

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Daniel A. Reuter

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

**Hämatopoetische Zellen vermitteln den günstigen Effekt einer  
Toll-like Rezeptor 2 Defizienz auf den  
vaskulären Heilungsprozess nach arterieller Gefäßverletzung**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Julia-Christin Eczko geb. Severitt

aus Einbeck

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. J. P. Roesner, Klinikum Südstadt Rostock, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Rostock, Chefarzt der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Südring 81, 18059 Rostock

2. Gutachterin: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmer, Universitätsmedizin Rostock, Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie, Schillingallee 69a, 18057 Rostock

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat Michael Lammers, Universität Greifswald, Institut für Biochemie, Arbeitskreis Sythetische und strukturelle Biochemie, Felix-Hausdorff-Str. 4, 17487 Greifswald

Jahr der Einreichung: 2021

Jahr der Verteidigung: 2022

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
1. Einleitung .....	7
1.1 Die Rolle der Toll-like Rezeptoren im angeborenen Immunsystem .....	7
1.2 Der Toll-like Rezeptor 2 und die Vermittlung von entzündlichen vaskulären Prozessen.....	9
1.3 Bedeutung der hämatopoetische Zellen für die Zusammensetzung der Neointima .....	12
1.4 Ziele der Arbeit .....	15
2. Methoden und Materialien .....	17
2.1 Versuchstiere .....	17
2.1.1 Wildtyp Maus .....	17
2.1.2 TLR2 defiziente Mäuse.....	17
2.2 Zellen.....	18
2.2.1 Zellkultur humaner glatter Muskelzellen .....	18
2.2.2 Isolation der Knochenmarkzellen aus der Maus .....	19
2.3 <i>In vivo</i> Versuche .....	23
2.3.1 Eisenchlorid-induzierte Thrombose Mausmodell .....	23
2.3.2 Knochenmarktransplantation .....	25
2.3.3 Systemische Applikation eines TLR2 Antikörpers .....	27
2.3.4 DNA-Extraktion zur Verifikation des TLR2 defizienten Genotyps .....	28
2.3.5 Histologie und Immunhistochemie .....	29
2.4 <i>In vitro</i> Versuche: Migrations-Modell .....	29
2.5 Statistische Auswertung .....	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1 TLR2 Defizienz ist mit reduzierter neointimaler Läsion assoziiert .....	32
3.2 TLR2 Defizienz geht mit reduzierter Anzahl und Fläche glatter Muskelzellen in der Neointima einher.....	33

3.3 Die Applikation TLR2 blockierender Antikörper in Wildtyp Mäusen reduziert die Neointimabildung .....	35
3.4 TLR2 defiziente Knochenmarkzellen führen zu einer reduzierten Neointimabildung in Wildtyp Mäusen.....	36
3.5 TLR2 defizientes Knochenmark geht mit reduzierter Anzahl und Fläche glatter Muskelzellen in der Neointima einher .....	39
3.6 TLR2 blockierende Antikörper hemmen die Migration der glatten Muskelzellen <i>in vitro</i> .....	40
3.7 TLR2 defiziente Knochenmarkzellen vermitteln eine Hemmung auf die Migration der glatten Muskelzellen <i>in vitro</i> .....	42
4. Diskussion .....	44
4.1. Eine TLR2 Defizienz und TLR2 defizientes Knochenmark reduzieren neointimale Läsionen.....	44
4.2. Das Eisenchlorid-induzierte Thrombose Mausmodell in der Atheroskleroseforschung .....	46
4.3. Eine TLR2 Defizienz reduziert die Migration von glatten Muskelzellen in die Neointima durch knochenmarkstämmige Progenitorzellen.....	49
4.4. Eine TLR2 Defizienz hat Einfluss auf die Migration von glatten Muskelzellen	51
4.5. Hämatopoetische Zellen vermitteln den günstigen Effekt der TLR2 Defizienz auf den vaskulären Heilungsprozess .....	52
4.6. Therapeutische Optionen der TLR2 Blockade.....	54
5. Zusammenfassung .....	57
6. Literaturverzeichnis.....	58
7. Anhang .....	69
7.1. Abbildungsverzeichnis.....	69
7.2. Tabellenverzeichnis.....	71
7.3. Abkürzungsverzeichnis.....	72
7.4. Eidesstattliche Erklärung .....	75

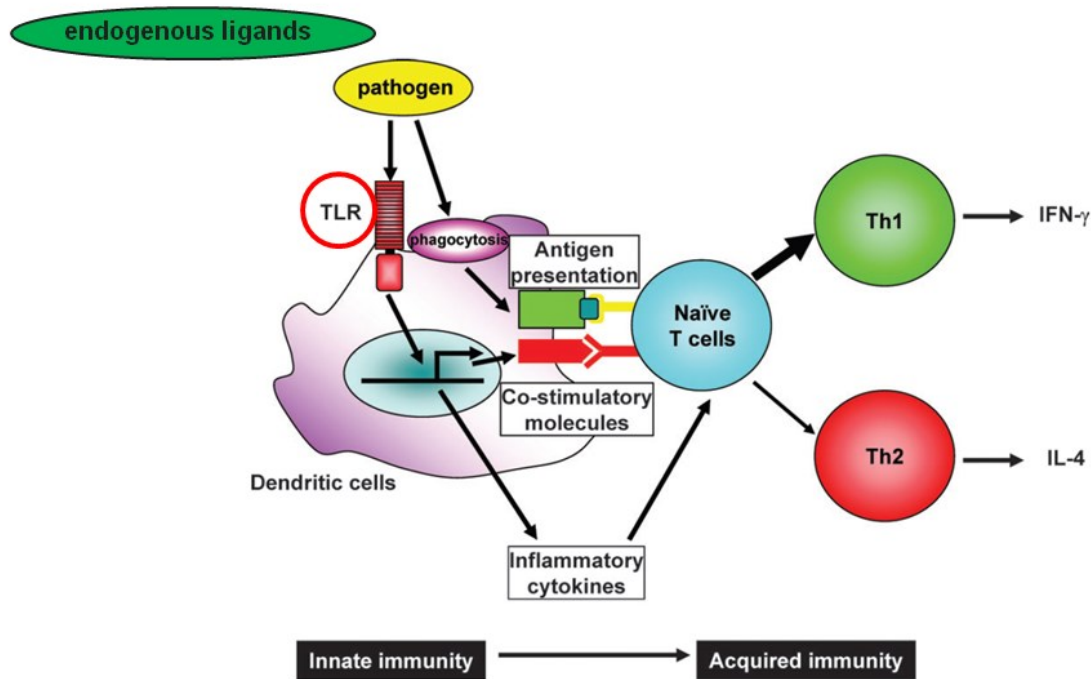
7.5. Lebenslauf.....	76
7.6. Danksagung .....	78
7.7. Thesen zur Dissertation.....	79



# 1. Einleitung

## 1.1 Die Rolle der Toll-like Rezeptoren im angeborenen Immunsystem

Alle Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören zum unspezifischen, auch angeborenen Immunsystem, sind Transmembran-Glykoproteine und ähneln dem Interleukin-1-Rezeptor [Beutler, 2004]. Die TLR spielen eine wichtige Rolle in der Initialisierung einer durch pathogene Keime oder Produkte zerfallender Zellen ausgelösten Entzündungsreaktion. TLR4 und TLR2 im Speziellen sind auf der Oberfläche von zahlreichen Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen, dendritischen Zellen, aber auch auf glatten Muskelzellen exprimiert und erkennen mit ihren Ligandendomänen die „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs), wie z.B. das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien und Lipoteichonsäure (LTA) als Bestandteil grampositiver Bakterien [Schmidt/Carrillo-Sepulveda, 2015; Hoebe et al., 2006]. Dadurch wird eine Signalkaskade eingeleitet, die zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt und die zelluläre Immunantwort stimuliert. Nachfolgend kommt es zu Zellproliferation, -differenzierung oder auch Apoptose [Hill/Olson, 2012; Smolock/Berk, 2012]. Zudem führt eine Aktivierung der TLR-Signalkaskade zu einer Reifung der B-Lymphozyten und spezifischer T-Lymphozyten. Dadurch stellen die TLR ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr dar. Der TLR2 (auch: CD282) spielt dabei eine besondere Rolle. Um bakterielle Antigene zu erkennen, muss dieser mit dem TLR 1 oder TLR 6 heterodimerisieren [O'Neill/Bowie, 2007]. Die TLR erkennen neben exogenen Antigenen auch endogene Antigene, die sogenannten „danger associated molecular patterns“ (DAMPs), wie z.B. oxidiertes low density lipid (LDL), Hitzeschockproteine 60 und 70 (Hsp60, Hsp70) und Hyaluronsäure [West et al., 2010; Akira/Takeda, 2004] (**Abb. 1**). Dieser Umstand macht sie zu einem interessanten Bestandteil der Atheroskleroseforschung.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Rolle des TLR als Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem**

Angeborene Immunzellen, wie z.B. dendritische Zellen und Makrophagen, eliminieren Pathogene mittels Phagozytose und präsentieren die Pathogen-Peptide den naiven T-Zellen. Zusätzlich erkennen die TLR pathogene und endogene Antigene und induzieren eine Genexpression von kostimulierenden Molekülen und inflammatorischen Zytokinen. Durch Phagozytose entstandenen Antigene und durch den TLR2 induzierten Signalweg kommt es zu einer Aktivierung des zellulären Immunsystems, im Speziellen der Th1-Zellen [Modifiziert nach Akira und Takeda et al 2004].

Toll-like Rezeptoren sind ein Teil der Interleukin-1 Rezeptor/Toll-like Rezeptor Überfamilie. Sie besitzen eine extrazelluläre N-terminale Ligandenerkennungsdomäne mit Leucine-rich Repeats (Leucin-reiche Wiederholungen, auch LRR) und zytoplasmatischem Carboxyl-terminalen Schwanz mit der Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) Signaldomäne. Die extrazelluläre LRR-Domäne bindet PAMPs und formt ein Homo- oder Heterodimer mit anderen TLR [Kawai/Akira, 2009]. Die Kooperation zwischen dem TLR2 und dem CD36 (auch: „scavenger receptor class B member 3“) ist vor allem für die Erkennung von endogenen Lipiden relevant. So werden oxidierte Phospholipide, LDL, gesättigte Fettsäuren und Lipoprotein A am Heterodimer TLR2/CD36 gebunden, erkannt und bewirken intrazellulär eine Apoptose innerhalb von Makrophagen [Seimon et al., 2010]. Diese und andere Vorgänge haben einen beträchtlichen Anteil in der Atheroskleroseentstehung.



Diese Zusammenhänge deuten auf einen proinflammatorischen Signalweg zwischen den endogenen Lipiden und der Aktivierung des angeborenen Immunsystems [Hoebe et al., 2005] hin. Die Toll-like Rezeptoren (TLR) spielen als Schnittstelle zwischen unspezifischer Immunantwort und vaskulärer Homöostase eine wichtige Rolle.

## **1.2 Der Toll-like Rezeptor 2 und die Vermittlung von entzündlichen vaskulären Prozessen**

Die Atherosklerose als entzündlicher Prozess im vaskulären System sowie ihre Folgeerscheinungen wie Ischämie, Thrombose, Herzinfarkt und Schlaganfall gelten als die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen. Obwohl in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte im Verständnis der Pathogenese, wie z.B. die Response-to-Injury-Hypothese dieser Erkrankung erzielt wurden, konnte bisher keine effektive Behandlung etabliert werden. Die Response-to-Injury Hypothese publiziert durch Russel Ross im Jahre 1977 ist neben der Lipoprotein-induced-atherosclerosis-Hypothese, untersucht durch Joseph Leonard Goldstein, eine der etablierten Hypothesen in der Atheroskleroseentstehung [Goldstein/Brown, 1977; Ross et al., 1977]. Sie besagt, dass eine zeitlich begrenzte Verletzung der inneren Arterienwandschicht der Initiator der Atherosklerose ist. Ursächlich hierfür sind z.B. mechanische Scherverletzungen (z. B. bei arterieller Hypertonie) und biochemische Schädigungen durch bakterielle Toxine, Viren oder Antigen-Antikörper Reaktionen. Dies führt zur Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die wiederum die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen in die Intima bedingen. Außerdem kommt es durch den Entzündungsreiz zu einer Einwanderung von Monozyten, die durch Fetteinlagerung zu Schaumzellen werden. Beide Vorgänge führen schlussendlich zu einer herdförmigen Bildung von Gewebeveränderungen in Form von Plaques und sind meistens mit einer gesteigerten Apoptoserate im Gefäß verbunden, z.B. bedingt durch eine verminderte Bildung von PECAM-1 (CD31, Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül) in Endothelzellen. Daraus folgt eine endotheliale Dysfunktion. Im Verlauf kann dies zur Plaqueruptur führen; die Arterienwand wird unelastisch und es kann zur intraluminalen Aktivierung der Gerinnungskaskade kommen. Akkumulierend bilden sich luminale Stenosen, poststenotische Minderperfusionen oder akute thrombotische Verschlüsse. Durch zunehmende Scher-

und Schubspannungen kommt es zur Stickstoffmonoxid-Bildung in den Endothelzellen, die ihrerseits eine Gefäßdilataion induzieren und gleichzeitig damit auch das Wachstum der glatten Muskelzellen hemmen, die zu Unelastizität des Gefäßes führen. Gerade an Gefäßbifurkationen entstehen intraluminale turbulente Strömungen, die zur Aktivierung von proinflammatorischen Signalwegen, z.B. dem NF-κB-Signalweg führen. Dadurch entsteht ein Circulus vitiosus; eine Hemmung der Stickstoffmonoxidproduktion führt zur Atheroskleroseprogression und Aneurysmabildung, die eine Zunahme der intraluminale Strömungsgeschwindigkeit bedingt und darauffolgend eine Entstehung von turbulenten Strömungen. Bekannte klinische Manifestationen sind Apoplexien, Myokardinfarkte, Bauchortenaneurysmata und die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Pathologisch-anatomische und experimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Einwandern von Entzündungszellen, die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen, sowie eine gestörte Reendothelialisierung im Heilungsprozess der initialen Gefäßläsion, eine entscheidende Rolle in der Neointimabildung und damit fortschreitenden intraluminale Stenosen spielen [Liao Yongbo et al., 2007; Han et al., 2001b]. Atherosklerotische Gefäßläsionen entwickeln sich nach der „Response-to-Injury“-Hypothese auf dem Boden von Verletzungen der Intima, die u. a. durch langjährige arterielle Hypertonie, jedoch auch durch interventionelle gefäßchirurgische Eingriffe, wie Angioplastien oder Stentimplantation verursacht werden können. Im Menschen finden sich atherosklerotische Plaques häufig an den hirnversorgenden Arterien, wie der Karotisbifurkation und führen zu Stenose oder Verschluss arterieller Gefäßlumina, was in eine zerebrale Minderperfusion mit der Gefahr eines Insultes übergehen kann. Der TLR2 ist auf Entzündungszellen exprimiert, aber auch auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Die Vernetzung erklärt den Zusammenhang zwischen dem Rezeptor und entzündlich vaskulären Erkrankungen. So ist eine Aktivierung des TLR2 durch endogene Antigene oder auch durch Scherkräfte innerhalb des Gefäßes mit endothelialer Dysfunktion sowie Atheroskleroseprogression assoziiert [Hajishengallis/Lambris, 2011; Curtiss/Tobias, 2009; Mullick et al., 2008].

Eine Verbindung zwischen Atherosklerose und TLR ist in mehreren Studien diskutiert worden. Unter anderem zeigte sich, dass in humanen atherosklerotischen Plaques eine Zellexpression von TLR1, 2, und 4 stattfindet [Edfeldt et al., 2002; Xu et al., 2001].

Experimentelle Daten identifizierten schon zuvor die Rolle des TLR4 in der Atherosklerose [Hollestelle et al., 2004; Michelsen et al., 2004] sowie eine TLR4 abhängige Interaktion innerhalb der MyD88 Signalkaskade (molecule myeloid differentiation factor 88) [Bjorkbacka et al., 2004]. Beispielweise fanden Michelsen et al. heraus, dass ein Verlust von TLR4 oder MyD88 zu einer reduzierten Atheroskleroseprogression in Atherosklerose-empfindlichen Apolipoprotein-E-defizienten (ApoE<sup>-/-</sup>) Mäusen führte. Zudem zeigte sich ein pro-atherogener Effekt nach einer TLR2 Aktivierung [Schoneveld et al., 2005].

Somit deutet der aktuelle Stand der Forschung darauf hin, dass eine Hemmung des TLR2, bzw. eine TLR2 Defizienz im Tiermodell zu einer verbesserten kardialen Endothelfunktion führt. In der Folge sind eine verminderte Atherosklerose und eine reduzierte Apoptoserate der Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt mit einem verbesserten Überleben nach Herz-Kreislauf-Stillstand und Reanimation zu beobachten [Bergt et al., 2013; Favre et al., 2007; Sakata et al., 2007; Shishido et al., 2003]. Aufgrund der kumulativen Evidenz des günstigen Effekts einer TLR2 Inhibition für die vaskuläre Homöostase wird der TLR2 als therapeutisches Angriffsziel neuer pharmakologischer Behandlungsmöglichkeiten bereits diskutiert [Lin et al., 2009]. Dennoch ist der genaue Mechanismus des protektiven Effekts einer TLR2 Defizienz bzw. Inhibition auf die Neointimabildung nach Gefäßläsion sowie auf den funktionellen vaskulären Heilungsprozess noch unklar.

*In vitro* Studien unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass eine TLR2 Defizienz vergleichbare Effekte auf die Migration knochenmarkstämmiger Vorläuferzellen haben könnte, wie der für die Rekrutierung hämatopoetischer Zellen bekannte Mediator stromal cell derived factor-1 (SDF-1, auch CXCL12 genannt) und sein Rezeptor [Wagner et al., 2013a]. So konnten die protektiven Effekte einer TLR2 Inhibition in Zusammenhang mit einer verbesserten Angiogenese gebracht werden [Wagner et al., 2013a; Wagner et al., 2013b]. Es zeigte sich, dass eine TLR2 Inhibition bzw. Defizienz mit verstärkter Ischämie-induzierter Gefäßneubildung einhergeht; *in vivo* mit einer vermehrten Kapillarisation im murinen Hinterlaufischämiemodell und *in vitro* mit vermehrter Endothelzellmigration. Nach diesen Hinweisen eines günstigen Effekts einer TLR2 Blockade bzw. Defizienz auf Gefäßzellen, stellt sich die Frage welche Rolle der TLR2 im vaskulären Heilungsprozess des gesamten Gefäßes spielt. So könnte auch vermutet werden, dass gefäßwandeigene Zellen von einer Inhibition einer TLR2

vermittelte Entzündungsreaktion profitieren, und vermehrt zum vaskulären Heilungsprozess beitragen könnten. Die Bedeutung einer TLR2 Defizienz für die Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen ist bislang ungeklärt, könnte jedoch das Verständnis des TLR2 als möglichen therapeutischen Ansatz in der Prävention und Behandlung vaskulärer Erkrankungen maßgeblich erweitern. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Grundlage dieser Fragestellung.

### **1.3 Bedeutung der hämatopoetische Zellen für die Zusammensetzung der Neointima**

Nach der Geburt ist das Knochenmark der primäre Ort der Hämatopoese. Die aktuell gängigste Theorie postuliert, dass das hämatopoetische System hierarchisch aufgebaut ist, mit pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (engl. pluripotent hematopoietic stem cells, HSC), die sich zu verschiedenen Progenitorzellen differenzieren. HSC sind selten (1 zu 10.000 Knochenmarkzellen) und haben einen eher trägen Zellzyklus (<5 % sind in einem aktiven Zellzyklus) [Nahrendorf Matthias/Swirski Filip K., 2015]. Um sich zu differenzieren, sind die HSC auf extrinsische Signale angewiesen. Ein sensibles Gleichgewicht entsteht zwischen den einzelnen extrinsischen Komponente, die die Proliferation der HSC kontrollieren z.B. durch M-CSF, GM-CSF oder SDF-1 (Makrophagen- , Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierende Faktor) sezerniert durch Stromazellen, Endothelzellen, Osteoblasten und Makrophagen [Morrison/Scadden, 2014]. Die HSC sind in der Lage zirkulierende Gefahrensignale zu erkennen, u.a. Toll-like Rezeptor Liganden („DAMPS“), wie in der akuten Phase Reaktion bei einer Gewebeschädigung durch Sepsis oder auch bei chronischen Entzündungen, wie der Atherosklerose [Swirski/Nahrendorf, 2013].

Eine andere Theorie besagt, dass sich HSC direkt in glatte Muskelzellen differenzieren und somit signifikant an dem arteriellen „Remodeling“ beteiligt sind. Insbesondere eine große Ansammlung von glatten Muskelzellen, wie sie z.B. in der Neointima nachzuweisen sind, stammt am ehesten aus solch einer Differenzierung aus HSC in glatten Muskelzellen. Diese Vermutung wurde bereits durch *in vivo* und *in vitro* Studien bestätigt, jedoch ist der exakte Mechanismus noch unklar und somit auch die Rolle des TLR2 als extrinsischer Signalgeber [Sata et al., 2002a].

Die Neointima bzw. die Neointimahyperplasie ist formal ein Narbengewebe, das innerhalb eines Blutgefäßes nach einer Verletzung entsteht. Es handelt sich hierbei um eine Proliferation von glatten Muskelzellen in der Media. Häufig kommt es durch die rasche Muskelzellproliferation und der Aufhebung des Zellverbundes der Lamina elastica interna zu einer Fusion der Media und Intima. Die Neointimahyperplasie ist eine der häufigsten Ursachen für Restenosen nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie nach drei bis sechs Monaten [Zhu et al., 2000]. Eine Stentimplantation reduziert dieses Risiko deutlich, jedoch ist eine kausale Therapie der Neointimahyperplasie noch nicht verfügbar [Bult, 2000].

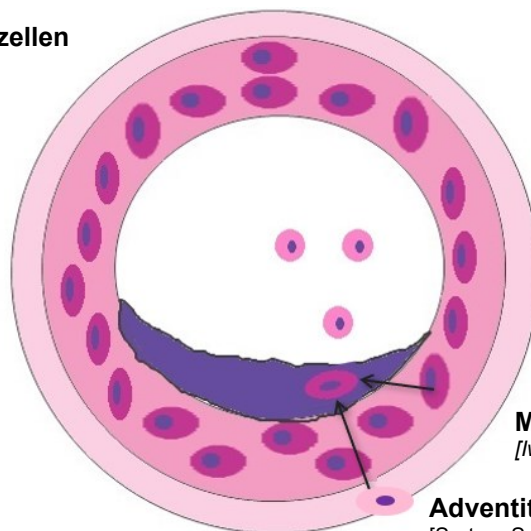
Die Arterienwand reagiert auf eine Verletzung mit einer Entzündungsreaktion analog der Response-to-injury Hypothese [Newby/Zaltsman, 2000]. Die Verletzung des arteriellen Endothels der Intima sowie der darunter gelegener Gefäßwandschichten resultieren in einer komplexen Entzündungsreaktion, im Rahmen dieser inflammatorischen und chemotaktischen Signale die zelluläre Komposition der Gefäßwand modulieren. Diese Signale interagieren sowohl mit gefäßwandeigenen, als auch mit im Blut zirkulierenden hämatopoetischen Vorläuferzellen [Mullick et al., 2005] (**Abb. 2**). Durch die Einwanderung glatter Muskelzellen kommt es zur Verdickung der

#### Differenzierung zu Endothelzellen

[Torsney & Xu 2011; Tsai et al. 2012]

#### Differenzierung zu SMC

[Saiura et al. 2001; Sata et al. 2002b; Shimizu et al. 2001]



#### Media: Migration der SMC

[Iwata & Sata 2008, Daniel et al., 2010]

#### Adventitia: Fibroblastendifferenzierung

[Sartore Saverio et al. 2001. Clowes et al., 1983]

#### Abbildung 2: Herkunft der Neointima

Exemplarische Darstellung eines arteriellen Gefäßquerschnitts mit Adventitia, Media und Neointima. Aus der Adventitia kann es zu einer Migration von Myelofibroblasten in die Intima kommen. Die Media, hauptsächlich bestehend aus glatten Muskelzellen, ermöglicht eine direkte Migration der ortsansässigen glatten Muskelzellen in die entstehende Neointima (smooth muscle cells, SMC) [Daniel et al., 2010; Clowes et al., 1983]. Eine weitere Quelle sind vermutlich die im Blut zirkulierende hämatopoetischen Zellen, im Speziellen die glatten Muskelprogenitorzellen (smooth muscle progenitor cells, SPCs) und die endothelialen Progenitorzellen (endothelial progenitor cells, EPCs), die sich zu glatten Muskelzellen differenzieren können und so einen entscheidenden Beitrag für die Neointimaformation bzw. für den vaskulären Heilungsprozess leisten könnten [Sata et al., 2002b].

superfiziellen, inneren Gefäßschichten, der sogenannte Intimahyperplasie oder Neointima [Hoglund et al., 2010]. Determiniert wird dieser Prozess durch die Interaktion zwischen Endothelzellen und Entzündungszellen. Diese Zellen bestimmen somit das Ausmaß der Narbenentstehung, Stenosebildung sowie der langfristigen Atheroskleroseprogression und den damit einhergehenden funktionellen Parametern des vaskulären Heilungsvorgangs.

In aktuellen Studien mit Cholesterinrezeptor defizienten Mäusen (LDL<sup>-/-</sup>) mit Spontanbildung atherosklerotischer Plaques konnte gezeigt werden, dass durch eine TLR2 Blockade eine Reduktion der Atheroskleroseprogression eintritt. Allerdings ist die Bedeutung des TLR2 für die Neointimabildung und den Heilungsprozess nach vaskulärer Verletzung noch unklar [Mullick et al., 2008]. Zahlreiche Studien zeigen, dass die Bildung der Neointima sowie der Reendothelialisierung des verletzten Gefäßes durch die Rekrutierung knochenmarkstämmiger Vorläuferzellen günstig beeinflusst wird [Tsai et al., 2009; Sata et al., 2002a].

Eine vermehrte Rekrutierung endothelialer Progenitorzellen in vaskuläre Läsionen bedeutet somit eine reduzierte Neointimabildung nach Gefäßverletzung, die mit einer verminderten luminalen Stenose des Gefäßes und damit erhaltender peripherer Durchblutung einhergehen könnte. Allerdings erweist sich auch die Gefäßwand selbst als Quelle einwandernder glatter Muskel- und Entzündungszellen in die verletzten Areale. Der genaue Beitrag und die modulierende Wirkung gefäßwandständiger im Vergleich zu knochenmarkstämmigen Vorläuferzellen, sowie deren Differenzierungspotential im Rahmen des vaskulären Heilungsvorgangs konnte bislang nur unvollständig identifiziert werden.

Die TLR spielen eine wichtige Rolle in der Initialisierung einer durch pathogene Keime oder Produkte zerfallender Zellen ausgelösten Entzündungsreaktion. Darüber hinaus lassen vorangegangene Studien sowie Vorbefunde unserer Arbeitsgruppe eine modulierende Funktion des TLR2 für die Reendothelialisierung sowie Rekrutierung knochenmarkstämmiger Vorläuferzellen vermuten.

Die Mobilisation von hämatopoetischen Zellen, im Speziellen die vaskulär aktiven Knochenmarkzellen sind in Zusammenhang mit Ischämien und der damit verbundenen Minderperfusion bereits vielfach beobachtet worden [Nervi et al., 2006]. Diese Beobachtungen konnten durch das Oberflächenmolekül cKit (auch: CD177 Antigen,

stem cell factor receptor, SCFR), dass ein wichtiger Marker für Stamm- und Progenitorzellen ist, gemacht werden. CD117-positive Zellen zeigen im Vergleich zu CD117-negativen Zellen im Tierversuch eine vermehrte Potenz zur Proliferation und Differenzierung zu Endothelzellen. Außerdem führen cKit-Liganden zu einer vermehrten Mobilisation vaskulär aktiver Knochenmarkzellen.

Insbesondere TLR2 defiziente cKit Zellen sind mit einer verstärkten Gefäßneubildung assoziiert und einer verminderten Neointimabildung nach arterieller Gefäßläsion [Wagner et al., 2013a; Takamiya et al., 2006]. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Wildtyp Mäuse im Hinterlaufischämiemodell mit intrakardial injizierten TLR2 defizienten cKit Zellen vergleichbare Temperaturen, wie Genotyp TLR2 defiziente Mäuse am 21. postoperativen Tag zeigen. Dieser Effekt konnte durch bloße Wildtyp cKit Injektion nicht reproduziert werden. Es lässt darauf schließen, dass hämatopoetischen Zellen die Vermittlung der protektiven Effekte einer TLR2 Defizienz beeinflussen.

#### **1.4 Ziele der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin die Bedeutung einer TLR2 Defizienz für den vaskulären Heilungsprozess nach arterieller Gefäßläsion durch chemische Endothelverletzung in der A. carotis communis der Maus zu untersuchen. TLR2 defiziente Mäuse (TLR2<sup>-/-</sup>) sollten dabei zunächst mit Wildtyp Tieren (WT) verglichen werden. Um den Einfluss gefäßwandeigener Zellen, mit dem aus dem Knochenmark in die Gefäßläsion rekrutierter Zellen genau differenzieren zu können, sollte darüber hinaus vor Induktion der arteriellen Verletzung TLR2 defizientes Knochenmark in WT Mäuse bzw. WT Knochenmark in TLR2 defiziente Mäuse nach Bestrahlung transplantiert werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob ähnliche Effekte durch TLR2 blockierende-Antikörpern erreicht werden können und auch *in vitro* reproduzierbar sind.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- Welche Bedeutung hat die TLR2 vermittelte, pro-inflammatorische Signaltransduktion in Atherosklerose?

Bedeutung einer genetischen TLR2 Defizienz für die Neointimabildung nach Gefäßverletzung in der Arteria carotis communis in der frühen Entstehungsphase der Atherosklerose

- Welche Rolle spielt eine TLR2 Defizienz in knochenmarkstämmigen Vorläuferzellen im Vergleich zu gefäßwandständigen Zellen für die Atherosklerosebildung bzw. Gefäßwandheilung nach arterieller Gefäßläsion? Bedeutung der Rekrutierung knochenmarkstämmiger Vorläuferzellen im Vergleich zu gefäßwandständigen Zellen bei der Vermittlung des heilungsfördernden Effektes einer TLR2 Defizienz in vaskulären Reparaturvorgängen
- Kann ein protektiver Effekt der genetischen TLR2 Defizienz durch exogen zugeführte TLR2 blockierende Antikörper nachvollzogen werden? Bedeutung blockierender TLR2 Antikörper auf die Neointimaformation in Wildtyp Mäusen und Effekt auf glatte Muskelzellen *in vitro*
- Welche Effekte haben TLR2 defiziente Knochenmarkzellen auf das Migrationsverhalten adulter glatter Muskelzellen *in vitro*? Bedeutung von TLR2 defiziente cKit-positive Knochenmarkzellen auf das Migrationsverhalten humaner glatter Muskelzellen im Migrationsmodell



## 2. Methoden und Materialien

### 2.1 Versuchstiere

Sämtliche Tierversuche wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern (LALLF) genehmigt (**Liste 1**) und nach der Nutzerordnung für die Zentrale Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock durchgeführt.

#### Liste 1: Aktenzeichen der Tierversuche

— AZ 72221.3-1.1-072/12

Die Tiere wurden jederzeit in ihrer Verhaltensweise beobachtet, auf Krankheitszeichen untersucht und regelmäßig gewogen. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum (Temperatur 22-24 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit) bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus in der Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) ad libitum gehalten.

Die transplantierten Mäuse wurden in einer SPF-(spezifisch pathogenfrei) nahen Haltung versorgt.

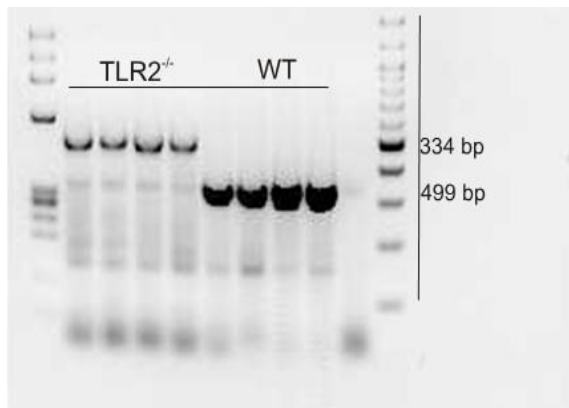
#### 2.1.1 Wildtyp Maus

Alle verwendeten Wildtyp Mäuse (Stamm C57BL/6J) waren sechs bis acht Wochen alte, männliche Tiere und stammten aus der Zucht der Zentralen Tierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universitätsmedizin Rostock.

#### 2.1.2 TLR2 defiziente Mäuse

Die TLR2 defizienten Mäuse (B6.129-Tlr2tm1Kir/J) wurden aus dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) kommerziell erworben. Die weitere Zucht fand im Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock statt, woraus auch die Tiere aus dieser Versuchsreihe stammten.

In unserem Labor konnte das funktionelle TLR2-knockout durch eine Detektion des defekten Gen-Produkts mittels qPCR verifiziert werden (**Abb. 3**).



**Abbildung 3: qPCR Analyse des TLR2 Genproduktes**

Aufgetragene vervielfachte Fragmente der PCR. Das TLR2 defiziente Genprodukt stellt sich als 334 bp dar und ist damit unvollständig. Die gesunde Bande ist im Vergleich als 499 bp Bande zu erkennen (WT).

Kurz zusammengefasst wurde DNA aus einer Gewebeprobe der Maus entnommen und aufgereinigt und auf 33 Zyklen mit spezifischen Primer Paaren a 45 sek (Sekunden) bei 94 °C, 45 sek bei 65 °C und zwei min (Minuten) bei 72 °C vervielfacht. Die Primer wurden dann genutzt, um die TLR2 DNA zu detektieren. Die PCR Produkte wurden in 3 % Agarose-Gel separiert und mittel Hilfe von Ethidiumbromid visualisiert.

## 2.2 Zellen

### 2.2.1 Zellkultur humaner glatter Muskelzellen

Die Zellkultur mit humanen glatten Muskelzellen der Aorta (Human Aortic Smooth Muscle Cells HAoSMC C-12533, Promocell, Heidelberg, Deutschland) erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Die Zellen wurden für jede Versuchsreihe neu aufgetaut, es wurden die Passagen zwei bis fünf genutzt. Dazu wurde eine Ampulle aus dem Stickstoffbehälter entnommen und diese bei 37 °C im Wasserbad (Grant, USA) zügig aufgetaut um anschließend die Zellen in 10 ml Vollmedium (**Tabelle 1**) zu überführen. Danach wurden die Zellen bei Raumtemperatur und 1300 rpm (revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute) für 5 min zentrifugiert (Zentrifuge, Allegra X-12R, Beckmann Coullter, Deutschland) und in neuem Medium resuspendiert um auf Zellkulturplatten (Ø 10 cm, TPP, Schweiz) aufgebracht zu werden. Zur Herstellung der nötigen Anhaftungsbedingungen wurden die neuen Platten zuvor mit 4 ml Attachment Factor (Life Technologies, Deutschland) behandelt. Das verwendete Nährmedium

wurde bei 2-8 °C gelagert und vor jeder Benutzung zunächst in einem 37 °C Wasserbad (Grant, USA) erwärmt.

Die Kulturbedingungen der Zellen (HAoSMC) wurden in 10 cm Zellschalen mit 8 ml Medium bei 37 °C in feuchter Atmosphäre und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung (CO<sub>2</sub>-Brutschrank Hera cell 150, Thermo Scientific, USA) sichergestellt.

Die Subkultivierung und Konfluenz der Zellen wurde regelmäßig unter dem Mikroskop (DMIL, Leica, Wetzlar, Deutschland) kontrolliert, bei Erreichen einer 70-80 %igen Konfluenz wurden die Platten passagiert. Die Passage erfolgte durch eine zweiminütige Inkubation mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (0,02 % EDTA + 0,05 % Trypsin, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One, USA) überführt und anschließend für 5 min bei 1200 rpm unter Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellresuspension mit 8 ml Medium auf neue Platten aufgetragen.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Deutschland) im Lichtmikroskop bestimmt, wobei vier Großquadrate mit je 0,01 µl Volumen ausgezählt wurden. Die durchschnittliche Anzahl der Zellen je Großquadrat mit 10.000 multipliziert, ergab die Anzahl der Zellen in einem Milliliter.

**Tabelle 1: Zusammensetzung Nährmedium (Vollmedium)**

<b>Basalmedium:</b>	
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2, C-22062, Promocell; Heidelberg, Deutschland	
<b>Zusätze:</b>	<b>Konzentration:</b>
Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal growth factor)	0,5 ng/ml
Fibroblasten Wachstumsfaktor (Basic Fibroblast Growth Factor, recombinant human)	2,0 ng/ml
Fetales Kälberserum (Fetal calf serum (FCS))	0,05 ml/ml
Insulin (recombinant human)	5 µg/ml
Penicillin (100 U/ml)- Streptomycin	100 µg/ml

### 2.2.2 Isolation der Knochenmarkzellen aus der Maus

TLR2<sup>-/-</sup> und WT Mäuse wurden mittels inhalativer Isoflurannarkose betäubt. Rasur und Hautdesinfektion der Hinterläufe erfolgte unmittelbar vor dem Genickbruch. Auf dem

aseptischen Arbeitsplatz wurden die Mäuse mit Pflasterband fixiert. Distal des Kniegelenks erfolgte die initiale Inzision, die apikal unter Berücksichtigung der anatomischen Gegebenheiten (A. femoralis) bis zur Leiste fortgeführt wurde und distal bis zur Achillessehne. Die Tibia und das Femur wurden vorsichtig freigelegt. Das Kniegelenk wurde mithilfe einer Knochenschere exartikuliert um anschließend das Femur und die Tibia vom umliegenden Gewebe zu befreien und für die nächsten Schritte vorzubereiten. Diese Präparation erfolgte beidseits. Alle anschließenden Arbeiten wurden aseptisch und auf Eis durchgeführt.

Die Knochen wurden zunächst in Phosphatgepufferte-Kochsalzlösung (PBS, PAA) gelagert. Ein vorher angesetzter Puffer (Hank's balancierte Salzlösung, HBSS mit 1 %igem ACD-A Stabilisator: **Tabelle 2, 3**) wurde in 1 ml Spritzen (1 ml Omnican F, Braun, Deutschland) aufgezogen. Die vorher gesammelten Knochen wurden proximal und distal mit einer Knochenschere aufgeschnitten und der nun ersichtliche Knochenmarkkanal mit zwei Spritzen zu je 1 ml durchgespült. Das darin befindliche Knochenmark wurde in ein 50 ml Falcon Röhrchen (Greiner Bio-One, USA) aufgefangen und nach Genotyp gepoolt.

Die Knochenmarksuspension wurde unter einer Sterilbank resuspendiert (Hera Safe, Kendro, Deutschland) und dann über ein 40 µm Nylonsieb (BD Bioscience, USA) in ein neues Falcon Tube überführt.

**Tabelle 2: Zusammensetzung Pufferlösung**

<b>Basalmedium:</b>	
GIBCO® Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ohne Mg <sup>2+</sup> / Ca <sup>2+</sup>	
<b>Zusätze:</b>	<b>Konzentration:</b>
Kaliumchlorid (KCl)	0,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,06 g
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	0,35 g
Natriumchlorid (NaCl)	8,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,04788 g
D-Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	1,0 g
Ad 1.000 ml Aqua destillata (steril)	

**Tabelle 3: ACD-A Stabilisator zur Gerinnungshemmung**

<b>Basalmedium:</b>	
Acid-Citrate-Dextrose-A, C3821, Sigma-Aldrich	
<b>Zusätze:</b>	<b>Konzentration:</b>
Natriumcitrat* H <sub>2</sub> O (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )	22,0 g
Citronensäure (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> )	7,3 g
D-Glucose* H <sub>2</sub> O (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	24,5 g
Ad 1.000 ml Aqua destillata (steril)	

### **2.1.2.1 Knochenmarkzellen für die Knochenmarktransplantation**

Die Zellen wurden 10 min bei 1.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes mit HBSS resuspendiert und erneut in der genannten Weise zentrifugiert. Nun erfolgte die Zellzählung mithilfe der Neubauer Zählkammer (Marienfeld, Deutschland).

Durchschnittlich enthielt ein Pellet Knochenmark von zwei Mäusen  $1 \times 10^8$  Zellen. Dieses Pellet war ausreichend für vier bestrahlte Mäuse.

### **2.1.2.2 Knochenmarkzellen-Isolation mithilfe des MACS-Systems**

Nach der ersten Zellzählung mit einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen zentrifugiert (1300 rpm, 21 °C für 5 min). Das entstandene Zellpellet wurde in Vorbereitung für die Antikörper-Bindung in 80 µl Puffer (MACS-Puffer: **Tabelle 4**) und 20 µl magnetischen CD117 Antikörpern (CD117 MicroBeads mouse Isotyp rat IgG2b; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Deutschland) pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert und für 20 min bei 4 °C inkubiert.

Alle weiteren Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt.

Das MACS-System mit MicroBead Technologie (Magnetic Cell Isolation and Cell Separation, Miltenyi Biotec, USA: **Abb. 4**) bestehend aus einem Magneten innerhalb einer Halterung inkl. Separator (OctoMACS Separation Unit), in dem sich die Säulen mit magnetischen Kanälen (25 MS Säulen) befinden, wurde mit dem selbst angesetzten MACS Puffer durchspült. Die MACS MicroBeads sind 50 nm große, supermagnetische Partikel, die an Antikörper konjugiert sind und somit sehr spezifisch

an Antigene oder Zelloberflächen binden können. Die Säulen besitzen ein ferromagnetisches Feld, das zu einem hohen Gradienten innerhalb der Säulen führt. Dadurch wird eine genaue Zellseparation ermöglicht. So wurden die nun Antikörper-gebundenen Zellen nach der Inkubation erneut zentrifugiert, in 500 µl MACS Puffer resuspendiert und in die vorbereiteten Säulen pipettiert. Anschließend wurde die Zellsuspension innerhalb der Säule mit dreimaliger Hinzugabe von 500 µl Puffer gespült. Hiermit wurde die Auswaschung der negativen Fraktion sichergestellt (nicht-gebundene Zellen). Die magnetisch-gebundenen Zellen befanden sich weiterhin innerhalb der Säule und wurden mit dem mitgelieferten Stempel und 1 ml Puffer ausgedrückt. Die positive Fraktion (Antikörper-gebundene Zellen) wurde aufgefangen und die gewonnenen Zellen waren nun selektiv CD117 positiv und bereit für die weiteren *in vitro* Versuche.

**Tabelle 4: MACS-Puffer**

<b>Basalmedium:</b>	
250 ml Phosphatgepufferte-Kochsalzlösung (PBS), PAA	
<b>Zusätze:</b>	<b>Konzentration/Gewicht:</b>
EDTA	2 mM/0,19 g
Bovines Serumalbumin (BSA)	0,5 %/1,25 g



**Abbildung 4: MACS-System**

Dargestellt ist das MACS-System mit magnetischem Separator (orange) mit innen-liegenden magnetischen Säulen und unterhalb der Säulen befindlichen 15 ml Röhrrchen zum Auffangen der zunächst negativen und dann positiven Fraktionen.

Bildnachweis: Broschüre Miltenyi Biotec, Deutschland

## 2.3 *In vivo* Versuche

### 2.3.1 Eisenchlorid-induzierte Thrombose Mausmodell

Das murine Eisenchlorid-Modell erlaubt die differentielle Untersuchung des vaskulären Heilungsprozesses durch die definierte Induktion einer Gefäßläsion und nachfolgender Bildung einer Neointima [Li et al., 2013; Schäfer Katrin et al., 2006].

Untersucht wurden die Größe der Neointimadicke, -fläche und der Grad der luminalen Stenose bei Wildtyp- (WT) im Vergleich zu Toll-like Rezeptor 2 defizienten (TLR2<sup>-/-</sup>) Mäusen. Die Karotiden wurden drei Wochen nach der Operation entnommen und in Hämatoxylin-Eosin-, sowie  $\alpha$ -SMA (alpha-smooth muscle actin) Färbung histologisch untersucht (**Abb. 5**).

#### Präoperative Phase:

Vor jedem Eingriff wurden die acht bis zwölf Wochen alten Mäuse gewogen und anschließend erfolgte die gewichtsadaptierte, intraperitoneale Injektionsnarkose durch Injektion eines Gemisches aus 100mg/kg Ketamin-Hydrochlorid (Pharmanovo GmbH; Hannover, Deutschland), 8 mg/g Xylazin-Hydrochlorid (CP-Pharma; Burgdorf, Deutschland) und 0,9 %iger Kochsalzlösung nach einem etablierten Schema.

#### Durchführung der Eisen(III)-chlorid-Verletzung:

Die Operation wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Dauer des Eingriffs betrug 20 min.

Nach Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe, definiert als eine Atemfrequenz von 60-80/ min und fehlender Reaktion auf Schmerzreize, wurde die Maus in Rückenlage auf einer Wärmeplatte unter dem Operationsmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) platziert und an den Extremitäten mit hautverträglichem Pflaster (2 cm × 0,5 cm) fixiert. Nach Rasur und Desinfektion des Operationfeldes wurde zum Zwecke der Gefäßläsion an der Arteria carotis communis sinistra, eine mediane Hautinzision vom Trigonum submentale bis hin zur Fossa jugularis am Sternum durchgeführt. Die zunächst visualisierte Struktur war die paarig angelegte submaxillare Speicheldrüse, die durch eine Faszie verbunden ist. Diese konnte stumpf durchtrennt werden und Trachea und Manubrium waren sichtbar. Nach Luxation der linken submaxillaren Speicheldrüse und Visualisierung der V. jugularis, konnte die weitere stumpfe Präparation bis zur linken Karotis erfolgen. Die Faszie zwischen

M. sternocleidomastoideus und M. omohyoideus wurde mithilfe einer Pinzette durchtrennt. Der linke M. sternocleidomastoideus wurde durch eine Naht (silk Prolene 6-0, Ethicon, USA) angeschlingt und leicht zur Seite gezogen, um die darunterliegende A. carotis com. freizulegen. Dieser Schritt musste mit äußerster Vorsicht durchgeführt werden um die V. jugularis, die lateral des M. sternocleidomastoideus liegt, nicht zu verletzen. Der sehr dünne M. omohyoideus, der ggf. die A. carotis com. verdeckt, wurde durchtrennt. Der mit der Arterie in einem Bindegewebemantel liegende N. vagus wurde vorsichtig dissektiert. Entscheidend für die richtige Diffusion des Eisen(III)-chlorides war die vollständige Entfernung allen Bindegewebes von der A. carotis com. Das freiliegende Gefäß wurde angeschlingt (silk Prolene 10-0, Ethicon, USA) und bis zur Karotidgabel freipräpariert. Da bereits ein mechanisches Trauma zu einer direkten Gefäßverletzung und somit zu Thrombosformation führen kann, wurde das Gefäß vor der chemischen Gefäßverletzung kontrolliert und ständig visualisiert. Ein in 10 % Eisen(III)-chlorid-Lösung getränktes Stück Filterpapier (1,5 x 2,0 mm) wurde für drei Minuten auf die Oberfläche der A. carotis com. unmittelbar distal der Karotidgabel platziert. Die Fläche um das Gefäß wurde mittels trockenen Filterpapiers vorher präpariert, um einen Kapillareffekt zu vermeiden. Nach drei Minuten wurde das getränkte Filterpapier vorsichtig entfernt und die Wunde sorgfältig mit 0,9 % NaCl-Lösung gespült. Der Wundverschluss erfolgte mit 6-0 Nylonfaden (silk Prolene, Ethicon, USA).

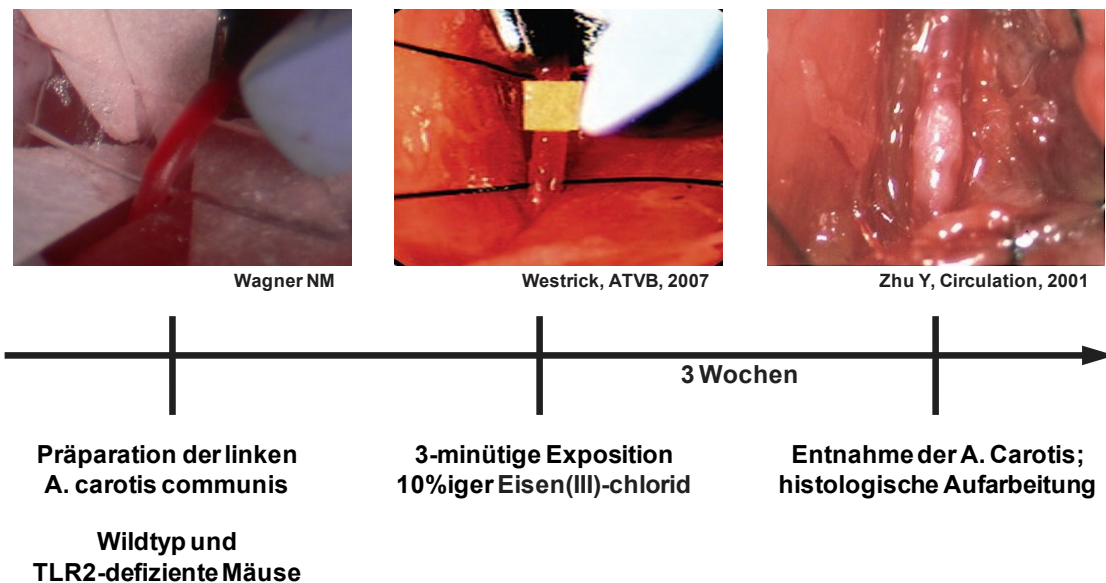
#### Postoperative Phase:

Postoperativ wurden die Mäuse unter einer Wärmelampe platziert und bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose beobachtet.

#### Gewebeentnahme:

Drei Wochen nach Induktion der Gefäßverletzung an der A. carotis com. sinistra wurden die Mäuse zunächst mit einer Isoflurannarkose (5 Vol.-% mit 3 l/min Sauerstofffluss; Isotec 5 Isofluran Cirrus Trans, Datex Engstrom, Deutschland) betäubt und anschließend die A. carotis com. sinistra erneut freipräpariert und nach systemischer Perfusion mit PBS und 4 %iger Zinkformalin-Lösung zur histologischen Untersuchung entnommen. Als Kontrolle wurde die rechte Karotide entnommen und histologisch mitgeführt.





### Abbildung 5: Fließschema des murinen Eisen(III)-chlorid-induzierten Thrombosemodells

Obere Bildreihe: Darstellung der A. carotis vor Gefäßverletzungsinduktion, währenddessen und drei Wochen nach Induktion [Westrick Randal J. et al., 2007; Zhu et al., 2001].

### 2.3.2 Knochenmarktransplantation

Zur Differenzierung der in die Gefäßläsion rekrutierten Zellen zwischen gefäßwandeigenen - und knochenmarkstämmigen Zellen, erfolgte eine Knochenmarktransplantation (**Abb. 6**).

#### Knochenmarkentnahme:

Mäuse im Alter von acht Wochen wurden unter inhalativer Isoflurannarkose mittels Genickbruch euthanasiert. Anschließend erfolgte zur Gewinnung des Knochenmarks die Entnahme und Durchspülung von Femur und Tibia beidseits (s. 2.2.2).

#### Bestrahlung:

Zur Bestrahlung und Rekonstitution des Knochenmarks wurden ausschließlich mindestens acht Wochen alte, gesunde Tiere ohne Hinweise auf Krankheitszeichen und mit einem Mindestgewicht von 20 g herangezogen.

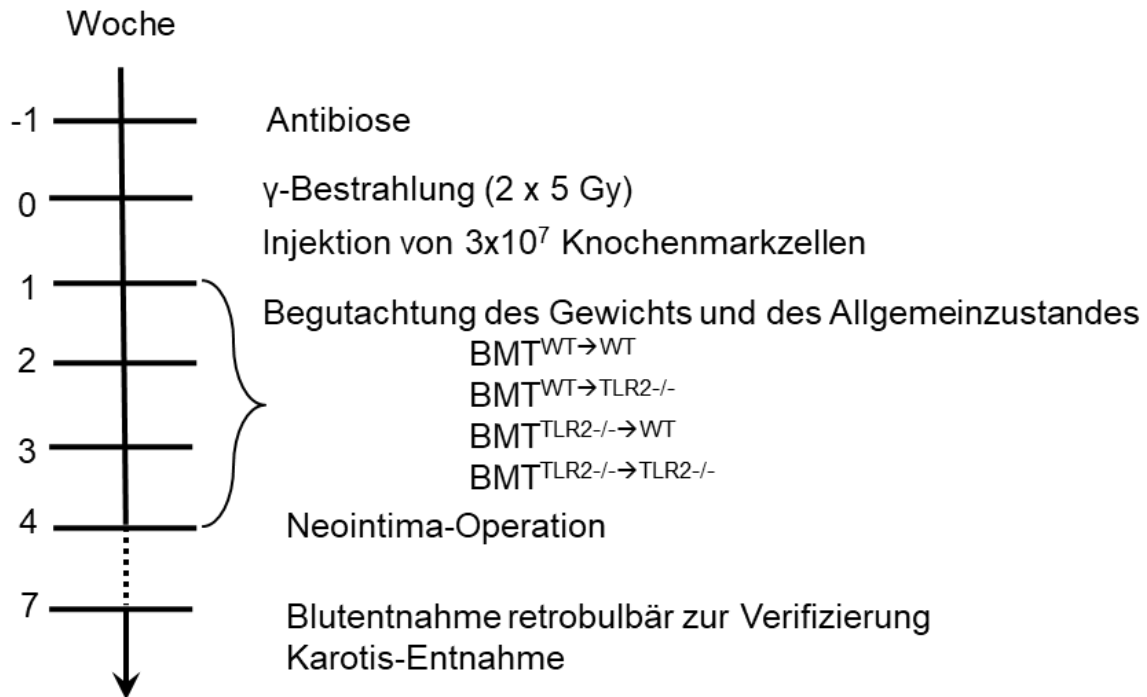
Die Knochenmark-ablative Bestrahlung erfolgte BiD (lat.: bis in die, dt.: zweimal täglich), 5,0 Gy pro Fraktion, d.h. zwei Bestrahlungen wurden im Abstand von vier Stunden an einem Tag appliziert. Es wurde mit einer Gesamtstrahlendosis von 10,0 Gy mit Hilfe einer Caesium(<sup>137</sup>Cs)- Gammastrahlenquelle bestrahlt. Nach einer 24-stündigen Ruhephase, wurden mittels Insulinspritze in jedes

Versuchstier  $1 \times 10^7$  Knochenmarkzellen in maximal 350  $\mu$ l Injektionslösung in die Schwanzvene unter Ether-Narkose appliziert.

#### Nachsorge:

Die Versuchstiere ruhten vier Wochen unter Beobachtungen mit täglichen Gewichtskontrollen in einer SPF-nahen Haltung, bevor die Gefäßläsion induziert wurde. Die Infektionsgefahr der Mäuse wurde durch die SPF-nahe Haltung, autoklaviertes Futter, Wasser und Einstreumaterial geringgehalten. Eine prophylaktische antibiotische Behandlung mit Ciprofloxacin im Trinkwasser (Ciprobay, Bayer 200 mg/ 100 ml Infusionslösung; 5ml der Infusionslösung in 100 ml autoklaviertes Trinkwasser) erfolgte eine Woche vor und zwei Wochen nach der Knochenmarktransplantation. Vier Wochen nach der Knochenmarktransplantation erfolgte die erste geplante Operation zur Gefäßverletzungsinduktion mittels Eisen(III)-chlorid.

Nach drei Wochen wurden auch hier die Karotiden entnommen und aufgearbeitet. Kurz vor der zweiten Operation (Karotisentnahme) wurde zudem eine geringe Menge Blut entnommen, um die Anwesenheit des TLR2 Rezeptor Gens in TLR2 defizienten bzw. genetischen TLR2-knockouts in Wildtyp Tieren mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in Knochenmarkstämmigen, peripheren Blutzellen zu verifizieren. Die Blutentnahme erfolgte aus dem retrobulbären Venenplexus unter Isofluran-Kurzarkose. Die nötige Stauung der Halsvenen erreichte man durch einen Nackengriff um anschließend den Venenplexus über den inneren Augenwinkel unter leicht drehender Bewegung mit einer heparinisierten Kapillare (Hämatokrit-Kapillaren, heparinisiert, Außendurchmesser 0,8 mm Firma Hecht Karl) zu erreichen und zu punktieren. Vor Entfernung der Kapillare lockerte man den Nackengriff, um Blutungen in das Gewebe zu vermeiden (Nachweis: Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT). Es wurden 500  $\mu$ l Blut in ein Lithium-Heparin Röhrchen gegeben (Microvette® 500  $\mu$ l, Lithium-Heparin, Sarstedt, Deutschland) und bei -70 °C eingefroren (weiteres Vorgehen s. 2.3.4).

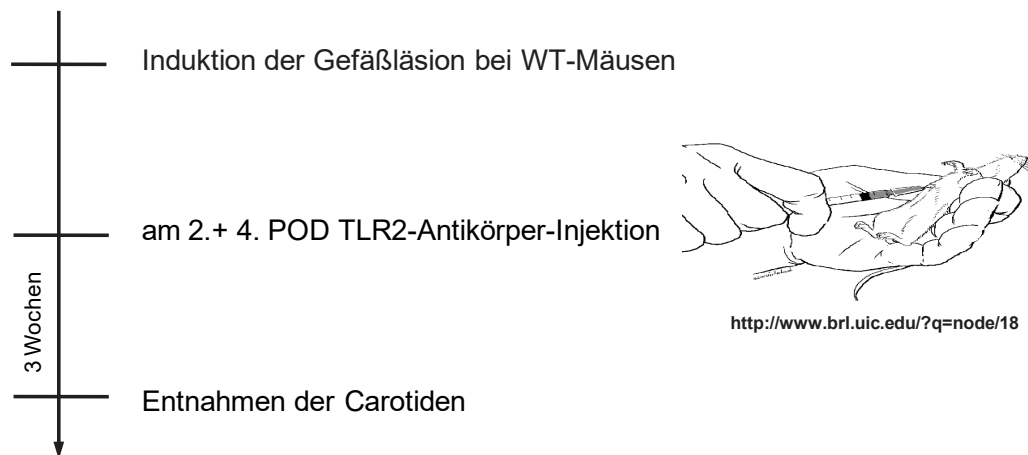


**Abbildung 6: Fließschema der Knochenmarktransplantation**

Die Mäuse wurden eine Woche vor der geplanten Knochenmarktransplantation von der SPF- in die SPF-nahe Haltung überführt. Die prophylaktische Antibiose mit Ciprofloxacin wurde begonnen. Nach der Bestrahlung erfolgte die Injektion der Knochenmarkzellen. Anschließend begann eine vierwöchige Regenerationsphase der Versuchstiere bis zur operativen Thromboseinduktion. Zur Verifizierung des intakten, bzw. defizienten TLR2 Gens wurde unmittelbar vor der zweiten Operation eine Blutentnahme durchgeführt. Der weitere Verlauf entspricht dem murinen Eisenchlorid-induzierten Thrombosemodell.

### 2.3.3 Systemische Applikation eines TLR2 Antikörpers

Zur Evaluation einer möglichen therapeutischen Anwendung der Reendothelialisierung, z.B. zur Therapie nach einem Myokardinfarkt oder Apoplexie, wurden am zweiten und vierten postoperativen Tag nach der thromboseinduzierenden Operation die WT Mäuse mit Isoflurannarkose betäubt und mit 50 µg anti-TLR2 Antikörper (anti-Maus/human CD282/TLR2 Antikörper clone T2.5, eBioscience, USA) behandelt. Intrakardial wurde der Antikörper in der Dosierung 5 mg/kg NaCl 0,9 % appliziert, die WT Mäuse der Kontrollgruppe bekamen 5 mg/kg NaCl 0,9 %. Die Versuchstiere wurden auf einer Wärmeplatte platziert und 100 µl der oben genannten Lösungen mit einer Insulinnadel (Braun, Deutschland) in den linken Ventrikel injiziert (**Abb. 7**).



**Abbildung 7: Fließschema der systemischen TLR2 Antikörper Injektion**  
 POD: postoperative day, engl. für postoperativer Tag

### 2.3.4 DNA-Extraktion zur Verifikation des TLR2 defizienten Genotyps

Den transplantierten und narkotisierten Versuchstieren wurde vor Beginn der Neointima-Operation, aus dem retroorbitalen Venenplexus in oben genannter Technik Blut entnommen. Die Vollblutproben wurden in Lithium-Heparin Röhrchen bei -70 °C bis zur weiteren Aufarbeitung tiefgefroren.

Die tiefgefrorenen Blutproben wurden aufgetaut, mit Standard Citratpuffer (SSC, Saline Sodium Citrate) vermengt und für eine Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit Natriumacetat vermischt und in 10 % SDS (sodium dodecyl sulfat) Detergens und Proteinase K (20 mg/ml H<sub>2</sub>O) resuspendiert. Die Mischung wurde einmalig erhitzt auf 55 °C und dann für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol-Lösung erfolgte die Trennung in eine hydrophile und eine lipophile Phase. Nach Zentrifugation wurde die hydrophile Phase in ein neues Röhrchen überführt. Die Probe inkubierte 15 min bei -20 °C. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Ethanolüberstand verworfen. TE-Puffer (tris/EDTA- Puffer) wurde hinzugefügt und die Probe wurde bei 55 °C inkubiert. Eine erneute Extraktion mittels Ethanol erfolgte. Das so entstandene Pellet wurde getrocknet in TE-Puffer erneut resuspendiert und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Mit der so extrahierten DNA-Probe erfolgte eine PCR und die Auftragung im Northern Blot wie unter Punkt 2.1.2 beschrieben.

### **2.3.5 Histologie und Immunhistochemie**

Drei Wochen nach operativer Thrombose-Induktion wurden die Versuchstiere wie zuvor beschrieben anästhesiert, die Karotiden visualisiert und freipräpariert. Anschließend wurden die Mäuse mit physiologischer Kochsalzlösung und Phosphatgepuffertem Formalin (Formafix 4 %) direkt in den linken Ventrikel infundiert und die Karotiden entnommen. Die vorfixierten Karotiden wurden über zwei Tage in Formalin weiter fixiert und über Nacht in 70 % Ethanol bei 4 °C aufgereinigt. Nach Fixation und Aufreinigung wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet und die Schnitte am Paraffinblock durchgeführt. Beginnend unmittelbar proximal der Karotisbifurkation erfolgten fünf 5 µm-Schnitte in einem Abstand von 200 µm. Zur Visualisierung der glatten Muskelzellen in der Neointima und Intima wurde ein polyklonaler anti-Maus  $\alpha$ -actin Antikörper, der die glatten Muskelzellen visualisiert (hier vereinfacht nur noch als  $\alpha$ -SMA aufgeführt) verwendet (rabbit polyclonal anti-mouse  $\alpha$ -actin antibody, Dako, Denmark). Dafür wurde der Antikörper in einer Verdünnung 1:50 für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und mit aminoethyl-carbazole (AEC) Reagens (Zytomed) sichtbar gemacht.

Für eine morphometrische Analyse wurden die Paraffinschnitte mit H.E. gefärbt und mittels einer Bildanalysesoftware (ImagePro Plus, Media Cybernetics, United Kingdom) analysiert. Dafür wurden die fünf seriellen Schnitte der Arterie ausgewertet. Die Resultate wurden für jedes Tier gemittelt angegeben.

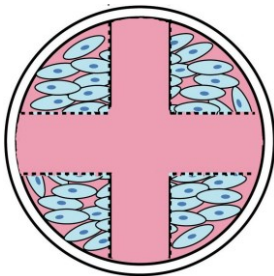
### **2.4 *In vitro* Versuche: Migrations-Modell**

Um das Migrationsverhalten von glatten Muskelzellen in Anwesenheit von Knochenmarkzellen zu beobachten und somit einen möglichen Rückschluss auf einen Rezeptorweg zwischen dem TLR2 auf den glatten Muskelzellen und der Knochenmarkzellen zu evaluieren, wurde das Wound-Scratch Assay als Migrationsmodell *in vitro* angewandt [Wagner et al., 2013a; Wong/Gotlieb, 1988].

Um eine Zelldichte von etwa 15.000 Zellen/ cm<sup>2</sup> zu erreichen wurden ca. 55.000 Zellen pro Well innerhalb der 12-Wellplatte (Greiner-Bio One) ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz im Vollmedium inkubiert. Im Anschluss wurden nach Entnahme des Vollmediums und zwei Spülvorgängen mit PBS, in die einzelnen Kavitäten mit Zellrasen mithilfe einer sterilen 1 µl Pipettenspitze (Eppendorf AG,

Deutschland) zwei Linien orthogonal zueinander (**Abb. 8**) gekratzt. Die einzelnen Wells wurden im Anschluss mit 500 µl serumarmen Hungermedium mit 0,5 % FCS (fetal calf serum, engl. für fetales Kälberserum, Hungermedium: Basalmedium der glatten Muskelzellen (C-22062, Promocell, Heidelberg, Deutschland) mit Zusatz von nur 0,5 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin) befüllt und die entsprechenden Testsubstanzen bzw. Zellen (**Liste 2**) hinzugefügt. Durch das Hungermedium wurde eine unspezifische Aktivierung der Zellen verhindert.

Die durch den Kratzvorgang von Zellen befreiten Areale wurden nach der Aussaat und nach zwölf und 24 Stunden mittels Durchlichtmikroskop (Leica, Wetzlar Deutschland) fotografiert. Der längere Beobachtungszeitraum ist aufgrund der langsamen Proliferationsrate der glatten Muskelzellen gewählt worden. Die Auswertung erfolgte in der Image-Pro Plus Win4 Software (Version 4.5.0.29, Media Cybernetics; Rockville, USA). Dabei wurde die Streckenlänge zwischen den entstandenen Wundrändern der Kreuze gemessen und daraus der Mittelwert bestimmt, somit ergeben sich vier Messwerte pro Zeitpunkt.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Wells im Migrations-Modell/Wound-Scratch Assay**  
Beobachtung des Migrationsverhaltens in den von den Zellen befreitem Areal.

#### Liste 2: Verwendete Reagenzien in den *in vitro*-Modellen

- **Kontroll-IgG** (Purifiziertes anti-Rat IgG; R&D Systems; USA)
- **Tumornekrose Factor  $\alpha$**  (Rekombinantes humanes TNF- $\alpha$ , R&D Systems)
- **Monoklonaler anti-Maus/human CD282/TLR2 Antikörper** (T2.5; eBioscience, USA)
- **Pam3CSK4** (TLR1/2 Ligand, Version # 11C21-MM) und **Pam2CSK4** (TLR2/6 Ligand, Version # 12A27-MM; beide Invivogen, USA)
- **Lipoteichonsäure** (TLR4 Ligand, aus Staphylococcus aureus; L 2515 Sigma-Aldrich, MO USA)

#### Verwendete Zellen in den *in vitro*-Modellen

- **Wildtyp Knochenmarkzellen** (CD 117<sup>+</sup> Zellen, Isolation s. 2.1.2.2)
- **TLR2<sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen** (CD 117<sup>+</sup> Zellen, Isolation s. 2.1.2.2)

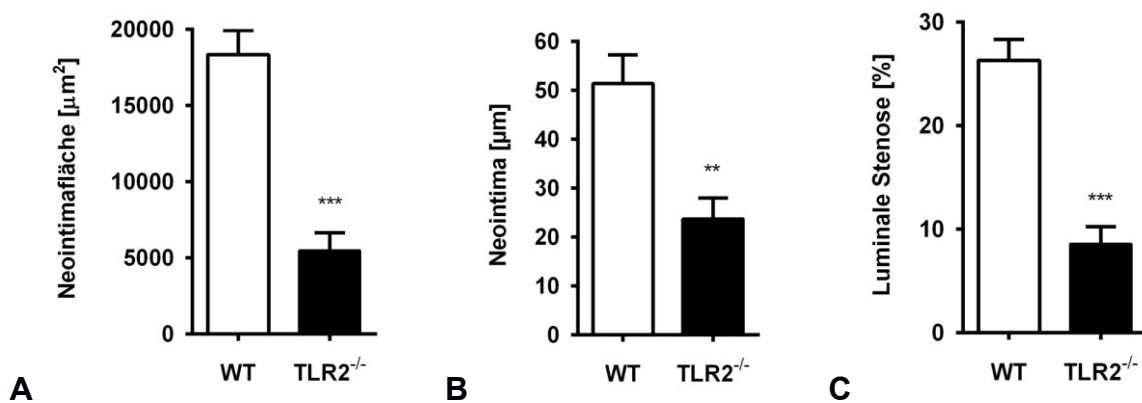
## **2.5 Statistische Auswertung**

Die Ergebnisse werden alle als Säulendiagramm mit einem Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (engl. standard error of the mean, kurz: SEM) angegeben. Für den Vergleich von quantitativen Werten zwischen zwei Mittelwerten wurde der Student's t-test genutzt. Für den Vergleich von mehr als zwei Werten wurde ein One-Way ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur angewendet. Ein P-Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen. Sämtliche statistische Auswertungen wurden mit der Graph Pad Prism Software 4.01 (Graph Pad, USA) durchgeführt.

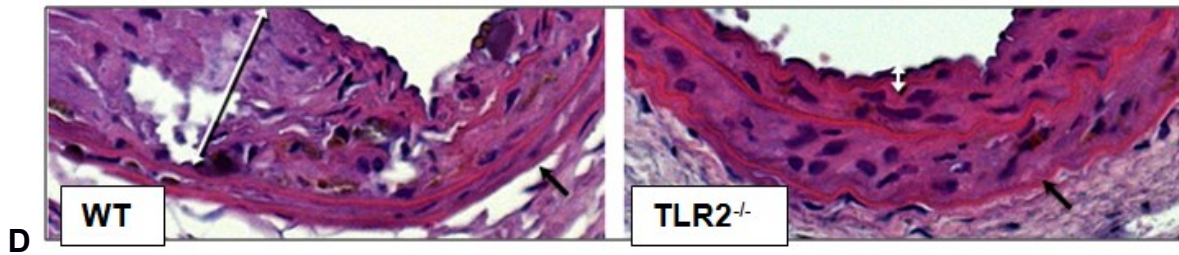
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 TLR2 Defizienz ist mit reduzierter neointimaler Läsion assoziiert

Die lokale arterielle Entzündung, die zu einem „Remodeling“ des vaskulären Gefäßes führt, gehört zu den ersten Schritten der Atherosklerose. Das Eisenchlorid-Modell erlaubt die morphometrische Untersuchung der Gefäßläsionen der TLR2<sup>-/-</sup> Tiere und Wildtypiere, die als Kontrollgruppe fungiert. Die Neointimafläche der TLR2<sup>-/-</sup> Mäuse fiel im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringer aus (5906  $\mu\text{m}^2$  vs. 18233  $\mu\text{m}^2$ ;  $P < 0,001$ ; **Abb. 9A**), sodass nach drei Wochen eine fast vollständige Reendothelialisierung stattfand. Bei der Betrachtung der Neointimadicke zeigte sich eine signifikant geringe Dicke der TLR2<sup>-/-</sup> Mäuse mit einem Median von 24,42  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu 53,28  $\mu\text{m}$  in den WT Mäusen ( $P < 0,01$ ; **Abb. 9B**). Aus den oben genannten Beobachtungen ergibt sich ergo eine signifikant geringere luminalen Stenose in TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen (9,17 % vs. 26,22 %;  $P < 0,001$ ; **Abb. 9C**). Zusammenfassend führte im Eisenchlorid-Modell im Vergleich zur Kontrollgruppe der WT Mäuse eine TLR2 Defizienz zu einer Verminderung der Neointimadicke und Neointimafläche, sowie der luminalen Stenose (**Abb. 9**).







**Abbildung 9: Genetische TLR2 Defizienz reduziert die Neointimahyperplasie nach arterieller Gefäßläsion**

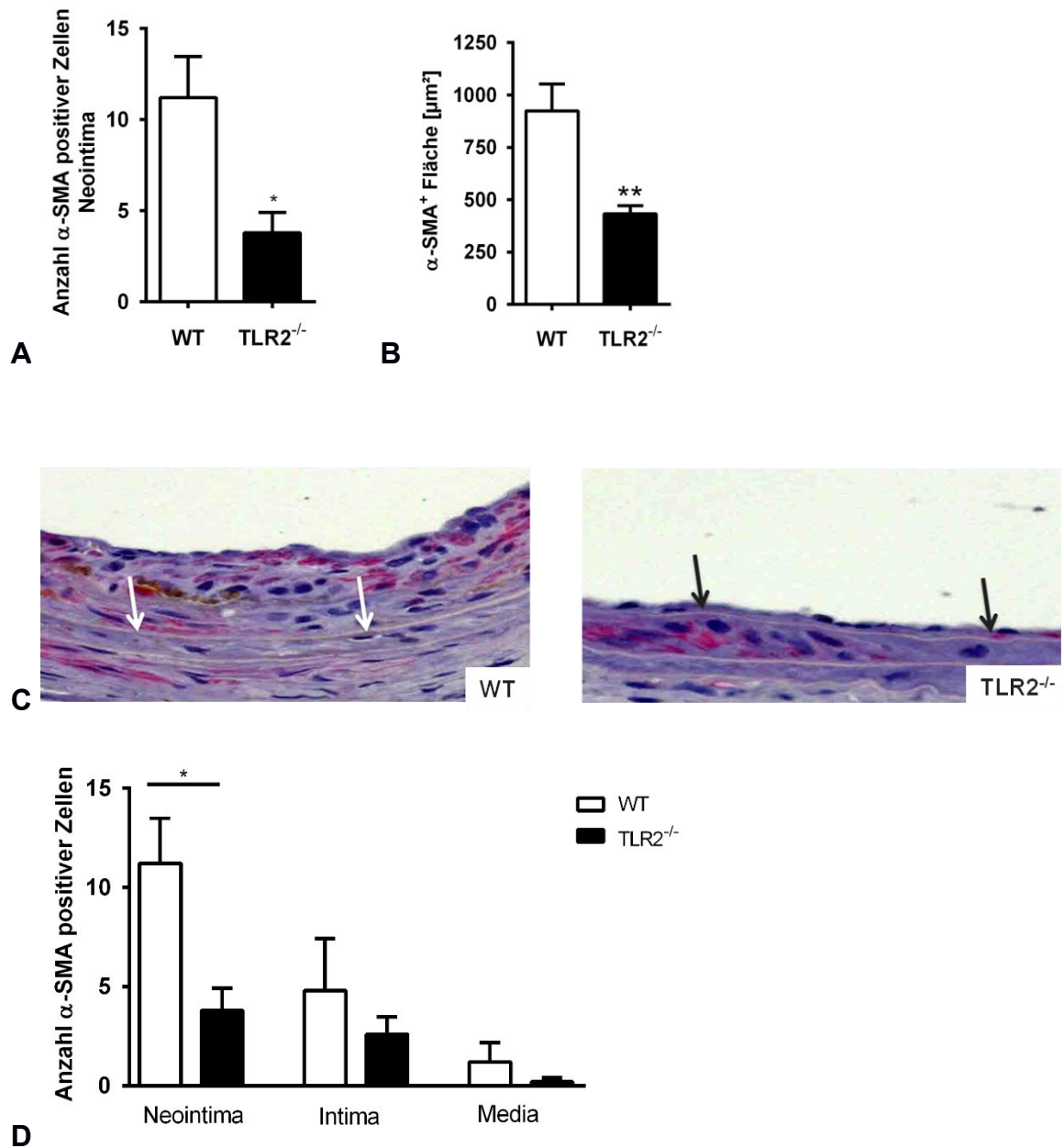
**A** Morphometrische Analyse: Quantifizierung der Resultate durch Ausmessen der Fläche und **B** der Dicke der Neointima, sowie **C** der luminalen Stenose an HE Schnitten. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM  $**P < 0,01$  und  $***P < 0,001$ ;  $n=8$  im Student's t-Test

**D** Repräsentative vergrößerte Gefäßausschnitte der A. carotis com. sinistra in HE-Färbung von einer WT Maus und einer TLR2 defizienten Maus; weiße Pfeile zeigen die Ausdehnung der Neointima, schwarze Pfeile markieren die Lamina elastica externa.

1.000-fache Vergrößerung

### 3.2 TLR2 Defizienz geht mit reduzierter Anzahl und Fläche glatter Muskelzellen in der Neointima einher

Um die Zusammensetzung der Zellen innerhalb der Neointima aufzuschlüsseln, wurde ein  $\alpha$ -SMA monoklonale Antikörper verwendet; einen etablierten Marker für glatte Muskelzellen. Innerhalb der neointimalen Läsion der TLR2<sup>-/-</sup> Tiere zeigte sich, im Vergleich zu den Wildtyp Tieren, eine signifikante Reduktion der Anzahl (Median drei Zellen vs. zehn Zellen;  $P < 0,05$ ;  $n=8$ ; **Abb. 10A, C**) und der Fläche ( $490,37 \mu\text{m}^2$  vs.  $964,8 \mu\text{m}^2$ ;  $P < 0,01$ ;  $n=8$ ; **Abb. 10B, C**) von glatten Muskelzellen in der verletzten Neointima. Dies impliziert eine Reduktion der Proliferation bzw. Migration der glatten Muskelzellen in die Neointima bei TLR2<sup>-/-</sup> Tieren. Es ergab sich keine Differenz zwischen der Anzahl der  $\alpha$ -SMA positiven Zellen in der Intima und Media der WT Tiere im Vergleich zu den TLR2<sup>-/-</sup> Tieren (**Abb. 10D**).



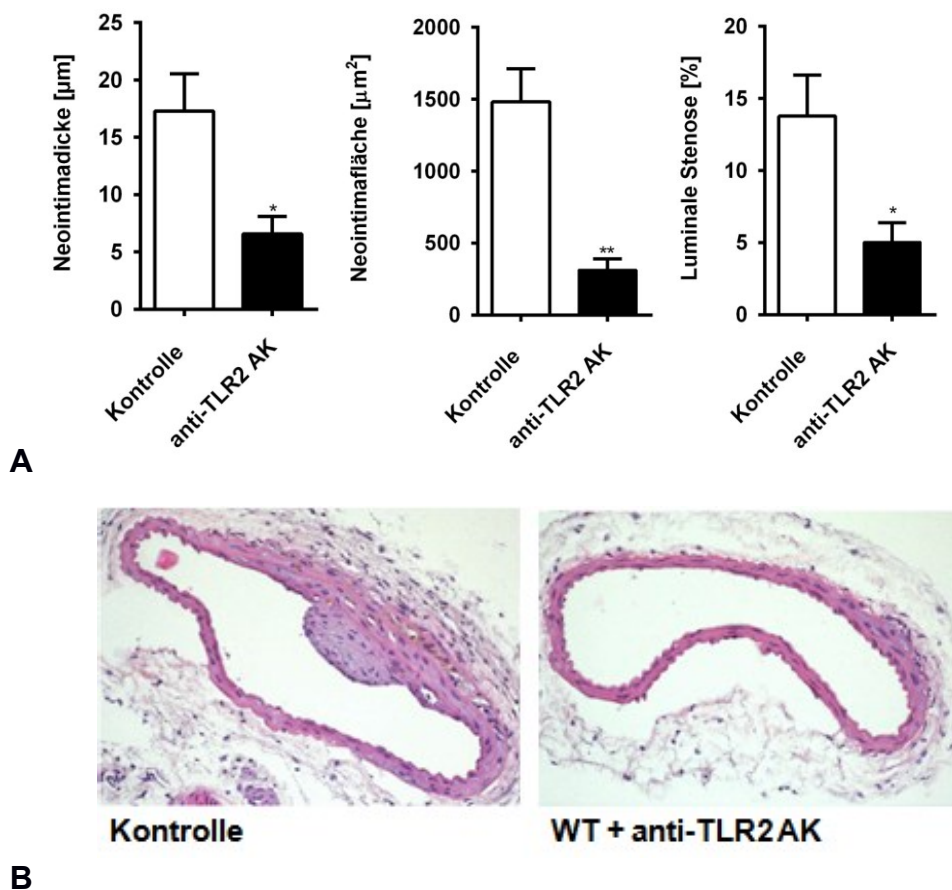
**Abbildung 10: Genetische TLR2 Defizienz reduziert die Anzahl und Fläche der glatten Muskelzellen in der Neointima**

**A** Anzahl und **B** Fläche der positiven  $\alpha$ -SMA Zellen \* $P < 0,05$  und \*\* $P < 0,01$ ;  $n = 8$  Student's t-test **C** Gefäßausschnitt von Wildtyp- und TLR2 defizienter Maus in  $\alpha$ -SMA Immunhistochemie;  $\alpha$ -SMA Zellen sind rot dargestellt, schwarze Pfeile markieren Lamina elastica externa. **D** Quantitative Analyse der Anzahl der  $\alpha$ -SMA positiven Zellen innerhalb der Intima und Media von Wildtyp Mäusen im Vergleich zu TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen \* $P < 0,05$ ;  $n = 8$  im Student's t-test

1.000-fache Vergrößerung

### 3.3 Die Applikation TLR2 blockierender Antikörper in Wildtyp Mäusen reduziert die Neointimabildung

Die Evaluation des therapeutischen Potenzials eines TLR2 blockierenden Antikörpers wurde durch Injektion an Wildtyp Mäusen am zweiten und vierten postoperativen Tag nach der thromboseinduzierenden Operation untersucht. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Neointimafläche, -dicke und der luminalen Stenose (**Abb. 11A, B**;  $P < 0,01$  Neointimafläche bzw  $P < 0,05$  Neointimadicke und luminal Stenose im Vergleich zur Kontrollgruppe: WT mit Natriumchlorid 0,9 % injiziert; je n=4) im Vergleich zur Kontrollgruppe, in die alleinig isotonische Kochsalzlösung injiziert wurde.

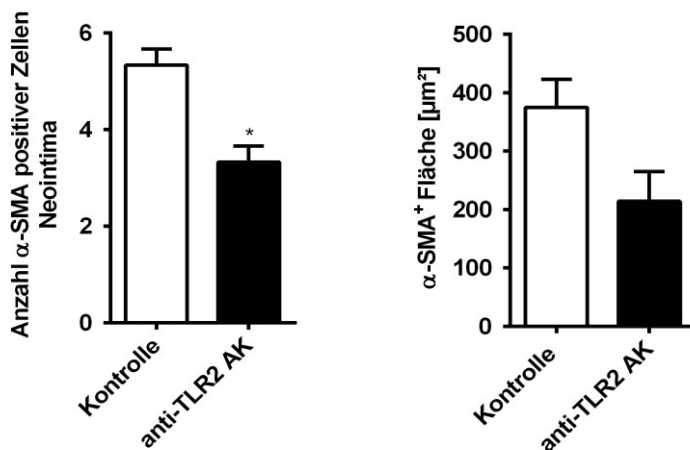


**Abbildung 11: WT Mäuse zeigen nach anti-TLR2 Antikörperapplikation eine Reduktion der Neointimahyperplasie ähnlich einer genetischen TLR2 Defizienz**

**A** Morphometrische Analyse: Quantifizierung der Resultate durch Ausmessen der Dicke und der Fläche der Neointima, sowie das Ausmessen der luminalen Stenose an HE Schnitten. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM \*P<0,05 und \*\*P<0,01; n=4 WT mit anti-TLR2 AK, n=4 WT mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung (Kontrolle) im Student's t-Test

**B** Gefäßausschnitt von einer WT Maus mit injizierter isotonischer Kochsalzlösung bzw. blockierenden TLR2 Antikörper

Bei der Betrachtung der Anzahl und Fläche der glatten Muskelzellen in der Neointima zeigte sich zudem eine signifikante Reduktion der Anzahl ebendieser (**Abb 12.**).



**Abbildung 12: Die Anzahl und Fläche der neointimalen glatten Muskelzellen reduziert sich nach intrakardialer Injektion von anti-TLR2 Antikörpern bei WT Mäusen**

**A** Anzahl und Fläche der positiv markierten  $\alpha$ -SMA Zellen \*P<0,05; dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM \*P<0,05; n=4 WT mit anti-TLR2 AK, n=4 WT mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung (Kontrolle) im Student's t-Test

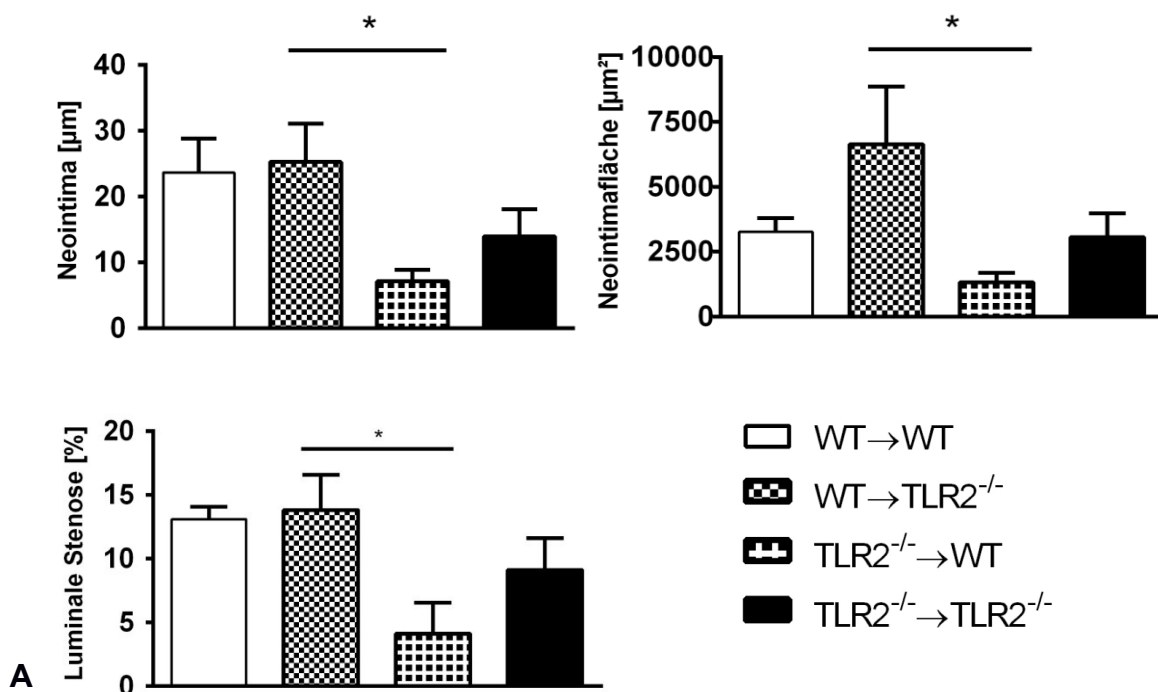
### 3.4 TLR2 defiziente Knochenmarkszellen führen zu einer reduzierten Neointimabildung in Wildtyp Mäusen

Um den Einfluss der hämatopoetischen Zellen auf das „Gefäßremodeling“ zu untersuchen, wurde die Knochenmarktransplantation gewählt. An den so entstandenen chimären Tieren erfolgte die Eisenchlorid-induzierte Thrombose der A. carotis communis.

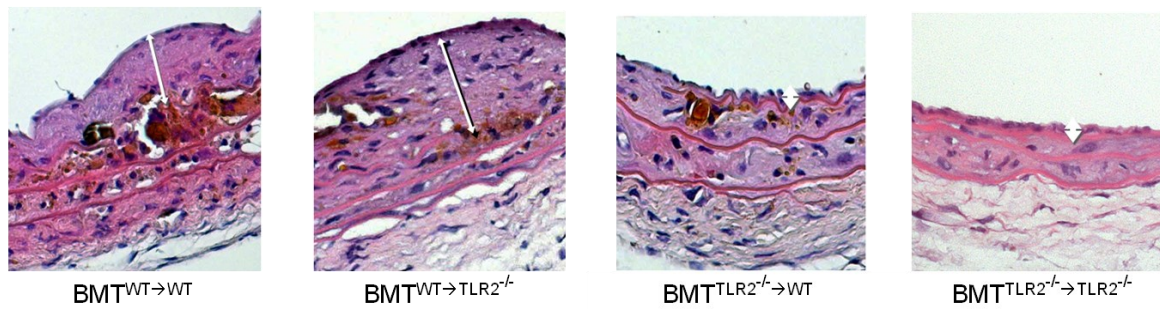
In WT Mäusen mit TLR2<sup>-/-</sup> Knochenmark („bone marrow transplant“; BMT<sup>TLR2<sup>-/-</sup>→WT</sup>) zeigte sich eine signifikante Reduktion der Neointimadicke, -fläche und der luminalen Stenose im Vergleich zu den TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen mit WT Knochenmark (BMT<sup>WT→TLR2<sup>-/-</sup></sup>) (P<0,05; n=6; **Abb. 13A, B**).

Bei der Betrachtung der TLR2<sup>-/-</sup> Mäuse mit WT Knochenmark (BMT<sup>WT→TLR2<sup>-/-</sup></sup>) im Vergleich zur Kontrollgruppe (BMT<sup>WT→WT</sup>) zeigt sich bei der Versuchsgruppe BMT<sup>WT→TLR2<sup>-/-</sup></sup> ein promovierender Effekt bezogen auf die Zunahme der Neointimadicke, -fläche und der luminalen Stenose, wobei dieser nicht signifikant ausfällt. Im Umkehrschluss zeigten auch die Wildtyp Tiere, die TLR2 defizientes Knochenmark erhielten, im Vergleich zur TLR2 defizienten Kontrollgruppe eine deutlichere Reduktion der Neointima.

Auch hier ist der Effekt zu beobachten, dass es in absoluten Zahlen im Vergleich zu der Ausgangsversuchsgruppe (auszugsweise: Neointimadicke der BMT<sup>WT→WT</sup> 24,21 µm im Vergleich zu 53,28 µm der Wildtyp Tiere ohne Knochenmarktransplantation) zu geringerer Neointimabildung gekommen ist.



**B**

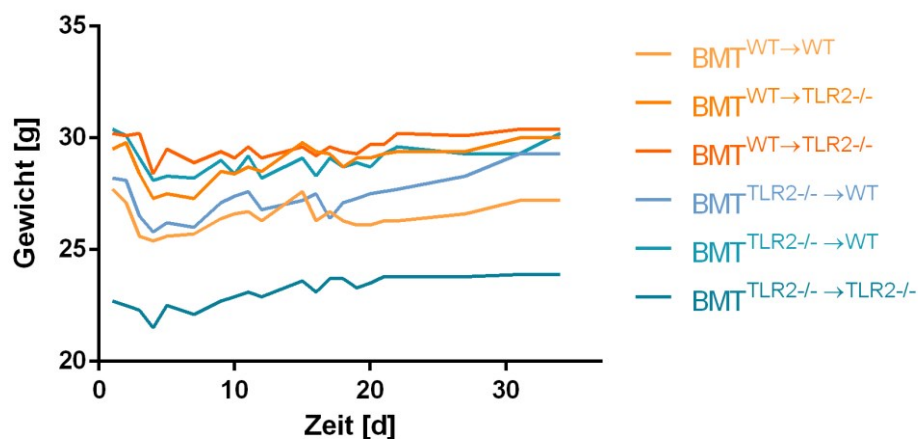


**Abbildung 13: Chimäre WT/TLR2<sup>-/-</sup> Tiere haben eine deutlich reduzierte vaskuläre Läsion**

**A** Morphometrische Analyse: Quantifizierung der Resultate durch Ausmessen der Dicke und der Fläche der Neointima, sowie das Ausmessen der luminalen Stenose an HE Schnitten. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM an sechs knochenmarkstransplantierten TLR2 defizienten Mäusen mit Wildtyp Knochenmark, sechs chimäre BMT<sup>TLR2<sup>-/-</sup>→WT</sup> Mäuse und deren Kontrollen (BMT<sup>TLR2<sup>-/-</sup>→TLR2<sup>-/-</sup></sup>, BMT<sup>WT→WT</sup>) \*P<0,05 im One-Way ANOVA/Bonferroni

**B** Gefäßquerschnitte von einzelnen Gruppen wie aufgeführt; weiße Pfeile zeigen die Dicke der Neointima

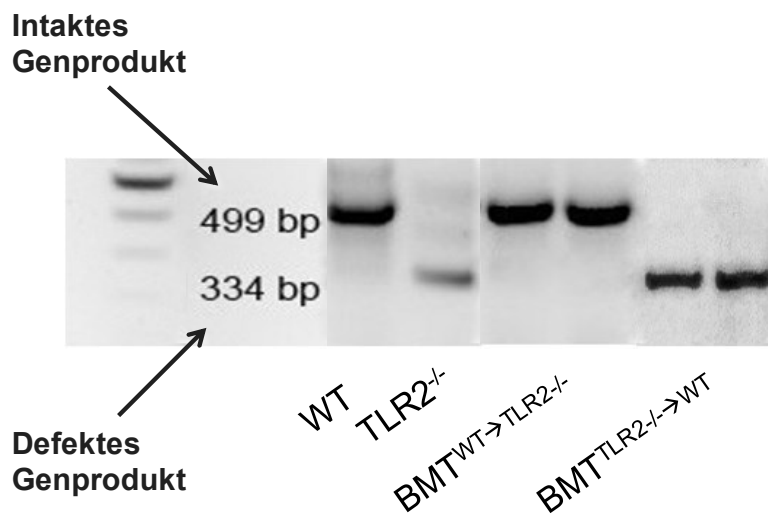
Begleitend zur Knochenmarkstransplantation wurden alle Versuchstiere gesondert untersucht. Keines der insgesamt 24 Versuchstiere verstarb nach der Knochenmarkstransplantation oder verlor mehr als 10 % ihres Ausgangsgewichtes (**Abb. 14**).



**Abbildung 14: Gewichtsverlauf der transplantierten Mäuse bis zur Karotisentnahme**

Exemplarisch ist der Gewichtsverlauf von sechs Tieren dargestellt. Die Tiere wurden täglich gewogen. Zu Beginn war eine geringe Gewichtsabnahme zu verzeichnen a.e. durch Flüssigkeitsverlust (Diarrhoe bedingt durch die Ganzkörperbestrahlung), welche sich nach drei bis vier Tagen wieder stabilisierte.

Zur Verifizierung der erfolgreichen Knochenmarktransplantation wurden die Genprodukte des TLR2 Rezeptors nach qPCR im Northern Blot aufgetragen. Der intakte TLR2 Rezeptor enthält 499 Basenpaare im Vergleich zum defekten Genprodukt mit 334 Basenpaaren. Die folgende Abbildung zeigt das Transkriptionsprodukt des intakten TLR2 Rezeptors in den chimären TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen mit WT Knochenmark (BMT<sup>WT→TLR2<sup>-/-</sup></sup>) und der Positivkontrolle (WT Mäuse) im Blot. Das defekte Genprodukt ließ sich in den WT Mäusen mit TLR2<sup>-/-</sup> Knochenmark und der Negativkontrolle (TLR2 Mäuse) detektieren. (**Abb. 15**).



**Abbildung 15: Verifikation des chimären Genotyps nach Knochenmarktransplantation**

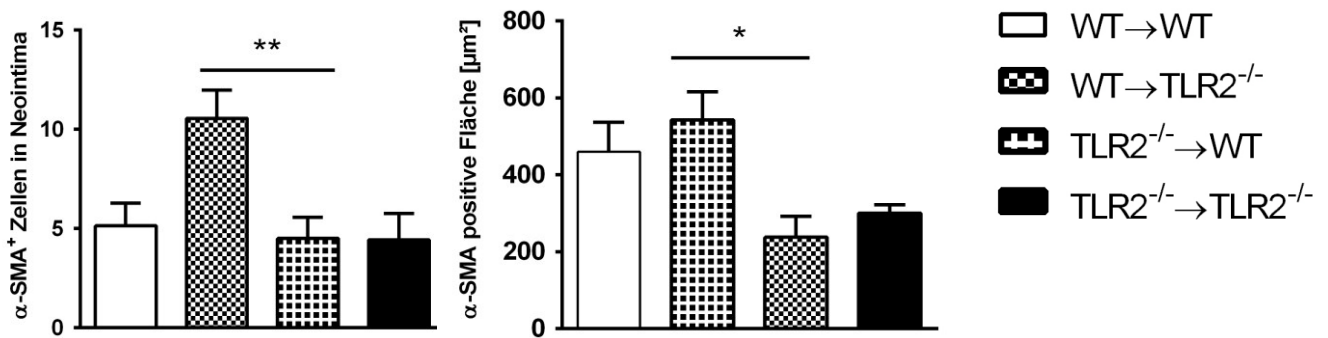
qPCR Analyse der Genprodukte, Nachweis des Transkriptionsprodukts des intakten bzw. defekten TLR2 Gens. Erkennbar ist das defekte Genprodukt mit 334 bp (Basenpaaren) der TLR2<sup>-/-</sup> Proben. Im Gegensatz dazu zeigen alle Wildtyp (WT) Proben 499bp Banden die dem Genprodukt des intakten Toll-like Rezeptors 2 entsprechen.

### 3.5 TLR2 defizientes Knochenmark geht mit reduzierter Anzahl und Fläche glatter Muskelzellen in der Neointima einher

Die Visualisierung der glatten Muskelzellen der Neointima in den Versuchstieren nach der Knochenmarktransplantation erfolgte ebenfalls mittels immunhistochemischer Färbung des  $\alpha$ -SMA.

In der Neointima der WT Mäuse mit TLR2<sup>-/-</sup> Knochenmark zeigte sich im Vergleich zu den TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen mit WT Knochenmark eine signifikante Reduktion der Anzahl und der Fläche  $\alpha$ -SMA positiver Zellen. Analog zum Kapitel 3.4 zeigte sich bei der Betrachtung der TLR2<sup>-/-</sup> Mäuse mit WT Knochenmark im Vergleich zur Kontrollgruppe (BMT<sup>WT→WT</sup>) bezogen auf die Zunahme der Anzahl und Fläche  $\alpha$ -SMA positiver Zellen

ein promovierender Effekt, wobei dieser nicht signifikant ausfällt. Ein reziprokes Verhalten lässt sich ebenfalls bei der Betrachtung der WT Mäuse mit TLR2<sup>-/-</sup> Knochenmark im Vergleich zur Kontrollgruppe der TLR2<sup>-/-</sup> Mäuse mit TLR2<sup>-/-</sup> Knochenmark beobachten (**Abb. 16**).



**Abbildung 16: TLR2 defizientes Knochenmark reduziert die glatten Muskelzellen innerhalb der Neointima in chimären Tieren**

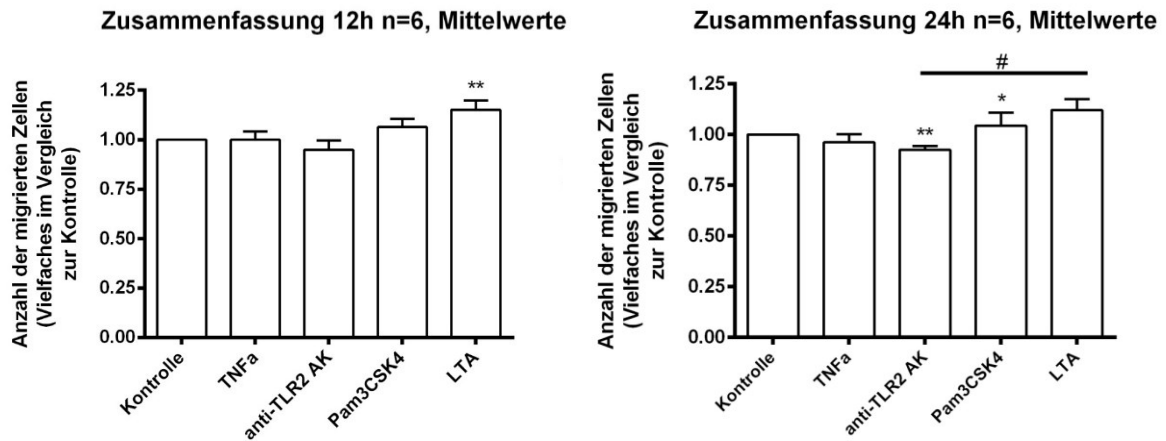
Fläche und Anzahl der positiv markierten  $\alpha$ -SMA Zellen; n=6 dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM an sechs knochenmarkstransplantierten TLR2 defizienten Mäusen mit Wildtyp Knochenmark, sechs chimäre BMT<sup>TLR2<sup>-/-</sup>→WT</sup> Mäuse und deren Kontrolle (BMT<sup>TLR2<sup>-/-</sup>→TLR2<sup>-/-</sup></sup>; BMT<sup>WT→WT</sup>) \*P<0,05, \*\*P<0,01 im One-Way ANOVA/Bonferroni

### 3.6 TLR2 blockierende Antikörper hemmen die Migration der glatten Muskelzellen *in vitro*

Die Migration glatter humaner Muskelzellen wurde *in vitro* mit dem Wound-Scratch-Assay untersucht. Eine Beeinflussung des Migrationsverhaltens durch einen TLR2 Liganden, bzw. durch einen TLR2 Antikörper ist ein indirekter Nachweis eines TLR2 Rezeptors in den glatten Muskelzellen.

Die Inkubation erfolgte mit einem anti-TLR2 Antikörper, TNF- $\alpha$ , Pam3CSK4 (ein stimulierender TLR1/2-Ligand), LTA (ein unspezifischer TLR Ligand, Lipoteichonsäure). Die Quantifikation der migrierten Zellen erfolgte nach zwölf und 24 Stunden. Ein längerer Beobachtungszeitraum ist in diesem Fall nicht empfohlen, da zwischen migrierenden und proliferierenden Effekten nicht mehr unterschieden werden kann. Unter der 24-stündigen Inkubation mit anti-TLR2 Antikörper zeigten die glatten Muskelzellen sowohl gegenüber den durch LTA stimulierten Zellen als auch gegenüber der Kontrolle eine signifikant geringere Migration (**Abb. 17**; P<0,01; n=6).





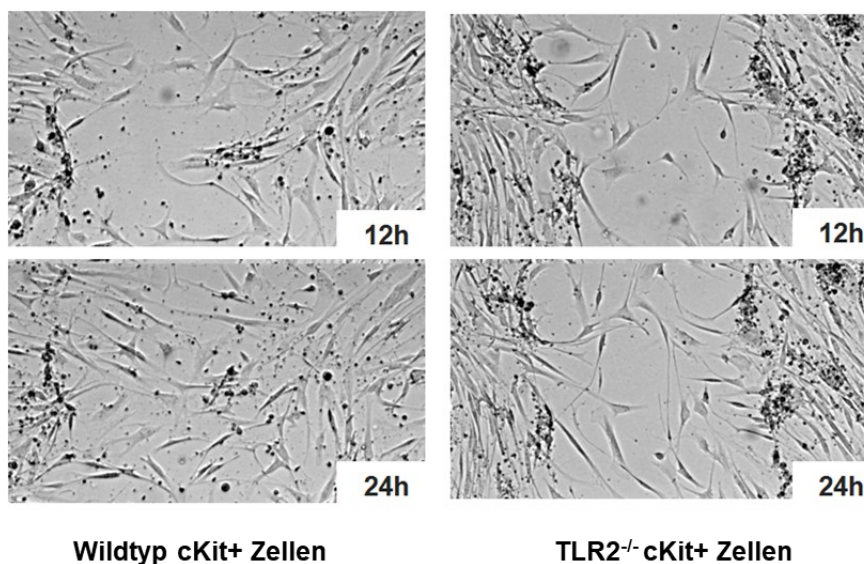
**Abbildung 17: Hemmender Einfluss von anti-TLR2 AK auf die Migration von glatten Muskelzellen im Wound-Scratch Assay *in vitro***

Quantitative Zusammenfassung der Streckenlänge zwischen den Wundrändern. Dargestellt sind der TLR1/2 Ligand (Pam3CSK4) und der TLR2 Ligand (LTA). Im Vergleich dazu den TLR2 blockierenden-Antikörper (anti-TLR2 AK) und TNF- $\alpha$ . Darstellung nach 12h und 24h. \*P<0,05, \*\*P<0,01 im Student's t-test im Vergleich zur Kontrolle. #P<0,05 im Student's t-test im Vergleich LTA vs anti-TLR2 AK

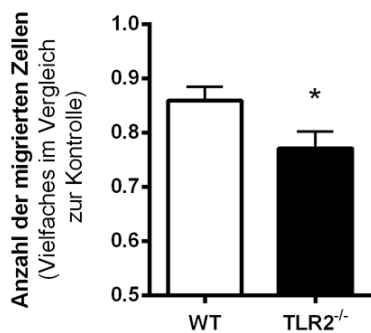
### 3.7 TLR2 defiziente Knochenmarkzellen vermitteln eine Hemmung auf die Migration der glatten Muskelzellen *in vitro*

Der modulierende Effekt der Knochenmarkzellen zeigte sich auch im Wound-Scratch Assay; bei einer Ko-Inkubation von Knochenmarkzellen und glatten Muskelzellen konnte im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant geringere Migration nachgewiesen werden. Der hemmende Effekt stieg bei Knochenmark aus TLR2 defizienten Tieren weiter an ( $P < 0,001$  vs. Kontrolle;  $n=7$ ; **Abb. 18**).

Im Verlauf von acht Stunden konnte beobachtet werden, dass die glatten Muskelzellen unter dem Einfluss von TLR2 defizienten Knochenmarkzellen die Wundfläche im Vergleich zur Kontrolle, sowie im Vergleich zu glatten Muskelzellen in der Anwesenheit von Wildtyp Knochenmarkzellen langsamer verschlossen. Die TLR2 defizienten Knochenmarkzellen zeigten somit *in vivo* eine höhere Potenz, die glatten Muskelzellen im Wundverschluss zu verlangsamen und somit die vermutliche Neointimaformation zu vermindern. Die Migration von glatten Muskelzellen (SMC) ist durch Ko-Inkubation mit cKit (auch: CD117) positiven Knochenmarkzellen vermindert. Diese Verminderung ist noch ausgeprägter bei TLR2 defizienten Knochenmarkzellen. Somit zeigten die TLR2 defizienten Knochenmarkzellen eine Hemmung auf die Migration der glatten Muskelzellen, wie es sich vorher schon im *in vivo* Modell darstellte.



**A**



## B

### Abbildung 18: Einfluss der Knochenmarkzellen auf die Migrationsfähigkeit glatter Muskelzellen im Migrations-Modell

A: Repräsentative, lichtmikroskopische Aufnahmen des Muskelzellrasens mit Wundkreuzen, inkubiert mit WT und TLR2 defizienten Knochenmarkzellen nach zwölf und 24 Stunden.

50-fache Vergrößerung

B: Quantifizierung der Anzahl der migrierten glatten Muskelzellen nach Inkubation mit TLR2 defizienten Knochenmark und Wildtyp Knochenmark im Vergleich zur Kontrolle nach 24 Stunden mit 100.000 Knochenmarkzellen. Dargestellt sind Wundflächen im Vergleich zur Kontrolle, deren Mittelwerte  $\pm$  SEM \* $P < 0,05$  Vergleich zwischen den Gruppen;  $n=7$  Experimente/Gruppe; Statistik: Student's t-test

Der hemmende Effekt ist auch bei Hinzugabe von 50.000 Knochenmarkzellen zu beobachten, jedoch ist dieser nicht signifikant bei einer Fallzahl von sieben Versuchsreihen. Ein längerer Beobachtungszeitraum als 24 Stunden wurde auch hier nicht als sinnvoll erachtet, da schon nach 36 Stunden der Zellrasen konfluent erschien und eine Identifikation des Wundkreuzes nicht mehr möglich war.

## 4. Diskussion

### 4.1. Eine TLR2 Defizienz und TLR2 defizientes Knochenmark reduzieren neointimale Läsionen

Die Rolle der TLR in der Entstehung von Gefäßerkrankungen ist zentraler Bestandteil der aktuellen Forschung. Insbesondere die Herausforderungen der interventionellen kardiologischen Eingriffe, wie z.B. Angioplastien wurden mehrfach in diesem Zusammenhang untersucht. Sie induzieren eine vaskuläre Gefäßverletzung mit darauffolgender Neointimaformation und Stenosebildung. Deshalb sind Ärzte klinisch häufig mit vaskulären Restenosen und Fragen der Revaskularisierung und deren Konsequenzen konfrontiert. Das größte Problem stellt die Entzündung innerhalb des Gefäßes dar, die unter anderem mit einer erhöhten Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen einhergeht. Deshalb werden heutzutage drug-eluting Stents eingesetzt, die durch eine Beschichtung mit Paclitaxel und Sirolimus eine Reendothelialisierung mit Entstehung einer Restenose verhindern sollen. Da durch DES (drug eluting stents) die protektive Reendothelialisierung verzögert wird, ist eine doppelte Plättchenaggregationshemmung notwendig, um eine in-Stent Thrombose zu verhindern.

Studien weisen auf die wichtige Rolle der TLR in entzündlichen Gefäßerkrankungen, wie der Atherosklerose, Ischämien/Reperfusionverletzungen nach Myokardinfarkt oder Apoplex, hin. Diese Erkrankungen sind die Folge von nicht infektiösen Vorgängen, u. a. hervorgerufen durch die endogene Aktivierung der TLR2 Signalkaskade.

Experimentelle Studien, die vorrangig den Verlust des TLR2 untersuchten, wiesen auf einen vorteilhaften Effekt in Bezug auf die Pathogenese der Atheroskleroseentstehung und des Ischämie/Reperfuionsverhaltens hin [Mullick et al., 2005; Michelsen et al., 2004; Shishido et al., 2003]. Im Gegenversuch zeigte die Gabe von einem TLR2 Agonisten einen dramatischen Anstieg der Atheroskleroseprogression [Mullick et al., 2005].

Die zentrale Rolle der endogenen Toll-like Rezeptor 2 Aktivierung in der Neointimaformation nach Gefäßverletzung wurde schon 2006 publiziert [Shishido et al., 2006]. Shishido et al. beschrieb hier eine Reduktion der Neointima bei TLR2 defizienten Tieren. Die Autoren vermuteten eine durch Zytokine und ROS (reactive

oxygen species) bedingte TLR2 Signalkaskade. Weiterhin wurde hier nach Gefäßverletzung eine erhöhte Expressionsregulation des TLR2 in den glatten Muskelzellen der Media und Adventitia nachgewiesen, jedoch verringerte sich die inflammatorische Signalgenexpression (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und Monozyten) in den TLR2 defizienten Artgenossen, nicht jedoch in den Wildtyp Mäusen. Damit war der erste Nachweis der zentralen Rolle des TLR2 in chronisch entzündlichen Gefäßerkrankung erbracht.

Ein ähnlicher Effekt konnte bereits beim Menschen beobachtet werden. Patientinnen und Patienten mit metabolischem Syndrom zeigen einen durch zelluläre Inflammation vermittelten proinflammatorischen Status. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren nicht nur die proinflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und löslicher TNFR1) verstärkt exprimiert, sondern auch der TLR2 und TLR4 vermehrt an der Zelloberfläche von Monozyten nachweisbar [Jialal et al., 2012].

Die vorliegende Arbeit liefert Hinweise auf die protektiven Effekte einer genetischen TLR2 Defizienz auf die maladaptiven Vorgänge nach arterieller Gefäßverletzung. Eine TLR2 Defizienz war mit einer reduzierten Neointimahyperplasie und somit einer reduzierten luminalen Stenose der A. carotis com. drei Wochen nach Gefäßverletzung im tierexperimentellen Setting assoziiert. Auffallend war eine Umkehr der phänotypischen Neointimaformation in Wildtyp Mäusen nach TLR2 defizienten Knochenmarktransplantation mit Verringerung der Neointimadicke. Zudem konnte die Neointimahyperplasie in genetischen TLR2<sup>-/-</sup> Mäusen mit transplantiertem WT Knochenmark beobachtet werden. Daniel et al. publizierte schon 2010 Erkenntnisse über die Rolle der Migration der zirkulierenden Knochenmarkzellen in die Neointimaläsion. Seine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass dieser Prozess hauptsächlich in den ersten drei Wochen nach Gefäßläsion stattfindet. Die zirkulierenden Zellen waren vor allem von myeloider Abstammung, die sich in Makrophagen- und Monozyten ähnliche Zellen differenziert hatten. Weiterhin waren sie identisch zu den knochenmarkabgeleiteten Zellen exprimiert durch eine TLR2-Aktivierung [Flo et al., 2001].

Der Toll-like Rezeptor 2 ist somit ein wichtiger Faktor in der vaskulären Homöostase. Er gehört zu den PRR (pattern recognition receptors) des angeborenen Immunsystems und übernimmt eine entscheidende Rolle sowohl in der Erkennung von exogenen Pathogenen als auch von endogenen Molekülen, den sogenannten danger-

associated molecular patterns, oder auch DAMPs genannt. Damit erfolgt die Aktivierung des TLR2 nicht nur durch gewebe penetrierenden Pathogene, sondern auch bei Gefäßverletzungen oder Ischämien [Rock et al., 2010]. Der TLR2 übernimmt hier eine wichtige Rolle in der Rekrutierung von Immunzellen und der daraus folgenden Initiierung einer Entzündungskaskade. Im Speziellen führt eine TLR2 Aktivierung auf Monozyten zu einer erhöhten Expression von Zytokinen und dessen Ausschüttung, die ein proinflammatorisches Milieu an Gefäßläsion erzeugen [Lacerte et al., 2016]. Die Akkumulation von proinflammatorischen Mediatoren ist einer der Schlüsselrollen in der Aktivierung der Migration der glatten Muskelzellen von der Tunica media in die Neointima [Zain et al., 2019]. Weiterhin wurde auch eine TLR2 Expression direkt auf glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Kardiomyozyten nachgewiesen [Watari et al., 2000; Frantz et al., 1999].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass zirkulierende Knochenmarkzellen eine der Schlüsselmediatoren im initialen „Gefäßremodeling“ nach Gefäßverletzung darstellen. Die phänotypische Ausprägung der Neointimaformation der Wildtyp und TLR2<sup>-/-</sup> Maus stellten sich nach Knochenmarktransplantation invers dar (WT/TLR2<sup>-/-</sup> und vice versa). Es kann deshalb angenommen werden, dass zirkulierende Knochenmarkzellen in Wildtyp Mäusen zu einem erhöhten „Homing“ der zirkulierenden Zellen in Gefäßläsionen führen, die ferner vermehrt proinflammatorische Zellen anziehen oder die Dauer der zirkulierenden Zellen innerhalb der Neointimaläsion verlängern. Dies könnte den maladapten Prozess der Gefäßregeneration innerhalb der WT Maus im Vergleich zu ihren TLR2<sup>-/-</sup> Artgenossen beeinflussen.

## **4.2. Das Eisenchlorid-induzierte Thrombose Mausmodell in der Atheroskleroseforschung**

In der Pathogenese von Gefäßerkrankungen spielen entzündliche Prozesse eine bedeutende Rolle. Die Aktivierung von Entzündungsrezeptoren, wie z. B. den Toll-like Rezeptoren durch sterile Liganden bzw. pathogene Keime wird als mögliche Ursache einer Atheroskleroseprogression aktuell vielfach diskutiert.

Beim Menschen ist die Arteria carotis eine Prädilektionsstelle atherosklerotischer Plaques, die bei fortschreitender Gefäßlumenverlegung zu zerebraler Minderperfusion, neurologischen Ausfällen und Apoplexien mit weitreichenden

neurologischen Residuen führen kann. In den fortgeschrittenen Stadien ist häufig die Thrombendarteriektomie und somit interventionelle Wiederherstellung der Durchblutung der Halsschlagader die einzige therapeutische Option. Die betroffenen Patientinnen und Patienten müssen sich damit jedoch, bei meist vielfältigen weiteren Vorerkrankungen, einer risikoreichen Operation in hohem Lebensalter unterziehen. Vor allem diese Patientinnen und Patienten würden somit deutlich von einer medikamentösen, ursächlichen Therapieoption zur Prävention und Reduktion der Atheroskleroseprogression profitieren.

Der protektive Effekt einer TLR2 Defizienz ist in der Literatur etabliert. Aus diesen Erkenntnissen zahlreicher grundlagenwissenschaftlicher Arbeitsgruppen sowie unserer eigenen Arbeitsgruppe generiert sich vermehrt der Begriff des funktionellen Ausschaltens des TLR2 als mögliche therapeutische Option in der Behandlung vaskulärer Erkrankungen. Das Verständnis des genauen Mechanismus der heilungsfördernden Wirkung des blockierten TLR2 ist dabei eine unabdingbare Voraussetzung für die Etablierung dieses neuen therapeutischen Ansatzes.

Die Bedeutung einer TLR2 Defizienz für die Rekrutierung hämatopoetischer Vorläuferzellen ist bislang ungeklärt. Jedoch deuten die vorliegende Arbeit und zahlreichen weitere Studien auf eine wichtige Rolle dieser Zellen in der Modulation vaskulärer Heilungsprozesse hin. Aus diesen Ergebnissen lassen sich somit vorsichtig erste Erkenntnisse bzgl. des Potentials des TLR2 als Angriffspunkt in der Behandlung der atherosklerotischen Gefäßläsion nach Gefäßverletzung ableiten.

Histomorphologische Analysen der neointimalen Läsion unserer Mäuse zeigten, dass vor allem glatte Muskelzellen in Wildtyp Mäusen die dominierende Zellart innerhalb der Läsion ist. Hingegen zeigten TLR2 defiziente Tiere weitaus weniger  $\alpha$ -SMA positive Zellen innerhalb der Neointima. Diese Resultate gliedern sich in die Daten der aktuellen Studienlage ein, die die zellulären Komponenten nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) innerhalb einer Neointimaläsion untersuchen [Christen et al., 2001]. Wie in der Einleitung dieser Arbeit schon erwähnt, halten sich die meisten glatten Muskelzellen in der Media der Gefäßwand vom kontraktiven Typ auf. Die frühe Reaktion auf eine luminale Verletzung der Gefäßwand kann eine Thrombozytenaktivierung und Thrombusformation, sowie eine endotheliale Aktivierung, endotheliale Dysfunktion oder eine Denudation und Leukozytenrekrutierung sein. Diese können eine lokale Expression der Matrix

Metalloproteinasen induzieren, die als Folge einen Abbau der Lamina elastica interna ermöglichen und somit glatte Muskelzellen zur Zellmigration in die Neo- bzw. Intima aktivieren [Zain et al., 2019].

Eisen(III)-chlorid, das hier topisch zur Initiierung einer Gefäßläsion genutzt wurde, penetriert die Gefäßwand und durchschreitet das Endothelium mittels eines endozytisch-exozytischen Wirkungspfadens in das arterielle Lumen. Dort führt es eine komplette endotheliale Denudation herbei [Tseng et al., 2006]. Diese Denudation erzeugt einen inflammatorischen vaskulären Wundheilungsprozess. Das Eisenchlorid-Modell induziert einen kompletten Gefäßverschluss durch Verletzung und Abtragung des Endothels. Im Vergleich dazu werden in der Literatur auch Laser-induzierte Läsionen beschrieben, die zu einem nicht-okkludierenden Thrombus führen [Denis/Wagner, 2007]. Die Vielzahl von Modellen zur Induktion einer Gefäßläsion sind nochmals hervorzuheben, da bei einer ernsthaften Schädigung des Gefäßes mitunter eine andere Immunantwort produziert wird [Moser et al., 2016]. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass bei einer schweren Verletzung mit kompletter Okkludierung des Gefäßes nach Denudation eher Progenitorzellen aus dem Blut bzw. aus dem Knochenmark innerhalb des Gefäßmodellierungsprozesses und der Neointimaformation rekrutiert werden [Tsai et al., 2012; Tsai et al., 2009], wohingegen leichtere Schäden eher durch lokale bzw. ortsständige Zellen aus der Adventitia oder Media repariert werden [Tsai et al., 2012; Majesky et al., 2011; Tsai et al., 2009]. Als Beispiel wird der TLR2 Signalweg eben bei dieser schweren Schädigung angesprochen. Der Signalweg erhöht die Thrombozytenaktivität und Thrombusformation [Biswas et al., 2017], im Umkehrschluss verstärkt er die endotheliale Zellfunktion auf zirkulierenden Progenitorzellen in der Abwesenheit des TLR2 [Wagner et al., 2013b]. Dies liefert Hinweise auf alternative Mechanismen der knochenmarkstammigen Zellen oder der Thrombozyten, um die Verbesserung der Gefäßregeneration in Abwesenheit des TLR2 zu erklären. In der hiesigen Arbeitsgruppe wurde ein Nachweis dafür geliefert, dass CD117-positive myeloische Stammzellen und Progenitorzellen von TLR2 defizienten Mäusen eine erhöhte Potenz die Gefäßregeneration durch Sekretion von parakrinen Faktoren zu stimulieren zeigen [Wagner et al., 2013a]. Ein unreifer Gefäßthrombus besteht größtenteils aus aktivierten Thrombozyten, Fibrin und Erythrozyten. Erst im Verlauf wird eine Reendothelialisierung im Zusammenspiel mit anderen partizipierenden Zellen wie



glatten Muskelzellen, Fibroblasten und, wie in dieser Arbeit diskutiert, hämatopoetische Zellen ermöglicht. Das unterschiedliche zeitliche Verhalten der Reendothelialisierung in verschiedenen Tiergruppen (Mäuse, Ratten, Kaninchen) im Vergleich zum Menschen lässt die Limitierung dieses Modells ersichtlich werden.

#### **4.3. Eine TLR2 Defizienz reduziert die Migration von glatten Muskelzellen in die Neointima durch knochenmarkstämmige Progenitorzellen**

Glatte Muskelzellen (Smooth muscle cells, SMC) spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Gefäßerkrankungen und deren klinischer Manifestation. Nach perkutaner Koronarintervention in Form von Angioplastie, Stentimplantation und Bypass Operation kommt es zu einer überschießenden Neointimaformation und damit zu der unerwünschten Restenose. Es ist in Expertenkreisen inzwischen weitestgehend akzeptiert, dass die intimalen SMC aus der Media stammen, oder sich aus migrierenden Adventitia-Fibroblasten differenzieren [Dzau et al., 2002; Sartore Saverio et al., 2001]. Einige Jahre zuvor wurden diese Theorie noch in Frage gestellt. Studien nahmen an, dass sich auch knochenmarkstämmige Progenitorzellen in Gefäßzellen in der Phase des arteriellen „Remodeling“ differenzieren könnten [Sata et al., 2002a]. Jedoch ist es bis heute unklar, ob die Differenzierung der knochenmarkstämmigen Progenitorzellen *in vivo* stattfindet [Hoofnagle Mark H. et al., 2006]. Viele Jahre war die Hypothese unangefochten, dass die glatten Muskelzellen innerhalb der Neointima ortsständig aus der Media entstammen müssten [Hoglund et al., 2010]. Demgegenüber steht eine steigende Anzahl von Publikationen, die davon ausgehen, dass bis zur Hälfte der SMC in der Neointima und damit auch in den atherosklerotischen Plaques aus zirkulierenden, knochenmarkstämmigen Progenitorzellen stammen [Saiura et al., 2001]. Mit dieser Erkenntnis entstand eine neue therapeutische Option, insbesondere eine neue Möglichkeit der Behandlung der postinterventionellen Restenose nach Stentimplantation. Jedoch war nach den ersten Langzeitstudien die Theorie der knochenmarkstämmigen Zellen und deren Mitwirkung an der Intimamodulation wenig haltbar [Hoofnagle Mark H. et al., 2006]. Diese Arbeit liefert einen Hinweis auf eine parakrine Aktivität der knochenmarkstämmigen Zellen auf die residierenden glatten Muskelzellen. Hier wurde gezeigt, dass CD117-positive Progenitorzellen vom Wildtypknochenmark die Migrationskapazität der glatten

Muskelzellen im Wound-Scratch Assay erhöhen. TLR2 defiziente Knochenmarkzellen hemmen die Migration von glatten Muskelzellen und vermögen dadurch die Neointimaformation zu vermindern. Diese Observation deutet auf eine parakrine proinflammatorische Aktivität der myeloischen Progenitorzellen von Wildtyp Mäusen im Vergleich zu TLR2<sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen hin. Die Rolle der CD177-positiven Zellen für das „Homing“ innerhalb einer Gefäßverletzung und für die nachfolgende Gefäßregeneration bleibt weiterhin unklar. Jedoch unterstützten unsere Resultate die Hypothese, dass knochenmarkstämmigen Zellen wie Progenitor- und myeloischen Zellen vorübergehend eine parakrine Aktivität an der Gefäßläsion aufzeigen bzw. sogar direkt in der Gefäßläsion residieren, monozyten-ähnliche Eigenschaften annehmen und ausschlaggebend für die Gefäßmodulation und -regeneration sind. Basierend auf dieser Hypothese könnte eine TLR2 Defizienz in diesen Zellen bzw. eine pharmakologische Blockade durch TLR2 Antikörper die Gefäßregeneration nach Gefäßverletzung, durch weniger proinflammatorische Mediatoren und Limitierung der Narbenbildung und somit der luminalen Stenose unterstützen. Die entscheidende Frage bleibt; was ist dann der Ursprung der SMC in der Neointima? Nicht nur die Media dient als Quelle der Zellen der Neointima, auch die Adventitia als Quelle von Fibroblasten und Myofibroblasten scheint einen Platz in der Rollenverteilung der Gefäßmodulation zu beanspruchen. Die Adventitia reagiert, vermutlich durch eine Kommunikation zwischen dem Endothelium und der Adventitia mittels transmuraler Mediatoren, auf Arterienverletzungen. Der grundlegende molekulare Mechanismus ist noch unbekannt.

Scott et al. beschrieb, dass in Koronararterien von Schweinen die meisten proliferierenden Zellen in der Adventitia nach „overstretch“ Verletzung zu finden sind und dass diese proliferierenden Adventitia-Zellen in die Neointima migrieren [Scott et al., 1996]. Gleichermaßen war dies auch bei Ratten im Ballon-Angioplastie Modell der Arteria carotis nachweisbar, bei dem adventitielle Fibroblasten markiert wurden und diese später in der Media, sowie in der Neointima nachweisbar waren [Li et al., 2000]. Weiterhin findet sich in der Literatur die These, dass es ortsständige Progenitorzellen gibt, die in Clustern zwischen Media und Adventitia auftreten und das Stammzellantigen Sca1 tragen. *In vitro* können sich diese Zellen in SMC differenzieren [Passman et al., 2008; Hu et al., 2004]. *In vivo* konnten diese Zellen zwei Wochen nach der Gefäßtransplantation in der Media und nach vier Wochen in der Neointima

gefunden werden. Zwanzig Prozent der neointimalen Zellen trugen den Sca1 Marker. Diese Zellen stammen jedoch nicht direkt aus dem Knochenmark [Hu et al., 2004]. Die Adventitia enthält Progenitorzellen, die die Kapazität besitzen, sich zu SMC zu differenzieren und von der Adventitia in die Media bzw. Neointima migrieren zu können. Daniel et al. identifizierte in der femoralen Arterie der Adventitia stark proliferative Zellen mit Sca1<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup> Marker, die EGFP-negativ waren (EGFP: „enhanced green fluorescent protein“, welches vor der Verletzung an hämatopoetische Zellen gebunden wurde) und deshalb ortsständig sein müssen und nicht knochenmarkstämmig. Außerdem waren sechs Wochen nach „wire-injury“ der A. femoralis in der Media Sca1<sup>pos</sup>/CD34<sup>pos</sup> Zellen nachweisbar, die vermutlich aus der Adventitia bis zur Neointima migrierten. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Hu et al. Diese Studie untermauert die Erkenntnisse, dass hämatopoetische Progenitorzellen wenig bis keine Plastizität besitzen und sich in gewebstypische Zellen der Gefäße differenzieren. Sie sind jedoch konträr zu den Daten von Sata et al., der publizierte, dass fast die Hälfte aller vaskulären glatten Muskelzellen knochenmarkstämmigen Ursprungs sind [Hu et al., 2004; Sata et al., 2002a]. Trotz der Hinweise, dass hämatopoetische Progenitorzellen sich direkt in vaskuläre glatte Muskelzellen differenzieren können, ist es durchaus plausibel, dass es vermutlich eine Interaktion in Form einer parakrinen Aktivität gibt. Diese Kontroverse bleibt für weitere Untersuchung bestehen. Diese Arbeit liefert auch keine konkreten Beweise für die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen in glatte Muskelzellen, jedoch Hinweise für eine mögliche parakrine Aktivität von diesen zirkulierenden Zellen, die eine Reduktion der Migration oder Proliferation von glatten Muskelzellen herbeiführen könnte.

#### **4.4. Eine TLR2 Defizienz hat Einfluss auf die Migration von glatten Muskelzellen**

Die Migration von glatten Muskelzellen ist ein wichtiger Bestandteil im Prozess der Neointimabildung. Um den Aspekt der Neointimaformation zu betrachten, wurde als drittes Modell das Migrations-Modell gewählt. Damit ließ sich die Fähigkeit der glatten Muskelzellen zur gezielten Migration untersuchen. Um den Prozess der Migration bereits vorhandener glatter Muskelzellen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu beobachten, wurde der Beobachtungszeitraum von zwölf bis 24 Stunden nach der

Wundsetzung gewählt. Die Proliferation von neuen glatten Muskelzellen, beginnt erst nach 24 Stunden. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es bei den mit TLR2<sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen ko-inkubierten glatten Muskelzellen im Gegensatz zu unbehandelten Zellen nach zwölf Stunden zu einer Hemmung der Migration bzw. des Wundverschlusses kam. In vergleichbaren Studien wurde häufig ein Beobachtungszeitraum von sechs bis zu 48 Stunden gewählt, wobei hier meist mittels einer BrdU-Inkorporation (Bromdesoxyuridin) zusätzlich zum Migrations- auch das Proliferationsverhalten untersucht wurde [Ammann et al., 2015; Grote et al., 2013]. Der zugrunde liegende Mechanismus der hemmenden Potenz der TLR2 defizienten Knochenmarkzellen auf glatte Muskelzellen ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Die gewonnenen Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass eine Anwendung von TLR2<sup>-/-</sup> Knochenmarkzellen, um eine überschießende Neointimaformation im Rahmen von ischämischen Gefäßerkrankungen zu verhindern denkbar wäre. Um diese therapeutische Option zu überprüfen, wurde mit Hilfe von TLR2 blockierenden-Antikörpern ein ähnlicher Aufbau des Versuches reproduziert. Eine TLR2 Blockade führte ebenfalls zur Hemmung der glatten Muskelzellmigration. Allerdings kam es im Vergleich zu den TLR2 defizienten Knochenmarkzellen zu einer geringeren Migrationshemmung. Die Literatur lieferte bisher kaum Anhaltspunkte, ob es eine direkte Interaktion durch den TLR2 Rezeptor zwischen den glatten Muskelzellen und den Knochenmarkzellen, oder ob es einen parakrinen Effekt der hämatopoetischen Zellen auf die glatten Muskelzellen gibt. Der endgültige Signalweg bleibt weiterhin ungeklärt und bedarf weiterer Betrachtung.

#### **4.5. Hämatopoetische Zellen vermitteln den günstigen Effekt der TLR2 Defizienz auf den vaskulären Heilungsprozess**

Wie oben bereits beschrieben gibt es Hinweise darauf, dass hämatopoetische Stammzellen die Neointimaformation nach Gefäßverletzung beeinflussen [Tsai et al., 2009]. Die zuvor erwähnten Autoren postulierten die umstrittene These, dass Knochenmarkzellen in die Neointima rekrutiert werden und sich hier in glatte Muskelzellen differenzieren könnten [Sata et al., 2002a]. Ursprünglich wurde die Neointimaentstehung als ein ortsständiger Prozess eingestuft. Progenitorzellen scheinen, unabhängig davon, ob eine Differenzierung stattfindet, eine entscheidende Rolle in der vaskulären Homöostase zu spielen. Zu beachten ist jedoch, dass die Daten

je nach genutztem Tiermodell und Gefäßverletzungsmodell, sowie je nach Färbemethoden in der histologischen Aufarbeitung sehr variieren [Daniel/Sedding, 2011]. In aktuellen Untersuchungen rücken Signalmoleküle wie cKit und cKit-Liganden, sowie SDF-1 $\alpha$  in den Fokus der Forschung, da sie nachweislich kritische Faktoren innerhalb des Rekrutierungsprozess in das verletzte Gefäß darstellen. Der Beitrag der Knochenmarkzellen auf die Neointimaläsion wurde bereits mehrfach an knochenmarktransplantierten Mäuse innerhalb eines Gefäßverletzungsmodells demonstriert [Wang et al., 2006; Tanaka et al., 2003; Sata et al., 2002a, 2002a; Han et al., 2001a]. Innerhalb dieser Studien wurde der Anteil der knochenmarkstämmigen Zellen innerhalb der Neointima mit 20 - 66 % angegeben. Nach einer Gefäßverletzung befinden sich Mäuse in einem inflammatorischen Status, sodass zirkulierende inflammatorische Zellen, insbesondere Makrophagen in die Neointima einwandern. Dies kann zu einem falsch-positive Ergebnis der  $\alpha$ -SMA Färbung durch Kreuzreaktion führen. Weiterhin untersuchte Tanaka et al. die „wire-mediated endovascular injury“ (ein Draht wird in die A. femoralis eingeführt und wieder entfernt) vs. „cuff-mediated perivascular injury“ (ein Polyethylen Schlauch wird longitudinal aufgeschnitten, um die A. femoralis gelegt und zugenäht) vs. „flow-restriction vascular injury“ (eine Ligation der A. carotis mit einem chirurgischen Faden wird durchgeführt) in Mäusen. Gezeigt wurde, dass die Anzahl von Progenitorzellen innerhalb der Neointima mit der Art der Gefäßverletzung variieren kann. Die „wire-mediated endovascular injury“ erzeugt eine Denudation des Gefäßes und führte zum höchsten Anteil von  $\alpha$ -SMA positiven Knochenmarkzellen innerhalb der Neointima. In der initialen Phase stellten Makrophagen, unabhängig vom Gefäßverletzungsmodus, den Großteil der Zellen innerhalb der Neointima dar. Vier Wochen nach initialer Gefäßverletzung zeigte das Gefäß, welches durch Draht verletzt wurde, eine deutlich signifikante Anzahl von hämatopoetischen Zellen innerhalb der Neointima und Media, wohingegen in den „cuff-mediated perivascular injury“ und nach Ligation der A. carotis nur ein Minimum an Zellen hämatopoetischen Ursprungs war. Weiterhin ist dies ein indirekter Marker dafür, dass sich die Neointimazusammensetzung nach Gefäßverletzungsart bzw. -prozess im Menschen, z.B. Atherosklerose vs. Intimahyperplasie eines Venenbypasses stark unterscheiden könnten. Hieraus leiten sich die Limitationen des angewandten Modells in dieser Arbeit ab. Die chemische Verletzung durch

Eisenchlorid induziert eine komplette Denudation des Gefäßes und entspricht a.e. einer „wire-mediated endovascular injury“.

#### **4.6. Therapeutische Optionen der TLR2 Blockade**

Die Akkumulation von glatten Muskelzellen innerhalb der Neointima ist ein ausschlaggebender Faktor innerhalb der Pathogenese der Atherosklerose und Restenose. Neointimale glatte Muskelzellen sind vor allem als Antwort auf eine akute Gefäßverletzung, wie sie z.B. nach Stentimplantation oder transplantierten Organen auftritt, zu finden. Wenn der eigentliche Prozess der Gefäßheilung überschießt, entsteht eine Stenose und der Blutfluss wird limitiert. Deshalb werden seit einigen Jahren therapeutische Strategien entwickelt, um die Ansammlung von glatten Muskelzellen zu minimieren und den Blutfluss innerhalb einer Gefäßläsion zu erhalten. Jedoch gibt es aktuell keine therapeutische Option die in-stent Stenose oder Restenose sicher und nachhaltig zu vermeiden. TLR2 Antagonisten wurden schon früher für die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen empfohlen [Lin et al., 2009] und in unserer Arbeitsgruppe wurden die vorteilhaften Effekte einer genetischen TLR2 Ablation in der vaskulären Regeneration und Funktion gezeigt [Bergt et al., 2013; Wagner et al., 2013b].

In der Atherosklerose selbst ist jedoch die Rolle der glatten Muskelzellen komplexer [Schober et al., 2012]. Atherosklerotische Plaques formieren sich in Jahren und durchlaufen verschiedene Stadien, beginnend mit einem Makrophagen-reichen Plaque bis zu einer komplexen Läsion mit einem Lipidkern und einer fibrösen Kappe mit glatten Muskelzellen. Dies führt, z.B. durch modifizierte LDL Partikel und Monozyteninfiltration, zu endothelialer Dysfunktion. Die glatten Muskelzellen könnten jedoch durch proinflammatorische Signale auch zu Beginn der Gefäßläsion eine Rolle spielen. In der späten Phase der Atherosklerose lässt sich sogar diskutieren, ob nicht die glatten Muskelzellen innerhalb der fibrösen Kappe, die Plaques stabilisieren und damit eine Plaqueruptur sogar verhindern. Daraus könnte man auch schließen, dass eine Verhinderung der Migration von glatten Muskelzellen in der späten Phase der Atherosklerose fatal wäre. Diese Arbeit konzentriert sich deshalb auf die frühe Entstehung der Atherosklerose bzw. der akuten Gefäßverletzung. Die Operation wurde bei jüngeren Tieren durchgeführt und die Neointima wurde drei Wochen nach Gefäßverletzung aufgearbeitet. Zurzeit sind die therapeutischen Optionen, die die

glatten Muskelzellen innerhalb der Gefäßläsion modifizieren, limitiert. Sirolimus- und Paclitaxel umhüllte Stents (sogenannte Drug-eluting Stents) zeigen eine hervorragende Wirkung bzgl. der Migration und Proliferationsreduktion von glatten Muskelzellen nach Stentimplantation. Jedoch haben beide Wirkstoffe einen unspezifischen antiproliferativen Effekt und verhindern sogar eine effiziente Reendothelialisierung, weswegen Patientinnen und Patienten weiterhin eine doppelte Plättchenaggregationshemmung für mehrere Monate einnehmen müssen. In einer Analyse von humanen Thrombendartektomien-Präparaten zeigte eine TLR2 Blockade eine Hemmung der proinflammatorischen Zytokine und Chemokinen durch eine abgeschwächte NF- $\kappa$ B Aktivität [Falck-Hansen et al., 2013]. Eine spezifischere, therapeutische Option kann deshalb eine postinterventionelle anti-TLR2 Antikörper Injektion sein. Die protektive Wirkung einer TLR2 Blockierung zeigte ein Experiment durchgeführt von Arslan et al. Durch Applikation eines TLR2 Antikörpers im murinen Modell zeigte sich, durch eine reduzierte Produktion von proinflammatorischen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und GM-CSF nach arterieller Gefäßverletzung, eine verringerte Anzahl von Neutrophilen-, Makrophagen- und T-Lymphozyten Infiltration in die Gefäßläsion. Im porzinen Ischämie/Reperusionsmodell zeigte sich eine reduzierte Infarktgröße mit erhaltender systolischer Pumpfunktion nach TLR2 Antikörper Injektion [Arslan et al., 2012; Arslan et al., 2010b; Arslan et al., 2010a]. Jedoch wurde die Dynamik der glatten Muskelzellen in diesen Modellen nicht betrachtet. Die erhobenen Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass durch die *in vivo* applizierten anti-TLR2 Antikörper und damit einhergehenden reduzierten Neointimaformation, bedingt durch die verminderte Migration der glatten Muskelzellen, eine überschießende arterielle Stenose verhindert wird. Vermittelt könnte dies vermutlich durch eine verminderte Rekrutierung von hämatopoetischen Knochenmarkzellen und damit verminderte Interaktion zwischen ebendiesen und den ortsständigen glatten Muskelzellen werden. Ein weiterer wichtiger Punkt zur vaskulären Homöostase liefert auch eine TLR2 Defizienz durch eine Verbesserung der Migration von Endothelzellen [Wagner et al., 2013b]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese getestet, dass eine initiale pharmakologische Blockade des TLR2 nach chemischer Gefäßverletzung die Neointimahyperplasie und luminale Stenose reduzieren kann. Es wurde ein etablierter anti-TLR2 Antikörper genutzt, der intrakardial am zweiten und vierten postoperativen Tag nach Gefäßverletzung injiziert wurde. Nach dreiwöchiger Observation und

Gefäßentnahme zeigten sich eine reduzierte Neointimaformation und lumenale Stenose in Wildtyp Mäusen mit appliziertem Antikörper im Vergleich zur Kontrolle. Zukünftige Studien sollten die vielversprechende Rolle der initialen Blockade der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems im Hinblick auf die bessere Gefäßregeneration und damit erfreulichen Therapieergebnis untersuchen. Da auch der TLR2 weiterhin eine wichtige Rolle innerhalb des Immunsystems und für eine spätere Gefäßmodellierung, im Speziellen der Arteriogenese spielt scheint eine andauernde, chronische Blockade des TLR2 keine geeignete Option für die Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen zu sein [He et al., 2016; Wu et al., 2016; Groot et al., 2011].



## 5. Zusammenfassung

Eine TLR2 Defizienz vermittelt einen günstigen Effekt nach Gefäßverletzung durch:

- Verminderung der Neointimafläche, -dicke und der luminalen Stenose
- Verminderung der migrierenden glatten Muskelzellen in die Neointima

Als Vermittler dieser Effekte nehmen wir Mitarbeitende der Arbeitsgruppe das Fehlen der TLR2 vermittelten Signaltransduktion auf hämatopoetischen Zellen an.

Vermutlich besteht eine zelluläre Interaktion in Form einer parakrinen Aktivität hämatopoetischer Zellen mit ortsständigen Zellen der Gefäßwand.

Eine therapeutische Option bei bestehender Atheroskleroseprogression könnte die Gabe eines anti-TLR2 Antikörper durch Reperfusion im geschädigten Gefäß sein.

Die Befunde der Arbeit lassen darauf schließen, dass dem TLR2 eine bedeutende Rolle in der Entstehung einer neointimalen Läsion nach arterieller Gefäßläsion zukommt und bestätigen den für die vaskuläre Homöostase günstigen Phänotyp einer TLR2 Defizienz. Das Fehlen TLR2 vermittelter Signaltransduktion auf hämatopoetischen Zellen, könnte im Gegensatz zu TLR2 Defizienz von Zellen der Gefäßwand als hauptsächlicher Vermittler dieser günstigen Effekte dienen. Insgesamt deuten die Befunde auf eine zelluläre Interaktion hämatopoetischer Zellen mit der Gefäßwand hin, die bei TLR2 Defizienz in einer reduzierten Migration vermutlich primär Media-stämmiger glatter Muskelzellen in die Neointima zurückzuführen sein könnte. Eine therapeutische Modulation TLR2 vermittelter pro-inflammatorischer Signaltransduktion könnte somit einen günstigen Einfluss auf den vaskulären Heilungsvorgang ausüben, die Perfusion günstig beeinflussen und langfristig die Gefahr einer Progression zur Atherosklerose reduzieren.

Atherosklerose ist und bleibt eine komplexe Pathogenese, die sich über Jahre hinweg entwickelt und sich im Rahmen von einem Modell kaum abbilden lässt. Die Limitationen der vorliegenden Arbeit wurden zuvor ausführlich dargestellt.

## 6. Literaturverzeichnis

Adams, B., Xiao, Q., Xu, Q. (2007): Stem cell therapy for vascular disease. in: Trends Cardiovasc Med, 17, 7, S. 246–51.

Akira, S., Takeda, K. (2004): Toll-like receptor signalling. in: Nat Rev Immunol, 4, 7, S. 499–511.

Ammann, K.R., DeCook, K.J., Tran, P.L., Merkle, V.M., Wong, P.K., Slepian, M.J. (2015): Collective cell migration of smooth muscle and endothelial cells: impact of injury versus non-injury stimuli. in: J Biol Eng, 9.

Arslan, F., Houtgraaf, J.H., Keogh, B., Kazemi, K., Jong, R. de, McCormack, W.J., O'Neill, L.A.J., McGuirk, P., Timmers, L., Smeets, M.B., Akeroyd, L., Reilly, M., Pasterkamp, G., Kleijn, D.P.V. de (2012): Treatment with OPN-305, a humanized anti-Toll-Like receptor-2 antibody, reduces myocardial ischemia/reperfusion injury in pigs. in: Circ Cardiovasc Interv, 5, 2, S. 279–87.

Arslan, F., Keogh, B., McGuirk, P., Parker, A.E. (2010a): TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury. in: Mediators Inflamm, 2010, S. 704202.

Arslan, F., Smeets, M.B., O'Neill, L.A.J., Keogh, B., McGuirk, P., Timmers, L., Tersteeg, C., Hofer, I.E., Doevendans, P.A., Pasterkamp, G., De Kleijn, Dominique P V (2010b): Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. in: Circulation, 121, 1, S. 80–90.

Bergt, S., Guter, A., Grub, A., Wagner, N.-M., Beltschany, C., Langner, S., Wree, A., Hildebrandt, S., Noldge-Schomburg, G., Vollmar, B., Roesner, J.P. (2013): Impact of Toll-like receptor 2 deficiency on survival and neurological function after cardiac arrest: a murine model of cardiopulmonary resuscitation. in: PLoS One, 8, 9, e74944.

Bertocchi, C., Traunwieser, M., Dorler, J., Hasslacher, J., Joannidis, M., Dunzendorfer, S. (2011): Atorvastatin inhibits functional expression of proatherogenic TLR2 in arterial endothelial cells. in: Cell Physiol Biochem, 28, 4, S. 625–30.

Beutler, B. (2004): Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. in: Nature, 430, 6996, S. 257–63.

- Biswas, S., Zimman, A., Gao, D., Byzova, T.V., Podrez, E.A. (2017): TLR2 Plays a Key Role in Platelet Hyperreactivity and Accelerated Thrombosis Associated With Hyperlipidemia. in: *Circulation Research*, 121, 8, S. 951–62.
- Bjorkbacka, H., Kunjathoor, V.V., Moore, K.J., Koehn, S., Ordija, C.M., Lee, M.A., Means, T., Halmen, K., Luster, A.D., Golenbock, D.T., Freeman, M.W. (2004): Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. in: *Nat Med*, 10, 4, S. 416–21.
- Bult, H. (2000): Restenosis: a challenge for pharmacology. in: *Trends Pharmacol Sci*, 21, 7, S. 274–79.
- Christen, T., Verin, V., Bochaton-Piallat, M., Popowski, Y., Ramaekers, F., Debruyne, P., Camenzind, E., van Eys, G., Gabbiani, G. (2001): Mechanisms of neointima formation and remodeling in the porcine coronary artery. in: *Circulation*, 103, 6, S. 882–88.
- Clowes, A.W., Reidy, M.A., Clowes, M.M. (1983): Mechanisms of stenosis after arterial injury. in: *Lab Invest*, 49, 2, S. 208–15.
- Curtiss, L.K., Tobias, P.S. (2009): Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. in: *Journal of lipid research*, 50 Suppl, Suppl, S340-S345.
- Daniel, J.-M., Bielenberg, W., Stieger, P., Weinert, S., Tillmanns, H., Sedding, D.G. (2010): Time-course analysis on the differentiation of bone marrow-derived progenitor cells into smooth muscle cells during neointima formation. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30, 10, S. 1890–96.
- Daniel, J.-M., Sedding, D.G. (2011): Circulating smooth muscle progenitor cells in arterial remodeling. in: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50, 2, S. 273–79.
- Denis, C.V., Wagner, D.D. (2007): Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 4, S. 728–39.
- Dzau, V.J., Braun-Dullaeus, R.C., Sedding, D.G. (2002): Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. in: *Nat Med*, 8, 11, S. 1249–56.

Edfeldt, K., Swedenborg, J., Hansson, G.K., Yan, Z.-q. (2002): Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. in: *Circulation*, 105, 10, S. 1158–61.

Falck-Hansen, M., Kassiteridi, C., Monaco, C. (2013): Toll-Like Receptors in Atherosclerosis. in: *Int J Mol Sci*, 14, 7, S. 14008–23.

Favre, J., Musette, P., Douin-Echinard, V., Laude, K., Henry, J.-P., Arnal, J.-F., Thuillez, C., Richard, V. (2007): Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 5, S. 1064–71.

Flo, T.H., Halaas, O., Torp, S., Ryan, L., Lien, E., Dybdahl, B., Sundan, A., Espevik, T. (2001): Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. in: *J Leukoc Biol*, 69, 3, S. 474–81.

Frantz, S., Kobzik, L., Kim, Y.D., Fukazawa, R., Medzhitov, R., Lee, R.T., Kelly, R.A. (1999): Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. in: *J Clin Invest*, 104, 3, S. 271–80.

Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1977): The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. in: *Annu Rev Biochem*, 46, S. 897–930.

Groot, D. de, Hoefler, I.E., Grundmann, S., Schoneveld, A., Haverslag, R.T., van Keulen, J.K., Bot, P.T., Timmers, L., Piek, J.J., Pasterkamp, G., Kleijn, D.P.V. de (2011): Arteriogenesis requires toll-like receptor 2 and 4 expression in bone-marrow derived cells. in: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50, 1, S. 25–32.

Grote, K., Sonnenschein, K., Kapopara, P.R., Hillmer, A., Grothusen, C., Salguero, G., Kotlarz, D., Schuett, H., Bavendiek, U., Schieffer, B. (2013): Toll-like receptor 2/6 agonist macrophage-activating lipopeptide-2 promotes reendothelialization and inhibits neointima formation after vascular injury. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33, 9, S. 2097–104.

Hajishengallis, G., Lambris, J.D. (2011): Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. in: *Nat Rev Immunol*, 11, 3, S. 187–200.

Han, C.I., Campbell, G.R., Campbell, J.H. (2001a): Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. in: *J Vasc Res*, 38, 2, S. 113–19.

Han, C.I., Campbell, G.R., Campbell, J.H. (2001b): Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. in: *J Vasc Res*, 38, 2, S. 113–19.

Hasu, M., Thabet, M., Tam, N., Whitman, S.C. (2011): Specific loss of toll-like receptor 2 on bone marrow derived cells decreases atherosclerosis in LDL receptor null mice. in: *Can J Physiol Pharmacol*, 89, 10, S. 737–42.

He, C., Lai, P., Wang, J., Zhou, T., Huang, Z., Zhou, L., Liu, X. (2016): TLR2/4 deficiency prevents oxygen-induced vascular degeneration and promotes revascularization by downregulating IL-17 in the retina. in: *Sci Rep*, 6, S. 27739.

Hill, J.A., Olson, E.N. (Hrsg.) (2012): *Muscle*, Boston/Waltham.

Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U., Beutler, B. (2005): CD36 is a sensor of diacylglycerides. in: *Nature*, 433, 7025, S. 523–27.

Hoebe, K., Jiang, Z., Tabeta, K., Du, X., Georgel, P., Crozat, K., Beutler, B. (2006): Genetic analysis of innate immunity. in: *Adv Immunol*, 91, S. 175–226.

Hoglund, V.J., Dong, X.R., Majesky, M.W. (2010): Neointima formation: a local affair. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30, 10, S. 1877–79.

Hollestelle, S.C.G., Vries, M.R. de, van Keulen, J.K., Schoneveld, A.H., Vink, A., Strijder, C.F., van Middelaar, B.J., Pasterkamp, G., Quax, P.H.A., De Kleijn, Dominique P V (2004): Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling. in: *Circulation*, 109, 3, S. 393–98.

Hoofnagle Mark H., Thomas James A., Wamhoff Brian R., Owens Gary K. (2006): Origin of Neointimal Smooth Muscle. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26, 12, S. 2579–81.

Hu, Y., Zhang, Z., Torsney, E., Afzal, A.R., Davison, F., Metzler, B., Xu, Q. (2004): Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. in: *J Clin Invest*, 113, 9, S. 1258–65.

Jialal, I., Huet, B.A., Kaur, H., Chien, A., Devaraj, S. (2012): Increased toll-like receptor activity in patients with metabolic syndrome. in: *Diabetes Care*, 35, 4, S. 900–04.

- Kawai, T., Akira, S. (2009): The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. in: *Int Immunol*, 21, 4, S. 317–37.
- Lacerte, P., Brunet, A., Egarnes, B., Duchêne, B., Brown, J.P., Gosselin, J. (2016): Overexpression of TLR2 and TLR9 on monocyte subsets of active rheumatoid arthritis patients contributes to enhance responsiveness to TLR agonists. in: *Arthritis Res Ther*, 18, S. 10.
- Li, G., Chen, S.J., Oparil, S., Chen, Y.F., Thompson, J.A. (2000): Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. in: *Circulation*, 101, 12, S. 1362–65.
- Li, W., McIntyre, T.M., Silverstein, R.L. (2013): Ferric chloride-induced murine carotid arterial injury: A model of redox pathology. in: *Redox Biol*, 1, S. 50–55.
- Liao Yongbo, Regan Christopher P., Manabe Ichiro, Owens Gary K., Day Kathy H., Damon Dave N., Duling Brian R. (2007): Smooth Muscle–Targeted Knockout of Connexin43 Enhances Neointimal Formation in Response to Vascular Injury. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 5, S. 1037–42.
- Lin, E., Freedman, J.E., Beaulieu, L.M. (2009): Innate immunity and toll-like receptor antagonists: a potential role in the treatment of cardiovascular diseases. in: *Cardiovasc Ther*, 27, 2, S. 117–23.
- Majesky, M.W., Dong, X.R., Hoggund, V., Mahoney, W.M., Daum, G. (2011): The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31, 7, S. 1530–39.
- Michelsen, K.S., Wong, M.H., Shah, P.K., Zhang, W., Yano, J., Doherty, T.M., Akira, S., Rajavashisth, T.B., Arditi, M. (2004): Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 29, S. 10679–84.
- Miglione, M., Patti, G., D'Ambrosio, A., Di Sciascio, G. (2008): Percutaneous coronary intervention utilizing a new endothelial progenitor cells antibody-coated stent: a prospective single-center registry in high-risk patients. in: *Catheter Cardiovasc Interv*, 71, 5, S. 600–04.
- Morrison, S.J., Scadden, D.T. (2014): The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. in: *Nature*, 505, 7483, S. 327–34.

- Moser, J., van Ark, J., van Dijk, M.C., Greiner, D.L., Shultz, L.D., van Goor, H., Hillebrands, J.-L. (2016): Distinct Differences on Neointima Formation in Immunodeficient and Humanized Mice after Carotid or Femoral Arterial Injury. in: *Sci Rep*, 6.
- Muhlradt, P.F., Kiess, M., Meyer, H., Sussmuth, R., Jung, G. (1997): Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. in: *The Journal of experimental medicine*, 185, 11, S. 1951–58.
- Mullick, A.E., Soldau, K., Kiosses, W.B., Bell, Thomas A, 3rd, Tobias, P.S., Curtiss, L.K. (2008): Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. in: *The Journal of experimental medicine*, 205, 2, S. 373–83.
- Mullick, A.E., Tobias, P.S., Curtiss, L.K. (2005): Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. in: *J Clin Invest*, 115, 11, S. 3149–56.
- Nahrendorf Matthias, Swirski Filip K. (2015): Lifestyle Effects on Hematopoiesis and Atherosclerosis. in: *Circulation Research*, 116, 5, S. 884–94.
- Nervi, B., Link, D.C., DiPersio, J.F. (2006): Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. in: *J Cell Biochem*, 99, 3, S. 690–705.
- Newby, A.C., Zaltsman, A.B. (2000): Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. in: *J Pathol*, 190, 3, S. 300–09.
- O'Neill, L.A.J., Bowie, A.G. (2007): The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. in: *Nat Rev Immunol*, 7, 5, S. 353–64.
- Passman, J.N., Dong, X.R., Wu, S.-P., Maguire, C.T., Hogan, K.A., Bautch, V.L., Majesky, M.W. (2008): A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 27, S. 9349–54.
- Rock, K.L., Latz, E., Ontiveros, F., Kono, H. (2010): The sterile inflammatory response. in: *Annu Rev Immunol*, 28, S. 321–42.
- Ross, R., Glomset, J., Harker, L. (1977): Response to injury and atherogenesis. in: *The American journal of pathology*, 86, 3, S. 675–84.

Saiura, A., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R., Makuuchi, M. (2001): Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. in: *Nat Med*, 7, 4, S. 382–83.

Sakata, Y., Dong, J.-W., Vallejo, J.G., Huang, C.-H., Baker, J.S., Tracey, K.J., Tacheuchi, O., Akira, S., Mann, D.L. (2007): Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury. in: *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, 1, H503-9.

Sartore Saverio, Chiavegato Angela, Faggin Elisabetta, Franch Rafaella, Puato Massimo, Ausoni Simonetta, Pauletto Paolo (2001): Contribution of Adventitial Fibroblasts to Neointima Formation and Vascular Remodeling. in: *Circulation Research*, 89, 12, S. 1111–21.

Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., Nagai, R. (2002a): Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. in: *Nat Med*, 8, 4, S. 403–09.

Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., Nagai, R. (2002b): Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. in: *Nat Med*, 8, 4, S. 403–09.

Schäfer Katrin, Schroeter Marco R., Dellas Claudia, Puls Miriam, Nitsche Mirko, Weiss Elisabeth, Hasenfuss Gerd, Konstantinides Stavros V. (2006): Plasminogen Activator Inhibitor-1 From Bone Marrow–Derived Cells Suppresses Neointimal Formation After Vascular Injury in Mice. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26, 6, S. 1254–59.

Schmidt, L., Carrillo-Sepulveda, M.A. (2015): Toll-like receptor 2 mediates vascular contraction and activates RhoA signaling in vascular smooth muscle cells from STZ-induced type 1 diabetic rats. in: *Pflugers Arch*, 467, 11, S. 2361–74.

Schober, A., Zhe, Z., Weber, C. (2012): Chapter 107 - Smooth Muscle Progenitor Cells: A Novel Target for the Treatment of Vascular Disease? in: Hill, J.A., Olson, E.N.: *Muscle*, Boston/Waltham, S. 1391–400.



Schoneveld, A.H., Oude Nijhuis, M.M., van Middelaar, B., Laman, J.D., de Kleijn, D P V, Pasterkamp, G. (2005): Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development. in: *Cardiovasc Res*, 66, 1, S. 162–69.

Scott, N.A., Cipolla, G.D., Ross, C.E., Dunn, B., Martin, F.H., Simonet, L., Wilcox, J.N. (1996): Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries. in: *Circulation*, 93, 12, S. 2178–87.

Seimon, T.A., Nadolski, M.J., Liao, X., Magallon, J., Nguyen, M., Feric, N.T., Koschinsky, M.L., Harkewicz, R., Witztum, J.L., Tsimikas, S., Golenbock, D., Moore, K.J., Tabas, I. (2010): Atherogenic Lipids and Lipoproteins Trigger CD36-TLR2-Dependent Apoptosis in Macrophages Undergoing Endoplasmic Reticulum Stress. in: *Cell Metab*, 12, 5, S. 467–82.

Shi, Y., O'Brien, J.E., JR, Mannion, J.D., Morrison, R.C., Chung, W., Fard, A., Zaleski, A. (1997): Remodeling of autologous saphenous vein grafts. The role of perivascular myofibroblasts. in: *Circulation*, 95, 12, S. 2684–93.

Shishido, T., Nozaki, N., Takahashi, H., Arimoto, T., Niizeki, T., Koyama, Y., Abe, J.-I., Takeishi, Y., Kubota, I. (2006): Central role of endogenous Toll-like receptor-2 activation in regulating inflammation, reactive oxygen species production, and subsequent neointimal formation after vascular injury. in: *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 4, S. 1446–53.

Shishido, T., Nozaki, N., Yamaguchi, S., Shibata, Y., Nitobe, J., Miyamoto, T., Takahashi, H., Arimoto, T., Maeda, K., Yamakawa, M., Takeuchi, O., Akira, S., Takeishi, Y., Kubota, I. (2003): Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. in: *Circulation*, 108, 23, S. 2905–10.

Smolock, E., Berk, B.C. (2012): Chapter 98 - Vascular Smooth Muscle Cell Remodeling in Atherosclerosis and Restenosis. in: Hill, J.A., Olson, E.N.: *Muscle*, Boston/Waltham, S. 1301–09.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M. (2013): Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. in: *Science*, 339, 6116, S. 161–66.

Takamiya, M., Okigaki, M., Jin, D., Takai, S., Nozawa, Y., Adachi, Y., Urao, N., Tateishi, K., Nomura, T., Zen, K., Ashihara, E., Miyazaki, M., Tatsumi, T., Takahashi,

T., Matsubara, H. (2006): Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized circulating c-Kit+/Flk-1+ progenitor cells regenerate endothelium and inhibit neointimal hyperplasia after vascular injury. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26, 4, S. 751–57.

Tanaka, K., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R. (2003): Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. in: *Circulation Research*, 93, 8, S. 783–90.

Tsai, S., Butler, J., Rafii, S., Liu, B., Kent, K.C. (2009): The role of progenitor cells in the development of intimal hyperplasia. in: *J Vasc Surg*, 49, 2, S. 502–10.

Tsai, T.-N., Kirton, J.P., Campagnolo, P., Zhang, L., Xiao, Q., Zhang, Z., Wang, W., Hu, Y., Xu, Q. (2012): Contribution of Stem Cells to Neointimal Formation of Decellularized Vessel Grafts in a Novel Mouse Model. in: *The American journal of pathology*, 181, 1, S. 362–73.

Tseng, M.T., Dozier, A., Haribabu, B., Graham, U.M. (2006): Transendothelial migration of ferric ion in FeCl<sub>3</sub> injured murine common carotid artery. in: *Thromb Res*, 118, 2, S. 275–80.

Wagner, N.-M., Bierhansl, L., Butschkau, A., Noeldge-Schomburg, G., Roesner, J.P., Vollmar, B. (2013a): TLR2-deficiency of cKit<sup>+</sup> bone marrow cells is associated with augmented potency to stimulate angiogenic processes. in: *Int J Clin Exp Pathol*, 6, 12, S. 2813–23.

Wagner, N.-M., Bierhansl, L., Noldge-Schomburg, G., Vollmar, B., Roesner, J.P. (2013b): Toll-like receptor 2-blocking antibodies promote angiogenesis and induce ERK1/2 and AKT signaling via CXCR4 in endothelial cells. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33, 8, S. 1943–51.

Wang, C.-H., Anderson, N., Li, S.-H., Szmitko, P.E., Cherng, W.-J., Fedak, P.W.M., Fazel, S., Li, R.-K., Yau, T.M., Weisel, R.D., Stanford, W.L., Verma, S. (2006): Stem cell factor deficiency is vasculoprotective: unraveling a new therapeutic potential of imatinib mesylate. in: *Circulation Research*, 99, 6, S. 617–25.

Watari, M., Watari, H., Nachamkin, I., Strauss, J.F. (2000): Lipopolysaccharide induces expression of genes encoding pro-inflammatory cytokines and the elastin-

degrading enzyme, cathepsin S, in human cervical smooth-muscle cells. in: *J Soc Gynecol Investig*, 7, 3, S. 190–98.

West, X.Z., Malinin, N.L., Merkulova, A.A., Tischenko, M., Kerr, B.A., Borden, E.C., Podrez, E.A., Salomon, R.G., Byzova, T.V. (2010): Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. in: *Nature*, 467, 7318, S. 972–76.

Westrick Randal J., Winn Mary E., Eitzman Daniel T. (2007): Murine Models of Vascular Thrombosis. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27, 10, S. 2079–93.

Wong, M.K., Gotlieb, A.I. (1988): The reorganization of microfilaments, centrosomes, and microtubules during in vitro small wound reendothelialization. in: *J Cell Biol*, 107, 5, S. 1777–83.

Wu, H., Cheng, X.W., Hu, L., Takeshita, K., Hu, C., Du, Q., Li, X., Zhu, E., Huang, Z., Yisireyili, M., Zhao, G., Piao, L., Inoue, A., Jiang, H., Lei, Y., Zhang, X., Liu, S., Dai, Q., Kuzuya, M., Shi, G.-P., Murohara, T. (2016): Cathepsin S Activity Controls Injury-Related Vascular Repair in Mice via the TLR2-Mediated p38MAPK and PI3K-Akt/p-HDAC6 Signaling Pathway. in: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36, 8, S. 1549–57.

Xu, X.H., Shah, P.K., Faure, E., Equils, O., Thomas, L., Fishbein, M.C., Luthringer, D., Xu, X.P., Rajavashisth, T.B., Yano, J., Kaul, S., Arditi, M. (2001): Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. in: *Circulation*, 104, 25, S. 3103–08.

Zain, M.A., Jamil, R.T., Siddiqui, W.J. (2019): *StatPearls, Neointimal Hyperplasia*, Treasure Island (FL).

Zhu, B., Kuhel, D.G., Witte, D.P., Hui, D.Y. (2000): Apolipoprotein E inhibits neointimal hyperplasia after arterial injury in mice. in: *The American journal of pathology*, 157, 6, S. 1839–48.

Zhu, Y., Farrehi, P.M., Fay, W.P. (2001): Plasminogen activator inhibitor type 1 enhances neointima formation after oxidative vascular injury in atherosclerosis-prone mice. in: *Circulation*, 103, 25, S. 3105–10.



## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Rolle des TLR als Schnittstelle zwischen angeborenen und erworbenen Immunsystem .....	8
Abbildung 2: Herkunft der Neointima .....	13
Abbildung 3: qPCR Analyse des TLR2 Genproduktes .....	18
Abbildung 4: MACS-System .....	22
Abbildung 5: Fließschema des Eisen(III)-chlorid-induzierte Thrombose Mausmodell	25
Abbildung 6: Fließschema der Knochenmarktransplantation.....	27
Abbildung 7: Fließschema der systemischen TLR2 Antikörper Injektion .....	28
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Wells im Migrations-Modell/Wound-Scratch Assay .....	30
Abbildung 9: Genetische TLR2 Defizienz reduziert die Neointimahyperplasie nach arterieller Gefäßläsion .....	33
Abbildung 10: Genetische TLR2 Defizienz reduziert die Anzahl und Fläche der glatten Muskelzellen in der Neointima .....	34
Abbildung 11: WT Mäuse zeigen nach anti-TLR2 Antikörperapplikation eine Reduktion der Neointimahyperplasie ähnlich einer genetischen TLR2 Defizienz .....	36
Abbildung 12: Die Anzahl und Fläche der glatten Muskelzellen innerhalb der Neointima bei WT Mäusen reduziert sich nach intrakardialer Injektion von anti-TLR2 Antikörpern .....	36
Abbildung 13: Chimäre WT/TLR2 <sup>-/-</sup> Tiere haben eine deutlich reduzierte vaskuläre Läsion .....	38
Abbildung 14: Gewichtsverlauf der transplantierten Mäuse bis zur Karotisentnahme .....	38
Abbildung 15: Verifikation des chimären Genotyps nach Knochenmarktransplantation .....	39

Abbildung 16: TLR2 defizientes Knochenmark reduziert die glatten Muskelzellen innerhalb der Neointima in chimären Tieren .....	40
Abbildung 17: Einfluss von anti-TLR2 AK auf die Migration von glatten Muskelzellen im Wound-Scratch Assay <i>in vitro</i> .....	41
Abbildung 18: Einfluss der Knochenmarkzellen auf die Migrationsfähigkeit glatter Muskelzellen im Migrations-Modell .....	43

## 7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung Nährmedium (Vollmedium) .....	19
Tabelle 2: Zusammensetzung Pufferlösung .....	20
Tabelle 3: ACD-A Stabilisator zur Gerinnungshemmung.....	21
Tabelle 4: MACS-Puffer.....	22

### 7.3. Abkürzungsverzeichnis

A./V./N./M.	<u>A</u> rteria / <u>V</u> ena / <u>N</u> ervus / <u>M</u> usculus
ACD-A	<u>A</u> nticoagulant/ <u>A</u> cid- <u>C</u> itrate- <u>D</u> extrose Solution <u>A</u>
AEC	3- <u>A</u> mino-9- <u>e</u> thyl <u>c</u> arbazol
AK	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
ApoE <sup>-/-</sup>	<u>A</u> polipoprotein <u>E</u> Defizienz
α-SMA	<u>A</u> lpha-Smooth Muscle Actin
BM(T)	<u>B</u> one <u>M</u> arrow ( <u>T</u> ransplant)
BrdU	<u>B</u> rom <u>d</u> esoxy <u>u</u> ridin
BSA	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
cKit	Tyrosinkinase KIT, Protoonkogen
com.	<u>c</u> ommunis
_ -CSF	_ - colony stimulating factor
CXCL12	<u>C</u> X <u>C</u> -Motiv-Chemokin 12, SDF-1
CXCR4	<u>C</u> X <u>C</u> -Motiv-Chemokin <u>r</u> ezeptor <u>4</u> , SDF-1-Rezeptor
DAMPs	<u>D</u> amage- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern molecules
DES	<u>D</u> rug <u>e</u> luting <u>s</u> tent
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
EC	<u>E</u> ndothelial <u>C</u> ell
EPC	<u>E</u> ndothelial <u>P</u> rogenitor <u>C</u> ell
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> ccetat
EGFP	<u>E</u> nhanced <u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>A</u> ssay
EPC	<u>E</u> ndothelial <u>p</u> rogenitor <u>c</u> ell
FCS	<u>F</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum
GAPDH	<u>G</u> lycerinaldehyd-3-phosphat- <u>D</u> ehydrogenase
G <sub>i</sub>	<u>I</u> nhibitorisches <u>G</u> uaninnucleotid-bindendes Protein
HAoSMC	<u>H</u> uman <u>A</u> ortic <u>S</u> mooth <u>M</u> uscle <u>C</u> ells
HBSS	<u>H</u> ank's <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution
H.E.	<u>H</u> ämatoxylin- <u>E</u> osin
HIF-1	<u>H</u> ypoxie- <u>i</u> nduzierter <u>F</u> aktor-1
HMGB-1	<u>H</u> igh- <u>M</u> obility- <u>G</u> roup-Protein <u>B</u> 1



HRP	<u>H</u> orseradish- <u>P</u> eroxidase
HSC	<u>H</u> ematopoietic <u>s</u> tem <u>c</u> ell
HSP	<u>H</u> itzes <u>s</u> chockprotein
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IL- <u>  </u>	<u>I</u> nterleukin- <u>  </u>
KM(T)	<u>K</u> nochen <u>m</u> ark(transplantation)
k.o.	<u>k</u> nock <u>o</u> ut
IP	<u>I</u> mmunpr <u>ä</u> zipitation
LDL	<u>L</u> ow- <u>d</u> ensity <u>L</u> ipoprotein
Ldlr <sup>-/-</sup>	<u>L</u> ow- <u>d</u> ensity <u>L</u> ipoprotein <u>R</u> ezeptor Defizienz
LRR	Leucine-rich repeats
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharide
LTA	<u>L</u> ipoteichoic <u>a</u> cid
MACS	<u>M</u> agnetic <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting
MALP-2	<u>M</u> acrophage- <u>a</u> ctivating lipopeptide-2
min	<u>M</u> inute
Myd88	<u>M</u> yeloid <u>d</u> ifferentiation primary response 88
NF- $\kappa$ B	<u>N</u> uklear <u>F</u> actor <u>k</u> appa <u>B</u>
PAMPs	<u>P</u> athogen- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> atterns
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
Pam_CSK_	<u>P</u> almitoyl- <u>  </u> - <u>c</u> ysteine- <u>s</u> erine-lysine- <u>  </u>
PI3K	<u>P</u> hosphoinositid- <u>3</u> - <u>K</u> inase
PRR	<u>P</u> attern- <u>r</u> ecognition <u>r</u> eceptors
PTX	<u>P</u> ertussistoxin
RNA	<u>R</u> ibonucleic <u>a</u> cid
ROS	<u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies
rpm	<u>r</u> evolutions <u>p</u> er <u>m</u> inute
SDF-1	<u>S</u> tromal cell- <u>d</u> erived <u>f</u> actor <u>1</u>
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	<u>S</u> tandard <u>E</u> rror of the <u>M</u> ean
sek	<u>S</u> ekunde
Sca1	<u>S</u> tem <u>c</u> ells <u>a</u> ntigen-1
SCFR	<u>S</u> tem <u>c</u> ell <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor, cKit, CD117

SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
SMA	<u>S</u> mooth <u>m</u> uscle <u>a</u> ctin
SMC	<u>S</u> mooth <u>m</u> uscle <u>c</u> ell
SPC	<u>S</u> mooth <u>m</u> uscle progenitor <u>c</u> ell
SPF	<u>S</u> pecific- <u>P</u> athogen- <u>F</u> ree
TAK	<u>T</u> GF-beta <u>a</u> ctivated <u>k</u> inase
TE	Tris/EDTA Puffer
Th_ -Zellen	<u>T</u> - <u>H</u> elferzellen
TIR	<u>T</u> oll/ <u>i</u> nterleukin-1 <u>r</u> eceptor
TNF- $\alpha$	<u>T</u> umor <u>n</u> ekrose <u>f</u> aktor- <u>\alpha</u>
TLR	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike <u>R</u> ezeptor
TLR2 <sup>-/-</sup>	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike <u>R</u> ezeptor <u>2</u> Defizienz
WT	<u>W</u> ild <u>t</u> yp
VEGF	<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor

#### **7.4. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Hämatopoetische Zellen vermitteln den günstigen Effekt einer Toll-like Rezeptor 2 Defizienz auf den vaskulären Heilungsprozess nach arterieller Gefäßverletzung“ selbstständig angefertigt habe und mir darüber hinaus keine weitere Hilfe zuteilgeworden ist.

Ich versichere, dass ich bei der Anfertigung der Dissertation keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.

Leipzig, den 27.09.2021

---

Julia-Christin Eczko

## **7.5. Lebenslauf**

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf nicht online veröffentlicht.



## **7.6. Danksagung**

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Daniel A. Reuter, Direktor der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Rostock, meinen Dank dafür aussprechen, dass ich diese Arbeit als Doktorandin in ihrer Klinik absolvieren durfte.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. habil. J. P. Roesner, zu Beginn meiner Arbeit Oberarzt der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Rostock, inzwischen Chefarzt in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin im Klinikum Südstadt Rostock, möchte ich für seine gute Betreuung besonders danken. Darüber hinaus danke ich ihm für seine stetige Unterstützung bei dieser Arbeit und die Möglichkeit die Dissertation auch noch nach vier Jahren zum Abschluss zu bringen.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau PD Dr. med. Nana-M. Wagner für die kontinuierliche Hilfe, ihr offenes Ohr und für die Heranführung an dieses Thema mit Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, der Direktorin des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrem Institut durchzuführen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dorothea Franz, Berit Blendow und Maren Nerowski, sowie bei allen anderen Mitarbeiter/-innen des Institutes für experimentelle Chirurgie, für die angenehme Zusammenarbeit und die hilfsbereite Unterstützung mit ihrer medizinisch-technischen Erfahrung.

Von Herzen danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mir mit Liebe und Kraft zur Seite standen. Der größte Dank gilt jedoch meinem Ehemann, der mich ausdauernd und unermüdlich bei dieser Arbeit begleitet hat. Ohne seine Motivation und seinen Antrieb wäre diese Arbeit nicht vollendet worden. Für Freude und Ablenkung sorgten stets unsere Söhne Hektor und Ansgar, die das Schreiben der Arbeit versüßt haben.

## **7.7. Thesen zur Dissertation**

### **„Hämatopoetische Zellen vermitteln den günstigen Effekt einer Toll-like Rezeptor 2 Defizienz auf den vaskulären Heilungsprozess nach arterieller Gefäßverletzung“**

1. Eine TLR2 Defizienz vermittelt günstigen Effekt nach Gefäßverletzung
2. Diese Effekte entstehen durch Verminderung der Neointimafläche, -dicke und der luminalen Stenose
3. Eine TLR2 Defizienz vermittelt eine Verminderung der migrierenden glatten Muskelzellen in die Neointima
4. Eine Ursache der Verminderung der Neointima ist ein antiinflammatorischer Prozess
5. TLR2 blockierende Antikörper appliziert in Wildtyp Mäusen zeigen ähnliche Effekte wie eine genetische TLR2 Defizienz
6. Als Vermittler dieser Effekte könnte das Fehlen TLR2 vermittelter Signaltransduktion auf hämatopoetischen Zellen ursächlich sein
7. Vermutlich besteht eine zelluläre Interaktion hämatopoetischer Zellen mit ortsständigen Zellen der Gefäßwand
8. Eine therapeutische Option bei Atheroskleroseprogression könnte die Gabe eines anti-TLR2 Antikörper sein