderem führt Liu *et al.* auf, dass HMGB1 erst über eine Bindung von Phosphatidylserin die Phagozytose apoptotischer neutrophiler Granulozyten durch Makrophagen hemmt; [173] weiter zeigten Kang *et al.* [174], dass HMGB1 durch Induktion der Expression der 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase (15-PGDH) führt, die schließlich die Phagozytose-Aktivität von Makrophagen unterdrückt. Allerdings müssen diese Ergebnisse von denen dieser Arbeit differenziert werden. Denn über die Phagozytose von Thrombozyten durch

Monozyten oder – wie die Gruppe um Chatterjee [172] – über HMGB1 treffen sie keine direkte Aussage.

Während sich zwar in den Phagozytose-Versuchsreihen überwiegend eine statistische Gesamt-Test-Signifikanz ergibt, finden sich diese größtenteils nicht zwischen den einzelnen Proben-Ergebnissen. Hierfür lassen sich mehrere Gründe anführen: Zunächst besteht bereits der Kontroll-Ansatz aus zwei Faktoren – Monozyten und Thrombozyten. Dadurch kann sich bereits in der Kontrolle eine Reaktions- bzw. Verhaltensvarianz innerhalb der verschiedenen Versuche ergeben. Außerdem kann es durch Verwendung zweier Zellarten unweigerlich zur Aktivierung der Thrombozyten durch die Umgebung oder auch iatrogen kommen; dasselbe gilt für die Stimulierung der Monozyten. Für die letztlich zu untersuchenden Proben bedeutet dies, dass neben den beiden „Fehlerquellen“ zumindest eine bzw. bei Rezeptorblock sogar zwei weitere dazukommen. Durch die Aktivierung mit CRP oder ADP wird nämlich wiederum eine mögliche Varianz der Thrombozyten-Reaktion oder des Thrombozyten-Verhaltens geschaffen. Gleiches gilt zusätzlich bei Blockade der Rezeptoren auf den Monozyten, wodurch es neben den Kreuzreaktionen in der Vorbehandlung *per se* auch zu zusätzlichen Interaktionen mit den Thrombozyten nach Zugabe kommen kann. Aus diesen Gründen ist es nicht verwunderlich, dass die Ergebnisse untereinander meist keine statistische Signifikanz zeigen.

Der Versuchsreihe lässt sich konsequenterweise nur ein Indiz zur Interaktion von Monozyten und Thrombozyten entnehmen. Aufgrund der Ergebnisse ist es sehr wahrscheinlich, dass HMGB1 eine bedeutende Rolle in der Stimulierung der Monozyten zur Phagozytose spielt. Dies konnte durch statistisch signifikante Ergebnisse ( $p < 0,0479$ , \*) bei ADP aktivierten Thrombozyten im Vergleich zu solchen, die zusätzlich mit Antikörpern gegen HMGB1 behandelt wurden, nachgewiesen werden. Es ist außerdem möglich, dass der TLR2 eine äußerst bedeutsame Rolle in dieser Interaktion spielt, wenngleich es nicht unwahrscheinlich ist, dass neben dem TLR2 auch der TLR4 einen gewissen Anteil an der Stimulierung der Monozyten hat. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass für die Wirkung des HMGB1 besonders der TLR2 bzw. in gewissem Maße wohlmöglich auch der TLR4 ausschlaggebend ist.

Für diese genaue Differenzierung sind weitere *in vitro* Experimente nötig. Hierbei steht ebenso noch die Beteiligung des RAGE (und ggf. TLR9) im Raum; diese Rezeptor-Interaktion wurde bisher noch nicht hinreichend untersucht und könnte deswegen entweder in diesem Prozess der entscheidende Rezeptor oder aber zumindest an einer möglichen multiplen Rezeptor-Interaktion beteiligt sein.

## 4.4 HMGB1-Nachweis

Hinsichtlich des Nachweises von HMGB1 in den verschiedenen Überständen aktivierter (mittels CRP bzw. ADP) Thrombozyten konnten bereits mehrfach statistisch signifikante Mengen detektiert werden. [175; 21] Die gezeigten Ergebnisse bestätigen insbesondere durch den statistisch signifikanten Unterschied von ADP aktivierten Thrombozyten zu nicht aktivierten Thrombozyten ( $p = 0,0232$ , \*) diese neuesten Erkenntnisse. Außerdem fanden sich in den Ansätzen bei Aktivierung von Thrombozyten durch Überstände apoptotischer Zellen (hier: HT-22-Zellen) ebenfalls erhöhte Werte für HMGB1. Dies ist ein Indiz dafür, dass die Aktivierung *per se* zu einer Freisetzung von HMGB1 führt – diese also nicht vom Mediator der Aktivierung abhängig ist. Zusätzlich ergaben die „additiven“ Aktivierungen (also z.B. mittels CRP und dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen) erhöhte Werte für HMGB1 im Vergleich zu den singulären Aktivierungen (z.B. nur mit CRP). Daraus lässt sich wiederum schließen, dass Thrombozyten auf unterschiedliche Weise aktiviert werden können und diese Effekte womöglich auch zu einer verstärkten Aktivierung der Thrombozyten, die sich dann quantitativ anhand einer größeren Menge freigesetzter Mediatoren (hier: nur HMGB1) zeigt, führt. Auf diese verschiedenartigen gleichzeitigen Möglichkeiten der Aktivierung haben bereits Zucker und Nachmias 1985 [176] hingewiesen und eine zeitliche Konkordanz zwischen Stimulus-Typ und Freisetzung der Mediatoren festgestellt (Thrombin führt zu einer Freisetzung innerhalb 1-2 Sekunden). Aus dieser Beobachtung kann nun darauf geschlossen werden, dass der HMGB1-Nachweis gerade auch diese zeitliche Komponente veranschaulicht: Während die „einfache“ Aktivierung mit ADP beispielsweise nur zu geringen Mengen an HMGB1 geführt hat, konnte bei gehäufte Aktivierung mit ADP und dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen eine im Vergleich deutlich erhöhte Menge an HMGB1 nachgewiesen werden; wenn also durch diese doppelte Aktivierung die Freisetzung wesentlich schneller stattfindet als bei einfacher Aktivierung, erklärt dies, warum mehr HMGB1 in der Probe detektiert wurde.

Problematisch ist vor allem, dass sich größtenteils keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen ergaben. Hierfür lassen sich mehrere Ursachen finden: Der Assay ist ohnehin der von allen hier durchgeführten der umfangmäßig aufwendigste; neben der Aktivierung der Thrombozyten und Gewinnung der Proben, die dann zunächst in der Gelelektrophorese „laufen“, danach „geblottet“, immer wieder mehrmals gewaschen und schließlich noch mit zwei Antikörpern behandelt werden, spielt letztlich auch noch die Immunodetektion eine für das Ergebnis entscheidende Rolle. In jedem dieser Schritte kann es zu Kreuzreaktionen, zur Verunreinigung sowie durch die stetigen verschiedenen „Umfeld“-Einflüsse zu Veränderungen

der Zusammensetzung der Proben kommen. Nichtsdestotrotz konnte speziell für das im Überstand von CRP und mit Überstand apoptotischer HT-22-Zellen aktivierten Thrombozyten statistisch signifikant mehr HMGB1 nachgewiesen werden als für den Überstand nach singularer Aktivierung mit CRP ( $p = 0,0057$ , \*\*).

Für noch genauere zeitliche Analysen der HMGB1-Freisetzung müssten die verschiedenen Ansätze bei unterschiedlichen Thrombozytenaktivierungs-Zeiten (z.B. 5 min., 15 min. und 30 min.) vorgenommen werden.

Schließlich könnte der Überstand apoptotischer HT-22-Zellen ebenso auf seinen HMGB1-Anteil untersucht werden. Wenn nun bei Aktivierung der Thrombozyten eine Antikörper-Behandlung gegen HMGB1 erfolgt, könnte bei anschließend reduzierter Aktivität der Thrombozyten auf einen bedeutenden Einfluss von dem von apoptotischen HT-22-Zellen freigesetzten HMGB1 geschlossen werden.

## 4.5 HMGB1 in verschiedenen Krankheiten

### 4.5.1 Thrombose

Dass HMGB1 ein bedeutender Mediator im pathophysiologischen Prozess der Entstehung einer tiefen Beinvenenthrombose ist, konnte die Gruppe um Stark [177] zeigen: In einem Maus-Modell mit induzierter Venen-Thrombose durch Blutfluss-Reduzierung in der *Vena cava inferior* fanden sie erhöhte Mengen an HMGB1; außerdem stellten sie fest, dass HMGB1 die Kommunikation zwischen Thrombozyten, Neutrophilen Granulozyten und Monozyten fördert und somit die Akkumulation von Thrombozyten zur Thrombose-Entwicklung einleitet. Bereits zuvor konnte eine HMGB1-vermittelte Thrombozyten-Akkumulation und schließlich Thrombose *via* TLR4/ MyD88 nachgewiesen werden. [21; 178] Außerdem spielt für die Rekrutierung von Monozyten zum Thrombose-Herd v.a. der RAGE eine besondere Rolle. [177]

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die These, dass HMGB1 bedeutsam im Thrombose-Entstehungs-Prozess beteiligt ist, besonders hinsichtlich der Rekrutierung von Monozyten *via* RAGE. Dass gerade der Phagozytose-Assay lediglich für die ADP-Aktivierung der Thrombozyten eine statistisch signifikante HMGB1-spezifische Aussage ergab, ist mit dem bisherigen Stand der Wissenschaft insofern vereinbar, als dass zwar aktivierte Thrombozyten

durchaus Monozyten zu deren Phagozytose anregen, diese aber wohl nicht (alleine) durch HMGB1 vermittelt wird. Da jedoch HMGB1, wenn auch nicht alleine, beteiligt ist, könnte durch gezielte HMGB1-Behandlung dennoch entscheidend in die Pathogenese einer Thrombose eingegriffen werden. Wie aber auch Stark *et al.* [177] betonte, ist die Langzeitwirkung von HMGB1, das eigentlich im Zellkern befindlich ist, noch nicht ausreichend *in vivo* untersucht (und selbst dann kann eine deutliche Varianz des menschlichen Organismus zu dem der Mäuse bestehen).

#### 4.5.2 Myokardinfarkt

2006 wurden bereits bei Patienten mit Herzinfarkt im Rahmen einer klinischen Studie erhöhte HMGB1-Blutwerte festgestellt. [179] Nur wenige Jahre später stellte die Gruppe um Kohno [111] die Hypothese – beruhend auf ihrem Ergebnis, dass die HMGB1-Inhibition in Ratten zu einer Ausweitung der Infarktnarbe und deutlichen Hypertrophie des nicht-infarzierten Nachbar-Myokards führt – auf, dass HMGB1 eine wesentliche Rolle im Postmyokardinfarkt-Heilungsprozess haben könnte. Diese grundlegende Hypothese hinsichtlich der positiven Modulationseigenschaft des Infarktgebiets nach Myokardischämie konnte sowohl schon davor [113; 114] als auch danach [180; 181] bestätigt werden. Zuletzt beschrieben Rath *et al.* [23] in einer Kohorten-Studie, dass das von Thrombozyten exprimierte HMGB1 weder Unterschiede zwischen den verschiedenen klinischen Erscheinungen der KHK (z.B. STEMI, NSTEMI und instabile Angina pectoris) noch eine Korrelation mit der Herzleistung zeigte. HMGB1 soll allerdings auch ein Prädiktor für schlechtes Outcome nach Intervention bei einem Myokardinfarkt sein [182] bzw. allgemein bei STEMI-Patienten [183].

Aus der Unbestimmtheit und vor allem auch noch teilweise bestehenden Uneinigkeit über die grundlegende Wirkung von HMGB1 auf die Wundheilungsprozesse nach Myokardinfarkt ist zum einen ersichtlich, dass es sich um eine äußerst komplexe Materie handelt und zum anderen die Grundlagenforschung auf diesem Gebiet einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis leisten kann. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass Thrombozyten durch den Überstand apoptotischer Zellen (hier: HT-22-Zellen) aktiviert werden und *via* HMGB1 sowohl die Rekrutierung von Monozyten als auch das Überleben derselben verbessern. Hieraus kann geschlossen werden, dass auch im Rahmen des Postinfarkt-Heilungsprozesses Thrombozyten zunächst durch absterbende Zellen aktiviert werden und schließlich durch den Mediator HMGB1 die Wundheilung in wesentlichem Maße steuern können.

Es ist also in der Gesamtschau eine positive Eigenschaft des HMGB1 darzustellen: HMGB1 verbessert sowohl die Migrations-, Survival- als auch Phagozytose-Eigenschaft der Monozyten; dies bedeutet, dass Monozyten besser zum Entzündungsgeschehen migrieren und schließlich auch länger überleben können. Das hat zur Folge, dass es für sie früher möglich ist zu differenzieren (z.B. zu Makrophagen), entscheidend im Wundgeschehen mitzuwirken und diese zwei Funktionen auch für längere Zeit wahrnehmen zu können. Von enormer Bedeutung für gezielte HMGB1-Anwendungen *in vivo* scheint zu sein, dass der Zeitraum der Gaben insofern genau bedacht wird, als dass besonders eine zu lange Wirkung von HMGB1 den Entzündungsprozess aufrechterhalten und dadurch einen negativen Effekt auf die Regeneration des Gewebes haben könnte [184].

## 4.6 Ausblick

Hinsichtlich weiterer *in vitro* und *in vivo* Studien sind noch immer eine Vielzahl an Fragen bezüglich des HMGB1 und seiner Wirkung sowie Interaktionsmechanismen mit bzw. zwischen Thrombozyten und Monozyten klärungsbedürftig:

*In vitro*:

1. Gibt es tatsächlich quantitative und vor allem auch qualitative Diskrepanzen des HMGB1 je nach Aktivierungsursprung (CRP oder ADP aktivierte Thrombozyten, apoptotische Zellen)?
2. In welchen Prozessen ist HMGB1 wie beteiligt; gibt es Co-Faktoren oder auch parallele Mediatorstoffe, die die Wirkung von HMGB1 verstärken oder abschwächen können?
3. Welche Rezeptoren spielen bei der Interaktion zwischen Thrombozyten und Monozyten bezogen auf HMGB1 in welchen Prozessen die entscheidende Rolle?
4. Wie ist der zeitliche Verlauf der Wirkung von HMGB1 im Rahmen von Wundheilungs- oder Thromben abbauenden Prozessen?

Außerdem wurde im Rahmen der Behandlung von Thrombozyten mit dem Überstand apoptotischer HT-22-Zellen bisher lediglich die qualitative Frage des „Ob“ der Aktivierung betrachtet. Dies gibt aber keine Erkenntnis darüber, welche Stoffe an dieser Stimulierung tatsächlich beteiligt sind; besonders in Bezug auf HMGB1 stellt sich natürlich die Frage, inwieweit dieses

Zytokin auf die Thrombozyten wirkt und welchen Stellenwert es hierbei einnimmt. Denn möglicherweise ist es nicht HMGB1 alleine, das von den apoptotischen HT-22-Zellen freigesetzt wird und über die Interaktion mit Thrombozyten diese aktiviert. Vielmehr könnte es sich um ein Zusammenspiel von einer bestimmten Vielzahl an Molekülen handeln, unter denen HMGB1 nur eine kleine Rolle einnimmt; oder es aber zu Reaktionen zwischen den Mediatoren kommt, die mit oder gerade durch HMGB1 passieren.

*In vivo:*

1. Kann HMGB1-Gabe bzw. -Injektion bei bspw. Mäusen den Wundheilungs- oder Thrombolyse-Prozess ausschlaggebend verbessern?
  - a. Gilt dies auch für die Postinfarkt-Wundheilung?
  - b. Können HMGB1-Injektionen in das geschädigte Infarktgebiet zu einer Optimierung der Wundheilungstherapie und damit zu einer bestmöglichen Abschwächung des *Remodeling* führen?
2. Welche körperinternen Interaktionen verbessern oder verschlechtern die Wirkung von HMGB1 (auf Monozyten oder Thrombozyten bzw. zwischen Monozyten und Thrombozyten)?
3. Spielen dieselben Rezeptoren für die gleichen Prozesse die entscheidende Rolle oder handelt es sich vielmehr um ein Zusammenspiel (Versuchsreihen bspw. mit *knock out*- und Wildtyp-Mäusen)?

Nichtsdestotrotz ist in der Gesamtschau die Forschung zu HMGB1 besonders vielversprechend, da sich bereits jetzt ein deutlicher Trend zeigt, dass neue therapeutische Ansätze mit HMGB1 bei Thrombose sowie Myokardinfarkt zu einer verbesserten Wundheilung bzw. einem besseren Outcome insgesamt führen.

## 5 Zusammenfassung

Thrombozyten und Monozyten spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen von Thrombose- sowie Wundheilungsprozessen und damit auch beim *Remodeling* nach Myokardinfarkt. Dies wurde bereits zu genüge *in vitro* und auch *in vivo* gezeigt. Die Rolle des Zytokins *High Mobility Group Box 1* (HMGB1) ist dabei jedoch noch immer nicht vollständig geklärt. Unlängst konnte nachgewiesen werden, dass HMGB1 bei der Rekrutierung von Monozyten über den *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) und bei survivalverbessernden Prozessen der Monozyten über den *Toll-like receptor 4* wirkt. Die vorliegende Arbeit untersucht nicht nur diese Interaktionen, sondern auch „neue“ – im Besonderen hinsichtlich der Phagozytose durch Monozyten. Dabei weist sie zum einen die migrationsverstärkende Eigenschaft des HMGB1 und die Interaktion über den RAGE nach und bestätigt zum anderen auch die das Überleben fördernden Effekte des HMGB1 bei Monozyten. In dieser Versuchsreihe findet sich allerdings zu den zuletzt publizierten Ergebnissen eine Diskrepanz hinsichtlich des maßgeblich beteiligten Rezeptors: Der Assay zeigt nämlich keine statistisch signifikante Wirkung *via Toll-like receptor 4*, sondern lässt vielmehr auf eine solche *via Toll-like receptor 2* schließen. Hierdurch erscheint eine multiple Rezeptorbeteiligung plausibel.

Speziell wird die stimulierende Wirkung des bei Apoptose von HT-22-Zellen (von einer primären neuronalen Hippocampus-Kultur von Mäusen geklonte Zelllinie) entstandenen Überstandes auf Thrombozyten beschrieben. Die darin enthaltenen Stoffe führen, ebenso wie *collagen-related peptide* (CRP) und Adenosindiphosphat (ADP), zu einer Aktivierung der Thrombozyten. Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Aktivierungsarten der Thrombozyten führten daraufhin zu einer Freisetzung von HMGB1 – dies wird mittels Western Blot und anschließender Immundetektion gezeigt. Hiermit lassen sich schließlich auch Unterschiede in der Quantität des ausgeströmten HMGB1 feststellen: Die hier demonstrierten Ergebnisse deuten auf eine verstärkte Freilassung von HMGB1 durch kumulative Aktivierung im Gegensatz zu einer „einfachen“ Thrombozytenaktivierung (bspw. nur CRP) hin.

Schließlich wird auch im Rahmen der Monozyten-Phagozytose von Thrombozyten eine erhöhte Rate nach Aktivierung letzterer (bspw. mit ADP) und sodann zusätzlich eine stimulierende Wirkung von HMGB1 nachgewiesen.

Die Arbeit zeigt insgesamt, dass die positive Wirkung von HMGB1 auf Thrombozyten und/oder Monozyten in Migrations- bzw. Survival-Prozessen mittlerweile als weitgehend gesichert

gelten sollte. Es bleibt jedoch weiterhin noch unzureichend erforscht, wie HMGB1 seine Wirkung exakt entfaltet. Hierzu und im Besonderen bezüglich der Phagozytose-Eigenschaft von Monozyten sind etwaige Fragen in weiteren *in vitro* und *in vivo* Studien zu klären.

Dennoch ist bereits jetzt ein klarer Trend durch diese und auch durch die aus mit HMGB1 durchgeführten *in vivo* Studien gewonnenen Erkenntnissen ersichtlich, der eine HMGB1-Therapie als neue Option insbesondere bei Thrombose- und Postinfarkt-Behandlung in naher Zukunft sehr wahrscheinlich macht.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization; 2018.
- [2] Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M (2016) Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J.* 37(42): 3232-3245
- [3] [https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400157004.pdf?__blob=publicationFile), Zugriff: 16.03.2019.
- [4] [https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17\\_347\\_236.html](https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2017/09/PD17_347_236.html), Zugriff: 18.06.2018.
- [5] Bühling KJ, Lepenies J, Witt K, Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag/Elsevier, München / Jena, 2008.
- [6] Herold, G., Innere Medizin, Gerd Herold, Köln, 2014.
- [7] Frangogiannis NG (2012) Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair. *Circ Res.* 110(1): 159-173.
- [8] Nahrendorf M, Pittet MJ, Swirski FK (2010) Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Circulation.* 121(22): 2437-2445.
- [9] Jackson SP (2011) Arterial thrombosis – insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med.* 17(11): 1423-1436.
- [10] Gawaz M (2004) Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 61(3): 498-511.
- [11] Ruggeri ZM (2002) Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 8(11): 1227-34.
- [12] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
- [13] Zawrotniak M und Rapala-Kozik M (2013) Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol.* 60(3): 277-284.
- [14] Liu CL, Tangsombatvisit S, Rosenberg JM, Mandelbaum G, Gillespie EC, Gozani OP, Alizadeh AA, Utz PJ (2012) Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis Res Ther.* 14(1): R25.
- [15] Dworski R, Simon HU, Hoskins A, Yousefi S (2011) Eosinophil and neutrophil extracellular DNA traps in human allergic asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 127(5): 1260-1266.

- [16] Papayannopoulos V, Staab D, Zychlinsky A (2011) Neutrophil Elastase Enhances Sputum Solubilization in Cystic Fibrosis Patients Receiving DNase Therapy. *PLoS One*. 6(12): e28526.
- [17] Lu T, Kobayashi SD, Quinn MT, Deleo FR (2012) A NET Outcome. *Front Immunol*. 3: 365.
- [18] Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JU, Wagner DD (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(36): 15880-15885.
- [19] Maugeri N, Campana L, Gavina M, Covino C, De Metrio M, Panciroli C, Maiuri L, Maseri A, D'Angelo A, Bianchi ME, Rovere-Querini P, Manfredi AA (2014) Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost*. 12(12): 2074-2088.
- [20] Huang H, Tohme S, Al-Khafaji AB, Tai S, Loughran P, Chen L, Wang S, Kim J, Billiar T, Wang Y, Tsung A (2015) DAMPs-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. *Hepatology*. 62(2): 600-614.
- [21] Vogel S, Bodenstein R, Chen Q, Feil S, Feil R, Rheinlaender J, Schäffer TE, Bohn E, Frick JS, Borst O, Münzer P, Walker B, Markel J, Csanyi G, Pagano PJ, Loughran P, Jessup ME, Watkins SC, Bullock GC, Sperry JL, Zuckerbraun BS, Billiar TR, Lotze MT, Gawaz M, Neal MD (2015) Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *J Clin Invest*. 125(12): 4638-4654.
- [22] de Boer OJ, Li X, Teeling P, Mackaay C, Ploegmakers HJ, van der Loos CM, Daemen MJ, de Winter RJ, van der Wal AC (2013) Neutrophils, neutrophil extracellular traps and interleukin-17 associate with the organisation of thrombi in acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 109(02): 290-297.
- [23] Rath D, Geisler T, Gawaz M, Vogel S (2017) HMGB1 Expression Level in Circulating Platelets is not Significantly Associated with Outcomes in Symptomatic Coronary Artery Disease. *Cell Physiol Biochem*. 43(4): 1627-1633.
- [24] Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD *et al.* (2012) Third universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 33(20). 2551-2567.
- [25] Löwel H, Hörmann A, Döring A, Heier M, Meisinger C, Schneider A, Kaup U, Gösele U, Hymer H, Koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt, Gesundheitsberichterstattung des Bundes (Robert Koch Institut), Heft 33, [https://www.rki.de/EN/Content/Health\\_Monitoring/Health\\_Reporting/GBEDownloadsT/Herzkrankheit.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/EN/Content/Health_Monitoring/Health_Reporting/GBEDownloadsT/Herzkrankheit.pdf?__blob=publicationFile), S. 1-35.
- [26] WHO, Prevention of cardiovascular disease - Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk (2007). [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/guidelines/Full%20text.pdf](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/guidelines/Full%20text.pdf), Zugriff: 27.06.2018.
- [27] Nayak BS, Sandiford S, Maxwell A (2009) Evaluation of the Wound-healing Activity of Ethanolic Extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf. *Evid Based Complement Alternat Med*. 6(3): 351-356.

- [28] Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N (2000) Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling, Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling, *J Am Coll Cardiol.* 35(3): 569-582.
- [29] Gonzalez AC de O, Costa TF, Andrade Z de A, Medrado ARAP (2016) Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 91(5): 614-620.
- [30] Ertl G, Brenner S, Angermann CE, Kardiales Remodelling nach Myokardinfarkt Update für die klinische Praxis, CME Fortbildung, Ausgabe 5/2017, Springer Medizin Verlag GmbH, Berlin.
- [31] Riede U-N und Werner M, Allgemeine und Spezielle Pathologie, 2. Auflage, Berlin/Heidelberg, Springer, 2017.
- [32] May A, Riede FN, Riede UN (2010) Acute subepicardial infarction associated with severe septic shock – insight in myocardial perfusion. *Path Res Pract.* 206(6): 401- 404.
- [33] Erlebacher JA, Weiss JL, Weisfeldt ML, Bulkley BH (1984) Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement. *J Am Coll Cardiol.* 4(2): 201-208.
- [34] Li J, Chen J, Kirsner R (2007) Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 25(1): 9-18.
- [35] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Molecular Biology of the Cell, 4th edition, New York: Garland Science; 2002, Fibroblasts and Their Transformations: The Connective-Tissue Cell Family (Fibroblasts Change Their Character in Response to Chemical Signals), Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26889/>.
- [36] Kumar R, Katoch SS, Sharma S (2006) Beta-adrenoceptor agonist treatment reverses denervation atrophy with augmentation of collagen proliferation in denervated mice gastrocnemius muscle. *Indian J Exp Biol.* 44(5): 371-76.
- [37] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Molecular Biology of the Cell, 4th edition, New York: Garland Science; 2002, The Extracellular Matrix of Animals (Fibronectin Is an Extracellular Protein That Helps Cells Attach to the Matrix), Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26810/>.
- [38] Young A und McNaught C-E (2011) The physiology of wound healing, *Surgery.* 29(10): 475-479.
- [39] De Donatis A, Ranaldi F, Cirri P (2010) Reciprocal control of cell proliferation and migration. *Cell Commun Signal.* 8:20.
- [40] Silbernagl S und Lang F, Taschenatlas Pathophysiologie, 5. Auflage, Stuttgart/New York, Georg Thieme Verlag, 2018.
- [41] Klinger MH und Jelkmann W (2002) Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 22(9): 913-922.

- [42] Filippi M-D (2016) Mechanism of Diapedesis: Importance of the Transcellular Route. *Adv Immunol.* 129: 25-53.
- [43] Rendu F und Brohard-Bohn B (2001) The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 12(5): 261-273
- [44] Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schömig A (1997) Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation.* 95(10): 2387-2394.
- [45] Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K (1998), Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation.* 98(12): 1164-1171.
- [46] Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 391(6667): 591-594.
- [47] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 7(9): 678-689.
- [48] Rainger GE, Chimen M, Harrison MJ, Yates CM, Harrison P, Watson SP, Lordkipanidzé M, Nash GB (2015) The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets.* 26(6): 507-520.
- [49] Amann-Vesti BR in: Siegenthaler W, Blum, HE, *Klinische Pathophysiologie*, 9. Auflage, Stuttgart, Thieme, 2006.
- [50] Fenyo IM, Gafencu AV (2013) The involvement of the monocytes/macrophages in chronic inflammation associated with atherosclerosis. *Immunobiology.* 218(11): 1376-1384.
- [51] Ruparelia N, Digby JE, Jefferson A, Medway DJ, Neubauer S, Lygate CA, Choudhury RP (2013) Myocardial infarction causes inflammation and leukocyte recruitment at remote sites in the myocardium and in the renal glomerulus. *Inflamm Res.* 62(5): 515-525.
- [52] Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P (2004) Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circ Res.* 94(12): 1543-1553.
- [53] Brandenburger T und Königshoff M, *Kurzlehrbuch Biochemie*, 3. Auflage, Stuttgart, Thieme, 2012.
- [54] Müller-Esterl W., *Biochemie*, 3. Auflage, Berlin/Heidelberg, Springer Spektrum, 2018.
- [55] Deutzmann R in: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, *Duale Reihe Biochemie*, 4. Auflage, Stuttgart, Thieme, 2016.
- [56] Gunsilius E, Gastl G, Petzer AL (2001) Hematopoietic stem cells. *Biomed Pharmacother.* 55(4): 186-194.

- [57] Mosaad YM (2014) Hematopoietic stem cells: An overview. *Transfus Apher Sci.* 51(3): 68-82.
- [58] Nathan CF (1987) Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 79(2):319-326.
- [59] Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA (2011) Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 127(3): 701-721.
- [60] Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ, *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition, New York: Garland Science; 2001, The components of the immune system, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27092/>.
- [61] Ruddle NH und Akirav EM (2009) Secondary Lymphoid Organs: Responding to Genetic and Environmental Cues in Ontogeny and the Immune Response. *J Immunol.* 183(4): 2205-2212.
- [62] Lüllmann-Rauch R, *Taschenlehrbuch Histologie*, 3. Auflage, Stuttgart, Thieme, 2009.
- [63] Li G, Liang X, Lotze MT (2013) HMGB1: The Central Cytokine for All Lymphoid Cells. *Front Immunol.* 4: 68.
- [64] Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger A-C, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ (2000) High mobility group 1 Protein (Hmg-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 192 (4) 565-570.
- [65] Goodwin GH, Johns EW (1977) The isolation and purification of the high mobility group (HMG) nonhistone chromosomal proteins. *Methods Cell Biol.* 16: 257-267.
- [66] Canaple L, Decoville M, Leng M, Locker D (1997) The Drosophila DSP1 gene encoding an HMG 1-like protein: genomic organization, evolutionary conservation and expression. *Gene.* 184(2): 285-290.
- [67] Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ (2005) The cytokine activity of HMGB1, *J Leukoc Biol.* 78(1): 1-8.
- [68] Ostell J, What's in a Genome at NCBI? 2013 Nov 8. In: *The NCBI Handbook* [Internet], 2nd edition, Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169442/>.
- [69] Sies H, Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies H, *Oxidative Stress*, London, Academic Press, 1985 (pp. 1-8).
- [70] Sies H (1986) Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl.* 25(12): 1058-1071.
- [71] Pugh BF (1996) Mechanism of transcription complex assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 8(3): 303-311.

- [72] Müller S, Scaffidi P, Degryse B, Bonaldi T, Ronfani L, Agresti A, Beltrame M, Bianchi ME (2001) New EMBO member's review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal. *EMBO J.* 20(16): 4337-4340.
- [73] Pfeifer U, Probleme der cellulären Autophagie: Morphologische, enzymcytochemische und quantitative Untersuchungen an normalen und alterierten Leberepithelien der Ratte, in: *Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte Band 44 Heft 4*, Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag, 1971.
- [74] Gillen JG and Nita-Lazar A (2017) Composition of the myddosome during the innate immune response. *J Immunol.* 198 (1 Supplement) 75.15.
- [75] Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Dauer M, Krug A, Hartmann G, Eigler A, Endres S, Dendritische Zellen – Träger tumorgerichteter Immuntherapie, *Dtsch Arztebl* 2002; 99:A 2408-2416 [Heft 37].
- [76] Edholm ES, Rhoo KH, Robert J, in: Kloc M, *Macrophages: Origin, Functions and Biointervention*, Basel, Springer International Publishing AG, 2017.
- [77] Mandal A und Viswanathan C (2015) Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 8(2): 47-55.
- [78] Cruse JM, Lewis RE, Wang H, Chapter 7 – Antigen Presentation, in: *Immunology Guidebook*, Elsevier Academic Press, San Diego, 2004.
- [79] Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B (2000) Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw.* 11(3): 362-71.
- [80] Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR (2002) Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 4(8): 837-851.
- [81] Ginsburg I (2002) Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis.* 2(3): 171-179.
- [82] Campana L, Santarella F, Esposito A, Maugeri N, Rigamonti M, Monno A, Canu T, Del Maschio A, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P (2014) Leukocyte HMGB1 Is Required for Vessel Remodeling in Regenerating Muscles. *J Immunol.* 192(11): 5257-5264.
- [83] Blom B und Spits H (2006) Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol.* 24:287-320.
- [84] Ulfig N, *Kurzlehrbuch Histologie*, 4. Auflage, Stuttgart, Thieme, 2015.
- [85] Haig DM, Hopkins J, Miller HRP (1999) Local immune responses in afferent and efferent lymph. *Immunology.* 96(2): 155-163.
- [86] Kawamoto H und Minato N (2004) Myeloid cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 36(8): 1374-1379.

- [87] Andrassy M, Volz HC, Riedle N, Gitsioudis G, Seidel C, Laohachewin D, Zankl AR, Kaya Z, Bierhaus A, Giannitsis E, Katus HA, Korosoglou G (2011) HMGB1 as a predictor of infarct transmuralty and functional recovery in patients with myocardial infarction. *J Intern Med.* 270(3):245-53.
- [88] Andersson U and Tracey KJ (2011) HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol* 29: 139-162.
- [89] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418(6894): 191-195.
- [90] Vogel S, Börger V, Peters C, Förster M, Liebfried P, Metzger K, Meisel R, Däubener W, Trapp T, Fischer JC, Gawaz M, Sorg RV (2015) Necrotic cell-derived high mobility group box 1 attracts antigen-presenting cells but inhibits hepatocyte growth factor-mediated tropism of mesenchymal stem cells for apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 22(7): 1219-1230.
- [91] Khakoo AY und Finkel T (2005) Endothelial Progenitor Cells. *Annu Rev Med* 56: 79-101.
- [92] Onat D, Brillon D, Colombo PC, Schmidt AM (2011) Human Vascular Endothelial Cells: A Model System for Studying Vascular Inflammation in Diabetes and Atherosclerosis. *Curr Diab Rep.* 11(3): 193-202.
- [93] Nakamura Y, Suzuki S, Shimizu T, Miyata M, Shishido T, Ikeda K, Saitoh S, Kubota I, Takeishi Y (2015) High Mobility Group Box 1 Promotes Angiogenesis from Bone Marrow-derived Endothelial Progenitor Cells after Myocardial Infarction. *J Atheroscler Thromb.* 22(6): 570-581.
- [94] Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E (2004) Involvement of TLR 2 and TLR 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein (HMGB1). *J Biol Chem.* 279(9): 7370-7377.
- [95] Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, Fenton MJ, Tracey KJ, Yang H (2006) HMGB1 signals through Toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock.* 26(2): 174-179.
- [96] Yang H und Tracey KJ (2010) Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1799(1-2): 149-156.
- [97] Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Neeper M, Przysiecki C, Shaw A, *et al.* (1993) Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol.* 143(6): 1699-1712.
- [98] v. Furth, R., *Mononuclear Phagocytes – Biology of Monocytes and Macrophages*, Dordrecht, Niederlande, Springer Science & Business Media, 1992.
- [99] Bucciarelli LG, Ananthakrishnan R, Hwang YC, Kaneko M, Song F, Sell DR, Strauch C, Monnier VM, Yan SF, Schmidt AM, Ramasamy R (2008), RAGE and modulation of ischemic injury in the diabetic myocardium. *Diabetes.* 57(7): 1941-51.

- [100] Bucciarelli LG, Kaneko M, Ananthakrishnan R, Harja E, Lee LK, Hwang YC, Lerner S, Bakr S, Li Q, Lu Y, Song F, Qu W, Gomez T, Zou YS, Yan SF, Schmidt AM, Ramasamy R (2006) Receptor for advanced-glycation end products: key modulator of myocardial ischemic injury. *Circulation*. 113(9): 1226-1234.
- [101] Andrassy M, Volz HC, Igwe JC, Funke B, Eichberger SN, Kaya Z, Buss S, Autschbach F, Pleger ST, Lukic IK, Bea F, Hardt SE, Humpert PM, Bianchi ME, Mairböurl H, Nawroth PP, Remppis A, Katus HA, Bierhaus A (2008) High mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart. *Circ*. 117:3216-26.
- [102] Kawai T und Akira S (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 34(5): 637-650.
- [103] Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM (2012) The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol*. 3: 79.
- [104] DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M (1997) A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B, *Nature*. 388(6642): 548-554.
- [105] Takeuchi O und Akira S (2001) Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol*. 1(4): 625-635.
- [106] Yu Y, Wan Y, Huang C (2009) The Biological Functions of NF- $\kappa$ B1 (p50) and its Potential as an Anti-Cancer Target. *Curr Cancer Drug Targets*. 9(4): 566-571.
- [107] Sethi G, Sung B, Aggarwal BB (2008) Nuclear factor- $\kappa$ B activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)*. 233(1): 21-31.
- [108] Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 285(5425): 248-251.
- [109] Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR (2005) The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J Exp Med*. 201(7): 1135-1143.
- [110] Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Müller S, Resnati M, Sanvito F, Arrighoni G, Bianchi ME (2001) The High Mobility Group Boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol*. 152(6): 1197-1206.
- [111] Kohno T, Anzai T, Naito K, Miyasho T, Okamoto M, Yokota H, Yamada S, Maekawa Y, Takahashi T, Yoshikawa T, Ishizaka A, Ogawa S (2009) Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodeling. *Cardiovasc Res*. 81(3): 565-573.
- [112] Takahashi K, Fukushima S, Yamahara K, Yashiro K, Shintani Y, Coppens SR, Salem HK, Bouillon-Swain SW, Yacoub MH, Suzuki K (2008) Modulated Inflammation by Injection of High-Mobility Group Box 1 Recovers Post-Infarction Chronically Failing Heart. *Circulation*. 118(14 Suppl): S106-114.

- [113] Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, Leoni O, Palumbo R, Battistini L, Rastaldo R, Muller S, Pompilio G, Anversa P, Bianchi ME, Capogrossi MC (2005) Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit<sup>+</sup> cell proliferation and differentiation. *Circ Res.* 97(8): e73-83.
- [114] Kitahara T, Takeishi Y, Harada M, Niizeki T, Suzuki S, Sasaki T, Ishino M, Bilim O, Nakajima O, Kubota I (2008) High-mobility group box 1 restores cardiac function after myocardial infarction in transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 80(1): 40-46.
- [115] Limana F, Esposito G, D'Arcangelo D, Di Carlo A, Romani S, Melillo G, Mangoni A, Bertolami C, Pompilio G, Germani A, Capogrossi MC (2011) HMGB1 Attenuates Cardiac Remodelling in the Failing Heart via Enhanced Cardiac Regeneration and miR-206-Mediated Inhibition of TIMP-3. *PLoS One.* 6(6): e19845.
- [116] Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Buday A, *et al.* (2013) 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: The Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 34(38): 2949-3003.
- [117] Antman EM (2008) Time is muscle: translation into practice. *J Am Coll Cardiol.* 52:1216-1221.
- [118] Bolooki HM, Askari A (2010) Acute myocardial infarction. Cleveland Clinic. Disease Manag Proj. 2010.
- [119] O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE Jr, Chung MK, de Lemos JA, *et al.* (2013) 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation.* 127(4): e362-425.
- [120] Huffman JC und Stern TA (2003) The use of benzodiazepines in the treatment of chest pain: a review of the literature. *J Emerg Med.* 25(4): 427-437.
- [121] Geckle M, Wischmeyer E, Gründer S, Petersen M, Schwab A, Markwardt F, Klöcker N, Baumann R, Marti H, Taschenlehrbuch Physiologie, 2. Auflage, Stuttgart, Thieme, 2010.
- [122] Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, *et al.* (2018) 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation, The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 39(2): 119-177.
- [123] Keeley EC und Hillis LD (2007) Primary PCI for Myocardial Infarction with ST-Segment Elevation. *N Engl J Med.* 356(1): 47-54.
- [124] Hochman JS, Sleeper LA, Webb JG, Sanborn TA, White HD, Talley JD, Buller CE, Jacobs AK, Slater JN, Col J, McKinlay SM, LeJemtel TH (1999) Early revascularization in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. SHOCK Investigators. Should We Emergently Revascularize Occluded Coronaries for Cardiogenic Shock. *N Engl J Med.* 341(9): 625-634.

- [125] Ahmed S, Antman EM, Murphy SA, Giugliano RP, Cannon CP, White H, Morrow DA, Braunwald E (2006) Poor outcomes after fibrinolytic therapy for ST-segment elevation myocardial infarction: impact of age (a meta-analysis of a decade of trials). *J Thromb Thrombolysis* 21(2): 119-29.
- [126] Thune JJ, Hoefsten DE, Lindholm MG, Mortensen LS, Andersen HR, Nielsen TT, Kober L, Kelbaek H (2005) Simple risk stratification at admission to identify patients with reduced mortality from primary angioplasty. *Circulation*. 112(13): 2017-2021.
- [127] Reynolds HR und Hochman JS (2008) Cardiogenic Shock: current concepts and improving outcomes. *Circulation*. 117(5): 686-697.
- [128] <https://www.nhlbi.nih.gov/health-topics/coronary-artery-bypass-grafting>, Zugriff: 18.06.2018.
- [129] Knuttinen MG, Emmanuel N, Isa F, Rogers AW, Gaba RC, Bui JT, Owens CA (2010) Review of Pharmacology and Physiology in Thrombolysis Interventions. *Semin Intervent Radiol*. 27(4), 374-383.
- [130] Babich H, Liebling EJ, Burger RF, Zuckerbraun HL, Schuck AG (2009) Choice of DMEM, formulated with or without pyruvate, plays an important role in assessing the in vitro cytotoxicity of oxidants and prooxidant nutraceuticals. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 45(5-6): 226-233.
- [131] Schrödel A: Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien, in: Tetsch L, *Biologie in unserer Zeit*, Band 37, Nummer 5, Oktober 2007, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 273-331.
- [132] Moore GE, Gerner RE, Franklin HA (1967) Culture of Normal Human Leukocytes. *JAMA*. 199(8): 519-524.
- [133] Lindl T und Gstraunthaler G, *Zell- und Gewebekultur, Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendung*, 7. Auflage, Berlin/Heidelberg, Springer, 2013.
- [134] <https://www.caymanchem.com/pdfs/21426.pdf>, Zugriff: 18.06.2018.
- [135] Papadea C und Check IJ (2008) Human Immunoglobulin G and Immunoglobulin G Subclasses: Biochemical, Genetic, and Clinical Aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 27(1): 27-58.
- [136] Burry RW (2011) Controls for Immunocytochemistry: An Update. *J Histochem Cytochem* 59(1): 6-12.
- [137] Burry RW, *Immunocytochemistry: a practical guide for biomedical research*, New York, Springer, 2010.
- [138] Smethurst PA, Onley DJ, Jarvis GE, O'Connor MN, Knight CG, Herr AB, Ouwehand WH, Farndale RW (2007) Structural basis for the platelet-collagen interaction: the smallest motif within collagen that recognizes and activates platelet Glycoprotein VI contains two glycine-proline-hydroxyproline triplets. *J Biol Chem*. 282(2): 1296-1304.

- [139] Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, Heinzmann U, Nieswandt B (2003) A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med.* 197(1): 41-49.
- [140] Moroi M, Jung SM (2004) Platelet glycoprotein VI: its structure and function. *Thromb Res.* 114(4): 221-233.
- [141] Morton LF, Hargreaves PG, Farndale RW, Young RD, Barnes MJ (1995) Integrin alpha 2 beta 1-independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for alpha 2 beta 1-independent platelet reactivity. *Biochem J.* 306(Pt2): 337-344.
- [142] Kahn ML (2004) Platelet-collagen responses: molecular basis and therapeutic promise. *Semin Thromb Hemost.* 30(4): 419-425.
- [143] Polanowska-Grabowska R, Gibbins JM, Gear ARL (2003) Platelet adhesion to collagen and collagen-related peptide under flow: roles of the [alpha]2[beta]1 integrin, GPVI, and Src tyrosine kinases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(10): 1934-1940.
- [144] Liu G, Liu G, Chen H, Borst O, Gawaz M, Vortkamp A, Schreiber R, Kunzelmann K, Lang F (2015) Involvement of Ca<sup>2+</sup> Activated Cl<sup>-</sup> Channel Ano6 in Platelet Activation and Apoptosis. *Cell Physiol Biochem.* 37(5): 1934-1944.
- [145] Horton HR, Moran LA, Scrimgeour KG, Perry MD, Rawn JD, Biochemie, 4. Auflage, München, Pearson Studium, 2008.
- [146] Bannwarth H, Kremer BP, Schulz A, Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie, Vom Atom bis zur Atmung – für Biologen, Mediziner und Pharmazeuten, 3. Auflage, Berlin/Heidelberg, Springer, 2013.
- [147] Puri RN, Colman RW, Liberman MA(1997) ADP-Induced Platelet Activation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 32(6): 437-502.
- [148] Woulfe D, Yang J, Brass L (2001) ADP and platelets: the end of the beginning. *J Clin Invest.* 107(12): 1503-1505.
- [149] Davie EW und Kulman JD (2006) An Overview of the Structure and Function of Thrombin. *Semin Thromb Hemost.* 32 Suppl 1: 3-15.
- [150] Avelar-Freitas BA, Almeida VG, Pinto MCX, Mourão FAG, Massensini AR, Martins-Filho OA, Rocha-Vieira E, Brito-Melo GEA (2014) Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz J Med Biol Res.* 47(4): 307-315.
- [151] <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/302643?lang=de&region=DE>, Zugriff: 18.06.2018
- [152] Menck K, Behme D, Pantke M, Reiling N, Binder C, Pukrop T, Klemm F (2014) Isolation of Human Monocytes by Double Gradient Centrifugation and Their Differentiation to Macrophages in Teflon-coated Cell Culture Bags. *J Vis Exp.* (91): e51554.

- [153] Liu J, Li L, Suo WZ (2009) HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci.* 84(9-10): 267-271.
- [154] Aminova LR, Chavez JC, Lee J, Ryu H, Kung A, Lamanna JC, Ratan RR (2005) Pro-survival and prodeath effects of hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in a murine hippocampal cell line. *J Biol Chem.* 280(5): 3996-4003.
- [155] Caldwell JD, Shapiro RA, Jirikowski GF, Suleman F (2007) Internalization of sex hormone binding globulin into neurons and brain cells in vitro and in vivo. *Neuroendocrinology.* 86(2): 84-93.
- [156] Davis JB, Maher P (1994) Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* 652(1): 169-173.
- [157] Panee J, Stoytcheva ZR, Liu W, Berry MJ (2007) Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. *J Biol Chem.* 282(33): 23759-23765.
- [158] Chen HC (2005) Boyden chamber assay. *Methods Mol Biol.* 294: 15-22.
- [159] Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchick MJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th edition, New York: Garland Science; 2001, Glossary, Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10759/>.
- [160] Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D, *Der Experimentator 'Immunologie'*, 4. Auflage, Berlin/Heidelberg, Springer Spektrum, 2014.
- [161] Lugli E, Roederer M, Cossarizza A (2010) Data Analysis in Flow Cytometry: The Future Just Started. *Cytometry A.* 77(7): 705-713.
- [162] Sabban S (2011) Development of an in vitro model system for studying the interaction of *Equus caballus* IgE with its high-affinity FcεRI receptor. PhD thesis, The University of Sheffield.
- [163] Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchick MJ. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 5th edition, New York: Garland Science; 2001. Appendix I. Immunologists' Toolbox, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10755](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10755/).
- [164] Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9): 4350-4354.
- [165] Mahmood T und Yang P-C (2012) Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci.* 4(9): 429-434.
- [166] Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(7): 3116-3120.

- [167] Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E (2006) High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol.* 290(3): C917-924.
- [168] Schiraldi M, Raucci A, Muñoz LM, Livoti E, Celona B, Venereau E, Apuzzo T, De Marchis F, Pedotti M, Bachi A, Thelen M, Varani L, Mellado M, Proudfoot A, Bianchi ME, Uguccioni M (2012) HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med.* 209(3): 551-563.
- [169] Vogel S, Rath D, Borst O, Mack A, Loughran P, Lotze MT, Neal MD, Billiar TR, Rawaz M (2016) Platelet-derived high-mobility group box 1 promotes recruitment and suppresses apoptosis of monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 478(1): 143-148.
- [170] Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepántalo M, Carpén O, Parkkinen J, Rauvala H (2004) Regulation of monocyte migration by amphotericin (HMGB1). *Blood.* 104(4): 1174-1182.
- [171] Poole JCF (1966) Phagocytosis of Platelets by Monocytes in Organizing Arterial Thrombi. An Electron Microscopical Study. *Quart J exp Physiol.* 51: 54-59.
- [172] Chatterjee M, von Ungern-Sternberg SN, Seizer P, Schlegel F, Büttcher M, Sindhu NA, Müller S, Mack A, Gawaz M (2015) Platelet-derived CXCL12 regulates monocyte function, survival, differentiation into macrophages and foam cells through differential involvement of CXCR4-CXCR7. *Cell Death Dis.* 6: e1989.
- [173] Liu G, Wang J, Park Y-J, Tsuruta Y, Lorne EF, Zhao X, Abraham E (2008) HMGB1 inhibits phagocytosis of apoptotic neutrophils through binding to phosphatidylserine. *J Immunol.* 181(6): 4240-4246.
- [174] Kang GJ, Lee HJ, Kang YP, Kim EJ, Kim HJ, Byun HJ, Park MK, Cho H, Kwon SW, Lee CH (2004) High-mobility group box 1 suppresses resolving D1-induced phagocytosis via induction of resolving D1-inactivating enzyme, 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* 1852(9): 1981-1988.
- [175] Vogel S, Chatterjee M, Metzger K, Borst O, Geisler T, Seizer P, Müller I, Mack A, Schumann S, Bühring HJ, Lang F, Sorg RV, Langer H, Gawaz M (2014) Activated platelets interfere with recruitment of mesenchymal stem cells to apoptotic cardiac cells via high mobility group box 1/Toll-like receptor 4-mediated down-regulation of hepatocyte growth factor receptor MET. *J Biol Chem.* 289(16): 11068-11082.
- [176] Zucker MB und Nachmias VT (1985) Platelet activation. *Arteriosclerosis.* 5(1): 2-18.
- [177] Stark K, Philipp V, Stockhausen S, Busse J, Antonelli A, Miller M, Schubert I, Hoseinpour P, Chandraratne S, von Brühl ML, Gaertner F, Lorenz M, Agresti A, Coletti R, Antoine DJ, Heermann R, Jung K, Reese S, Laitinen I, Schwaiger M, Walch A, Sperandio M, Nawroth PP, Reinhardt C, Jäckel S, Bianchi ME, Massberg S (2016) Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. *Blood.* 128(20): 2435-2449.

- [178] Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, Du X, Li Z (2009) LPS stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol.* 182(12): 7997-8004.
- [179] Goldstein RS, Gallowitsch-Puerta M, Yang L, Rosas-Ballina M, Huston JM, Czura CJ, Lee DC, Ward MF, Bruchfeld AN, Wang H, Lesser ML, Church AL, Litroff AH, Sama AE, Tracey KJ (2006) Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock.* 25(6): 571-574.
- [180] He Y, Zhou X, Zheng X, Jiang X (2013) Exogenous high-mobility group box 1 protein prevents postinfarction adverse myocardial remodeling through TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. *J Cell Biochem.* 114(7): 1634-1641.
- [181] Zhou Y-H, Han Q-F, Wang L-H, Liu T, Meng X-Y, Wu L, Li T, Jiao Y-R, Yao H-C, Zhang D-Y (2017) High mobility group box 1 protein attenuates myocardial ischemia reperfusion injury via inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Exp Ther Med.* 14(2): 1582-1588.
- [182] Jin P, Zhou Q, Song S, Xu J, Zhang M, Zhu M, Kang M, Shi X, Shi J, Lu D, Li J (2016) Elevated preoperative HMGB1 as predictor of myocardial injury post-percutaneous coronary intervention. *Medicine (Baltimore).* 95(46): e5149.
- [183] Sørensen MV, Pedersen S, Møgelvang R, Skov-Jensen J, Flyvbjerg A (2011) Plasma high-mobility group box 1 levels predict mortality after ST-segment elevation myocardial infarction. *JACC Cardiovasc Interv.* 4(3): 281-286.
- [184] Divya D, Arul Salomee KR, Anusuyadevi M, Jayachandran KS (2017) HMGB1: A Therapeutic Target for Myocardial Infarction. *J Cardiol Cardiovasc Ther.* 7(5): 555724.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik Tübingen Innere Medizin III – Kardiologie und Kreislauferkrankungen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Gawaz durchgeführt. Die Konzeption der Versuche erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Gawaz und meinem Betreuer Herrn Dr. Sebastian Vogel. Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Herrn Dr. Sebastian Vogel) von mir eigenständig durchgeführt; die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls unter Supervision von Herrn Dr. Sebastian Vogel.

Ich versichere, die Dissertation selbstständig verfasst zu haben (kritische Revision durch Prof. Dr. Gawaz, Herr Dr. Vogel und Frau Dr. Castor) und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, 20.11.2018

## 8 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Meinrad Paul Gawaz, Ärztlicher Direktor und Ordinarius an der Universitätsklinik und Poliklinik sowie Leiter des Deutschen Herzkompetenz Zentrums in Tübingen für die Überlassung dieses außerordentlich interessanten Themas und die Möglichkeit meine Dissertation unter seiner Leitung zu realisieren.

Herrn Dr. med. Sebastian Vogel danke ich für seine Betreuung, seinen ansteckenden Enthusiasmus für das Thema und letztlich für die Hilfestellung bei der Durchführung meiner Arbeit. Frau Dr. Madhumita Chatterjee gilt ebenso mein besonderer Dank für die Möglichkeit jederzeit mit Fragen auf sie zukommen zu können und für ihre stetigen hilfreichen Tipps zu Versuchen und Auswertungen.

Außerdem bedanke ich mich recht herzlich bei allen Mitarbeitern des Labors für Kardiologie und Kreislauferkrankungen in Tübingen. Hier möchte ich Rebecca Bodenstein besonders hervorheben, die – ebenfalls unter Betreuung von Herrn Dr. med. Sebastian Vogel – jederzeit unsere jeweiligen Ergebnisse kritisch mit mir diskutierte.

Außerdem möchte ich mich hiermit auch bei allen bedanken, die in irgendeiner Weise in dem Schaffungsprozess der Doktorarbeit mitgewirkt haben; insbesondere bei Pauline Hachenberg, die mich beim Zeichnen und Gestalten der Abbildungen tatkräftig unterstützt hat.

Meiner Familie gilt schließlich ein ganz besonders herzlicher Dank für ihre uneingeschränkte, liebevolle Unterstützung im und über das Studium hinaus, sowie für die Motivation alle meine Ziele zu erreichen.