

Förderung der Atherogenese im Endothel durch immunologische Prozesse
über virale und endogene RNA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Inga Catrin Heiders geb. Motz
aus Leverkusen

2013

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Nickenig
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Armin Welz

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.05.2013

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Johannes und meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	12
1.1 Atherosklerose und Endotheliale Dysfunktion.....	12
1.2 Das Immunsystem	17
1.2.1 Das angeborene Immunsystem.....	17
1.2.2 Virale Nukleinsäuren als PAMPs	18
1.2.3 Pattern recognition receptors.....	18
1.2.4 Toll-like Rezeptoren.....	19
1.2.5 RIG-I like Rezeptoren	22
1.3 Regenerationsfähigkeit des Endothels.....	23
1.4 Atherosklerose und oxidativer Stress.....	26
1.4.1 Die Rolle von Stickstoffmonoxid	26
1.4.2 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies	27
1.5 Ziel der Arbeit	29
2. Material und Methodik.....	29
2.1 Zellen und Versuchstiere	29
2.1.1 Versuchstiere.....	29
2.1.2 Zellen.....	32
2.2 In Vivo Experimente.....	33
2.2.1 Organbadexperiment.....	33
2.2.2 L-012 Messung.....	37
2.2.3 FACS Messung für Oberflächenmarker auf Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMNC)	38
2.2.4 FACS Messung von endothelialen Mikropartikeln (EMP)	39
2.3 In Vitro Experimente	40
2.3.1 Zytokinbestimmung per Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	40
2.3.2 Messung der freien Radikale mittels L012-Assay.....	41
2.3.3 Proliferationsnachweis mittels BrdU Färbung	41
2.3.4 Apoptose Assay.....	44
2.4 Statistik	45
3. Ergebnisse	46

3.1 Ergebnisse der in vivo Versuche	46
3.1.1 Organbadexperiment	46
3.1.2 Arteria carotis Denudation	52
3.1.3 Ergebnisse FACS Untersuchung auf PBMNC und EMP	54
3.1.4 L012 Messung in vivo	57
3.2 Ergebnisse der in vitro Versuche	59
3.2.1 ELISA	59
3.2.2 L012 Messung	61
3.2.3 BrdU Färbung	63
3.2.4 Apoptose Assay	65
4. Diskussion.....	68
4.1 Immunstimulation und Zytokinfreisetzung.....	68
4.2 Direkte Effekte der Rezeptorstimulierung	69
4.3 Proliferation und Apoptose.....	70
4.4 Regenerationsfähigkeiten des Endothels.....	72
4.5 Vergleich mit anderen Studien.....	72
4.6 Molekulare und Klinische Bedeutung.....	75
5. Zusammenfassung.....	77
6. Literaturverzeichnis	79
7. Danksagung.....	98

Abkürzungsverzeichnis

3pRNA	Triphosphat Ribonukleinsäure
A549	humane, alveoläre Adenokarzinomzellen (Basalepithel)
ABTS	2,2'Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazolin-6) Sulfonsäure
ADP	Adenosindiphosphat
AngII	Angiotensin II
BH₄	Tetrahydrobiopterin
BrdU	5-Brom-2'desoxyuridin
CARD	Caspase rekrutierende Domäne
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CNP	C Typ natriuretisches Peptid
CpG	Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin
CXCL10	Chemokin Ligand 10
DAMP	Damage associated Molecular Patterns
DAPI	4', 6-Diamidino-2 Phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang Ribonukleinsäure
EDHF	Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor
EDRF	Endothelium Derived Relaxing Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMP	Endotheliale Mikropartikel

eNOS	endotheliale NO Synthase
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
ET	Endothelin
FACS	Fluorescence activated Cell Sorter
FITC	Fluoreszin Isothiocyanat
FLK-1	Fetal Liver Kinase - 1
GC	Guanylatzyklase
GITC	Guanindinium - Isothiocyanat
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCAEC	Human Coronary Artery Endothelial Cells
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293 Cells
HMEC	Human microvascular Endothelial Cells
HO-1	humane Melanomzellen
HUVECS	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IFN-γ	Interferon γ
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IP-10	Interferon Gamma-induced Protein 10
IRF	Interferon-regulierender Faktor

KDR	Kinase Domänen Rezeptor
KHK	Koronare Herzerkrankung
L-O12	8-Amino-5 Chloro-7 Phenylpyridol[3,4-d] Pyridazin-1,4-(2H,3H) Natrium Salz
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Domäne
Mal	MyD88 – adaptor like
MCP	Monocyte chemoattractant Protein
MDA-5	Melanoma differentiation-associated Gene 5
mRNA	Messenger RNA
MyD88	Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFκB	Nuclear Factor 'kappa-Light-Chain-Enhancer' of activated B-Cells
NLR	NOD like Rezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nucleotide-binding, Oligomerization Domain
NOX2	NADPH Oxidase 2
oxLDL	Oxidiertes Low Density Lipoprotein
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBMNC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Solution
PCR	Polymerasekettenreaktion

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule
PGI2	Prostazyklin
PLC	Phospholipase C
polyA	Poly-Adenosin
polyIC	Polyinosinic - Polycytidylic Acid
PRR	Pattern Recognition Receptors
RIG-I	Retinoic Acid inducible Gene I
RLR	RIG-I like Rezeptoren
RLU	Relative Chemilumineszenz
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transkriptase
SCA-1	Stem Cell Antigen 1
siRNA	Small interfering RNA
ssRNA	Single Strand RNA
TF	Tissue Factor
TICAM-1	TIR containing adaptor molecule
TIR	Toll/II-1 Rezeptordomäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α

TRAM	TRIF-related Adaptor Molecule
TRIF	TIR Domain-containing Adaptor - inducing Interferon β
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VE Cadh.	Vascular Endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells

1. Einleitung

1.1 Atherosklerose und Endotheliale Dysfunktion

Die Atherosklerose ist eine multifaktorielle inflammatorische Erkrankung, deren Folgen die häufigsten Todesursachen weltweit darstellen. Besagte Folgen bestehen unter anderem aus Myokardinfarkt, Schlaganfall und aus der peripher arteriellen Verschlusskrankheit. Was sind aber die auslösenden Faktoren dieser epidemiologisch wichtigen Erkrankung? Wurde früher davon ausgegangen, dass Lipidablagerungen in den Gefäßwänden ursächlich für die Entwicklung der Atherosklerose seien, so weiß man heute, dass es zusätzlich zu einer inflammatorischen Reaktion innerhalb der atherosklerotischen Läsionen kommt. Hierbei sind neben den ortsständigen Zellen der Arterienwand wie Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen auch verschiedene zirkulierende Zelltypen wie Monozyten, Thrombozyten sowie T- und B-Lymphozyten beteiligt (Ross, 1995). Ein Beispiel dafür ist, dass es in frühen atherosklerotischen Läsionen, wie sie schon im Kindesalter vorkommen können, im Bereich der Gefäßwand zu einer Ansammlung von Makrophagen und T Lymphozyten kommt (Stary, 1994).

Innerhalb der Entwicklung einer Atherosklerose lassen sich mehrere Stadien abgrenzen. Allen Stadien gemein ist die endotheliale Dysfunktion. Sie initiiert und begünstigt die Entstehung einer Atherosklerose und ist gekennzeichnet durch den Verlust zellulärer Funktionen, durch eine vermehrte Apoptose und durch eine verminderte Regenerationsfähigkeit der Endothelzellen. Auf molekularer und zellulärer Ebene bedeutet dies eine reduzierte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) durch einen zunehmenden Verlust an Endothelzellen (Libby, 2002; Ross, 1999). Hierbei muss gesagt werden, dass sich die endotheliale Dysfunktion nicht allein als Hauptmerkmal der Atherosklerose findet, sondern auch unabhängig hiervon auftreten kann und dann für ein hohes kardiovaskuläres Risiko steht (Schachinger et al., 2000; Suwaidi et al., 2000; Halcox et al., 2002; Vita und Keaney, 2002).

Spricht man über die endotheliale Dysfunktion als prädisponierenden Faktor für die Atherogenese, so muss man sich zunächst über die Aufgaben des gesunden Endothels bewusst werden. Neben seiner Funktion als Grenzstruktur kommen ihm noch andere wichtige Aufgaben zuteil.

Um einen ungestörten Blutfluss zu garantieren, sorgt das Endothel für eine durchgängige nicht-adhärenzte Oberfläche für zirkulierende Zelltypen. Zudem gewährleistet es eine selektive Permeabilität für bestimmte Moleküle. Außerhalb des zentralen Nervensystems findet so zum Beispiel ein zumeist passiver Transport von Ionen und Nährstoffen statt. Im zentralen Nervensystem ist zudem ein Transport von Glukose, Transferrin, LDL und Aminosäuren von Nöten. In inflammatorischen Situationen kommt es zytokinvermittelt zur Öffnung der Interzellularspalten und damit zum freien Austritt von Blutproteinen und Zellen in die Gefäßwand (Benninghoff und Drenckhahn, 2004). Den Muskeltonus des Gefäßes beeinflusst das Endothel durch die Generierung vasoaktiver Substanzen wie Stickstoffmonoxid und Prostazyklin (Vasorelaxation) auf der einen und Endothelin sowie Angiotensin II (Vasokonstriktion) auf der anderen Seite. Das Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Gerinnungshemmung wird mittels verschiedener, durch das Endothel sezernierte Moleküle (u.a. Heparansulfat-proteoglykan, NO, Prostazyklin und der von-Willebrand Faktor), geregelt (Rösen, 2002).

Das Endothel hat zudem Einfluss auf die Proliferation umgebender Gefäßwandbestandteile. So wird zum Beispiel das Wachstum der medialen glatten Muskelzellen durch das Endothel gesteuert. Aus experimentellen Modellen weiß man, dass ein denudiertes Endothel zu einer gesteigerten Proliferation der glatten Muskelzellen führt (Lindner et al., 1993).

Endothelzellen können Pathogenen und Bakterienprodukten ausgesetzt sein, die über den Blutstrom eintreten. Auch endogene Moleküle, die nach einem Gewebeschaden im Blut zirkulieren oder lokal anfallen, können das Endothel beeinflussen. Als wichtiger Bestandteil des Immunsystems verfügt das Endothel über spezifische Rezeptoren für Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone und beantwortet deren Aktivierung mit Strukturveränderungen und der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (wie z.B. Tumor Nekrose Faktor α und Interferon γ), die zur Leukozytenrekrutierung und -aktivierung führen. Zudem exprimieren Endothelzellen im Rahmen einer Inflammation Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (intracellular adhesion molecule) oder VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule), welche die Thrombozytenaggregation und die Leukozytenmigration fördern (Opitz et al., 2007; Pober und Sessa, 2007). Zusätzlich setzen ortsständige immunkompetente Zellen wie Leukozyten und Monozyten proinflammatorische Zytokine sowie freie Sauerstoffradikale frei. Der inflammatorische Prozess

wird verstärkt. Den proinflammatorischen Prozessen stehen im gesunden Endothel einige antiinflammatorische Regulatoren gegenüber. Hierunter zählen zum Beispiel Stickstoffmonoxid, Prostazyklin und antioxidative Enzyme (Rösen, 2002).

Zu Anfang der Atherogenese kommt es nun zu einer permanenten Schädigung des Endothels, zum Einen durch kardiovaskuläre Risikofaktoren (siehe Abbildung 1.1) und zum Anderen durch lokale Entzündungsgeschehen, die wiederum auch durch die Risikofaktoren ausgelöst werden können.



Abb. 1: Wichtige Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose. Mehrere Faktoren erhöhen das Risiko der Entstehung einer Atherosklerose. Hierzu zählen das metabolische Syndrom mit der arteriellen Hypertonie, der Hypercholesterinämie und der Adipositas genauso wie oxidativer Stress oder der Nikotinabusus. Auch kann es über inflammatorische Prozesse zu einer endothelialen Dysfunktion kommen.

Auf die primäre Schädigung des Endothels mit konsekutiver Veränderung der zellulären Homöostase folgt eine Ansammlung von Lipiden mit Einwanderung von Makrophagen in die subendothelialen Schichten. Dies wird durch eine Zunahme der Gefäßpermeabilität zugelassen. Zunächst nehmen die eingewanderten Phagozyten kleinere Cholesterinkristalle auf (Düwell et al., 2010). Über Scavenger Rezeptoren können darauf große Mengen an Lipoproteinen aufgenommen werden. Die Makrophagen werden nun zu sogenannten „Schaumzellen“. Makroskopisch zeigt sich nunmehr das Bild einer „fatty streak“, einer streifenförmigen Fetteinlagerung in der Gefäßwand. Die gelbliche Farbe resultiert aus der Einlagerung von Schaumzellen. Fatty Streaks bilden sich vermehrt an

Stellen mit hämodynamischen Besonderheiten (abnehmender Blutfluss, Rückstrom, Totwasserzonen, Krümmungen), die lokal zu einer Schädigung des Endothels führen können. Diese finden sich zum Beispiel an der Bauchaorta, den Koronarien, der Arteria carotis interna, der Arteria femoralis oder dem Circulus arteriosus cerebri (Wissler und Vesselinovitch, 1983; Cornhill et al., 1985).

Das nun folgende Intermediärstadium wird auch „fibrofatty lesion“ genannt und ist gekennzeichnet durch in die Gefäßintima eingewanderte glatte Muskelzellen neben T-Zellen und Schaumzellen. Die glatten Muskelzellen, vascular smooth muscle cells (VSMC) wandern entweder aus der Gefäßmedia ein oder entstehen über aus dem zirkulierenden Blut eingewanderten CD 34 positiven hämatopoetischen Progenitorzellen, welche sich zu Vorläuferzellen glatter Muskelzellen differenzieren (Gerthoffer, 2007). Im Stadium der Atherosklerose wandeln sich die VSMC zudem vom kontraktiven Phänotyp zum synthetischen Phänotyp. Sie produzieren vermehrt Proteine der Extrazellulärmatrix (Adiguzel et al., 2009). Verschiedene Moleküle wirken migrationsstimulierend auf VSMC. Hierzu zählen zum Beispiel Zytokine wie Interleukin 1 β und Interleukin 6, vascular endothelial growth factor (VEGF) und platelet derived growth factor (PDGF). Auch die extrazelluläre Matrix kann über Komponenten wie monomeres Kollagen I promigratorische Effekte initiieren. Die Hochregulation von Matrixmetalloproteasen im Rahmen der Atherosklerose, welche Proteine der extrazellulären Matrix fragmentieren, trägt auch zur Migration von VSMC bei. Migrationsinhibierend wirken dahingegen Heparin oder NO-Liberatoren (Gerthoffer, 2007). Das dysfunktionale Endothel kann der Proliferation der Mediazellen nichts entgegensetzen, die inflammatorische Antwort stimuliert zudem die Migration und Proliferation zirkulierender Zellen. Die Gefäßwand verdickt sich. Zunächst wird dieser Prozess jedoch noch von einer langsamen Dilatation des Gefäßes kompensiert, sodass der Lumendurchmesser gleich bleibt. Dieses Phänomen nennt man „Remodeling“ (Glasgov et al., 1987).

Die glatten Muskelzellen synthetisieren und sezernieren Proteoglykane, Elastin und Kollagen und bilden so eine fibröse Plaquekappe. Als Folge der Kappenbildung kann es zu einer Lumeneinengung und so zu einer Verminderung der Durchblutung kommen. Die Zusammensetzung der Kappe entscheidet darüber, ob die Plaque stabil ist oder nicht. Eine gleichmäßig dicke und dichte Kappe sorgt für Stabilität, eine unregelmäßige, dünne und makrophagenreiche Kappe sorgt für Instabilität (Fuster et al., 1992).

Atherosklerotische Läsionen in Situationen einer chronischen, stabilen Ischämie wachsen aufgrund einer exzessiven Vermehrung der Extrazellulärmatrix. Dahingegen ist im Falle einer instabilen Plaque die Fähigkeit zur suffizienten Matrixsynthese nicht mehr gegeben. Die Synthese von Kollagenen über VSMC tragen zur Aufrechterhaltung der Stabilität bei. Falk beobachtete 1992, dass die fibröse Kappe rupturierter Plaques doppelt so viele Makrophagen als diejenige unrupturierter Plaques enthält, jedoch nur die Hälfte an VSMC. Diese verminderte Expression könnte Resultat einer Wachstumsinhibierung via Interferon γ Sekretion von T Lymphozyten darstellen (Geng et al., 1996). Bennett et al. zeigten 1995 zudem, dass in atherosklerotischen Läsionen die VSMC einer vermehrten Apoptose unterliegen. Zudem wurde gezeigt, dass Monozyten und Makrophagen, die atherosklerotische Läsionen infiltrieren können, zu einer Inflammation führen und proteolytische Enzyme freisetzen, welche die Extrazellulärmatrix auflösen (Charo und Ransohoff, 2006; Galkina und Ley, 2009; Libby et al., 2011; Randolph, 2009; Weber und Noels, 2011). Dutta et al. zeigten 2012, dass ein akuter Myokardinfarkt oder ein Apoplex die inflammatorische Reaktion in einer atherosklerotischen Plaque noch steigert, dieser Effekt einige Monate nach dem Event anhielt und zu einem schnelleren Wachstum der Plaques und einer erhöhten Aktivität proteolytischer Enzyme führt.

Der lipidreiche Kern der atheromatösen Läsion ist um einiges instabiler als die fibröse Kappe. Er besteht aus Cholesterinmonohydrat, Cholesterinestern und Phospholipiden. Zudem ist er Quelle von prothrombotischem Material. Hier spielt vor allem der Tissue Factor (TF, Thromboplastin) eine tragende Rolle (Nemerson, 1995). Wenn die fibröse Kappe reißt, ist dieser Kern Thrombozyten und zirkulierenden Gerinnungsfaktoren ausgesetzt. Der entstehende Thrombus kann zu einem Verschluss des Gefäßes führen (Lee und Libby, 1997).

Betrachtet man also die Atherogenese, so stellt man fest, dass neben dem Endothel auch das angeborene und erworbene Immunsystem eine große Rolle spielt.

1.2 Das Immunsystem

Durch das Immunsystem ist der menschliche Körper in der Lage, mit Infektionserregern und anderen Fremdstrukturen umzugehen. Es besteht aus einem komplexen System von Zellen und Faktoren, welche über den gesamten Organismus verteilt sind. Einzu- teilen ist es in zwei unterschiedlich funktionierende Untergruppen:

- Das *angeborene, unspezifische Immunsystem*, das die erste, frühe Phase der Abwehr von Pathogenen bestimmt, sowie
- Das *selektive, erworbene Immunsystem*, das antigenspezifisch und zeitver- zögert wirkt. Es ist anpassungsfähig und trägt zu einem immunologischen Ge- dächtnis bei.

Typische Zellen des angeborenen Immunsystems sind Makrophagen, Monozyten, Gra- nulozyten, NK Zellen und auch Endothelzellen.

Typische Zellen des erworbenen Immunsystems sind B- und T- Lymphozyten sowie Antigen- präsentierende Zellen (Löffler, 2003).

Die endotheliale Dysfunktion sowie die Atherosklerose sind nun chronisch inflam- matorische Prozesse mit einer Ansammlung inflammatorischer Zellen in der Gefäß- wand. Wie vorhin beschrieben finden sich in allen Stadien der Erkrankung Zellen sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems.

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem arbeitet mit Hilfe einiger hochkonservierter Rezeptoren, die körperfremde Pathogene erkennen. Diese Rezeptoren nennt man „pattern recog- nition receptors“, kurz PRRs. Sie werden von multiplen Zelltypen exprimiert und sind auf bestimmte PAMPs (pathogen associated molecular patterns) spezialisiert. Als Beispiel für PAMPs seien die Lipopolysaccharide (LPS) der Bakterienwand oder virale Nuklein- säuren genannt. PRRs können zudem auf endogene damage-associated molecular pat- terns (DAMPs) einschließlich ATP oder Hyaluronsäure reagieren, die bei Zell- schädigungen freigesetzt werden.

1.2.2 Virale Nukleinsäuren als PAMPs

Virale oder bakterielle Nukleinsäuren weisen oftmals andere Merkmale als körpereigene Nukleinsäuren auf. So produzieren viele Viren doppelsträngige RNA während ihres Replikationszyklus (Baltimore et al., 1964; Montagnier und Sanders, 1963). Inkubiert man Säugetierzellen mit artifiziell produzierter doppelsträngige RNA (polyIC = polyinosinic:polycytidylic acid) so kommt es im Verlauf zu einer proinflammatorischen Antwort im Sinne einer Typ I Interferon Aktivierung (Field et al., 1967). Der Körper reagiert also auf die Erkennung einer fremden Struktur.

Kariko et al. fanden 2005 heraus, dass eine Inkubation von mitochondrialer RNA in dendritischen Zellen ähnliche TNF α Spiegel verursacht, wie die Inkubation reiner E. coli RNA. Zelluläre RNA zeigte hingegen keinerlei immunologische Aktivität. Hieran lässt sich erkennen, dass es bestimmte Nukleosid Modifikationen geben muss, die je nach Spezies unterschiedlich sind. Mitochondriale RNA stammt originär von Bakterien ab und kommt allenfalls bei Zellschädigung im Zytosol vor.

Spezielle RNA Sequenzen können zur Erkennung fremder Nukleinsäuren durch unser Immunsystem beitragen. So kann ein freies 5' Phosphatende auf eine körperfremde RNA hinweisen und durch zytosolische PRRs erkannt werden (Hornung et al., 2006). In humanen Zellen kommt diese von nun an als 3pRNA bezeichnete RNA aufgrund von posttranskriptionellen Modifizierungen wie dem Capping der 5' Triphosphat Enden nicht vor (Shatkin und Manley, 2000).

1.2.3 Pattern recognition receptors

Allen PRRs ist Folgendes gemein:

- 1.) Sie werden in der Keimbahn kodiert.
 - 2.) Sie werden in multiplen Geweben exprimiert, so auch im Endothel.
 - 3.) Sie erkennen eine limitierte Anzahl an mikrobiellen und endogenen Molekülen
- (Opitz et al., 2009).

Allein in der Signaltransduktion, der Immunantwort und ihrer Lokalisation unterscheiden sich die PRRs. Man kennt folgende Untergruppen:

- 1.) Toll-like Rezeptoren (TLR)
- 2.) Zytosolische NOD-like Rezeptoren (NLR)
- 3.) RIG-I like Rezeptoren (RLR)

(Beutler, 2009; Chen et al., 2009; Fritz et al., 2006; Ting et al., 2008; Yoneyama und Fujita, 2009).

Hier wird nur auf die Toll like Rezeptoren und die RIG-I-like Rezeptoren eingegangen.

1.2.4 Toll-like Rezeptoren

1985 wurde das Protein „Toll“ in einem *Drosophila Melanogaster* Embryo von Christiane Nüsslein-Vollhard erstmalig beschrieben (Anderson et al., 1985). TLRs bestehen aus Proteinen die Toll ähneln. Mittlerweile sind beim Menschen 13 Subtypen der Toll-Like Rezeptoren bekannt, die alle dafür sorgen, körpereigene von bakteriellen oder viralen Molekülen zu unterscheiden. Jedem Rezeptor sind intrinsische Signalwege mit resultierender Freisetzung von biochemischen Molekülen zugeordnet. Diese enden dann in einer Reifung immunkompetenter Zellen und in einer Zytokinproduktion (Takeuchi und Akira, 2007).

Die TLRs liegen entweder an der Zelloberfläche oder an lysosomalen/endosomalen Membranen. Sie werden durch unterschiedliche Liganden aktiviert, wie aus der folgenden Tabelle 1 ersichtlich wird. Hierbei handelt es sich nicht nur um exogene, sondern vielmehr auch um eine Vielzahl endogener Liganden. Ein Toll-like Rezeptor hat eine zytoplasmatische Toll/II-1 Rezeptordomäne (TIR) und eine extrazelluläre Leucin-reiche Domäne (LRR). Die Signalkaskade beginnt mit vier Adaptermolekülen für die zytoplasmatische Domäne: MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88), Mal (MyD88- adaptor like), TRIF (TIR domain-containing adaptor-inducing interferon β) und TRAM (TRIF-related adaptor molecule).

PRR	PAMP	Adapter	Funktion	Lokalisation	Quelle
TLR-1	Triacetylierte Lipopeptide (zusammen+TLR-2)	MyD88	NF-κB abhängige Gen Expression	Zelloberfläche	(Takeuchi et al.,2002; Opitz et al., 2007; Beutler, 2009)
TLR-2	Triacetylierte Lipopeptide (zusammen mit TLR-1 und TLR-6), Lipoteichoidsäuren, Glykolipide	MyD88, Mal	NF-κB abhängige Gen Expression	Zelloberfläche	(Aliprantis et al.,1999; Underhill et al., 1999; Opitz et al., 2001)
TLR-3	dsRNA	TRIF	NF-κB abhängige Gen Expression; TICAM-1 abhängige Expression von Typ 1 Interferonen	Endosomal/lysosomal	(Alexopoulou et al., 2001; Oshiumi et al., 2003; Liu et al., 2008)
TLR-4	LPS,virale Proteine, endogene Hitzeschockproteine,oxLDL, Fibrinogen	MyD88, Mal, TRIF,TRAM	NF-κB abhängige Gen Expression; IRF abhängige Expression von Typ 1 Interferonen	Zelloberfläche	(Poltorak et al., 1998; Miller et al., 2005)
TLR-5	Flagellin	MyD88	NF-κB abhängige Gen Expression	Zelloberfläche	(Hayash et al., 2001)
TLR-6	Diacetylierte Lipopeptide (zusammen+TLR-2)	MyD88	NF-κB abhängige Gen Expression	Zelloberfläche	Siehe TLR-2

TLR-7/TLR-8	ssRNA	MyD88	NF- κ B abhängige Gen Expression; IRF abhängige Expression von Typ 1 Interferonen	Endosomal/lysosomal	(Heil et al., 2004)
TLR-9	CpG-DNA	MyD88	NF- κ B abhängige Gen Expression; IRF abhängige Expression von Typ 1 Interferonen	Endosomal/lysosomal	(Poeck et al., 2004; Rothenfusser et al., 2004)
TLR-10	Nicht bekannt	MyD88	Nicht bekannt		
TLR-11	Uropathogene Bakterien		Aktivierung von Tumor Nekrose Faktor α , Interferon γ , Interleukin 12		(Zhang et al., 2004; Yarovinsky et al., 2005; Yarovinsky et al., 2008)
TLR-12	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt		
TLR-13	Nicht bekannt	Nicht bekannt	Nicht bekannt		

Tab. 1: Toll-like Rezeptoren und ihre Funktion

TICAM: TIR containing adaptor molecule; oxLDL: oxidiertes LDL, LPS: Lipopolysaccharide; IRF: Interferon-regulierender Faktor; CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanosin. Jeder Toll-like Rezeptor fungiert als PRR und hat seine spezifischen PAMP. So erkennt z.B. der TLR 3 lange Doppelstrang RNA, die Signalübermittlung wird via TRIF vermittelt und führt zu einer NF κ B abhängigen Gen-Expression sowie zu einer TICAM-1 vermittelten Expression von Typ 1 Interferonen. Dieses geschieht endosomal und lysosomal.

Im Rahmen dieser Dissertation wird vor allem auf TLR-3 eingegangen. Es wird postuliert, dass eine Rezeptoraktivierung mittels langer Doppelstrang RNA das Endothel durch proinflammatorische und proatherogene Prozesse schädigt.

Der Toll-Like Rezeptor 3 wird hauptsächlich in Pankreas und Plazenta (Rock et al., 1998) aber auch in Gefäßen wie der Aorta oder der Arteria carotis exprimiert. Wird TLR-3 stimuliert, so findet eine TICAM-1 abhängige Aktivierung des Interferon- β Promotors und des NF κ B Promotors statt (Oshiumi et al., 2003). Somit wird eine proinflammatorische Antwort initiiert. Diese kann zum Einen für unsere Körperabwehr sorgen, zum Anderen jedoch auch die Ursache von pathologischen Prozessen darstellen.

1.2.5 RIG-I like Rezeptoren

Eine weitere Untergruppe der PRRs stellt diejenige der RIG-I like Rezeptoren dar. Zu diesen gehören die intrazytoplasmatische RNA Helikase retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I) und melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA-5) (Andrejeva et al., 2004; Yoneyama et al., 2004).

Während im Endosom durch TLR-3 lange Doppelstrang RNA und sein synthetisches Äquivalent polyIC erkannt wird (Alexopoulou et al., 2001), findet diese Erkennung im Zytosol über MDA-5 statt (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006; Rothenfusser et al., 2005; Yoneyama et al., 2005). Vor Kurzem wurde 3pRNA als spezifischer Ligand von RIG-I identifiziert (Hornung et al., 2006). Die Autoren transfizierten *in vitro* transkribierte RNA in Monozyten und dendritische Zellen und bestimmten im Anschluss die Interferon α Konzentration als Zeichen der inflammatorischen Antwort. Die RNA benötigte mindestens 19 Basenpaare. Mehr noch als eine spezifische Basensequenz war ein 5' Triphosphat Ende für die Erkennung via RIG-I von Nöten. Dieses Charakteristikum ließ die Autoren den RIG-I Liganden 3pRNA nennen.

RIG-I und MDA-5 werden in Endothelzellen exprimiert. Die RIG-I Rezeptorexpression wird durch proinflammatorische Stimulation hochreguliert (Berghall et al., 2006; Imaizumii et al., 2002).

RIG-I ist eine DExD/H Box RNA Helikase mit einer C-terminalen Helikase Domäne und zwei Tandem Kaspase-rekrutierenden Domänen (CARDs) am N-Terminus. Die zu erkennende RNA bindet am C-Terminus und induziert Konformationsänderungen der

CARD. Dieses führt über eine Signalkaskade dann zur Aktivierung von IRF-3 und NFκB (Yoneyama et al., 2004).

MDA-5 ist ebenfalls eine DexD/H Box RNA Helikase und besteht aus zwei CARD-ähnlichen Domänen und einer einzelnen Helikase Domäne. Eine Aktivierung von MDA-5 führt zur Typ 1 Interferon Produktion (Andrejeva et al., 2004; Kang et al., 2002; Kovacsovics et al., 2002).

Inflammatorische Prozesse sind mitverantwortlich für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion. Eine endotheliale Dysfunktion ihrerseits führt wiederum zu einer Aktivierung des Immunsystems. Ziel ist es nun herauszufinden, in wie weit das Endothel selber an diesem Prozess beteiligt ist und somit ein immunkompetentes Gewebe darstellt.

Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass menschliche Endothelzellen aus Koronararterien einige der oben genannten Rezeptoren exprimieren, dass deren Expression durch Rezeptoraktivierung hochreguliert wird und dass es zu einer gezielten Immunantwort nach Stimulation der Rezeptoren kommt. 3pRNA und polyIC führten zu einer Hochregulation von TLR-3, RIG-I, MDA-5 sowie zur Produktion von Interferon β.

Wir postulieren daher, dass Endothelzellen imstande sind, auf eine virusähnliche Stimulation zu reagieren und dass diese Stimulation zur Endothelzellaktivierung und zu einer endothelialen Dysfunktion führt.

1.3 Regenerationsfähigkeit des Endothels

Bei einem chronisch inflammatorischen Prozess wie der Atherosklerose und der endothelialen Dysfunktion kommt es zu einer Schädigung des Endothels. Der Schädigung stehen hierbei Regenerationsprozesse der Zellen gegenüber.

1.3.1 Endotheliale Progenitorzellen (EPC)

Eine lokale oder systemische Entzündung kann im Endothel zu einem Zellschaden führen (Ross, 1995). Früher wurde angenommen, dass Gefäßwachstum beim Erwachsenen allein durch Angiogenese und Arteriogenese, einem Gefäßwachstum auf Basis

bereits vorbestehender Gefäße, möglich wäre. Eine Vaskulogenese aus endothelialen Vorläuferzellen gäbe es nur während der Embryogenese. Heute finden sich jedoch Hinweise dafür, dass auch im erwachsenen Körper eine Vaskulogenese möglich ist (Asahara et al., 1997; Asahara et al., 1999; Rafii und Lyden, 2003; Shi et al., 1998). Verantwortlich hierfür sind zirkulierende unreife Zellen, die sogenannten endothelialen Progenitorzellen, aus dem hämatopoetischen Knochenmark. Urbrich und Dimmeler definierten 2004 EPC als nicht-endotheliale Zellen, die klonale Expression, Proliferationskapazität und Stressresistenz zeigen und zur Differenzierung in Endothelzellen fähig sind.

Die EPC sind durch die Oberflächenmoleküle CD 34 (sca-1) und vascular endothelial growth factor (VEGF) Rezeptor 2 bzw. Kinase Domänen Rezeptor (KDR) gekennzeichnet worden (Asahara et al., 1997). CD 34 findet sich jedoch auch auf reifen Endothelzellen. Eine unreife Untergruppe von EPC exprimiert zudem den Marker CD 133 (Gill et al., 2001; Handgretinger et al., 2003; Rafii und Lyden, 2003). Peichev et al. postulierten 2000, dass die Kombination aus CD 34, CD 133 und KDR die EPC Population definieren könnte.

Hur et al. fanden 2004 heraus, dass zwei unterschiedliche Typen von EPC existieren. Die „early EPC“ imponieren spindelförmig, zeigen ein Proliferationsmaximum bei 2-3 Wochen und starben nach 4 Wochen. Die „late EPC“ zeigen einen kopfsteinpflasterähnlichen Phänotyp, erscheinen erst nach 2-3 Wochen, zeigen nach 4-8 Wochen ein exponentielles Wachstum und eine Überlebenszeit von 12 Wochen. Auch in der Expression der Oberflächenmoleküle unterscheiden sich die beiden Zelltypen. So exprimieren frühe EPC CD 45 ausgeprägter, während späte EPC Endothel-spezifische Marker wie KDR und Vascular endothelial (VE)-Cadherin vermehrt produzieren. Späte EPC produzieren ähnlich wie reifes Endothel vermehrt NO und bilden sowohl Einzelzellschichten als auch Kapillaren aus. Frühe EPC sezernieren hingegen vermehrt angiogenetische Zytokine. Vergleichbar ist die vaskulogenetische Kapazität in vivo (Hur et al., 2004).

Die Anzahl zirkulierender EPC ist negativ korreliert mit der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren. So verschlechtert Diabetes mellitus zum Beispiel die Migrationskapazität der EPC (Hill et al., 2003; Vasa et al., 2001). Hill et al. publizierten 2003 zudem, dass die endotheliale Dysfunktion mit einer reduzierten EPC Anzahl einhergeht. Nur wenige

Studien beschäftigten sich mit der Rolle von EPC in der Prävention und Therapie der Atherosklerose (Rauscher et al., 2003; Werner et al., 2002).

1.3.2 Endotheliale Mikropartikel

Geben zirkulierende EPC eine Auskunft über die Regenerationsfähigkeit von Endothelzellen, so wäre auf der anderen Seite auch ein Marker für die stattgefundene Zellschädigung wünschenswert. Während der Apoptose einer Endothelzelle ändert sich die Konformation der Plasmamembran, der Zellkern kondensiert, die DNA wird fragmentiert und kleine Membranvesikel werden sezerniert. Diese Vesikel nennt man endotheliale Mikropartikel (EMP) (Horstman et al., 2004). Mikropartikel werden definiert als Vesikel unter 1µm Durchmesser. Sie werden von der Plasmamembran als Antwort auf Zellaktivierung, -verletzung und Apoptose freigegeben (Hugel et al., 2005). Ein intrazytoplasmatischer Kalziumanstieg während Zellaktivierung oder Apoptose führt über bestimmte Signalwege zur Externalisierung des sonst an der Innenseite der Plasmamembran sitzenden Phosphatidylserins. Zudem führt das Kalzium zu einer Spaltung der Zytoskelett-Filamente. Dies resultiert dann in einer Loslösung der Mikropartikel in die Extrazellulärflüssigkeit (Boulanger et al., 2006).

EMPs besitzen verschiedene Oberflächenmarker, mit deren Hilfe sie charakterisiert werden können: CD 31 (PECAM, platelet-endothelial cell adhesion molecule), CD 51 (ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1), CD 62E (E-Selectin), CD 62P (P-Selectin), CD 146 u.a. (Horstman et al., 2004). Phosphatidylserin bindet spezifisch an Annexin V, somit wird dieser Marker generell zur Quantifizierung der Gesamtmenge an Mikropartikeln hinzugezogen. Jedoch ist Annexin V nicht spezifisch oder sensitiv für Mikropartikel. Apoptose-induzierte EMP exprimieren eher CD 31, Aktivierungs-induzierte EMP eher CD 62E (Abid Hussein et al., 2003; Jimenez et al., 2003).

Die Wichtigkeit von EMP als prognostischer Marker für das kardiovaskuläre Risiko zeigt sich in der Erhöhung selbiger in verschiedenen Erkrankungen des Herz-Kreislauf Systems. Sowohl beim akuten Koronarsyndrom (Bernal-Mizrachi et al., 2003; Mallat et al., 2000) als auch bei der arteriellen Hypertonie (Preston et al., 2003) treten erhöhte EMP Spiegel auf. Auch beim Diabetes mellitus Typ 1 (Sabatier et al., 2002) und bei der venösen Thrombembolie (Chirinos et al., 2005) finden sich diese Serumspiegelveränderungen. In Patienten mit KHK korreliert die Anzahl der zirkulierenden EMP zudem

mit der Schwere der endothelialen Dysfunktion, was annehmen lässt, dass die endothelabhängige Vasodilatation eng mit dem Grad der Endothelzellapoptose zusammenhängt (Werner et al., 2006).

Abschließend muss erwähnt werden, dass EMP eine prokoagulatorische Aktivität aufweisen, an Entzündungsprozessen beteiligt sind und selber einen direkten Effekt auf die Endothelfunktion haben (Diamant et al., 2004).

1.4 Atherosklerose und oxidativer Stress

1.4.1 Die Rolle von Stickstoffmonoxid

Als eine der wichtigsten Aufgaben des funktionstüchtigen Endothels wurde im Vorfeld bereits die Regulierung von Vasodilatation und Vasokonstriktion genannt. Das Endothel ist fähig durch Sekretion vasoaktiver Substanzen den Gefäßtonus zu regulieren. Die wichtigsten Autakoide sind Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF), der gleichzusetzen ist mit Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin (PGI_2), Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF), C-Typ natriuretisches Peptid (CNP), Endothelin-1 und Urotensin-II. NO wird im Endothel konstitutiv über die endotheliale NO Synthase (eNOS) aus L-Arginin gebildet. Das Enzym arbeitet abhängig von einer Kalzium/Calmodulin Bindung und somit führen alle Botenstoffe, die zu einer intrazellulären Kalziumerhöhung führen (Acetylcholin, Bradykinin, Histamin, Thrombin, Substanz P) zu einer Steigerung der NO Bildung. Ebenso führen mechanisch stimulierbare Kinasen zu einer Aktivitätsänderung des Enzyms. Neben der basalen NO Freisetzung in Ruhe, kommt es unter bestimmten physikalischen Einflüssen auf das Endothel zu vermehrten NO Produktion. Hierzu zählen vermehrte Wandschubspannung, pulsatorische Dehnungs- und Entdehnungszyklen, mechanische Deformationen und die Absenkung des arteriellen O_2 Partialdruckes (Schmidt, 2005).

Im Gefäß selber hemmt Stickstoffmonoxid die Kontraktion und Proliferation der glatten Muskelzelle in der Gefäßmedia und vermittelt ein Gleichgewicht zwischen myogen sowie neurogen induzierter Vasokonstriktion und NO induzierter Vasodilatation. Unterstützend hierzu hemmt es die Endothelinproduktion im Endothel. Auf molekularer Ebene kommt es zur Hemmung der Aktivierung von NF κ B sowie zur Unterdrückung der

Expression von VCAM, E-Selectin, P-Selectin und Monocyte chemoattractant Protein-1 (MCP-1), welches die Monozytenmigration in die Gefäßwand vermittelt.

Einige der NO-Liberatoren, so z.B. Acetylcholin, führen in der glatten Muskelzelle zur Kontraktion. Die resultierende vasomotorische Reaktion ist also immer eine Nettoantwort von endothelabhängiger bzw. NO getriggelter Dilatation und glattmuskulärer Kontraktion. Bei einer endothelialen Dysfunktion mit reduzierter Bioverfügbarkeit von NO kommt es also zu einem Übergewicht der Vasokonstriktion.

NO kann zudem die Oxidation von low density Lipoproteinen verhindern und spielt so eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von oxidativem Stress (Schmidt, 2005).

1.4.2 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies umfassen molekularen Sauerstoff und seine Derivate. Werden vermehrt Sauerstoffradikale gebildet und reichen die antioxidativen Kapazitäten einer Zelle nicht mehr aus, so werden biologische Makromoleküle wie DNA, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide oxidiert. Diesen Status nennt man oxidativen Stress. Viele Studien weisen darauf hin, dass oxidativer Stress an der Pathogenese vieler kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt ist. So zum Beispiel bei der Hypercholesterinämie, der Atherosklerose, der arteriellen Hypertonie, des Diabetes mellitus und der Herzinsuffizienz (Cai und Harrison, 2000).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind zumeist freie Radikale, z.B. Hyperoxid Anion (O_2^-), Hydroxylradikal (OH), Stickstoffmonoxid (NO) und Lipidradikale. Es existieren auch reaktive Sauerstoffspezies, die keine freien Radikale darstellen, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit ($ONOO^-$) und Hypochlorit (HOCL). Durch die Reaktion dieser Sauerstoffspezies mit zum Beispiel ungesättigten Fettsäuren kann es wiederum zu weiteren reaktiven Sauerstoffspezies kommen. Es kann konsekutiv zur erhöhten Permeabilität des Plasmalemm, und zum Funktionsverlust membrangebundener Rezeptoren kommen (Cai und Harrison, 2000).

Als potentielle Quellen von ROS gelten Enzyme der Atmungskette und des Arachidonsäurestoffwechsels. Dazu zählen die Lipooxygenase, die Zyklooxygenase, das Cytochrom P450 System, die Xanthinxygenase, die NADH/NADPH Oxygenase, die NO Synthase und Peroxidasen.

Dupont et al. zeigten 1992, dass es durch Interferon- γ zu einer Aktivitäts- und Expressionssteigerung der Xanthinoxidase kommt. Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies dieses Enzyms hat dann Einfluss auf die Entstehung von Hypertonie, Atherosklerose und Hypercholesterinämie (Cardillo et al., 1997; Nakazono et al., 1991; Ohara et al., 1993).

Die Aktivität der NADH/NADPH Oxidase wird durch Zytokine und andere Botenstoffe bestimmt, die auch bei Gefäßkrankheiten eine tragende Rolle spielen. So zum Beispiel TNF α , Angiotensin II, Lactosylceramid und Thrombin (Bhunja et al., 1997; De Keulenaer et al., 1998; Griendling et al., 1994; Holland et al., 1998). Bauersachs et al. zeigten 1999, dass bei sekundärem Herzversagen nach Myokardinfarkt die basale und die durch das Enzym getriggerte O_2^- Produktion gesteigert sind. Ebenso findet man bei Ratten mit hypertonen Blutdruckwerten erhöhte NADH/NADPH Oxidase-assoziierte O_2^- Werte (Zalba et al., 2000). Guzik et al. zeigten schließlich 2000 einen Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie mit erhöhten ROS Werten.

Die endotheliale NO Synthase katalysiert wie oben erwähnt die Reaktion von L-Arginin hin zu Stickstoffmonoxid. Hierzu benötigt sie Tetrahydrobiopterin (BH_4) als Koenzym. In Abwesenheit von BH_4 oder L-Arginin kann sie jedoch auch O_2^- und H_2O_2 produzieren. Dadurch kommt es dann zu oxidativem Stress und zur endothelialen Dysfunktion. Hierzu tragen nach Cai und Harrison (2000) drei Mechanismen bei:

- 1.) das eigentliche NO wird nicht mehr produziert
- 2.) die eNOS produziert ROS
- 3.) das Enzym wird nur partiell entkoppelt und produziert paralell NO und O_2^-

Wassmann et al. zeigten 2004, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie und Inflammation mit vermehrtem oxidativen Stress und einer endothelialen Dysfunktion assoziiert sind (Wassmann et al., 2004). Oxidativer Stress spielt demnach eine große Rolle in der Pathogenese der frühen Atherosklerose. Ihn zu messen könnte helfen, asymptomatischen Patienten ein Risiko für die Entwicklung dieser Erkrankung zuzuschreiben (Ashfaq et al., 2006).

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es zu untersuchen, ob eine Erkennung fremder Nukleinsäuren bzw. endogener Liganden in der Endothelzelle zu einer Einschränkung ihrer Funktion und somit zur Atheroskleroseentwicklung führen kann. Hierbei wird zunächst die immunologische Antwort des Endothels im Sinne einer vermehrten Zytokinausschüttung analysiert. Die zu in dieser Arbeit zu untersuchenden Rezeptoren sind TLR-3, RIG-I und MDA-5. Die Auswirkung einer inflammatorischen Reaktion auf die endothelabhängige Vasodilatation und –relaxation wird zur Aussage bezüglich einer Funktionsminderung der Zellen getestet. Auch Regenerationsfähigkeit beziehungsweise Apoptoserate nach Exposition der Zelle mit Fremd-RNA wird im Rahmen dieser Arbeit beleuchtet. Schließlich wird noch das Auftreten von oxidativem Stress unter Stimulation der genannten Rezeptoren analysiert werden.

2. Material und Methodik

2.1 Zellen und Versuchstiere

2.1.1 Versuchstiere

1. Versuchsreihe

Haltung:

20 zwölf Wochen alte Wild Typ Mäuse (C57BL/6J, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden bei 22°C mit einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus gehalten. Die Ernährung bestand aus Mäusetrockenfutter (Ssniff, Spezialdiäten, Soest) und Trinkwasser. Die Behandlung mit den Testsubstanzen erfolgte intravenös in die Schwanzvene über 7 Tage an jedem zweiten Tag.

Alle Tierexperimente wurden in Einverständnis mit den Institutsrichtlinien und dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

Testsubstanzen:

Jeweils 5 Tieren wurde dreimalig die Testsubstanz verabreicht. Diese waren gelöst in einer 5 %igen Glucose Lösung. Als Transfektionsreagenz für polyA, 3pRNA und polyIC diente JetPei.

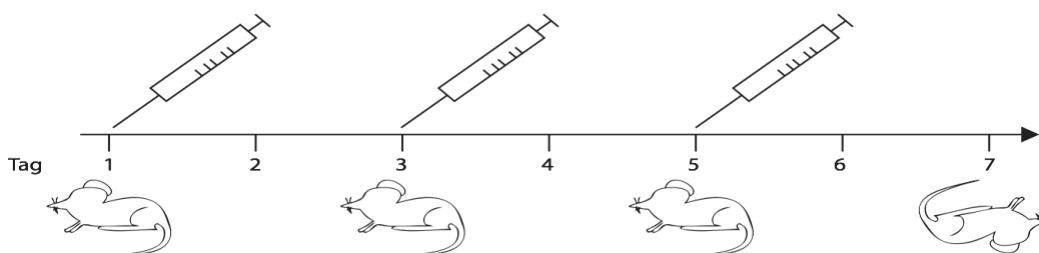


Abb. 2: Behandlungsschema der Versuchstiere. Die Versuchstiere wurden an jedem zweiten Tag mit den Testsubstanzen behandelt. An Tag 7 erfolgten die Experimente.

Substanz	Kontrolle	PolyA	3pRNA	polyIC
5 % Glucose	450 µl	200 µl	200 µl	200 µl
Poly A (1µg/µl)		32,5 µl		
3pRNA (1µg/µl)			32,5 µl	
PolyIC (1µg/µl)				32,5 µl
Vektor		215 µl	215 µl	215 µl

Tab.2: Verabreichungsmengen der Substanzen pro Tier. PolyA stellt ein synthetisches Polyadenosin dar und dient in den Versuchen als Kontroll- Nukleinsäure. Der Polyadenosinrest wird weder über TLR-3 noch über RIG-I erkannt und stellt kein Erkennungsmerkmal für virale Nukleinsäuren dar. 3pRNA ist eine synthetisch hergestellte Nukleinsäure mit einem 5' Triphosphatende (freundlich zur Verfügung gestellt vom Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie, Bonn) PolyIC ist eine synthetisch hergestellte Doppelstrang RNA (Sigma) Die Vektorlösung für 3 Tiere setzt sich zusammen aus: 700 µl 5 % Glucose und 15 µl JetPei (Polyplus Transfection).

2. Versuchsreihe

Haltung:

20 zwölf Wochen alte Wild Typ Mäuse (C57BL/6J, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden bei den oben genannten Bedingungen gehalten. Die Behandlung erfolgte in dieser Versuchsreihe mit 100 µg polyIC ohne Transfektionsmedium sowie isotoner Kochsalzlösung (NaCl) als Kontrolle über 7 Tage an jedem zweiten Tag intravenös über die Schwanzvene.

Bei 10 Tieren (5 Mäuse mit NaCl behandelt, 5 Mäuse mit polyIC nicht transfiziert (n.t.)) wurde nach der Behandlung eine elektrische Carotis Injury durchgeführt. Diese erfolgte in Anästhesie mit 150 mg/kgKG Ketamin Hydrochlorid (Ketanest[®], Pharmacia) und 0,1 mg/kgKG Xylazin Hydrochlorid (Rompun[®] 2 %, Bayer). Die Arteria carotis communis sinistra wurde freigelegt und einem zweimaligen, zweisekündigem Stromschlag von 4 mA ausgesetzt. Da das Endothel am sensibelsten auf diesen Stromschlag reagiert, wurde so ein Gefäßabschnitt von 4 mm denudiert. 5 Tage nach der Denudierung wurde den Tieren 50 µl einer 5 %igen Evans Blue Lösung (gelöst in NaCl) intravenös verabreicht. Die Lösung zirkulierte 5 Minuten im Kreislauf bevor die Tiere getötet und die Karotiden explantiert wurden. Die Gefäße wurden darauf mit einer 0,9 %igen NaCl Lösung perfundiert und vorsichtig vom umliegenden Gewebe befreit. Mit Hilfe des Computer Programms AxioVision 4.5.0 von Zeiss wurden der ursprünglich denudierte Abschnitt von 4 mm und der verbleibende, blaugefärbte Abschnitt fotografisch dokumentiert. Der reendothelialisierte Gefäßabschnitt wurde in der Auswertung prozentual zur gesamten Gefäßläsion dargestellt.

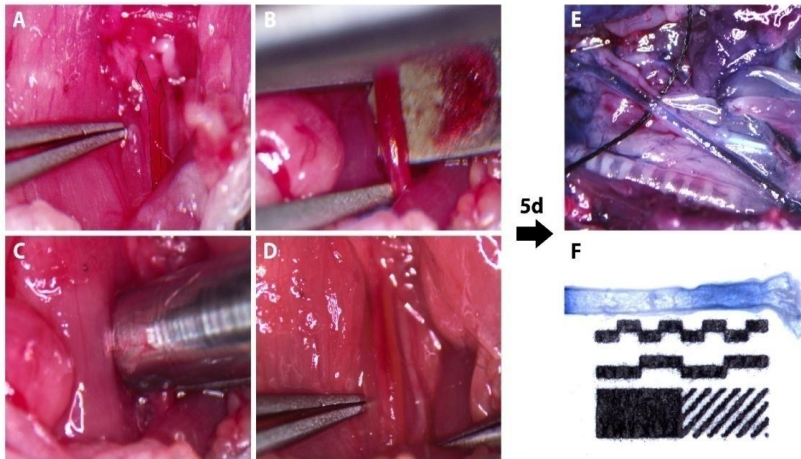


Abb. 3: Ablauf Karotis Denudation: A: Die A. carotis communis wird mit Hilfe des Dissektionsmikroskop (MZ6, Leica, Heerbrugg, Schweiz) aufgesucht B: 4 mm langes Denudierungsareal wird ausgesucht C: elektrische Verletzung wird gesetzt D: koaguliertes Gefäß E: Evans Blue markierte Karotis in situ F: Evans Blue markierte Karotis ex situ

2.1.2 Zellen

Human coronary artery endothelial cells (HCAEC, humane koronare Endothelzellen) wurden von Lonza aus Basel, Schweiz erworben. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ Begasung gehalten und in Endothelial Cell Growth Medium MU (25 ml FCS, 10 ng/ml EGF, 1 µg/ml Hydrocortison, 2 ml ECGS/H) + Supplement Mix C-39225 (Firma: Dromo Cell, Artikelnummer: C-22020) kultiviert. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei einer Bewachungsdichte von > 80 % einer Zellschale wurden die Endothelzellen auf neue Schalen ausgesät.

Zellstimulation :

Die humanen endothelialen Koronarzellen wurden mit folgenden Substanzen je für 24 oder 48 h behandelt:

Substanz	Hersteller	Konzentration
PolyIC n.t.	Sigma	4 µg/ml
polyIC	Sigma	1 µg/ml
3pRNA	Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie, Bonn	1 µg/ml
polyA	Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie, Bonn	1 µg/ml

Tab. 2: Behandlungssubstanzen der HCAEC. Die HCAEC wurden mit den oben genannten vier Testsubstanzen in den aufgeführten Konzentrationen inkubiert.

Alle Testsubstanzen wurden nach Absaugen des alten Mediums hinzugefügt. Opti-Mem 1 (Gipco) diente als Zellkulturmedium, Lipofectamin als Transfektionsreagenz. Um zu untersuchen, ob polyIC auch ohne Eindringen in die Zelle via TLR-3 Rezeptoraktivierung wirkt, wurde in den Versuchen zusätzlich polyIC ohne Beigabe von Lipofectamin verwendet.

Zur Applikation der Substanzen wurden zunächst zwei Lösungen hergestellt. Die eine bestand aus 122,5 µl Opti-Mem 1/ ml Gesamtvolumen auf der Zellkulturplatte sowie 2,5 µl Lipofectamin/ml Gesamtvolumen. Die zweite Lösung bestand aus 124 µl Opti-Mem1/ml Gesamtvolumen und 1 µg RNA/ml Gesamtvolumen. Beide Lösungen wurden zusammengegeben und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Das gewünschte Gesamtvolumen wurde durch Zugabe von Endothelial Cell Growth Medium MU (25ml FCS, 10 ng/ml EGF, 1 µg/ml Hydrocortison, 2 ml ECGS/H) + Supplement Mix C-39225 (Firma: Dromo Cell, Artikelnummer: C-22020) erreicht.

2.2 In Vivo Experimente

2.2.1 Organbadexperiment

Prinzip:

Die endothelabhängige Vasodilatation kann als Parameter für die intakte Endothelfunktion angesehen werden. Liegt eine endotheliale Dysfunktion vor, so resultiert dieses in einer verminderten endothelialen NO-Produktion. Dieser zentrale Botenstoff ist ein

hochdiffusibles Gas. Es wird im intakten Endothel gebildet und vermittelt in der glatten Gefäßmuskulatur ein Absinken des intrazellulären Calciums.

Vasodilatation und Vasokonstriktion von isolierten Aortenringen werden im Organbadexperiment durch die Stoffe Phenylephrin, Kalium, Carbachol und NO provoziert. Die Gefäßringe hängen hierbei in einem Bad, das mit oxygeniertem Tyrode Puffer gefüllt ist.

Mit der Applikation von Kalium wird getestet, ob das Gefäß rein mechanisch dazu in der Lage ist zu kontrahieren. Phenylephrin wiederum stimuliert die α_1 Rezeptor abhängige Vasokonstriktion. Von außen hinzugefügtes NO greift direkt an der Gefäßmuskulatur und führt endothelunabhängig zur Vasodilatation. Carbachol hingegen simuliert die durch Acetylcholin vermittelte Freisetzung von NO im funktionstüchtigen Endothel. Ist ein Aortenring fähig, sich unter Phenylephrin und Kalium zu kontrahieren, unter NO zu dilatieren und bleibt eine Vasodilatation unter Carbachol aus, so kann man von einer endothelialen Dysfunktion ausgehen.

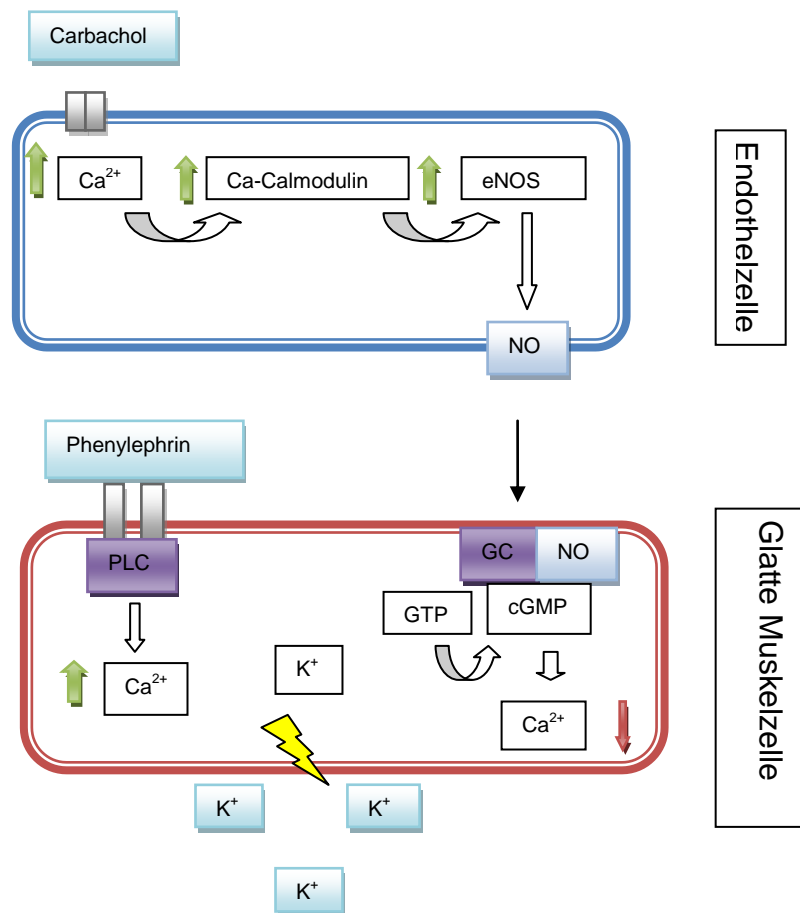


Abb. 4: Prinzip des Organbadexperiments: Carbachol bindet an seinen Rezeptor an der Endothelzelle. Eine Vermehrung der Ca^{2+} -Calmodulin Komplexe bewirkt eine vermehrte Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS). NO diffundiert in die Muskelzelle und aktiviert die Guanylatzyklase (GC). Guanosin-5'-triphosphat (GTP) wird zu zyklichem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) gespalten und erniedrigt die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration. Phenylephrin bindet an den α_1 Rezeptor und aktiviert die Phospholipase C (PLC). Es kommt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration. Erhöhtes extrazelluläres Kalium (> 20 mmol) führt zu einer Reduktion des Konzentrationsgradienten für Kalium über der Membran und somit zu einer Depolarisation und Kontraktion.

Vorbereitung des Tyrode Puffers:

In 5 Litern destilliertem Wasser werden 6,898 g NaCl/l + 353 mg KCl/l + 114,2 mg $\text{MgCl}_2\text{H}_2\text{O/l}$ + 7,6 mg EDTA/l + 163 mg $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{l}$ + 278 mg CaCl_2/l + 991 mg Glukose/l + 2,1 g NaHCO_3 angesetzt und anschließend auf einen pH von 7,4 bei einer Temperatur von 37°C eingestellt: Der Tyrode Puffer wird anschließend kontinuierlich mit 95 % O_2 und 5 % CO_2 in der Organbadanlage (IOA 5301, FMI GmbH Seeheim/Ober-Beerbach) oxygeniert.

Durchführung:

Zunächst intraperitoneale Injektion von ~300 µl Ketaminhydrochlorid (Ketanest[®], Pharmacia) / Xylazin (Rompun[®], Bayer) Gemisch im Verhältnis 2:1 pro Maus (750 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid und 50 mg/kgKG Xylazin). Es folgte die Eröffnung der Bauchdecke sowie eine initiale Blutabnahme aus der Vena cava inferior. Das Herz wurde unter Mitnahme des Bulbus aortae und des Truncus Pulmonalis entfernt. Die Aorta descendens wurde von der Wirbelsäule abgetrennt und auf Höhe des Diaphragmas abgesetzt. Ihre Endstücke wurden entfernt und der LO12 Chemilumineszenz Messung zugeführt. Der mittlere Anteil wurde gevierteilt und in die Organbadanlage eingespannt.

Nun erfolgte das stufenweise Vorspannen der Aortenringe im Tyrodepuffer über 45 Minuten bis zu einer Gesamtspannung von 10 mN. Anschließend Hinzupipettieren von zunächst 20 mM, dann 40 mM KCl. Nach Spülung der Bäder mit Tyrodepuffer erfolgte nun die Hinzugabe von Phenylephrin in aufsteigenden Konzentrationen, beginnend bei 10^{-9} M in 10er Schritten aufsteigend und endend bei 10^{-4} M. Anschließend erfolgte ohne vorherige Spülung das Hinzupipettieren von Carbachol anfangend bei 10^{-9} M wiederum in 10er Schritten aufsteigend und endend bei 10^{-4} M. Nach einer erneuten Spülung mit Tyrodepuffer Hinzufügen von Phenylephrin in einer Konzentration von 10^{-4} M. Abschließend stufenweises Hinzufügen von NO bei 10^{-9} M beginnend in 10er Schritten aufsteigend hin zu 10^{-5} M.

Zu jeder neu hinzugegebenen Substanz wurde die erzeugte Spannung notiert.

Auswertung:

Spannungskurven wurden erstellt. Darauf folgte die Berechnung der relativen Relaxation unter Carbachol im Vergleich zum Maximum der Kontraktion unter Phenylephrin. Um die Beeinträchtigung der endothelabhängigen Relaxation zu objektivieren, wurden die Spannungswerte unter Carbachol denen unter Nitroglycerin gegenübergestellt.

2.2.2 L-012 Messung

Prinzip:

Freie Radikale spielen eine große Rolle in vaskulären Krankheiten wie zum Beispiel der Atherosklerose (Cai und Harrison, 2000). Zudem wurde nachgewiesen, dass diese sogenannten ROS bedeutend an der Differenzierung glatter Muskelzellen, wie sie in der Gefäßwand vorkommen, beteiligt sind. Entzündungsprozesse, vaskuläres Remodelling und der Gefäßtonus werden von diesen Radikalen beeinflusst (Griendling et al., 1994; Griendling und Ushio-Fukai, 1998). Vor allem dem Superoxid wird hier eine bedeutende Rolle zugesprochen. 8-Amino-5-Chloro-7-Phenylpyridol[3,4-d]Pyridazin-1,4-(2H, 3H) Dion Natrium Salz, auch genannt L-012 ist ein Luminol Derivat mit einer hohen Sensitivität für Superoxid Radikale. Die Substanz zeigt zudem keine Teilnahme am sogenannten Redox Cycling. Diese Eigenschaften erlauben es, L-012 als Detektionsreagenz für Superoxid in Vollblut, Leukozyten und auch Gefäßschnitten zu verwenden (Daiber et al., 2004).

Durchführung:

Die im Organbadexperiment entnommenen Aortenstücke wurden in gekühltem, modifizierten Krebs Hepes Puffer (pH 7,4; NaCl 99,01 mmol, KCl 4,69 mmol, CaCl₂ 1,67 mmol, MgSO₄ 1,2 mmol, NaHEPES 20,0 mmol, K₂HPO₄ 1,03 mmol) gelagert und zu Beginn der L012 Messung in ca. 2 mm große Stücke geteilt. (2 Stücke pro Maus) Das L-012 Reagenz (Wako Pure Chemical Industries, Japan) wurde in der Verdünnung 1:100 in 1mal PBS gelöst. Das so verdünnte Reagenz wurde 1:10 in Krebs Hepes Puffer angesetzt. Ein Aortenstück wurde in 100 µl des L-012/Puffer Gemischs gegeben und in ein Reagenzröhrchen überführt. Die Probe wurde daraufhin im Szintillationszähler (Lumat LB 9501, Berthold) für 15 Minuten (Messintervall 30 Sekunden) untersucht. Nach erfolgter Messung wurden die Aortenstücke getrocknet und auf der Feinwaage gewogen.

Auswertung:

Die Superoxid Freisetzung des Aortensegments wurde als relative Chemilumineszenz (RLU) pro Milligramm Gewebe gemessen.

2.2.3 FACS Messung für Oberflächenmarker auf Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMNC)

Prinzip:

Mit der FACS Messung (fluorescence activated cell sorter), auch Durchflusszytometrie genannt, werden mit Antikörpern markierte Proteine nachgewiesen. Die markierten Zellen werden mit einem Laserstrahl erfasst. Es kommt zu Lichtstreuungen und einer Anregung der zumeist fluoreszierenden Farbstoffe, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Mit Hilfe von Spiegeln und Filtern wird dieses Licht gebündelt und zerlegt. Man erhält für jeden Farbstoff ein spezifisches Signal. Zudem kann man eine Aussage über die Größe und die Granularität einer Zelle treffen. Diese erfolgt unabhängig vom Fluoreszenzfarbstoff: Der Laserstrahl wird von den Zellen in einem gewissen Maße abgelenkt. Dabei sind die nach vorn abgelenkten Strahlen (Forward-scatter) ein Maß für die relative Größe der Zelle, die in einem 90° Winkel abgelenkten Strahlen (Sidescatter) hingegen ein Maß für die Zellgranularität (Herzenberg et al., 2002; Owens et al., 2000).

Stammzellen Antigen-1 (stem cell antigen-1, sca-1) und der vaskuläre Gefäßproliferationsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF R2) sind als Markermoleküle für endotheliale Progenitor Zellen (EPCs) anzusehen (Hunting et al., 2005).

Benötigte Antikörper:

Name	Details
Sca1-FITC	clone E13-161.7, Pharmingen
VEGF R2 (entspricht Flk-1)- PE	VEGF R2: clone A3, Santa Cruz PE: Sigma
Rat Anti-mouse CD16/CD32 (Mouse BD FC Block)	Pharmingen

Tab. 3: Verwendete FACS Antikörper. Die oben genannten Antikörper entsprechen den benötigten für die FACS Untersuchung.

Durchführung:

Der Maus wurden aus der Vena cava inferior 100 µl Vollblut abgenommen und dieses wurde zu 3 ml 1:10 in Ampuwa (Fresenius) verdünnter Pharmlyse pipettiert. Das Gemisch wurde eine Minute lang gevortext bevor es zehn Minuten bei 1000 rpm zentri-

fugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und die Probe wurde mit FACS Puffer auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt. Daraufhin wurden jeweils 10 µl des FC Block Antiköpers hinzugegeben. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 4°C wurden zu jeder Probe 10 µl von Sca-1 und VEGFR-2 hinzugegeben. Nach einer Minute Vortexen wurden die Proben lichtgeschützt bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 2 ml FACS Puffer zu jeder Probe hinzupipettiert und eine Minute gevortext. Es folgte eine zehnmütige Zentrifugation bei 1750 U/min. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und das Pellet mit 200 µl 1mal PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die Messung im FACS Gerät. (Biosciences Scientific, FACSCalibur) Leerwert und Isotypenkontrolle wurden durchgeführt.

Auswertung:

Die ermittelten Daten wurden mit der CellQuest Software (Becton Dickinson) analysiert. Die Units aller gemessenen Komponenten sind spezifische Ereignisse nach der Messung von 50 000 Ereignissen in einem präspezifizierten Lymphozyten Gate während der FACS Analyse.

2.2.4 FACS Messung von endothelialen Mikropartikeln (EMP)

Prinzip:

Endotheliale Mikropartikel sind Membranvesikel, die bei der Apoptose und bei einer Zellaktivierung freigesetzt werden. Bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen findet man erhöhte EMP Spiegel vor (Agouni et al., 2008).

Als Markerproteine finden in der FACS Messung CD 31 (PECAM-1 bzw. Endocam) und Phosphatidylserin Verwendung. Letzteres bindet zum fluoreszenzfarbstoffgebundenen Annexin V (Horstman et al., 2004). CD 31 ist ein Adhäsionsmolekül mit Signalfunktion. Es vermittelt Leukozyten-Endothel- bzw. Endothel-Endothel Wechselwirkungen und kommt auf Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Endothelzellen vor. Das negativ geladene Phosphatidylserin liegt normalerweise an der inneren Zytoplasmamembran. Kommt es zur Apoptose, so wird es an der äußeren Membran exprimiert. Annexin V oder auch Annexin A5 spielt eine Rolle in der Hemmung der Blutgerinnung und hemmt die Aktivität der Phospholipase A1.

Benötigte Antikörper:

Name	Details
Anti Annexin V	FITC konjugiert, Becton Dickinson
Anti CD 31	PE konjugiert, Becton Dickinson

Tab. 4: Antikörper für die FACS Messung. Die oben genannten Antikörper werden für die FACS Messung auf EMP benötigt.

Durchführung:

Das entnommene Blut wurde zunächst 15 Minuten bei 2000 U/Minute zentrifugiert. Daraufhin wurde das Plasma entfernt und in ein neues Eppendorf Gefäß gefüllt. Es folgte eine erneute Zentrifugation für zwei Minuten bei 1300 Umdrehungen/Minute. Der Überstand bestand nun aus plättchenfreiem Plasma welches in ein neues Eppendorf Gefäß überführt wurde. 100µl dieses Plasmas wurden nun mit 4 µl Anti CD 31 PE für 45 Minuten lichtgeschützt und bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden 5 µl Annexin V FITC hinzugegeben, gevortext und für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 200 µl Binding Puffer (10mM Hepes B, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂; Angaben gelten für 200 ml destilliertes Wasser und Lagerung bei 4°C) hinzugefügt und gevortext. Die Messung umfasste eine ungefärbte Kontrolle, eine Isotypenkontrolle sowie Annexin V FITC und CD 31 PE.

2.3 In Vitro Experimente

2.3.1 Zytokinbestimmung per Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Prinzip:

Bei ELISA handelt es sich um einen quantitativen Immunoassay. Als Marker dient ein Enzym mit dem die Antigenkonzentration anhand des Substratumsatzes bestimmt werden kann. Antikörper oder Antigen werden zudem an einer festen Phase adsorbiert. So kann allein durch Waschen ein festes Antigen von einem freien Antigen abgetrennt werden. Der Ablauf eines ELISA erfolgt prinzipiell wie dargestellt:

Adsorption des Antikörpers → Abblocken freier Proteinbindungsstellen → Inkubation mit markiertem Antigen → Farbreaktion → Messung im Photometer

Durchführung:

HCAEC wurden 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert und anschließend die Konzentrationen von Il-6 (Interleukin-6), Il-8 (Interleukin-8) und IP-10 (Interferon γ induced Protein 10) per ELISA gemessen. Ein kommerziell erhältliches KIT für humanes Il-6, Il-8 und IP-10 (R&B Systems) wurden nach Gebrauchsanleitung verwendet.

2.3.2 Messung der freien Radikale mittels L012-Assay

Prinzip:

Das Prinzip entspricht demjenigen der *in vivo* Messung.

Durchführung:

Für den L-012 Assay wurden HCEAC auf 6 cm Schalen ausgesät. Die Schalen wurden unter den unterschiedlichen Bedingungen 4 Stunden inkubiert. Zuerst wurden die Zellen einmal in 5 ml 1mal PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 1 ml Trypsin EDTA (Invitrogen) pro Schale für drei bis fünf Minuten bei 37°C. Pro Schale wurden 2 ml Medium hinzugegeben, in ein 15 ml Falcon überführt und für fünf Minuten bei 1000 Umdrehungen/Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. 10 μ l L-012 (verdünnt 1:100 in 1mal PBS) wurden zu 90 μ l Krebs Hepes Puffer titriert. Das Pellet im Falcon wurde anschließend in diesen 100 μ l aufgelöst. Das Gemisch wurde in die Messküvette überführt und für 10 Minuten im Lumat LB 9501, Berthold gemessen. Anschließend wurde die Probe getrocknet und gewogen.

Auswertung:

Die Auswertung entspricht derjenigen der *in vivo* Messung.

2.3.3 Proliferationsnachweis mittels BrdU Färbung

Prinzip:

5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidinanalogon, das an dessen Stelle während der DNA Synthese von der DNA Polymerase in den neuen Strang eingebaut wird. Alle Zellen die sich während der Behandlung in der S Phase der Zellteilung befinden, werden

damit BrdU anreichern. Dieses kann immunhistochemisch mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden. Um die proliferierenden von der Gesamtzahl der Zellen abgrenzen zu können benutzt man zudem noch eine Zellkernfärbung, in diesem Fall die 4',6-Diamidino-2 phenylindol (DAPI) Färbung (Perros und Weightman, 1991; Porstmann et al., 1985; Vitale et al., 1991).

Durchführung:

Die Zellen wurden im 24 Well Plate (jeweils 4 Wells pro Bedingung) auf mit 1 %iger Gelatine (gelöst in 1mal PBS) beschichteten Deckgläschen ausplattiert. Pro Well wurden 300 µl einer Mischung von 1/1000 BrdU/Medium (Abcam) hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über 24 Stunden im Brutschrank.

Nach Absaugen des Gemisches wurden die Zellen dreimal mit warmem Medium gespült. Die Fixierung erfolgte mit einer Mischung aus 30 % Glycerol pH 2/70 % Ethanol für 20 Minuten bei -20°C. Nach Entfernen des Fixans wurden 300 µl 2N HCl pro Well für 10 Minuten bei Raumtemperatur hinzugegeben. Anschließend wurde dreimal mit 1mal PBS gespült. Hiernach wurden 300 µl/well 5 %iges Donkey Serum für 1 Stunde bei Raumtemperatur hinzugefügt. Nach Absaugen dieser Blocking Solution wurden die Zellen mit dem monoklonalem Primärantikörper Anti-BrdU (abcam) 1:50 in 1 %igem Donkey Serum über Nacht bei 4°C auf dem Schütteltisch inkubiert.

Der Primärkörper wurde am nächsten Tag abgesaugt und die Zellen wurden dreimalig mit 1mal PBS gewaschen. Nun wurde der Sekundärantikörper (Anti-Rat Cy3 1:400 gelöst in 1 %igem Donkey Serum) aufgetragen und die Zellen wurden über Nacht bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Nach Waschen der Zellen in 1mal PBS wurden die Deckgläschen aus dem 24 Well Plate genommen, auf einen Objektträger gelegt und pro Gläschen wurde ein Tropfen DAPI Lösung aufgetragen. Die Objektträger wurden darauf über Nacht lichtgeschützt gelagert.

Am nächsten Tag erfolgte dann die lichtmikroskopische Aufnahme unter dem Fluoreszenzmikroskop.

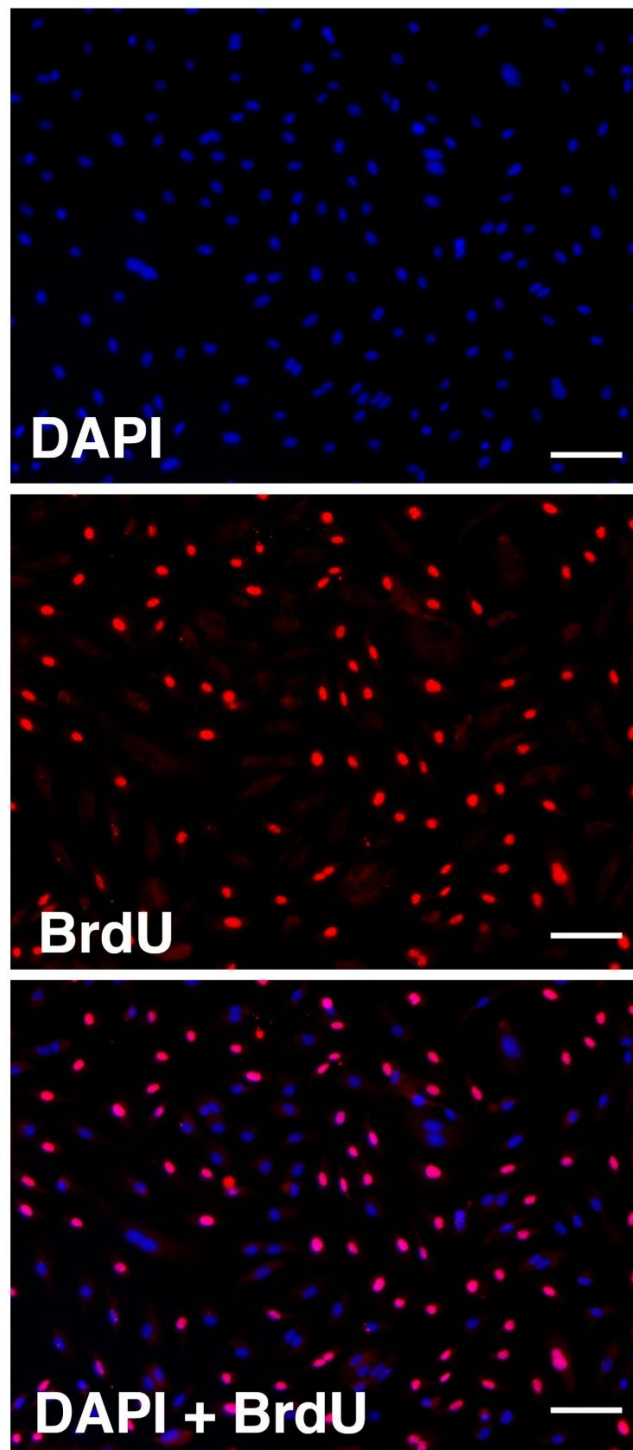


Abb.5: Repräsentative BrdU Färbung. Die Zellkerne aller Zellen auf der Platte werden mittels der DAPI Färbung blau gefärbt. Mit BrdU markierte Zellen imponieren in rot. Legt man beide Farbkanäle übereinander erscheinen die doppelt gefärbten Zellen rosafarben.

2.3.4 Apoptose Assay

Prinzip:

Die Apoptose ist der programmierte Zelltod. Die Induktion der Apoptose erfolgt über sogenannte Death Rezeptoren. Über verschiedene intrazelluläre Kaspasen werden kalzium- und magnesiumabhängige DNasen aktiviert.

Eine Methode die Degradation chromosomaler DNA zu Nukleosomeneinheiten nachzuweisen ist ein Nukleosomen-Quantifizierungs Enzym-linked Immunabsorbent Assay (ELISA). Dieser Versuch basiert auf einem Sandwich ELISA. Ein Gemisch aus Zelllysat, biotinkonjugierten Histon-Antikörpern und peroxidase-gekoppelten DNA Antikörpern wird in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Es bilden sich Immunkomplexe. Als Maß für gebundene Nukleosomen dient die farblich sichtbar gemachte Peroxidaseaktivität.

Durchführung:

Für den Versuch wurden die HCAEC auf einem 96 Well Plate ausgesät, mit den Testsubstanzen versehen und über 5 Tage kultiviert. Nach Ablauf der 5 Tage wurde das Plate 10 Minuten bei 1500 Umdrehungen/Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde weggefroren. Für den Assay wurde nun das Cell Death Detection Elisa Plus KIT, Roche nach Bedienungsanleitung verwendet. Die Messungen der Fluoreszenz erfolgten bei 405 nm. Als Referenzwert diente der Wert bei 490 nm.

Auswertung:

Für die Auswertung wurde der Mittelwert der beiden Messungen bei 405 nm bestimmt. Anschließend subtrahierte man den sogenannten Hintergrundwert. (Inkubationspuffer+ ABTS Stop Lösung) Nun wurde der Anreicherungsfaktor nach folgender Formel berechnet:

Absorbtion (tote Zellen)

$$AF = \frac{\text{Absorbtion der zugehörigen Negativkontrolle}}{\text{Absorbtion (tote Zellen)}} \quad [\text{mU Absorption } (10^{-3})]$$

Je höher dieser Anreicherungsfaktor ist, desto mehr Apoptose hat stattgefunden.

2.4 Statistik

Die folgenden Daten sind die arithmetischen Mittelwerte der untersuchten Parameter \pm dem Standardfehler (SEM). Die Prüfung auf signifikante Unterschiede der Mittelwerte erfolgte mit dem t-Test nach Student und ANOVA für multiple Vergleiche. Post-hoc Vergleiche wurden mit dem Neuman-Keuls Test durchgeführt. Eine statistische Signifikanz war gegeben bei $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der in vivo Versuche

3.1.1 Organdbadexperiment

Ziel der Versuchsreihe war es herauszufinden, ob eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems via PRR unter Verwendung der Testsubstanzen die vaskuläre Biologie bzw. die endotheliale Funktion beeinflusst. Da der erste und essentielle Schritt der Atherogenese derjenige der endothelialen Dysfunktion ist, wurde zunächst die Endothelfunktion an ex vivo entnommenen Aortensegmenten von Mäusen untersucht.

Die Versuchstiere wurden intravenös mit Nukleinsäuren über eine Woche behandelt. Als Testsubstanzen fanden 3pRNA, polyIC und polyIC n.t. Verwendung. PolyIC nicht transfiziert wirkt hierbei über membranständige TLR-3 Rezeptoren, während polyIC mit Transfektionsmedium den intrazytoplasmatischen Rezeptor MDA-5 erreicht. 3pRNA wirkt ebenfalls intrazytoplasmatisch an der Helikase RIG-I. All diese Rezeptoren werden in Endothelzellen exprimiert und führen zu einer inflammatorischen Reaktion. Nun sollte der Einfluss auf die Endothelfunktion und hier insbesondere auf die NO abhängige Vasodilatation untersucht werden. Ist diese vermindert, so kann man hieraus auf eine Fehlfunktion des Endothels schließen.

Als Kontrollsubstanzen dienten Poly Adenosin (PolyA), 5 %ige Glucoselösung und NaCl.

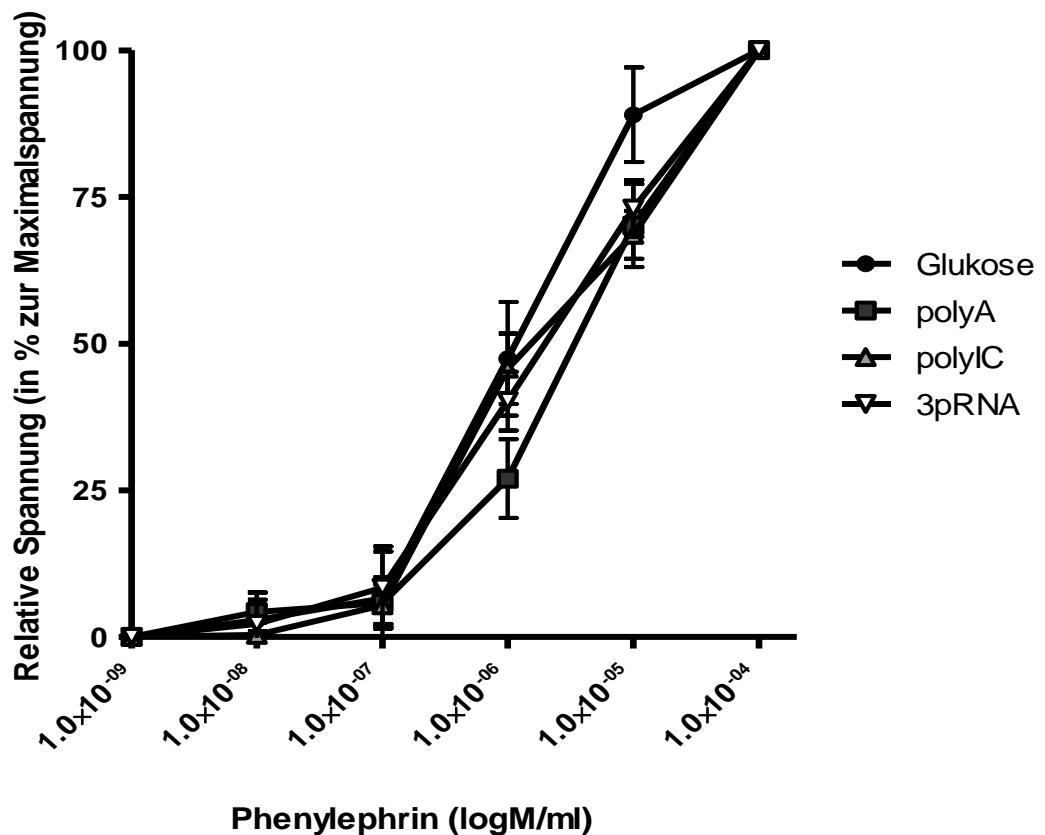


Abb. 6: Spannungsverläufe der Aortenringe nach Applikation von Phenylephrin. Die Kontraktilität der Gefäßmuskulatur bleibt von den Testsubstanzen und deren Stimulation der Rezeptoren MDA-5 und RIG-I im Vergleich zu den Kontrollsubstanzen unbeeinflusst.

Ziel der Phenylephrinapplikation der einzelnen Aortenringe war es zu zeigen, dass eine Applikation der Testsubstanzen die über die glatten Muskelzellen der Media vermittelte vaskuläre Funktion nicht direkt beeinflusst. Unter Hinzugabe aufsteigender Konzentrationen der Testsubstanzen und Glukoselösung als Kontrolle kam es unter allen vier Bedingungen zum Erreichen der Maximalspannung (10 mN).

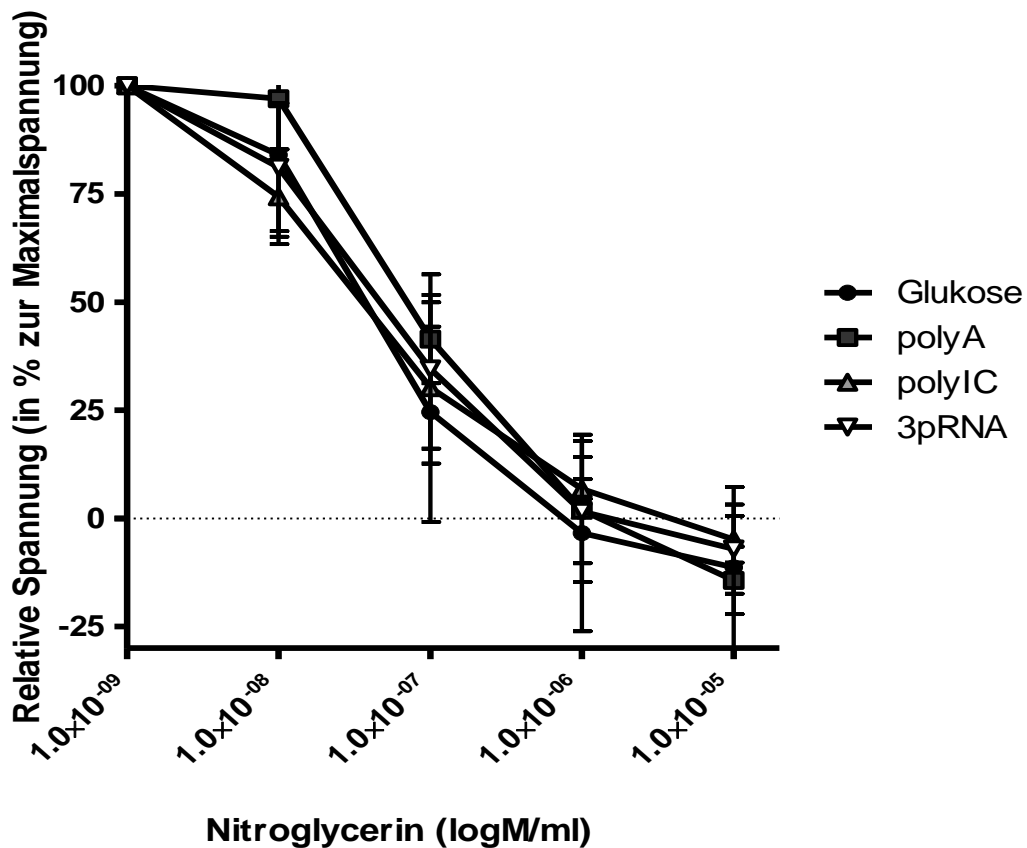


Abb. 7: Spannungsverläufe der Aortenringe nach Applikation von NO. Unter RIG-I und MDA-5 Rezeptorstimulation kommt es zu keiner Beeinflussung auf die durch von extern hinzugegebenes NO vermittelte Gefäßdilatation.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Testsubstanzen keinen Einfluss auf die durch die glatten Muskelzellen vermittelte Vasokonstriktion haben, zeigte sich unter Applikation von NO auch kein direkter Einfluss selbiger auf die durch SMC vermittelte Vasodilatation. Unter steigender NO Konzentration zeigte sich bei allen vier Bedingungen ein Abfall der Gesamtspannung auf ca. -10 % im Vergleich zum Ausgangswert (Glukose: -11.35 %; polyA: -14.30 %; polyIC: -4.83 %; 3pRNA: -7.08 %).

Zusammenfassend ist nunmehr die Gefäßmuskelzellfunktion in unserer Versuchsreihe als intakt zu werten.

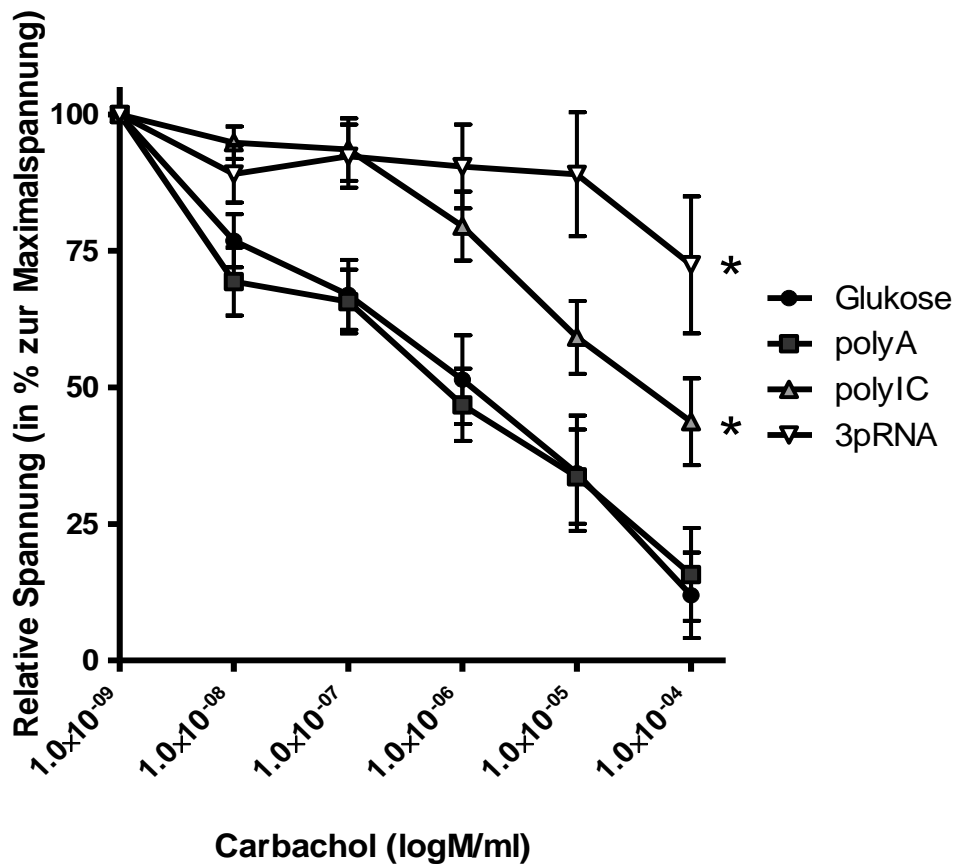


Abb. 8: Spannungsverläufe der Aortenringe nach Applikation von Carbachol. Unter MDA-5 und RIG-I Rezeptorstimulation kommt es zu einer statistisch signifikanten Einschränkung der endothelzellabhängigen Vasorelaxation im Vergleich zu Relaxation unter Glukose und PolyA Applikation.

Im Vergleich mit den Kontrollsubstanzen Glukose (11.9 ± 7.8 % Restspannung am Ende des Versuches) und polyA (15.8 ± 8.5 % Restspannung) kommt es unter der Stimulation mit polyIC zu einer signifikanten Abnahme der Relaxation (43.7 ± 8.0 % Restspannung, $p < 0,05$). Auch unter der Stimulation mit 3pRNA und damit einer konsekutiven RIG-I Rezeptoraktivierung kommt es zu einer deutlichen Einschränkung der endothelzellabhängigen Vasorelaxation (72.5 ± 12.6 % Restspannung, $p < 0,05$).

Die Abnahme der Vasorelaxation unter Carbachol ist als Hinweis auf einen Endothelzellfunktionsverlust zu werten.

PolyIC als synthetisch hergestellte Doppelstrang RNA wird ohne Transfektionsmedium appliziert und kann so als direkter TLR-3 Agonist wirken. Aufgründessen wurde in einer zweiten Versuchsreihe mit äquivalentem Versuchsaufbau der Effekt einer TLR-3 Rezeptoraktivierung auf die Endothelzellfunktion untersucht. Als Kontrollmedium diente in diesem Versuchsaufbau einfache Kochsalzlösung.

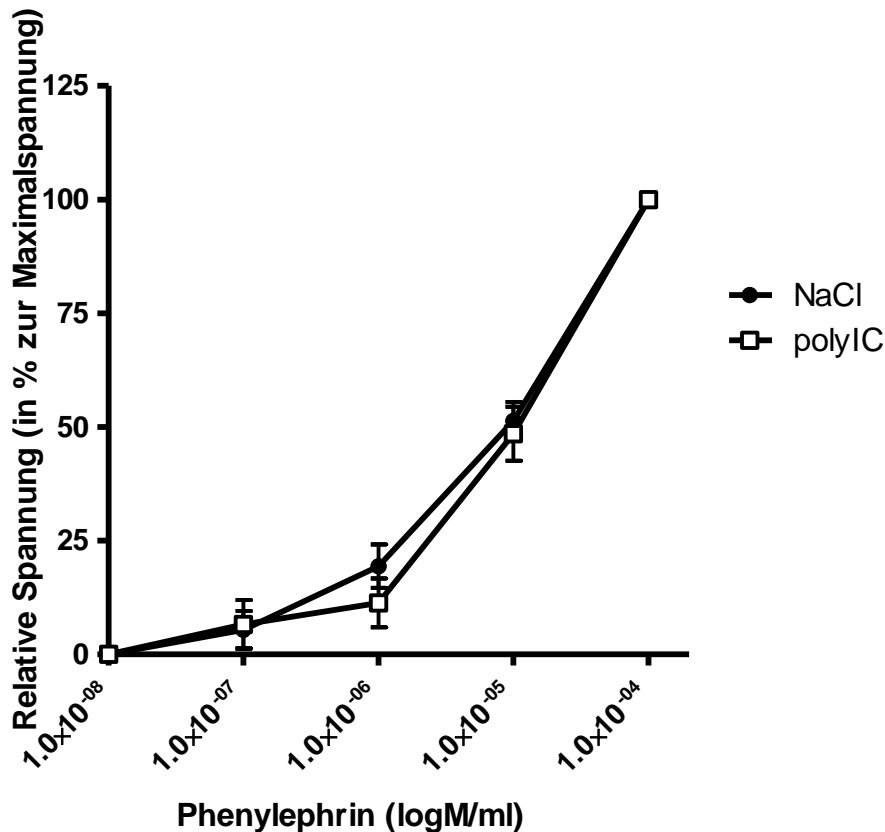


Abb. 9: Spannungsverläufe der Aortenringe unter Stimulation mit Phenylephrin. Unter TLR-3 Stimulation zeigt sich keinerlei Beeinflussung der Vasokonstriktion.

Analog zum obigen Versuchsaufbau wurde zunächst die fehlende Beeinflussung der Gefäßkonstriktion unter TLR-3 Rezeptoraktivierung gezeigt. Auch die endothelunabhängige Vasorelaxation zeigte sich nicht verändert, sodass die Versuchsvoraussetzung einer intakten Gefäßmuskulatur auch hier gegeben war. Unter steigender NO Konzentration zeigte sich sowohl unter Kontrollbedingungen mit NaCl, als auch unter TLR-3 Rezeptoraktivierung ein Abfall der Spannung auf 1-2 % der Maximalspannung (NaCl: 2.8 %; polyIC n.t.: 1.2 %).

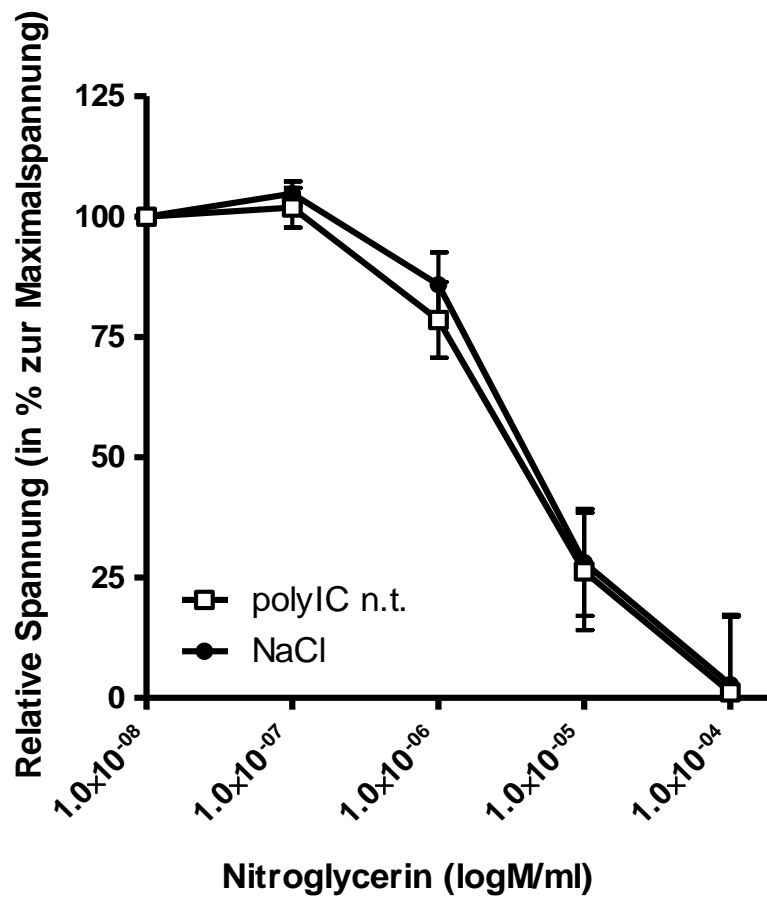


Abb. 10: Spannungsverläufe der Aortenringe unter Nitroglycerin. Die endothel-unabhängige Vasorelaxation zeigte sich durch TLR-3 Rezeptorstimulation unbeeinflusst.

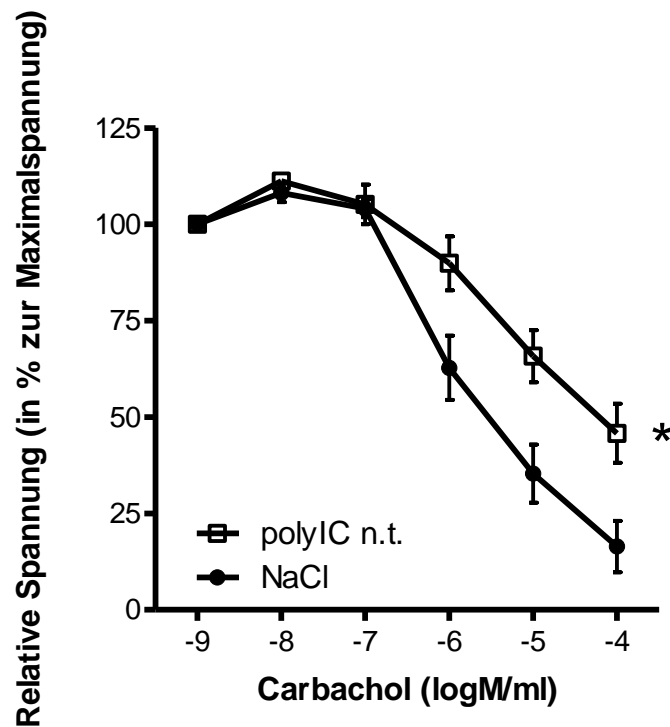


Abb. 11: Spannungsverläufe der Aortenringe unter Stimulation mit Carbachol. Unter TLR 3 Rezeptoraktivierung zeigt sich ein signifikanter Rückgang der endothelabhängigen Vasorelaxation.

Bei Betrachtung der endothelabhängigen Vasorelaxation wurde gezeigt, dass neben einer MDA-5 und RIG-I auch eine TLR-3 Rezeptoraktivierung zu einer signifikanten Abnahme der endothelabhängigen Vasorelaxation führen kann (polyIC n.t. $45,8 \pm 7,7$ % vs. NaCl $16,4 \pm 6,7$ % Restspannung, $p < 0,05$).

Folgernd kann gesagt werden, dass es zu einem Rückgang der Endothelzellfunktion kommt, insbesondere in Hinblick auf deren Einfluss auf die Gefäßrelaxation.

3.1.2 Arteria carotis Denudation

Eine atherosklerotische Plaque entwickelt sich dort, wo es wiederholt zu Endothelzellschädigungen kommt. Dieser Zerstörung steht als entgegenwirkender Faktor die Reendothelialisierung gegenüber. Sie schützt die Gefäße vor der Ausbildung einer Atherosklerose. Zur Reendothelialisierung tragen sowohl Endothelzellen als auch endotheliale Progenitorzellen (EPC) bei.

Im Organbadexperiment hat sich gezeigt, dass eine TLR-3 Rezeptorstimulation zu einer endothelialen Dysfunktion führen kann. Nun wurde weitergehend untersucht, in wie weit eine solche Aktivierung den protektiven Faktor Reendothelialisierung aufheben kann. Dies kann mit Denudationsexperimenten untersucht werden.

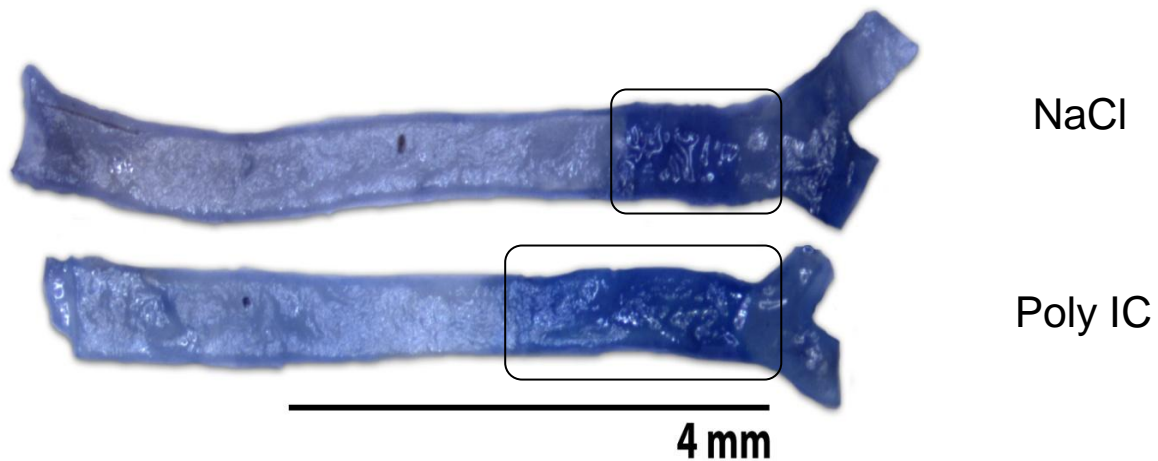


Abb. 12: Ergebnisse des Arteria carotis Denudation Versuchs. An den mit Evans Blue gefärbten Schnitten imponiert die nach 5 Tagen noch verbliebene denudierte Fläche dunkelblau. Unter TLR-3 Rezeptorstimulation ist diese deutlich größer als die entsprechende Kontrolle.

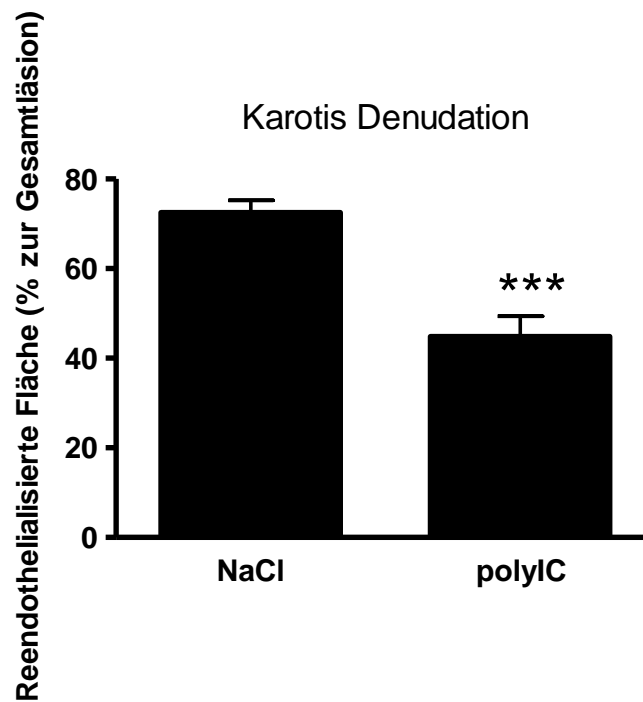


Abb. 13: Ergebnisse der Karotis Denudation. Wie schon oben anhand der histologischen Schnitte gezeigt, sieht man auch in der statistischen Aufarbeitung eine kleinere reendothelialisierte Fläche unter TLR-3 Rezeptorstimulation.

Im Karotis Denudations Versuch zeigt sich, dass auch die Reendothelialisierung unter TLR-3 Rezeptorstimulation mittels poly IC n.t. nach 5 Tagen deutlich reduziert ist. Dieser Effekt war statistisch signifikant (poly IC n.t. $44.8 \pm 4.6 \%$, N=4 vs. NaCl $72.5 \pm 2.7 \%$, N=5, $p < 0,05$).

3.1.3 Ergebnisse FACS Untersuchung auf PBMNC und EMP

Asahara et al. beschrieben 1997 als erste Arbeitsgruppe die endothelialen Progenitorzellen in der Gruppe der PBMNC als Stammzellpool für eine Angiogenese auch nach der Embryogenese. Das Vorhandensein von diesen EPC im peripheren Blut spricht also für die Potenz zur Gefäß- und Endothelneubildung. Die Anzahl zirkulierender EPC ist korreliert mit deren Erneuerungsfähigkeit.

Mikropartikel sind kleine Vesikel, die sich als Antwort auf Zellaktivierung, Verletzung und/oder Apoptose von der Zellmembran ablösen (Chironi et al., 2009). Diese Partikel

können ursprünglich von Thrombozyten, Leukozyten oder Endothelzellen abstammen. Endotheliale Mikropartikel sind hier nicht nur ein Zeichen für endotheliale Dysfunktion sondern spielen auch eine Rolle bei Entzündung, Gefäßverletzungen, Angiogenese und Thrombose (Mallat et al., 2000).

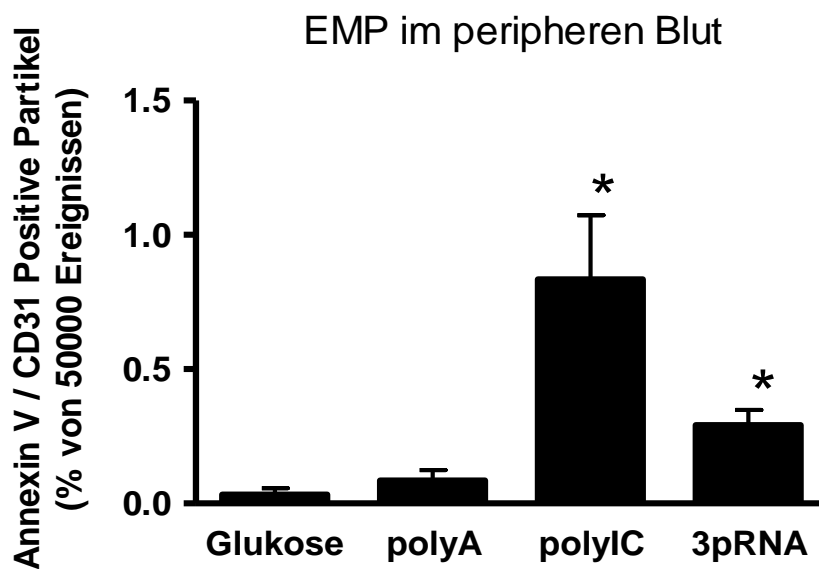


Abb. 14: Ergebnisse der FACS Messung von EMP. Sowohl nach RIG-I als auch nach MDA-5 Stimulation zeigt sich ein signifikanter Anstieg der EMP im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

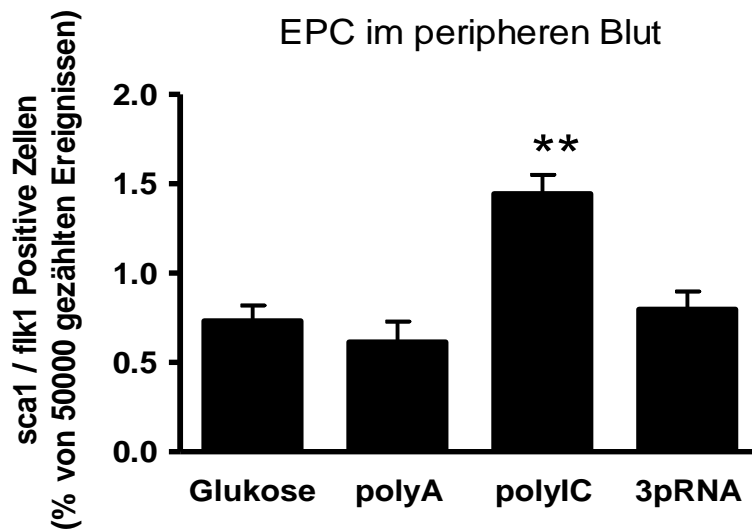


Abb. 15: Ergebnisse der FACS Messung von EPC. Eine MDA-5 Rezeptorstimulation via polyIC führt zu einem signifikanten Anstieg der EPC im peripheren Blut, wohingegen eine RIG-I Stimulation in keiner Erhöhung zirkulierender EPC resultiert.

Hinsichtlich der EMP zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Anzahl im peripheren Blut unter MDA-5 Stimulation (polyIC 0.8 ± 0.2 % N=4 vs. PolyA 0.1 ± 0.04 %, N=4, $p = 0,0207$). Auch eine RIG-I Stimulation via 3pRNA führt im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem signifikanten EMP Anstieg im peripheren Blut (3pRNA 0.3 ± 0.1 %, N=4 vs. polyA 0.1 ± 0.04 %, N=4, $p = 0,0230$).

Somit lässt sich sagen, dass unter Stimulation mit den Nukleinsäuren 3pRNA und polyIC von einem Endothelschaden auszugehen ist.

Hinsichtlich der endothelialen Vorläuferzellen zeigt sich die Zahl der zirkulierenden EPC unter MDA-5 Rezeptorstimulation signifikant erhöht (polyIC 1.4 ± 0.1 %, N=6 vs. Glukose 0.7 ± 0.1 %, N=4, $p = 0,0015$). Eine RIG-I Rezeptorstimulation führt dahingegen nicht zu einer signifikanten EPC Erhöhung (3pRNA 0.8 ± 0.1 %, N=4 vs. Glukose 0.7 ± 0.1 %, N=4; $p = 0,6397$).

Das überraschende Ergebnis hinsichtlich der EPC unter polyIC Stimulation gab Grund für weitere Untersuchungen über die Bedeutung der EPC im Prozess der Atherosklerose und wurde durch unsere Arbeitsgruppe über diese Dissertation hinaus unter-

sucht. Hier zeigte sich, dass EPC unter polyIC Stimulation zwar zahlreicher, jedoch dysfunktional waren (Zimmer et. al., 2011).

3.1.4 L012 Messung in vivo

Dysfunktionales Endothel ist dafür bekannt, mehr freie Sauerstoffradikale zu bilden als gesundes Gewebe (Lakshmi et al., 2009). Somit ist ein weiterer wichtiger Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose der oxidative Stress. Mithilfe der L012 Messung versuchten wir, eine Auskunft über die Ausschüttung freier Radikale unter MDA-5, RIG-I und TLR-3 Rezeptorstimulation zu bekommen.

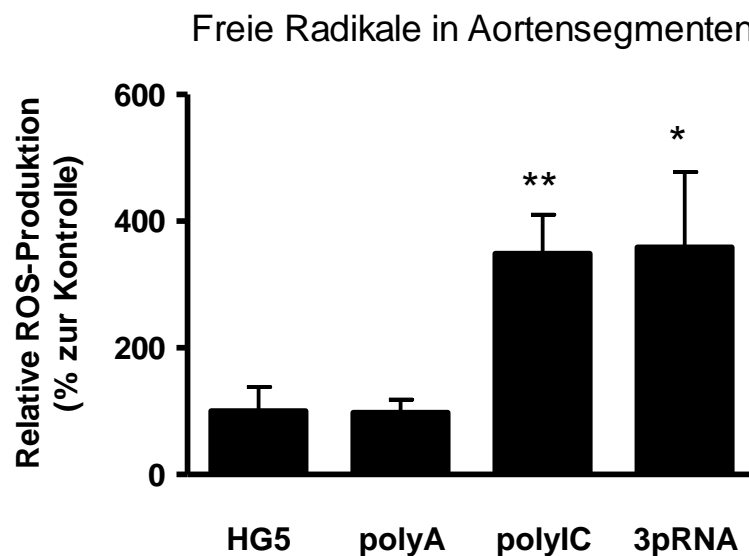


Abb. 16: Messung der ROS Produktion unter MDA-5 und RIG-I Rezeptorstimulation. Unter MDA 5 und unter RIG-I Stimulation kommt es zu einem deutlichen Anstieg der freien Radikale in den Aortensegmenten.

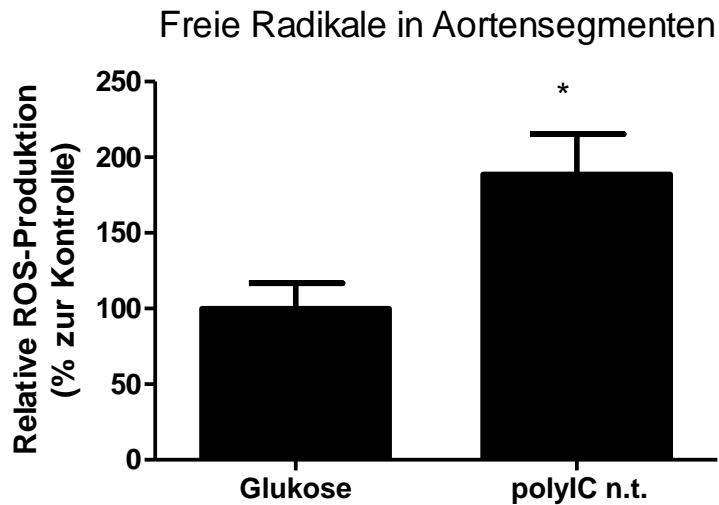


Abb. 17: Messung der ROS Produktion unter TLR-3 Rezeptorstimulation. Unter TLR-3 Rezeptorstimulation via polyIC n.t. kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Produktion freier Sauerstoffradikale.

Unter MDA-5 Stimulation via polyIC zeigt sich eine deutliche Zunahme der ROS Produktion (polyIC 348.7 ± 61.3 % vs. PolyA 97.8 ± 20.4 %, $p < 0,05$). Auch unter RIG-I Stimulation steigt die Anzahl freier Sauerstoffradikale in den Aortensegmenten signifikant an (3pRNA 358.7 ± 118.9 % vs. polyA 97.8 ± 20.4 %, $p < 0,05$). In der zweiten Versuchsreihe wurde zusätzlich der Einfluss einer TLR-3 Rezeptoraktivierung untersucht. Auch hier zeigt sich eine signifikante Steigerung der ROS Produktion (polyIC n.t. 188.6 ± 26.8 % vs. Glukose 100.0 ± 16.8 %, $p < 0,05$).

Lagen also nach den vorangegangenen Versuchen schon Hinweise darauf vor, dass eine Stimulation der von uns untersuchten Rezeptoren zu einer Endothelzellschädigung und endothelialen Dysfunktion führt, so unterstreichen die Resultate der LO12 Messung diese Beobachtung noch einmal.

Als Zwischenfazit lässt sich sagen: Eine MDA-5, RIG-I und TLR-3 Rezeptorstimulation führt im Tiermodell der Wildtypmaus zu endothelialer Dysfunktion und oxidativem Stress. Eine TLR-3 Rezeptoraktivierung führt zudem zu einer reduzierten Reendothelialisierung.

3.2 Ergebnisse der *in vitro* Versuche

3.2.1 ELISA

Die Resultate der *in vivo* Experimente wirft die Frage auf, ob Endothelzellen selber dazu in der Lage sind, auf Nukleinsäuren als Stimuli immunkompetent zu reagieren.

Als ersten Schritt untersuchten wir hierfür die Zytokinproduktion in humanen Koronarendothelzellen (HCAEC) nach Inkubation mit spezifischen MDA-5, RIG-I und TLR-3 Agonisten. Die Konzentration von Interleukin-6, Interleukin-8 und IP-10 wurden im Überstand mittels ELISA bestimmt.

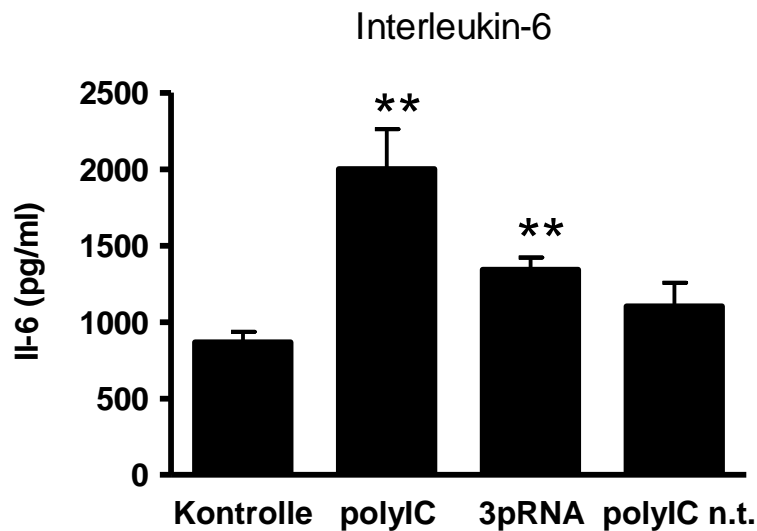


Abb. 18: Interleukin-6 Spiegel im Überstand von HCAEC. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich unter MDA-5 und RIG-I Rezeptorstimulation statistisch signifikant erhöhte Interleukin-6 Spiegel. ($p < 0,01$) Unter TLR-3 Rezeptorstimulation ergibt sich dahingegen kein signifikanter Unterschied.

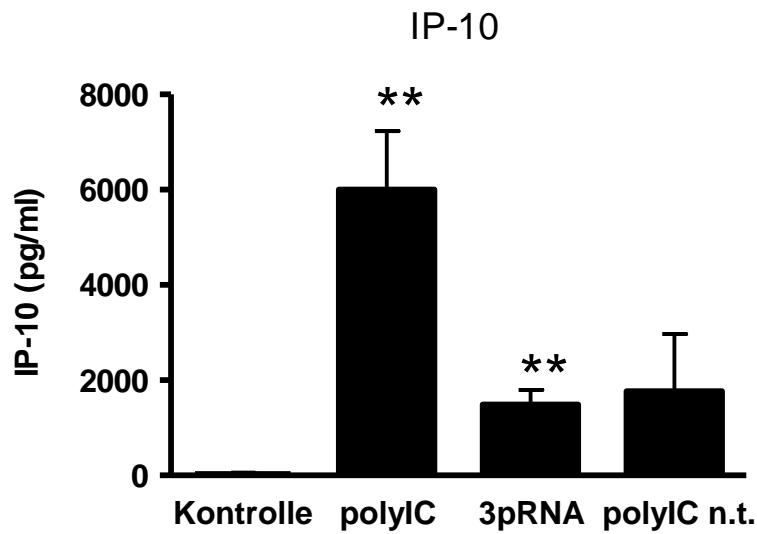


Abb. 19: IP-10 Spiegel in HCAEC. Im Vergleich zu Kontrollgruppe ergaben sich unter TLR-3 Rezeptorstimulation nicht signifikant höhere Zytokinmengen. Die Erhöhung der IP-10 Konzentration unter MDA-5 und RIG-I Rezeptorstimulation imponiert statistisch signifikant ($p < 0,01$).

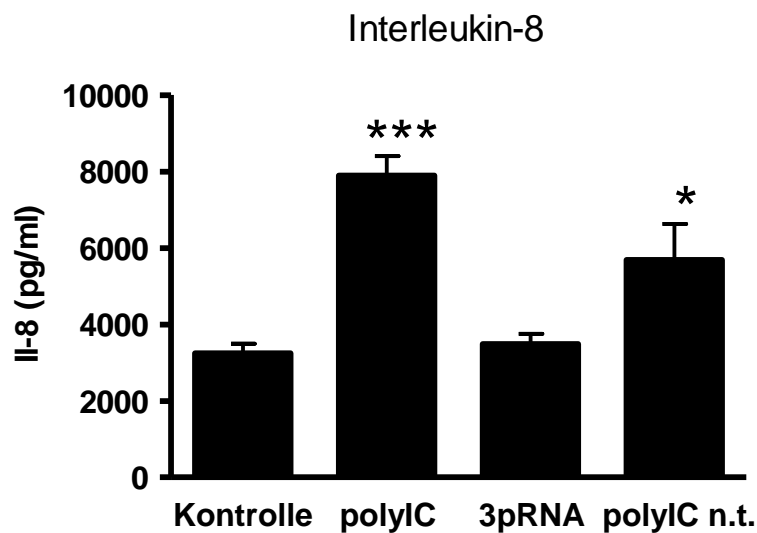


Abb. 20: Interleukin-8 Konzentration in HCAEC. Eine TLR-3 Rezeptorstimulation führt zu einer signifikanten Mehrproduktion von Interleukin-8 ($p < 0,05$). Unter MDA-5 Aktivierung zeigt sich hier sogar ein statistisch signifikanter Effekt ($p < 0,001$).

Sortiert nach den einzelnen Rezeptoren beobachtet man nach MDA-5 Stimulation durch polyIC eine statistisch signifikante Mehrproduktion von Interleukin-6 (polyIC $2000 \pm$

260.3 pg/ml vs. Kontrolle 866.8 ± 69.7 pg/ml, $p < 0,01$). Auch IP-10 wird statistisch signifikant mehr synthetisiert als unter Kontrollbedingungen (polyIC 6001 ± 1228 pg/ml vs. Kontrolle 27.0 ± 27.0 pg/ml, $p < 0,01$). Hinsichtlich der Interleukin-8 Mehrausschüttung zeigt sich hier ebenfalls ein statistisch signifikanter Effekt (polyIC 7898 ± 502.6 pg/ml vs. Kontrolle 3248 ± 251.9 pg/ml, $p < 0,001$).

Unter RIG-I Stimulation via 3pRNA zeigt sich eine signifikante Steigerung der Interleukin-6 Ausschüttung im Vergleich zur Kontrollgruppe (3pRNA 1342 ± 80.5 pg/ml vs. Kontrolle 866.8 ± 69.7 pg/ml, $p < 0,01$). Auch IP-10 wird statistisch signifikant mehr ausgeschüttet als in HCAEC, die lediglich mit dem Kontrollmedium behandelt wurden (3pRNA 1493 ± 306.9 pg/ml vs. Kontrolle 27.0 ± 27.0 pg/ml, $p < 0,01$). Hinsichtlich der Ausschüttung von Interleukin-8 ergaben sich keine statistisch signifikanten Effekte (3pRNA 3484 ± 269.3 pg/ml vs. Kontrolle 3248 ± 251.9 pg/ml, $p = 0,5454$).

Eine TLR-3 Stimulation führte in diesem Versuch zu einer nicht signifikanten Veränderung der Interleukin-6 Produktion (polyIC n.t. 1104 ± 154.1 pg/ml vs. Kontrolle 866.8 ± 69.7 pg/ml, $p = 0,2106$). Die IP-10 Produktion zeigte auch allenfalls eine nicht signifikante Steigerung unter polyIC n.t. (polyIC n.t. 1769 ± 1201 pg/ml vs. Kontrolle 27.0 ± 27.0 pg/ml, $p = 0,1974$). Die Interleukin-8 Produktion hingegen zeigt sich unter TLR-3 Stimulierung signifikant erhöht (polyIC n.t. 5685 ± 946.3 pg/ml vs. Kontrolle 3248 ± 251.9 pg/ml, $p < 0,05$)

Aufgrund der Veränderungen in der Zytokinproduktion unter Stimulation der drei Rezeptoren lässt sich nunmehr schließen, dass HCAEC im Stande sind, immunkompetent im Sinne einer Ausschüttung proinflammatorischer Botenstoffe zu reagieren.

3.2.2 L012 Messung

Inflammatorische Zytokine können eine Atherosklerose verursachen, jedoch kann eine Stimulation mit unseren Substanzen auch direkt die Zellbiologie der Endothelzelle verändern und somit die Entstehung einer Atherosklerose begünstigen. Die *in vivo* Experimente zeigten eine vermehrte ROS Produktion sowie eine verschlechterte Endothelfunktion.

Ob diese gesteigerte Ausschüttung von freien Sauerstoffradikalen nun eine systemische Reaktion darstellt, oder ob sie auch schon auf der zellulären Ebene nachverfolgt werden kann, ist Gegenstand dieses Versuchs.

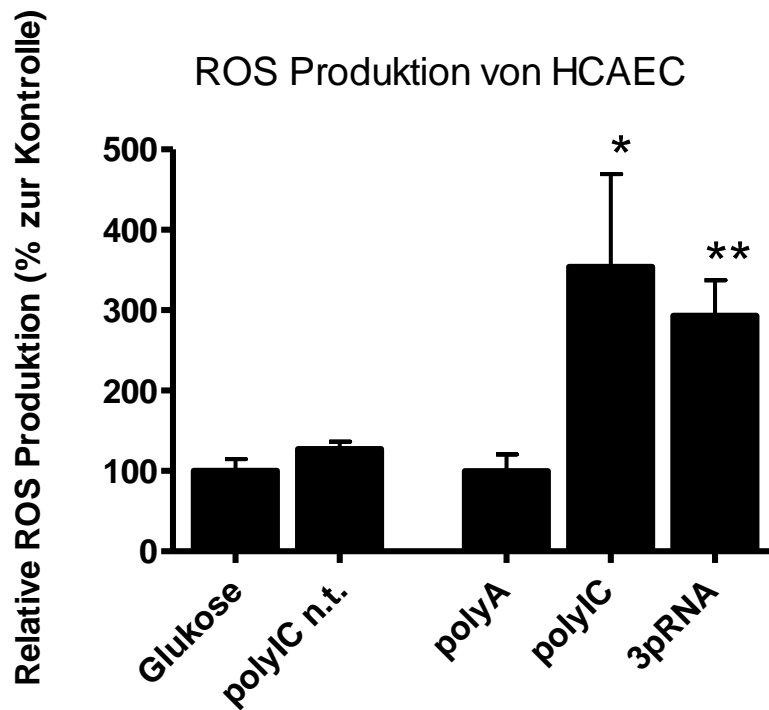


Abb. 21: Messung der ROS Produktion MDA-5, TLR-3 und RIG-I Stimulation. Es zeigt sich eine signifikant höhere Ausschüttung freier Sauerstoffradikale unter MDA-5 Rezeptorstimulation. Die Kontrollgruppe stellt in diesem Falle die Stimulation mit polyA dar. Auch unter RIG-I Rezeptorstimulation zeigt sich eine signifikante Erhöhung der freien Sauerstoffradikale. Kontrollbedingung auch hier wieder polyA. Unter TLR-3 Stimulation zeigt sich keine signifikante Änderung der ROS Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Zellmedium).

Die HCEAC wurden mit den bekannten Nukleinsäuren inkubiert. Nach 4 Stunden Inkubationszeit zeigt sich unter MDA-5 Rezeptorstimulation eine statistisch signifikant höhere ROS Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe mit Inkubation unter polyA (polyIC 353.9 ± 115.6 % vs. polyA 100.0 ± 20.5 %, $p < 0,05$).

Eine RIG-I Rezeptorstimulation führt in HCAEC zu einer signifikanten Erhöhung der Ausschüttung freier Sauerstoffradikale (3pRNA 293.2 ± 44.1 % vs. polyA 100.0 ± 20.5 %, $p < 0,05$). Eine TLR-3 Rezeptorstimulation via polyIC n.t. führt dahingegen zu keiner signifikanten Vermehrung der ROS Produktion (polyIC n.t. 127.2 ± 9.2 % vs. Kontrolle 100.0 ± 14.8 %, $p = 0,1882$).

Wie schon in den *in vivo* Experimenten gezeigt, steigert die Stimulation von MDA-5 und RIG-I die Ausschüttung freier Sauerstoffradikale, nicht nur wie bisher beobachtet systemisch, sondern auch direkt durch die HCAEC. Der *in vivo* beobachtete Effekt einer TLR-3 Rezeptoraktivierung konnte *in vitro* dahingegen nicht reproduziert werden.

3.2.3 BrdU Färbung

Die Fähigkeit einer Zelle zu proliferieren spiegelt deren intakte Funktion wider. Im Carotis Injury Versuch innerhalb der *in vivo* Testreihe zeigte sich eine reduzierte Endothelreendothelialisierung unter TLR-3 Rezeptorstimulation. Um zu prüfen, in wie weit die Stimulation der Rezeptoren MDA-5, RIG-I und TLR-3 Einfluss auf die Teilungsrate der Endothelzellen hat, führten wir den folgenden Proliferationsassay durch.

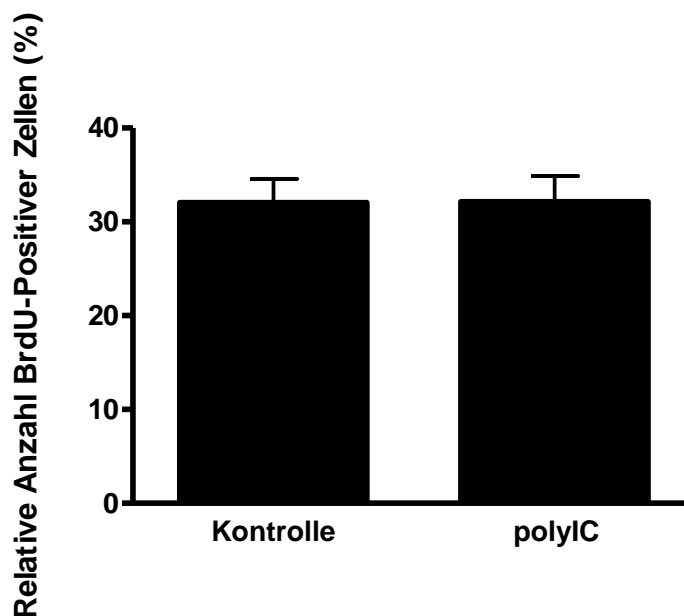


Abb. 22: Proliferationsverhalten unter MDA-5 Rezeptorstimulation. Hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der HCAEC zeigt sich kein Unterschied zwischen Zellen unter MDA-5 Stimulation und Zellen ohne Stimulation.

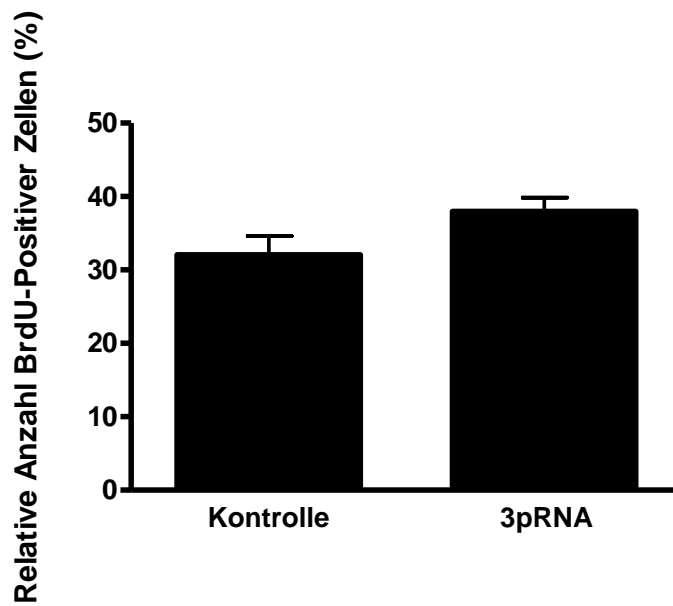


Abb. 23: Proliferationsverhalten unter RIG-I Stimulation. Auch unter RIG-I Stimulation ergibt sich kein signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten.

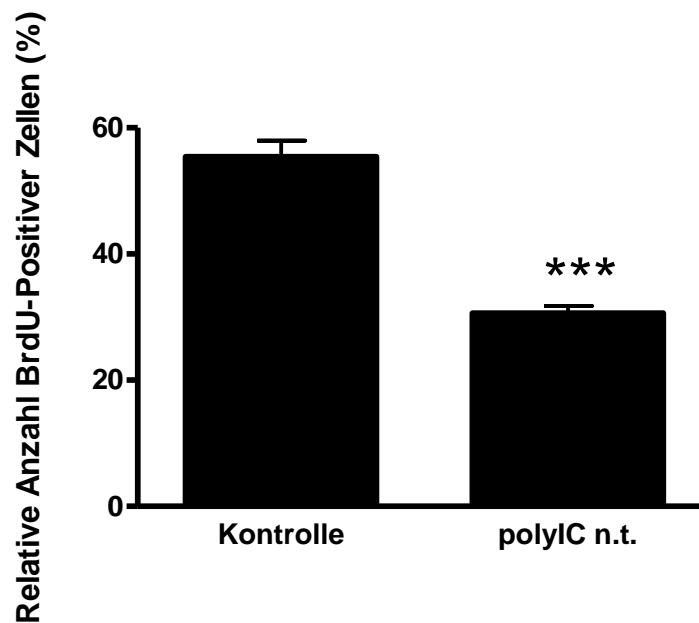


Abb. 24: Proliferationsverhalten unter TLR-3 Rezeptorstimulation. Es zeigt sich eine deutliche Reduzierung des Proliferationsverhalten der HCAEC unter TLR-3 Rezeptorstimulation. Dieser Effekt ist statistisch signifikant ($p < 0,001$).

Nach Auswertung des Proliferationsverhaltens der HCAEC unter Stimulation der verschiedenen Rezeptoren zeigen sich jeweils keine signifikanten Unterschiede unter MDA-

5 und unter RIG-I Stimulation (polyIC 32.1 ± 2.7 % vs. polyA 32.1 ± 2.5 %, $p= 0,9855$ und 3pRNA 38.0 ± 1.9 % vs. polyA 32.1 ± 2.5 %, $p= 0,1179$).

Unter TLR-3 Rezeptorstimulation via polyIC n.t. kommt es jedoch zu einer signifikanten Verminderung der Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe (polyIC n.t. 30.6 ± 1.2 % vs. Kontrolle 55.4 ± 2.5 %, $p < 0,001$). Dieses Ergebnis passt zu dem reduzierten Re-endothelialisierungsverhalten aus dem *in vivo* Experiment.

3.2.4 Apoptose Assay

Ob eine reduzierte Proliferation unter Rezeptorstimulation auch mit einer erhöhten Apoptoserate einhergeht, war die Fragestellung bei der Durchführung des Apoptose Assays. Messparameter hier ist die Peroxidaseaktivität.

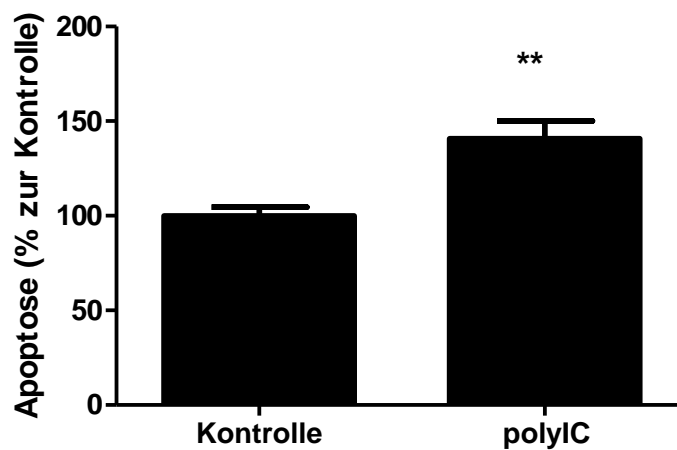


Abb. 25: Apoptoserate unter MDA-5 Rezeptorstimulation. Unter Stimulation der HCAEC kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate ($p < 0,01$).

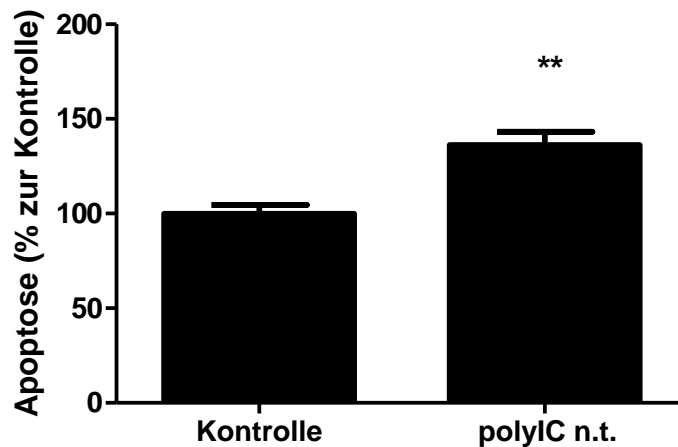


Abb. 26: Apoptoserate unter TLR-3 Rezeptorstimulation. Eine Stimulation mit polyIC n.t. führt im Vergleich zur Kontrolle zu einer statistisch signifikant vermehrten Apoptose ($p < 0,01$).

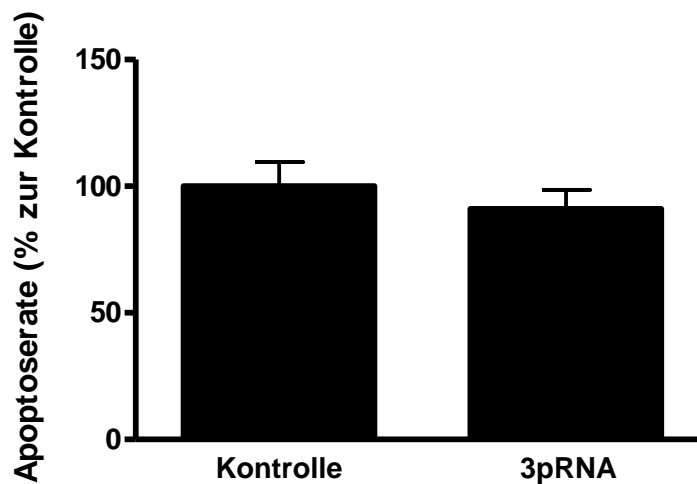


Abb. 27: Apoptoserate unter RIG-I Rezeptorstimulation. Unter RIG-I Rezeptorstimulation zeigt sich keine signifikante Änderung bezüglich der Apoptoserate.

Hinsichtlich des programmierten Zelltodes zeigt sich eine Zunahme selbigens unter MDA-5 (Kontrolle 100.0 ± 9.6 %, $N=5$ vs. polyIC 152.9 ± 22.5 %, $N=3$) und TLR-3 (Kontrolle 100.0 ± 4.6 %, $N=8$ vs. polyIC n.t. 136.2 ± 7.0 %, $N=4$) Beide Effekte zeigten sich statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Unter RIG-I Stimulation kam es zu keiner signifikanten Änderung des Apoptoseverhaltens der HCAEC (Kontrolle 100.0 ± 9.6 % N=5 vs. 3pRNA 91.1 ± 7.5 % N=5).

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Endothelzellen in der Lage sind aktiv auf eine Stimulation mit bestimmten Nukleinsäuren zu reagieren. Eine Aktivierung der untersuchten PRR TLR-3, RIG-I und MDA-5 in Endothelzellen löst eine entzündliche und atherogene Reaktion *in vitro* sowie einen Endothelschaden *in vivo* aus. Diese Ergebnisse stützen die Vorstellung einer Verbindung zwischen Zellschädigung, endogener RNA Freisetzung und PRR Aktivierung einerseits sowie der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion andererseits.

4.1 Immunstimulation und Zytokinfreisetzung

Unter *in vitro* Stimulation von HCAEC mit TLR-3 Rezeptoragonisten zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg von IL-8. Unter MDA-5 und RIG-I Rezeptorstimulation kam es jeweils zu einer signifikanten Mehrausschüttung von IL-6 und IP-10. Zusätzlich zeigte eine MDA-5 Stimulation einen signifikanten Anstieg von IL-8.

IP-10 oder Chemokin Ligand 10 „CXCL10“ ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches von Endothelzellen, Monozyten sowie Fibroblasten als Antwort auf exogene Typ I Interferone (Luster et al., 1985) oder auf Toll-Like Rezeptor Agonisten, ausgeschüttet wird. IP-10 bindet am CXCR3 Rezeptor, welcher direkt mit der Atherogenese in Verbindung steht. In einer Studie mit ApoE^{-/-}/IP-10^{-/-} defizienten Mäusen zeigten Heller et al. 2006, dass die Entstehung atherosklerotischer Plaques in diesen Tieren signifikant geringer war als in der Kontrollgruppe mit ApoE^{-/-} Mäusen. In humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) ist IP-10 an der Leukozytenmigration in die Gefäßwand beteiligt (Campanella et al., 2006).

IL-8 oder CXCL8, wird in der Gefäßwand von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen gebildet. Seine Rezeptoren sind die G-Protein gekoppelten Proteine CXCR1 und CXCR2, welche chemotaktische und mitogene Effekte vermitteln. Apostolopoulos et al. beschrieben 1996 das Vorkommen von IL-8 in atherosklerotischen Plaques sowie die Bedeutung des in zirkulierenden Monozyten produzierten Interleukins als Biomarker für die koronare Herzerkrankung. Im gesunden Patientenkollektiv konnte

in dieser Studie keine Interleukin-8 mRNA Produktion in peripheren Monozyten nachgewiesen werden.

IL-6 spielt ebenfalls eine Rolle in der Atherogenese. Angiotensin II induziert eine Mehrproduktion von Interleukin-6 (Boring et al., 1998; Ikeda et al., 1991). Wassmann et al. zeigten 2009, dass IL-6 die AT1 Rezeptor Konzentration und über diesen Weg die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies *in vitro* in vascular smooth muscle cells (VSMC) und *in vivo* steigert. Dieses führt zu einer erhöhten Angiotensin II-vermittelten Vasokonstriktion und zu der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion. Andere Studien zeigen, dass IL-6 eine atherosklerotische Plaque vergrößern kann (Huber et al., 1999) und dass die Höhe des IL-6 Spiegels mit dem Risiko eine koronare Herzerkrankung zu entwickeln invers korreliert ist.

Jeder der drei untersuchten Rezeptoraktivierungswege induziert also die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die für eine Beteiligung am atherogenen Prozess bekannt sind. Eine MDA-5 Rezeptorstimulation führt alleinig zu einer signifikant vermehrten Ausschüttung aller drei untersuchten Zytokine. Eine Gewichtung der Zytokine in ihrer Bedeutung für die Atherogenese wurde hier nicht durchgeführt. Die Ergebnisse der folgenden Versuche werden hierbei noch in Zusammenhang gesetzt werden.

4.2 Direkte Effekte der Rezeptorstimulation

Eine Atherosklerose kann nicht nur durch eine Zytokin-vermittelte Reaktion hervorgerufen werden, sondern auch durch direkte Effekte der Rezeptorstimulation von TLR-3, RIG-I und MDA-5. Diese Effekte zeigten sich anhand der erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies unter der Behandlung sowohl der HCAEC als auch der Wildtypmäuse im *in vivo* Experiment unter MDA-5, RIG-I und – zumindest *in vivo* - TLR-3 Rezeptorstimulation. Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies kann zur zellulären Dysfunktion sowie zum Zellschaden führen. Zudem finden sich ROS in allen Stadien der endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose.

Hayashi et al. zeigten, ähnlich wie in dieser Arbeit, 2003, dass eine TLR-3 Rezeptorstimulation via polyIC zu keiner Änderung der Superoxid Ausschüttung in neutrophilen Granulozyten führt. Auch eine Ausschüttung von Zytokinen oder Chemokinen war hier

nicht zu beobachten, sodass die Autoren schlussfolgern, dass in neutrophilen Granulozyten TLR-3 im Vergleich zu den anderen Toll-like Rezeptoren eine untergeordnete Rolle spielt (Hayashi et al., 2003).

Über den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und RIG-Rezeptoraktivierung finden sich zurzeit noch wenige Studien. Jüngere Ergebnisse zeigen, dass die antivirale Antwort über RIG-I in *adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells*, A549 Zellen, stark von der Aktivität der NOX2 (NADPH Oxidase 2) abhängt. Eine Herunterregulierung dieses Enzyms oder antioxidative Therapien reduzierten die Fähigkeit der Zellen über den RIG-I Signalweg antiviral zu antworten (Soucy-Faulkner et al., 2010). Ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress beziehungsweise der Freisetzung freier Sauerstoffradikale und dem RIG-I Signaltransduktionsweg kann somit zumindest vermutet werden. Unsere Ergebnisse lassen hier darauf schließen, dass auch eine RIG-I Induktion selber zu einer Freisetzung von ROS führen kann. Inwieweit es damit zu einer Verstärkung der immunologischen Antwort kommen könnte bleibt noch zu klären

4.3 Proliferation und Apoptose

Neben der erhöhten ROS Produktion fand sich unter TLR-3 Rezeptoraktivierung eine erhöhte Apoptoserate und eine deutlich reduzierte Proliferation im BrdU Assay bei HCAEC. Diese Effekte *in vitro* könnten eine Erklärung für die Ergebnisse der *in vivo* Organbadexperimente darstellen. Hier zeigte sich unter Behandlung der Mäuse mit polyIC n.t. eine reduzierte Endothel-abhängige Vasodilatation und eine verschlechterte Re-Endothelialisierung in der Karotis Denudation. Feletou und Vanhoutte beschrieben 2006 die Endotheliale Dysfunktion als Beeinträchtigung der Endothel-vermittelten Vasodilatation. Dieses wurde erstmals an Tiermodellen hypertensiver Ratten (Lockette et al., 1986) und nachfolgend auch in Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren (Ludmer et al., 1986) beobachtet, nachdem zuvor beschrieben worden war, dass die Acetylcholin vermittelte Vasodilatation ein funktionsfähiges Endothel, das zur NO Produktion fähig ist, voraussetzt (Furchgott und Zawadzki, 1980).

Der endothelialen Dysfunktion unter TLR-3 Stimulation auf organischer Ebene könnte demnach auf zellulärer Ebene ein erhöhter programmierter Zelltod, eine verminderte

Proliferationskapazität oder aber eine verminderte Fähigkeit des Endothels, auf Schädigungen adäquat zu reagieren, zu Grunde liegen.

Unter MDA-5 Rezeptorstimulation kam es in den durchgeführten Experimenten zu einem nicht eindeutigen Zusammenhang. Während die Apoptoserate deutlich erhöht war, blieb der signifikante Effekt auf das Proliferationsverhalten in diesen Testreihen aus. Im Mausmodell zeigte sich jedoch ganz klar eine Verschlechterung der endothelzellabhängigen Vasodilatation. Auch hier könnte die Erklärung in einer reduzierten Reaktionsfähigkeit des Endothels liegen. Kang et al. zeigten 2002 bereits, dass eine Aktivierung von MDA-5 wachstumshemmende Effekte hatte. In späteren Follow Up Studien zeigten die Autoren, dass die durch Adenoviren getriggerte Expression von MDA-5 in humanen Melanomzellen (HO-1 Zellen) zu einer gesteigerten Apoptoserate dieser Zellen führen (Kang et al., 2004). Liu et al. zeigten 2012, dass polyIC in CD 34 positiven Zellen via MDA-5/RIG-I eine vermehrte Apoptose induzieren kann. Interessanterweise führt in dieser Studie eine TLR-3 Rezeptoraktivierung nicht zu einer erhöhten Apoptoserate. Zusammenfassend scheint eine reduzierte Proliferation unter MDA-5 Stimulation in Endothelzellen wahrscheinlich, muss jedoch noch experimentell belegt werden.

Führte in den Organbadexperimente eine Stimulation von RIG-I via 3pRNA zu einer verminderten endothelzellabhängigen Vasodilatation, so ließen sich auf zellulärer Ebene keine signifikanten Änderungen auf das Apoptose- oder das Proliferationsverhalten der HCAEC erkennen. Zur Beeinflussung des programmierten Zelltods und der Proliferation finden sich für die Stimulation von RIG-I mit 3pRNA bei Endothelzellen derzeit keine wegweisenden Studien. Besch et al. zeigten jedoch 2009, dass es in humanen Melanomzellen unter Stimulation mit polyIC oder 3pRNA jeweils via MDA-5 oder RIG-I zu einem erhöhten Zelltod kam. Hierbei bedienten sich die beiden Rezeptoren ihres Adapter Proteins Cardif (IPS-1) in der äußeren Mitochondrienmembran.

Dass der Rezeptor RIG-I an der Atherosklerose generell beteiligt ist, zeigten Imaizumi et al. 2007. RIG-I wurde vermehrt in Makrophagen der Intima in atherosklerotischen Plaques exprimiert. Die Autoren suggerierten zudem, dass RIG-I an der Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen beteiligt sei. Als Ligand für RIG-I wurde darauf 3pRNA identifiziert, die auch in unseren Experimenten als Testsubstanz diente

(Hornung et al., 2006). Bereits 2005 wurde gezeigt, dass Doppelstrang RNA in der Lage ist, die Expression von RIG-I *in human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) zu induzieren (Imaizumi et al., 2005). PolyIC als Doppelstrang RNA führte wiederum via RIG-I in CD 34 positiven Zellen zur vermehrten Apoptose (Liu et al., 2012). Inwieweit 3pRNA via RIG-I ebenfalls zu einem vermehrten Zelltod in HCAEC führen kann und ob dieses dann als zelluläres Korrelat zur endothelialen Dysfunktion gesehen werden kann, gilt es in weiteren Experimenten zu untersuchen.

4.4 Regenerationsfähigkeiten des Endothels

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von PBMNC fiel auf, dass es *in vivo* unter MDA-5 Rezeptor Stimulation zu einer erhöhten Ausschwemmung endothelialer Progenitorzellen ins periphere Blut kam, die Re-Endothelialisierung jedoch vermindert war.

Unsere Arbeitsgruppe zeigte 2012, dass es unter TLR-3 Rezeptorstimulation zur vermehrten Ausschüttung von EPC in Wildtypmäusen und ApoE ^{-/-} Knockout Mäusen kam, während dieser Effekt in TLR-3 ^{-/-} Knockout Mäusen ausblieb. Eine Inkubation mit polyIC von EPC führte jedoch *in vitro* zu einer erhöhten Apoptoserate, einer verschlechterten EPC Migration sowie zu einer vermehrten ROS Produktion. Die Autoren injizierten daraufhin EPC aus Wildtyp- und TLR-3 Knockout Mäusen, welche zuvor mit polyIC behandelt wurden, in Wildtypmäuse. Die empfangenden Tiere zeigten eine deutlich verminderte Re-Endothelialisierung nach Arteria carotis Denudation, wenn die EPC aus Wildtyp Mäusen stammten. Bei aus TLR-3 Knockout Mäusen gewonnenen EPC blieb dieser Effekt aus (Zimmer et al., 2011). Die Autoren schlussfolgerten, dass eine TLR-3 Rezeptorstimulation die EPC Funktion verschlechterte und somit zur endothelialen Dysfunktion beitrug.

Hier lässt sich übertragend vermuten, dass die EPC unter MDA-5 Rezeptorstimulation ebenso dysfunktional sein könnten.

4.5 Vergleich mit anderen Studien

Der Toll like Rezeptor 3 erkennt in seiner ursprünglichen Funktion virale RNA Partikel, so zum Beispiel Doppelstrang RNA, die in unseren Experimenten durch das synthetisch hergestellte polyIC ersetzt wurde. Ross et al. wiesen 1999 infektiöse Mikroorganismen

wie Herpesviren und *Chlamydia pneumoniae* in atherosklerotischen Plaques nach, es scheint jedoch fraglich, inwieweit virale Infektionen die Hauptverursacher der Atherosklerose sind. Aktuelle Antibiotikainterventionsstudien widerlegen diese Vermutung, schließen jedoch nicht aus, dass infektiöse Partikel potentiell an der Pathogenese der Atherosklerose beteiligt sind (Grayston et al., 2005). Guan et al. zeigten zuletzt 2012 in einem Patientenkollektiv, die einen akuten Myokardinfarkt erlitten, dass diese signifikant häufiger eine Influenza B Infektion in ihrer Vorgeschichte aufwiesen. Hier ist anzumerken, dass RIG-I auch durch Inflenzaviren aktiviert werden kann (Hornung et al., 2006). Johnstone et al. zeigten 2012 in einem Patientenkollektiv mit bekannter koronarer Herzerkrankung, dass eine Influenza Impfung für ein besseres Outcome hinsichtlich kardiovaskulärer Mortalität führt. Diese Schlussfolgerung gilt hierbei für die Jahre, in denen der Impfstoff auf den jeweils vorliegenden Influenzaserotyp abgestimmt war. Die Autoren berichteten jedoch auch davon, dass es ebenso in der Nicht-Influenza Saison zu einem verbesserten Outcome der kardiovaskulären Mortalität kam, sodass hier noch weitere Studien folgen müssen.

Neuere Untersuchungen zeigten, dass schon kurze RNA Sequenzen wie zum Beispiel die small interfering RNA (siRNA) ausreichen, um TLR-3 zu aktivieren (Kleinman et al., 2008). SiRNA besteht aus 21-28 Nukleotiden, die mittels RNase III Dicer aus langer doppelsträngiger RNA herausgeschnitten werden. Diese siRNA ist jedoch nicht vergleichbar mit dem von uns genutzten polyIC. Cho et al. zeigten 2009, dass siRNA die Neovaskularisation mittels TLR-3 Rezeptoraktivierung inhibiert, was dennoch eine mögliche Parallele zu unseren Ergebnissen darstellt.

Zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine Tendenz hin zu proinflammatorischen und proatherogenen Effekten einer TLR-3 Rezeptoraktivierung, so finden sich in der Literatur hier auch gegenteilige Ergebnisse. Aumeunier et al. zeigten 2010, dass unter anderem eine TLR-3 Rezeptoraktivierung in Mäusen die Inzidenz von Diabetes mellitus Typ I vermindert. Vijay-Kumar et al. zeigten bereits 2007, dass eine subkutane Verabreichung von polyIC bei Wildtyp- und IL-10 Knock Out Mäusen, zu einem Schutz vor Dextran-Natriumsulfat induzierter Kolitis führte. Dieser Effekt konnte unter oraler Verabreichung von polyIC nicht beobachtet werden. Interessanterweise kam es unter TLR-3 Rezeptorstimulation außerdem zu einer Reduktion der Neointima Bildung nach Induktion von Atherosklerose via „Collar Placement“ (Cole et al., 2010). Die Autoren zeigten zudem

eine Zunahme der TLR-3 Rezeptorexpression in glatten Muskelzellen der Gefäßmedia (SMC) im Bereich von atherosklerotischen Plaques im Vergleich zu gesunden Gefäßabschnitten. In diesen Zellen wurden via TLR-3 Rezeptorstimulation sowohl pro- als auch antiinflammatorische Faktoren hochreguliert. So kam es zum Beispiel zu einer Hochregulierung von IL-10. Der Nettoeffekt einer TLR-3 Rezeptorstimulation *in vivo* bei einem mechanischem und einem Hypercholesterinämie Injury Modell via polyIC war in dieser Studie artheroprotektiv. Bsibsi et al. beschrieben 2006 die durch TLR-3 Stimulation induzierte Ausschüttung von IL-10 in Astrozyten und dessen neuroprotektive Effekte. Endogene Liganden scheinen also über TLR-3 je nach dessen Expressionsort (Endothelzelle oder glatte Muskelzelle) zunächst scheinbar gegensätzliche Effekte auszulösen. Eben diese endogenen Liganden müssen in Zukunft vielleicht noch besser spezifiziert werden. In dieser Arbeit und in den soeben genannten wurde jeweils das synthetisch hergestellte polyIC als Ligand verwendet. Fragen für weitere Untersuchungen könnte also sein, welche Liganden von TLR-3 in der Atherosklerose überwiegen und somit entweder zum Überwiegen der pro- oder aber der anti-inflammatorischen Effekte einer TLR-3 Rezeptorstimulation führen.

Auch andere Rezeptoren der Toll like Familie wurden mit der Atherogenese in Verbindung gebracht. TLR-4 als transmembranes Rezeptormolekül für Lipopolysachharid (LPS) findet sich in gesunden Gefäßwänden, wird jedoch in atherosklerotischen Plaques überexprimiert. Eine Aktivierung dieses Rezeptors löst eine vermehrte Zytokinausschüttung sowie die Produktion von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen aus und führt zudem zur vermehrten Ausschüttung von Matrix Metalloproteinasen in Makrophagen (Frantz et al., 2007). Interessant hierbei ist, dass Michelsen et al. 2004 herausfanden, dass TLR-4 und MyD88 Knockout Mäuse weniger atherosklerotische Plaques entwickelten als Kontrolltiere. Klinisch finden sich erhöhte Spiegel TLR-4 Rezeptor positiver Monozyten bei Patienten mit instabiler Angina und akutem Koronarsyndrom (Methe et al., 2005). Auch bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz als Folge eines akuten Myokardinfarktes fanden sich höhere Spiegel von TLR-4 positiven Monozyten als in der Kontrollgruppe mit gesunden Probanden (Sato et al., 2006).

Neben TLR-4 wurden auch die Typen 2 und 5 in atherosklerotischen Plaques gefunden. Diese wurden von ortsständigen Zellen und Leukozyten exprimiert, die vorher in die Gefäßwand imigriert waren (Edfeldt et al., 2002; Xu et al., 2001).

TLR-2 und seine Signalwege scheinen ebenso in die Atherogenese mit einzuspielen. TLR2^{-/-} und LDL Rezeptor^{-/-} Doppelknockout Mäuse zeigten so zum Beispiel eine Reduktion des Atheroskleroseschweregrades (Mullick et al., 2005). Zudem wird vermutet, dass eine TLR-2 Aktivierung die Re-Stenoserate nach Stent Implantation fördert, da exogene Stimulation des Rezeptors die Atheroskleroserate und die Neointimabildung nach Gefäß Injury fördert (Schoneveld et al., 2005).

Vergleicht man nun TLR-2 und TLR-3 muss man jedoch sagen, dass Ersterer Bakterienbestandteile als Liganden aufweist, TLR-3 jedoch RNA erkennt, welche nicht nur von Viren exprimiert wird, sondern eben auch von endogenen Liganden.

RIG-I führt zu Typ 1 Interferon Antworten und zu einer NFκB abhängigen proinflammatorischen Genexpression. Als spezifischer Ligand wurde von Hornung et al. 2006 3pRNA nachgewiesen, eine 5' Triphosphat RNA, die bei Flaviviridae, Paramyxoviridae, Orthomyxoviridae und Rhabdoviridae vorkommt (Kato et al., 2006; Sumpter et al., 2005; Yoneyama et al., 2004). Bei körpereigener RNA fehlt durch Prozesse wie das posttranskriptionale Capping der mRNA besagtes Triphosphatende. So kann der Körper zwischen Fremd und Selbst unterscheiden. Unsere Ergebnisse der in vivo Experimente zeigen eine verminderte Relaxationsfähigkeit des Endothels unter RIG-I Rezeptoraktivierung, also eine endotheliale Funktionsstörung. Weiteren Studien werden zum einen zeigen müssen inwieweit endogene Liganden RIG-I aktivieren können und so proatherogen wirken und zum anderen welche Signalwege genau zur Atherosklerose führen.

4.6 Molekulare und Klinische Bedeutung

Zusammengefasst zeigen unsere Ergebnisse eine Beteiligung des angeborenen Immunsystems in der Endothelzellbiologie und unterstützen die These einer Beteiligung sowohl endogener Liganden als auch viraler Nukleinsäuren am Pathomechanismus der Atherosklerose über Aktivierung von TLR-3, RIG-I und MDA-5. Diese Rezeptoren werden auf bzw. in der Endothelzelle exprimiert und sind ihren Liganden bei einer Endothelzellschädigung ausgesetzt.

Klinisch genutzt werden könnten diese Erkenntnisse in der gezielten Blockade eben dieser Rezeptoren auf der Endothelzelle, um eine Plaqueformation im Sinne der Athe-

roskleroseentstehung zu minimieren oder ganz zu vermeiden. Hieraus ergibt sich ein interessanter Ansatzpunkt für neue Pharmaka. Der TLR-4 Antagonist Lipid-A-Derivat Eritoran[®] (E5564) stellt in Studien bereits ein mögliches Therapeutikum bei Patienten mit schwerer Sepsis dar (Tidswell et al., 2010). Wang et al. beschrieben 2009 TLR-7 und TLR-9 Antagonisten, welche in Zukunft therapeutisch in der Behandlung des systemischen Lupus Erythematoses zur Behandlung beitragen könnten. Alves-Filho und Culha zeigten 2006, dass Statine neben ihrem HMGCoA Reduktase-inhibierendem Effekt die TLR-2 und TLR-4 Expression vermindern können. Wie oben erwähnt spielen diese beiden Rezeptoren eine Rolle in der Atheroskleroseentwicklung. Bunting et al. zeigten 2011, dass mittels monoklonaler Antikörper gegen TLR-3 die IP-10 und MCP-1 Ausschüttung in HEK293T (Human Embryonic Kidney 293 cells) vermindert werden kann. Nach intraperitonealer Injektion von polyIC am Mausmodell kam es zudem nach Applikation eines Anti-TLR-3-Antikörpers zu erniedrigten Serumwerten von TNF- α und IL-6. Cheng et al. fanden 2011 „Compound 4a“ als kompetitiven Inhibitor von TLR-3, dessen Bindung an den Rezeptor zu einer verminderten Expression von TNF- α und IL-1 β in Makrophagen führte. Ziel weiterer Studien sollte es sein, die Effekte dieser Antagonisten auf die Endothelzellfunktion zu untersuchen.

Ranjith-Kumar et al. zeigten 2009, dass phosphorothioilierte Oligodesoxynukleotide als Antagonisten an RIG-I wirken können, was einen weiteren Ansatzpunkt für Untersuchungen hinsichtlich möglicher Therapieoptionen der Atherosklerose darstellen könnte.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einer Toll-like Rezeptor-3 (TLR-3), Retinoic Acid inducible Gene I (RIG-I) und Melanoma differentiation-associated Gene 5 (MDA-5) Rezeptoraktivierung auf Endothelzellen im Zusammenhang mit einer Atheroskleroseentwicklung *in vitro* an Human Coronary Artery Endothelial Cells (HCAEC) und *in vivo* an C57BL/6J Mäusen untersucht.

Als Rezeptoragonisten wurden das künstlich hergestellte Polyinosinic - Polycytidylic Acid (polyIC) als Analogon zur viralen Doppelstrang Ribonukleinsäure und Triphosphat Ribonukleinsäure (3pRNA), der kürzlich entdeckte spezifische Ligand für RIG-I, verwendet. Die Effekte dieser Liganden wurden hinsichtlich proatherogenen Auswirkungen untersucht. Die Experimente umfassten Untersuchungen zur Zytokinausschüttung, Rezeptorexpression, zu oxidativem Stress, gesteigertem Apoptose- und verringertem Proliferationsverhalten, Ausschüttung von endothelialen Progenitorzellen und endothelialen Mikropartikeln sowie Untersuchungen zur Endothelfunktion via Organbad.

Unter Toll-like Rezeptor-3 Rezeptorstimulation zeigte sich eine deutlich verminderte Proliferation bei gleichzeitig erhöhter Apoptoserate in Endothelzellen *in vitro*, eine vermehrte Ausschüttung freier Sauerstoffradikale sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, sowie eine vermehrte Produktion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-8. *In vivo* zeigte sich zudem eine deutlich verminderte Reendothelialisierung nach Denudierung der Arteria carotis communis sowie eine verminderte endothelzellgetriggerte Vasodilatation als Ausdruck für eine endotheliale Dysfunktion.

Unter Retinoic Acid inducible Gene I Rezeptorstimulation zeigten sich keine Effekte auf Proliferation und Apoptose, jedoch eine vermehrte Ausschüttung von Interleukin-6, Interferon Gamma-induced Protein-10 (IP-10) und freier Sauerstoffradikale *in vivo* und *in vitro*. Als Zeichen für eine endotheliale Schädigung kam es *in vivo* zur vermehrten Ausschüttung von endothelialen Mikropartikeln und einer verminderten endothelzellabhängigen Vasodilatation.

Eine Melanoma differentiation-associated Gene 5 Rezeptoraktivierung führte zu keiner Änderung des Proliferationsverhalten *in vivo*, zeigte jedoch eine deutlich erhöhte

Apoptoserate der HCAEC. Es kam sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zur vermehrten Ausschüttung von freien Sauerstoffradikalen. Proinflammatorische Zytokine wurden vermehrt exprimiert. *In vivo* zeigte sich eine vermehrte Ausschüttung von endothelialen Mikropartikeln und endothelialen Progenitorzellen sowie eine verminderte endothelzellabhängige Vasodilatation.

Es stellte sich somit heraus, dass das Endothel immunkompetent reagieren kann und eine Aktivierung der in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren zu einer Verschlechterung der Endothelfunktion führen.

Unsere Daten postulieren eine Beteiligung von Toll-like Rezeptor-3, Melanoma differentiation-associated Gene-5 und Retinoic Acid inducible Gene I in der Entstehung der Atherosklerose. Endogene Liganden für die Rezeptoren müssen in weiteren Studien identifiziert werden. Antagonisten der Rezeptoren stellen potentielle atheroprotektive Behandlungsstrategien dar.

6. Literaturverzeichnis

Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FP, Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2434-2443

Adiguzel E, Ahmad PJ, Franco C, Bendeck MP. Collagens in the progression and complications of atherosclerosis. *Vasc Med.* 2009; 14:73-89

Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Lefheriotis G, Heymes C, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol* 2008; 173: 1210-1219

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-738

Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggestt S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999; 285: 736-739

Alves-Filho JC, Cunha FQ. Modulation of toll-like receptor expression: a further effect of statins? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 ;26:e128

Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985; 42: 791-798

Andrejeva J, Childs KS, Young DF, Carlos TS, Stock N, Goodbourn S, Randall RE. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 17264-17269

Apostolopoulos J, Davenport P, Tipping PG. Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 1007-1012

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal

vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967

Asdonk T, Motz I, Werner N, Coch C, Barchet W, Hartmann G, Nickenig G, Zimmer S. Endothelial RIG-I activation impairs endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;42066-42071

Ashfaq S, Abramson JL, Jones DP, Rhodes SD, Weintraub WS, Hooper WC, Vaccarino V, Harrison DG, Quyyumi AA. The relationship between plasma levels of oxidized and reduced thiols and early atherosclerosis in healthy adults. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:1005-1011

Aumeunier A, Grela F, Ramadan A, Pham Van L, Bardel E, Gomez Alcala A, Jeannin P, Akira S, Bach JF, Thieblemont N. Systemic Toll-like receptor stimulation suppresses experimental allergic asthma and autoimmune diabetes in NOD mice. *PLoS One*. 2010; 5:e11484

Baltimore D, Becker Y, Darnell JE. Virus-specific double-stranded RNA in poliovirus-infected cells. *Science*. 1964; 143:1034-1036

Bauersachs J, Bouloumié A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* 1999; 100: 292-298

Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1995;95:2266-2274

Benninghoff A, Drenckhahn D. Anatomie- Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie Band 2. 16. Auflage. München: Elsevier GmbH, 2004

Berghäll H, Sirén J, Sarkar D, Julkunen I, Fisher PB, Vainionpää R, Matikainen S. The interferon-inducible RNA helicase, mda-5, is involved in measles virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes Infect* 2008; 8: 2138-2144

Bernal-Mizrachi L, Jy W, Jimenez JJ, Pastor J, Mauro LM, Horstman LL, de Marchena E, Ahn YS. High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. *Am Heart J* 2003; 145: 962-970

Besch R, Poeck H, Hohenauer T, Senft D, Häcker G, Berking C, Hornung V, Endres S, Ruzicka T, Rothenfusser S, Hartmann G. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest.* 2009;119:2399-2411

Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009; 113: 1399-1407

Bhunja AK, Han H, Snowden A, Chatterjee S. Redox-regulated signaling by lactosylceramide in the proliferation of human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1997; 272: 15642-15649

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 894-897

Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 2006; 48: 180-186

Bsibsi M, Persoon-Deen C, Verwer RW, Meeuwsen S, Ravid R, Van Noort JM. Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia.* 2006;53:688-695

Bunting RA, Duffy KE, Lamb RJ, San Mateo LR, Smalley K, Raymond H, Liu X, Petley T, Fisher J, Beck H, Flavell RA, Alexopoulou L, Ward CK. Novel antagonist antibody to TLR3 blocks poly(I:C)-induced inflammation in vivo and in vitro. *Cell Immunol.* 2011; 267: 9-16

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844

Campanella GS, Grimm J, Manice LA, Colvin RA, Medoff BD, Wojtkiewicz GR, Weissleder R, Luster AD. Oligomerization of CXCL10 is necessary for endothelial cell presentation and in vivo activity. *J Immunol* 2006; 177: 6991-6998

Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 1997; 30: 57-63

Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006;354:610-621

Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nuñez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 365-398

Cheng K, Wang X, Yin H. Small Molecule Inhibitors of the TLR3/dsRNA Complex. *J Am Chem Soc*. 2011; 133: 3764–3767

Chirinos JA, Heresi GA, Velasquez H, Jy W, Jimenez JJ, Ahn E, Horstman LL, Soriano AO, Zambrano JP, Ahn YS. Elevation of endothelial microparticles, platelets, and leukocyte activation in patients with venous thromboembolism. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1467-1471

Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 2009; 335: 143-151

Cho WG, Albuquerque RJ, Kleinman ME, Tarallo V, Greco A, Nozaki M, Green MG, Baffi JZ, Ambati BK, De Falco M, Alexander JS, Brunetti A, De Falco S, Ambati J. Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 7137-7142

Cole JE, Navin TJ, Cross AJ, Goddard ME, Alexopoulou L, Mitra AT, Davies AH, Flavell RA, Feldmann M, Monaco C. Unexpected protective role for Toll-like receptor 3 in the arterial wall. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:2372-2377

Cornhill JF, Barrett WA, Herderick EE, Mahley RW, Fry DL. Topographic study of sudanophilic lesions in cholesterol-fed minipigs by image analysis. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 415-426

Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, Sydow K, Kleschyov AL, Munzel T. Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 101-111

De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 1998; 329: 653-657

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; 34: 392-401

Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464:1357-1361

Dupont GP, Huecksteadt TP, Marshall BC, Ryan US, Michael JR, Hoidal JR. Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in cultured rat pulmonary endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 89: 197-202

Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbатов R, Robbins CS, Iwamoto Y, Thompson B, Carlson AL, Heidt T, Majmudar MD, Lasitschka F, Etzrodt M, Waterman P, Waring MT, Chicoine AT, van der Laan AM, Niessen HW, Piek JJ, Rubin BB, Butany J, Stone JR, Katus HA, Murphy SA, Morrow DA, Sabatine MS, Vinegoni C, Moskowitz MA, Pittet MJ, Libby P, Lin CP, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature*. 2012; 487:325-329

Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002; 105: 1158-1161

Falk E. Progressive atherogenesis: why do plaques rupture . *Circulation* 1992; 86: 30-42

Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H985-1002

Field AK, Tytell AA, Lampson GP, Hilleman MR. Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967; 58: 1004–1010

Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4: 444-454

Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 2006; 7: 1250-1257

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992; 326: 310-318

Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27: 165-197

Geng Y, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon- γ , tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:19-27

Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*. 2007; 100:607-621

Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001; 88: 167-174

Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 8459-8464

Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987; 316:1371-1375

Grayston JT, Kronmal RA, Jackson LA, Parisi AF, Muhlestein JB, Cohen JD, Rogers WJ, Crouse JR, Borrowdale SL, Schron E, Knirsch C; ACES Investigators. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. *N Engl J Med* 2005; 352: 1637-1645

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-1148

Griendling KK, Ushio-Fukai M. Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med* 1998; 132: 9-15

Guan X, Yang W, Sun X, Wang L, Ma B, Li H, Zhou J. Association of influenza virus infection and inflammatory cytokines with acute myocardial infarction. *Inflamm Res*. 2012;61:591-598

Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res* 2000; 86: E85-90

Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, Mincemoyer R, Prasad A, Waclawiw MA, Nour KR, Quyyumi AA. Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 2002; 106: 653-658

Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuci S. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996: 141-151

Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003; 102: 2660-2669

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099-1103

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303: 1526-1529

Heller EA, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY, Ahluwalia N, Jones K, Koehn SL, Lok VM, Aikawa E, Moore KJ, Luster AD, Gerszten RE. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation* 2006; 113: 2301-2312

Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford." *Clin Chem* 2002; 48: 1819-1827

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593-600

Holland JA, Meyer JW, Chang MM, O'Donnell RW, Johnson DK, Ziegler LM. Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. *Endothelium* 1998; 6: 113-121

Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; 314: 994-997

Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci* 2004; 9: 1118-1135

Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2364-2367

Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 22-27

Hunting CB, Noort WA, Zwaginga JJ. Circulating endothelial (progenitor) cells reflect the state of the endothelium: vascular injury, repair and neovascularization. *Vox Sang* 2005; 88: 1-9

Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:288-293

Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, Oguchi A, Kamitani T, Tsuruya Y, Kano S. Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am J Physiol* 1991; 260: H1713-1717

Imaizumi T, Aratani S, Nakajima T, Carlson M, Matsumiya T, Tanji K, Ookawa K, Yoshida H, Tsuchida S, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Satoh K. Retinoic acid-inducible gene-1 is induced in endothelial cells by LPS and regulates expression of COX-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 292: 274-279

Imaizumi T, Hatakeyama M, Yamashita K, Ishikawa A, Yoshida H, Satoh K, Taima K, Mori F, Wakabayashi K. Double-stranded RNA induces the synthesis of retinoic acid-inducible gene-1 in vascular endothelial cells. *Endothelium* 2005; 12: 133-137

Imaizumi T, Yagihashi N, Kubota K, Yoshida H, Sakaki H, Yagihashi S, Kimura H, Satoh K. Expression of retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) in macrophages: possible involvement of RIG-I in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2007; 14: 51-55

Johnstone J, Loeb M, Teo KK, Gao P, Dyal L, Liu L, Avezum A, Cardona-Munoz E, Sleight P, Fagard R, Yusuf S; Ongoing Telmisartan Alone and in Combination With Ramipril Global EndPoint Trial (ONTARGET); Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE Intolerant Subjects With Cardiovascular Disease (TRANSCEND) Investigators. Influenza vaccination and major adverse vascular events in high-risk patients. *Circulation*. 2012; 126:278-286

Kang DC, Gopalkrishnan RV, Wu Q, Jankowsky E, Pyle AM, Fisher PB. *mda-5*: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 637-642

Kang DC, Gopalkrishnan RV, Lin L, Randolph A, Valerie K, Pestka S, et al. Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, *mda-5*: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene*. 2004; 23:1789–1800

Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*. 2005;23:165-175

Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441: 101-105

Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, Albuquerque RJ, Yamasaki S, Itaya M, Pan Y, Appukuttan B, Gibbs D, Yang Z, Karikó K, Ambati BK, Wilgus TA, DiPietro LA, Sakurai E, Zhang K, Smith JR, Taylor EW, Ambati J. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 2008; 452: 591-597

Kovacsovics M, Martinon F, Micheau O, Bodmer JL, Hofmann K, Tschopp J. Overexpression of Helicard, a CARD-containing helicase cleaved during apoptosis, accelerates DNA degradation. *Curr Biol* 2002; 12: 838-843

Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK. Oxidative stress in cardiovascular disease. *Indian J Biochem Biophys* 2009; 46: 421-440

Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:1859-1867

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011; 473: 317-325

Lindner V, Fingerle J, Reidy MA. Mouse model of arterial injury. *Circ Res* 1993; 73: 792-796

Liu L, Botos I, Wang Y, Leonard JN, Shiloach J, Segal DM, Davies DR. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science* 2008; 320: 379-381

Liu J, Guo YM, Hirokawa M, Iwamoto K, Ubukawa K, Michishita Y, Fujishima N, Tagawa H, Takahashi N, Xiao W, Yamashita J, Ohteki T, Sawada K. A synthetic double-stranded

RNA, poly I:C, induces a rapid apoptosis of human CD34(+) cells. *Exp Hematol.* 2012;40:330-341

Lockette W, Otsuka Y, Carretero O. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 1986; 8: 1161-66

Löffler G, Petrides P. *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer Verlag, 2003

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315: 1046-1051

Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 1985; 315: 672-676

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101: 841-843

Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 2005; 111: 2654-2661

Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Arditi M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10679-10684

Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1213-1219

Montagnier L, Sanders FK. Replicative form of encephalomyocarditis virus ribonucleic acid. *Nature* 1963; 199: 664-667

Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J Clin Invest* 2005; 115: 3149-3156

Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10045-10048

Nemerson Y. Tissue factor: then and now. *Thromb Haemost.* 1995;74:180-184

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91: 2546-2551

Opitz B, Eitel J, Meixenberger K, Suttrop N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb Haemost* 2009; 102: 1103-1109

Opitz B, Hippenstiel S, Eitel J, Suttrop N. Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells. *Thromb Haemost* 2007; 98: 319-326

Opitz B, Schröder NW, Spreitzer I, Michelsen KS, Kirschning CJ, Hallatschek W, Zähringer U, Hartung T, Göbel UB, Schumann RR. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* 2001; 276: 22041-22047

Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003; 4: 161-167

Owens MA, Vall HG, Hurley AA, Wormsley SB. Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000; 243: 33-50

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000 Feb 1;95:952-958

Perros P, Weightman DR. Measurement of cell proliferation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a monoclonal antibody to bromodeoxyuridine. *Cell Prolif* 1991; 24: 517-523

Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 803-815

Poeck H, Wagner M, Battiany J, Rothenfusser S, Wellisch D, Hornung V, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help. *Blood* 2004; 103: 3058-3064

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088

Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. *J Immunol Methods* 1985; 82: 169-179

Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstman LL, Valle M, Aime G, Ahn YS. Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* 2003; 41 211-217

Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries. *Circulation* 2008; 118: 1276-1284

Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; 9: 702-712

Randolph GJ. The fate of monocytes in atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* 2009;7: 28-30

Ranjith-Kumar CT, Murali A, Dong W, Srisathiyannarayanan D, Vaughan R, Ortiz-Alacantara J, Bhardwaj K, Li X, Li P, Kao CC. Agonist and antagonist recognition by RIG-I, a cytoplasmic innate immunity receptor. *J Biol Chem*. 2009 Jan 9;284:1155-1165

Rauscher FM, Goldschmidt-Clermont PJ, Davis BH, Wang T, Gregg D, Ramaswami P, Phippen AM, Annex BH, Dong C, Taylor DA. Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation* 2003; 108: 457-463

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 588-593

Rösen P. Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. *Journal für Kardiologie - Austrian Journal of Cardiology* 2002; 9 : 556-562

Ross, R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 791-804

Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126

Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA. RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 2005; 175: 5260-5268

Rothenfusser S, Hornung V, Ayyoub M, Britsch S, Towarowski A, Krug A, Sarris A, Lubenow N, Speiser D, Endres S, Hartmann G. CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8⁺ T-cell responses in vitro. *Blood* 2004; 103: 2162-2169

Sabatier F, Darmon P, Hugel B, Combes V, Sanmarco M, Velut JG, Arnoux D, Charpiot P, Freyssinet JM, Oliver C, Sampol J, Dignat-George F. Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 2002; 51: 2840-2845

Salaun B, Coste I, Risoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 2006; 176: 4894-4901

Satoh M, Shimoda Y, Maesawa C, Akatsu T, Ishikawa Y, Minami Y, Hiramori K, Nakamura M. Activated toll-like receptor 4 in monocytes is associated with heart failure after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2006; 109: 226-234

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899-1906

Schlee M, Hartmann E, Coch C, Wimmenauer V, Janke M, Barchet W, Hartmann G. Approaching the RNA ligand for RIG-I? *Immunol Rev* 2009; 227: 66-74

Schmidt RF, Lang F, Thews G. *Physiologie des Menschen - mit Pathophysiologie*. Heidelberg: Springer Verlag, 2005

Schoneveld AH, Oude Nijhuis MM, van Middelaar B, Laman JD, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development. *Cardiovasc Res* 2005; 66: 162-169

Shatkin AJ, Manley JL. The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol*. 2000; 7:838-842

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 362-367

Shibamiya A, Hersemeyer K, Schmidt Wöll T, Sedding D, Daniel JM, Bauer S, Koyama T, Preissner KT, Kanse SM. A key role for Toll-like receptor-3 in disrupting the homeostasis balance on endothelial cells. *Blood* 2009; 113: 714-722

Soucy-Faulkner A, Mukawera E, Fink K, Martel A, Jouan L, Nzengue Y, Lamarre D, Vande Velde C, Grandvaux N. Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000930

Stary HC. Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries. *Basic Res Cardiol*. 1994; 89:17-32

Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 2005; 79: 2689-2699

Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2001; 101: 948-954

Takeuchi O, Akira S. Pathogen recognition by innate immunity. *Arerugi* 2007; 56: 558-562

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169: 10-14

Tidswell M, Tillis W, Larosa SP, Lynn M, Wittek AE, Kao R, Wheeler J, Gogate J, Opal SM; Eritoran Sepsis Study Group. Phase 2 trial of eritoran tetrasodium (E5564), a Toll-like receptor 4 antagonist, in patients with severe sepsis. *Critical Care Medicine* 2010; 38: 72-83

Ting JP, Willingham SB, Bergstralh DT. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 372-379

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999; 401: 811-815

Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med* 2004; 14: 318-322

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: E1-7

Vijay-Kumar M, Wu H, Aitken J, Kolachala VL, Neish AS, Sitaraman SV, Gewirtz AT. Activation of toll-like receptor 3 protects against DSS-induced acute colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:856-864

Vita JA, Keaney JF Jr. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk?" *Circulation* 2002; 106: 640-642

Vitale M, Rizzoli R, Mazzotti G, Zamai L, Galanzi A, Rizzi E, Manzoli L, Matteucci A, Papa S. Characterization and cell cycle kinetics of hepatocytes during rat liver regeneration: in vivo BrdUrd incorporation analysed by flow cytometry and electron microscopy. *Cell Prolif* 1991; 24: 331-338

Wang D, Bhagat L, Yu D, Zhu FG, Tang JX, Kandimalla ER, Agrawal S. Oligodeoxynucleotide-based antagonists for Toll-like receptors 7 and 9. *J Med Chem*. 2009;52:551-558

Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, Schmid A, Schieffer B, Böhm M, Nickenig G. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circ Res* 2004; 94: 534-541

Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G. Improvement of endothelial function by systemic transfusion of vascular progenitor cells. *Circ Res* 2006; 99: e74-83

Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. 2011;17:1410-1422

Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* 2003; 93: e17-24

Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Böhm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1567-1572

Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 112-116

Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Schiegl T, Kosiol S, Link A, Walenta K, Nickenig G. Endothelial progenitor cells correlate with endothelial function in patients with coronary artery disease. *Basic Res Cardiol* 2007; 102: 565-571

Wissler RW, Vesselinovitch D. Atherosclerosis--relationship to coronary blood flow. *Am J Cardiol* 1983; 52: 2A-7A

Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001; 104 3103-3108

Yarovinsky F, Hieny S, Sher A. Recognition of *Toxoplasma gondii* by TLR11 prevents parasite-induced immunopathology. *J Immunol* 2008; 181: 8478-8484

Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S, Sher A. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 2005; 308: 1626-1629

Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. *Immunol Rev* 2009; 227: 54-65

Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 2005 175: 2851-2858

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 730-737

Zalba G, Beaumont FJ, San José G, Fortuño A, Fortuño MA, Etayo JC, Díez J. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 35: 1055-1061

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522-1526

Zimmer S, Steinmetz M, Asdonk T, Motz I, Coch C, Hartmann E, Barchet W, Wassmann S, Hartmann G, Nickenig G. Activation of endothelial toll-like receptor 3 impairs endothelial function. *Circ Res*. 2011; 108: 1358-1366

7. Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Georg Nickenig danke ich für die Überlassung des interessanten Themas.

Herrn Dr. med. Sebastian Zimmer danke ich für das Lehren aller vielfältigen Methoden, seinem stets großen Interesse am Fortgang der Arbeit sowie seiner tatkräftigen und fachkundigen Betreuung der Experimente für diese Arbeit.

Herrn Dr. med. Tobias Asdonk danke ich für die stets gute und kollegiale Zusammenarbeit.

Herrn Dr. med. Martin Steinmetz danke ich ebenso für die gute und kollegiale Zusammenarbeit.

Bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors für molekulare Kardiologie bedanke ich mich für das gute Klima sowie die einander stets unterstützende Zusammenarbeit.