

Aus der
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. G. Steinhoff
der Universität Rostock



**Die Rolle von Toll-like-Rezeptor-2 und -4 für HMGB-1 induziertes *Rolling* und
Adhärenzverhalten von c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen im Mausmodell**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock
vorgelegt von
Ingeborg Westien
aus Potsdam

Rostock, den 25.02.2012



Tag der mündlichen Verteidigung: 18.12.2012

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Steinhoff

2. Gutachter: Prof. Dr. med. S. Schrepfer

3. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Vollmar

**What we know is a drop,
what we don't know is an ocean.**

(Sir Isaac Newton)

Meiner Familie...

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1 Einführung	5
2.2 Zielsetzung	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Isolation von c-kit ⁺ Zellen	13
2.2 FACS	14
2.3 Zellzahlbestimmung	16
2.4 Fluoreszenzmarkierung von c-kit ⁺ Zellen	17
2.5 Tiermodell	18
2.6 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	23
2.6.1 Hintergrund und Aufbau der IVM - Einheit	23
2.6.2 Fluoreszenzfarbstoffe	25
2.7 Real Time PCR	26
2.7.1 Grundlagen	26
2.7.2 RNA Isolierung	27
2.7.3 Reverse Transkription	28
2.7.4 Quantitative rt-PCR	29
2.8 Immunhistochemische Analysen	31
2.8.1 eNOS Bestimmung	31
2.8.2 SVEC	33
2.8.3 β 1-Integrin, P-Selectin und ICAM-1 Bestimmung	34

3. Ergebnisse	37
3.1 Reinheit isolierter c-kit ⁺ Zellen	37
3.2 c-kit ⁺ Zell-Endothel-Interaktionen in der Mikrozirkulation des M. cremaster	38
3.3 c-kit ⁺ <i>Rolling</i> nach HMGB-1 <i>Superfusion</i>	40
3.4 c-kit ⁺ Adhäsion nach HMGB-1 <i>Superfusion</i>	41
3.5 <i>Rolling</i> und Adhäsionsverhalten von WT c-kit ⁺ Zellen in TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Mäusen	42
3.6 <i>Rolling</i> und Adhäsionsverhalten von TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-c-kit ⁺ Zellen in WT-Mäusen	44
3.7 HMGB-1 vermittelte Expression von eNOS	46
3.8 HMGB-1 vermittelte Expression von P-Selektin	47
3.9 Entzündungsreaktion nach HMGB-1 <i>Superfusion</i>	48
3.10 HMGB-1 induzierte Adhäsionsmolekül Polarisation	49
4. Diskussion	52
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	57
7. Anhang	63

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
ASZ	Adulte Stammzelle
CD	Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen)
CFSE	Carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
ESZ	Embryonale Stammzelle
EPC	Endothelial progenitor cell (Endotheliale Vorläuferzelle)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward light scatter (Vorwärtsstreulicht)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HPF	High power field (Hauptgesichtsfeld)
HMGB-1	High mobility group box protein-1
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
ICAM-1	Inter-cellular adhesion molecule-1
IFM	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie
IVM	Intravitale Mikroskopie
M.	Musculus
MACS	Magnetic activated cell sorting
min	Minute

MSC	Mesenchymal stroma cell (Mesenchymale Stromazelle)
NaCl	Natriumchlorid
NO	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	real-time PCR (Echtzeit-PCR)
SSC	Side scatter (Seitwärtsstreulicht)
SDF-1 α	Stromal cell derived factor-1 α
SVEC	Simian virus endothel cells
SZ	Stammzelle
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TLR-2 (-/-)	Toll-like-Rezeptor 2 knockout
TLR-4 (-/-)	Toll-like-Rezeptor 4 knockout
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor - α
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
WSR	Wall shear rate (segmentaler Blutvolumenfluss)
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Einführung

In Deutschland wurden im Jahr 2010 41% aller Todesfälle durch Herzinfarkte oder andere Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursacht.¹

Obwohl sich die Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen in den meisten Industrieländern während der letzten Jahre rückläufig verhält, nehmen Inzidenz und Prävalenz der Herzinsuffizienz ständig zu [1]. In Europa leiden schätzungsweise 15 Millionen Menschen an einer chronischen Herzmuskelschwäche und es ist davon auszugehen, dass die Herzinsuffizienz zu einem der führenden Krankheitsbilder dieses Jahrhunderts wird [2].

Das endogene mitotische Potential von Kardiomyozyten geht postnatal größtenteils verloren. Daher ist eine direkte Schädigung der Herzmuskelzellen praktisch irreversibel, da ein adäquater Reparaturmechanismus fehlt. [3]. Die durch einen Herzinfarkt zugrunde gegangenen Zellen werden durch fibrotisches Gewebe ersetzt. Erreicht die so entstandene Narbe ein gewisses Ausmaß, führt sie zu einer Beeinträchtigung der Pumpleistung des Herzens und schließlich zu einer Herzinsuffizienz [4].

Aktuell besteht die Therapie der Herzinsuffizienz in dem Bemühen, das Fortschreiten derselben medikamentös zu verhindern oder zumindest zu verlangsamen. Die letzte therapeutische Möglichkeit im terminalen Stadium besteht oft in einer allogenen Herztransplantation. Dieser Eingriff ist allerdings mit schwerwiegenden Nebenwirkungen aufgrund der notwendigen immunsuppressiven Therapie und der Gefahr einer Host-versus-Graft-Disease verbunden.

Als neuer regenerativer Therapieansatz zur Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz, hat der therapeutische Einsatz von Stammzellen (SZ) immer mehr an Bedeutung gewonnen.



¹ Pressemitteilung Nr.354 vom 23.09.2011, Bundesamt für Statistik 2011

Stammzellen

Stammzellen zeichnen sich durch zwei besondere Eigenschaften aus: Sie können sich durch Zellteilung selbstständig erneuern und sie besitzen die Fähigkeit, sich bei Bedarf in reifere Nachkommen zu differenzieren. Je nach Art der Stammzellen haben sie das Potential, sich in jegliches Gewebe zu entwickeln. Durch asymmetrische Zellteilung entsteht einerseits eine weitere Stammzelle, andererseits eine determinierte Progenitorzelle (Vorläuferzelle). Diese kann sich über mehrere Teilungen in eine reife Zelle ausdifferenzieren. (Abb. 1).

Im menschlichen Körper sind Stammzellen in einer Vielzahl von Organen und Geweben an Umbau- und Regenerationsprozessen beteiligt [5]. Hierbei können sie in verschiedene Gruppen unterteilt werden, wie z.B. in embryonalen und adulten Stammzellen.

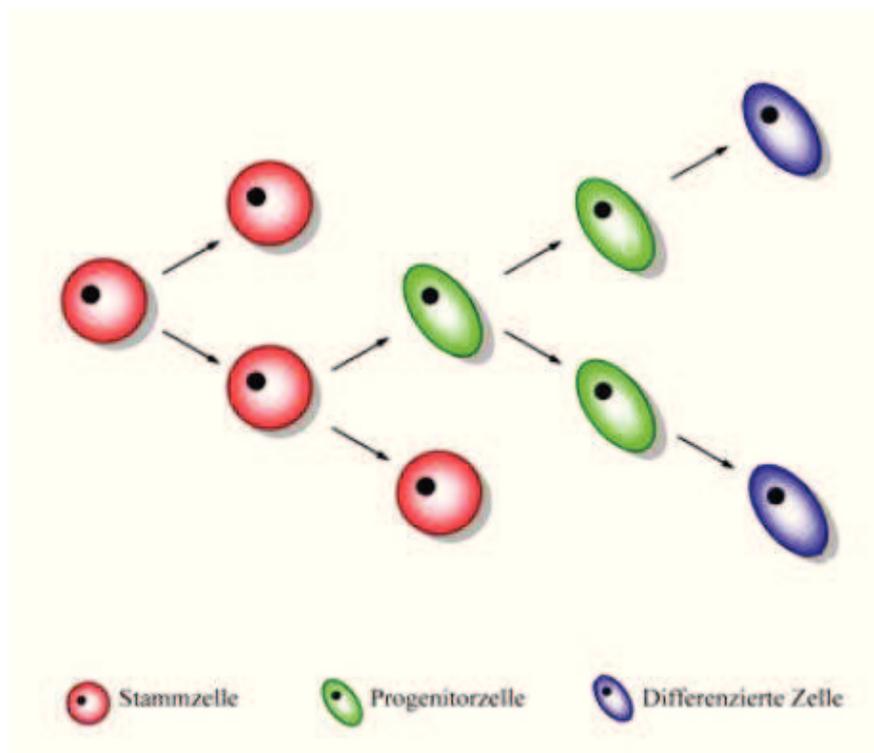


Abbildung 1: Stammzellteilung

Pluripotente embryonale Stammzellen (ESZ) können zu Zellen des Endoderms, Ektoderms, Mesoderms und der Keimbahn differenzieren. Somit sind sie theoretisch eine hervorragende Quelle für die Regeneration von Myokardgewebe. Der Einsatz von ESZ ist aber besonders durch ethische Bedenken limitiert. Daneben besteht auch eine potentiell immunogene und arrhythmogene Wirkung [6].

Adulte (somatische) Stammzellen (ASZ) besitzen ein eingeschränkte Differenzierungspotential und werden in mindestens drei verschiedene Subgruppen unterteilt: Die Stammzellen aus dem Knochenmark, der zirkulierenden Pool aus Stamm- und Progenitorzellen, sowie die gewebeständigen Stammzellen. Das Knochenmark wiederum beinhaltet hämatopoetischen Stammzellen (HSZ), sogenannten „side population“- Zellen, mesenchymale Stammzellen und multipotente adulte Progenitorzellen [7]. Hierbei sind hämatopoetische Stammzellen (HSZ) die am besten charakterisierten adulten Stammzellen. Sie bilden den Ausgangspunkt aller myeloiden und lymphoiden Zelltypen.

In den letzten Jahrzehnten haben sich HSZ in der Behandlung vieler hämatologischer Erkrankungen bewährt, wie z.B. Knochenmarktransplantationen bei Leukämiepatienten. Im Rahmen regenerativer Therapiekonzepte zur Behandlung eines chronischen Myokardschadens wurden bereits mehrere klinische Studien durchgeführt, in denen Stammzellen aus dem Knochenmark appliziert wurden. Hierbei zeigten sich ein Rückgang der Infarkt Narbe, eine Verbesserung der Ejektionsfraktion und ein verringertes linksventrikuläres endsystolisches Volumen. [8, 9, 10, 11]

Zur Differenzierung der Stammzelltypen werden verschiedene Oberflächenmarker genutzt. So werden beispielsweise verschiedene ‚Unterscheidungsgruppen‘ (Cluster of Differentiation; CD) beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmarker, die sich nach biochemischen und funktionellen Kriterien ordnen lassen. Für Stammzellen sind unter anderem CD133, CD34 und CD117 (c-kit) beschrieben [12]. C-kit ist ein in der Zellmembran vorkommendes Protein aus der Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen. Es wird vor allem in HSZ gebildet, kommt aber auch in anderen Zelllinien wie z.B. in multipotenten und myeloischen Progenitorzellen vor [13]. Es spielt weiterhin eine entscheidende Rolle bei der Proliferation von Stammzellen [14].

Rolling, Adhäsion und Transmigration

Die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut in entzündlich verändertes Gewebe ist unentbehrlich für die Entwicklung einer Immunantwort. Dieser Vorgang ist ein dynamischer, mehrstufiger Prozess, in dem die Leukozyten mit dem Endothel von postkapillaren Venolen interagieren. Am Ort der Entzündung werden von verschiedenen Zellen Zytokine produziert. Diese bewirken u.a. die Aktivierung des Endothels, welches daraufhin vermehrt Adhäsionsmoleküle exprimiert. Hierbei handelt es sich um membranständige Rezeptoren, die auf fast allen Zellen vorkommen und in drei Hauptgruppen unterteilt werden: Selektine, Integrine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie.

Der Prozess der Zell-Endothel-Interaktion kann in verschiedene Abschnitte unterteilt werden (Abb. 2), wobei an den einzelnen Schritten unterschiedliche Adhäsionsmoleküle beteiligt sind. Dieser Prozess ist in ähnlicher Weise auch für Stammzellen beschrieben worden [15].

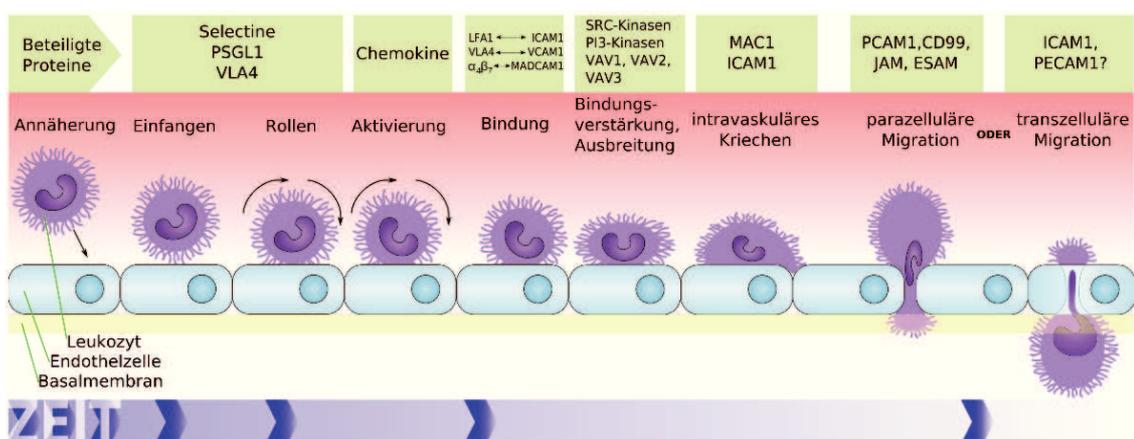


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Leukozytenmigration durch das Endothel

Nach einer Grafik von U. H. von Andrian und C. R. Mackay: T-Cell Function and Migration. In: NEJM. October 5th, 2000, S. 1025. Und K. Ley et al.: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. In: Nature Reviews Immunology 7, 2007; S. 679

Zu Beginn verlassen die Zellen den Blutstrom durch leichte molekulare Bindungen an das Endothel. Die Zellen werden dadurch abgebremst und es kommt zu einem Abrollen der Zellen an der Gefäßwand (*Rolling*). Diese beiden Prozesse werden hauptsächlich durch Selektine und deren Liganden vermittelt [16].

Die darauffolgende feste Adhäsion, als Voraussetzung für die anschließende Migration in das darunterliegende Gewebe, wird hauptsächlich durch Mitglieder der Integrin-Familie vermittelt. Aus dem Knochenmark stammende Stammzellen und endotheliale Progenitorzellen benötigen β 1- und β 2-Integrin für die Durchwanderung der endothelialen Barriere [17].

Die Transmigration, also die zelluläre Extravasation mit Durchwanderung der Endothelschicht in das benachbarte Gewebe, ist gegenwärtig Gegenstand intensiver Forschung. An diesem Prozess ist eine Vielzahl an Proteinen beteiligt. Beispielsweise PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1), für welches in *in vitro* Studien gezeigt wurde, dass es direkt an dem Prozess der Diapedese von neutrophilen Granulozyten und Monozyten beteiligt ist [18].

Homing

Die gegenwärtige Hypothese zur Organregeneration durch Stammzellen beinhaltet, dass es nach einer Myokardschädigung zu einer Wanderung von Stammzellen aus dem Knochenmark zum Herzen kommt. Dabei werden hämatopoetische Stammzellen aus ihrer Nische im Knochenmark, wo sie von Stromazellen umgeben sind, ausgeschüttet. Sie differenzieren zu endothelialen Progenitorzellen, zirkulieren im peripheren Blut und migrieren in Richtung des Schadens [19, 20]. Dort erfolgt die Einwanderung der Stammzellen in das geschädigte Myokard. Dieser Prozess wird als ‚*Homing*‘ bezeichnet.

Es hat sich gezeigt, dass der Chemokin-Rezeptor CXCR4 auf der Zellmembran der Stammzellen und sein Ligand stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) im myokardialen Zielgewebe essentiell für ein zielgerichtetes *Homing* sind [21, 22, 23].

In tierexperimentellen Studien fand sich nach Applikation von Knochenmark-Stammzellen eine verbesserte Neovaskularisation im Myokard. Zusätzlich konnten aufgrund dieser Behandlung die Pumpleistung und das Überleben verbessert werden [24, 25].

Chemokine

Chemokine sind lösliche Proteine die als Signalmoleküle (Lockstoffe) im Rahmen einer Gradienten-vermittelten Zielwanderung (Chemotaxis) von Leukozyten und Stammzellen wirken. Interleukine und eine Vielzahl anderer Chemokine weisen beispielsweise den Leukozyten chemotaktisch den Weg von der Gefäßwand zum Ort der Entzündung. Die Bedeutung von Chemokinen sowie einer lokalen Entzündungsreaktion für das Wandern und *Homing* von Leukozyten, Progenitor- und Stammzellen zu geschädigtem Gewebe ist mehrfach aufgezeigt worden [15, 26].

HMGB-1

In den 70er Jahren wurde das Protein High Mobility Group Box1 (HMGB-1), auch als Amphoterin bezeichnet, erstmals beschrieben. [27]. 1991 wurden die ersten Strukturanalysen an HMGB-1 durchgeführt [28]. Nach intensiver Forschung wurden Sequenzabschnitte identifiziert, welche proinflammatorische Eigenschaften vermitteln und welche an den Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) binden [29, 30]. HMGB-1 ist ein in hohem Grade konserviertes, universell vorkommendes Kernprotein [31]. Es wird bei Nekrose, jedoch nicht bei Apoptose, in den extrazellulären Raum sezerniert. Dort ruft es eine entzündliche Reaktion hervor. Monozyten werden zur TNF- α -Sekretion stimuliert und weitere Leukozyten zum Ort der Nekrose geleitet [32]. Weiterhin wird HMGB-1 von Zellen nach inflammatorischer Aktivierung ausgeschüttet. Im Extrazellularraum wirkt es als chemischer Lockstoff für Entzündungszellen, Zellen der glatten Muskulatur und Stammzellen [33, 34].

Ferner wurde gezeigt, dass HMGB-1 das Integrin-abhängige *Homing* von endothelialen Progenitorzellen verstärkt [35]. Darüber hinaus induziert HMGB-1 die Migration von Mesoangioblasten durch einschichtiges Endothel *in vitro*. *In vivo* fungiert es als Signalstoff, welcher sowohl Mesoangioblasten als auch Stammzellen des Knochenmarks anlockt [36]. Zusätzlich bewirkt HMGB-1 in Endothelzellen eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 [37].

In einem Mausmodell führte exogen zugefügtes HMGB-1 nach induziertem Myokardinfarkt zu einer Verbesserung der links ventrikulären Funktion durch Regeneration von Kardiomyozyten aus lokalen kardialen c-kit⁺ Stammzellen [38]. Dies lässt vermuten, dass HMGB-1 auch eine funktionelle Relevanz im Rahmen einer stammzellvermittelten kardialen Regeneration besitzt.

Rezeptoren

Für HMGB-1 sind, wie in Abbildung 3 dargestellt, verschiedene Rezeptoren beschrieben, wobei RAGE als erster beschrieben wurde [39]. RAGE ist ein Multiligandrezeptor, welcher auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Nervenzellen, dendritischen Zellen, T-Zellen und Monozyten/Makrophagen exprimiert wird [40, 41]. Strukturanalysen zeigten allerdings, dass die proinflammatorische Sequenz von HMGB-1 nicht mit der RAGE-bindenden Sequenz übereinstimmt [30]. Daraufhin wurde erkannt, dass HMGB-1 auch an Toll-Like-Rezeptor (TLR) -2 und -4 bindet [42].

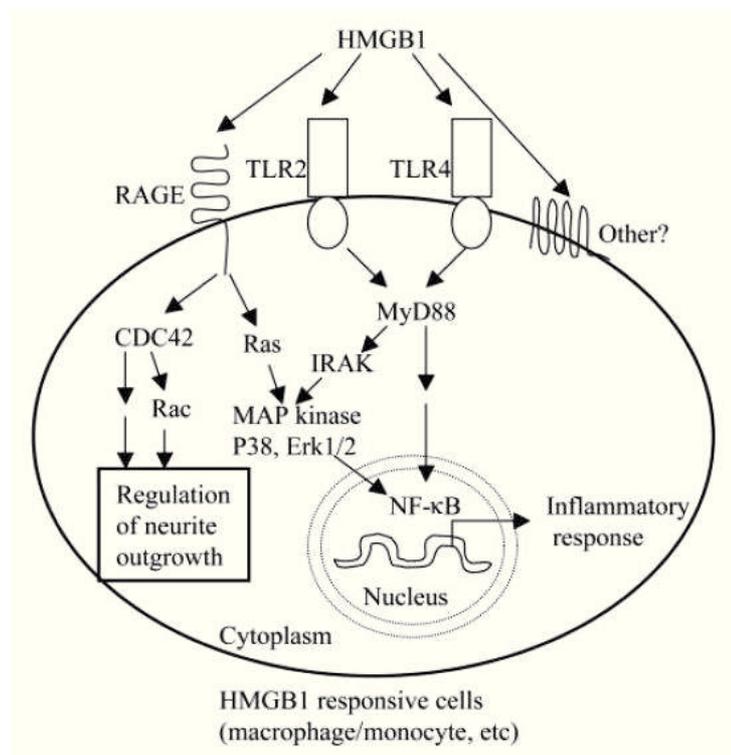


Abbildung 3: HMGB1 Rezeptoren und deren Signaltransduktion

nach Yang et al. [Yang, H., Wang, H., Czura, C. J. and Tracey, K. J., The cytokine activity of HMGB1. J Leukoc Biol 2005. 78: 1-8.]

Der Rezeptor 'Toll' wurde 1984 in der *Drosophila melanogaster* entdeckt [43]. Einige Jahre später wurden in Säugetieren Homologe von 'Toll', die sogenannten 'Toll-like-Rezeptoren' entdeckt [44]. Diese Familie der Rezeptoren umfasst im humanen System bisher 11 Mitglieder [45]. Sie werden auf verschiedenen Zelltypen des Immunsystems exprimiert [46].

2011 erhielten die drei Immunologen Bruce Beutler, Jules Hoffmann und Ralph M. Steinmann den Nobelpreis für Physiologie und Medizin. Hoffmann entdeckte die Bedeutung des Toll-Gens für das Immunsystem der Fruchtfliege. Beutler fand heraus, dass Toll-like-Rezeptormoleküle für die Erkennung bestimmter bakterieller Produkte notwendig sind. Beispielsweise kommt es nach Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren zu einer vermehrten Herstellung diverser Zytokine, wie IL-1, -6, -8, -12 und TNF [47].

1.2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit HMGB-1 die Interaktionen zwischen $c\text{-kit}^+$ Knochenmark-Stammzellen und dem Endothel in der Mikrozirkulation des *M. cremaster* der Maus zu regulieren vermag. Weiterhin wurde betrachtet welche Rolle Toll-like-Rezeptor-2 und -4 hierbei spielen. Hierzu wurden *in vivo* das *Rolling* und Adhärenzverhalten zwischen $c\text{-kit}^+$ -Zellen und Endothel unter Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie (IFM) untersucht. Zusätzlich wurde evaluiert, ob HMGB-1 die Adhäsionsmolekül-Umverteilung auf endothelialen Zelloberflächen *in vitro* beeinflusst.

2 Materialien und Methoden

2.1 Isolation von c-kit⁺ Zellen

Murine hämatopoetische Knochenmarksstammzellen, welche den Oberflächenmarker c-kit (CD117) exprimieren, wurden aus Wildtyp-, TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)- Mäusen isoliert. Die Zellen wurden unter Verwendung magnetischer MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland), welche mit monoklonalen anti-c-kit Antikörpern beschichtet sind, isoliert.

Vor Beginn der Isolation wurde die entsprechende Spendermaus betäubt und anschließend durch Genickbruch geopfert. Daraufhin wurden die Humeri, Femura und Tibiae freipräpariert und durch Deartikulation aus dem Körper herausgelöst. Nach weiterer Reinigung der Knochen mittels Pinzette erfolgte die Entfernung der proximalen und distalen Knochenenden. Durch eine 26 G Nadel wurde gekühlter PBS-Puffer (PBS + EDTA 0,1%) in ein Ende des Knochens gespritzt und so das Knochenmark herausgespült. Dieses wurde in einer Petrischale aufgefangen und durch mehrfaches, vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in eine homogene Zellsuspension überführt. Um etwaige Zellklumpen zu entfernen wurde die Lösung anschließend durch einen 30 µm Nylonfilter (Pre-Seperation Filter, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) gegeben. Daraufhin wurde die Suspension durch Zugabe von PBS-Puffer und Zentrifugation (300×g, 10 min, 4°C) gewaschen. Anschließend wurde der flüssige Überstand abgetrennt und verworfen. Nach Durchmischung des Niederschlags mit 1 ml PBS-Puffer wurde hieraus die Zellzahl bestimmt (siehe 2.3). Im Anschluss wurden weitere 9 ml PBS-Puffer zu dem Gemisch gegeben und erneut zentrifugiert (300×g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde wiederum verworfen und zu dem Niederschlag jeweils 80 µl PBS-Puffer und 20 µl CD117 MicroBeads je 10⁷ Zellen gegeben. Nach gründlicher Durchmischung inkubierte die Lösung für 15 Minuten bei 4° C.

Hierdurch konnten die monoklonalen Antikörper an die c-kit Rezeptoren der Stammzellen binden.

Zu den fertig inkubierten Zellen wurde 1 ml PBS-Puffer je 10⁷ Zellen gegeben, um sie mittels nochmaliger Zentrifugation bei 300 x g für 10 min bei 4° C zu waschen. Nach Entfernung des Überstandes wurde zu den Zellen 500 µl PBS-Puffer hinzugegeben und die gut durchmischte Lösung im magnetischen Feld des MACS Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) weiterverarbeitet. Hierzu wurde eine MS

MACS column (Säule; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) in das magnetische Feld des MACS Separator eingesetzt und zusätzlich mit einem angefeuchteten 30 µm Nylonfilter ausgestattet.

Zur Vorbereitung der Säule wurden 500 µl PBS-Puffer zur Anfeuchtung verwendet. Anschließend wurde die Zellsuspension in die Säule eingebracht. Die ungebundenen Zellen flossen durch die Säule, wohingegen die magnetisch markierten im Magnetfeld gehalten wurden. Durch dreimaliges Waschen mit 500 µl PBS-Puffer wurde sichergestellt, dass der Hauptteil der unmarkierten Zellen entfernt wurde. Um die hämatopoetischen Stammzellen aus der Säule herauszulösen, wurde diese auf ein passendes Gefäß gebracht und mit einem Milliliter PBS-Puffer kräftig durchgespült. Um die Reinheit des Zellgemisches zu erhöhen, wurde der Separationsvorgang am MACS Separator mit einer zweiten vorbereiteten Säule wiederholt. Im Anschluss wurde die Zellzahl bestimmt und die Reinheit mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

2.2 FACS

Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) ist eine durchflusszytometrische Analysemethode, welche die gleichzeitige Bestimmung verschiedener Zellparameter in einer Zellpopulation ermöglicht. Die Zellen werden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern inkubiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom nacheinander an einem Laserstrahl vorbei geleitet (siehe Abb.4). Hierbei interagieren die Zellen mit dem einfallenden Lichtstrahl, wobei allein die Richtung des Lichtes verändert wird, jedoch nicht die Wellenlänge. Die Streuung wird von Zellgröße, Oberflächenstruktur und intrazellulären Bestandteilen beeinflusst. Das Licht wird nicht gleichmäßig gestreut. Der größte Anteil, der ein Maß für die Zellgröße darstellt, wird in die Vorwärtsrichtung (forward light scatter; FSC) gelenkt. Als Seitwärtsstreulicht (side scatter; SSC) wird dasjenige Licht bezeichnet, welches im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut wird. Dieses hängt überwiegend von der intrazellulären Granularität ab. Die entstehende Lichtstreuung sowie die emittierte Fluoreszenz werden von Detektoren aufgenommen und verrechnet. Somit lassen sich Aussagen über die Zellgröße, die Granularität und die an der Zelloberfläche markierten Strukturen treffen.

Es wurden mindestens 10 000 Ereignisse pro Probe aufgezeichnet und SSC sowie Fluoreszenzdaten logarithmisch registriert.

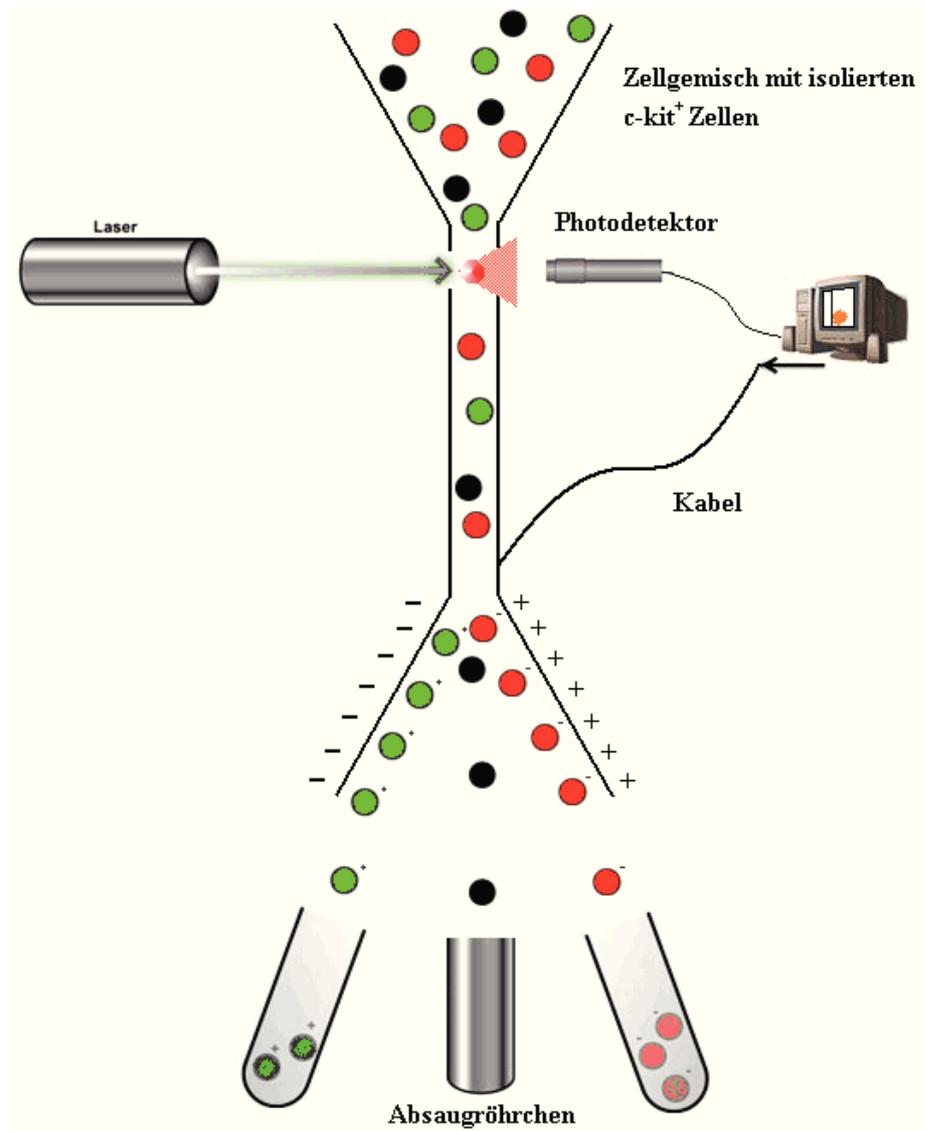


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Strahlengangs durch ein FACS-Gerät

2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl sowie –vitalität wurden mittels Trypanblaufärbung untersucht. Der Farbstoff markiert nur tote Zellkörper, da er in vitale Zellen aufgrund der intakten Zellmembran nicht eindringen kann.

Um die gewünschte Zellzahl zu ermitteln, wurden 50 μl der zu bestimmenden Probe entnommen. Diese wurde in einem Gefäß mit 50 μl Trypanblau vermengt und ein Teil des Gemisches in eine Neubauer Zählkammer gefüllt. Anschließend wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop (10x Objektiv) gezählt. Es wurden die ungefärbten (lebenden) Zellen der fünf 4x4 Quadrate bestimmt (Abb. 5).

Mit der Formel $n:5 \times 2 \times 10^4$ konnte danach die Zellzahl der Suspension bestimmt werden. Hierbei stellt n die Gesamtzahl der Zellen aus den fünf Zählfeldern dar. Somit lässt sich der Mittelwert der Zellen pro Feld bestimmen. Durch die Multiplikation mit 2 wird der Grad der Verdünnung in die Formel mit einbezogen. 10^4 stellt einen konstanten Faktor dar, der sich aus der Größe der Zählkammer ergibt.

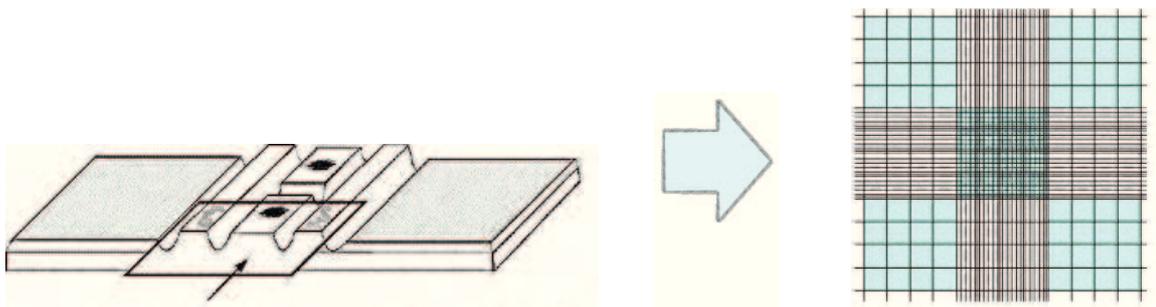


Abbildung 5: Neubauer Zählkammer

Seitenansicht der Neubauer Zählkammer und Ansicht bei Blick durch ein Lichtmikroskop

2.4 Fluoreszenzmarkierung von c-kit⁺ Zellen

Zur Markierung der isolierten c-kit⁺-Knochenmark-Stammzellen wurde Carboxy Fluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (Vybrant[®] CFDA SE; Invitrogen) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen nicht-fluoreszierenden Farbstoff, der während der Inkubation mit der Zellsuspension über Diffusion ins Zytoplasma gelangt. Dort wird dieser durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert und dadurch in einen fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt. Hierdurch wird eine Detektion der markierten Zellen über einen Zeitraum von mehreren Tagen möglich. Geschätzte Fluoreszenz Exzitation/Emission Maxima: 492/517 nm, nach Hydrolyse (gemäß Angaben des Herstellers).

Ein Milliliter PBS-Puffer wurde mit 2 µl CFDA SE versetzt. Nach Durchmischung wurde die Probe zum Schutz vor Licht in Aluminiumfolie gewickelt und für 10 Minuten bei 37 ° C inkubiert. Währenddessen wurde die gewünschte Menge an isolierten c-kit⁺ Zellen herangezogen und bei 500 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der entstandene Niederschlag mit der angewärmten CFDA SE Probe gründlich vermischt. Erneut wurde das Gefäß mit Aluminiumfolie umwickelt und für 15 Minuten bei 37 ° C inkubiert. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und ein Milliliter warmer PBS-Puffer hinzugefügt und durchmischt. Durch erneute Zentrifugation wurde die Zelllösung gewaschen und ungebundenes CFDA SE mit dem Überstand verworfen. Der Niederschlag wurde mit dem gewünschten Endvolumen von 300 µl PBS-Puffer vermengt und für weitere 30 Minuten lichtgeschützt aufbewahrt, um eine vollständige Modifikation der Probe zu gewährleisten. Daraufhin wurden die markierten Stammzellen im Rahmen der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie weiterverwendet.

2.5 Tiermodell

Versuchsaufbau

Das *Rolling* und Adhärenzverhalten von hämatopoetische c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen im peripheren Gewebe, in Abhängigkeit einer lokalen Behandlung mit HMGB-1, wurde mit Hilfe der intravitralen Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Hierzu wurde das vaskuläre Verhalten arteriell injizierter Stammzellen in der Mikrozirkulation des M. cremaster der Maus betrachtet. Die Analysen von *Rolling* und Adhäsion wurden analog zu den Stammzellen auch für endogene Leukozyten durchgeführt. Zum einen wurden c-kit⁺ Zellen aus WT-Mäusen isoliert und anschließend TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Mäusen verabreicht. Andererseits wurden Knochenmark-Stammzellen aus TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Mäusen isoliert und deren *Rolling* und Adhärenzverhalten in WT-Mäusen analysiert.

Nach der Präparation des M. cremaster wurden die Mäuse der WT-Gruppe entweder mit 200 µl HMGB-1 (400 ng/ml in PBS-Puffer; HMGBiotech), oder 200 µl erhitztem HMGB-1 (400 ng/ml in PBS-Puffer; für 15 min gekocht) behandelt. Das Gemisch wurde direkt auf den Muskel gegeben. Dieser Vorgang wird im folgenden als ‚*Superfusion*‘ bezeichnet. Die Gruppen der operierten TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Mäuse wurden allein mit 200 µl HMGB-1 (400ng/ml in PBS-Puffer) behandelt. Zur Beurteilung der Stammzell- und Leukozytenmigration wurde einerseits direkt nach der Injektion der Anteil der rollenden Zellen bestimmt. Andererseits wurde nach 45 Minuten das Ausmaß der festen Adhärenz der Zellen am Endothel quantifiziert. Ein Zellverhalten entlang dem Endothel wurde dann als *Rolling* angesehen, wenn es zu einer um mehr als 50%igen Reduktion der Zellflußgeschwindigkeit kam. Zusätzlich musste dies in Verbindung mit dem typischen zellularen ‚*Sticking*‘ und nachfolgendem erneuten Weiterrollen auftreten. ‚*Sticking*‘ bezeichnet den Vorgang, der eine Adhäsion höherer Affinität beschreibt.

Um die gleichen Versuchsbedingungen in den einzelnen Gruppen zu gewährleisten, wurden verschiedene mikrohämodynamische Parameter, wie beispielsweise der Gefäßdurchmesser, die Blutflussgeschwindigkeit und der segmentale Blutvolumenfluss bestimmt. Die Blutflussgeschwindigkeit wurde anhand der 'Line-Shift-Diagramm-Methode' (CapImage Software, Zeintl, Heidelberg, Deutschland) in Video-Aufzeichnungen der Mikrozirkulation verifiziert. Die Durchblutung des M. cremaster wurde während der intravitralen Mikroskopie (IVM) aufgezeichnet. Unter Verwendung

der gewonnenen Parameter Gefäßdurchmesser und Blutflussgeschwindigkeit wurde ebenfalls der segmentale Blutvolumenfluss (wall shear rate; WSR) errechnet.

Zur Berechnung des segmentalen Blutflusses wurde folgende Formel herangezogen:

$$WSR = \gamma = (8 \times v)/d$$

(d: Durchmesser; v: Fließgeschwindigkeit, gemäß Baker-Wayland durch 1,6 dividiert [48])

Die Konstante von 1,6 geht auf Studien an Glasröhren zurück, in denen gezeigt werden konnte, dass die zentrale Fließgeschwindigkeit höhere Werte messen lässt als am Randstrom der Röhre [48].

Nach Durchführung der IVM-Analysen wurde die operierte Maus geopfert, der M. cremaster entfernt und geteilt. Eine Hälfte des Muskels wurde in 4%igem Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet, um ihn für spätere histologische Untersuchungen zu konservieren. Die andere Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei -70 °C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt für real-time PCR Analysen herangezogen.

Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz und nach Genehmigung durch die lokalen Behörden durchgeführt (Tierversuchsvorhaben LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-029/07). Alle verwendeten Versuchstiere wurden aus den Jackson Laboratorien (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

Den Großteil der Versuchstiere stellten männliche Mäuse der Linie C57BL/6J dar (Kurzbezeichnungen: wildtype; WT). Diese wurden auch für die Kontrollgruppe herangezogen. Eine weitere Gruppe bestand aus männlichen Tieren der Linie B6.129-Tlr2Tm1kir/j. Diese Tiere zeichnen sich durch eine homozygote Mutation des Toll-like-Rezeptor-2 Gens aus (Kurzbezeichnungen: TLR-2 knock-out; TLR-2 (-/-)). Eine dritte Gruppe wurde aus männlichen Mäusen der Linie C3H/HeJ (Tlr4(LPS-del)) gebildet. Diese Linie ist durch eine Spontanmutation des Toll-like-Rezeptor-4 Gens charakterisiert (Kurzbezeichnungen: TLR-4 knock-out, TLR-4 (-/-)).

Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Versuche 6-12 Wochen alt und wogen 20-25 g. Bis zu dem jeweiligen Experiment wurden sie entsprechend der Richtlinien des deutschen

Tierschutzgesetzes bei freiem Zugang zu Trockenfutter und Wasser bei einem 12-stündigem Hell-Dunkelrhythmus in der Zentralen Tierhaltung am Institut für Experimentelle Chirurgie, Rostock gehalten.

Materialien

OP-Tisch, beheizbar

Operationsbesteck, bestehend aus:

1 Nachstarschere nach Vannas 8 mm; gerade

1 Mikro-Federschere, 120 mm gebogen

1 Mikroskopierpinzette, gebogen; 130 mm; AESCULAP

1 Nagelhautschere, 90 mm gebogen, extrafein

1 Mikro-Pinzette, Uhrmacher, 110 mm

1 Anatomische Pinzette, sehr fein, 115 mm

1 Chirurgische Pinzette

1 Knüpfpinzette Geb. Maul 0,3 mm 150 mm

1 Mikro-Nadelhalter, 160 mm, gebogen

3 Gewebeklemmen, nach Kocher

Thermokauter

Prolene (Polypropylene) Nahtmaterial; nicht resorbierbar; Ethicon

Kanülen: 18 und 26 Gauge; Becton Dickinson Microlance

1 ml Spritzen; Typ Omnifix; Braun

Die Instrumente wurden von der Firma Krauth und Timmermann bezogen.

Operation

Zur Intravitalmikroskopie der Mikrozirkulation wurde der rechte Musculus cremaster nach der Methode von Baez mit kleineren Modifikationen präpariert [49]. Dieses Modell wurde initial anhand von Ratten etabliert. Es wurde von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. med. Vollmar, Institut für experimentelle Chirurgie, Universität Rostock, auf Mäuse übertragen [50].

Durch intraperitoneale Injektion von Ketamin (Ketanest, 75 mg/kg) und Xylazin (Rompun, 25 mg/kg) wurde bei den Versuchstieren die Narkose eingeleitet. Nach Eintritt der Anästhesie wurden der linke Oberschenkel sowie das rechte Skrotum mit einem Einmalrasierer enthaart und anschließend mit Alkohol (75%) desinfiziert. Zur Sicherung der Atmung wurde die Zunge luxiert. Daraufhin wurde die Maus in Rückenlage auf einem Präparationstisch aus Plexiglas (Spezialanfertigung des Institutes für experimentelle Chirurgie, Universität Rostock) fixiert. Um eine Stabilisierung der Körpertemperatur zu gewährleisten, wurde der Präparationstisch auf eine erwärmte Heizplatte (37° C) gelegt und dort die Operation durchgeführt (Abb. 6).

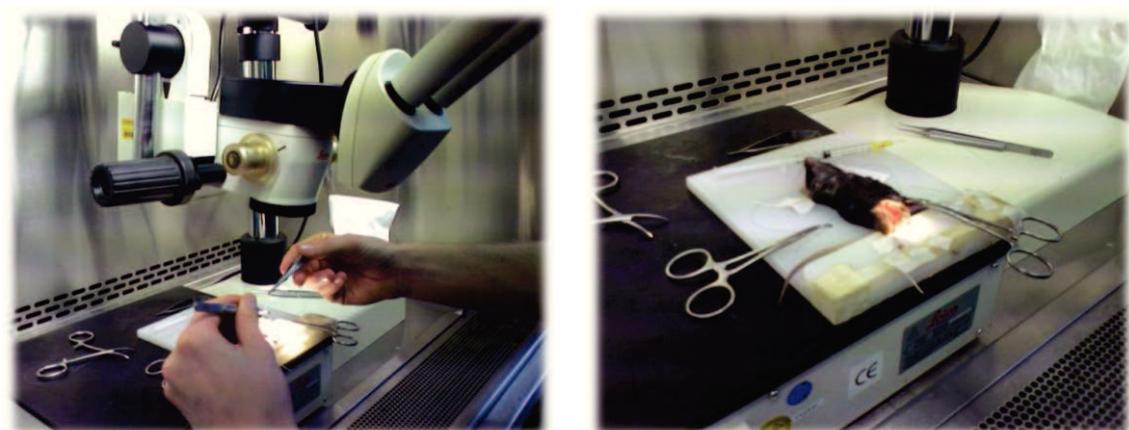


Abbildung 6: Präparation des M. cremaster der Maus

Zu Beginn der Operation wurde die Haut im anatomischen Verlauf der linken A. femoralis entfernt. Mit Hilfe eines Operationsmikroskops erfolgte die Freilegung des Gefäßes bis in die Inguinalregion. Abgehende Seitenäste der Arterie wurden mit einem Thermokauter ligiert. Um den Blutfluss vorübergehend zu unterbinden, wurde das Gefäß proximal durch den Zug eines Fadens abgeknickt. Daraufhin wurde in den distalen Anteil der Arterie ein Polypropylenkatheter (Portex non sterile Polythen Tubing 0.28mm ID, SIMS Portex, UK) eingeführt und fixiert. Nach Inzision des rechten Skrotums in der Mittellinie wurde der M. cremaster an seinem distalen Ende dargestellt. An der Spitze des Muskelsackes wurde ein atraumatischer Faden (Prolene[®], 7-0) eingebracht, über den der M. Cremaster horizontal aufgespannt wurde. Mit einer Mikroschere wurde der Muskelsack unter Schonung der muskeleigenen Gefäßarkaden von kaudal nach kranial eröffnet. Die Seitenränder des nun flächig aufliegenden Muskels wurden mit fünf weiteren Nähten aufgespannt (Abb. 7). Während der chirurgischen Präparation sowie im gesamten Versuchsverlauf wurde der Muskel mit angewärmter Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl) superfundiert.

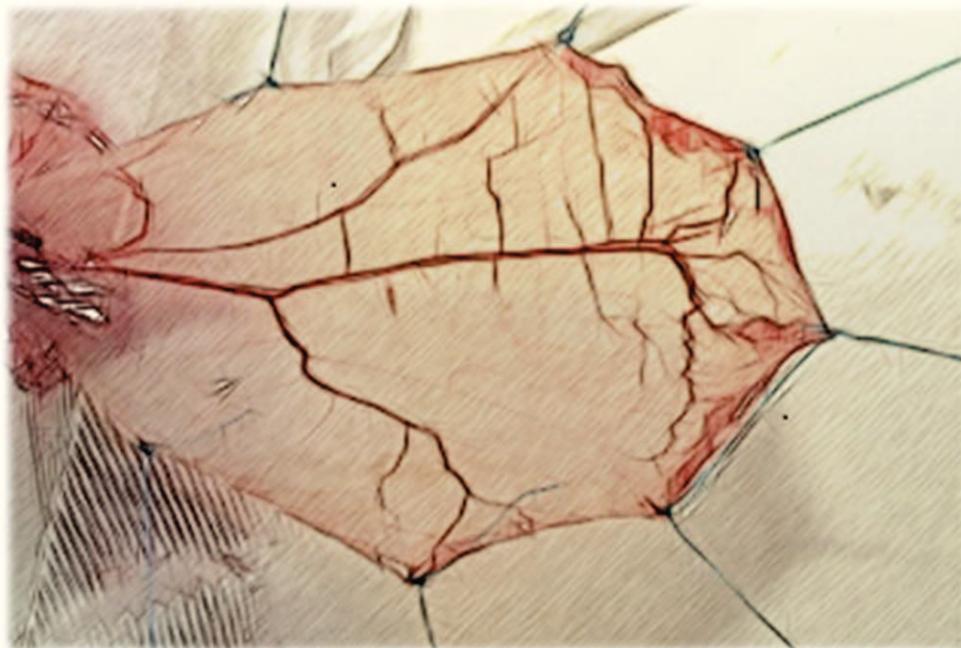


Abbildung 7: Präparierter und aufgespannter M. cremaster während der IVM

2.6 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

2.6.1 Hintergrund und Aufbau der intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie. Durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge werden fluoreszierende Stoffe angeregt. Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht eine direkte und wiederholbare Untersuchung von Geweben *in vivo* mit einer quantitativen Analyse der Mikrozirkulation und deren Veränderungen [51]. Es lässt sich dadurch das Verhalten von Leukozyten im Blutgefäßsystem, insbesondere die Adhäsion an Endothelzellen, beobachten und beurteilen [52, 53].

Zur Beobachtung der Mikrozirkulation des M. Cremaster wurde ein Axiotech vario Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock verwendet. Die Durchleuchtung erfolgte mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberlampe als Anregungslichtquelle. Die Beleuchtungsintensität wurde zunächst durch einen Hitzefilter reduziert. Anschließend passierte das Licht einen von zwei austauschbaren Filterblöcken. Diese erlaubten eine Blau-Anregung (Exzitation: 450 – 490 nm) für die Darstellung des Blutplasmas und eine Grün-Anregung (Exzitation: 530 – 560 nm) zur Darstellung der Leukozyten. Zur zusätzlichen Schonung des Muskelpräparates wurde die Beleuchtung in den Versuchspausen unterbrochen. Die Betrachtung des Gefäßsystems wurde anfangs mit einem Objektiv mit einer 10-fachen Vergrößerung durchgeführt. Für die Beobachtung der c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (Achromplanx20/0.5W, Zeiss) mit 20-facher Vergrößerung verwendet. Das Gefäßbett konnte einerseits direkt durch das Mikroskop betrachtet werden, andererseits wurde es über eine Videokamera (FK-6990-IQ-S; Pieper, Schwerte, Deutschland) auf einen Monitor übertragen. Für spätere Analysen wurden die Versuche mit einem Videorekorder aufgezeichnet (Abb. 8)

Die Lagerung der Versuchstiere während der intravitale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte auf einem beweglichen Mikroskopiertisch. Alle Experimente wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von 21-23 °C durchgeführt.

Vor der c-kit⁺ Knochenmark-Stammzell-Injektion wurden 6 postkapillare Venolen als Ort der Zell-Adhäsions-Analysen nach dem Zufallsprinzip ausgesucht. Entsprechend der einzelnen Gruppen wurden der M. cremaster mit erhitztem oder aktiven HMGB-1 15 Minuten vor der Stammzell-Injektion behandelt. In insgesamt fünf Injektionen wurden jeweils 4×10^6 c-kit⁺ Zellen verabreicht. Anschließend wurde das *Rolling* und Adhärenzverhalten der Stammzellen und beurteilt. Die Zahl ‚rollender‘ Zellen wurden als Prozentsatz aller vorbeifließenden c-kit⁺ Zellen in einem bestimmten Gefäßabschnitt ausgedrückt. Die Beobachtungszeit dieses vorher festgelegten Gefäßabschnittes betrug 1 Minute. Zellen die für mehr als 30 Sekunden am Endothel hafteten, wurden als fest adhären angesehen. Um die Anzahl an fest adhären c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen zu berechnen, wurde sie in Bezug zur endothelialen Oberfläche gesetzt (Durchmesser x Länge x π). Die Analysen von *Rolling* und Adhäsion wurden analog zu Stammzellen auch für endogene Leukozyten in WT-Mäusen durchgeführt. Die Untersuchungen mittels IVM wurden von zwei Untersuchern durchgeführt, die bezüglich der Behandlung verblindet waren.

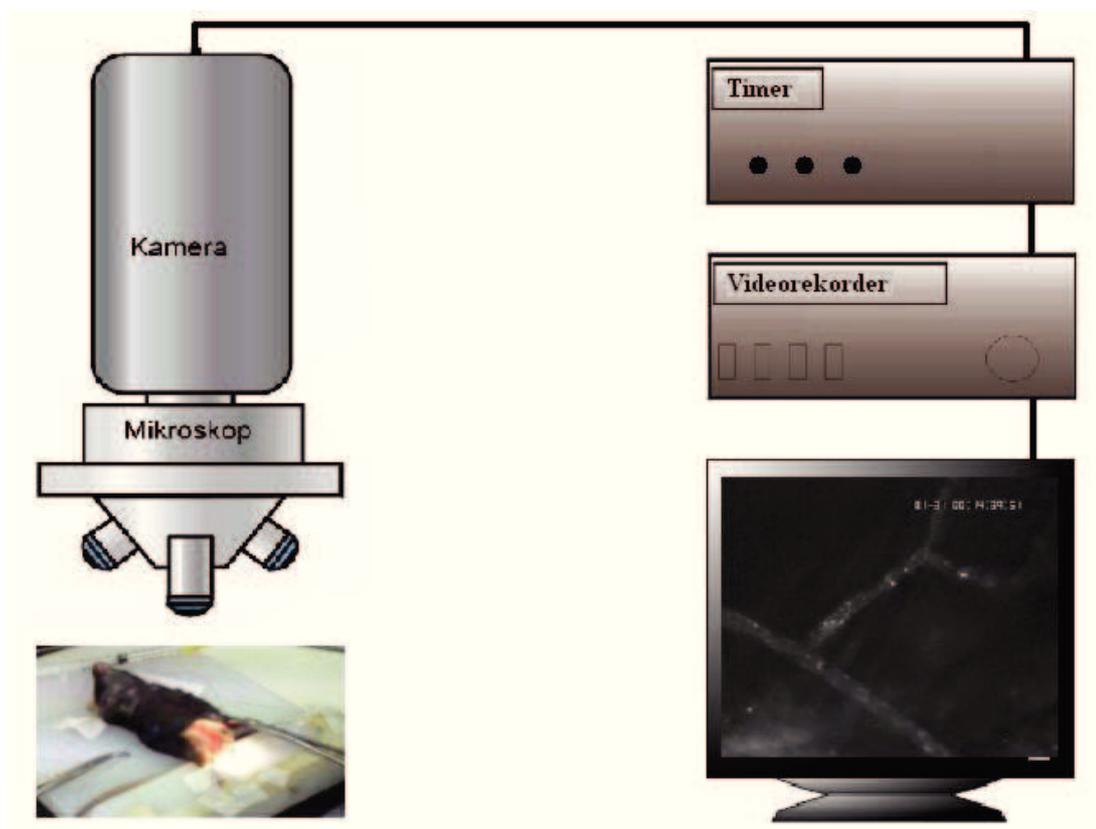


Abbildung 8: Schematischer Aufbau des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes

2.6.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Da Blutplasma, Endothelzellen und Leukozyten keine ausreichende Eigenfluoreszenz aufweisen, wurden Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt.

Bei Bestrahlung des Farbstoffes werden Lichtquanten absorbiert und führen so zur Anregung von Elektronen (Exzitation). Versiegt die Lichtquelle, so fallen die Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau ab und setzen Energie in Form von Strahlung frei (Emission). Somit ermöglichen Fluoreszenzfarbstoffe die Markierung von bestimmten Zellarten. Dabei wird die Bildqualität *in vivo* durch Kontrastierung verbessert [54]. Zur Markierung der injizierten c-kit⁺ Stammzellen wurde CFSE eingesetzt.

FITC-Dextran

Der Plasmamarker Fluoreszein-Iso-Thio-Cyanat (FITC) ist an Dextran irreversibel gebunden (FITC-Dextran). Es handelt sich um einen wasserlöslichen Stoff, welcher nur sehr geringe Interaktionen mit Proteinen eingeht und gut toleriert wird [55]. FITC erhöht den Kontrast zwischen Intra- und Extravasalraum, da es nicht aus intakten Gefäßen diffundieren kann [56, 57]. Der Farbstoff wird durch Licht mit der Wellenlänge von $\lambda = 490$ nm (blauer Bereich) angeregt und fluoresziert im grünen Bereich mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 520$ nm.

Rhodamin 6 G

Rhodamine zählen zu der Gruppe der Xanthen-Farbstoffe und reichern sich in den Mitochondrien von Leukozyten an. Um auch Aussagen über die Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel treffen zu können, wurde der Farbstoff verabreicht. Hierdurch war eine direkte Darstellung von Leukozyten möglich [52].

Der Farbstoff wird durch Licht mit der Wellenlänge von $\lambda = 500 - 550$ nm (grüner Bereich) angeregt und fluoresziert im roten Bereich mit einem Emissionsmaximum bei $\lambda = 555$ nm.

2.7 Real-time PCR des M. Cremaster

2.7.1 Grundlagen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode von DNA. Die Doppelstränge werden mittels Denaturierung in Einzelstränge gespalten. Anschließend werden jeweils zwei Primer, DNA-Polymerase und Desoxynukleotidtriphosphate zu dem Gemisch hinzugegeben. So werden neue definierte DNA-Stränge synthetisiert. Durch Wiederholung können weitere Syntheszyklen durchgeführt werden, wobei bei jedem Durchgang die Zahl der DNA-Stränge verdoppelt wird.

Da die Amplifikationseffizienz bei jeder PCR-Reaktion verschieden ist, kann sie nur schwer nachvollzogen werden. Diese Überprüfung entfällt, wenn die gebildete DNA-Menge während der PCR im Behältnis gemessen werden kann. Das ist bei der real-time PCR (rt-PCR) mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen möglich. Bei der rt-PCR-TaqMan-Methode befindet sich zusätzlich noch eine Sonde im Reaktionsgemisch. Diese ist mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, welche zwischen den beiden Primern liegen. Wenn diese beiden Fluoreszenzfarbstoffe in enger Beziehung zueinander liegen, wird nach Anregung durch einen Laser die Energie des einen auf den anderen Farbstoff übertragen. Während der PCR werden die Fluorochrome räumlich voneinander getrennt und es kann kein Energietransfer mehr stattfinden. Auf diese Weise wird die Fluoreszenz der Farbstoffe nur dann messbar, wenn die Polymerase tatsächlich den gewünschten DNA-Strang kopiert hat. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Zyklus wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung der PCR vorgenommen.

2.7.2 RNA Isolierung

Für Analysen der mRNA Level wurden aus den jeweiligen Versuchsgruppen jeweils 6 Cremaster-Muskel-Hälften verwendet. Um die Gesamt-RNA aus den Gewebestücken zu isolieren, wurde die Single-Step-Methode nach Chomczynski und Sacchi mit Hilfe des TRIZOL[®]-Reagenz (Invitrogen) angewandt [58]. Zu Beginn der Isolierung wurde das entsprechende gefrorene Gewebestück mittels Mörser pulverisiert. Zu dem Gewebestaub wurde 1 ml TRIZOL[®] gegeben und durch Pipettieren in eine homogene Suspension überführt. TRIZOL[®] besteht aus einem Phenol-Guanidinisothiocyanat-Gemisch, welches die Zellen eröffnet und Zellkomponenten löst, ohne dass die RNA gespalten wird. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und anschließend für 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Nach einer weiteren dreiminütigen Inkubationszeit wurde der Inhalt 10 Minuten bei 12 000 g und 4°C zentrifugiert. Hierdurch trennte sich die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase, wobei die RNA ausschließlich in der wässrigen Phase verbleibt. Diese wurde dann vorsichtig abgezogen und in einem neuen Gefäß mit 500 µl Isopropanol vermennt, welches zur Ausfällung der RNA führt. Nach einer zehnminütigen Inkubation wurde das Gemisch nochmals 10 Minuten bei 12 000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde der entstandene Niederschlag mit 1 ml 75% Ethanol zum Waschen vermennt und bei 7 500 g für 5 Minuten bei 4°C nochmals abzentrifugiert. Der Überstand an Ethanol wurde abgesaugt und der Niederschlag bei Raumtemperatur angetrocknet. Zum Schluss wurde dieser in 12 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und dann für 10 min bei 55°C inkubiert.

Die Qualität der isolierten RNA wurde mit Hilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop[™] 1000) anhand der optischen Dichte (OD) beurteilt. Dazu wurde der Quotient aus OD_{260nm}/OD_{280nm} bestimmt. Die ermittelten Werte lagen bei einem Maximalwert von 2 nicht unter 1,8. Somit konnten grobe DNA-Kontaminationen und eine Degradation der RNA ausgeschlossen werden.

Anschließend wurden die so gewonnenen Proben bei -70°C eingefroren.

2.7.3 Reverse Transkription

Voraussetzung für den Nachweis von RNA aus Untersuchungsmaterial mittels rt-PCR ist die Transkription der RNA in die komplementäre DNA (c-DNA). Dies geschieht mit sequenzspezifischen Primern, die an der gesuchten RNA binden. Zusätzlich wird eine reverse Transkriptase oder ein Enzym, das reverse Transkriptase-Aktivität besitzt, benötigt. Diesen Vorgang nennt man reverse Transkription. Die daraus resultierende c-DNA wird in der anschließenden PCR amplifiziert.

Die gewonnene mRNA wurde mit dem SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden in einem nukleasefreien Gefäß 1 µg RNA mit 1 µl 50 µM Oligo(dT)₂₀ Primern versetzt. Nach Zugabe von 1 µl 10 mM dNTP Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf 13 µl aufgefüllt und für 5 min bei 65°C denaturiert. Zu dieser Lösung wurden auf Eis 4 µl 5x First-Strand Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 1 µl RNaseOUT (40 U/µl) und 1 µl Superscript III RT (200 U/µl) zugegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei 25°C erfolgte die reverse Transkription bei 50°C für 60 min. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min auf 75°C erhitzt. Die erzeugte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.7.4 Die quantitative Real-Time-Polymerase- Kettenreaktion

Die synthetisierte cDNA wurde zur Amplifizierung mittels PCR genutzt. Die real-time PCR erfolgte in einem TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) mit dem StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Als Primer wurde Selectin, Thrombozyen Ligand (p-Selectin) - Mm01204601_m1 (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) verwendet.

Die TaqMan Universal Master Mix Reagenzien sind zur Detektion der cDNA-Sequenz der Probe bei darauf abgestimmten Primern optimal geeignet. Durch die im Master Mix enthaltenen Enzyme wird die Möglichkeit einer Reamplifizierung verhindert. Die Durchführung der rt-PCR erfolgte mit 10 µl TaqMan Universal Master Mix, 1 µl Primer, 2 µl cDNA (10 ng cDNA) und 7 µl nukleasefreiem Wasser. Dieses Gemisch wurde bei 50 °C für 2 min inkubiert. Anschließend wurde es zur Aktivierung der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase bei 95 °C für 10 Minuten erneut inkubiert. Es folgten weitere 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95 °C und zuletzt ein Durchlauf bei 60 °C für eine Minute. Jedes DNA Extrakt wurde dreifach analysiert und in jeder Untersuchung eine Negativkontrolle verwendet.

Als Referenz-Gen wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) herangezogen. Hierbei handelt es sich um ein Enzym der Glykolyse welches unentbehrlich für den Organismus ist. Man benötigt ein Referenz-Gen, da beim Pipettieren nie die exakt gleiche Menge DNA in die nachfolgende Reaktion gegeben wird. Diese Ungenauigkeiten der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA müssen ausgeglichen werden, was als ‚Normalisierung‘ bezeichnet wird.

Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wurde der C_T-Wert (Threshold Cycle = Schwellenwert-Zyklus) verwendet. Dieser Wert beschreibt denjenigen Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Für jede Probe wurde der C_T-Wert von der StepOne™ Software 2.0 (Applied Biosystems) bestimmt. Die Normalisierung der Zielgene gegen GAPDH wurde unter Verwendung folgender Formel durchgeführt:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ GAPDH}}$$

Aus den dreifach berechneten ΔC_T -Werten jeder Probe wurde der Durchschnittswert bestimmt. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Nach der Normalisierung wurde die Differenz der ΔC_T -Werte zwischen den zu vergleichenden Proben gebildet, der $\Delta\Delta C_T$ -Wert:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ sample}} - \Delta C_{T \text{ calibrator sample}}$$

Als ‚calibrator sample‘ wurde die Kontroll-Gruppe herangezogen.

Die Unterschiede in der Genexpression nach HMGB-1 Behandlung wurden mit folgender Formel berechnet [59]:

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

2.8 Immunhistochemische Analysen

Immunhistochemische Verfahren haben seit der Verwendung von Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, deutlich an Bedeutung gewonnen [60]. Im Gewebe vorhandene Antigene können mit spezifischen Primärantikörpern identifiziert werden. An diese binden in einer zweiten Reaktion Sekundärantikörper, welche an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Dieser kann anschließend fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden.

2.8.1 eNOS Immunfluoreszenzbestimmung nach HMGB-1 Vorbehandlung

Die Immunhistologie wurde unter Verwendung von Gewebeproben (M. cremaster) durchgeführt, welche im Rahmen der Operationen gewonnen und in Paraffin eingebettet wurden. Die Untersuchung zielte auf die Verteilung der eNOS (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase). Nach der Herstellung von 5 µm dicken Schnitten und dem Aufziehen auf Objektträger erfolgte zunächst die Entparaffinierung der Gewebsschnitte.

Entparaffinierung

- Erstes Entparaffinieren: 30 min bei 70°C
- 2 mal jeweils 5 min in Xylol
- 1 mal 3 min in Xylol
- 2 mal jeweils 1 min in 100 % Ethanol
- 1 mal 1 min in 95 % Ethanol
- 1 mal 1 min in 80 % Ethanol
- 1 mal 1 min in Aqua dest.

Anschließend wurden die Schnitte vorbehandelt und immunhistochemisch bearbeitet. Dabei wurde folgendes Protokoll angewendet:

Vorbehandlung:

Die Andauung erfolgte durch 30 minütiges Kochen auf einer Heizplatte bei 130 °C mit Citratpuffer (Verdünnung: 1:25)

Blockierung der endogenen Peroxidasen

- 1 mal 15 min mit PBS-Puffer spülen
- 1 mal 10 min mit Peroxidaseblock-Reagenz (Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland)
- 2 mal 5 min mit PBS-Puffer spülen

Erhöhung der Gewebeporosität

- 1 mal 30 min mit 2NHCl inkubieren
- 1 mal 20 min mit 0,1 % Triton-X-100 (Sigma, Steinheim, Deutschland) in PBS-Puffer
- 1 mal 5 min mit PBS-Puffer spülen

Protein-Blockierung und Antikörperbehandlung

- 1 mal 10 min Proteinblock-Reagenz (Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland)
- Inkubation mit Primär-Antikörper (eNOS Maus-Anti-Maus, Becton, Dickson; Konzentration: 5 µg/ml; Inkubationszeit: über Nacht bei 4 °C)
- 3 mal 5 min mit PBS-Puffer spülen
- Inkubation mit Sekundär-Antikörper (Esel-Anti-Maus, mit Alexa 488 konjugiert, Becton, Dickson; Konzentration: 5 µg/ml ; Inkubationszeit: 2 Stunden bei RT)
- 3 mal 15 min mit PBS-Puffer spülen
- Inkubation mit TOPRO-3 (Invitrogen; Verdünnung: 1:200; Inkubationszeit 20 min bei RT)
- 3 mal 5 min mit PBS-Puffer spülen
- Einbettung, Abdeckung und Versiegelung der Schnitte (FluorSaveTM, Calbiochem)

Die angegebenen Antikörper wurden mit einem speziellen Antikörperlösungs-Reagenz verdünnt (DAKO; Antibody Diluent with Background reducing components).

Für jede Färbung wurde zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindungen eine Negativkontrolle angefertigt. Hierzu wurden die entsprechenden Schnitte lediglich mit dem Sekundär-Antikörper ohne Verwendung des Primär-Antikörpers inkubiert.

Zur Detektion von eNOS im Gefäßendothel des M. cremaster wurden die Gewebeschnitte mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops (Leica TCS SPE) analysiert.

2.8.2 SVEC

Simian Virus Endothel Zellen (SVEC) sind endotheliale Zellen axillärer Lymphknotengefäße von virustransformierten Mäusen. Die Zellen sind durch das Simian-Virus 40 immortalisiert. SVEC Zellen exprimieren diverse Adhäsionsmoleküle. Ihre Verdopplungsrate liegt zwischen 24 und 36 Stunden. Trotz der Transformation mit dem Virus lassen sich die Zellen mit normalen Endothelzellen vergleichen [61].

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5%igem CO₂ Luftgemisch. Als Medium wurde eine Kombination aus 89% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; ATTC: 30-2002), 10% Horse Serum Heat Inactivated (PAA: B15-122) und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet. Alle Zellversuche wurden unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

Um die HMGB-1 vermittelte Endothelaktivierung zu untersuchen, wurden die SVEC Zellen mit dem Chemokin behandelt. Hierbei wurden besonders Expressionsveränderungen bzw. Umverteilungen von Adhäsionsmolekülen betrachtet. Die Auswirkungen der Vorbehandlung mit HMGB-1 wurden mit der Aktivität anderer bekannter Chemokine, wie beispielsweise Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Stromal Derived Faktor-1 α (SDF-1 α) verglichen.

2.8.3 Immunfluoreszenzanalysen von β 1-Integrin-, P-Selectin- und ICAM-1-Motilität auf SVEC Membran nach HMGB-1 Vorbehandlung

Um die endotheliale Antwort auf HMGB-1 Behandlung *in vitro* nachzuahmen, wurden SVEC mit aktivem oder erhitztem HMGB-1 für 15 Minuten inkubiert. TNF- α (200 U/ml; R& D-Systeme, Minneapolis, MN, USA) oder SDF-1 α (100 ng/ml; R& D-Systeme) wurden als Kontroll-Chemokine verwendet.

Nach der Behandlung mit dem Chemokin wurden die Zellen mittels Cytospin (550 rct für 5 min) auf Objektträger aufgebracht. Anschließend folgte die immunhistologische Färbung der Zellen, welche nach folgendem Protokoll durchgeführt wurde:

Fixierung und Protein-Blockierung

- 1 mal 5 min mit PBS-Puffer spülen
- Fixierung mit 1% PFA (Paraformaldehyd)
- 2 mal 5 min mit PBS-Puffer spülen
- 1 mal 10 min Proteinblock-Reagenz (Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland)

Protein-Blockierung und Antikörperbehandlung

- Inkubation mit Primär-Antikörper (Tab. 1) über Nacht bei 4 °C
- 3 mal 5 min mit PBS-Puffer spülen
- Inkubation mit Sekundär-Antikörper (Ziege-Anti-Hamstermit Alexa 488 konjugiert, Molecular Probes; Konzentration: 5 μ g/ml ; Inkubationszeit: 2 Stunden bei RT)
- 3 mal 5 min mit PBS-Puffer spülen
- Inkubation mit TOPRO-3 (Invitrogen; Verdünnung: 1:200; Inkubationszeit 20 min bei RT)
- 3 mal 5 min mit PBS-Puffer spülen
- Einbettung, Abdeckung und Versiegelung der Schnitte (FluorSaveTM, Calbiochem)

Die angegebenen Antikörper wurden mit einem speziellen Antikörperlösungs-Reagenz verdünnt (DAKO; Antibody Diluent with Background reducing components).

Für jede Färbung wurde zum Ausschluss unspezifischer Antikörperbindungen eine Negativkontrolle angefertigt. Hierzu wurden die entsprechenden Zellen lediglich mit dem Sekundär-Antikörper ohne Verwendung des Primär-Antikörpers inkubiert.

Zur Detektion der Adhäsionsmoleküle wurden die SVEC Zellen mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops (Leica TCS SPE) analysiert.

Die Anzahlen von SVEC Zellen, die β -Integrin, P-Selectin oder ICAM-1 Polarisation aufwiesen, wurden in 20 zufällig ausgewählten Hauptgesichtsfeldern (high-power fields; HPFs; 630-fache Vergrößerung) bestimmt. Die Resultate wurden in Zellen pro HPF ausgedrückt. Alle morphometrischen Analysen wurden von zwei Untersuchern durchgeführt, die gegenüber der Behandlung verblindet waren.

Primäre Antikörper	Konzentration	Wirtsspezies	Hersteller
P-Selectin	10 $\mu\text{g/ml}$	Ratte	Becton, Dickinson
β 1-Integrin	5 $\mu\text{g/ml}$	Hamster	Becton, Dickinson
ICAM-1	5 $\mu\text{g/ml}$	Hamster	Becton, Dickinson
Sekundäre Antikörper			
Alexa 488	5 $\mu\text{g/ml}$	Ziege	Molecular Probes

Tabelle 1: Verwendete Primär-Antikörper

Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen wurden unter Verwendung der Sigma Stat Software Version 3.0 durchgeführt (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Sämtliche Werte wurden als arithmetische Mittelwerte zusammen mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. SEM errechnet sich aus der Standardabweichung geteilt durch die Quadratwurzel der Fallzahl (n) der Stichprobe. Vergleiche der einzelnen Gruppen wurden unter Verwendung einfaktorieller Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Erkannte die ANOVA eine signifikante Varianz, wurde als Post-hoc-Analyse ein Holm-Sidak-Test durchgeführt, um die Varianz einzelner Gruppen untereinander weiter zu untersuchen. Fiel der Test auf Normalverteilung negativ aus, wurde zum Vergleich mehrerer Gruppen eine Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis sowie als post-hoc-Analyse ein Dunn-Test durchgeführt. P-Werte <0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Reinheit isolierter c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen

Die Reinheit der isolierten c-kit⁺ Stammzellen war durchwegs höher als 95% (Abb. 9).

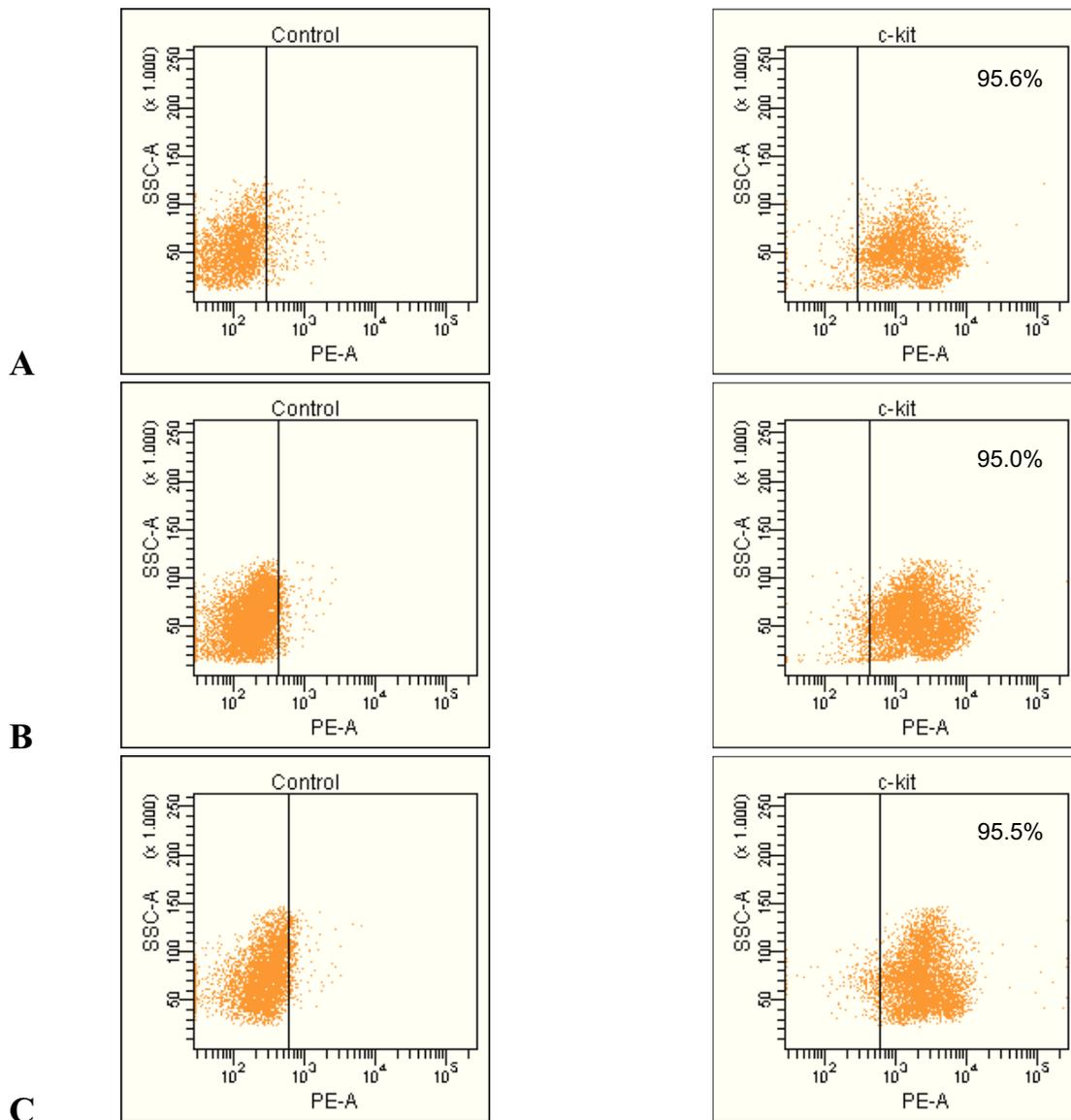


Abbildung 9: FACS Analysen der Reinheit von c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen aus WT-, TLR-2 (-/-) und TLR-4 (-/-)-Mäusen

A, c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen aus Wildtyp Mäusen

B, c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen aus TLR-2 knock-out Mäusen

C, c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen aus TLR-4 knock-out Mäusen

3.2 Quantifizierung der Interaktionen zwischen c-kit⁺ Stammzellen und Endothel in der Mikrozirkulation des M. cremaster

Anhand der intravitalen Mikroskopie wurden die Interaktionen zwischen den injizierten c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen und dem Endothel betrachtet. Insgesamt waren Interaktionen zwischen den Stammzellen und der Gefäßwand ein seltenes Ereignis. Beobachtete Interaktionen traten fast ausschließlich in den postkapillaren Venolen (Durchmesser: 40-80 µm) des M. cremaster auf. C-kit⁺ Zellkontakte mit dem Endothel entstanden in einem unterschiedlichen Umfang in den jeweiligen experimentellen Gruppen. Als Reaktion auf eine HMGB-1 *Superfusion* konnten in den betrachteten Venolen sowohl *Rolling* als auch feste Adhärenz der c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen eindeutig gezeigt werden (Abb. 10).

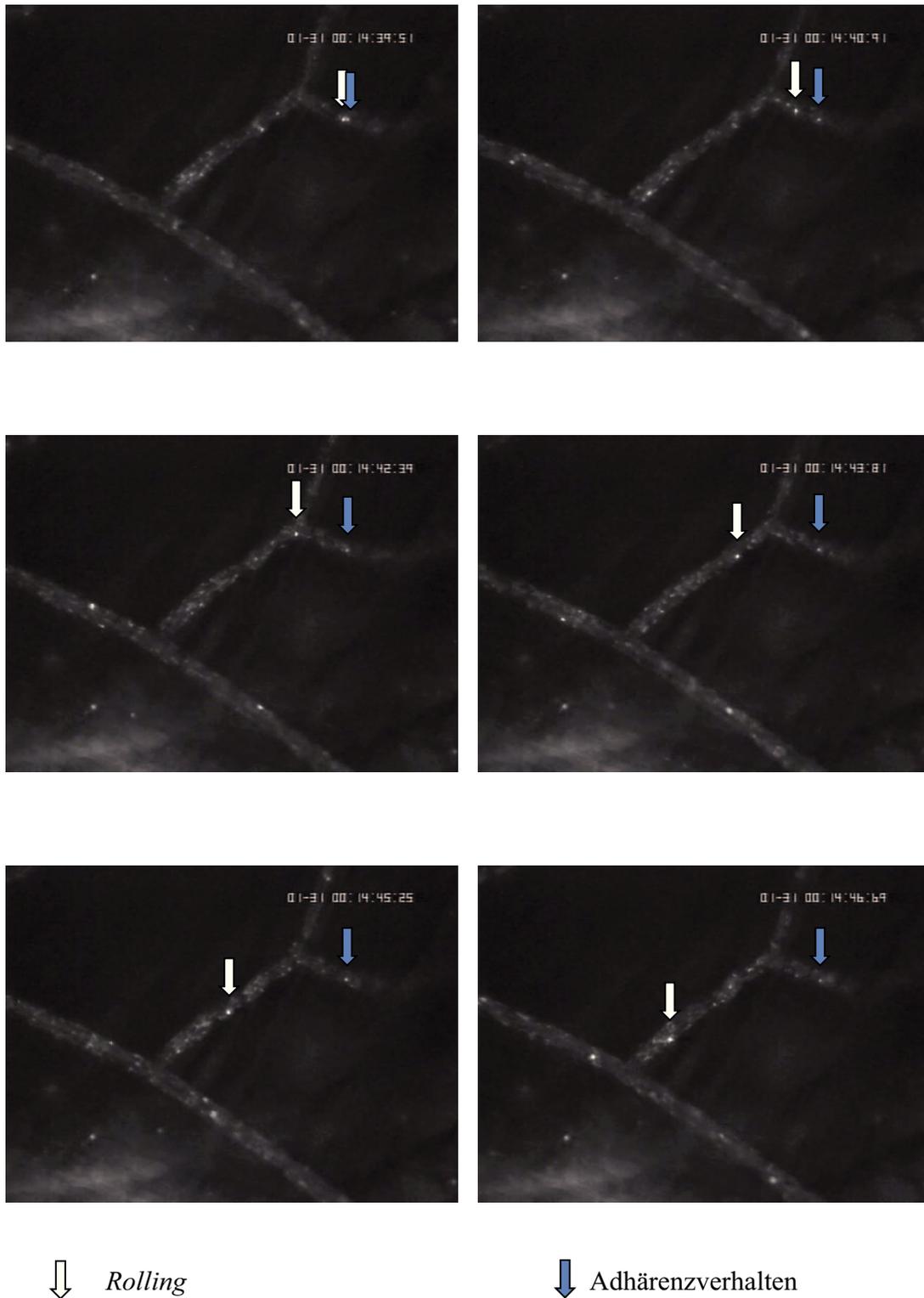


Abbildung 10: Quantifizierung des HMGB-1 vermittelten c-kit⁺ Rollings und Adhärenzverhaltens nach lokaler *Superfusion* mit HMGB-1 in der Mikrozirkulation des *M. cremaster*
 Repräsentative Bilder der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie von rollenden und fest adhärenen c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen

3.3 Quantifizierung des endothelialen *Rollings* der c-kit⁺ Knochenmark-Stammzelle *in vivo* nach lokaler HMGB-1 *Superfusion*

In vivo wurden rollende c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen unter Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie quantitativ bestimmt. In den mit erhitztem HMGB-1 superfundierten Muskeln (Kontroll-Gruppe), betrug der Anteil der rollenden c-kit⁺ Zellen $9.9 \pm 3.2\%$. Dahingegen zeigte sich nach lokaler Zugabe von aktivem HMGB-1 eine Zunahme der rollenden c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen, die um mehr als das Dreifache erhöht war ($32.4 \pm 7.1\%$ in der HMGB-1-Gruppe gegenüber $9.9 \pm 3.2\%$ in der Kontroll-Gruppe, $P < 0.05$) (Abb. 11).

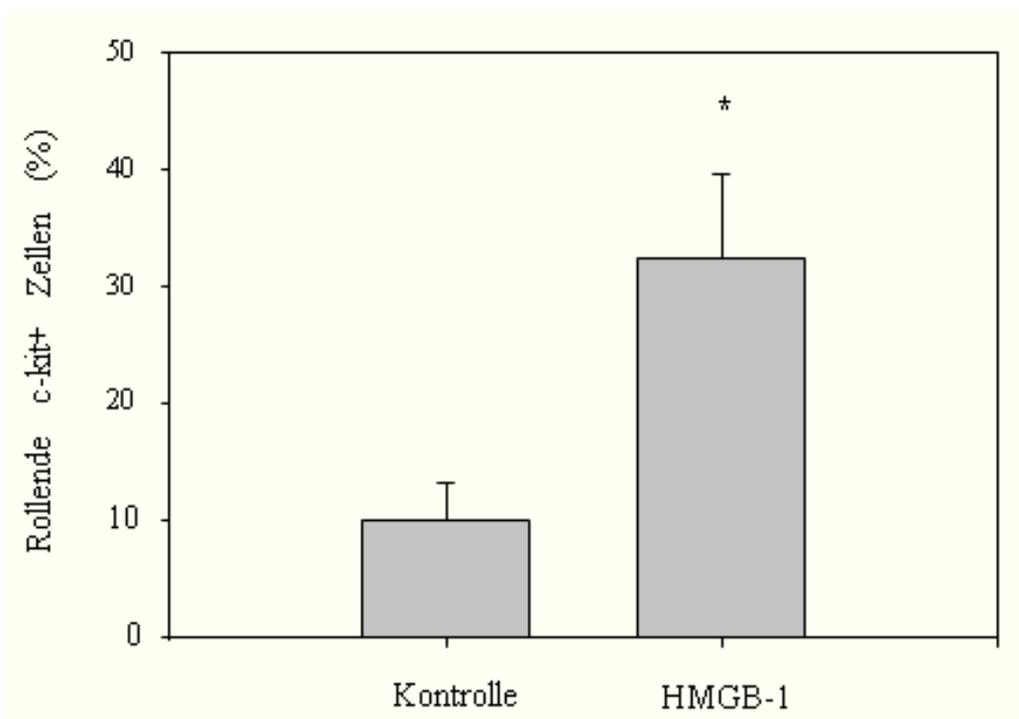


Abbildung 11: Quantifizierung des HMGB-1 vermittelten c-kit⁺ *Rollings* nach lokaler *Superfusion* mit HMGB-1 in der Mikrozirkulation des M. cremaster basierend auf intravitalmikroskopischem Bildmaterial

Anteil der rollenden c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen in der Kontroll- und HMGB-1-Gruppe. (* $P < 0.05$ vs. Kontrollgruppe).

3.4 Quantifizierung der HMGB-1 vermittelten festen endothelialen Adhäsion der c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen *in vivo*

Die Menge der fest adhärenen c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen nach *Superfusion* des M. cremaster mit erhitztem HMGB-1 (Kontroll-Gruppe) betrug 1.1±1.0 Zellen/mm². Als Auswirkung auf die Behandlung mit dem aktiven Chemokin war die Zahl fest adhärenen c-kit⁺ Zellen erheblich höher als in der jeweiligen Kontrollgruppe (c-kit⁺ Zell-Adhäsion: 14.6±5.1 Zellen/mm² in der HMGB-1-Gruppe gegenüber 1.1±1.0 Zellen/mm² in der Kontroll-Gruppe, $P<0.05$). Tatsächlich überstieg die Stammzelladhäsion nach Gewebearregung mit HMGB-1 die der unbehandelten Kontrollmäuse um mehr als das 13fache (Abb. 12).

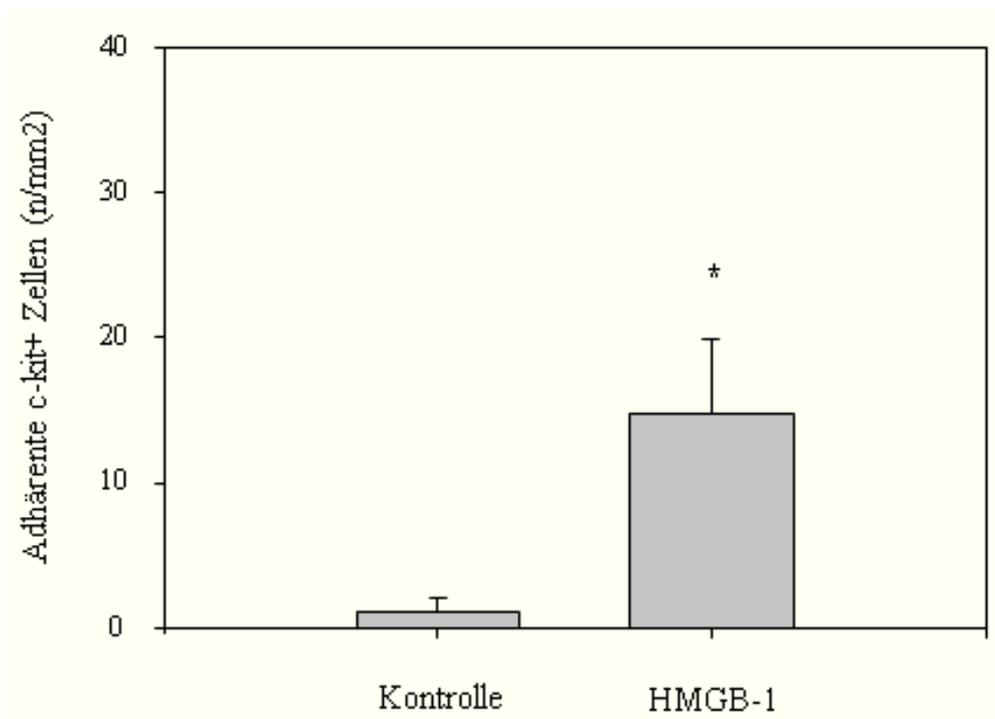


Abbildung 12: Quantifizierung des HMGB-1 vermittelten c-kit⁺ Adhärenzverhalten nach lokaler *Superfusion* mit HMGB-1 in der Mikrozirkulation des M. cremaster basierend auf intravitalmikroskopischem Bildmaterial

Anzahl der adhärenen c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen in der Kontroll- und HMGB-1-Gruppe (* $P < 0.05$ vs. Kontrollgruppe).

3.5 Quantifizierung des HMGB-1 vermittelten *Rollings* und der festen Adhäsion von WT c-kit⁺ Stammzellen in TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Mäusen

Um die Rolle von Toll-like-Rezeptor-2 und -4 in dem HMGB-1 vermittelten endothelialen Adhäsionsverhalten der c-kit⁺ Zellen zu untersuchen, wurden weitere Versuche durchgeführt. Nach Anregung mit HMGB-1 wurden hierzu die Interaktionen zwischen Endothel und c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen aus WT Mäusen in TLR-2- und in TLR-4 knock-out Mäusen *in vivo* untersucht. In den TLR-2 (-/-) und TLR-4 (-/-) Mäusen unterschied sich der Anteil an rollenden Zellen nach lokaler HMGB-1 Behandlung nicht signifikant von der Kontroll-Gruppe (c-kit⁺ *Rolling*: 8.8±3.9% in der TLR-2 (-/-)-Gruppe und 3.1±1.6% in der TLR-4 (-/-)-Gruppe gegenüber 9± 3.2% in der Kontroll-Gruppe, $P= 0.3$). Im Gegensatz zu den WT-Mäusen induzierte die lokale *Superfusion* des M. cremaster mit aktivem HMGB-1 in den TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Mäusen kein *Rolling* (Abb. 13A). Die Anzahl der fest adhärenen c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen war im Vergleich zu den WT-Mäusen nach einer lokalen HMGB-1 Behandlung in den TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Tieren eindeutig verringert (c-kit⁺ Zell-Adhäsion: 1.5±1.4 Zellen/mm² in der TLR-2 (-/-)-Gruppe und 2.4±1.4 Zellen/mm² in der TLR-4 (-/-)-Gruppe gegenüber 14.6±5.1 Zellen/mm² in der HMGB-1-Gruppe, $P<0.05$) (Abb. 13B).

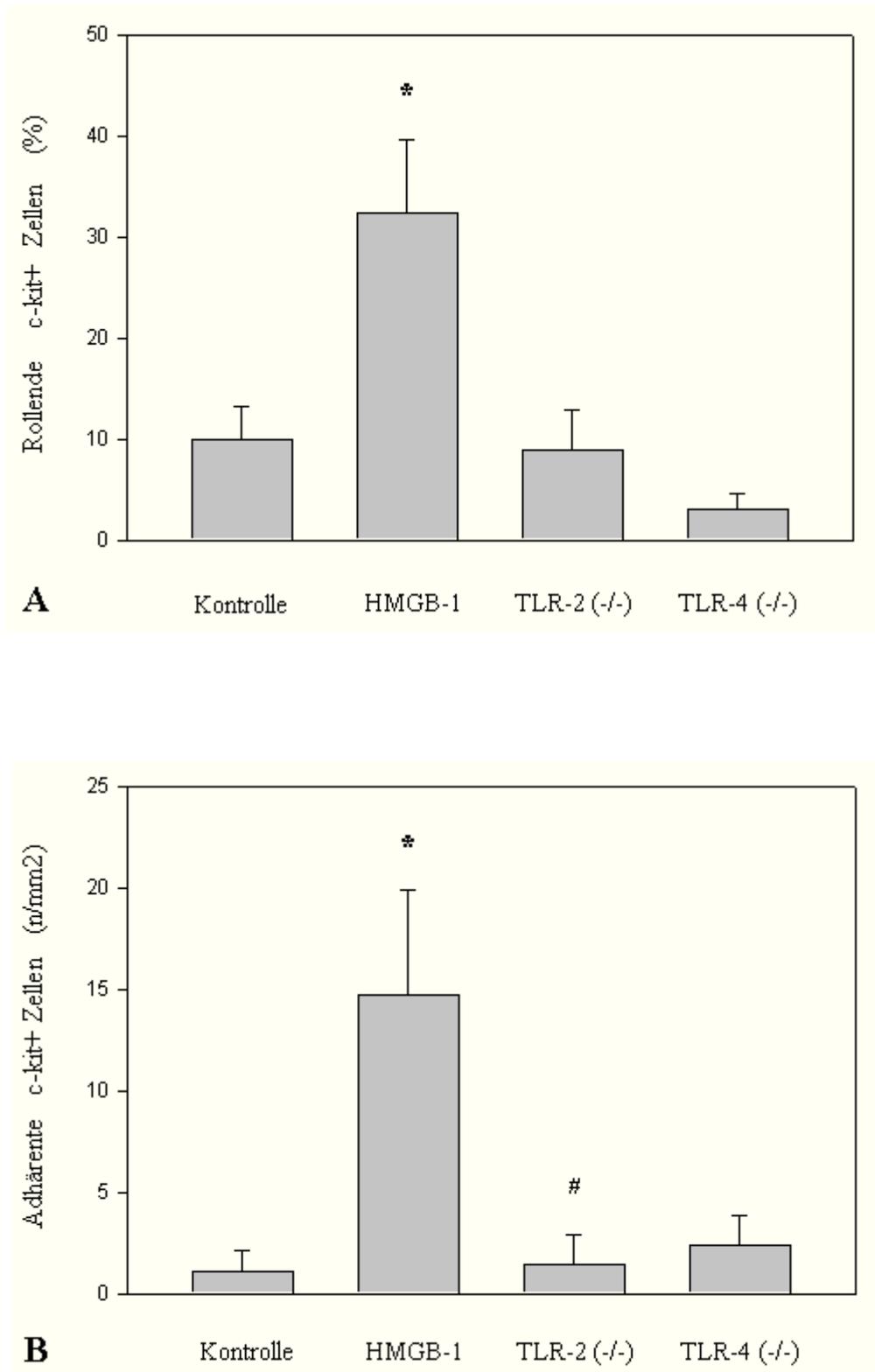


Abbildung 13: Quantifizierung des HMGB-1 vermittelten c-kit⁺ Rollings und Adhärenzverhaltens nach lokaler Superfusion mit HMGB-1 in der Mikrozirkulation des M. cremaster basierend auf intravitalmikroskopischem Bildmaterial

A, Anteil der rollenden WT c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen in TLR knock-out Mäusen

B, Anzahl der adhärennten WT c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen in TLR knock-out Mäusen

(* $P < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe, # $P < 0.05$ vs. HMGB-1-Gruppe).

3.6 HMGB-1 induziertes *Rolling* und feste Adhärenz von c-kit⁺ Zellen aus TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Mäusen in Wildtyp-Mäusen

Da Toll-like Rezeptoren sowohl auf endothelialen Zellen also auch auf der Stammzelloberfläche exprimiert werden, ist es wichtig zu klären, ob die Effekte der HMGB-1 vermittelten Stammzell-Endothel-Interaktionen hauptsächlich von Seiten des Endothels oder von Seiten der Stammzellen hervorgehen. Dazu wurde das *Rolling* und Adhäsionsvermögen von c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen aus TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Mäusen im Gefäßnetz von Wildtyp-Mäusen untersucht. Nach HMGB-1 *Superfusion* des M. cremaster war die Anzahl der rollenden TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-c-kit⁺ Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontroll-Gruppe signifikant erhöht (c-kit⁺ *Rolling*: 18.6±1.2% in der TLR-2 (-/-)-Zell-Gruppe und 18.2±2.2% in der TLR-4 (-/-)-Zell-Gruppe gegenüber 9± 3.2% in der Kontroll-Gruppe, $P < 0.01$ und $P < 0.05$). Verglichen mit der HMGB-1-Gruppe gab es keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Anzahl der rollenden Zellen in der TLR-2 (-/-)- und der TLR-4 (-/-)-Zell-Gruppe (Abb. 14A). Nach lokaler HMGB-1 Behandlung war die Anzahl fest adhärenter TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen im Gegensatz zu der Kontroll-Gruppe signifikant erhöht (c-kit⁺ Zell-Adhäsion: 16.3±5.2 Zellen/mm² in der TLR-2 (-/-)-Zell-Gruppe und 11.7±3.6 Zellen/mm² in der TLR-4 (-/-)-Zell-Gruppe gegenüber 1.1±1.0 Zellen/mm² in der Kontroll-Gruppe, $P < 0.05$) (Abb. 14B). Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl adhärenter Zellen in den TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Zell-Gruppen im Vergleich zu der HMGB-1-Gruppe ($P = 0.84$ und $P = 0.82$).

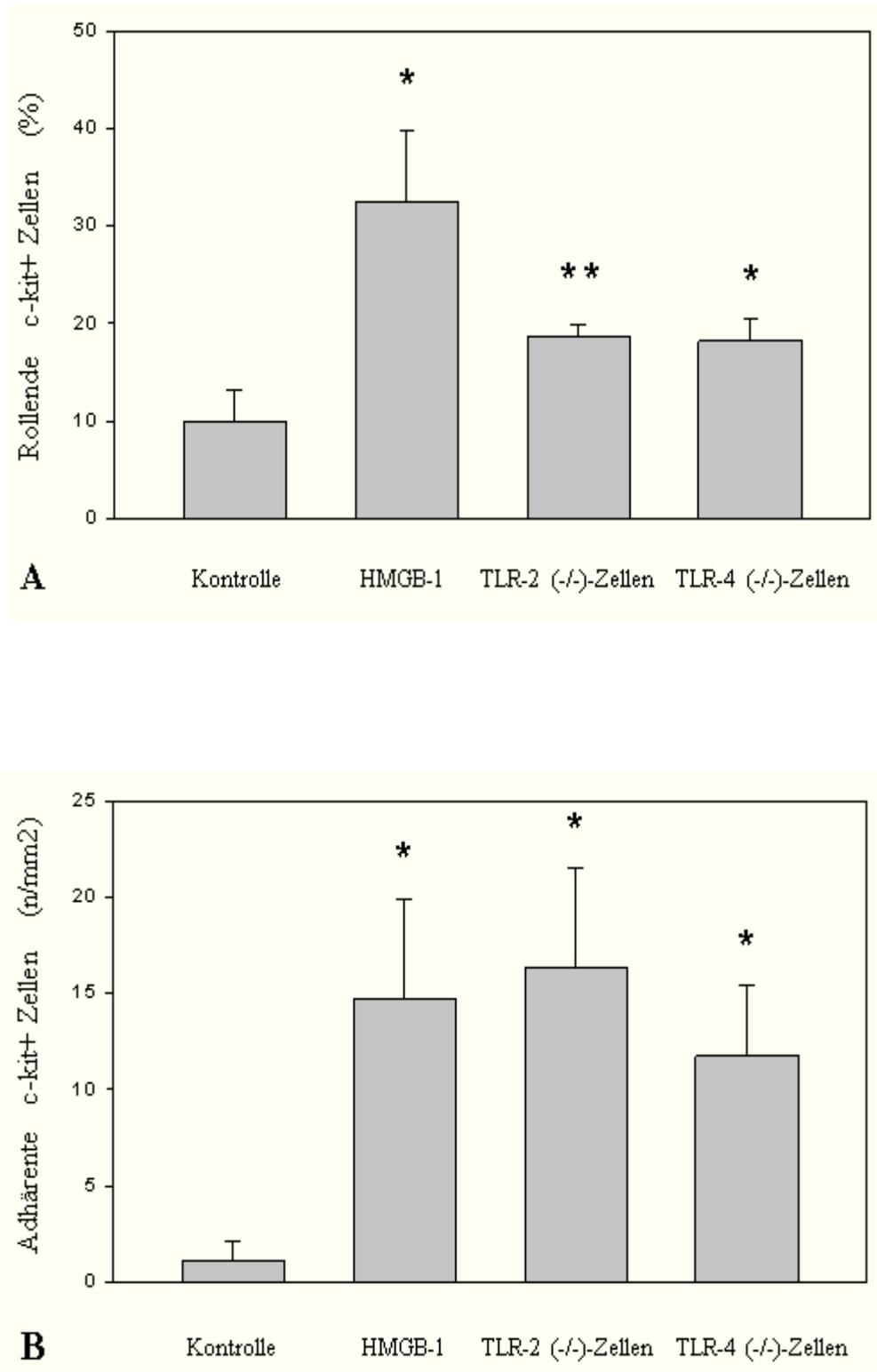


Abbildung 14: Quantifizierung des HMGB-1 vermittelten c-kit⁺ Rollings und Adhärenzverhaltens nach lokaler Superfusion mit HMGB-1 in der Mikrozirkulation des M. cremaster basierend auf intravitalmikroskopischem Bildmaterial

A, Anteil der rollenden TLR-2 (-/-) und TLR-4 (-/-) c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen in WT-Mäusen

B, Anzahl der adhärennten TLR-2 (-/-) und TLR-4 (-/-) c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen in WT-Mäusen (* $P < 0.05$ vs. 'Kontrolle', # $P < 0.05$ vs. 'HMGB-1').

3.7 HMGB-1 vermittelte Expression von eNOS

Um zu klären, inwieweit die Behandlung mit HMGB-1 die Expression von eNOS im M. cremaster verändert, wurden weitere immunhistochemische Analysen durchgeführt. Hierbei konnte ein eindeutiges eNOS-Expressionsmuster im HMGB-1 behandelten Muskeln identifiziert werden. Die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase wurde in denjenigen endothelialen Zellen sichtbar gemacht, die das Gefäßlumen begrenzen (Abb. 15).

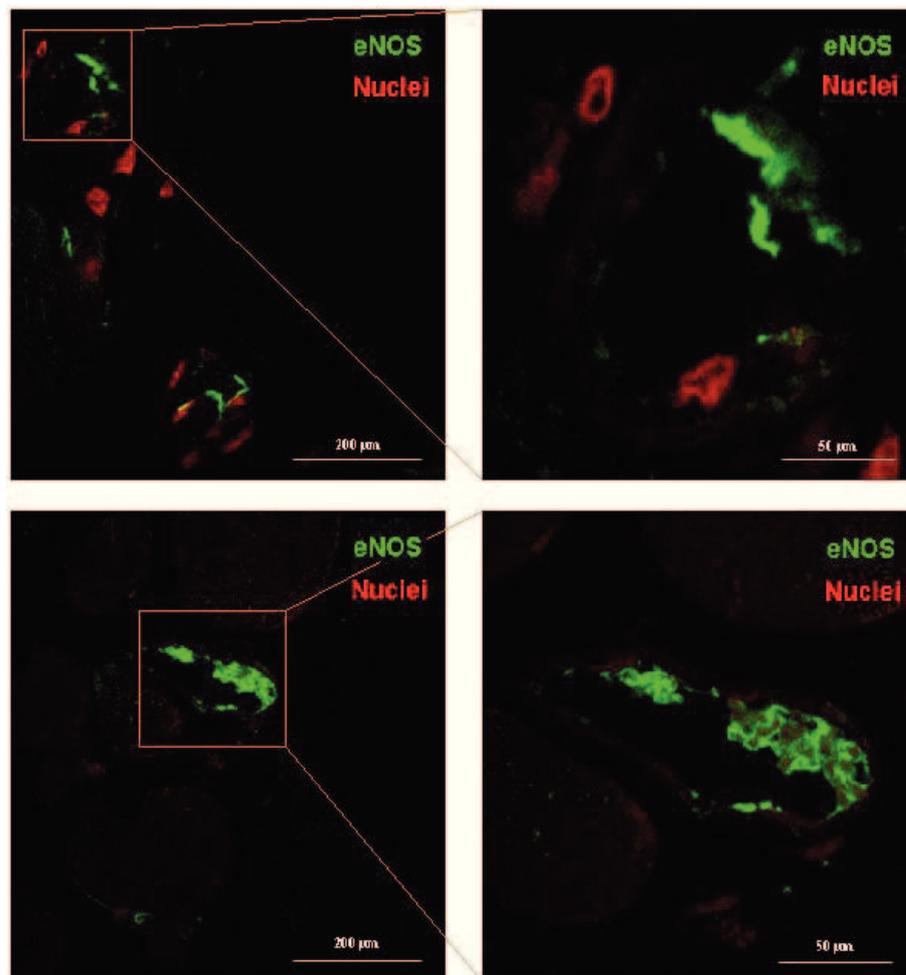


Abbildung 15: HMGB-1 *Superfusion* vermittelte eNOS Expressionserhöhung

Repräsentative Bilder von eNOS Expressionsmustern in der HMGB-1-Gruppe (konfokale Mikroskopie). eNOS⁺ Signale (grün) waren reichlich an der endothelialen Auskleidung (obere Bilder) und mit adhärenenten hämatopoetischen Zellen colokalisiert (untere Felder). TOPRO-3 in den Nuclei (rot).

3.8 HMGB-1 vermittelte Hochregulierung der P-Selectin Expression im Gewebe des M. cremaster

Es wurden die Effekte von HMGB-1 auf die Adhäsionskapazität von Endothelzellen und zirkulierenden Zellen untersucht. Dazu erfolgten quantitative mRNA-Level Bestimmungen von P-Selektin mittels real-time PCR. Nach M. cremaster *Superfusion* mit HMGB-1 zeigte sich eine signifikante Transkriptionserhöhung der mRNA von P-Selektin ($P < 0,01$) (Abb. 16). In der TLR-2 (-/-)-Gruppe war die P-Selektin Expression nach der Behandlung drastisch reduziert ($P < 0,01$) (Abb. 16).

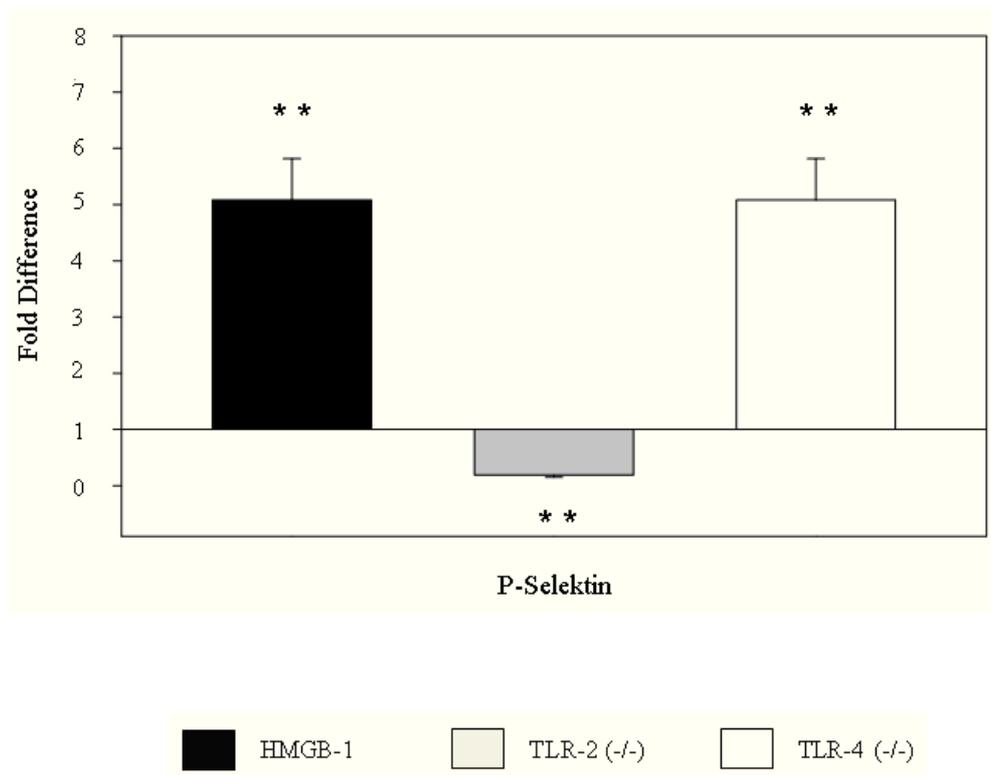


Abbildung 16: Die mRNA Level von P-Selektin in An- oder Abwesenheit von TLR-2 und -4
 Quantitative real-time PCR Analysen in den Kontroll-, HMGB-1-, TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Gruppen. Der Wert der durchschnittlichen mRNA Expressions-Level von eNOS und c-kit in der Kontroll-Gruppe wurde willkürlich mit 1 beziffert (Linie). ‚Fold difference‘ ist das Verhältnis der Genexpression in Bezug auf das Grundniveau. (** $P < 0.01$ vs. Kontroll-Gruppe).

3.9 Quantifizierung der HMGB-1 vermittelten Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel im Gewebe des M. cremaster

In Anbetracht der Wirkung von HMGB-1 als potentieller Mediator von Entzündungsreaktionen wurde zuerst eine praktikable Dosierung des Chemokins (Dosis/Resultat Test) mittels IVM evaluiert (Daten nicht gezeigt). Nachdem die günstigste Menge des Proteins (400ng/ml) bestimmt wurde, folgten Untersuchungen über die Interaktionen zwischen endogenen Leukozyten und dem Endothel in der M. cremaster Mikrozirkulation von WT-Mäusen. Die HMGB-1 *Superfusion* verursachte eine signifikante Zunahme der endogenen Leukozytenadhäsion (Abb. 17).

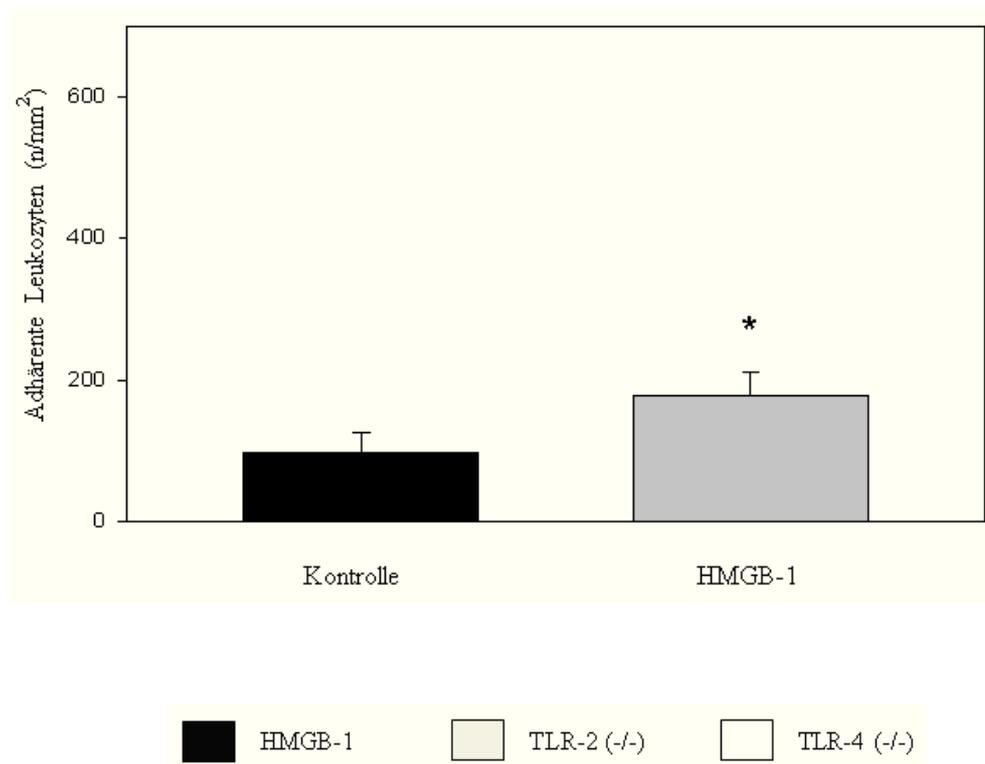


Abbildung 17: Endogene Leukozytenadhäsion im M. cremaster nach HMGB-1 *Superfusion*
Anzahl der adhärenen Leukozyten in der Kontroll- und HMGB-1-Gruppe
(* $P < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe)

3.10 HMGB-1 vermittelte β 1-Integrin-, P-Selektin- und ICAM-1-Polarisation in murinen Endothelzellen

Es wurden die Auswirkung von HMGB-1 auf die Expression und die Umverteilung von β 1-Integrin, P-Selektin und ICAM-1 auf der endothelialen Zellmembran analysiert. Dazu wurden SVEC Zellen mit dem Chemokin inkubiert und anschließend mittels konfokaler Mikroskopie betrachtet. Im Gegensatz zu der unbehandelten Kontroll-Gruppe kam es in der mit HMGB-1 behandelten Gruppe zu einer eindeutigen Polarisation der oben genannten Oberflächenmoleküle. Das HMGB-1 Signal verursachte eine sofortige Reaktion der SVEC Zellen, die dann eine signifikante Membranamverteilung von β 1-Integrin (10 ± 2 Zellen/HPF, $P < 0.05$), P-Selektin (8 ± 4 Zellen/HPF, $P < 0.05$) und ICAM-1 (30 ± 4 Zellen/HPF, $P < 0.01$) zeigten. Um diese Effekte zusätzlich zu quantifizieren, wurden die SVEC Zellen zusätzlich mit SDF-1 α und TNF- α stimuliert. Hierbei handelt es sich um bekannte Mediatoren der Zell-Zell Interaktionen. Die Behandlung mit dem Entzündungsmediator TNF- α verursachte eine β 1-Integrin-, P-Selektin- und ICAM-1-Polarisation in ähnlichem Ausmaß wie nach HMGB-1 Inkubation. Auch eine SDF-1 α Vorbehandlung der Zellen induzierte eine signifikante Polarisation von ICAM-1. Dahingegen wurde keine signifikante Polarisation von β 1-Integrin und P-Selektin beobachtet (Abb. 18).

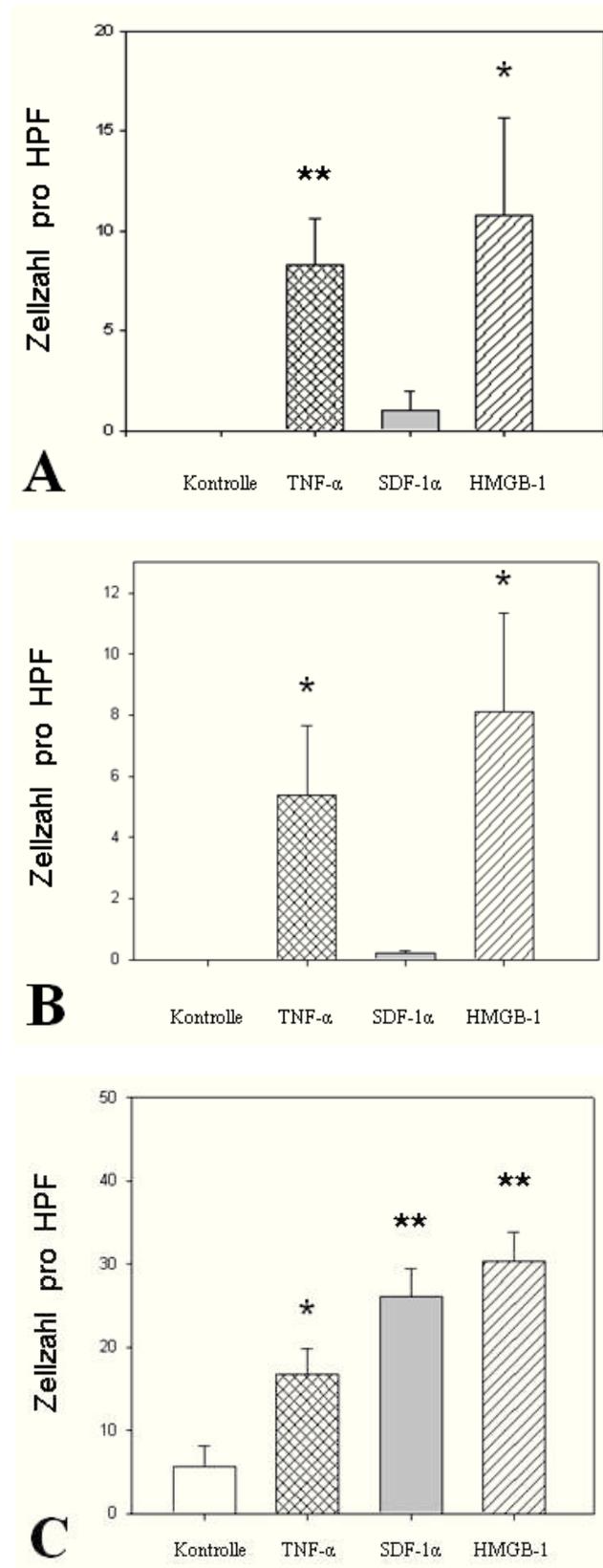


Abbildung 18: HMGB-1-vermittelte Expression von Adhäsionsmolekülen in SVEC

A, Anzahl der SVEC mit β 1-Integrin Polarisation nach Chemokin-Stimulation

B, Anzahl der SVEC mit einer Umverteilung von P-Selektin nach Chemokin-Stimulation

C, Anzahl der Zellen mit ICAM-1 Polarisation nach Chemokin-Stimulation

(** $P < 0.01$ vs. Kontroll-Gruppe; * $P < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe, HPF= 630 \times Vergrößerung)

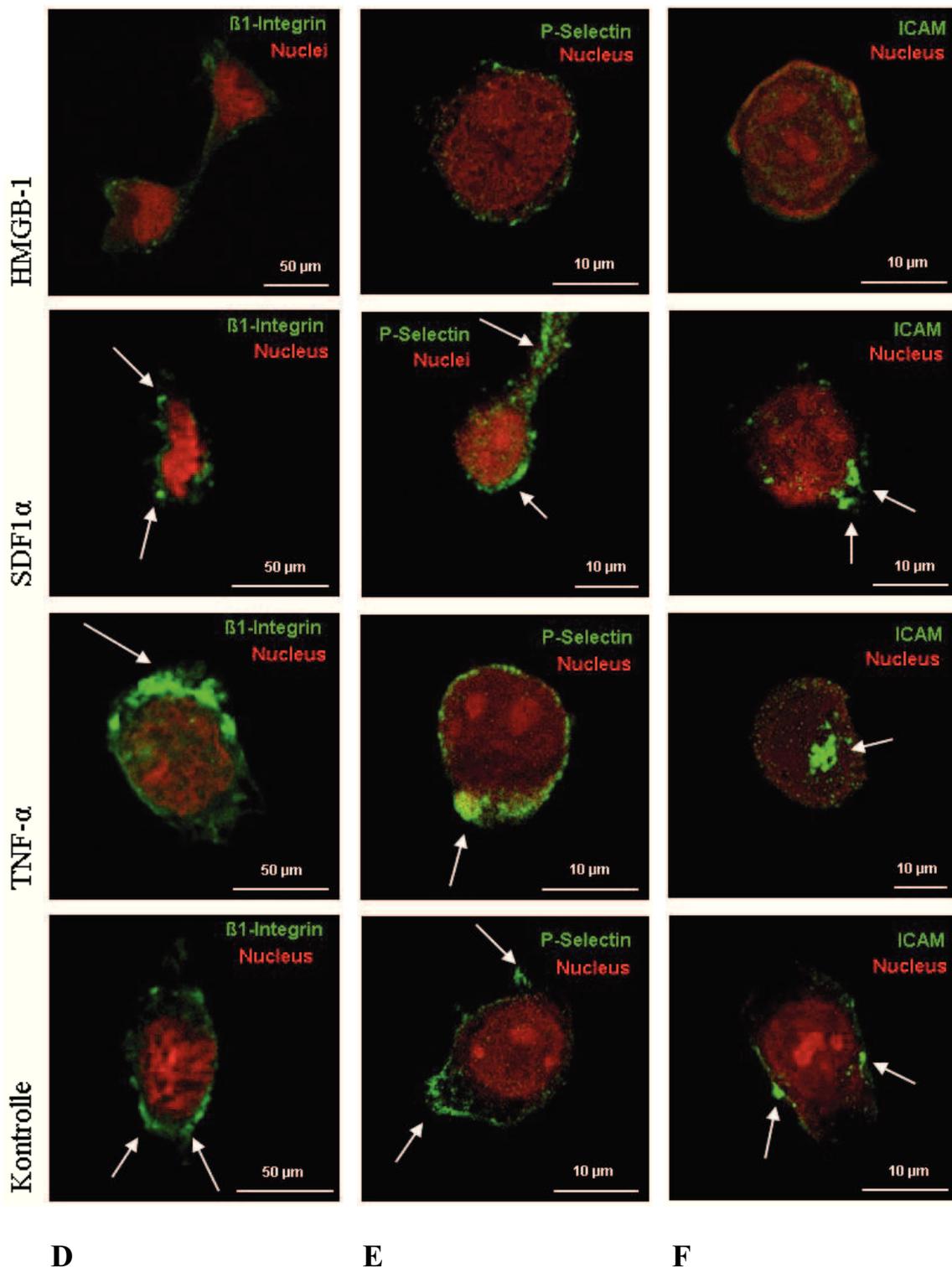


Abbildung 18: HMGB-1-vermittelte Expression von Adhäsionsmolekülen in SVEC
 Repräsentative Bilder der Fluoreszenzfärbung mittels konfokalen Mikroskopie
D, Grün: β 1-Integrin-Oberflächenverteilung, unbehandelt und nach Chemokin-Stimulation
E, Grün: P-Selektin-Oberflächenverteilung, unbehandelt und nach Chemokin-Stimulation
F, Grün: ICAM-1-Oberflächenverteilung, unbehandelt und nach Chemokin-Stimulation
 Kernfärbung: Rot: TOPRO-3

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von HMGB-1, TLR-2 und TLR-4 auf die einleitenden Phasen der c-kit⁺ Knochenmark-Stammzell-Diapedese und -Transmigration *in vivo* zu untersuchen. Ein weiteres Ziel bestand darin, *in vitro* nachzuweisen, inwieweit HMGB-1 die Expression von Adhäsionsmolekülen beeinflusst. Dazu wurden vorwiegend diejenigen Oberflächenmoleküle untersucht, die an den Prozessen des *Rollings* und der Adhäsion am Endothel beteiligt sind. In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal die HMGB-1 vermittelten Interaktionen zwischen c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen und dem Endothel der Mikrozirkulation des M. cremaster unter Verwendung der intravitalen Mikroskopie beschrieben werden. *In vivo* löste die Vorbehandlung des murinen Muskels mit HMGB-1 einen signifikanten Anstieg an rollenden und adhärenen c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen aus. Diese Prozesse sind als erste Schritte der zellulären Extravasation unabdingbar. Des Weiteren konnte eine drastische Hochregulierung von eNOS Signalen im M. cremaster nach HMGB-1 *Superfusion* verzeichnet werden. Es zeigte sich, dass das Vorhandensein der beiden HMGB-1 Rezeptoren TLR-2 und TLR-4 auf den endothelialen Zellen obligatorisch für die HMGB-1 vermittelten Affinitätssteigerung zwischen c-kit⁺ Stammzellen und der Gefäßwand war. Zwischen den TLR-2 (-/-)- und den TLR-4 (-/-)-Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied in den HMGB-1 vermittelten Effekten hinsichtlich *Rolling* und feste endotheliale Adhäsion festgestellt werden. Des Weiteren konnte dargelegt werden, dass für die HMGB-1 vermittelte Expression von P-Selektin das Vorhandensein von funktionstüchtigen Toll-like Rezeptor-2 Molekülen entscheidend war. Zusätzliche Untersuchungen *in vitro* zeigten die zentrale Rolle der HMGB-1 Stimulation für die Reorganisation wichtiger Adhäsionsmoleküle auf der Zellmembran des Endothels.

Die Analysen anhand der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie lassen vermuten, dass es durch eine HMGB-1 *Superfusion* zu einer sofortigen Aktivierung des Endothels in der Mikrozirkulation des M. cremaster kommt. Durch diese Aktivierung wurde eine signifikante Erhöhung des *Rollings* und Adhäsionsverhaltens der c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen ausgelöst. Das wiederum lässt annehmen, dass HMGB-1 einen Einfluss auf die Aktivierung von endothelialen Signalwegen besitzt, welche die Extravasation der c-kit⁺ Zellen einleiten.

In der aktuellen Literatur finden sich keine Studien die sich auf die direkte intravital-mikroskopische Betrachtung der von HMGB-1 vermittelten Interaktionen zwischen c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen und dem vaskulärem Endothel konzentrieren. Nur wenige Arbeiten beschreiben Analysen des murinen Knochenmarks anhand der intravitalem Mikroskopie [62, 63]. Der Großteil der Studien, die an nicht-knochenmarkhaltige Organen durchgeführt wurden, konzentriert sich auf Untersuchungen über das Verhalten von reifen Leukozyten mittels IVM [64, 65]. Es sind nur eine geringe Zahl an Arbeiten über die peripheren Interaktionen zwischen Stammzellen und Endothel *in vivo* verfügbar [26, 66, 67]. In einer dieser Studien wurde beschrieben, dass SDF-1 α das Adhäsionsvermögen von c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen nur in Anwesenheit von weiteren proinflammatorischen Faktoren, wie beispielsweise TNF- α , signifikant erhöhen kann [26]. In der hier vorliegenden Arbeit wird nun gezeigt, dass die alleinige Behandlung mit HMGB-1 das *Rolling* und Adhärenzvermögen von c-kit⁺ Zellen am Endothel signifikant erhöht. Dieses Ergebnis kann die Hinweise auf eine HMGB-1 vermittelte Entzündungsreaktion bestärken [33, 36]. Ein weiterer Aspekt, der diese Hypothese stützt, ist das Adhäsionsverhalten von Leukozyten. So konnte in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg an adhärenenten endogenen Leukozyten nach HMGB-1 Behandlung beschrieben werden. Ein gleichartiger Effekt konnte in einer vorangegangenen Studie mittels SDF-1 α Behandlung nicht erzielt werden [26].

Bereits in früheren Studien konnten die grundlegenden Funktionen von eNOS für die endotheliale Progenitorzell-Mobilisation und das Vorläuferzell-*Homing* belegt werden [68, 69]. Die drastische Hochregulierung von eNOS im murinen Muskel nach HMGB-1 *Superfusion* bestätigt die Fähigkeit von HMGB-1, das *Homing* von c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen positiv zu beeinflussen. Weiterhin lässt es vermuten, dass dieses *Homing*-Potential möglicherweise mit einer lokalen eNOS Aktivierung in Verbindung gebracht werden kann.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine zentrale Rolle der Toll-Like Rezeptoren 2 und 4 für das *Rolling* und Adhärenzvermögen von c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen aufgezeigt. Chavakis *et al* belegten, dass HMGB-1 die endotheliale Progenitorzell-Migration und -Adhäsion in Abhängigkeit von RAGE steigert [35]. Van Zoelen und Mitarbeiter fanden anhand eines Mausmodells heraus, dass der HMGB-1 assoziierte

Anstieg an TNF- α sowie Interleukin-6 und die Zunahme an neutrophilen Leukozyten in Abhängigkeit von Toll-like Rezeptor 4 und RAGE geschieht [70]. Demgegenüber beschrieb die Arbeitsgruppe von Yu unterschiedliche Angriffspunkte von TLR-2 und TLR-4 im HMGB-1 Signalweg [71]. In den Untersuchungen der vorliegenden Studie stellte sich heraus, dass das Fehlen von TLR-2 und -4 auf den vaskulären Endothelzellen die Aufhebung der HMGB-1 vermittelten Interaktionen zwischen c-kit⁺ Zellen und dem Endothel bewirkte. Dahingegen zeigten sich keine Auswirkungen auf das *Rolling* und Adhärenzverhalten in den Venolen von Wildtyp-Mäusen, wenn c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen aus TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Mäusen injiziert wurden. Diese Ergebnisse machen die entscheidende Rolle von Toll-like Rezeptor 2 und 4 auf Endothelzellen für die HMGB-1 vermittelte c-kit⁺ Zellmigration deutlich. Zusätzlich konnte hier nachgewiesen werden, dass die Blockierung sowohl von TLR-2 als auch von TLR-4 eine HMGB-1 vermittelte c-kit⁺ Zellmigration aufhob. Das deutet darauf hin, dass beide Rezeptoren gemeinsam an dem Vorgang der Migration beteiligt sind. Die Analysen der real-time PCR lassen vermuten, dass TLR-2 die HMGB-1 vermittelte Adhärenz durch P-Selektin vermittelt. Dagegen beeinflusst der TLR-4 Signalweg wahrscheinlich ein anderes Adhäsionsmolekül-Muster.

Um den Einfluss von HMGB-1 auf die Adhäsionsmolekül-Expression weiter zu erforschen, wurden in dieser Arbeit Versuche mit einer endothelialen Zelllinie (SVEC) unternommen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es durch eine HMGB-1 Vorbehandlung der murinen Zellen zu einer signifikanten Umverteilung von β 1-Integrin, P-Selektin und ICAM-1 auf der Zellmembran kam. Die Bedeutung von β 1-Integrinen für die Erkennung von Molekülen der extrazellulären Matrix ist umfangreich erforscht worden [72, 73, 74, 75]. Beispielsweise tragen die Moleküle zu den grundlegenden Mechanismen zur Aufrechterhaltung und Funktionsfähigkeit der Blutgefäße bei. Diese umfassen unter anderem die Zell-Ausbreitung, die -Retraktion, die -Polarisation und die -Migration [76, 77]. Dies lässt vermuten, dass die HMGB-1 vermittelte β 1-Integrin Umverteilung auf der endothelialen Zellmembran bei der Migration und Extravasation der c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen eine Rolle spielt. Zusätzlich weisen die Auswirkungen von HMGB-1 auf die Polarisation von P-Selektin und ICAM-1 darauf hin, dass dieses Chemokin eine wichtige Funktion für das Stammzell-*Homing* besitzt. Die Polarisationen der beiden Adhäsionsmoleküle in der endothelialen Zelllinie (SVEC) deuten an, dass HMGB-1 seine Wirkung frühzeitig auf

die Zellen ausübt. Somit wird das Endothel aktiviert, was wiederum das c-kit⁺ Zell-*Homing* auslöst. Möglicherweise teilen sich der Prozess des c-kit⁺ Knochenmark-Stammzell-*Homings* zum Ort der Neovaskularisation und der Vorgang des *Homings* von Leukozyten zum Ort der Entzündung einige grundlegende Mechanismen.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass HMGB-1 das Ausmaß des *Homings* von c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen im peripheren Gewebe *in vivo* erhöhen kann. Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass HMGB-1 die endothelialen Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* aktivieren kann. Diese Effekte scheinen durch endothelseitige-, aber nicht durch stammzellseitige-Toll-like-Rezeptoren reguliert zu werden. Diese Arbeit hebt zwei wichtige Wirkungen von HMGB-1 besonders hervor: einerseits die Verstärkung der Stammzellrekrutierung für eine Geweberegeneration durch HMGB-1, andererseits die essenziellen Funktionen nachgeschalteter Toll-like Rezeptor-abhängiger Signalwege in diesem Zusammenhang.

5. Zusammenfassung

High mobility group box 1 (HMGB-1) ist ein sehr effizientes chemotaktisches Signal sowohl für Entzündungszellen als auch für Stammzellen. In der vorliegenden Arbeit konnten einerseits die Mechanismen beurteilt werden, die das HMGB-1 vermittelte *Rolling* und Adhäsionsverhalten der c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen regulieren. Andererseits wurde geprüft, ob Toll-like Rezeptor-2 und -4, welche auf Endothelzellen und c-kit⁺ Zellen exprimiert werden, an der Aktivierung von nachgeordneten Migrationssignalen für c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen beteiligt sind.

Die Auswirkungen einer HMGB-1 Behandlung auf die Interaktionen zwischen c-kit⁺ Zellen und Endothel wurden anhand eines Cremastermuskel-Modells an Wildtyp-, TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Mäusen betrachtet. Nach einer lokalen HMGB-1 Administration wurde ein signifikanter Anstieg des *Rollings* der c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen beobachtet (32.4±7.1 % in der WT-Gruppe vs. 9.9 ± 3.2 % in der Kontroll-Gruppe, $P < 0.05$). Die Anzahl der fest adhärenen c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen war um mehr als das 13-fache höher als in der Kontroll-Gruppe (14.6±5.1 Zellen/mm² in der WT-Gruppe vs. 1.1±1.0 Zellen/mm² in der Kontroll-Gruppe, $P < 0.05$). In den Gruppen der knock-out Mäuse unterschied sich die Menge der Zellen, die ein typisches *Rolling* zeigten, nicht signifikant von der Menge der Kontroll-Gruppe. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen war die Zahl fest adhärenen c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen in den Gruppen der TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-Mäuse signifikant verringert (1.5±1.4 Zellen/mm² in der TLR-2 (-/-)-Gruppe und 2.4±1.4 Zellen/mm² in der TLR-4 (-/-)-Gruppe vs. 14.6±5.1 Zellen/mm² in der WT-Gruppe, $P < 0.05$). TLR-2 (-/-)- und TLR-4 (-/-)-c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen, die WT Mäusen injiziert wurden, zeigten keine signifikante Reduktion des *Rollings* und Adhäsionsverhaltens im Vergleich zu WT Stammzellen. Des Weiteren wurde nach entsprechender HMGB-1 Vorbehandlung eine deutliche Polarisierung von endothelialen Adhäsionsmolekülen, die eine zentrale Rolle für das *Rolling* und Adhäsionsverhalten von Stammzellen und Leukozyten besitzen, *in vivo* und *in vitro* beobachtet.

Zusammenfassend kann man schlussfolgern, dass HMGB-1 die Interaktionen von c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen mit dem Endothel und damit das konsekutive Stammzell-*Homing* sowohl über den TLR-2- als auch über den TLR-4 vermittelten Signalweg beeinflusst.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K *et al.* Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet.* 2003; 362: 777–781.
- [2] Schannwell CM, Hennersdorf MG, Strauer BE. Hypertension and cardiac failure. *Internist (Berl).* 2007; 48(9):909-20.
- [3] Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009; 324:98-102.
- [4] Smits AM, van Vliet P, Hassink RJ, Goumans MJ, Doevendans PA. The role of stem cells in cardiac regeneration. *J. Cell. Mol. Med* 2005; 9:25-36.
- [5] Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2008; 2:169-83.
- [6] Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MVG, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ. Res.* 2004; 95:911-921.
- [7] Burchfield JS, Dimmeler S. Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair* 2008; 1:4.
- [8] Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Süselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM, REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355:1210-1221.
- [9] Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364:141-148.
- [10] Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belém L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107:2294-2302.
- [11] Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008; 28:208-216.
- [12] Bonnet D. Hematopoietic stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003; 69(3):219-29.

- [13] Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D, Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* 2005; 23(1):16-43.
- [14] Lev S, Yarden Y, Givol D. Dimerization and activation of the kit receptor by monovalent and bivalent binding of the stem cell factor. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:15970-15977.
- [15] Prosper F, Verfaillie CM. Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J Leukoc Biol*, 2001; 69(3): p. 307-16.
- [16] Schürmann G. Zelladhäsion. Molekulare Grundlagen und erste Aspekte für die Chirurgie. *Chirurg* 1997; 68, 477-487.
- [17] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation research* 2004; 95:343-353.
- [18] Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993; 178, 449-460.
- [19] Fruehauf S, Seeger T. New strategies for mobilization of hematopoietic stem cells. *Future Oncol* 1 2005; (3): 375-83.
- [20] Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitoriano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001; 97 (11): 3354-60.
- [21] Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ, Penn MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; 362 (9385): 697-703.
- [22] Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10 (8): 858-64.
- [23] Franz WM, Zaruba M, Theiss H, David R. Stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; 362 (9385): 675-6.
- [24] Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7 (4): 430-6.
- [25] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (18): 10344-9.
- [26] Kaminski A, Ma N, Donndorf P, Lindenblatt N, Feldmeier G, Ong LL, et al. Endothelial NOS is required for SDF-1alpha/CXCR4-mediated peripheral endothelial adhesion of c-kit+ bone marrow stem cells. *Lab Invest* 2008; 88:58-69.

- [27] Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 1973; 38: 14-19.
- [28] Bianchi ME. Production of functional rat HMGB1 protein in *Escherichia coli*. *Gene* 1991; 104: 271-275.
- [29] Huttunen HJ, Fages C, Kuja-Panula J, Ridley AJ, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphoterin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Research* 2002; 62: 4805-4811.
- [30] Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, Qiang X, Harris HE, Czura CJ, Wang H, Ulloa L, Wang H, Warren HS, Moldawer LL, Fink MP, Andersson U, Tracey KJ, Yang H. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Molecular Medicine* 2003; 9: 37-45.
- [31] Bianchi ME, Manfredi A. Chromatin and cell death. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1677:181-186.
- [32] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002; 418: 191-195.
- [33] Palumbo R, Galvez BG, Pusterla T, De Marchis F, Cossu G, Marcu KB, et al. Cells migrating to sites of tissue damage in response to the danger signal HMGB1 require NF-kappaB activation. *The Journal of cell biology* 2007; 179:33-40.
- [34] Palumbo R, Bianchi ME. High mobility group box 1 protein, a cue for stem cell recruitment. *Biochemical pharmacology* 2004; 68:1165-1170.
- [35] Chavakis E, Hain A, Vinci M, Carmona G, Bianchi ME, Vajkoczy P, et al. High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circulation research* 2007; 100:204-212.
- [36] Palumbo R, Sampaolesi M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *The Journal of cell biology* 2004; 164:441-449.
- [37] Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2003; 101:2652-2660.
- [38] Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, et al. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit⁺ cell proliferation and differentiation. *Circulation research* 2005; 97:e73-83.
- [39] Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 1999; 274: 19919-19924.

- [40] Stern D, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM. Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; 54: 1615-1625.
- [41] Dumitriu IE, Baruah P, Bianchi ME, Manfredi AA, Rovere-Querini P. Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology* 2005; 35: 2184-2190.
- [42] Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 7370-7377.
- [43] Anderson KV, Nusslein-Volhard C. Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 1984; 20-26;311, 223-227.
- [44] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-397.
- [45] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 2004; 4:499-511.
- [46] Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002; 168, 554-561.
- [47] Szczepański M, Szyfter W, Jenek R, Wróbel M, Lisewska IM, Zeromski J. Toll-like receptors 2, 3 and 4 (TLR-2, TLR-3 and TLR-4) are expressed in the microenvironment of human acquired cholesteatoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006; 263(7):603-7.
- [48] Baker M, Wayland H. On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc.Res.* 1974; 7: 131-143.
- [49] Baez S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res.* 1973;5(3):384-94.
- [50] Lindenblatt N, Menger MD, Klar E, Vollmar B. Sustained hypothermia accelerates microvascular thrombus formation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(6):H2680-7.
- [51] Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbeck's Arch. Surg.* 2000; 385(4):290-8.
- [52] Mempel TR, Scimone ML, Mora JR, von Adrian UH. In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues. *Curr. Opin. Immunol.* 2004; 16(4):406-17.
- [53] Halin C, Mora JR, Sumen C, von Adrian UH. In vivo imaging of lymphocyte trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005; 21:581-603.

- [54] Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD. Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials* 2006; 27, 5027 – 5038.
- [55] Schroder U, Arfors KE, Tangen O. Stability of fluorescein labeled dextrans in vivo and in vitro. *Microvasc Res* 1976; 11[1], 57-66.
- [56] Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am. J. Pathol.* 1993; 143, 1055 – 1062.
- [57] Herrmann KS. Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc. Res.* 1983; 26, 238 – 249.
- [58] Chomczynski P, Sacchi N Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162, 156-159.
- [59] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25, 402-408.
- [60] Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 47:200-202.
- [61] O'Connell KA, Edidin M. A mouse lymphoid endothelial cell line immortalized by simian virus 40 binds lymphocytes and retains functional characteristics of normal endothelial cells. *J Immunol* 1990; 144:521-525.
- [62] Frenette PS, Subbarao S, Mazo IB, von Andrian UH, Wagner DD. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:14423-14428.
- [63] Mazo IB, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, von Andrian UH. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med* 1998; 188:465-474.
- [64] Thorlacius H, Vollmar B, Guo Y, Mak TW, Pfreundschuh MM, Menger MD, *et al.* Lymphocyte function antigen 1 (LFA-1) mediates early tumour necrosis factor alpha-induced leucocyte adhesion in venules. *Br J Haematol* 2000; 110:424-429.
- [65] Zarbock A, Ley K. New insights into leukocyte recruitment by intravital microscopy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 334:129-152.
- [66] Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Muller S, Seifried E, *et al.* Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 2006; 108:3938-3944.

- [67] Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, *et al.* Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc Res* 2009; 77:370-376.
- [68] Klopsch C, Furlani D, Gabel R, Li W, Pittermann E, Ugurlucan M, *et al.* Intracardiac injection of erythropoietin induces stem cell recruitment and improves cardiac functions in a rat myocardial infarction model. *J Cell Mol Med* 2009; 13:664-679.
- [69] Wegiel B, Gallo DJ, Raman KG, Karlsson JM, Ozanich B, Chin BY, *et al.* Nitric oxide-dependent bone marrow progenitor mobilization by carbon monoxide enhances endothelial repair after vascular injury. *Circulation*; 121:537-548.
- [70] van Zoelen MA, Yang H, Florquin S, Meijers JC, Akira S, Arnold B, *et al.* Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo. *Shock* 2009; 31:280-284.
- [71] Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, *et al.* HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 2006; 26:174-179.
- [72] Smith CW. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 1993; 71:76-87.
- [73] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003; 302:1704-1709.
- [74] Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268:233-239.
- [75] Sobel RA, Hinojoza JR, Maeda A, Chen M. Endothelial cell integrin laminin receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* 1998; 153:405-415.
- [76] Dejana E, Raiteri M, Resnati M, Lampugnani MG. Endothelial integrins and their role in maintaining the integrity of the vessel wall. *Kidney Int* 1993; 43:61-65.
- [77] Shattil SJ, Ginsberg MH. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 1997; 100:1-5.

7. Anhang

I Thesen

- 1 Die Faktoren, die die gerichtete Zielwanderung (*Homing*) transplantierte Knochenmark-Stammzellen in knochenmarksferne Organe beeinflussen, sind bisher nur in Ansätzen untersucht.
- 2 Dazu wurde der Musculus cremaster der Maus so präpariert, dass injizierte c-kit⁺ Stammzellen aus dem Knochenmark einer Spendermaus in ihrem intravaskulären Verhalten direkt beobachtet werden konnten.
- 3 Im unbehandelten M. cremaster zeigten c-kit⁺ Knochenmark-Stammzellen eine geringe Interaktion mit dem Endothel der postkapillaren Venolen.
- 4 Erst nach *Superfusion* des Muskels mit HMGB-1 wurde ein signifikanter Anstieg des *Rollings* und der Stammzelladhärenz am Endothel des Zielorgans verzeichnet.
- 5 Nach *Superfusion* mit dem aktiven Chemokin zeigte sich eine moderate Erhöhung der Leukozytenadhärenz.
- 6 Das Vorhandensein der beiden HMGB-1 Rezeptoren TLR-2 und TLR-4 auf den endothelialen Zellen ist obligatorisch für die in These 4 beschriebenen Interaktionen der Stammzellen mit dem Endothel.
- 7 Für die HMGB-1 vermittelte Expression von P-Selektin ist das Vorhandensein von funktionstüchtigen TLR-2 Molekülen entscheidend.
- 8 HMGB-1 vermittelt eine Umverteilung von β 1-Integrin, P-Selektin und ICAM-1 auf der Zellmembran von Endothelzellen.

II Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Ingeborg Westien

Ausbildung

- 2005-2007: Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg;
Abschluss: 1. Staatsexamen
- 2007-2011: Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock;
Abschluss: 2. Staatsexamen
- 2007-2012: Promotion im Forschungszentrum für kardialen Gewebe- und
Organersatz der Klinik für Herzchirurgie der Universität Rostock

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

1. Furlani D, Ugurlucan M, Ong LL, Bierback K, Pittermann E, **Westien I**, Wang W, Yerebakan C, Li W, Gäbel R, Li R-K, Vollmar B, Steinhoff G, Ma N. *Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe?* Microvasc Res. 2009; 77(3):370-6. Epub 2009
2. Furlani D, Li W, Pittermann E, Kloppsich C, Wang L, Knopp A, Jungebluth P, Thedinga E, Havenstein C, **Westien I**, Ugurlucan M, Li R, Ma N, Steinhoff G. *A transformed cell population derived from cultured mesenchymal stem cells has no functional effect after transplantation into the injured heart.* Cell Transplant. 2009;18(3):319-31
3. Furlani D, Donndorf P, **Westien I**, Ugurlucan M, Pittermann E, Wang W, Li W, Vollmar B, Steinhoff G, Kaminski A, Ma N. *HMGB-1 induces c-kit(+) cell microvascular rolling and adhesion via both toll-like receptor-2 and toll like receptor-4 of endothelial cells.* J Cell Mol Med. 2011: 10.1111/j.1582-4934.2011.01381.x.