

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie

Direktorin: Prof. Dr. med. Gabriele Nöldge-Schomburg

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

**Der Toll-like Rezeptor 2 moduliert Endothelzellfunktionen und
Gefäßneubildungsprozesse:
Bedeutung der Interaktion des TLR2 mit dem SDF-1/CXCR4 System**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Bierhansl, Laura

aus Wolfen

Rostock 2014

Dekan

Prof. Dr. med. E. Reisinger

Dekan: Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: PD Dr. med. habil. Jan P. Roesner, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Klinikum Südstadt Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Institut für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Patrick Meybohm, Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie, Universität Frankfurt

Datum der Einreichung: 28. März 2014

Datum der Verteidigung: 24. September 2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das angeborene Immunsystem und die Rolle der Toll-like Rezeptoren.....	1
1.2. Die Rolle und Funktion des Toll-like Rezeptors 2 für die vaskuläre Homöostase	3
1.3. Der angiogene Prozess.....	6
1.4. Hämatopoetische Stammzellen und ihre Bedeutung für Neovaskularisationsprozesse	7
1.5. Das SDF-1/CXCR4 System in Angiogenese und Stammzellrekrutierung	8
1.6. Der Toll-like Rezeptor 2 interagiert mit dem SDF-1 Rezeptor CXCR4	10
1.7. Ziele der Arbeit.....	12
2. Methoden und Materialien	13
2.1. Zellen	13
2.1.1. Zellkultur humaner Endothelzellen	13
2.1.2. Isolation CD117 positiver Stammzellen aus der Maus.....	14
2.1.2.1. Knochenmarkisolation.....	14
2.1.2.2. Magnetisch unterstützte Stammzellisolation	15
2.2. Versuchstiere	16
2.2.1. Wildtyp Mäuse.....	17
2.2.2. TLR2-Knock out Mäuse.....	17
2.3. <i>In vitro</i> Versuche	18
2.3.1. Matrigel-Angiogenese-Modell.....	18
2.3.2. Migrations-Modell.....	19
2.3.3. Sphäroid-Angiogenese-Modell	20
2.4. Durchflusszytometrie.....	22
2.5. Western Blot	23
2.5.1. Herstellung des Zelllysats.....	23
2.5.2. Bestimmung der Proteinmenge	24
2.5.3. Immunoblot	24

2.6. Immunpräzipitation	26
2.7. Transfektion mit siRNA.....	27
2.8. <i>In vivo</i> Versuche.....	28
2.8.1. Hinterlaufischämie-Modell	28
2.8.1.1. <i>Ligatur der Arteria femoralis</i>	28
2.8.1.2. <i>Systemische Antikörperapplikation</i>	29
2.8.1.3. <i>Wärmebildaufnahmen</i>	29
2.8.1.4. <i>Entnahme des M. gastrocnemius</i>	30
2.8.1.5. <i>Immunhistochemie</i>	31
2.8.2. Matrigel-Plug-Angiogenese-Modell.....	31
2.8.2.1. <i>Injektion des Matrigels und Entnahme des Matrigel Plugs</i>	31
2.8.2.2. <i>Färbung und Auswertung der Matrigel Plugs</i>	32
2.9. Statistische Auswertung	32
3. Ergebnisse	34
3.1. Eine TLR2 Defizienz hat proangiogene Effekte im Hinterlaufischämiemodell 34	
3.1.1. Eine TLR2 Defizienz führt zu einer verbesserten Perfusion im Hinterlauf nach Ischämie.....	34
3.1.2. TLR2-defiziente Mäuse haben mehr funktionelle Kapillaren nach Ischämie als Wildtypmäuse.....	36
3.2. Hämatopoetische Stammzellen aus TLR2-defizienten Tieren haben proangiogene Effekte im <i>in vivo</i> Modell	38
3.2.1 Die Injektion TLR2-defizienter Knochenmarkstammzellen in Wildtyp Tiere resultiert in verstärkter ischämie-induzierter Angiogenese.....	39
3.2.2. TLR2-defiziente Stammzellen bilden mehr Netzwerke im Matrigel-Plug- Angiogenese-Modell	42
3.3. Die hämatopoetischen Stammzellen haben proangiogene Effekte auf ausdifferenzierte Endothelzellen.....	44
3.3.1. TLR2-defiziente Stammzellen unterstützen Endothelzellen bei der Netzwerkbildung im Matrigel-Angiogenese-Modell.....	44
3.3.2. Die dreidimensionale Sprossung von Endothelzellen wird durch TLR2- defiziente Stammzellen gefördert	46

3.3.3. Die Migration von Endothelzellen ist durch Ko-Inkubation mit TLR2-defizienten Stammzellen verbessert	47
3.3.4. TLR2-defiziente Stammzellen zeigen eine vermehrte Aktivierung der MAP-Kinase AKT	48
3.4. Die ischämie-induzierte Angiogenese wird durch die Injektion von TLR2-blockierenden-Antikörpern verstärkt	50
3.5. TLR2-blockierende-Antikörper haben einen proangiogenen Effekt auf Endothelzellen	53
3.5.1. TLR2-blockierende-Antikörper haben einen positiven Effekt auf die Netzwerklänge im Matrigel-Angiogenese-Modell.....	53
3.5.2. Die Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern hat einen stimulierenden Effekt auf die Sprosslänge von Endothelzellen.....	55
3.5.3. TLR2-blockierende-Antikörper stimulieren die Migration von Endothelzellen	57
3.5.4. Die TLR2 Stimulation hat keine Effekte im Matrigel-Angiogenese-Modell	58
3.6. TLR2-blockierende-Antikörper führen zu einer Aktivierung des SDF-1 vermittelten Signalwegs.....	59
3.6.1. Die TLR2-blockierenden-Antikörper aktivieren den MAP-Kinasen Signalweg	59
3.6.2. Eine TLR2 Stimulation aktiviert den Signalweg der MAP-Kinasen nicht ..	62
3.6.3. Die Inhibition von ERK1/2 und AKT führt zu einer Unterdrückung des proangiogenen Effekts der TLR2-blockierenden-Antikörper	64
3.7 Die Interaktion zwischen dem TLR2 und dem SDF-1 Rezeptor CXCR4	65
3.7.1. Die Blockade von CXCR4 hat keine Auswirkung auf die proangiogene Wirkung der TLR2-blockierenden-Antikörper <i>in vitro</i>	65
3.7.2. CXCR4 wird in der Vermittlung der proangiogenen TLR2-blockierenden-Antikörper-induzierten Effekte benötigt	66
3.7.3. Die Unterdrückung des CXCR4 führt zu einer Inhibition der TLR2-blockierenden-Antikörper-vermittelten ERK1/2 Aktivierung	68
3.7.4 Die Inhibition des G _i -Proteins führt zu einer Unterdrückung des proangiogenen Effekts der TLR2-blockierenden-Antikörper	69

3.7.5. TLR2-blockierende-Antikörper verändern die Expression des CXCR4 im Western Blot nicht	70
3.7.6. Die Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern führt zu einer Interaktion des CXCR4 und dem TLR2	71
3.7.7. Die Stimulation mit TLR2 Liganden führt nach einer Immunpräzipitation nicht zu einer Interaktion mit CXCR4.....	72
4. Diskussion.....	74
4.1. Eine TLR2-Defizienz geht mit proangiogenen Effekten nach Ischämie einher	74
4.2. Hämatopoetische cKit positive Stammzellen wirken proangiogen <i>in vivo</i>	75
4.3. Hämatopoetische cKit positive Stammzellen unterstützen die Endothelzellen in dem Prozess der Angiogenese	77
4.4. Die Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern hat einen protektiven Effekt nach Ischämie im Hinterlaufischämiemodell	80
4.5. TLR2-blockierende-Antikörper stimulieren Endothelzellen hinsichtlich ihres angiogenen Potentials	81
4.6. Der proangiogene Effekt der TLR2-blockierenden-Antikörper ist durch eine Interaktion zwischen dem TLR2 und dem CXCR4 vermittelt.....	82
5. Zusammenfassung.....	85
6. Literaturverzeichnis	87
7. Anhang.....	96
7.1. Abbildungsverzeichnis.....	96
7.2. Tabellenverzeichnis	97
7.3. Abkürzungsverzeichnis	98
7.4. Danksagung	100
7.5. Thesen zur Dissertation	101

1. Einleitung

1.1. Das angeborene Immunsystem und die Rolle der Toll-like Rezeptoren

Das System zum Schutz und zur Abwehr vor äußeren Einflüssen, das unserem Körper zur Verfügung steht, ist sehr komplex und hat sich im Laufe der Evolution immer besser angepasst. Die Entstehung von Krankheiten beruht zu großen Teilen auf einem Ungleichgewicht des Körpers zwischen Immunität und Toleranz. Dabei versteht man die Immunität als die Fähigkeit unseres Organismus, eine kontrollierte Immunantwort bezüglich Körperfremdem zu generieren. Die Toleranz beschreibt die Eigenschaft des Körpers, die Immunantwort gegenüber körpereigenen Stoffen zu hemmen. Um dieses Gleichgewicht zu gewährleisten, haben sich zwei Systeme in unserem Immunsystem entwickelt. Zum einen das angeborene Immunsystem und zum anderen das evolutionär jüngere, adaptive, erworbene Immunsystem. Jedoch agieren die beiden Systeme bei der Erkennung und Beseitigung von pathogenen Faktoren oft gemeinsam und sind daher nie klar voneinander zu trennen.

Das angeborene Immunsystem liefert die erste, unmittelbare Immunantwort. Bereits nach wenigen Sekunden werden Erreger erkannt, angegriffen und eliminiert. Im Gegensatz zum adaptiven kann das angeborene Immunsystem jedoch kein „Gedächtnis“ entwickeln und reagiert auf denselben pathogenen Reiz immer mit derselben Antwort. Die einzelnen Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind in unseren Genen angelegt und von Geburt an in unserem Körper aktiv. Janeway beschrieb in seinem Modell, dass infektiöse „non-self“ Substanzen die Initiatoren für die Immunantwort sind [Janeway C und Murphy KP 2009]. Die als körperfremd erkannten mikrobentypischen Markermoleküle werden als sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet und sind Strukturen, die unser Körper als fremd erkennt. Dazu gehören zum Beispiel bakterielle Bestandteile wie Lipopolysaccharide und Peptidoglykane aus der Zellwand extrazellulärer Erreger oder DNA-Sequenzen von intrazellulären Erregern. Die PAMPs werden durch Membranrezeptoren, die pattern-recognition receptors (PRRs), erkannt [Janeway C 1989].

Zu diesen PRRs gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR). Bis heute wurden dreizehn verschiedene Toll-like Rezeptoren in der Maus und elf im Menschen detektiert und es ist bekannt, dass ihnen eine entscheidende Rolle in der Immunantwort zukommt [Dunne A 2005]. 1996 konnte einem Toll-like Rezeptor erstmalig ein spezifisches Allel auf einem Chromosom zugeordnet werden. Dadurch wurde erwiesen, dass die Toll-like Rezeptoren zu den ältesten Bestandteilen unseres Immunsystems gehören [Taguchi T 1996]. Die Toll-like Rezeptoren sind transmembranäre Rezeptoren, welche auf dendritischen Zellen, Zellen des Immunsystems, des Blutsystems und auf vielen weiteren Zelloberflächen zu finden sind. Weiterhin wurden sie auch auf Endothelzellen detektiert [Fritzner 2008]. Die Liganden (PAMPs) der Toll-like Rezeptoren sind vielseitig, darunter sind bakterielle Zellwandbestandteile, bakterielle DNA Fragmente, fungale, parasitäre oder virale Produkte und synthetische Analoga von natürlichen Produkten (**Abbildung 1**).

Toll-like Rezeptoren kommt neben ihrer immunologischen Bedeutung im Detektieren von äußeren pathogen-assoziierten Molekülen auch eine Rolle bei der Erkennung von körpereigenen Stoffen zu. Diese Liganden werden als danger-associated molecular pattern (DAMPs) bezeichnet, welche von sterbenden und zerfallenden Zellen freigesetzt werden. Diese endogenen Liganden der Toll-like Rezeptoren werden zum Beispiel bei zellulärem Stress oder im Rahmen von ischämischen Perfusionsstörungen ausgeschüttet. Es konnte gezeigt werden, dass es bei einem Gewebeschaden zur Freisetzung von Hitzeschockproteinen (Hsp70/Hsp60) kommt. Diese Moleküle agieren als Warnsignale im Körper und führen über eine Bindung an den Toll-like Rezeptor 2 zu einer Aktivierung des Immunsystems [Vabulas RM 2002]. Als ein weiterer endogener Ligand des Toll-like Rezeptors 2 wurde das High Mobility Group Protein B1 (HMGB1) beschrieben. Das HMGB1 wird bei traumatischen Schäden oder zellulären Stress freigesetzt und führt zu einer Aktivierung des Toll-like Rezeptors 4 und des Toll-like Rezeptors 2, wodurch es zu einer Rekrutierung von Leukozyten kommt [Venereau E 2012; Curtin FJ 2009]. Es wurde weiterhin beschrieben, dass die Gewebebestandteile Hyaluron oder Heparansulfat im Rahmen von Gewebeschäden, Infektionen oder auch Gewebeumbau freigesetzt werden. Diese können ebenfalls als endogene Liganden des Toll-like Rezeptors 4 agieren und somit das Immunsystem dahingehend stimulieren, dass sterbende oder geschädigte Zellen eliminiert werden [Johnson GB 2002; Termeer C 2002]. Es wurde

gezeigt, dass auch schon kleinere Teile der Hyaluronsäure zu einer Aktivierung des Toll-like Rezeptors 2 führen und es damit zu einer verstärkten Antwort von T-Zellen kommt [Scheibner KA 2006].

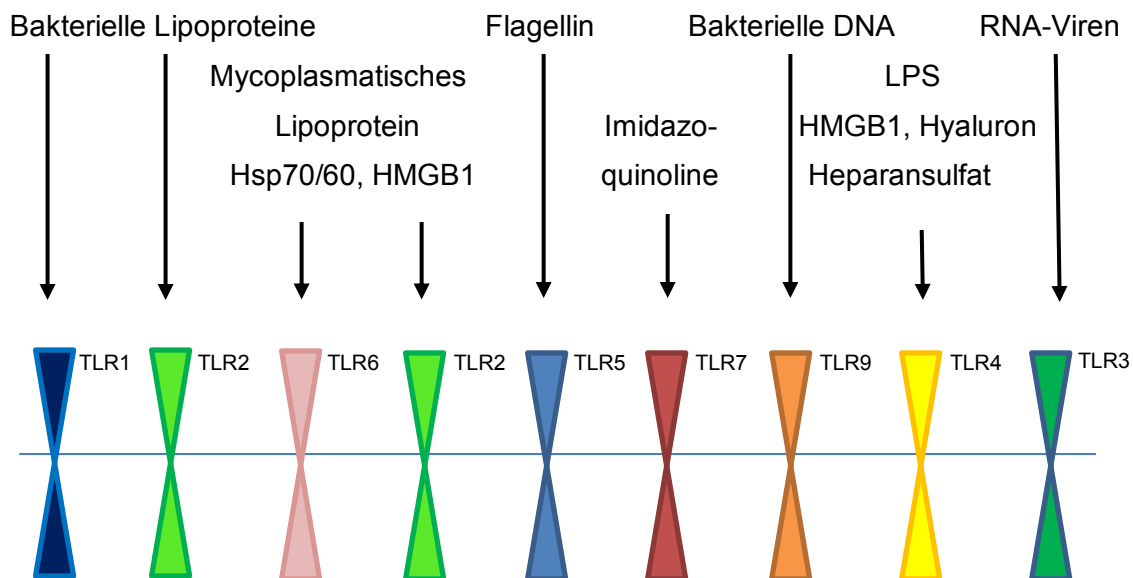


Abbildung 1: Die verschiedenen Toll-like Rezeptoren und deren Liganden

Darstellung modifiziert nach Takeda K 2004.

Damit wird deutlich, dass die Toll-like Rezeptoren vermutlich eine weitaus größere Rolle in unserem Körper einnehmen als bisher vermutet. Die Erkennung von endogenen Molekülen durch Toll-like Rezeptoren und der daraus folgende inflammatorische Prozess sowie die immunologische Antwort könnten ein wichtiger Bestandteil von physiologischen, immunologischen und pathologischen Vorgängen sein. Es wurde zum Beispiel beschrieben, dass arteriosklerotische Veränderungen mit vermehrter Expression von Hitzeschockproteinen (Hsp70/Hsp60) einhergehen. Die Induktion der Hitzeschockproteine führt zur Immunantwort über den Toll-like Rezeptor 4 und damit zur entzündlichen Veränderung an der Gefäßläsion und fördert somit die Entstehung von arteriosklerotischen Plaques [Xu Q 2002].

1.2. Die Rolle und Funktion des Toll-like Rezeptors 2 für die vaskuläre Homöostase

Die Rolle der Toll-like Rezeptoren wird auch maßgeblich über ihre Lokalisation in unserem Körper bestimmt. Die Expression des Toll-like Rezeptors 2 (TLR2) auf

Endothelzellen lässt vermuten, dass dem Rezeptor außerhalb seiner Funktion im Immunsystem auch im Zusammenhang mit der vaskulären Homöostase und der Endothelzellfunktion eine wichtige Rolle zu Teil kommen könnte [Fan J 2003]. Die vaskuläre Homöostase ist ein Gleichgewicht in unserem Gefäßsystem, welches durch die Funktion der Endothelzellen gewährleistet wird. Einerseits fungieren sie als Sensoren für hämodynamische Blutströmungen und im Blut zirkulierende Signale und andererseits reagieren sie als Effektoren mit der Freisetzung vasoaktiver Substanzen. Die Endothelzellen werden durch verschiedenste Faktoren beeinflusst, darunter Neurotransmitter aus dem autonomen Nervensystem, im Blut zirkulierende vasoaktive Substanzen und vom Gewebe gebildete Metabolite. Das Gleichgewicht der Endothelfunktion kann aber auch durch pathogene Moleküle beeinträchtigt werden. Solche Moleküle, ob nun körpereigen oder körperfremd, können durch den TLR2 erfasst werden, was zur Ausbildung einer Immunantwort führt. Dadurch wird deutlich, dass der TLR2 ebenfalls mitverantwortlich für die vaskuläre Homöostase und die Funktion der Endothelzellen sein könnte. Der TLR2 erkennt ein weites Spektrum an körperfremden pathologischen Molekülen (PAMPs). Dazu zählen Peptidoglykane, die Lipoteichonsäure (LTA), Lipoarabinomannan von Mykobakterien, Lipoproteine aus Gram negativen Bakterien und Zymosane aus Hefen [Faure E 2001]. Die Breite des Erkennungsspektrums des TLR2 wird durch die Kooperation mit dem TLR1 und TLR6 noch erweitert [Ozinsky A 2000]. Auch Stoffe, die durch Gewebeschäden oder Stress im Körper freigesetzt werden, können den TLR2 aktivieren. Hierzu zählen zum Beispiel das HGMB1, die HSP60/70 und die Hyaluronsäure [Venereau E 2012, Vabulas RM 2002, Scheibner KA 2006].

Diese entscheidende Rolle als Schnittstelle zwischen Immunsystem und vaskulärer Homöostase lässt vermuten, dass eine Beeinträchtigung oder Stimulation des TLR2 auch Auswirkung auf die endotheliale Funktion haben könnte. Die Aktivierung des TLR2 führt zu einer Immunreaktion, welche zu einer endothelialen Dysfunktion führen kann und sich somit störend auf die vaskuläre Homöostase auswirkt [Frantz S 2007]. Ein protektiver Einfluss einer TLR2 Defizienz könnte daher mit einer abgemilderten Immunantwort assoziiert sein, wobei es zum Beispiel zu einer verringerten Leukozytenaktivität kommt [Lin E 2009]. Eine chronische Inflammation durch die Aktivierung des TLR2 hat somit auch Einfluss auf Krankheiten, welche mit vaskulären Störungen in Verbindung mit Entzündung und Autoimmunität assoziiert sind, wie z.B.

der Atherosklerose [Mullick AE 2008], der Ischämie und Reperfusionstörungen [Arumugam TV 2009] und den Vaskulitiden [Soylu A 2010].

Daher wurde die Auswirkung einer TLR2 Defizienz hinsichtlich dieser Erkrankungen mehrfach untersucht. Favre et al. konnten in einer Studie zu Ischämie und Reperfusionstörungen zeigen, dass TLR2-defiziente (TLR2^{-/-}) Mäuse im Rahmen eines murinen koronaren Ischämie-Reperfusion-Modells, eine kleinere myokardiale Infarktgröße und einen besseren Erhalt der koronare endothelialen Funktion aufweisen [2007]. Weiterhin kommt dem TLR2 eine entscheidende Rolle im Rahmen der Atherosklerose zu, denn es wurde gezeigt, dass eine TLR2 Defizienz in Atherosklerose-empfindlichen low density lipoprotein receptor (Ldlr)^{-/-} Mäusen mit der Protektion vor dem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert ist [Mullick AE 2008]. Auch bei einer zerebralen Ischämie scheint die Abwesenheit des TLR2 von Bedeutung zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass TLR2^{-/-} Mäuse nach einer einstündigen, transienten fokalen Ischämie ein verringertes Infarktvolumen im Gehirn aufwiesen als Wildtypiere [Ziegler G 2011]. All diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine TLR2 Defizienz die Ausdehnung der endothelialen Dysfunktion begrenzen könnte, indem sie die inflammatorische Reaktion unterdrückt und dadurch den Schaden im Gewebe einschränkt [Kanzler H 2007].

In diesem Zusammenhang wird auch der Einsatz von TLR2-blockierenden-Antikörpern im Rahmen der Therapie vaskulärer Erkrankungen bereits diskutiert [Frantz S 2007]. Arslan F et al. konnten zeigen, dass schon eine einzige Injektion von TLR2-blockierenden-Antikörpern die myokardiale Infarktgröße reduzieren kann [2010]. Außerdem zeigte eine Forschungsgruppe aus Japan auf, dass das Apolipoprotein CIII, ein Warnsignal bei Ausbreitung eines Gewebeschadens nach einem Herzinfarkt, mit der Aktivierung von Monozyten assoziiert ist. Diese Aktivierung fand bei TLR2-defizienten Mäusen im Gegensatz zu Wildtypmäusen nicht mehr statt und es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von TLR2-blockierenden-Antikörpern ebenfalls zur Unterdrückung von inflammatorischen Signalen führt [Kawakami A 2008]. Auch Meng et al. gelang es, den TLR2-Signalweg mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (T2.5) zu blockieren. Sie waren in der Lage, einen septischen Schock bei Wildtypmäusen zu unterdrücken, der durch eine Hyperaktivierung von Immunzellen hervorgerufen wurde [2005]. Weiterhin konnte

eine Forschungsgruppe zeigen, dass eine Injektion von TLR2-blockierenden-Antikörpern nach einer kardiopulmonalen Reanimation bei Mäusen zu einer verbesserten Überlebensrate und verbesserten neurologischen Ergebnissen führt [Bergt S 2013]. TLR2-blockierende-Antikörper könnten somit eine neue therapeutische Möglichkeit in Rahmen von vielen vaskulären und immunologisch assoziierten Erkrankungen sein [Lin E 2009]. Die Effekte von TLR2-blockierenden-Antikörpern auf die endotheliale Funktionen sind jedoch bislang noch nicht untersucht.

1.3. Der angiogene Prozess

Eine wesentliche Funktion von Endothelzellen ist die Neubildung kleinster Gefäße. Dieser sogenannte „angiogene Prozess“ ist definiert als das Wachstum von Blutgefäßen durch Aussprossung und Teilung der Endothelzellen aus bereits vorhandenen Gefäßen. So kommt es zur Entstehung neuer Kapillaren (Angiogenese). Eine bedeutende Rolle kommt der Angiogenese im Rahmen von Wundheilung und Reparaturprozessen zu, wie zum Beispiel das Ausbilden von Kollateralkreisläufen in ischämischen Geweben. Der Begriff der Angiogenese wurde erstmalig 1935 im Zusammenhang mit der Bildung von Gefäßen im Rahmen der Plazentaentwicklung beschrieben. Später erkannte man im Rahmen der Erforschung der Tumorentstehung, dass die Angiogenese ein mehrstufiger Prozess der Gefäßneubildung ist.

Im Rahmen der Angiogenese sind die Kapillaren des Gefäßsystems die Hauptakteure. Kapillaren bestehen aus Endothelzellen, umliegenden Perizyten und Matrixbestandteilen. Eine Grundvoraussetzung für den Prozess der Angiogenese ist die Fähigkeit von Endothelzellen zur Proliferation, Migration und Invasion. Diese Teilprozesse werden durch angiogene Faktoren, zum Beispiel VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), welcher in ischämischen Geweben vermehrt gebildet wird, stimuliert. Durch Proteinasen, Kollagenasen und Metalloproteinasen werden zunächst bindegewebige Strukturen in der Umgebung der Kapillaren lysiert. Dadurch haben Endothelzellen die Möglichkeit, in das umliegende Gewebe zu migrieren und auszusprossen. Die Endothelzelle agiert somit als Schnittstelle zwischen vaskulärer Homöostase, Angiogenese und dem Erhalt der Organperfusion [Hack CE 2001].

1.4. Hämatopoetische Stammzellen und ihre Bedeutung für Neovaskularisationsprozesse

Auch wenn im Rahmen der Angiogenese neue Gefäße im adulten Organismus primär durch die Sprossung und Migration von bereits vorhandenen Endothelzellen gebildet werden, so haben neuere Studien gezeigt, dass auch hämatopoetische Stammzellen diesen angiogenen Prozess maßgeblich mit unterstützen [Kalka C 2000]. Im Rahmen der Gefäßneubildung und Wundheilung ist die Mobilisation dieser körpereigenen Stammzellen aus dem Knochenmark von enormer Bedeutung [Asahara T 2004].

Um diese vaskulär aktiven Stammzellen zu charakterisieren, wird die Detektion von den für diese Stammzellen spezifischen Oberflächenmolekülen genutzt. Ein wichtiger Marker für Stamm- und Progenitorzellen ist das CD 117 Antigen, welches auch als „stem cell factor receptor“ (SCFR) oder cKit-Protein bezeichnet wird. Knochenmarkstammige CD117-positive Zellen zeigen eine vermehrte Proliferation und Differenzierung zu Endothelzellen und eine vermehrte Bildung von angiogenen Faktoren (z.B. VEGF) im Vergleich zu CD117-negativen Zellen. In einem Hinterlaufischämiemodell in der Maus führt die Injektion von CD117-positiven Zellen zu vermehrter Kapillarbildung und erhöhter Perfusion in den Hinterläufen als durch die Injektion von CD117-negativer Zellen [Li TS 2003]. Dies zeigt, dass der Oberflächenmarker CD117 besonders auf angiogen potenten Stammzellen ausgebildet ist. In einer weiteren Studie zum Hinterlaufischämiemodell konnte gezeigt werden, dass frisch implantierte CD117-positive Zellen zu einer verstärkten Durchblutung des betroffenen Beines und einer vermehrten Bildung von Mikrogefäßen führen als die Injektion von CD117-positiven *ex vivo* expandierten Zellen [Li TS 2003]. Die Kapazität dieser Stammzellen wurde in einem Matrigel-Plug-Modell von Fang et al demonstriert, indem sie zeigen konnten, dass eine einzelne CD117-positive isolierte Stammzelle in einem Matrigelbett in der Maus in der Lage war, ein vollständig funktionsfähiges Gefäß zu generieren. Im Weiteren konnten sie zeigen, dass eine genetische Defizienz von CD117 in der Maus in einer reduzierten Angiogenese und einem reduzierten Tumorwachstum resultiert [Fang S 2012]. Eine weitere Gruppe konnte zeigen, dass mesenchymale Stammzellen mit angiogenem Potential in der Lage sind, röhrenartige Strukturen in einem Matrigel-Versuch zu

bilden und in kürzester Zeit zu Endothelzellen zu differenzieren. *In vivo* wurde dargestellt, dass es in einem Modell zur peripheren Verschlusskrankheit (pAVK) durch die Integration von Stammzellen zu einer vermehrten Bildung von Kollateralen kommt und somit der Blutfluss in den geschädigten Hinterläufen gesteigert werden kann [Huss R 2004]. Das therapeutische Potential von Stammzellen hinsichtlich der Verringerung von Schäden nach einem Myokardinfarkt wird zurzeit untersucht: Orlic et al. zeigten in einem murinen *in vivo* Modell, dass es durch eine Mobilisation von CD117-positiven Knochenmarkzellen zu einer reduzierten Mortalität nach einem Myokardinfarkt kommt. Weiterhin konnten sie darstellen, dass die Knochenmarkzellen eine vermehrte Reparatur der entstandenen Schäden induzieren und somit die Funktionalität nach Myokardinfarkt erhöht ist [2001]. Dies lässt den Schluss zu, dass das therapeutische Potential von Zelltransplantationen mit Stammzellen vielversprechend für Patienten mit vaskulären Erkrankungen sein könnte [Rafii S 2003]. Inwiefern die günstigen Effekte einer TLR2 Defizienz für die vaskuläre Homöostase jedoch über hämatopoetische Stammzellen vermittelt sein könnte, ist bislang nicht untersucht worden.

1.5. Das SDF-1/CXCR4 System in Angiogenese und Stammzellrekrutierung

In der Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen spielt der Stromal cell-derived Factor-1 (SDF-1, CXCL12), ein Chemokin der CXC-Familie, eine besondere Rolle. Wenn ein Gewebe unter Sauerstoffmangel leidet und ischämisch wird, kommt es über die Induktion des Hypoxie-induzierten Faktors-1 (HIF-1) zu einer vermehrten Expression des SDF-1. Dies führt über die Bindung des SDF-1 an seinen Rezeptor, den CXCR4, auf den zirkulierenden Stammzellen zu einer Steigerung der Adhäsion und der Migration dieser Zellen in das ischämische Gewebe. Weiterhin führt die Aktivierung des CXCR4 zur Mobilisierung von weiteren Stammzellen aus dem Knochenmark, die sogenannten Rekrutierung [Ceradini PJ 2004]. SDF-1 führt jedoch nicht nur zu einer Mobilisierung der Stammzellen, sondern ist auch ein Stimulator für die Ausdifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu Endothelzellen [Tang J 2009]. Des Weiteren kommt SDF-1 im Rahmen der Angiogenese eine entscheidende Rolle zu. Durch die Stimulation von Endothelzellen durch SDF-1 kommt es *in vitro* zu einer vermehrten Zellproliferation, Migration und zur vermehrten

Bildung von kapillarähnlichen Strukturen [Kuhlmann CRW 2005]. Auch scheint SDF-1 einen protektiven Einfluss hinsichtlich der Apoptose von Endothelzellen zu haben. Diese Wirkung auf Endothelzellen kann auch im lebenden Organismus nachvollzogen werden. Die subdermale Injektion eines Matrigel-SDF-1 Gemisches führt zu der Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen in einer Extrazellulärmatrix. Dies zeigt auf, dass SDF-1 die Angiogenese und Reparaturmechanismen im ischämischen Gewebe, sowohl durch die Rekrutierung von Stammzellen, aber auch durch einen direkten Einfluss auf die Endothelzellen, positiv beeinflusst [Ho TK 2012; Kryczek I 2005].

Die Bindung des SDF-1 an seinen Rezeptor CXCR4 ist ein zweisechrittiger Prozess. Zunächst wird der CXCR4 durch die Internalisierung des SDF-1 aktiviert. Durch diese Internalisierung kommt es zur Aktivierung des G_i-Proteins. Der weitere Signalweg führt über verschiedenste G-Proteine und mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinase). MAP-Kinasen sind Teil der intrazellulären Signaltransduktionswege und sind an vielen Funktionen der Zelle wie Differenzierung, Apoptose und Proliferation beteiligt. Die grundlegende Funktionsweise von MAP-Kinasen besteht aus der Aktivierung von drei hintereinandergeschalteten Kinasen. Die typische Signaltransduktion (**Abbildung 2**) des SDF-1 α führt über die Aktivierung der Proteinkinase B (AKT), der extrazellulär-signal-regulierten Kinase (ERK1/2) und der Inhibition der p38-mitogen-aktivierten Proteinkinase (p38) [Ho TK 2012]. AKT ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie der Proliferation, dem Stoffwechsel oder dem Zellzyklus beteiligt. Die Aktivierung von ERK1/2 wird als klassische mitogene Kaskade bezeichnet, da sie durch Wachstumsfaktoren stimuliert wird und zur Mitose führt [Vlahakis SR 2002; Ganju RK 1998]. Die p38 ist ebenfalls eine mitogen-aktivierte Kinase welche anti-proliferativ wirkt.

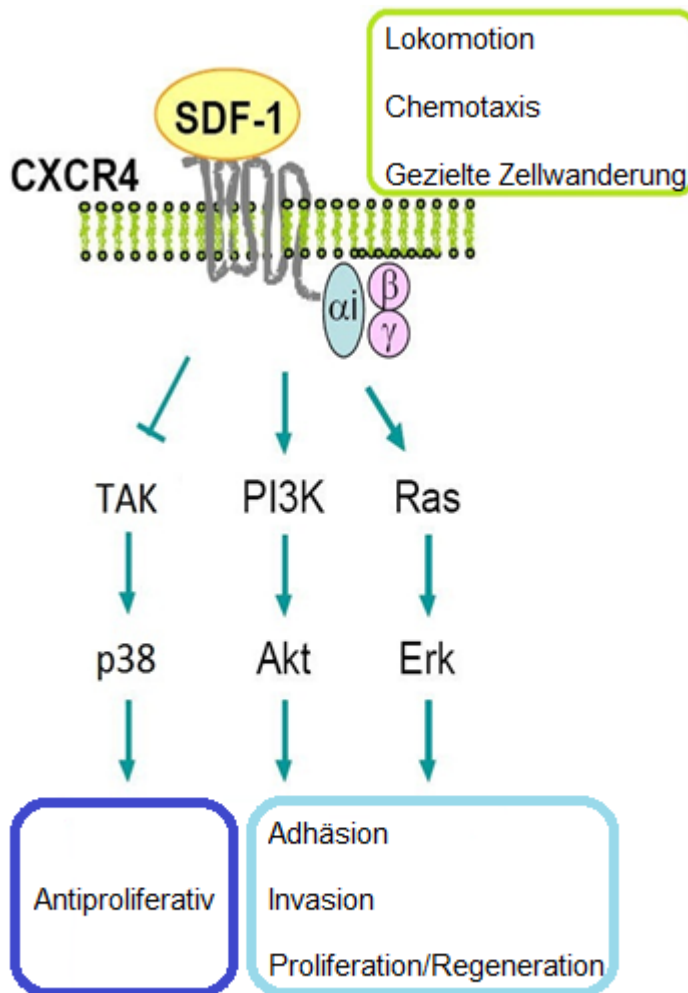


Abbildung 2: Übersicht der Signaltransduktionswege des SDF-1

SDF-1-induzierte Signaltransduktion über CXCR4. Bild modifiziert nach Shim H 2009.

1.6. Der Toll-like Rezeptor 2 interagiert mit dem SDF-1 Rezeptor CXCR4

Im Rahmen ihrer immunologischen Funktion gehen Toll-like Rezeptoren (TLR) viele Interaktionen mit anderen Rezeptoren ein. Der TLR4 zum Beispiel agiert mit dem Protein aktivierten Rezeptor 2 (PAR2) im Rahmen der aortalen Vasodilatation um eine vaskuläre Homöostase in einer Entzündungssituation aufrecht zu erhalten [Bucci M 2012].

Auch für den TLR2 konnten verschiedenen Interaktionen mit anderen Rezeptoren gezeigt werden. Um z.B. Lipopolysaccharide (LPS) zu erkennen, interagiert der TLR2 mit dem Glykoprotein CD14, was zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB

führt [Kanaya S 2009]. Schmid et al. konnten zeigen, dass die Migration von angehenden dendritischen Progenitorzellen im Lymphknoten abhängig von der durch TLR2 aktivierten CXCR4-Herunterregulation ist [2011]. Auch ein pathogenes Bakterium der Parodontitis macht sich die Interaktion dieser Rezeptoren bei der Invasion des Wirts zu Nutze, indem es durch seine Fimbrien einen TLR2-CXCR4 Cross-talk induziert und somit das Immunsystem umgeht [Hajishengallis G 2008].

Auch die Pathogenese von Tumoren wird durch eine TLR2-CXCR4 Interaktion beeinflusst. Dabei zeigt sich, dass der von vielen Tumoren exprimierte pankreatische Adenokarzinom hochregulierende Faktor (PAUF) über einen TLR2-CXCR4 Rezeptor Cross-talk zu einer Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 und einer Unterdrückung des NF κ B Signals führt, was dem Tumor einen entscheidenden Vorteil hinsichtlich seines Tumorwachstums gibt [Park HD 2011].

All dies gibt erste Hinweise darauf, dass es eine Interaktion zwischen dem TLR2 und dem CXCR4 geben könnte, welche eine Rolle im Rahmen von Angiogenese und Endothelzellenfunktion spielen könnte.

1.7. Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit eine TLR2 Defizienz den angiogenen Prozess beeinflusst und somit einen günstigen Effekt auf die vaskuläre Homöostase haben könnte. Des Weiteren sollte überprüft werden, inwiefern diese Effekte durch Applikation von TLR2-blockierende-Antikörpern nachvollzogen werden können und welcher molekulare Mechanismus diesen ggf. therapeutisch nutzbaren Effekten in Endothelzellen zugrunde liegt.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- Wirkt sich eine TLR2 Defizienz durch Einfluss auf den angiogenen Prozess protektiv auf einen *in vivo* durch ischämie-induzierten Gewebeschaden aus? Kommt es zu einer verbesserten Kapillarisation und damit Reperfusion und Regeneration nach dieser Ischämie?
- Könnte dieser Effekt durch hämatopoetische Stammzellen vermittelt sein? Führt eine Behandlung von Wildtyp-Tieren mit TLR2-defizienten Stammzellen zu einer Verbesserung der post-ischämischen Reperfusion und Kapillarisation?
- Welche Effekte haben TLR2-defizienten Stammzellen auf die angiogenen Eigenschaften ausdifferenzierter Endothelzellen *in vitro*?
- Kann ein protektiver Effekt durch TLR2 Defizienz durch TLR2-blockierende-Antikörper nachvollzogen werden? Wie wirkt sich eine Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern auf die Reperfusion und Regeneration des Gewebes nach einer Ischämie aus und welchen Effekt hat dieser auf Endothelzellen?
- Könnte dem CXCR4 als möglichem Cross-talk Partner des TLR2 eine Bedeutung in der Vermittlung proangiogener Effekte der TLR2-blockierenden-Antikörper zukommen?

2. Methoden und Materialien

2.1. Zellen

2.1.1. Zellkultur humaner Endothelzellen

Die Arbeit mit venösen Nabelschnurendothelzellen (Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) C-12200, Promocell, Heidelberg, Deutschland) erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden für jede Versuchsreihe neu aufgetaut und die Passagen 2 bis 5 wurden genutzt. Dazu wurde eine Ampulle aus dem Stickstoffbehälter entnommen und diese bei 37°C im Wasserbad (Grant, USA) zügig aufgetaut, um anschließend die Zellen in 10ml Kulturmedium (**Tabelle 1**) zu überführen. Danach wurden die Zellen bei 1300 Umdrehungen und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge, Allegra X-12R, Beckmann Coulter, Deutschland) und in neuem Medium resuspendiert, um auf Zellkulturplatten (Ø10cm, TPP, Schweiz) aufgebracht zu werden. Zur Herstellung der nötigen Anhaftungsbedingungen wurden die neuen Platten zuvor mit 4ml Attachment Factor (Life Technologies, Deutschland) beschichtet. Das verwendete Nährmedium wurde bei 2-8°C gelagert und vor jeder Benutzung zunächst in einem 37°C Wasserbad (Grant, USA) erwärmt.

Die Kulturbedingungen der Zellen (HUVEC) wurden in 10cm Zellschalen mit 8ml Medium bei 37°C in feuchter Atmosphäre und 5% CO₂-Begasung (CO₂-Brutschrank Hera cell 150, Thermo Scientific, USA) sichergestellt.

Die Konfluenz der Zellen wurde regelmäßig unter dem Mikroskop (DMIL, Leica, Wetzlar, Deutschland) kontrolliert, dabei wurden die Platten bei Erreichen einer 70-80%igen Konfluenz passagiert. Dafür wurden die Zellen mit Hilfe einer 2 minütigen Inkubation mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (0,02% EDTA + 0,05% Trypsin, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) in ein 50ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One, USA) überführt und anschließend für 5 Minuten bei 1200 Umdrehungen und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde ein Teil mit 8ml Medium auf neue Platten aufgetragen.

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Deutschland) im Lichtmikroskop bestimmt, wobei vier Großquadrate mit je 0,01µl Volumen

ausgezählt wurden. Die durchschnittliche Anzahl der Zellen je Großquadrat mit 10.000 multipliziert, ergab die Anzahl der Zellen in einem Milliliter.

Tabelle 1: Endotheliales Wachstumsmedium

Name	Menge	Hersteller
Endoprime Basis Medium	500ml	PAA, Pasching, Österreich
Ergänzungsreagenzien (100x)	5ml	PAA
Endothelialer Wachstumsfaktor (Endothelial growth factor (EGF)) 2,5µg/ml	1ml	PAA
Vaskulärer endothelialer Wachstumsfactor (Vascular endothelial growth factor (VEGF)) 250ng/ml	1ml	PAA
Fötales Kälberserum 10% (Fetal calf serum (FCS))	50ml	PAA
Penicillin (100U/ml)- Streptomycin (100µg/ml)	5ml	Gibco, Deutschland

2.1.2. Isolation CD117 positiver Stammzellen aus der Maus

2.1.2.1. Knochenmarkisolation

Wildtypmäuse (siehe 2.2.1.) wurden zunächst mit Hilfe einer gewichtsadaptierten intraperitonealen Narkose mit 8mg/kg Xylazine-Hydrochlorid (CP-pharma; Burgdorf, Deutschland) und 12mg/kg Ketamin-Hydrochlorid (Pharmanovo GmbH; Hannover, Deutschland) betäubt. Zunächst wurden die Hinterläufe durch eine Trockenrasur und anschließend durch eine Nassrasur von Haaren befreit. Nach Vorbereitung eines sterilen Arbeitsplatzes wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und anschließend auf dem Operationsfeld mit Pflasterband fixiert. Die Haut wurde distal des Kniegelenks eröffnet, dann bis zur Leiste und der Achillessehne präpariert, um das Femur und die Tibia von umliegendem Gewebe zu befreien. Mit Hilfe einer Knochenschere wurde zunächst das Kniegelenk durchtrennt, um anschließend das Femur am Hüftkopf abzutrennen und die Tibia am Sprunggelenk zu lösen.

Die Knochen wurden zunächst in einem Puffer verwahrt (MACS-Puffer **Tabelle 2**), welcher mit EDTA und Serum versetzt wurde, um die Gerinnung der noch beinhalteten Blutbestandteile zu verhindern und den Stammzellen ein Nährmedium zu bieten. Mit Hilfe von mit MACS Puffer gefüllten Einmalspritzen (1ml Omnican F, Braun, Deutschland) wurden nun die zuvor eröffneten Knochenmarkkanäle durchspült. Die so entstandene Knochenmarklösung wurde dann unter die Sterilbank (Hera Safe, Kendro, Deutschland) überführt.

Tabelle 2: MACS-Puffer

Name	Menge	Hersteller
Phosphatgepufferte-Kochsalzlösung (PBS)	250ml	PAA
EDTA 2mM	0,19g	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA) 0,5%	1,25g	PAA

2.1.2.2. Magnetisch unterstützte Stammzellisolation

Die entstandene Knochenmarklösung wurde nun mehrmals resuspendiert und durch ein 40µm Nylonsieb (BD Bioscience, USA) gesiebt, um größere Reste zu entfernen. Nach einer Zellzählung mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen bei 1300 Umdrehung bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 80µl MACS Puffer und 20µl magnetischen CD117 Antikörpern (CD117 MicroBeads mouse Isotyp rat IgG2b; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Deutschland) pro 1×10^7 Zellen resuspendiert und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert, damit die Antikörper an die Zellen binden konnten.

Das MACS System (**Abbildung 3A**), bestehend aus einem starken Magneten mit Halterung (OctoMACS Separation Unit; Miltenyi Biotec), Säulen mit magnetischem Kanal (25 MS Säulen, Miltenyi Biotec) und dem MACS Puffer, wurde auf Eis aufgebaut. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut zentrifugiert, um anschließend in 500µl MACS Puffer resuspendiert zu werden. Die Zellsuspension wurde nun in die Säulen pipettiert. Anschließend wurde dreimalig 500µl Puffer hinzu

gegeben, um die negative Fraktion, welche nicht magnetisch gebunden wurde, auszuwaschen.

Die nun in der Säule verbleibenden Zellen wurden von dem Magneten abgenommen, um danach mit Hilfe eines Stempels und 1ml des Puffers die positive Fraktion herauszudrücken. Die nun gewonnenen Zellen konnten dann den einzelnen Versuchen zugeführt werden.

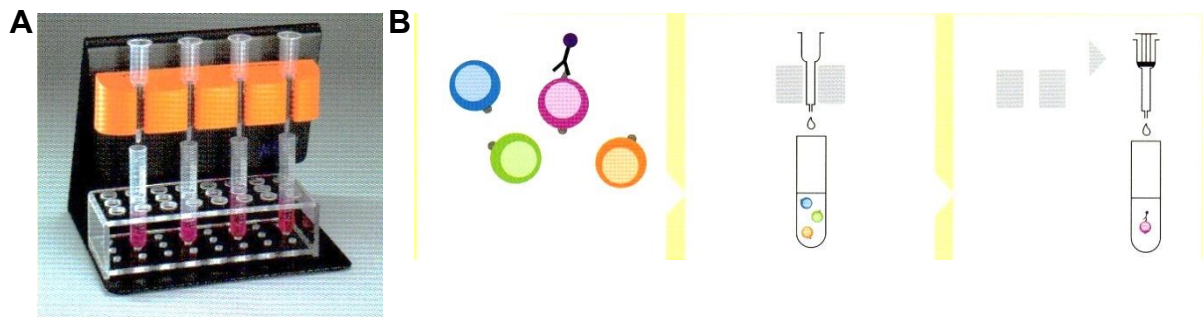


Abbildung 3: Schematische Darstellung magnetische Stammzellisolation

A Hier dargestellt das MACS System bestehend aus einem starken Magneten (schwarz), einer magnetischen Halterung (orange), den Selektionssäulen, die sich in der Halterung befinden mit dem innenliegenden Separator, der ein hoch gradientes magnetisches Feld in den Säulen indiziert und darunter 15ml Röhren zum Auffangen der negativen Fraktion (nicht antikörpergebundene Anteile) und später der positiven Fraktion (antikörpergebundene Anteile). **B** Schematische Abbildung des Prinzips der MACS Isolation. Im ersten Bild (links nach rechts) sind Zellen dargestellt wobei, nur die violette Zelle vom CD117 Antikörper gebunden wird. Anschließend wird die Auswaschung der negativen Fraktion am Magneten durch die Säule durchgeföhrt, um am Ende mit Hilfe eines Stempels die verblieben CD117 positive Fraktion herauszudrücken. Bildnachweis: Broschüre Miltenyi Biotec, Deutschland

2.2. Versuchstiere

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

Liste 1 Aktenzeichen der Tierversuche

- Hinterlaufischämie Modell: 7221.3-1.1-002/12
- Matrigel-Plug-Angiogenese-Modell: 7221.3-1.1-108/12

2.2.1. Wildtyp Mäuse

Die verwendeten Wildtyp Mäuse waren Tiere des Stammes C57BL/6J. Für die Versuche wurden 8-12 Wochen alte männliche Tiere verwendet, die ein Körpergewicht von ca. 20g aufwiesen. Die Mäuse entstammten der Zucht der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie an der Medizinischen Fakultät Rostock. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum (Temperatur 22-24°C, 60% Luftfeuchtigkeit) bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus in der Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) ad libitum gehalten.

2.2.2. TLR2-Knock out Mäuse

Die TLR-defizienten Mäuse sind B6.129-Tlr2tm1Kir/J Mäuse und stammten aus dem Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) und wurden im Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock weiter gezüchtet. Um diese Tiere zu generieren wurde ein gezielter Vektor (entwickelt von Dr. Carten J. Kirsching (TU München)), der eine Neomycin resistente Herpes-simplex-Virus-Thymidin-Kinase beinhaltet, in 129/SvJ embryonische Stammzellen transferiert. Dabei kam es zu einer Unterbrechung der Gensequenz, welche den extrazellulären C-Terminus des transmembranären Toll-like Rezeptors 2 kodiert. Diese genveränderten Stammzellen wurden dann in C57BL/6 Blastozysten injiziert. Die Mäuse wurden anschließend für mehr als 8 Generationen in C57BL/6J-Hintergrund zurückgekreuzt und als separate Homozygote weitergezüchtet. Diese homozygoten Mäuse sind lebensfähig und fertil. Hinsichtlich des immunologischen Phänotyps zeigen TLR2^{-/-} homozygote Mäuse keine Produktion von IL-6 oder TNF α und weisen keine Krankheitszeichen bei der Behandlung mit Spirocheten Lipoprotein (*Borrelia burgdorferie*), Leptospiral (*Leptospira interrogans*) und Lipopolysaccharid (LPS) auf [JAX Mice Database - 022507 C.129(B6)-Tlr2/J, 2013]. In unserem Labor konnte das funktionelle TLR2

Knock-out durch eine Detektion des defekten Gen-Produkts mittels PCR verifiziert werden (**Abbildung 4**).

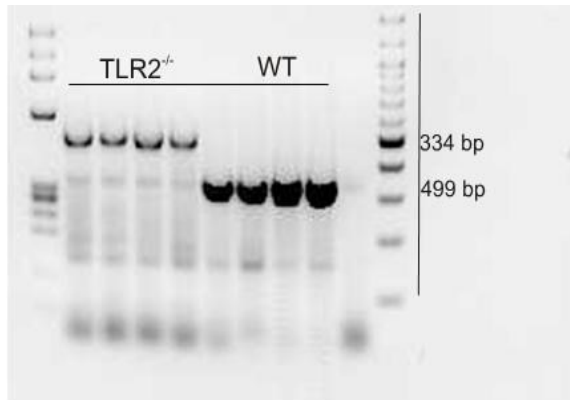


Abbildung 4: PCR Analyse des TLR2 Genprodukts

Zu erkennen ist, dass sich bei den TLR2^{-/-} Proben defekte 499bp Banden als 334bp Banden abzeichnen. Im Gegensatz dazu zeigen alle Wildtyp (WT) Proben intakte 499bp Banden die dem Genprodukt des Toll-like Rezeptors 2 entsprechen.

2.3. *In vitro* Versuche

2.3.1. Matrigel-Angiogenese-Modell

Die Nutzung des Matrigel-Angiogenese-Modells ermöglicht die Beobachtung der Fähigkeit von Endothelzellen neue Kapillaren zu bilden [Malinda KM 2001; Wagner NM 2013(1)]. BD Matrigel™ (Basement Membran Matrix Phenol Red Free, BD Biosciences, USA) ist ein von den Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maussarkomzellen produziertes Gelatin-Protein-Gemisch, welches in etwa mit einer extrazellulären Matrix vergleichbar ist. Zur Durchführung des Versuchs wurde zunächst Matrigel aufgetaut und dann jeweils 70µl davon in 2 Wells pro Variante einer 96-Wellplatte (Greiner Bio-One, USA) pipettiert. Anschließend wurde die Platte bei 37°C inkubiert, damit das Matrigel eine gelförmige Konsistenz annahm. Die auf der Zellkulturschale adhärenen Zellen wurden, um alte Zellbestandteile und Mediumreste zu entfernen, zunächst zweimalig mit PBS (PAA Laboratories, Österreich) gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 2ml Trypsin inkubiert, um die Zellen von der Platte zu lösen.

Nach Resuspension der Zellen in Medium wurden diese mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 Umdrehungen und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einer finalen Konzentration von 100.000 pro Milliliter resuspendiert.

Im Folgenden wurden die Lösungen für die einzelnen Versuchsvarianten (**Liste 2**) in 250µl Medium in Eppendorfgefäße (Sarstedt, Deutschland) angesetzt.

Nun wurden in die mit Matrigel beschichteten Wells jeweils 100µl der Zellsuspension, was wiederum 10.000 Zellen pro Well entsprach, und 100µl der Versuchslösung pro Well pipettiert.

Die Platte wurde dann für 8 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops in 100-facher Vergrößerung und der Progres Capture Pro Software (Jenoptik AG, Deutschland) jeweils 4 Fotos pro Well aufgenommen, wobei demnach jeweils 8 Bilder pro Variante entstanden, welche anschließend ausgewertet wurden. Zur Quantifizierung wurde die Netzwerklänge in µm mit Hilfe des Programms Image-Pro Plus Win4 (Version 4.5.0.29, Media Cybernetics, USA) gemessen, um diese Daten anschließend mit Graph Pad Prism 4.0 Pro (Graph Pad, USA) statistisch zu erfassen und auszuwerten. Alle Angaben der Netzwerklänge erfolgen im Mittelwert ± SEM.

2.3.2. Migrations-Modell

Um die Fähigkeit der Zellen zur Migration zu erfassen, wurde ein Scratch-Assay durchgeführt [Wong & Gotlieb 1984; Wagner NM 2013(1)]. Zunächst wurden dazu ca. 50.000 Zellen in jeweils ein Well einer 12-Wellplatte (Greiner-Bio One) ausgesät. Den konfluenten Platten wurde dann das Medium entnommen und diese anschließend mit PBS zweifach gespült, um tote Zellen und Mediumreste zu entfernen. Im Anschluss an den zweiten Spülvorgang wurden mit Hilfe einer 10µl Pipettenspitze (Eppendorf AG, Deutschland) jeweils zwei waagerechte und zwei senkrechte Linien in den konfluenten Rasen gezogen („gescratched“), so dass die dadurch entstandenen freien Flächen im Endothelzellrasen die Figuren von vier Kreuzen bildeten. Anschließend wurde jeweils 1ml Medium pro Well eingefüllt und die entsprechenden Reagenzien den einzelnen Versuchsvarianten hinzugefügt (**Liste 2**).

Mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops konnten dann jeweils vier Wundkreuze pro Variante abfotografiert werden. Nun wurden, um den Verlauf zu beobachten, zu den Zeitpunkten 2, 4, 6 und 8 Stunden jeweils wieder Fotos von denselben Wundkreuzen gemacht. Bei der Auswertung konnte nun die Streckenlänge zwischen den entstandenen Wundrändern mit dem Programm IPWin4 in μm ausgemessen werden, um so den Unterschied zwischen den einzelnen Varianten mit Hilfe von Graph Pad Prism Pro statistisch zu erfassen. Alle Wundflächenlängen sind in Mittelwert \pm SEM angegeben.

2.3.3. Sphäroid-Angiogenese-Modell

Eine weitere Möglichkeit, das angiogene Potenzial der Endothelzellen zu erfassen, ist das Sphäroid-Angiogenese-Modell [Korff T 1998; Wagner NM 2013(1)]. Hierfür wurden zunächst pro Variante 15ml Röhrchen mit 8,8ml Medium und 2,2ml Methylzellulose (20%; Sigma Aldrich, Deutschland) vorbereitet. Anschließend wurden nach dem Lösen und Zählen der Endothelzellen 40.000 Zellen in die vorbereitete Lösung überführt. Nach erneutem Suspendieren wurden die Lösungen in eine sterile Plastikschaale (Labcor, USA) überführt, um anschließend mit Hilfe einer 100 μl Multikanalpipette (Eppendorf AG) die Lösungen in 96-Wellplatten (Greiner Bio-One) zu überführen. Die Zellen wurden dann über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden zunächst zwei Lösungen hergestellt. Lösung A bestand aus einem 1:1 Gemisch von Essigsäure (Sigma Aldrich) und Kollagen (Typ 1 aus Rattenschwänzen, BD Bioscience) und zusätzlich 10% Medium199 (Sigma Aldrich). Lösung B bestand aus Methylzellulose und 16% FCS (PAA).

Die entstandenen Sphäroide aus den 96-Wellplatten konnten nun mit Hilfe von zuvor abgeschnittenen 1000 μl Pipettenspitzen (Eppendorf AG) entnommen werden und in 15ml Röhrchen überführt werden. Anschließend wurden diese bei 1200 Umdrehung/min bei Raumtemperatur für 3 Minuten zentrifugiert.

Mit Hilfe des pH Indikators M199 und Natronlauge ((NaOH) 0,1%, Lachema, Tschechische Republik) wurde die Lösung A durch Farbumschlag von Gelb zu Magenta in den Bereich eines neutralen pH-Werts gebracht. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und die Sphäroide in 1ml der Lösung A und 1ml der Lösung B resuspendiert und vermischt. Zu dieser Lösung

wurden nun gegebenenfalls die zu untersuchenden Reagenzien hinzugefügt (**Liste 2**). Beispielsweise wurden 30µl der Ausgangslösung der TLR2-blockierenden-Antikörper (Ausgangskonzentration: 1mg/ml) in die Mischung von Lösung A und B hinzugegeben, um in dem Gesamtvolumen von 3ml eine Konzentration von 10µg/ml zu erhalten. Anschließend wurde zunächst in einer 24-Wellplatte (Greiner Bio One) eine Trockenheitssperre aus PBS rundum die vorgesehenen Wells für die Proben angelegt, um ein Austrocknen der Proben zu verhindern. Daraufhin wurden jeweils 2 Wells mit je 1ml der Probe gefüllt und die Lösung nach Festwerden in einem Inkubator mit 500µl Medium bedeckt. Die Inkubationszeit betrug nun weitere 24 Stunden.

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (DMI 4000 B, Leica) konnten nun die einzelnen Sphäroide in Hell Feld und Dylight abgebildet werden. Pro Variante wurden 10 zufällig ausgewählte Sphäroide fotografiert. Für die Auswertung wurde die Länge der Aussprossungen mit dem Programm IPWin4 in µm gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Graph Pad Prism Pro und alle Werte wurden in Mittelwert ± SEM angegeben.

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

- **Kontroll-IgG** (Purifiziertes anti-Rat IgG; R&D Systems; USA)
- **Dimethylsulfoxid** (DMSO) als Kontrolle für in DMSO lösliche Substrate
- **Stromal Cell Derived Factor-1 alpha** (Rekombinantes Human/Katzen/Rhesusaffen SDF-1 α , CXCL 12; R&D Systems, USA)
- **Pam3CSK4** (TLR1/2 Ligand, Version # 11C21-MM) und **Pam2CSK4** (TLR2/6 Ligand, Version # 12A27-MM; beide Invivogen, USA)
- **Lipoteichonsäure** (TLR 2/6 Ligand, aus Salmonella Minnesota Re 595; Sigma-Aldrich)
- **Lipid A** (TLR4 Ligand, aus Staphylococcus aureus; L 2515 Sigma-Aldrich, MO USA)
- **AMD 3100** octahydrochloride CXCR4-Hemmer (Tocris Bioscience, Großbritannien)
- **LY 294002** – spezifischer Inhibitor der Phosphoinositid-3 Kinase (Tocris Bioscience)

- **SB 202190** – spezifischer Inhibitor der p38 Mitogen-aktivierendes-Protein (MAP)- Kinase (Tocris Bioscience)
- **FR 180204** - spezifischer Inhibitor der extrazellulär-signal-geregelten Kinase (ERK) 1/2, (Tocris Bioscience)
- **Polyklonaler anti-human TLR2 Antikörper** (Pab hTLR2, aus Ratten IgG, Version # 07E15-MT; InvivoGen; CA USA)
- **Monoklonaler anti-Maus/human CD282/TLR2 Antikörper** (T2.5; eBioscience, USA)
- **Monoklonaler anti-human CXCR4 Antikörper** (CXCR4 AK, Maus IgG_{2B} Klon # 44716; R&D Systems, USA)
- **Pertussis Toxin** (G_i-Inhibitor, PTX; Tocris Bioscience)

2.4. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können durch spezifische Antikörper Proteine auf der Oberfläche von Zellen bestimmt werden. Damit kann zum Beispiel angegeben werden, zu wieviel Prozent ein Rezeptor auf der Oberfläche von einer Population Zellen exprimiert wird.

Für die Analyse in der Durchflusszytometrie wurden die Zellen auf 10cm Platten ausgesät und dann für einen bestimmten Zeitraum mit den zu untersuchenden Reagenzien behandelt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und trypsinisiert, um von der Platte gelöst werden zu können. Die Zellen wurden dann in 6ml eines vorgekühlten Puffers zur durchflusszytometrischen Analyse (PBS, 0,5% BSA) überführt. Die Zellen wurden zweimalig mit Puffer gewaschen und bei 1300 Umdrehung/min für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellen wurden gezählt und 10.000 Endothelzellen in einem Volumen von 100µl entnommen und diese mit einem PE-konjugierten Antikörper (**Liste 3**) in einem 5ml Durchflusszytometrie-Röhrchen (Greiner Bio-One, USA) inkubiert, um mit Hilfe eines Durchflusszytometers (Becton Dickinson Flow Cytometer, MA USA) analysiert zu werden. Die Endothelzellen wurden gezählt und eine Gesamtzahl von 10.000 Ereignissen wurde abgezählt. Alle Ergebnisse werden in Mittelwert ± SEM angegeben.

Liste 3 Verwendete Antikörper in der Durchflusszytometrie

- **PE (Phycoerythrin)-konjugierter monoklonaler CXCR4 Antikörper** (R&D Systems, USA)
- **PE-konjugierte Maus IgG_{2A} Isotyp Kontrolle** (R&D Systems, USA)

2.5. Western Blot

Um die Signaltransduktion und Expression von Proteinen in den Zellen unter bestimmten Versuchsbedingungen zu analysieren, wurde die molekularbiologische Methode des Western Blot, den sogenannten Immunoblot, gewählt. Das Grundprinzip ist die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe auf einer Membran, um dadurch die einzelnen Proteine und deren Menge im vorher behandelten Zelllysats zu bestimmen.

2.5.1. Herstellung des Zelllysats

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf einer 10cm Platte für 12 Stunden mit Basalmedium mit reduziertem Serumgehalt (5% FCS) überdeckt. Anschließend wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Reagenzien für einen bestimmten Zeitraum stimuliert. Zum Beispiel wurden Zellen für 2, 5 und 10 Minuten mit 10µg/ml TLR2-blockierenden-Antikörpern inkubiert, um anschließend diese Proben hinsichtlich der Proteinmengen der aktivierten MAP-Kinasen AKT, ERK1/2 oder p38 zu untersuchen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen vom Medium bereinigt und mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurden jeweils 500µl Lysepuffer (**Tabelle 3**) mit frischen Proteasen und Phosphatasen auf die Platten gegeben und mit Hilfe eines Zellschabers (Sarstedt, Deutschland) die Zellen von der Platte gelöst. Die Zellen wurden dann in 15ml Röhrchen überführt und eine halbe Stunde auf Eis gelagert, wobei sie alle 10 Minuten mit Hilfe eines Schüttlers (GFL, Deutschland) gemischt wurden. Dann wurden die Zellen bei 10.000 Umdrehungen/min in Eppendorfcups für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit dem nun enthaltenden Zelllysats wurde abgenommen und in Eppendorfgefäßen bei -20°C eingefroren. Das verbleibende Pellet bestehend aus den Resten der Zellmembranen wurde verworfen.

Tabelle 3: Homburg Lysepuffer

Name	Menge	Hersteller
Destilliertes Wasser	9,026ml	Braun, Deutschland
Tris 1M pH 7,5	100µl	Sigma Aldrich, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) 5M	20µl	Serag Wiessner, Deutschland
EDTA 250M	4µl	Sigma Aldrich, Deutschland
Triton-X-100 10%	500µl	Sigma Aldrich, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃) 4%	50µl	Sigma Aldrich, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 100M	200µl	Sigma Aldrich, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	100ml	Sigma Aldrich, Deutschland
PhosphoStop	1Tablette/10ml	Roche, Schweiz

2.5.2. Bestimmung der Proteinmenge

Die Proteinmenge wurde mit Hilfe der BCA-Reaktion (Bicichionensäure-Reaktion) bestimmt. Dazu wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend je 25µl in eine 96er Mikrotiterplatte (Greiner-Bio One) pipettiert. Anschließend wurde zu den Proben jeweils 200µl der BCA-Cu²⁺-Sulfat Lösung (Sigma, USA) hinzugegeben und bei 37°C auf einem Schüttler für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562nm mit Hilfe des ELISA-Readers (Tecan Group, Deutschland) gemessen. 25µg des Proteinlysats wurden anschließend für den Western Blot genutzt.

2.5.3. Immunoblot

Bei dem Prinzip des Western Blots werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine, welche durch das SDS negativ geladen sind, auf eine immobilisierende

positiv geladene Membran transferiert. Der Transfer erfolgt dann durch Anlegen einer Spannung und somit durch Erzeugung eines elektrischen Feldes.

Zu Beginn wurden gleich große Mengen Protein in die zuvor hergestellten Taschen eines 6-10% SDS Polyacrylamid Gels (Sigma Aldrich) mitsamt einer Ladungskontrolle, der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, MAB374 clone 6C5, Millipore, USA) gegeben. Die GAPDH ist ein Protein, welches sich in einer bestimmten Menge in allen Zellen befindet. Das Mitführen von GAPDH gewährleistet somit, dass beim Pipettieren immer die äquivalenten Proteinmengen pro Variante genutzt werden und somit alle Varianten die gleiche Proteinladung besitzen. Anschließend wurden die Gele samt den Proben auf eine Nitrozellulose Membran (Immobilon Transfer Membranes, Millipore Corporation, USA) transferiert. Die Membranen wurden mit 2,5% Bovinem Serum Albumin (BSA, PAA, Österreich) für 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt, um im Anschluss mit dem ersten Antikörper (**Liste 4**) über Nacht bei 4°C zu inkubieren. Um die Proteinbanden zu visualisieren wurde ein zweiter Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper (**Liste 4**) für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, daraufhin wurde die Proteinexpression mittels luminolverstärkender Chemilumineszenz (SuperSignal West Pico Chemilumineszenz Substrat, Fisher Thermo Scientific; Schwerte, Deutschland) visualisiert und mit Hilfe der Autoradiografie (BioRad Universal Hood 2, Segrate, Italien) digitalisiert. Die Densitometriebestimmung wurde mit Hilfe der Software Quantify One 4.6.6.0 vorgenommen. Alle Werte sind in Mittelwert ± SEM angegeben.

Liste 4 Verwendete Antikörper im Western Blot

- **Monoklonaler anti-human/Maus CD282/TLR2 Antikörper T2.1** (eBioscience, USA)
- **Polyklonaler anti-Human/Maus CD184 (CXCR4)** (Kaninchen-IgG; eBioscience; USA)
- **Monoklonale Maus-IgG1 K Isotyp Kontrolle** (eBioscience, USA)
- **Antikörper gegen human ERK1/2, phospho-ERK1/2 (T202/Y204;** R&D Systems, USA)
- **Antikörper gegen human AKT, phospho-AKT (S473;** R&D Systems)
- **Antikörper gegen human p38, phospho p38** (R&D Systems)

2.6. Immunpräzipitation

Um ein bestimmtes Protein aus einem Proteingemisch zu isolieren und konzentrieren wird das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion, die sogenannte Immunpräzipitation, genutzt. Dabei wird mit Hilfe der Protein-G-Sepharose ein Teil des Toll-like Rezeptors 2 gebunden. Dadurch wird es ermöglicht, die Probe vor einem Western Blot positiv für TLR2 zu selektieren, um dann im Western Blot die Menge des zu vermutenden interagierenden Rezeptors CXCR4 zu detektieren.

Dafür wurde, wie für den Western Blot, ein Zelllysat aus den vorher behandelten, konfluenten Endothelzellen vorbereitet. Daraufhin wurden 100µg des vorbereiteten Gesamtprotein-Extrakts mit 50µl der Protein-G-Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala Schweden) und 4µl des zu selektionierenden Proteinantikörpers, in diesem Fall eines monoklonalen TLR2-blockierenden-Antikörpers oder, im umgekehrten Fall, eines CXCR4 Antikörpers, versetzt. Über Nacht wurde die Lösung dann bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Proben bei 10.000 Umdrehungen/min für 10 Minuten zentrifugiert; anschließend dreimalig mit Homburg Lysepuffer gewaschen und dann erfolgte eine Zugabe des Laemmli Puffers (62,5mM Tris pH 6,8; 2% SDS; 10% Glycerol; 5% 2-Mercaptoethanol; 0,001% Bromphenolblau) in einem Verhältnis von 1:1. Die Proben wurden anschließend auf 95°C für 5 Minuten erhitzt, um das Protein G und die Sepharose wieder zu lösen. Zur Durchführung des Western Blots wurden die Proben erneut bei 10.000 Umdrehungen/min zentrifugiert und dann mit Proteinproben derselben Menge vor der Immunpräzipitation auf das Gel geladen.

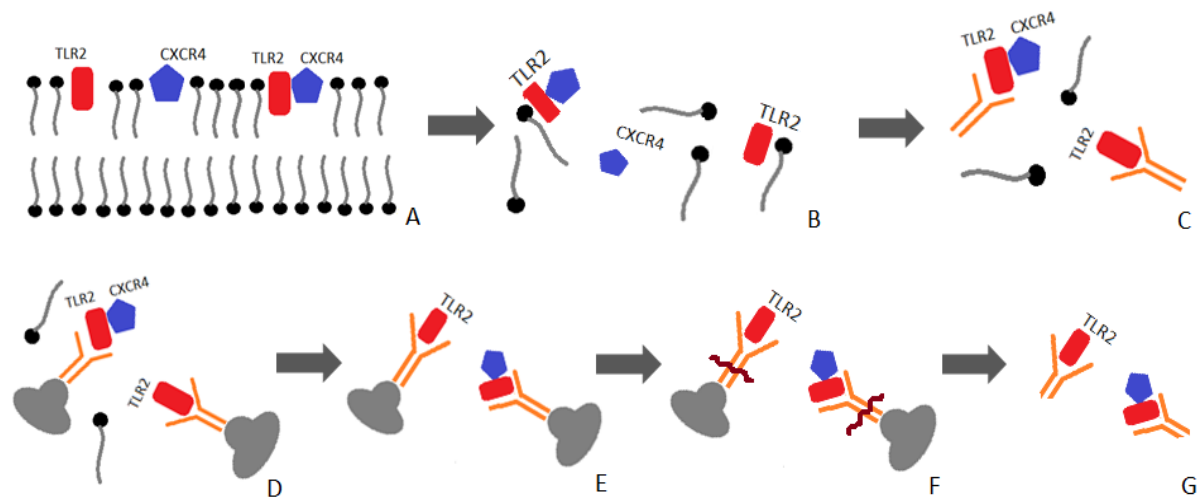


Abbildung 5: Prinzip einer Immunpräzipitation

Schematische Darstellung einer Zellmembran mit Rezeptoren (A) die anschließend lysiert wird (B). Daraufhin binden Antikörper an die Rezeptoren (C) und werden wiederum von dem Protein G gebunden (D). Durch mehrmaliges waschen werden restliche Zellbestandteile entfernt (E) und anschließend durch Hitze das Protein G wieder vom Immunkomplex entfernt (F). Am Ende entstehen die fertigen Proben für die Western Blot Analyse (G).

2.7. Transfektion mit siRNA

Mit Hilfe der siRNA Transfektion ist es möglich, die Expression eines bestimmten Proteins durch gezielte Blockade und Zerstörung der messengerRNA, die das Protein kodiert, zu unterdrücken. In diesem Fall wurde die Expression des CXCR4 Rezeptors unterdrückt.

Für die Transfektion einer siRNA wurden zunächst 6-Wellplatten (Greiner-Bio One) so vorbereitet, dass sie ca. 60-80%ig konfluent waren. Schließlich wurden zwei Lösungen hergestellt, zunächst eine Lösung A aus 150µl Serum- und Antibiotikafreiem Basismedium (PAA) und 9µl Lipofectamin® (RNA iMax Reagenz, Invitrogen, USA) und eine Lösung B mit wieder 150µl Basismedium und 9µl der CXCR4 siRNA (Fusin siRNA (h) sc-35421, Santa Cruz Biotechnology, USA) oder 9µl einer Kontroll siRNA (Control siRNA-A sc-37007; Santa Cruz Biotechnology). Anschließend wurden die Lösungen kombiniert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich das Lipofectamin an die siRNA binden konnte. Dann wurden pro Well der 6-

Wellplatte 2ml des Vollmediums aufgetragen und anschließend das Lösungsgemisch hinzugefügt. Nach 6 Stunden Inkubation wurde das Medium gewechselt. Zur Unterdrückung der Proteinexpression kam es nach 24-48 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellen dann gewaschen und trypsiniert, um sie dann den einzelnen Versuchen zuzuführen.

2.8. *In vivo* Versuche

2.8.1. Hinterlaufischämie-Modell

Um die Befunde aus den *in vitro* Endothelzellmodellen auf eine physiologische Relevanz für die endotheliale Angiogenese im Gesamtorganismus zu überprüfen, wählten wir das Hinterlaufischämie-Modell in der Maus. Sauerstoffmangel (Ischämie) ist einer der stärksten Reize für die endotheliale Gefäßneubildung [Carmeliet P 2000]. In diesem Modell wird durch die Ligatur der Arteria femoralis eine Gewebeischämie erzeugt [Limbourg A 2009]. Mit Hilfe anschließender Wärmebildaufnahmen und einer histologischen Untersuchung konnten die Auswirkungen der Ischämie in Bezug auf die verschiedenen Versuchsvarianten untersucht werden [Wagner NM 2013].

2.8.1.1. *Ligatur der Arteria femoralis*

Vor jedem Versuch wurden die Mäuse gewogen, um eine gewichtsbezogene Injektionsnarkose vorzunehmen. Dazu wurde ein Gemisch mit 12mg/kg Ketamin-Hydrochlorid und 8mg/kg Xylazine-Hydrochlorid intraperitoneal appliziert. Unter resultierender Narkose wurden die Mäuse auf einer Wärmeplatte mit hautverträglichem Pflasterband fixiert. Bei Erreichen einer adäquaten Narkosetiefe wurde zunächst eine ca. 2mm große Hautinzision distal des Kniegelenks gesetzt. Die darunter liegende Muskelfaszie wurde stumpf durchtrennt und dann mit Hilfe von mikrochirurgischem Werkzeug die A. tibialis von umliegenden Gewebe separiert. Mit einem Nylonfaden (Prolene™ 7,0, Ethicon, Deutschland) wurde die Arterie ligiert und anschließend durchtrennt. Selbiges Verfahren wurde am Oberschenkel an der Arterie femoralis communis angewandt, um anschließend den nun zwischen den Ligaturen liegenden Anteil der A. femoralis durch Zug zu entfernen. Die Hautinzisionen wurden anschließend mit Nylonfäden (Prolene™ 6,0, Ethicon) vernäht und desinfiziert.

2.8.1.2. Systemische Antikörperapplikation

Am ersten und vierten postoperativen Tag wurden die Mäuse mit Hilfe einer Inhalationsnarkose mit Isofluran (Isotec 5 Isofluran Cirrus Trans, Datex Engstrom, Deutschland) narkotisiert, um sie anschließend mit anti-Maus/human CD282/TLR2 Antikörper T2.5 mit 5mg/kg (eBioscience, USA) bzw. die Kontrollgruppe mit NaCl zu behandeln. Dafür wurden die Mäuse auf den Rücken gelegt, um mit einer Insulininjektionsnadel (Braun, Deutschland) das Volumen von 100µl im linksthorakalen Bereich in den 6.- 7. Interkostalraum unter Aspiration in den linken Ventrikel zu injizieren [Wagner NM 2013(1)].

2.8.1.3. Wärmebildaufnahmen

Um die Entwicklung der Reperfusion im Verlauf zu beobachten, wurde alle drei Tage postoperativ Wärmebildaufnahmen der Hinterläufe gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass die Temperatur der Hinterläufe mit deren Durchblutung korreliert [Gul KM 2009]. Dazu wurden die Mäuse mit Hilfe einer Inhalationsnarkose betäubt. Daraufhin wurden sie für 6 Minuten auf eine Wärmeplatte bei 37°C auf dem Bauch liegend belassen, wobei die Hinterläufe von ventral erwärmt wurden. Anschließend wurden die Tiere auf der Tischplatte auf den Rücken gelegt und die Füße mit der ventralen Seite nach oben auf einen Tesafilmstreifen fixiert. Dann wurden die Hinterläufe mit Hilfe einer Wärmebildkamera (ThermaCam B20 HS, FLIR Systems, Deutschland) fotografiert. Es wurden am 6., 9., 12., 15. und 18. postoperativen Tag Wärmebilder der Hinterläufe gemacht. Dabei waren die Aufnahmen präoperativ und direkt postoperativ entscheidend, um die weiteren Aufnahmen anhand dieser Bilder zu verifizieren und eine Vergleichbarkeit der Methode zu sichern. Dabei war es wichtig, dass für jede einzelne Maus eine mittlere Temperatur vor und nach der Operation aufgenommen wurde. Diese Aufnahmen sind in **Abbildung 6** für einzelne Tiere repräsentativ dargestellt, wobei hier die Temperaturen der Mäusepfoten farbig auszumachen sind und anhand der Farbtemperaturskala deutliche Temperaturunterschiede sichtbar gemacht werden können. Dabei ist anzumerken, dass der Temperaturunterschied (um die 4,2°C) in der direkten postoperativen Aufnahme zwischen den beiden Pfoten (operiert und nicht operiert) nach der Femoralarterienligatur auch für eine erfolgreiche chirurgische Unterbrechung des Blutflusses anzusehen ist und die Temperaturmessung auch eine Kontrolle über den

Erfolg der Operation darstellt (**Abbildung 6**). Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der FLIR QuickReport 1.2 Software (FLIR, Deutschland) und dem Statistikprogramm Graph Pad Prism 4.0 Pro.

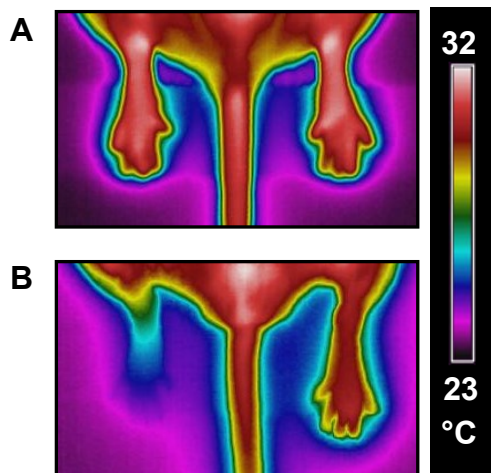


Abbildung 6: Aufnahmen der Thermografie

Darstellung der Hinterläufe prä- (**A**) und postoperativ (**B**) in der Wärmebildkamera. Dabei ist zu erkennen, dass die linke Pfote nach der Ligatur einen Temperaturabfall aufweist.

2.8.1.4. Entnahme des *M. gastrocnemius*

Nach 21 Tagen wurden die Mäuse erneut mit Hilfe einer gewichtsadaptierten intraperitonealen Injektionsnarkose betäubt. Zunächst wurde den Mäusen linksventrikulär 100µl des Fluoreszenzstoff Lectin (Fluorescein Isothiocyanat(FITC)-labeled agglutinin-I, Lectin aus *Bandeiraea simplicifolia* (*Griffonia simplicifolia*), Vector Laboratories, USA) verabreicht und anschließend 10 Minuten gewartet, damit das Lectin durch den Blutkreislauf zirkulieren konnte. Das zirkulierende Lectin bindet an der Oberfläche von murinen Endothelzellen. Somit können in der histologischen Präparation des *M. gastrocnemius* die einzelnen Kapillaren dargestellt werden [Laitinen L 1987]. Anschließend wurde die Maus durch einen Genickbruch getötet und auf dem Operationstisch fixiert. Die Haut wurde vom Knöchel aufwärts bis zum Oberschenkel eröffnet und daraufhin der *M. gastrocnemius* freipräpariert. Der Muskel wurde dann möglichst distal am Knie und an der Achillessehne abgetrennt, um den so separierten Muskel in ein Einfriergel (Einbettgel Tissue Tek, Sakura Finetek, Niederlande) zu betten. Dann wurde der Muskel unter Zuhilfenahme zweier Nadeln aufrecht auf eine Korkplatte gestellt und anschließend in flüssigem Stickstoff fixiert.

2.8.1.5. Immunhistochemie

Der präparierte Muskel wurde im Gefrierschnittverfahren aufbereitet. Dazu wurden die eingebetteten Muskeln in einer Breite von 5µm mit einem Cryostat (Schneidemaschine Cryostat Jung Frigocut 2800N; Leica, Deutschland) bei einer Temperatur von -20°C geschnitten und dann auf Objektträger (Thermo Scientific, USA) gelegt. Die Schnitte wurden anschließend für 24 Stunden zur Trocknung gestellt, um in 4°C kaltes Aceton für 10 Minuten eingetaucht zu werden. Zur Darstellung der Kapillardichte im Muskel wurden die luftgetrockneten Schnitte mit einem primären Antikörper gegen CD31 (sc-18916; Santa Cruz, USA) und anschließend mit einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper (Molecular Probes, USA) behandelt. Die Zellkerne wurden mit Hilfe einer 1:200 DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; Sigma, USA) Färbung gefärbt (Blau fluoreszierend). Das zuvor intrakardial gespritzte Lectin ist nun auch in den Gefrierschnitten weiterhin sichtbar (Grün fluoreszierend).

Die Kapillardichte wurde durch die Zählung der CD31/DAPI doppelt positiven Zellen pro mm² quantifiziert. Dazu wurden pro Muskel 7 willkürliche Gesichtsfelder im Fluoreszenzmikroskop (DMI 4000B; Leica) bei einer 200-fachen Vergrößerung ausgewählt, manuell ausgezählt und die Rohdaten mit Hilfe des Programm Graph Pad Prism Pro statistisch erfasst. Alle Werte sind im Mittelwert ± SEM angegeben.

2.8.2. Matrigel-Plug-Angiogenese-Modell

Zur Untersuchung des Potenzials von CD117⁺ isolierten Zellen *in vivo* wurde ein Matrigel-Plug-Assay gewählt, um zu untersuchen, inwieweit sich die aus Wildtyp Mäusen isolierten Zellen von denen aus TLR2^{-/-} Mäusen isolierten Zellen in ihrem Potenzial zur spontanen Kapillarbildung unterscheiden [Malinda KM 2001, Wagner NM 2013(2)].

2.8.2.1. Injektion des Matrigels und Entnahme des Matrigel Plugs

Zunächst wurden circa 4 Millionen Stammzellen mit Vybrant CM-Dil-Zellmembranmarkierung (Molecular Probes, OR USA) markiert und anschließend mit 500µl Matrigel gemischt. Anschließend wurden die Mäuse mit Hilfe einer gewichtsadaptierten Injektionsnarkose betäubt und auf eine Wärmeplatte bei 37°C

gelegt. Den Tieren wurde dann lateral der Wirbelsäule ungefähr auf Höhe der Nieren subkutan das Matrigel injiziert. Hierbei war zu beachten, dass der Stichkanal dabei mit dem Finger abgedrückt wurde, damit das Matrigel nicht am Ende des Stichkanals austrat und die gesamten 500µl einen Matrigelplug bildeten. Aufgrund der Körpertemperatur der Tiere erhärtete sich das Matrigel innerhalb kürzester Zeit unter der Haut. Die Mäuse wurden dann über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet.

Für die Entnahme der Plugs wurden die Mäuse zunächst narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Es wurde eine kleine Hautinzision im Lendenwirbelbereich gesetzt und dann bogenförmig um das zuvor gespritzte Plug die Haut eröffnet. Das Matrigel war nun durchsichtig als gelartige Masse im subkutanen Bereich erkennbar und wurde von diesem als ganzes Stück abgetragen.

2.8.2.2. Färbung und Auswertung der Matrigel Plugs

Die Plugs wurden für 1 Stunde in 4%igem Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Deutschland) bei Dunkelheit und Raumtemperatur auf einem Schüttler fixiert. Anschließend wurden die Proben in 5ml 20%iger Saccharose (Sigma-Aldrich) überführt und weiterhin auf einem Schwenker über Nacht bei 4 °C inkubiert, um den in den Präparaten enthaltenen Wasseranteil zu entfernen. Am nächsten Tag wurden die Plugs dann nochmalig für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 1ml 1%igem Triton (Sigma-Aldrich) zur Permeabilisierung behandelt. Anschließend wurden die Proben dreimalig mit PBS gewaschen und mit einer DAPI-Färbung in einer Verdünnung von 1:200 für 1 Stunde inkubiert. Dann wurden die Proben mit für fluoreszierende Stoffe geeignetem Einbettmedium eingedeckt, mit Hilfe zweier Objekträger zerdrückt und mit einem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Es wurden dann 5 verschiedene, zufällige Ausschnitte in einer 200-fachen Vergrößerung fotografiert und die entstandenen DAPI/Knochenmarkzellen-doppelt-positiven Kapillaren mit der Image Pro Plus Win4 Software in µm ausgemessen und statistisch mit der Graph Pad Prism Software erfasst. Alle Daten sind im Mittelwert ± SEM angegeben.

2.9. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden alle im Mittelwert ± SEM angegeben. Die Daten wurden in einem Vielfachen der Kontrolle angegeben, wobei die Einzeldaten durch den Mittelwert der Kontrolle geteilt wurden, wodurch die Kontrollwerte auf 1 normiert wurden, um die

Vergleichbarkeit der einzelnen Versuchstage zu gewährleisten. Die Anzahl der unabhängigen Experimente ist in den jeweiligen Abschnitten des Textes dargestellt. Für den Vergleich von quantitativen Werten zwischen zwei Mittelwerten wurde der „Student t-Test“ genutzt. Für den Vergleich von mehr als zwei Werten wurde ein One-Way ANOVA mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Ein Wert von P kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Statistische Analysen wurden mit Hilfe der Graph Pad Prism Software 4.01 (Graph Pad, USA) ausgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Eine TLR2 Defizienz hat proangiogene Effekte im Hinterlaufischämiemodell

Um die vorbeschriebenen protektiven Effekte einer TLR2 Defizienz zu überprüfen, wurde das Hinterlaufischämiemodell gewählt. Dabei konnte dargestellt werden, dass eine TLR2 Defizienz nach einer Ischämie zu einem verbesserten Blutfluss im Hinterlauf führt.

3.1.1. Eine TLR2 Defizienz führt zu einer verbesserten Perfusion im Hinterlauf nach Ischämie

Da die Oberflächentemperatur von Mäusen eng mit ihrer Blutperfusion korreliert [Gul KM 2009], konnte man an Hand der Oberflächentemperaturmessung der Hinterläufe, Aussagen bezüglich der Perfusion der Hinterläufe nach Ischämie treffen.

Um den Effekt einer TLR2 Defizienz auf die ischämie-induzierte Angiogenese zu untersuchen, wurde das *in vivo* Hinterlaufischämiemodell mit je 8-10 Wildtyp (WT) Tieren und TLR2^{-/-} Mäusen durchgeführt. Wärmebildaufnahmen verifizierten zunächst die vergleichbare Durchblutung beider Pfoten vor dem Eingriff, sowie die reproduzierbar induzierte Reduktion der Durchblutung durch die Ligatur im linken Bein aller Versuchstiere. Es konnte aufgezeigt werden, dass die TLR2^{-/-} Tiere am 6. und 16. postoperativen Tag eine kleinere Temperaturdifferenz der Hinterläufe aufwiesen als die Wildtyp Tiere (TLR2^{-/-} 2,4±0,90°C im Vergleich zu WT 4,0±1,21°C, P<0,05). Auch im zeitlichen Verlauf der einzelnen Versuchsgruppe der TLR2^{-/-} Tiere ist zu erkennen (**Abbildung 7B**), dass sich ein Unterschied zwischen den Temperaturdifferenzen am ersten und sechsten postoperativen Tag zeigte. Im Gegensatz dazu blieben die Temperaturunterschiede in den Hinterläufen der Wildtyp Tiere gegenüber dem ersten postoperativen Tag nahezu gleich.

Zusammenfassend zeigten die TLR2^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen eine verbesserte Reperfusion nach Ligatur im zeitlichen Verlauf.

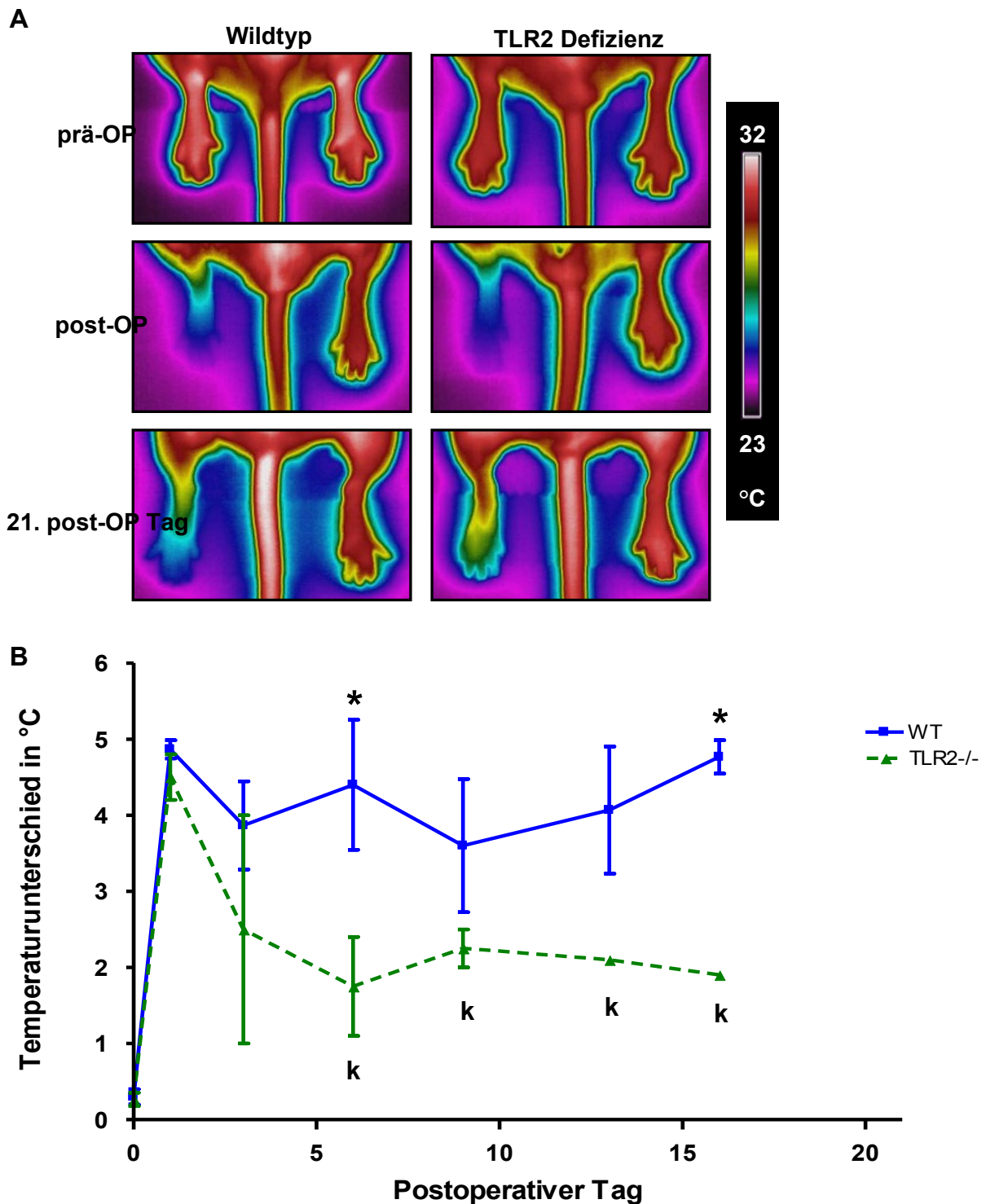


Abbildung 7: Temperaturdifferenzen im Hinterlauf bei Wildtyp und TLR2^{-/-} Tieren

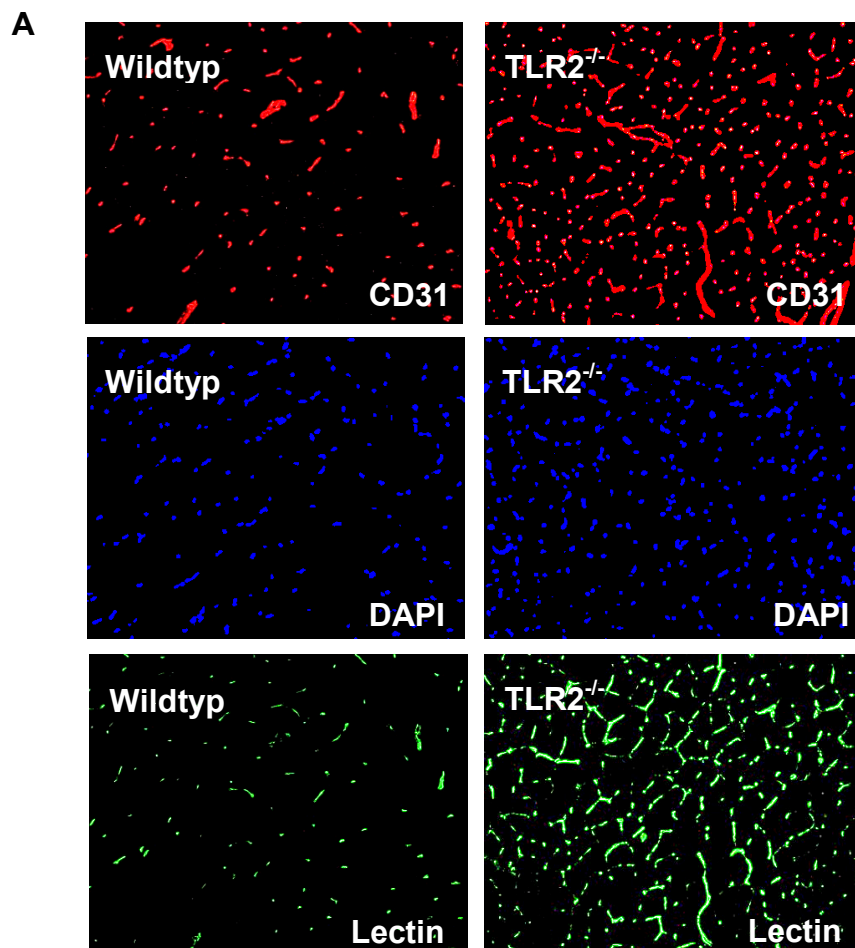
A Wärmebildaufnahmen der Mäusehinterläufe vor der Operation und direkt nach der Ligatur. Dabei ist die Abkühlung im betroffenen linken Bein deutlich. Untere Reihe: Darstellung nach 21 Tagen nach der Ligatur. **B** Quantitative Darstellung der Ergebnisse. * WT vs. TLR2^{-/-}, *P<0.05, k Tag 1 TLR2^{-/-} vs. Tag 6 (und folgend) TLR2^{-/-}, k P<0,05.

3.1.2. TLR2-defiziente Mäuse haben mehr funktionelle Kapillaren nach Ischämie als Wildtypmäuse

Ischämie gehört zu einem der stärksten Induktoren für die Bildung neuer vaskulärer Strukturen [Carmeliet P, 2000]. Dieser Prozess wurde mit Hilfe eines Hinterlaufischämie Modells untersucht, um im Musculus gastrocnemius diese induzierte Neubildung zu untersuchen. Nach ersten Hinweisen auf eine verbesserte Reperfusion TLR2-defizienter Tiere im Rahmen der Thermografie wurde nun Mittels Immunhistochemie die Kapillarbildung in den Hinterläufen im M. gastrocnemius der Mäuse 21 Tage nach der Femoralis-Ligatur untersucht. Die gezeigten Fluoreszenzbilder des M. gastrocnemius stellen die drei unterschiedlichen Färbungen (CD31, DAPI, FITC markiertes Lectin) am 21. postoperativen Tag dar (**Abbildung 8A**). Dabei markiert die rote Fluoreszenz CD31, einen Oberflächenmarker von Endothelzellen im Gewebe. Blau zeigen sich die mit DAPI gefärbten Zellkerne, wodurch einzelne Zellen differenziert werden können. Die Angiogenese wurde durch die Zählung der DAPI/CD31 doppelt positiven Kapillaren im Muskel quantifiziert, wobei die DAPI Färbung dabei verifiziert, dass es sich bei den CD31 positiven Signalen auch um Zellen handelt und nicht um Artefakte. Die grüne Färbung entsteht durch intrakardial injiziertes FITC-markiertes und stellt die vom Kreislauf bedienten Areale dar. Damit stellen sich die durchbluteten Kapillaren im Muskel grün dar [Gee MS, 2003]. Eine funktionelle Endothelzelle ist somit gekennzeichnet durch eine dreifach positive Färbung, wobei DAPI sie als Zelle, CD31 sie als Endothelzelle und Lectin als dem Kreislauf angeschlossene, mit Blut versorgte Endothelzelle identifiziert.

Die Abbildungen zeigen, dass eine TLR2 Defizienz mit mehr positiven CD31 Signalen im Muskel einhergeht im Vergleich zum Bild der Wildtypen. Gut darstellbar ist auch, dass es unter TLR2 Defizienz zu einer deutlichen Vermehrung der Kapillaren in der Lectinfärbung kommt, was für intakte, neue, durchblutete Gefäße spricht. Aus diesen schon optisch eindeutigen Ergebnissen konnte mit Hilfe einer Quantifizierung der CD31/DAPI positiven Arealen auch statistisch signifikante Ergebnisse gezeigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die TLR2^{-/-} Mäuse ($2294 \pm 391,8$ CD31⁺/DAPI⁺ Zellen/mm²) mehr CD31/DAPI doppelt positive Zellen aufwiesen als die Wildtyp Mäuse ($1439 \pm 314,3$ CD31⁺/DAPI⁺ Zellen/mm²; $P < 0.01$).

Weiterhin ließ sich mittels der statistischen Zusammenfassung (**Abbildung 8B**) aufzeigen, dass in jeder einzelnen Versuchsgruppe ein Unterschied zwischen dem operierten und dem nicht operierten Bein der Mäuse zu erkennen ist, da eine Induktion einer Ischämie als Reiz per se zu einer erhöhten Angiogenese führt. Auch ist zu erkennen, dass es einen Unterschied der CD31/DAPI doppelt positiven Zellen zwischen den Kontrollbeinen der Wildtypiere und den Kontrollbeinen der TLR2-defizienten Tiere gibt. Dies zeigt auf, dass TLR2-defiziente Tiere per se wahrscheinlich eine erhöhte Kapillardichte haben. Jedoch zeigt sich ein größerer Unterschied im Vergleich zu den ischämischen TLR2-defizienten Hinterläufen, wodurch dargestellt werden konnte, dass eine TLR2 Defizienz zu einer vermehrten Angiogenese nach Ischämie führt.



B

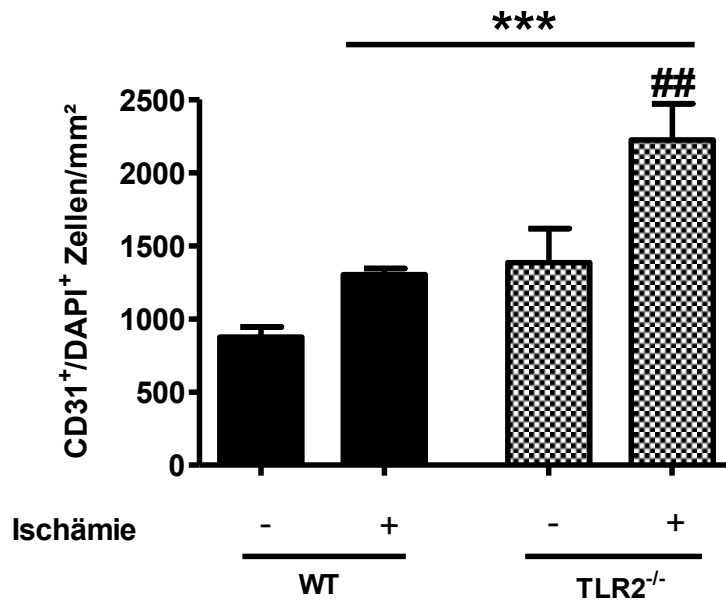


Abbildung 8: Immunhistochemie des M. gastrocnemius der Wildtyp- und TLR2^{-/-} Tiere

A Immunhistochemie des M. gastrocnemius bei 200-facher Vergrößerung. Dabei in Rot dargestellte CD31 positive Zellen, in Blau dargestellte DAPI-Zellkernfärbung und in Grün dargestellte intravasale Lectinfärbung. **B** Quantitative Zusammenfassung der Ergebnisse. * vs. Ischämiebein der Wildtyptiere, # vs. Kontrollbein der TLR2^{-/-} Tiere. ##P<0.01, ***P<0.001.

3.2. Hämatopoetische Stammzellen aus TLR2-defizienten Tieren haben proangiogene Effekte im *in vivo* Modell

Es konnte gezeigt werden, dass eine TLR2 Defizienz im Hinterlaufischämiemodell einen positiven angiogenen Effekt induziert. Nachfolgend prüfte man die Hypothese, inwiefern dieser Effekt auf das Fehlen einer möglichen TLR2-vermittelten Signaltransduktion in Stamm- und Progenitorzellen zurückzuführen sein könnte. Hierfür wurde zunächst untersucht, inwieweit dieser günstige Phänotyp der TLR2^{-/-} Tiere durch die Injektion selektierter Knochenmarkstammzellen dieser TLR2^{-/-} Tiere in Wildtyp Tieren hergestellt werden kann. Es wurde eine Selektion der Stammzellen für den Oberflächenmarker cKit (CD117) gewählt, da gezeigt wurde, dass dieser Oberflächenmarker auf angiogenen potenten Stammzellen exprimiert wird [Li TS 2003]. Es wurden dazu wie zuvor beschrieben cKit (CD117) positive Stammzellen

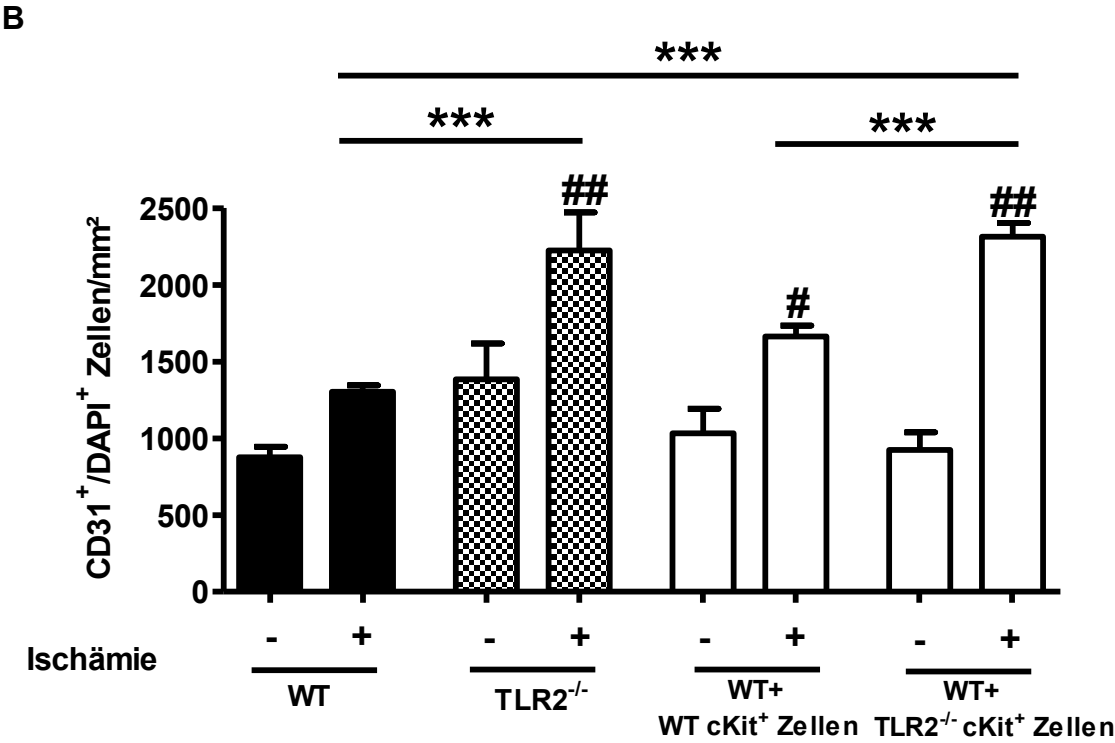
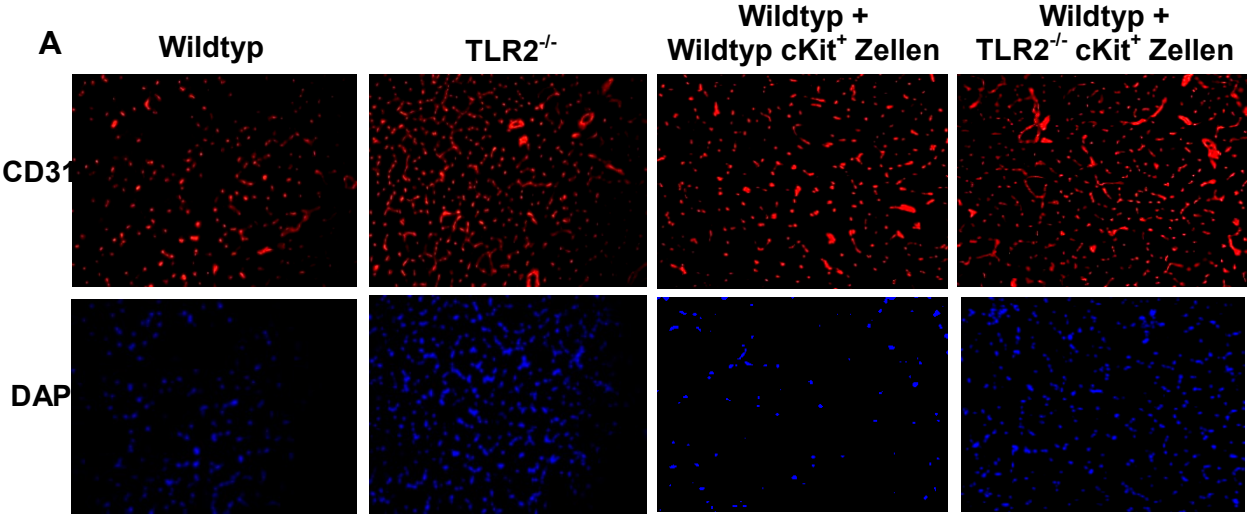
aus Wildtyp und TLR2^{-/-} Mäusen isoliert, um deren Effekte im Hinterlaufischämiemodell und im Matrigel-Plug-Modell zu überprüfen.

3.2.1 Die Injektion TLR2-defizienter Knochenmarkstammzellen in Wildtyp Tiere resultiert in verstärkter ischämie-induzierter Angiogenese

CD117⁺(cKit⁺) Zellen aus Wildtyp und TLR2-defizienten Tieren wurden 24 Stunden nach der Ligaturoperation der Femoralis in Wildtypiere linksventrikulär injiziert. Im Vergleich dazu dienten Wildtyp Tiere und TLR2^{-/-} Tiere, welche nur mit einer Kontrollinjektion behandelt wurden. Es wurde erneut dargestellt, dass eine TLR2 Defizienz einen positiven Einfluss auf die Kapillardichte im M. gastrocnemius hat. Im Vergleich zu den Wildtyp Tieren zeigten die mit TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen behandelten Tiere einen deutlichen Unterschied bezüglich der CD31/ DAPI doppelt positiven Anteile. Somit geht die Injektion von TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen mit einer verbesserten Kapillarbildung einher (2313±89 CD31⁺/DAPI⁺ Zellen/mm² für TLR2^{-/-}cKit⁺ Zellen im Vergleich zu 1302±42 CD31⁺/DAPI⁺ Zellen/mm² für WT; P<0.001). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Behandlung von Wildtyp Tieren mit TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen zu der gleichen Ausprägung der Neovaskularisation im Hinterlauf führte, welche sich in TLR2^{-/-} Tieren aufgezeigt hatte (2224±24 CD31⁺/DAPI⁺ Zellen/mm²). Die Injektion von Wildtyp cKit⁺ Zellen führte im Vergleich zu den unbehandelten Wildtyp Tieren auch zu einer Erhöhung der CD31/DAPI doppelt positiven Zellen, was darauf zurückzuführen ist, dass alleinig eine vermehrte Anzahl an Stammzellen zu einer verbesserten Neovaskularisation führt (1664±70 CD31⁺/DAPI⁺ Zellen/mm² im Vergleich zu 1033±161 CD31⁺/DAPI⁺ Zellen/mm², P<0.05). Jedoch ist der Unterschied in der Kapillardichte zwischen der Wildtyp- und der TLR2^{-/-} cKit⁺-Zellinjektion immer noch sehr deutlich was dafür spricht, dass das Fehlen des TLR2 einen proangiogenen Effekt auf die ischämie-induzierte Neovaskularisation hat.

Die Erholung des Blutflusses in den Hinterläufen wurde wiederum mit Hilfe einer Thermografie verfolgt. Auch hierbei konnte gezeigt werden, dass analog zur Kapillardichte, die TLR2^{-/-} Tiere und die mit TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen behandelten Tiere eine niedrigere Temperaturdifferenz am 21. postoperativen Tag aufwiesen als die Wildtyp Tiere. Jedoch zeigten weder die Wildtypiere, noch die mit Wildtyp cKit⁺

Zellen behandelten Tiere eine Verbesserung der Temperaturdifferenz und somit der Durchblutung.



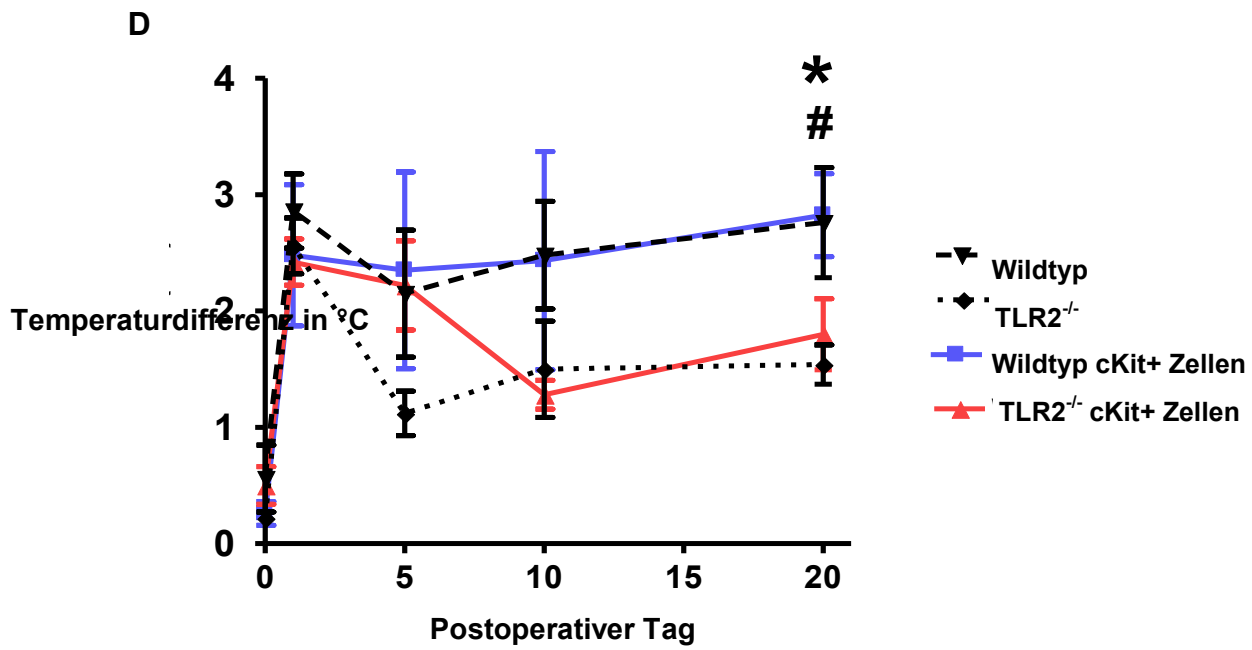
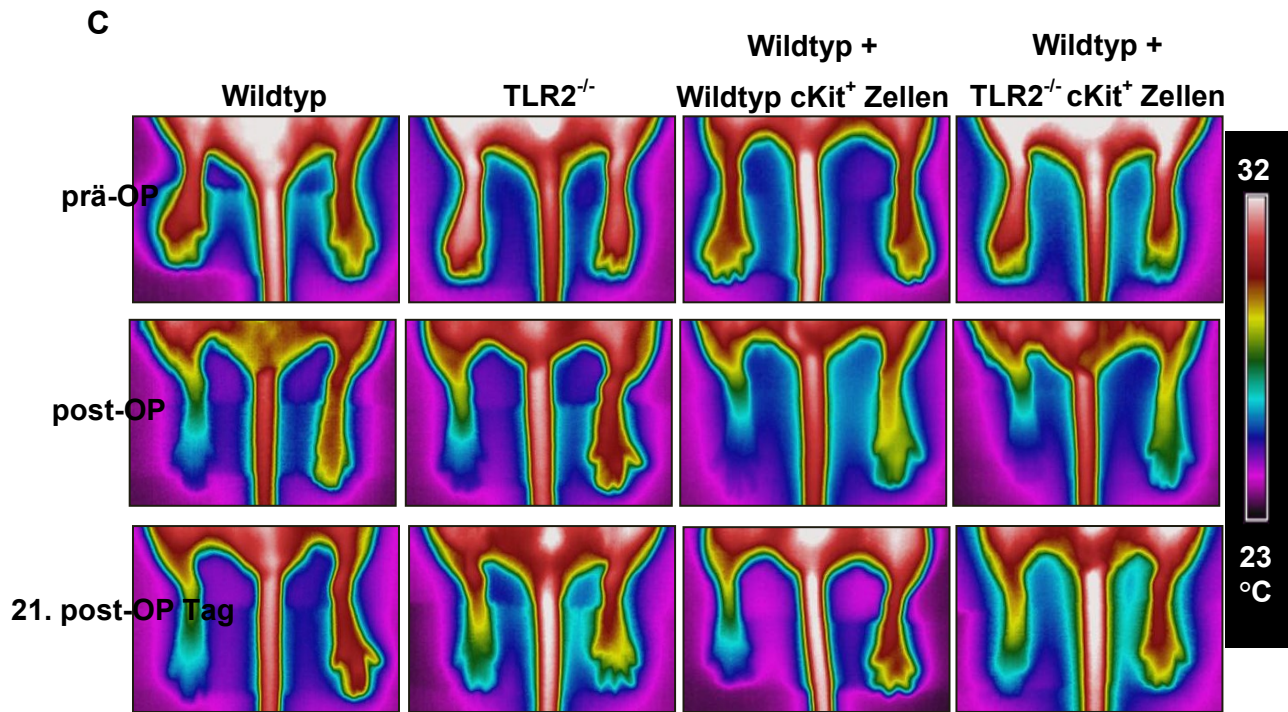


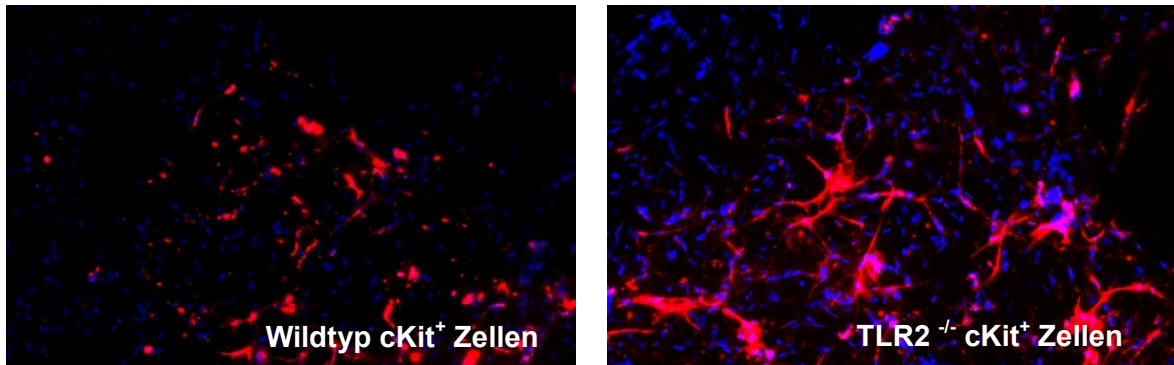
Abbildung 9: Ergebnisse der TLR2^{-/-} Stammzellen im Hinterlaufischämiemodell

A Repräsentative Abbildung von Schnitten des Musculus gastrocnemius des ischämischen Hinterlaufs in 200-facher Vergrößerung in der Fluoreszenzmikroskopie. Dabei sind in Rot die CD31 Färbung und in Blau die DAPI Färbung dargestellt. Die Schnitte zeigen Gewebe von Wildtyp Tieren, TLR2^{-/-} Tieren, mit Wildtyp cKit⁺ Zellen behandelten Tieren (3x10⁶ Zellen) und mit TLR2^{-/-} cKit⁺ behandelten Tieren (3x10⁶ Zellen). **B** Quantitative Zusammenfassung der CD31/DAPI doppelt positiven Zellen pro mm². Jeweils im Vergleich die Anzahl der Zellen/mm² des unbehandelten und des ischämischen Hinterlauf pro Variante. * vs. Ischämie der Kontrolle, # vs. Hinterlauf ohne Ischämie der jeweiligen Variante. #P<0.05, ##P<0.01, ***P<0.001, n=5 Tiere pro Versuchsgruppe. **C** Repräsentative Aufnahmen der Hinterläufe mit der Thermokamera. Zum präoperativen Zeitpunkt, dem direkten postoperativen Zeitpunkt und dem 21. postoperativen Tag. Abbildung für Wildtyp Tiere, TLR2^{-/-} Tiere, mit Wildtyp cKit⁺ Zellen behandelte Tiere und mit TLR2^{-/-} cKit⁺ behandelte Tiere. **D** Quantitative Zusammenfassung der Temperaturdifferenzen zwischen den ischämischen und nicht-ischämischen Hinterläufen. In der grafischen Zusammenfassung sind die Wildtyp Tiere in schwarzer Farbe und dreieckigen Symbolen gekennzeichnet, die TLR2^{-/-} Tiere in schwarzer Farbe und viereckigen Symbolen, die mit Wildtyp cKit⁺ Zellen behandelte Tiere in Blau und die mit TLR2^{-/-} cKit⁺ behandelte Tiere in Rot. * TLR2^{-/-} vs. Wildtyp, # TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen vs. Wildtyp, *P<0.05, #P<0.05 n=5 Tiere pro Versuchsgruppe.

3.2.2. TLR2-defiziente Stammzellen bilden mehr Netzwerke im Matrigel-Plug-Angiogenese-Modell

Um die Auswirkung der isolierten Stammzellen auch in einem nicht-ischämischen Organismus überprüfen zu können, wurde das Matrigel-Plug-Angiogenese-Modell gewählt. Dabei wurde die Fähigkeit der Stammzellen untersucht, neue kapillarähnliche Strukturen zu bilden und somit ihr Vermögen sich innerhalb eines lebenden Organismus zu organisieren. Durch die Ausmessung der kapillar-ähnlichen Netzwerke konnte gezeigt werden, dass die TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen (867,0 ± 154,9µm) gegenüber den Wildtyp cKit⁺ Zellen (255,2 ± 91,43µm) mehr Netzwerke im Matrigel-Plug bildeten. Jedoch konnte intrakardiales injiziertes Lectin in den Matrigel-Plugs nicht dargestellt werden, was darauf schließen lässt, dass die Netzwerke nicht am Blutkreislauf angeschlossen waren. Damit zeigt sich, dass die TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen ein höheres Potenzial besitzen eigene Netzwerke zu bilden.

A



B

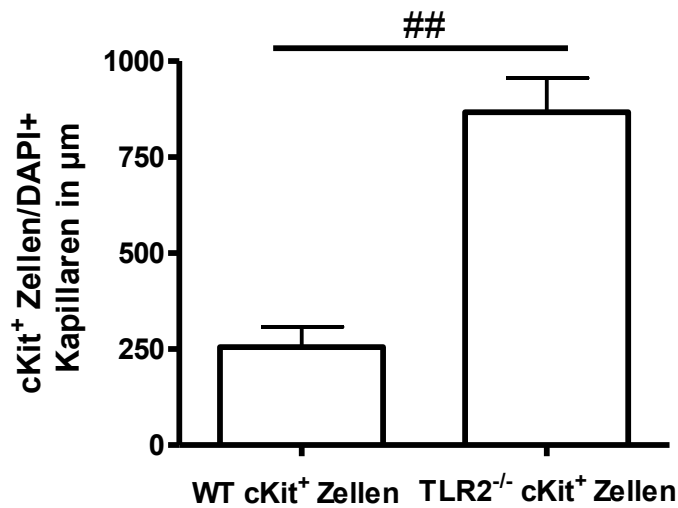


Abbildung 10: Darstellung der Kapillarbildung von TLR2^{-/-} Stammzellen im Matrigelplug

A Fluoreszenzaufnahmen vom Matrigel-Plug aus der Maus in 200-facher Vergrößerung, Blau sind Zellkerne mit DAPI gefärbt und Rot stellt die Membranfärbung der Knochenmarkszellen dar. Dabei wurden 2×10^6 Zellen pro Plug injiziert. **B** Quantitative Zusammenfassung der Netzwerklänge der Kapillaren der DAPI/BMC doppelt positiven Zellen. #vs. Wildtyp BMC, ## $P < 0.01$ Student T Test. $n=3$

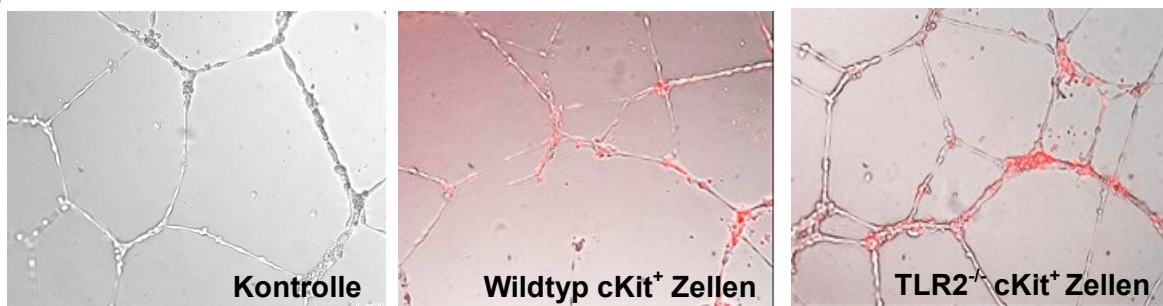
3.3. Die hämatopoetischen Stammzellen haben proangiogene Effekte auf ausdifferenzierte Endothelzellen

Nachdem gezeigt wurde, dass TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen *in vivo* sowohl im Hinterlaufischämiemodell als auch im Matrigel-Plug eine proangiogene Wirkung haben, wurde untersucht, ob dieser Effekt durch die Wirkung der cKit⁺ Zellen auf ausdifferenzierte Endothelzellen erklärt sein könnte. Dazu wurden verschiedene Angiogenese *in vitro* Modelle genutzt, um die Modulation der Fähigkeiten der Endothelzellen hinsichtlich der Kapillarbildung, der Migration und der Aussprossung als wesentliche Bestandteile des angiogenen Prozesses durch Stammzellen zu untersuchen.

3.3.1. TLR2-defiziente Stammzellen unterstützen Endothelzellen bei der Netzwerkbildung im Matrigel-Angiogenese-Modell

Es konnte gezeigt werden, dass die Netzwerke der Endothelzellen bei einer Ko-Inkubation mit TLR2-defizienten Knochenmarkzellen länger sind als im Vergleich zur Kontrolle ($1,23 \pm 0,04$ fach für TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen im Vergleich zur Kontrolle). Auch die Anzahl der in dem Netzwerk integrierten Zellen ist höher, was darauf schließen lässt, dass sich die Zellen besser in den Verband der Endothelzellen einfügen und dass deren Anwesenheit die Endothelzellen fördert mehr Angiogenese zu betreiben und sich stärker zu vernetzen.

A



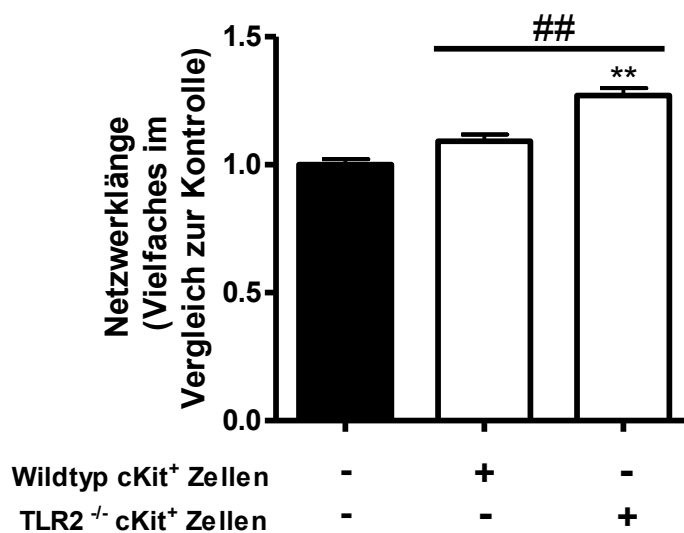
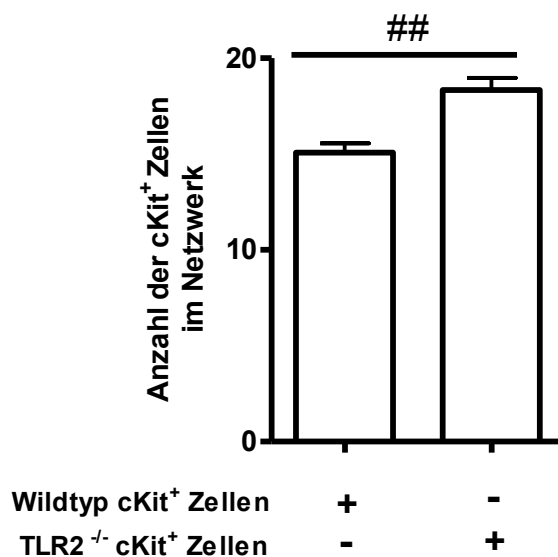
B**C**

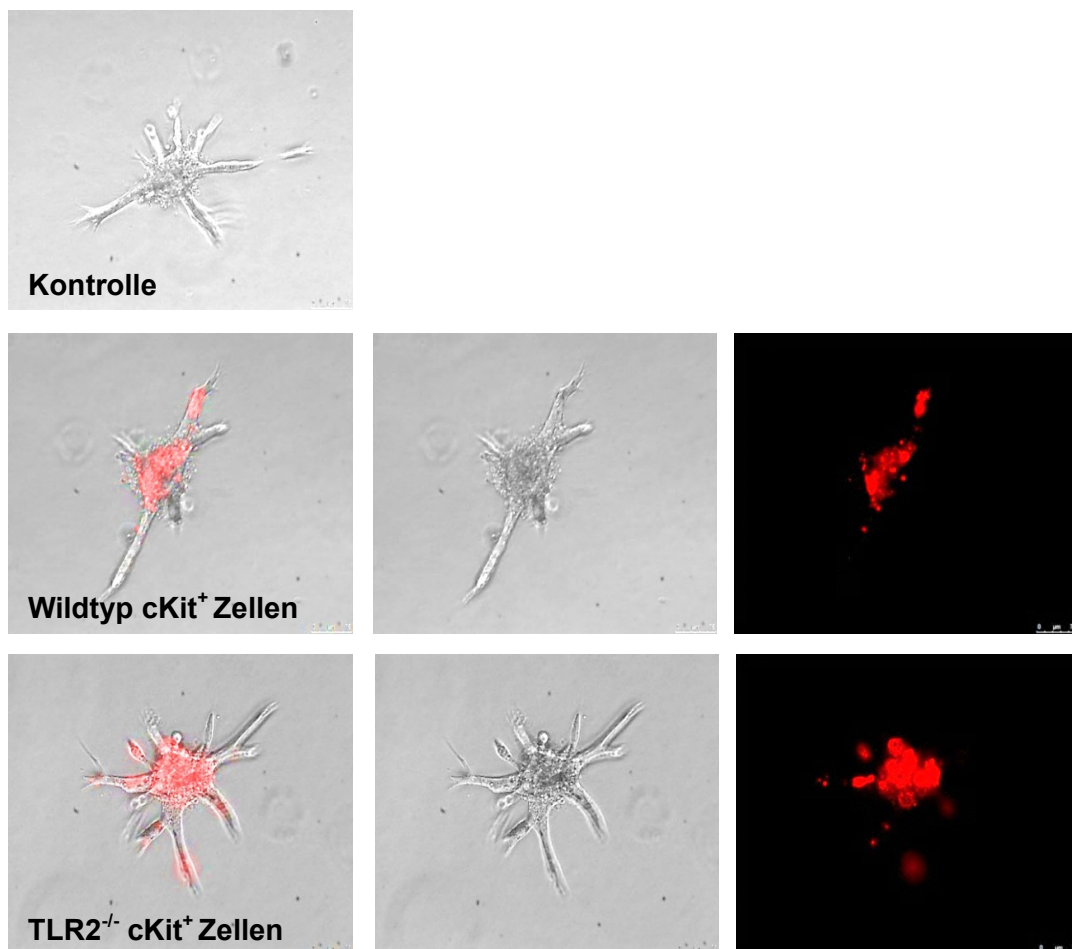
Abbildung 117: TLR2^{-/-} Stammzellen im Matrigel-Angiogenese-Modell

A Die hier abgebildeten Fotografien sind Überlagerungen von Durchlichtmikroskopien und den Bildern der Fluoreszenzmikroskopie in 100-facher Vergrößerung nach 8 Stunden. Wie man erkennen kann, integrieren sich die rot markierten hämatopoetischen Stammzellen in die Netzwerke der Endothelzellen. Es wurden 1×10^4 Endothelzellen mit 3×10^6 Stammzellen ko-inkubiert. **B** Quantitative Zusammenfassung der Netzwerklänge. * vs. Kontrolle, # vs. Wildtyp cKit⁺ Zellen, **P<0.01, ##P<0.01 **C** Anzahl der Knochenmarkstammzellen im Netzwerk der Endothelzellen. #vs. Wildtyp cKit⁺ Zellen, ##P<0.01. n= 3

3.3.2. Die dreidimensionale Sprossung von Endothelzellen wird durch TLR2-defiziente Stammzellen gefördert

Mit Hilfe des Sphäroid-Angiogenese-Modells wurde die unterstützende Fähigkeit der Stammzellen, ausdifferenzierte Endothelzellen im angiogenen Prozess zu stimulieren, erneut untersucht. Dazu wurden ca. 8000 cKit⁺ Zellen mit in das Methylzellulosegemisch gegeben und diese gemeinsam mit den Endothelzellen für 24 Stunden inkubiert, um sie dann in die Kollagenmatrix zu überführen. Auch in diesem zweiten Angiogenese Modell stellte sich heraus, dass die Zugabe von TLR2^{-/-} Stammzellen längere und vermehrte Sprossenbildung bei den Endothelzellen im Vergleich zur Kontrolle und im Vergleich zur Wildtyp Stammzellpopulation hervorrief (1,55±0,39fach für TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen im Vergleich zu 1,13±0,35fach für Wildtyp cKit⁺ Zellen). Es konnte auch dargestellt werden, dass die cKit⁺ Zellen der TLR2-defizienten Tiere vermehrt in den ausgesprosten Arealen der Sphäroide zu finden waren und sich somit wieder die verbesserte Integrationsfähigkeit dieser Zellen darstellte.

A



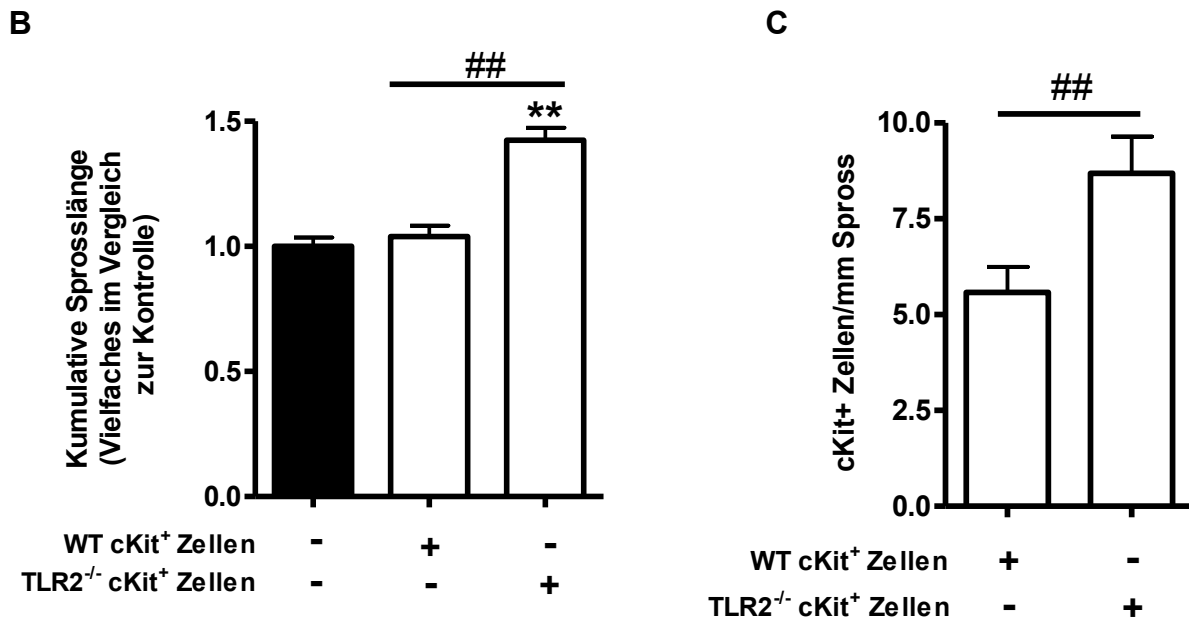


Abbildung 12: TLR2^{-/-} Stammzellen im Sphäroid-Angiogenese-Modell

A Darstellung einzelner Sphäroide in 200-facher Vergrößerung. In Rot dargestellte fluoreszierende Stammzellen. **B** Quantitative Zusammenfassung der kumulativen Sprosslänge. * vs. Kontrolle, # vs. Wildtyp cKit⁺ Zellen, **P<0.01, ###P<0.01. **C** Quantitative Zusammenfassung der Anzahl der Knochenmarkstammzellen welche sich in den Sprossen der Sphäroide befinden. Student t-test , # vs. Wildtyp cKit⁺ Zellen, ###P<0.01. n=5

3.3.3. Die Migration von Endothelzellen ist durch Ko-Inkubation mit TLR2-defizienten Stammzellen verbessert

Die Knochenmarkzellen wurden ebenfalls in einem Migrations-Modell untersucht. Im Verlauf von 8 Stunden konnte beobachtet werden, dass die Endothelzellen unter dem Einfluss von TLR2-defizienten Stammzellen die Wundfläche im Vergleich zur Kontrolle, sowie im Vergleich mit Endothelzellen in der Präsenz von Wildtyp Knochenmarkzellen schneller verschlossen. Die TLR2-defizienten Knochenmarkstammzellen zeigten somit eine höhere Potenz, die Endothelzellen im Wundverschluss zu unterstützen.

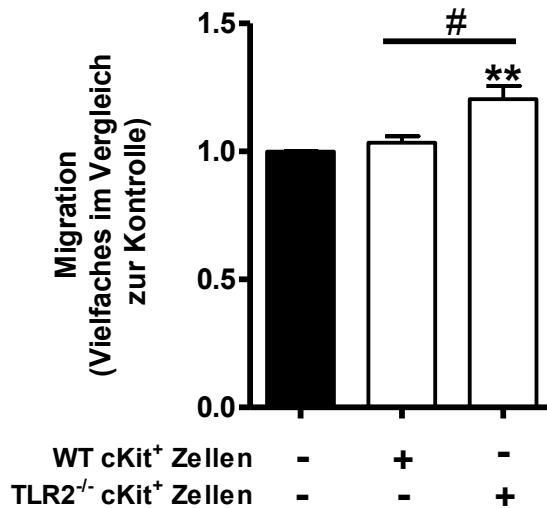
A**B**

Abbildung 8: TLR2^{-/-} Stammzellen im Migrationsmodell

A Lichtmikroskopische Aufnahmen des Endothelzellrasens mit Wundkreuzen. Rot fluoreszierend sind die Knochenmarkzellen (50.000 pro Well) erkennbar. **B** Quantitative Zusammenfassung nach 4 Stunden der noch offenen Wundfläche im Vergleich zur Kontrolle. * vs. Kontrolle, # vs. Wildtyp cKit⁺ Zellen. #P<0.05, **P<0.01, n=5.

3.3.4. TLR2-defiziente Stammzellen zeigen eine vermehrte Aktivierung der MAP-Kinase AKT

Das sogenannte „Homing“ von hämatopoetischen Zellen an den Ort der Ischämie ist ein wichtiger Mechanismus des angiogenen Prozesses [Rafii S 2003]. Während einer Ischämie wird vermehrt SDF-1 von Geweben exprimiert und dadurch verstärkt SDF-1 die Rekrutierung von CXCR4 positiven Stammzellen aus dem Kreislauf [Ceradini DJ 2004]. Bei dem Vergleich der Mengen an CXCR4 Expression in Wildtyp und TLR2^{-/-}

cKit⁺ Zellen zeigt sich jedoch kein Unterschied (**Abbildung 14**). Stattdessen konnte eine erhöhte Aktivierung (d.h. Phosphorylierung) des nachgeschalteten Signalmoleküls, der Proteinkinase B (AKT), in TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen aufgezeigt werden. Diese erhöhte Aktivierung der MAP-Kinase AKT in TLR2^{-/-} Stammzellen im Vergleich zu Wildtyp Stammzellen könnte die Ursache für die erhöhte Potenz dieser Zellen bei der Unterstützung des angiogenen Prozesses sein.

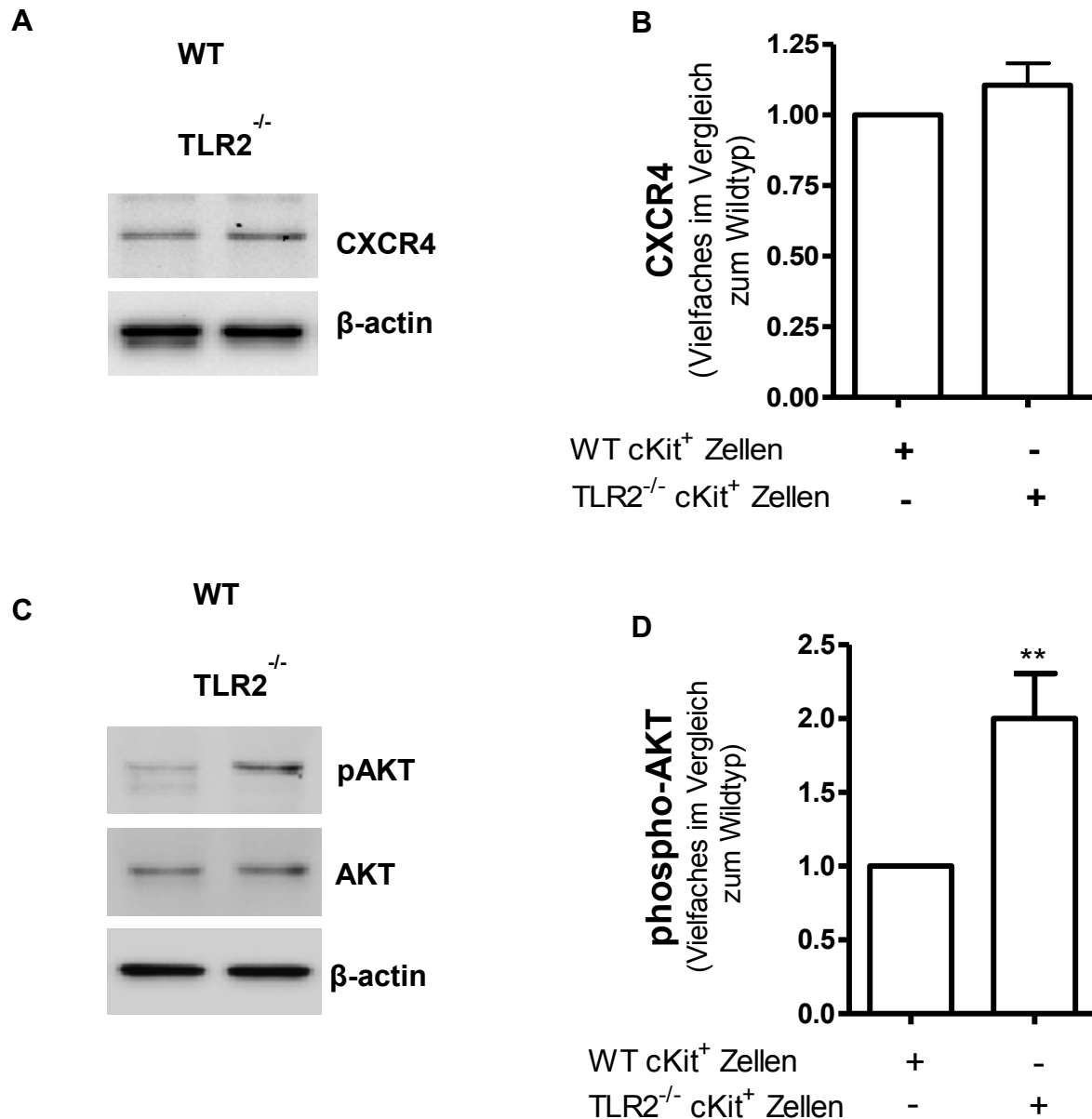


Abbildung 14: TLR2^{-/-} cKit⁺ Stammzellen zeigen eine gleichbleibende CXCR4 Expression aber eine erhöhte basale Aktivierung der MAP-Kinase AKT

A Repräsentative Abbildung des Western Blot für CXCR4 von Wildtyp cKit⁺ Zellen und TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen. **B** Quantitative Zusammenfassung der densitometrischen Messung für CXCR4. **C** Repräsentative Abbildung des Western Blots für phosphorylierten AKT(pAKT), AKT und der Ladungskontrolle β-Aktin. **D** Quantitative Zusammenfassung der densitometrischen Messung für pAKT. * WT cKit⁺ Zellen vs. TLR2^{-/-} cKit⁺ Zellen, *P<0.05.

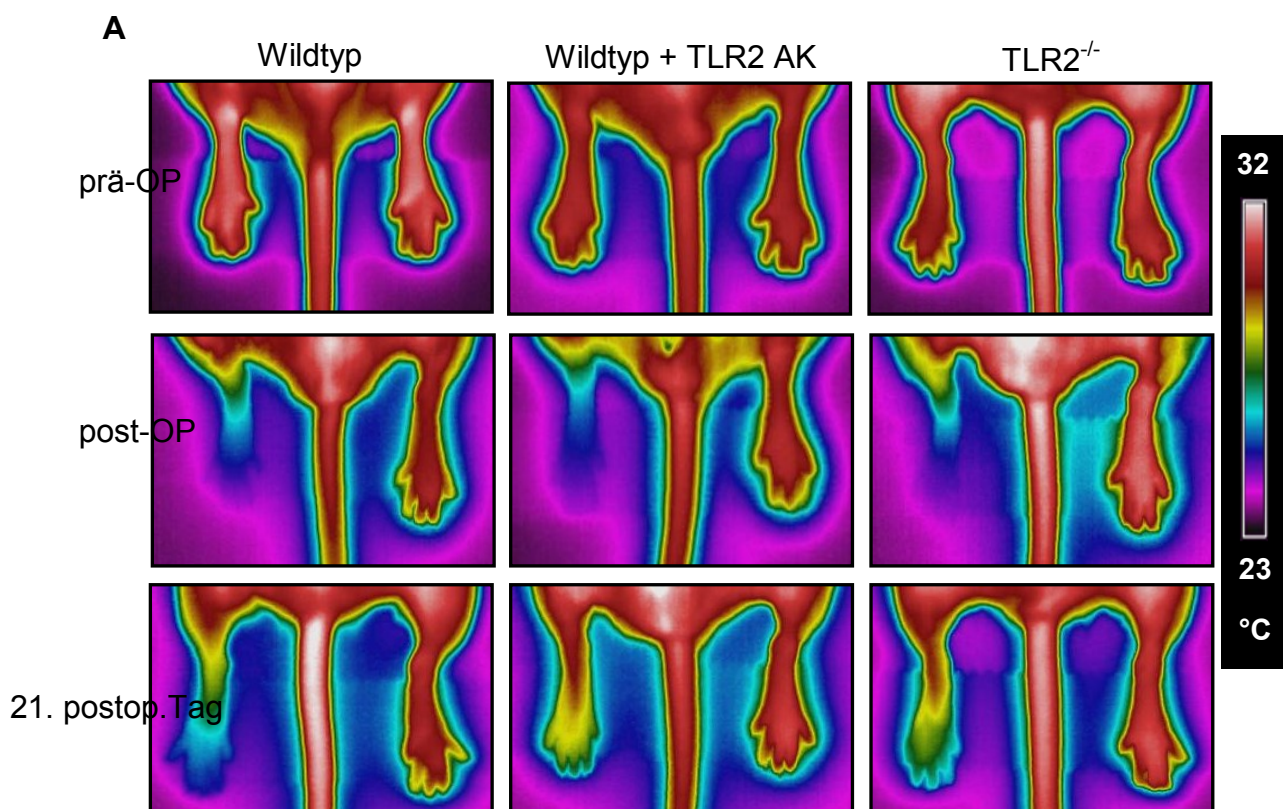
3.4. Die ischämie-induzierte Angiogenese wird durch die Injektion von TLR2-blockierenden-Antikörpern verstärkt

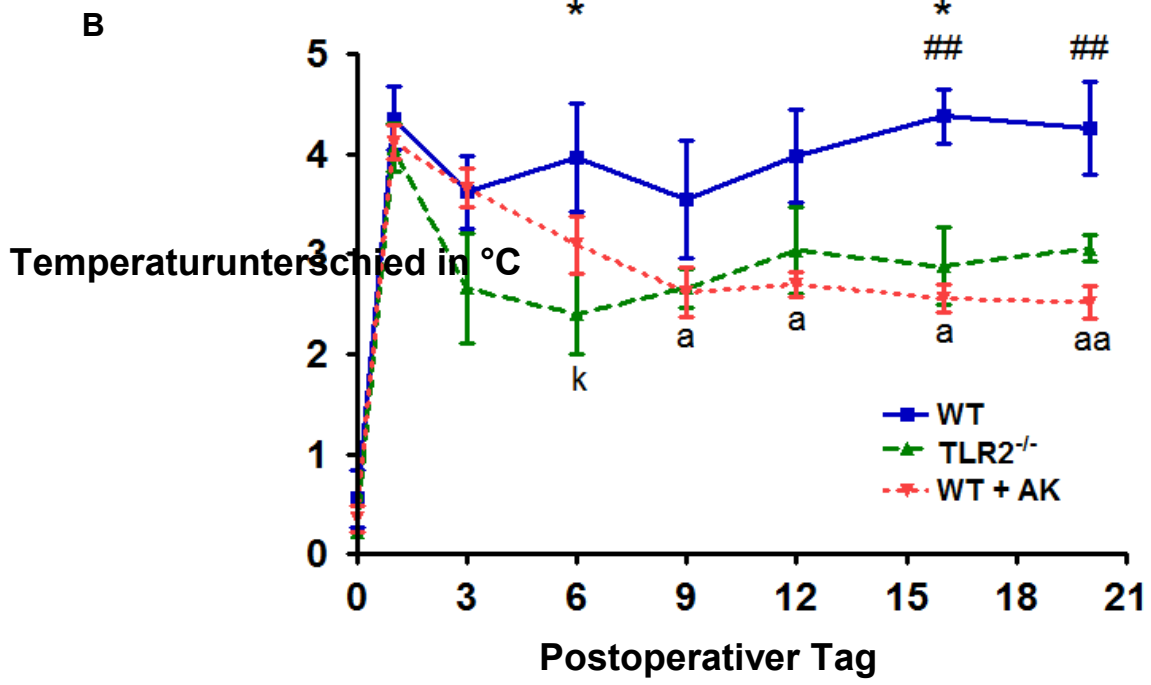
Es konnte gezeigt werden, dass eine TLR2 Defizienz per se, aber auch eine Nachahmung dieser durch TLR2-defizienter Stammzellen einen proangiogenen Effekt hat. Da jedoch eine TLR Defizienz klinisch nicht umsetzbar ist, wurde überprüft, ob dieser Effekt auch durch TLR2-blockierende-Antikörper induziert werden könnte. Dazu wurden diese Antikörper zunächst im Hinterlaufischämiemodell verwandt, um zu überprüfen, inwieweit sich der proangiogene Effekt reproduzieren lässt.

Die Versuchsgruppen bestanden aus 8-10 Tieren, wobei eine Gruppe mit den TLR2-blockierenden-Antikörpern (5µg/g Maus in 100µl PBS; T2.5, eBioscience, USA) und die Kontrollgruppe mit Kontroll-IgG (5µg/g Maus in 100µl PBS, Mouse IgG1 Isotype Control, eBioscience, USA) behandelt wurde. In der Thermografie konnte gezeigt werden, dass die mit TLR2-blockierenden-Antikörpern behandelten Mäuse bereits nach dem 6. postoperativen Tag eine verringerte Temperaturdifferenz gegenüber dem ersten postoperativen Tag zeigten, was dafür spricht, dass die Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern zu einer verbesserten zügigen Reperfusion der Hinterläufe führt. Im Gegensatz dazu zeigten die Wildtypiere nahezu keine Reduktion der Temperaturdifferenz und demnach auch keine Reperfusion nach dem 21. Tag. Im direkten Vergleich zeigte sich ab dem 16. postoperativen Tag ein Unterschied zwischen den mit TLR2-blockierenden-Antikörper behandelten Tieren und den Wildtypieren. Dadurch wird deutlich, dass eine Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern zu einer verbesserten Reperfusion nach Ischämie führt.

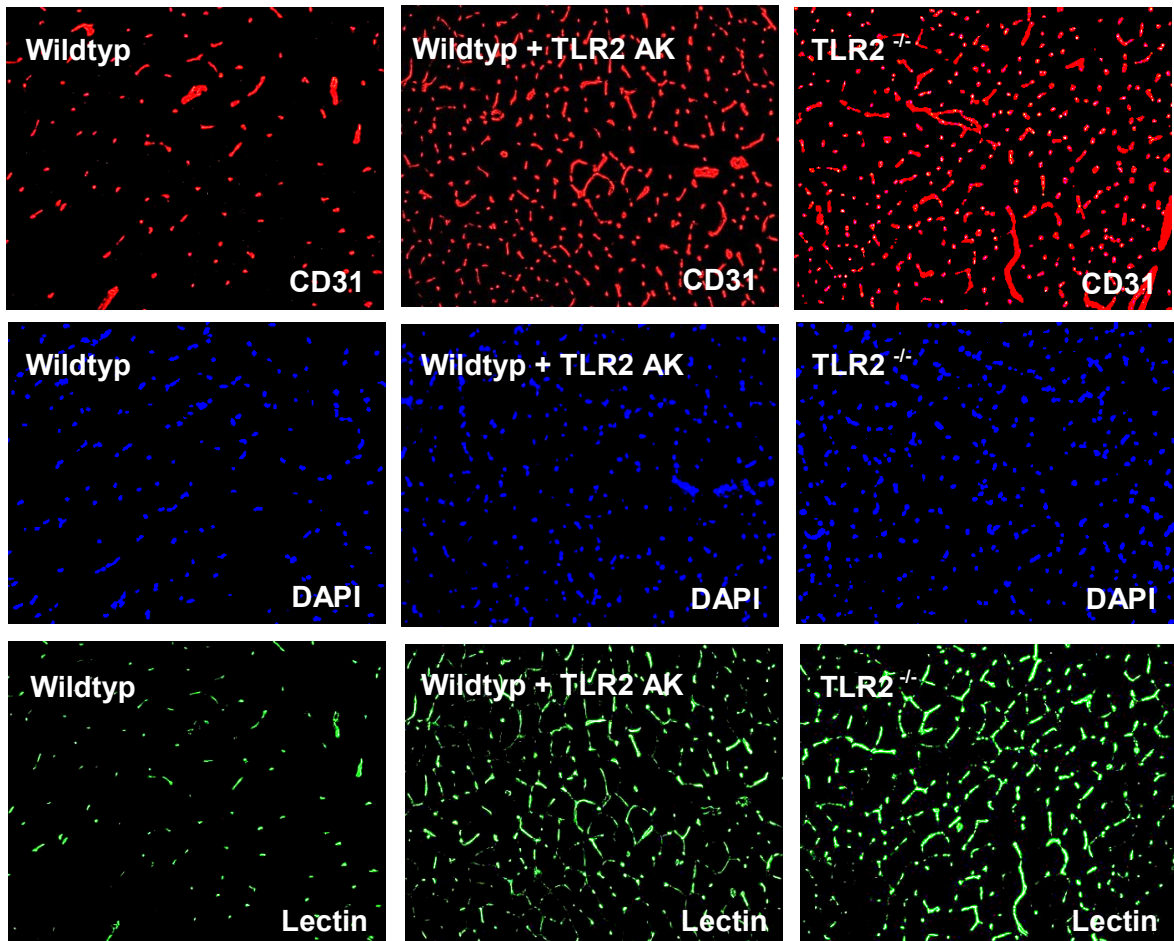
Im Vergleich zu den vorherigen Ergebnissen der TLR2^{-/-} Tiere wird deutlich, dass der günstige Effekt nahezu vergleichbar ist, was dafür spricht, dass TLR2-blockierende-Antikörper den Effekt einer TLR2 Defizienz nachahmen könnte.

Am 21. postoperativen Tag wurde der Musculus gastrocnemius entnommen und wie zuvor beschrieben mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen die Kapillardichte untersucht. Dabei zeigte sich, dass es bei einer Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer vermehrten Kapillarbildung im Muskel kam ($2672 \pm 540,3$ CD31+/DAPI+ Zellen/mm² im ischämischen Gewebe des operierten Beins einer mit TLR2-blockierenden-Antikörpern behandelten Maus im Vergleich dazu $1439 \pm 314,3$ CD31+/DAPI+ Zellen/mm² bei Wildtypieren $P < 0.001$). Diese Steigerung der Kapillardichte war wiederum vergleichbar mit der Kapillardichte in TLR2-defizienten Mäusen. Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass eine Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern mit einer verbesserten Reperfusion und einer vermehrten Kapillarbildung nach Ischämie einhergeht. Dieser proangiogene Effekt war nahezu vergleichbar mit den Effekten einer TLR2 Defizienz. Daher wäre es denkbar, mit Hilfe von TLR2-blockierenden Antikörpern im Rahmen vaskulärer Erkrankungen neue Therapiemöglichkeit zu ergründen.





C



D

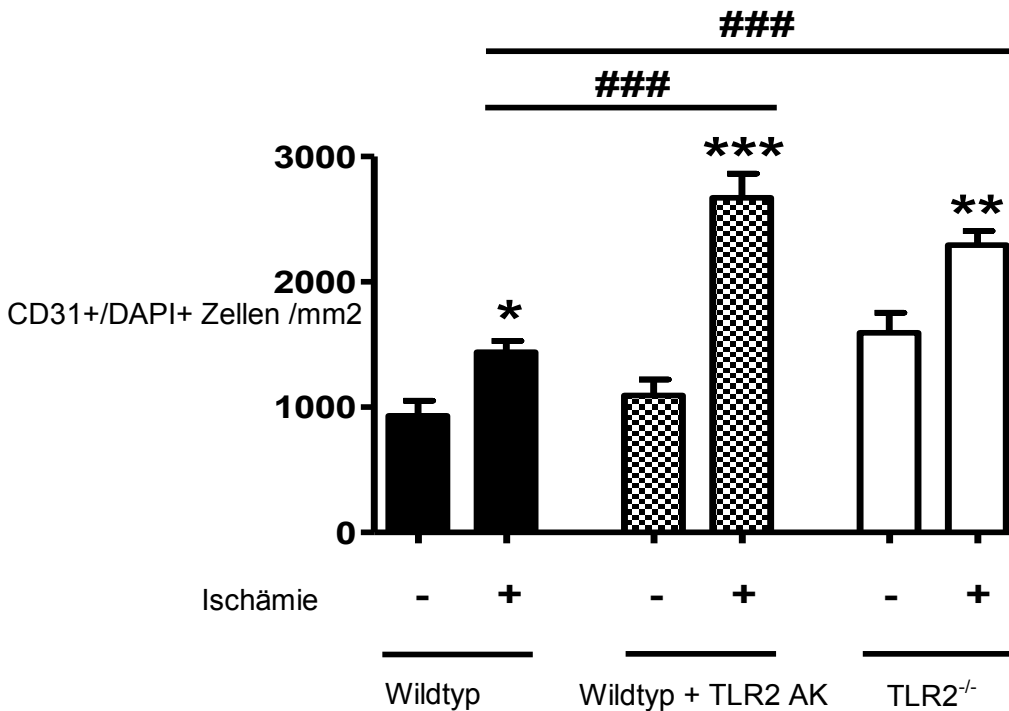


Abbildung 15: Ergebnisse der TLR2-blockierenden-Antikörper (TLR2 AK) im Hinterlaufischämiemodell

A Wärmebildaufnahmen der murinen Hinterläufe vor der Operation (Prä OP), direkt nach der Ligatur (Post OP) und Darstellung am 21. Tag nach der Ligatur. **B** Quantitative Darstellung der Ergebnisse. * WT vs. TLR2^{-/-}, # WT vs. TLR2 Antikörper; k 1.Tag TLR2^{-/-} vs. 6.Tag TLR2^{-/-}; a 1.Tag TLR2 Antikörper vs. 9.,12.,15.,21. Tag TLR2 Antikörper. *P<0.05, ##P<0.01. **C** Immunhistochemie des M. gastrocnemius. Rot=CD31 positive Zellen, Blau=DAPI Zellkernfärbung, Grün=intravasale Lectinfärbung. 200-fache Vergrößerung. **D** Quantitative Zusammenfassung der Ergebnisse. * vs. Kontrolle, # vs. Ischämie im WT. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ####P<0.001. n=10 Mäuse pro Gruppe.

3.5. TLR2-blockierende-Antikörper haben einen proangiogenen Effekt auf Endothelzellen

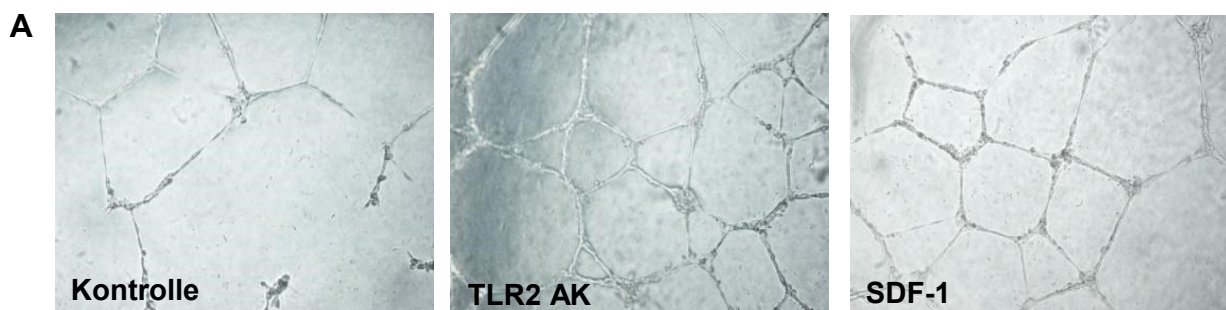
3.5.1. TLR2-blockierende-Antikörper haben einen positiven Effekt auf die Netzwerklänge im Matrigel-Angiogenese-Modell

Nachdem die günstigen Effekte von TLR2-blockierenden-Antikörpern im Hinterlaufischämiemodell der Maus hinsichtlich der Perfusion und der Kapillardichte im M. gastrocnemius dargestellt werden konnten, wurde untersucht, inwieweit diese

Effekte durch eine direkte Wirkung auf Endothelzellen vermittelt sein könnten. Dazu wurden zunächst Endothelzellen im Matrigel-Angiogenese-Modell untersucht, um die Auswirkung der TLR2-blockierenden-Antikörper *in vitro* zu beurteilen. Dabei wurde zum einen der monoklonale TLR2-blockierenden-Antikörper (T2.5; eBioscience, USA) sowie auch ein polyklonaler TLR2-blockierenden-Antikörper (Pab hTLR2; InvivoGen; CA USA) gewählt. Als Vergleich wurde dazu der Stromal cell derived Faktor (SDF-1) gewählt, der als starker proangiogener Faktor gilt [Kuhlmann CRW 2005].

Endothelzellen haben die Eigenschaft, im Matrigel Netzwerke auszubilden. Es konnte gezeigt werden, dass sich eine Stimulation mit TLR2-blockierenden-Antikörpern positiv auf die Netzwerklänge der Zellen auswirkt. Dabei ist die Zunahme der Netzwerklänge durch eine Behandlung mit TLR2-blockierende-Antikörpern mit der des Stromal cell derived Factor (SDF-1) vergleichbar ($1,29 \pm 0,09$ fach für TLR2-blockierenden-Antikörper [$10 \mu\text{g/ml}$] im Vergleich zu $1,24 \pm 0,16$ fach für SDF-1 [50ng/ml]). In einer Titrationsreihe konnte dargestellt werden, dass bereits ab einer TLR2-blockierenden-Antikörperkonzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ eine gleich starke Netzwerkformation auftritt wie unter Zugabe von SDF-1. Durch Anwendung höherer Konzentrationen konnte der Effekt der TLR2-blockierenden-Antikörper jedoch nicht weiter gesteigert werden (**Abbildung 16B**).

Damit konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von TLR2-blockierenden-Antikörpern einen positiven Einfluss auf die Netzwerkbildung von Endothelzellen hat.



B

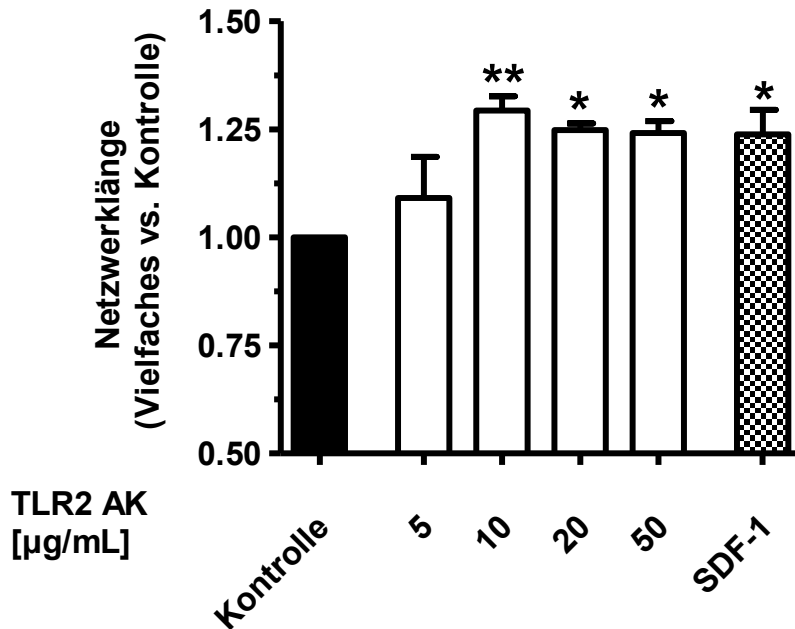


Abbildung 16: TLR2-blockierende-Antikörper (TLR2 AK) im Matrigel-Angiogenese-Modell

A Fotografien der Netzwerke in 100-facher Vergrößerung nach 8 Stunden unter der Behandlung der Zellen mit TLR2 Antikörpern (AK) [10 $\mu\text{g/ml}$] und SDF-1 [50 ng/ml]. **B** Quantitative Zusammenfassung der Ergebnisse. * vs. Kontrolle. * $P < 0.05$ und ** $P < 0.01$. $n = 8$

3.5.2. Die Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern hat einen stimulierenden Effekt auf die Sprosslänge von Endothelzellen

Im Sphäroid-Angiogenese-Modell kann man die Fähigkeit von Endothelzellen untersuchen, in einen dreidimensionalen Raum auszusprossen. Dabei wachsen aus den Endothelzellverbänden Sprossen in das umliegende Kollagen, wie auf **Abbildung 17A** zu erkennen ist. In der Titrationsreihe der TLR2-blockierenden-Antikörper konnte erneut dargestellt werden, dass die Endothelzellen bei einer Konzentration ab 10 $\mu\text{g/ml}$ der Antikörper vermehrt und verlängerte Sprossen ausbildeten (1,65 \pm 0,34fach für TLR2-blockierende-Antikörper [10 $\mu\text{g/ml}$] im Vergleich zu Kontrolle; $P < 0.01$). Der Effekt auf die Ausbildung der Sprossen gleicht sich zwischen einer Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörper [10 $\mu\text{g/ml}$] (1,65 \pm 0,34fach) und einer Behandlung mit SDF-1 [50ng/ml] (1,71 \pm 0,41fach). Die Titrationsreihe zeigt auf, dass der proangiogene Effekt von den TLR2-blockierendem-

Antikörpern ab einer Konzentration von 10µg/ml auftritt und sich auch in höheren Konzentrationen nicht steigern lässt.

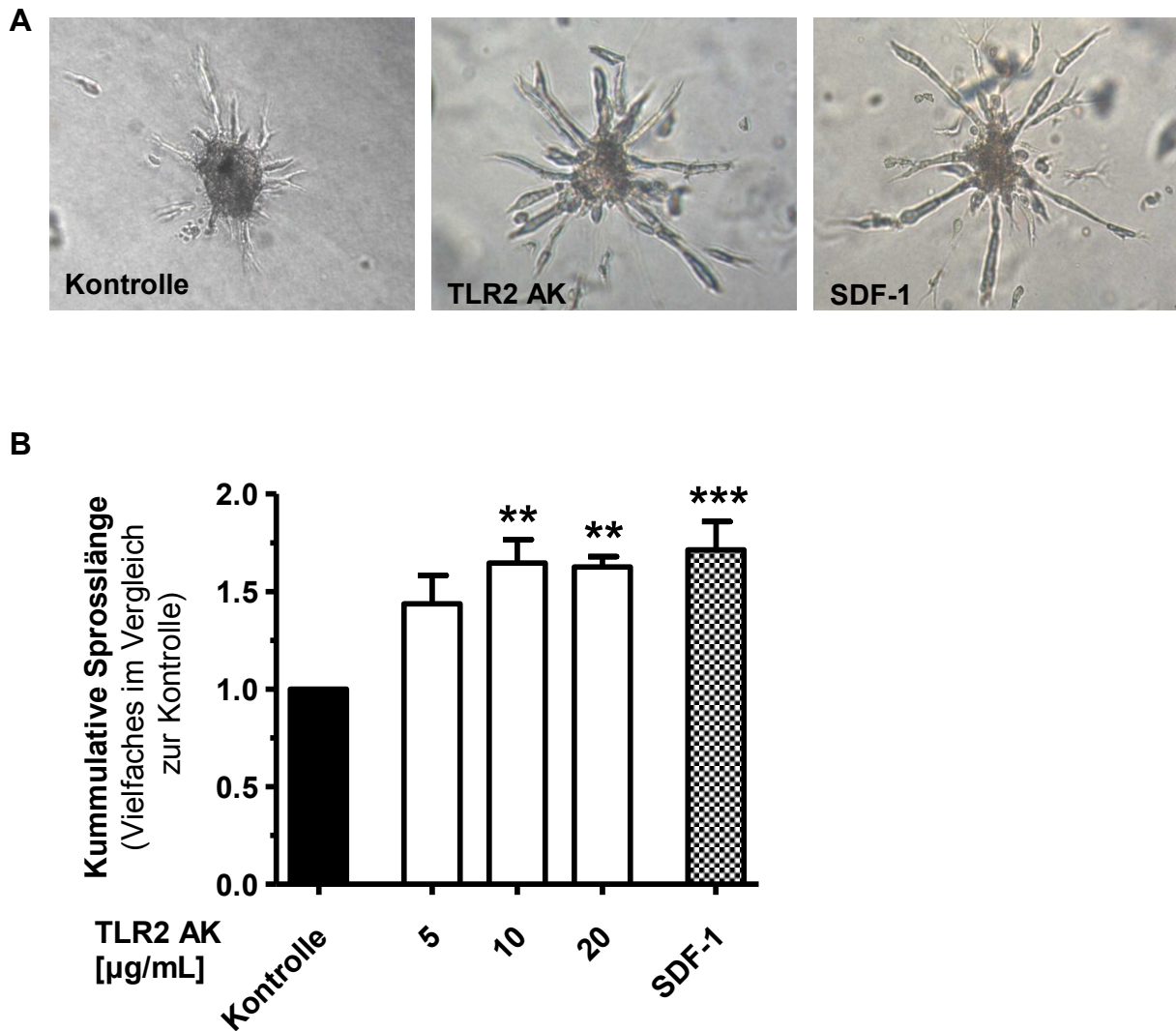


Abbildung 17: TLR2-blockierende-Antikörper (TLR2 AK) im Sphäroid-Angiogenese-Modell

A Repräsentative Abbildungen in 200-facher Vergrößerung der ausgesprosten Sphäroide unter der Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörper [10µg/ml] und SDF-1 [50ng/ml]. **B** Quantitative Zusammenfassung der Ergebnisse, * vs. Kontrolle. **P<0.01 ***P<0.001. n=8

3.5.3. TLR2-blockierende-Antikörper stimulieren die Migration von Endothelzellen

Der Prozess der Migration von Endothelzellen kann mit Hilfe eines Migrations-Modells dargestellt werden. Dabei wird die verursachte Wundfläche im zeitlichen Verlauf beobachtet. In diesem Modell wurde nun nach den vorangegangenen Titrationsreihen der Antikörper die Konzentration von 10µg/ml gewählt. Dabei stellte sich in 8 unabhängigen Versuchen heraus, dass Endothelzellen unter der Zugabe von TLR2-blockierenden-Antikörpern die Wundfläche schneller verschlossen, als unter Kontrollbedingungen. Nach einem Zeitraum von 4 Stunden konnte man einen Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den mit TLR2-blockierenden-Antikörpern behandelten Zellen erkennen ($1,73 \pm 0,30$ fach für TLR2-blockierende-Antikörper [10µg/ml] im Vergleich zu Kontrolle; $P < 0.01$). Denselben fördernden Effekt auf die Migration hat auch wieder der SDF-1 ($1,76 \pm 0,33$ fach SDF-1 [50ng/ml] im Vergleich $1,73 \pm 0,30$ fach für TLR2-blockierende-Antikörper [10µg/ml]).

A



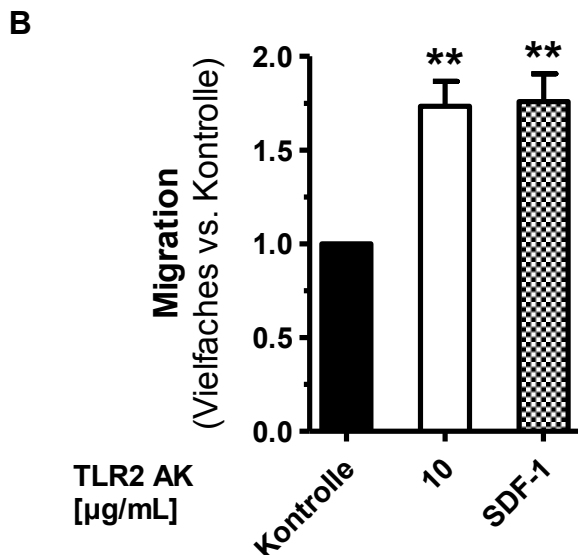


Abbildung 18: TLR2-blockierende-Antikörper (TLR2 AK) im Migrationsmodell

A Abbildung der Wundkreuze nach 4 Stunden. Im Vergleich dargestellt sind unbehandelte Kontrollzellen, mit TLR2-blockierenden-Antikörper [10µg/ml] oder mit SDF-1 [50ng/ml] behandelte Zellen in 100-fache Vergrößerung. **B** Quantitative Zusammenfassung der Ergebnisse. Dargestellt ist ein Vielfaches der Kontrolle, wobei die Migration der Zellen aufgetragen ist. *vs. Kontrolle, **P<0.01. n=8

3.5.4. Die TLR2 Stimulation hat keine Effekte im Matrigel-Angiogenese-Modell

Um nun im Gegensatz zur Blockade des TLR2 auch den Effekt einer TLR2 Stimulation darzustellen, wurden wieder die *in vitro* Versuche an den Endothelzellen genutzt. Dabei wurden verschiedene Liganden wie Pam2CSK4 [5µg/ml], ein synthetischer TLR2/6 Ligand, Pam3CSK4 [5µg/ml], ein synthetischer TLR1/2 Ligand, Lipoteichonsäure (LTA) [50µg/ml], ein natürlicher TLR2 Ligand und im Vergleich Lipid A [5µg/ml], ein natürlicher TLR4 Ligand genutzt. Wie in **Abbildung 19** dargestellt, konnte gezeigt werden, dass keiner dieser Liganden einen Effekt auf die Netzwerklänge im Vergleich zur Kontrolle hatte (1,02±0,08fach für Pam2CSK4 im Vergleich zur Kontrolle, 1,01±0,13fach für LTA im Vergleich zur Kontrolle, 1,04±0,34fach für Pam3CSK4 im Vergleich zur Kontrolle, 0,95±0,10fach für Lipid A im Vergleich zur Kontrolle). Im Gegensatz dazu konnte man den proangiogenen Effekt der TLR2-blockierenden-Antikörper [10µg/ml], sowie der Positivkontrolle SDF-1[50ng/ml] nochmals bestätigen.

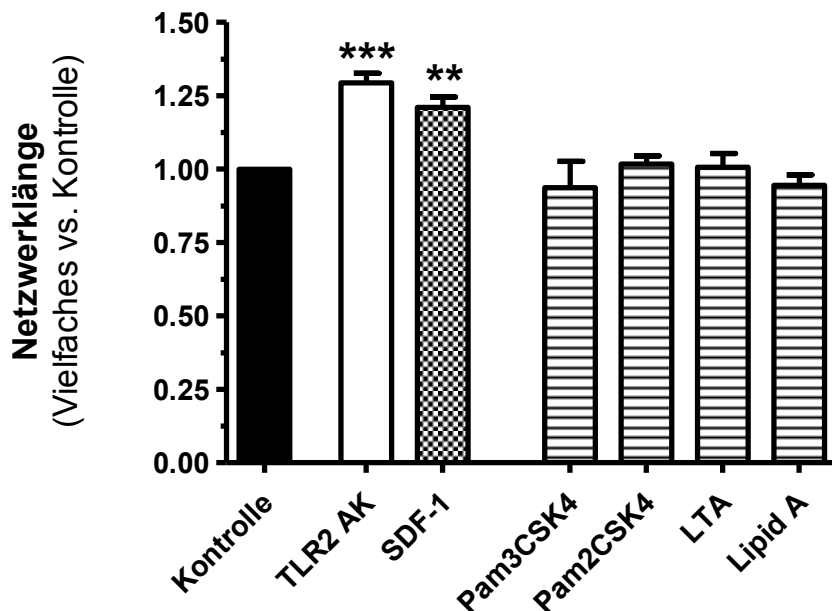


Abbildung 19: TLR2 und TLR4 Liganden im Matrigel-Angiogenese Modell

Quantitative Zusammenfassung der Netzwerklänge. Dargestellt sind der TLR1/2 Ligand (Pam3CSK4), der TLR2/6 Ligand (Pam2CSK4), der TLR2 Ligand (LTA) und der TLR4 Ligand (Lipid A). Im Vergleich dazu TLR2-blockierende-Antikörper (TLR2 AK) und SDF-1. * vs. Kontrolle. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $n = 8$

3.6. TLR2-blockierende-Antikörper führen zu einer Aktivierung des SDF-1 vermittelten Signalwegs

3.6.1. Die TLR2-blockierenden-Antikörper aktivieren den MAP-Kinasen Signalweg

Nachdem dargestellt werden konnte, dass eine Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen fördernden Effekt auf die Angiogenese hat, wurde untersucht in welchem Zusammenhang dieser Effekt mit dem SDF-1 Signalweg stehen könnte, da die Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern einen gleichsam Effekt wie eine Behandlung mit SDF-1 aufweist. Der Signalweg des SDF-1 führt über die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2, AKT und die Hemmung der MAP-Kinase p38. Daher wurde untersucht inwieweit eine Stimulation mit TLR2-blockierenden-Antikörpern zu einer Aktivierung der SDF-1

typischen Signalkaskaden führt. Dazu nutzten man das Western Blot Verfahren und untersuchte Endothelzellen hinsichtlich ihrer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2, AKT und p38, wobei eine Phosphorylierung einer Aktivierung der MAP-Kinasen entsprach. Dabei konnte bestätigt werden, dass eine Behandlung der Zellen mit SDF-1 zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen AKT und ERK 1/2 führt, nicht jedoch zu einer Aktivierung der p38 [Ho TK 2012].

Eine Stimulation mit TLR2-blockierenden-Antikörpern lieferte dieselben Ergebnisse wie eine Stimulation mit SDF-1, wobei eine zeitabhängige Aktivierung der Kinasen beobachtet werden kann. Dies gibt erste Hinweise darauf, dass der proangiogene Effekt der TLR2 Blockade über den SDF-1 Signalweg vermittelt sein könnte.

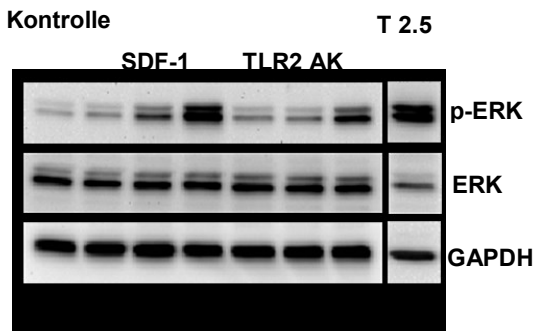
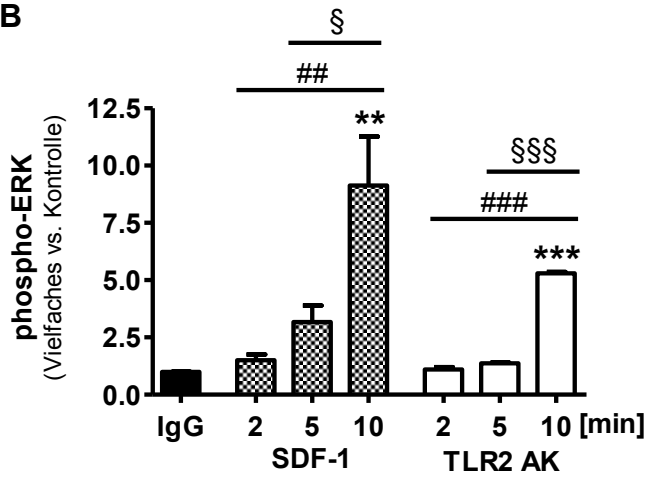
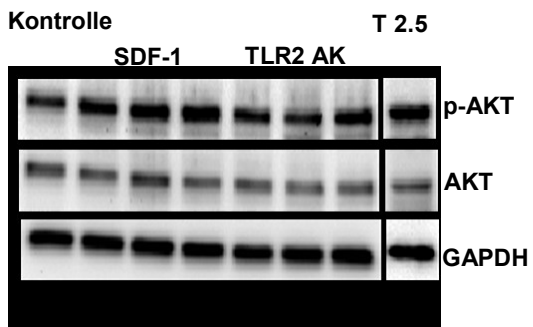
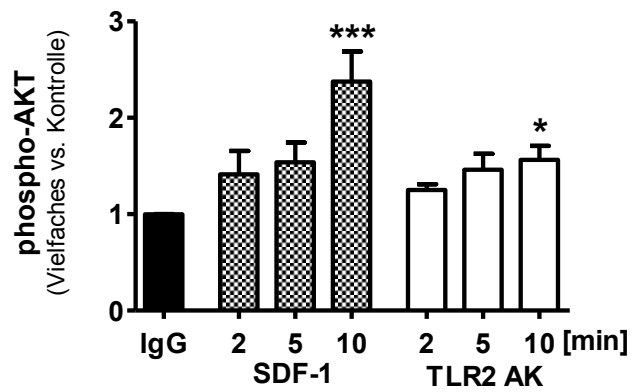
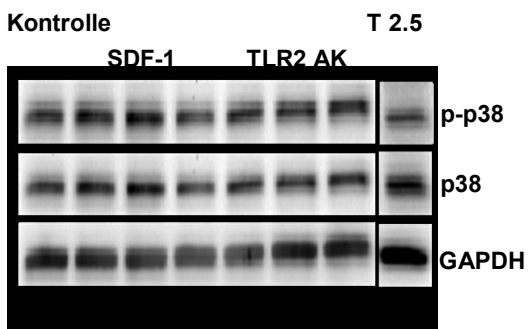
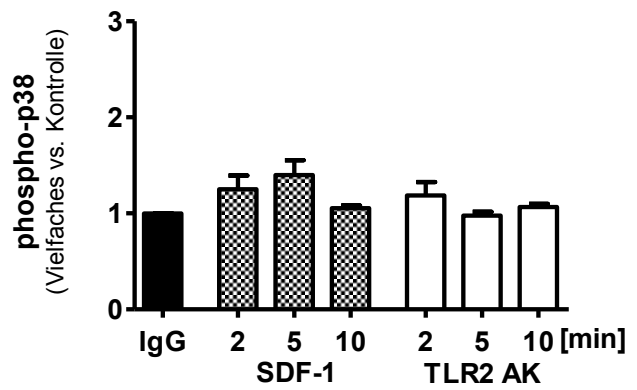
A**B****C****D****E****F**

Abbildung 20: Western Blot für ERK1/2, AKT und p38 mit TLR2-blockierenden-Antikörper (TLR2 AK) Behandlung

Grafische Darstellung der Proteinbanden der MAP-Kinasen und phosphorylierten MAP-Kinasen und die jeweiligen quantitative Zusammenfassung der Densitometrie der phosphorylierten MAP-Kinasen. In jedem Versuch wurde GAPDH mitgeführt um eine gleiche Proteinladung darzustellen. n=5 **A** Repräsentative Abbildung ERK1/2 und phosphorylierten ERK1/2 unter Stimulation mit SDF-1 [50ng/ml], polyklonalem TLR2 Antikörper [10µg/ml] (eBioscience) und monoklonalem TLR2 Antikörper [10µg/ml] (T2.5, Invivogen) für 2, 5 und 10 Minuten. **B** Quantitative Zusammenfassung der densitometrischen Daten des phosphorylierten ERK1/2. * Vergleich zur Kontrolle, # Vergleich zwischen 2 und 10 Minuten, § Vergleich 5 und 10 Minuten, *P<0.05, **P<0.001, #P<0.05, ##P<0.01, §P<0.05, §§§P<0,001. **C** Repräsentative Abbildung AKT und phosphorylierten AKT unter Stimulation mit SDF-1 [50ng/ml], polyklonalem TLR2 Antikörper [10µg/ml] (eBioscience) und monoklonalem TLR2 Antikörper [10µg/ml] (T2.5, Invivogen) für 2, 5 und 10 Minuten **D** Quantitative Zusammenfassung der densitometrischen Daten des phosphorylierten AKTs. * Vergleich zur Kontrolle, *P< 0.05, ***P<0.001. **E** Repräsentative Abbildung p38 und phosphorylierten p38 unter Stimulation von SDF-1 [50ng/ml], polyklonalem TLR2 Antikörper [10µg/ml] (eBioscience) und monoklonalem TLR2 Antikörper [10µg/ml] (T2.5, Invivogen) für 2, 5 und 10 Minuten **F** Quantitative Zusammenfassung der densitometrischen Daten des phosphorylierten p38.

3.6.2. Eine TLR2 Stimulation aktiviert den Signalweg der MAP-Kinasen nicht

Neben dem Ausbleiben eines proangiogenen Effekts zeigten stimulierende TLR2 Liganden auch keine Aktivierung der MAP-Kinasen, wie mittels Western Blot gezeigt wurde.

Die Zellen wurden zunächst vergleichbar mit den stimulierenden Liganden Pam3CSK4, Pam2CSK4, LTA und Lipid A für 2, 5 und 10 Minuten stimuliert. Der anschließende Western Blot zur Analyse von ERK1/2/phosphoERK1/2, AKT/phosphoAKT und p38/phospho38 erwies, dass keine der MAP-Kinasen durch eine Stimulation des TLR2 oder des TLR4 aktiviert wurde. Dazu wurde im Vergleich die Aktivierung der Kinasen durch SDF-1 nachgewiesen (**Abbildung 21**).

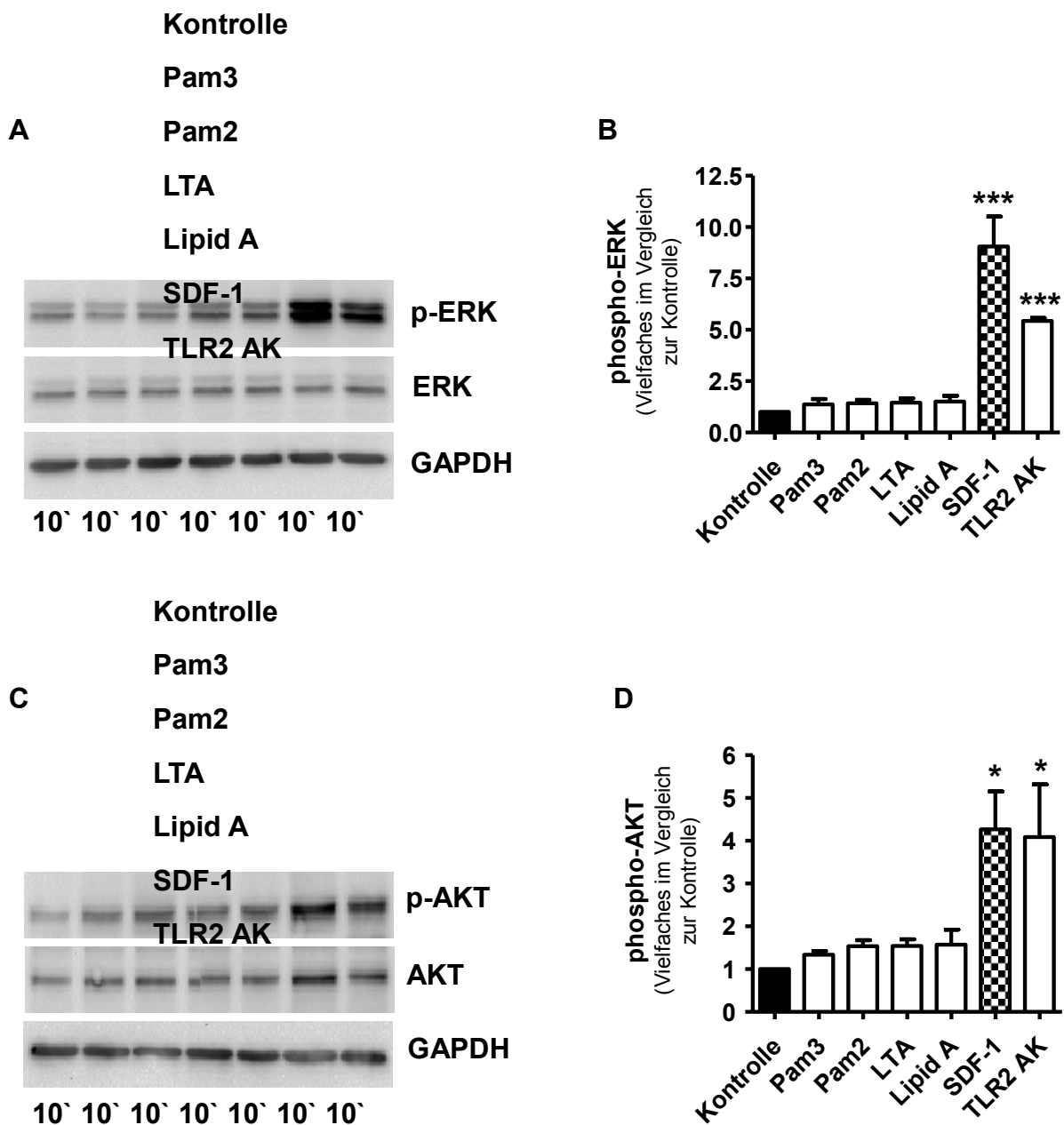


Abbildung 21: Western Blot für ERK1/2 und AKT mit TLR2 Liganden

A Repräsentative Western Blot Abbildungen für ERK1/2 und phosphoERK1/2. Die Zellen wurden entweder mit Pam3CSK4, Pam3CSK4, Lipid A, LTA, SDF-1 oder TLR2-blockierenden-Antikörpern (TLR2 AK) für 10 Minuten behandelt. **B** Quantitative Zusammenfassung der densitometrischen Messungen für phosphoERK1/2. * vs. Kontrolle, *** $P < 0.001$. **C** Repräsentative Western Blot Abbildungen für AKT und phosphoAKT. Die Zellen wurden entweder mit Pam3CSK4, Pam3CSK4, Lipid A, LTA, SDF-1 oder TLR2 Antikörpern für 10 Minuten behandelt. **D** Quantitative Zusammenfassung der densitometrischen Messungen für phosphoAKT.* vs. Kontrolle, * $P < 0.05$.

3.6.3. Die Inhibition von ERK1/2 und AKT führt zu einer Unterdrückung des proangiogenen Effekts der TLR2-blockierenden-Antikörper

Um die Bedeutung der MAP-Kinasen in der Vermittlung der proangiogenen Effekte der TLR2-blockierenden-Antikörper weiter zu überprüfen, wurden die einzelnen MAP-Kinasen mit spezifischen Inhibitoren blockiert und den Effekt auf die Wirkung der Antikörper beobachtet. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei einer Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern als auch bei einer SDF-1 Stimulation der proangiogene Effekt bei der Blockade der ERK1/2 oder AKT aufgehoben wird. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Inhibition der p38 keine Änderung des positiven Effekts auf die Angiogenese (0,70±0,15fach für TLR2-blockierende-Antikörper + FR180204, 0,79±0,18fach für TLR2-blockierende-Antikörper + LY294002, 1,27±0,02fach für TLR2-blockierende-Antikörper + SB202190 im Vergleich zu 1,19±0,05fach für TLR2-blockierende-Antikörper).

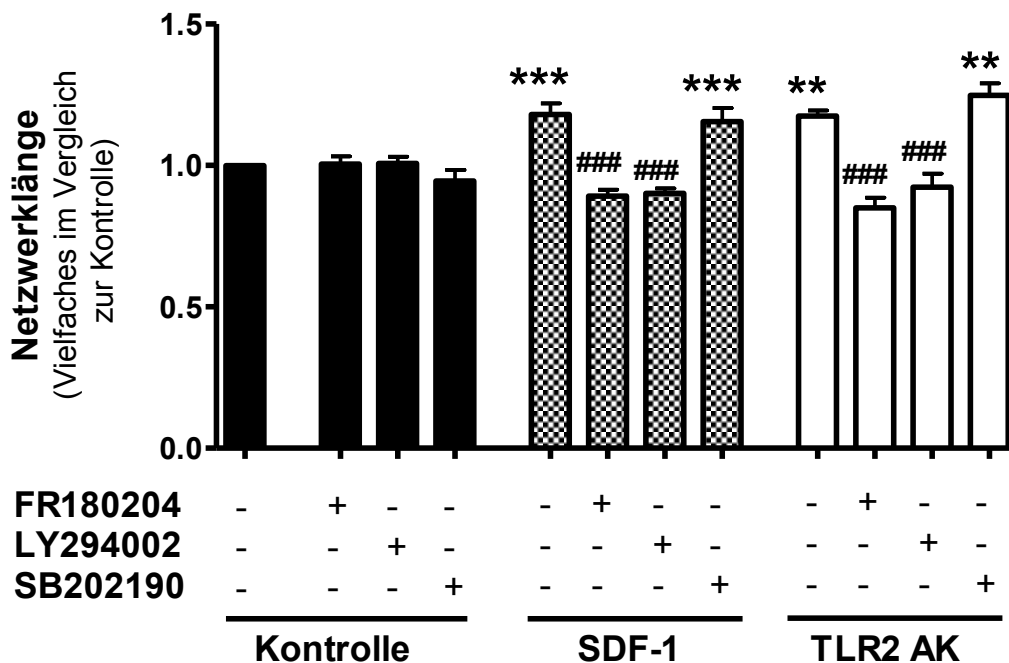


Abbildung 22: Inhibitoren von ERK1/2, AKT und p38 im Matrigel-Angiogenese-Modell

Quantitative Zusammenfassung der Netzwerklänge im Matrigel-Angiogenese-Assay nach 8 Stunden. Dargestellt sind der ERK1/2 Inhibitor (FR180204), der PI3Kinase Inhibitor (LY294002) und der p38 Inhibitor (SB202190). Im Vergleich zu TLR2-blockierenden-Antikörpern (TLR2 AK). *vs. Kontrolle, # vs. SDF-1. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 ####P<0.001, n = 4.

3.7 Die Interaktion zwischen dem TLR2 und dem SDF-1 Rezeptor CXCR4

3.7.1. Die Blockade von CXCR4 hat keine Auswirkung auf die proangiogene Wirkung der TLR2-blockierenden-Antikörper *in vitro*

In einer weiteren Versuchsreihe von n=8 Versuchen wurde im Matrigel-Modell wiederholt der positive Effekt von SDF-1 und der TLR2-blockierendem-Antikörper auf die Netzwerklänge gezeigt. Jedoch zeigt sich entgegen der Vermutung, dass eine gleichzeitige Blockade des CXCR4 den Effekt der TLR2-blockierenden-Antikörper aufheben würde, dass der Effekt der TLR2-blockierenden-Antikörper nicht beeinflusst wird ($1,13 \pm 0,06$ fach für TLR2-blockierende-Antikörper + CXCR4 Antikörper im Vergleich $1,10 \pm 0,07$ fach für TLR2-blockierende-Antikörper). Um diese Ergebnisse zu überprüfen nutzte man den CXCR4 Antagonisten AMD3100. Jedoch zeigte sich auch hier, dass eine Blockade des CXCR4 den proangiogenen Effekt der TLR2-blockierenden-Antikörper nicht unterdrückt ($1,07 \pm 0,04$ fach im Vergleich $1,10 \pm 0,07$ fach für TLR2-blockierende-Antikörper).

Zusammenfassend konnte dargestellt werden, dass die TLR2 Antikörper-vermittelten Effekte unabhängig von der Blockade des CXCR4 sind und somit auch unabhängig von der Ligandenbindung an den CXCR4.

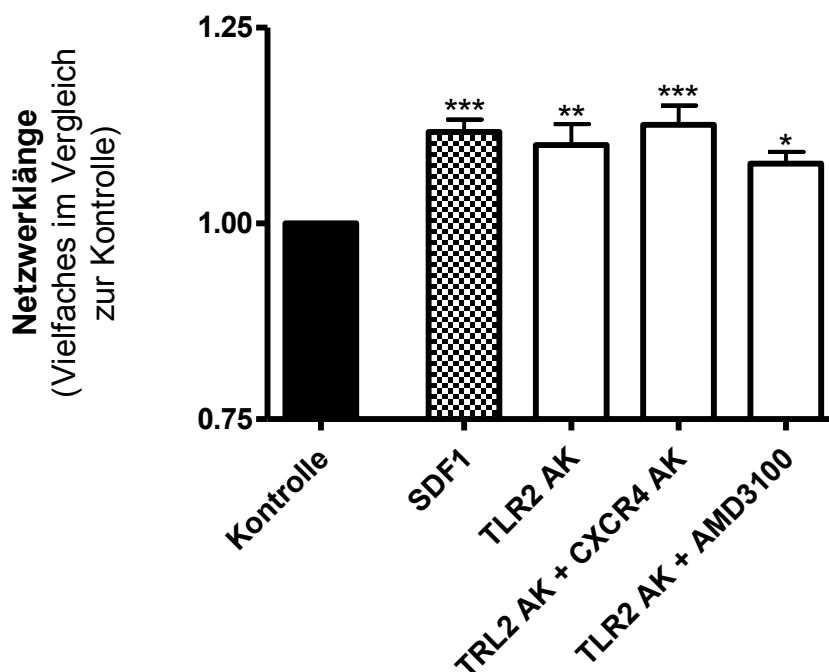


Abbildung 23: Blockade des CXCR4 im Matrigel-Angiogenese-Modell

Quantitative Zusammenfassung der Netzwerklänge nach 8 Stunden. Die Zellen wurden mit SDF-1 [50ng/ml], TLR2 Antikörper [10µg/ml] oder mit TLR2 Antikörpern (TLR2 AK) in Ko-Inkubation mit CXCR4 Antikörpern [10µg/ml] behandelt. * vs. Kontrolle, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, n = 5.

3.7.2. CXCR4 wird in der Vermittlung der proangiogenen TLR2-blockierenden-Antikörper-induzierten Effekte benötigt

Zuvor konnte dargestellt werden, dass eine Blockade des CXCR4 nicht zu einer Unterdrückung des proangiogenen Effekts der TLR2-blockierenden-Antikörper führt. Dies lässt darauf schließen, dass dieser Effekte unabhängig von der Bindung des CXCR4 Rezeptors sind. Es wurde nun untersucht, ob das Fehlen des CXCR4 durch eine Herunterregulation der Expression des Rezeptors mit Hilfe einer siRNA den proangiogenen Effekt der TLR2-blockierenden-Antikörper beeinflusst. Die mit siRNA transfizierten Zellen wurden dazu im Matrigel-Angiogenese-Modell verwendet. Dabei stellte sich dar, dass es unter der Stimulation der CXCR4 siRNA behandelten Zellen mit SDF-1 zu einer Unterdrückung des proangiogenen Effekt des SDF-1 kommt, wodurch sich die reduzierte Expression des CXCR4 verifizierte ($0,84 \pm 0,21$ fach für SDF-1 mit CXCR4-siRNA im Vergleich zu $1,25 \pm 0,15$ fach für SDF-1). Ein ähnlicher Effekt zeigt sich auch bei einer Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern und den Zellen mit zuvor herunterregulierten CXCR4 ($0,90 \pm 0,14$ fach für CXCR4-siRNA mit TLR2-blockierenden-Antikörper Behandlung im Vergleich zu $1,16 \pm 0,12$ fach für eine alleinige TLR2-blockierenden-Antikörper Behandlung). Damit wird deutlich, dass der CXCR4 an der Vermittlung des proangiogenen Effekts der TLR2-blockierenden-Antikörper beteiligt ist.

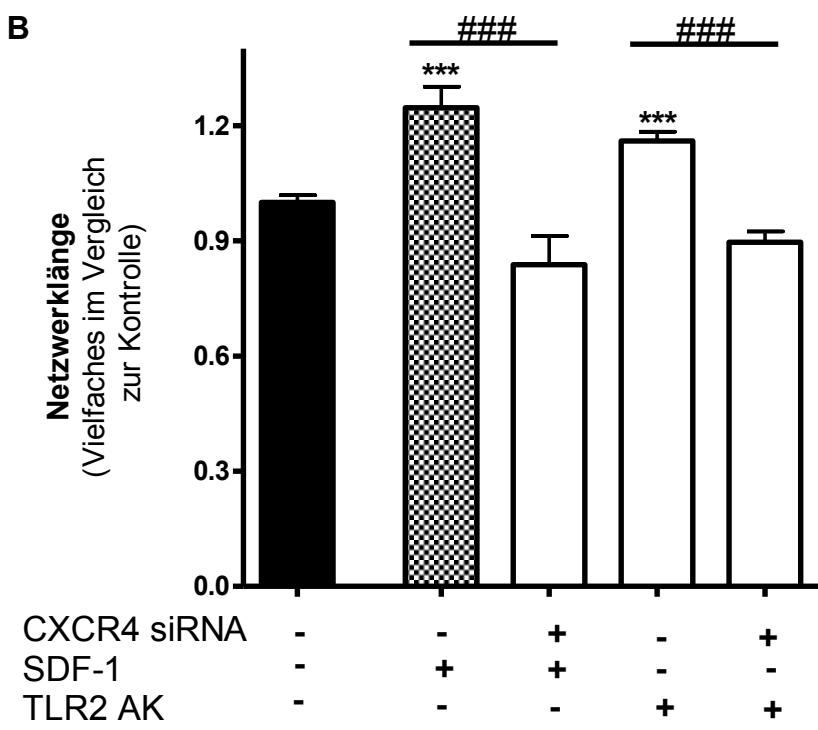
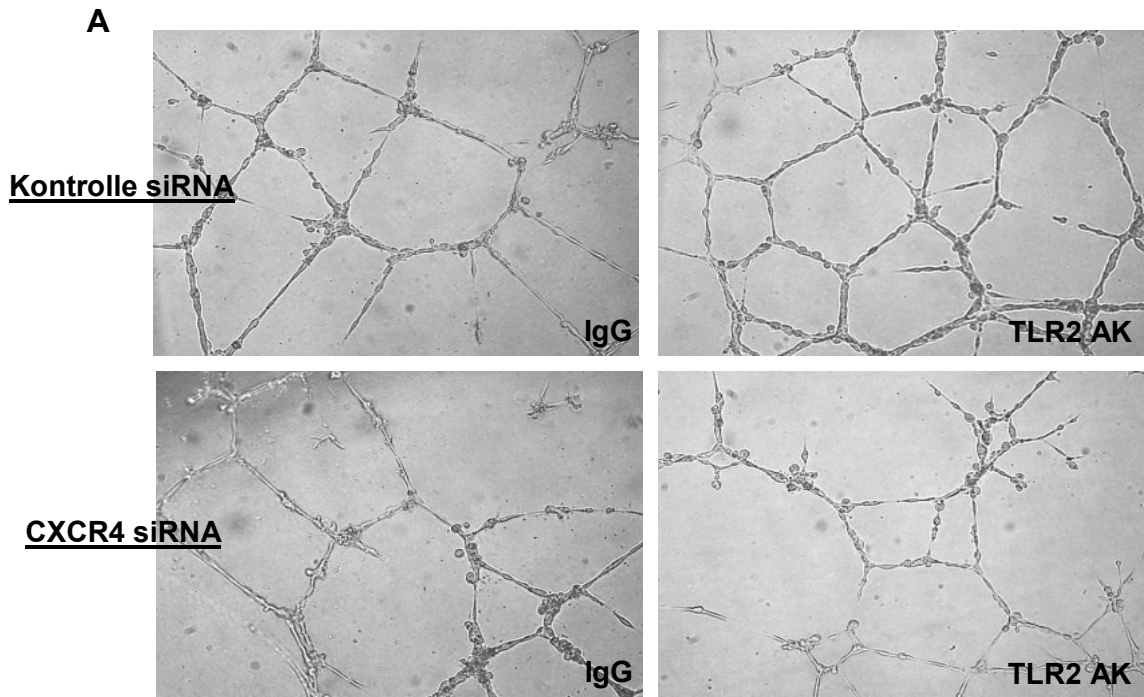


Abbildung 24: Behandlung mit CXCR4-siRNA im Matrigel-Angiogenese-Modell

A Repräsentative Abbildung der endothelialen Netzwerkformationen nach 8 Stunden in 200-facher Vergrößerung. Die Zellen wurden entweder mit einer Kontroll-siRNA oder einer CXCR4-siRNA vorbehandelt und dann entweder mit einem Kontroll-IgG, SDF-1 [50ng/ml] oder dem TLR2-blockierenden-Antikörpern (TLR2 AK) [10µg/ml] behandelt. **B** Quantitative Zusammenfassung der Netzwerklänge. * gegen Kontrolle, # gegen CXCR4-siRNA, ***P<0.001, ###P<0.001, n=5.

3.7.3. Die Unterdrückung des CXCR4 führt zu einer Inhibition der TLR2-blockierenden-Antikörper-vermittelten ERK1/2 Aktivierung

Um den funktionellen inhibitorischen Effekt der CXCR4-siRNA auf die Wirkung der TLR2-blockierenden-Antikörper auch auf die nachfolgende Signalkaskade nachzuweisen, wurde ein Western Blot nach der MAP-Kinase ERK1/2 durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die vorherige Behandlung der Zellen mit der CXCR4-siRNA zu einer Unterdrückung der TLR2-blockierenden-Antikörper-induzierten Aktivierung der ERK1/2 führt. Bei der Behandlung mit einer Kontroll-siRNA bleibt die Aktivierung der ERK1/2 durch die TLR2-blockierenden-Antikörper erhalten.

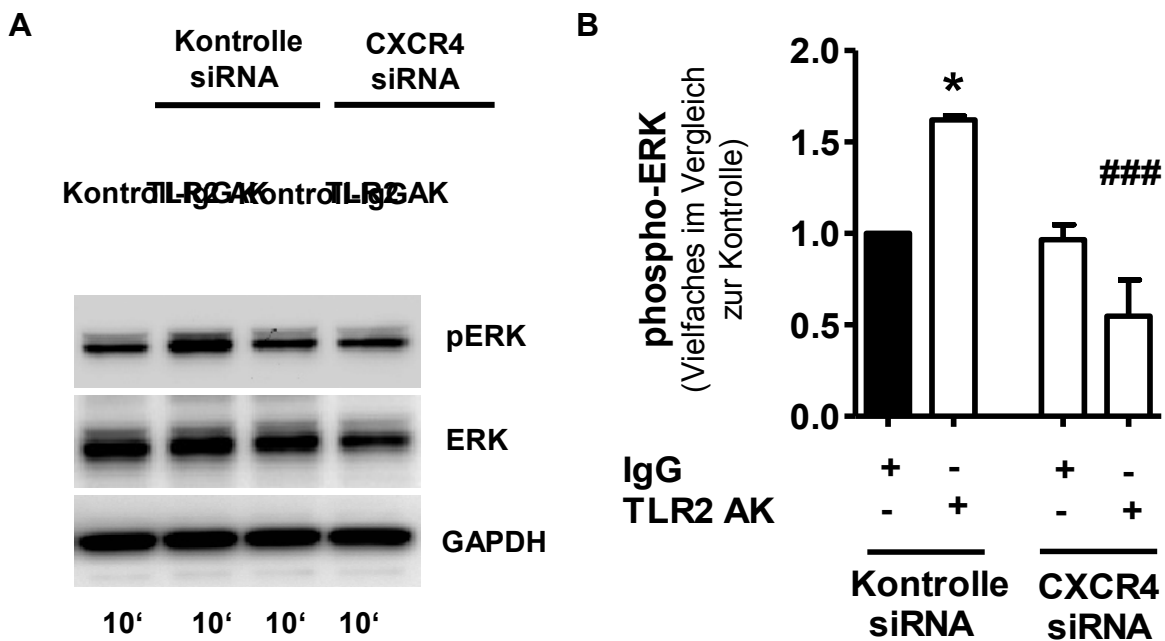


Abbildung 25: Western Blot für ERK1/2 bei einer Behandlung mit CXCR4-siRNA

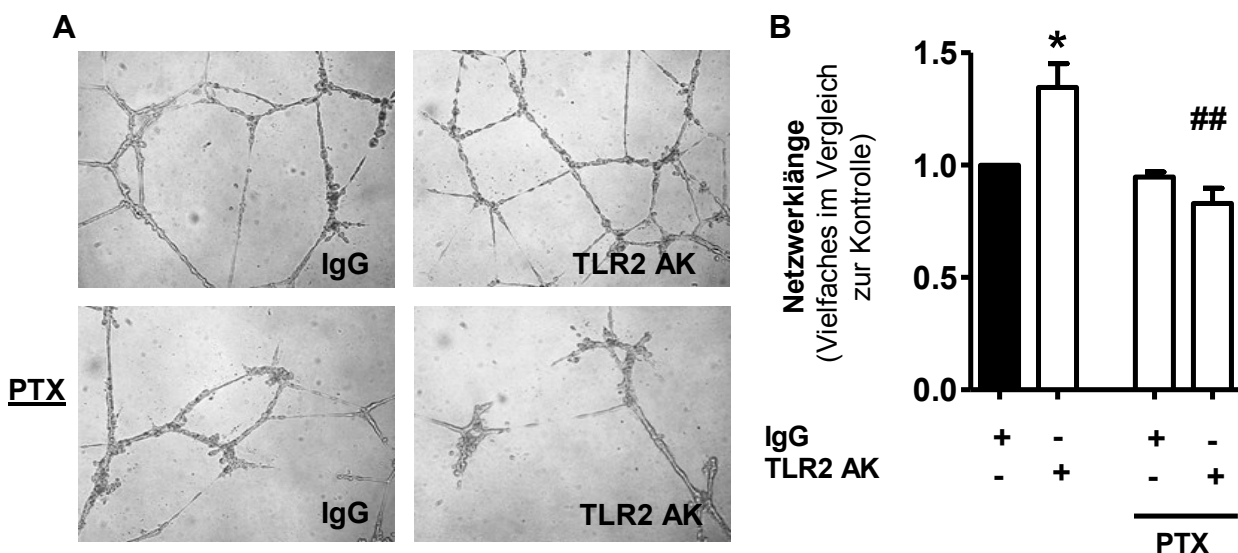
A Repräsentative Abbildung eines Western Blots für ERK und phosphoERK. Die Zellen wurden entweder mit einer Kontroll-siRNA oder CXCR4-siRNA vorbehandelt und dann mit Kontroll-IgG oder TLR2-blockierenden-Antikörpern (TLR2 AK) [10µg/ml] für 10 Minuten inkubiert. **B** Quantitative Zusammenfassung der densitometrischen Messungen. * vs. Kontroll-siRNA + Kontroll-IgG, # vs. CXCR4-siRNA + Kontroll-IgG, *P<0,05, ####P<0,001.

3.7.4 Die Inhibition des G_i-Proteins führt zu einer Unterdrückung des proangiogenen Effekts der TLR2-blockierenden-Antikörper

In der Signaltransduktion des CXCR4 spielen G_i-Proteine eine wichtige Rolle. Das G_i-Protein ist in der Signalkaskade des SDF-1 direkt an den CXCR4 gekoppelt und vermittelt so die weitere Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 und AKT. Daher wurde untersucht, inwieweit eine Blockade dieser G_i-Proteine sich auf den positiven Effekt der TLR2-blockierenden-Antikörper auswirkt. Ein spezifischer Inhibitor des G_i-Proteins ist das Pertussistoxin (PTX) [Mangmool 2011]. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen wurde wieder das Matrigel-Angiogenese-Modell gewählt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die positive Wirkung der TLR2-blockierenden-Antikörper nach einer vorherigen Inkubation mit dem Pertussistoxin (PTX) unterdrückt wird. Im Vergleich dazu hat das PTX allein keine Wirkung auf die Netzwerkbildung der Endothelzellen.

Um diesen Effekt auch direkt in Bezug auf die Weiterführung der Signalkaskade untersuchen zu können, wurde das Western Blot Verfahren verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern zu einer vermehrten Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 führt. Bei einer Vorinkubation mit PTX wird diese Aktivierung jedoch nicht mehr hervorgerufen.

Dies lässt den Schluss zu, dass die Wirkung der TLR2-blockierenden-Antikörper direkt mit der Signalkaskade des CXCR4 verbunden ist und somit eine Art Interaktion zwischen den Rezeptoren bestehen müsste.



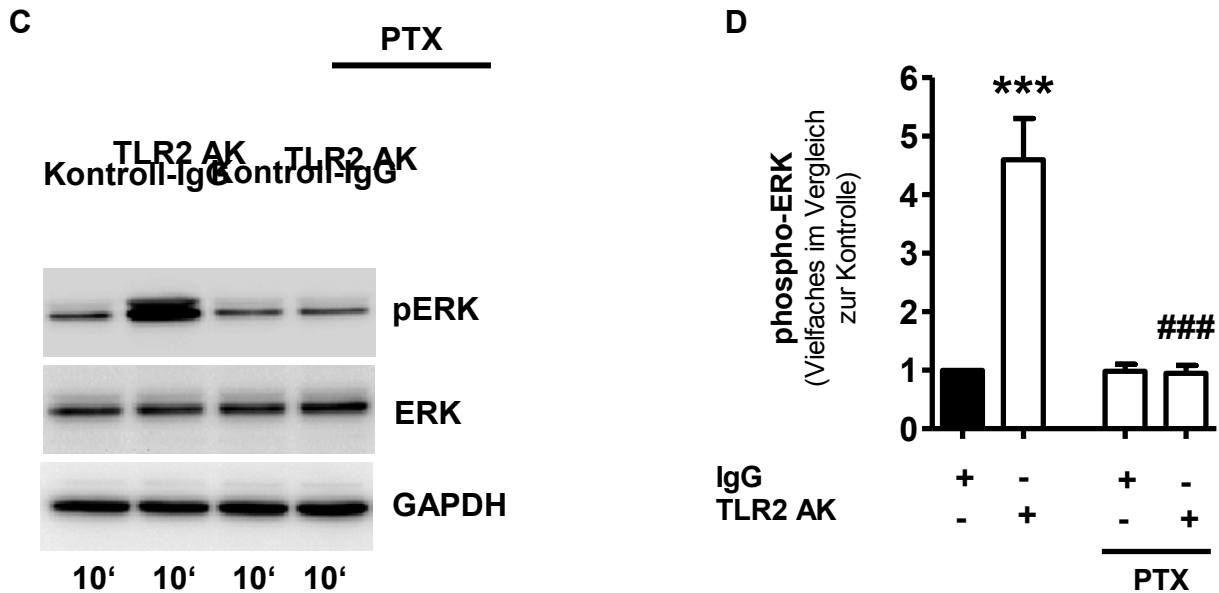


Abbildung 26: Effekte des Petrusstoxins (PTX) im Matrigel-Angiogenese-Modell und im Western Blot für ERK1/2

A Repräsentative Abbildung von Netzwerkformationen von Endothelzellen nach 8 Stunden in 200-facher Vergrößerung. Die Zellen wurden mit Kontroll-IgG oder TLR2-blockierenden-Antikörpern (TLR2 AK) [10µg/ml] behandelt. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit PTX [100ng/ml] ko-inkubiert. **B** Quantitative Zusammenfassung von n=3 unabhängigen Experimenten. * vs. Kontroll-IgG, # vs. Kontroll-IgG+PTX, * $P < 0.05$, ### $P < 0.01$. **C** Repräsentative Abbildung der Densitometrie des Western Blot für eine 10 minütige Behandlung mit PTX [100ng/ml] und TLR2 Antikörpern [10µg/ml]. **D** Quantitative Zusammenfassung des Western Blot von n=3 unabhängigen Ergebnissen. * im Vergleich zur Kontrolle, # im Vergleich zu TLR2 AK, *** $P < 0.001$, ### $P < 0.001$.

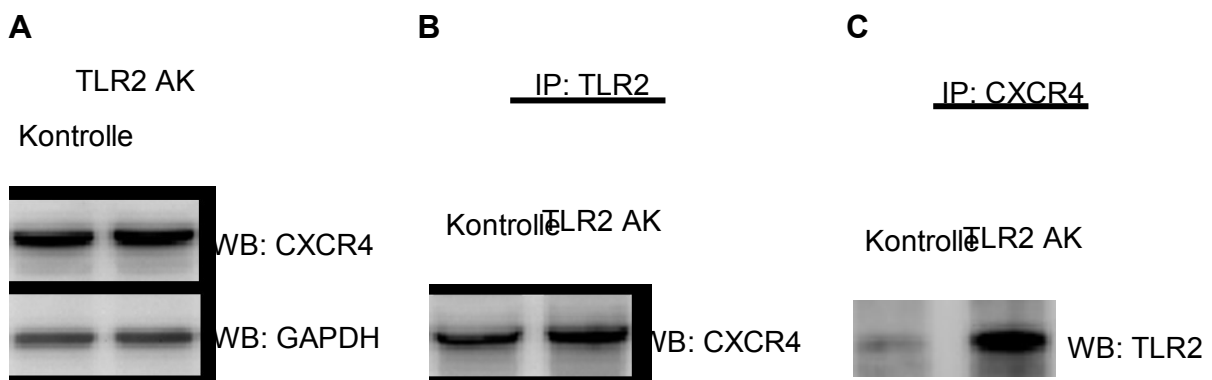
3.7.5. TLR2-blockierende-Antikörper verändern die Expression des CXCR4 im Western Blot nicht

Da wie zuvor beschrieben erste Hinweise darauf bestanden, dass es eine Interaktion zwischen dem TLR2 und dem CXCR4 gibt, wurde zunächst untersucht, inwieweit sich die Proteinexpression des CXCR4 bei einer Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern verändert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression unabhängig von der Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern ist. Da jedoch wie schon in vorherigen Untersuchungen keine veränderte Expression des

CXCR4 erwartet wurde, wurde eine Immunpräzipitation gewählt, um eine mögliche Interaktion der beiden Rezeptoren zu identifizieren.

3.7.6. Die Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern führt zu einer Interaktion des CXCR4 und dem TLR2

Daraufhin wurde im Anschluss an die Probengewinnung eine Immunpräzipitation (IP) nach TLR2 durchgeführt. Es ist bei der Untersuchung der Proben für CXCR4 im Western Blot deutlich zu erkennen, dass die Proben vor der IP keinen Unterschied aufwiesen (**Abbildung 27A**), es jedoch nach einer IP für TLR2 einen Unterschied zwischen der Kontrolle und der mit TLR2-blockierenden-Antikörpern behandelten Probe gab (**Abbildung 27B**). Daraus könnte man folgern, dass sich die Gesamtmenge des CXCR4 bei Inkubation mit den TLR2-blockierenden-Antikörpern nicht verändert, jedoch wird aus der zweiten Hälfte des Experiments ersichtlich, dass die Rezeptoren nach der TLR2-blockierenden-Antikörper Behandlung scheinbar zusammenhängen und interagieren könnten. Um den Beweis im Umkehrschluss nachzuvollziehen wurde eine Immunpräzipitation mit einem CXCR4 Antikörper durchgeführt und anschließend ein Western Blot zum Nachweis des TLR2 angeschlossen. Auch hier stellt sich deutlich dar, dass die mit TLR2-blockierenden-Antikörpern behandelten Zellen nach der Präzipitation von CXCR4 mehr TLR2 im Western Blot aufzeigten als in der Kontrollprobe (**Abbildung 27C**).



D

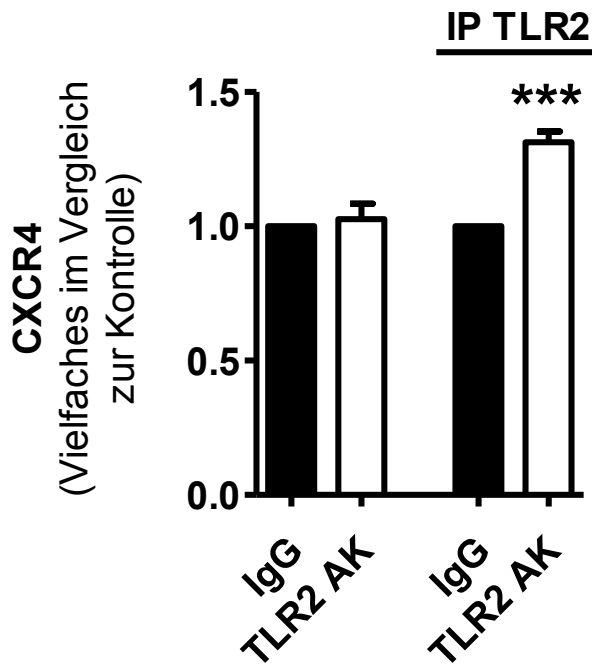


Abbildung 27: Immunpräzipitation für mit TLR2-blockierenden-Antikörpern (TLR2 AK) behandelte Zellen

A Western Blot nach CXCR4 unter Stimulation der Zellen mit Kontroll-IgG und mit TLR2 Antikörpern [10µg/ml] für 10 Minuten. **B** Western Blot für CXCR4 nach Immunpräzipitation der Proben mit TLR2 Antikörpern. **C** Western Blot für TLR2 nach der Immunpräzipitation mit CXCR4 Antikörpern. **D** Quantitative Zusammenfassung der Westernblot Ergebnisse für CXCR4 vor und nach der Immunpräzipitation nach TLR2. *vs. Kontrolle. ***P<0.001, n=4.

3.7.7. Die Stimulation mit TLR2 Liganden führt nach einer Immunpräzipitation nicht zu einer Interaktion mit CXCR4

Um in Gegensatz dazu zu überprüfen, ob die Interaktion dieser beiden Rezeptoren nur durch die Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern induziert wird, wurde dasselbe Experiment auch mit den zuvor schon genutzten TLR2 Liganden durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch nach einer Immunpräzipitation nach TLR2 kein Unterschied zwischen der Kontrolle oder den Liganden dargestellt werden konnte (**Abbildung 28B**).

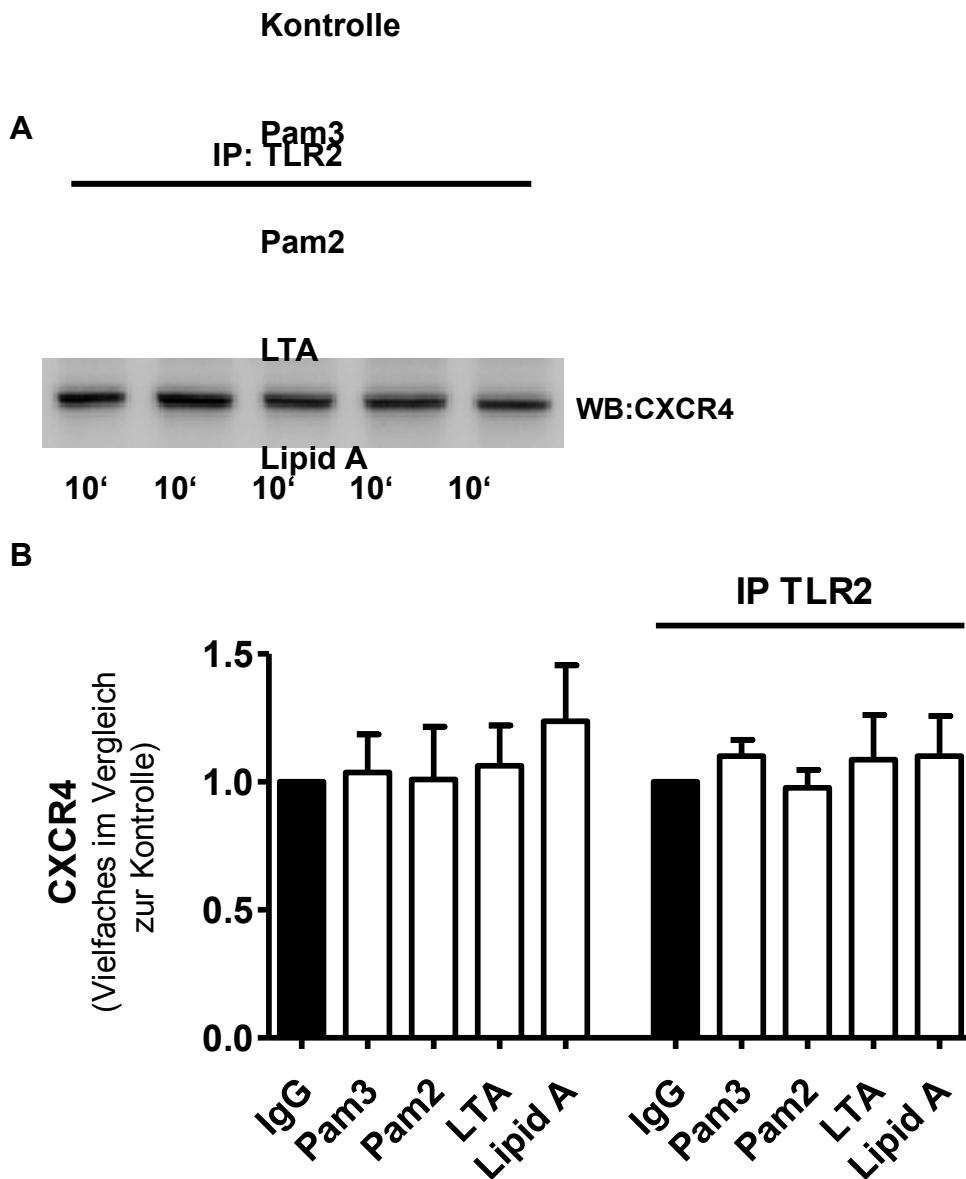


Abbildung 28: Immunpräzipitation für TLR2 Liganden

A Repräsentative Abbildung eines Western Blots nach CXCR4 mit den Liganden Pam3CSK4, Pam2CSK4, LTA und Lipid A nach 10 Minuten Stimulation nach einer Immunpräzipitation nach TLR2. **C** Quantitative Zusammenfassung der densitometrischen Messungen des Western Blots für CXCR4, zum einen vor und zum anderen nach der Immunpräzipitation für TLR2, n=3.

4.Diskussion

4.1. Eine TLR2-Defizienz geht mit proangiogenen Effekten nach Ischämie einher

Mehr als 4,5 Millionen Menschen leiden in Deutschland an den Folgen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) mit steigender Prävalenz. Trotz therapeutischer Interventionen ist die Anzahl von schweren Verläufen immer noch erschreckend hoch [Saw J 2006]. Die Amputationsraten von Extremitäten bei pAVK liegen zwischen 10-40% und gehen mit einer enormen Erhöhung der Letalität einher [Novo S 2004]. Die Pathogenese dieser Erkrankung beruht zu großen Teilen auf einer Störung der vaskulären Perfusion auf Grund einer arteriellen Insuffizienz, einer daraus resultierenden Muskelunterversorgung mit Hypoxie und führt damit zu einer gefährlichen Ischämie des Beines.

Der Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) ist mit der Pathogenese von endothelialen Dysfunktionen im Rahmen vaskulärer Krankheitsbilder wie zum Beispiel der Atherosklerose oder Ischämie- und Reperfusionstörungen assoziiert. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des TLR2 schädlich für die Angiogenese sein kann [Frantz S 2007]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine TLR2 Defizienz einen protektiv Effekt nach Ischämie-Reperfusionstörungen im Herzen, der Leber und dem Gehirn hat [Arumugam TV 2009; Favre J 2007]. Es konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass eine TLR2 Defizienz im Rahmen der Angiogenese im Kontext einer Ischämie zu einer verbesserten Reperfusion, einer höheren Kapillardichte und somit zu einer besseren Durchblutung des betroffenen Areals führt. Jedoch ist der zu Grunde liegende Mechanismus noch nicht hinreichend geklärt.

Eine Problematik der TLR2 Defizienz ist die Diskrepanz zwischen der resultierenden Immunmodulation und dem Vorteil des potentiell unterstützenden Einflusses auf die Angiogenese. Es wurde gezeigt, dass es bei einer TLR2 Defizienz zu einer kompensatorischen Hochregulation des TLR4 und TLR9 kommt [Ehrentraut SF 2012]. Diese Hochregulation widerspricht den Vorstellungen, dass die Reduktion von TLR2 Signalaktivierung mit einer unzureichenden Aktivierung der Inflammation assoziiert ist. Es ist zu vermuten, dass durch diese Hochregulation der beiden

anderen TLRs die Funktion des TLR2 im Rahmen der inflammatorischen Antwort kompensiert wird und dadurch die positiven Effekte der TLR2 Defizienz auf die vaskuläre Homöostase dennoch erhalten bleiben.

Des Weiteren wurde noch nicht evaluiert, welche beteiligten Akteure der Angiogenese diesen protektiven Effekt der TLR2 Defizienz vermitteln könnten. Der Phänotyp der TLR2-defizienten Knock-out Maus entspricht dem einer Ganzkörperdefizienz und daher ist nicht eindeutig zu klären, ob der protektive Effekt auf das Endothel der Mäuse oder auf im Blut zirkulierende Zellen zurückzuführen ist. Daher wurde untersucht, inwieweit die TLR2-defizienten Stammzellen der Maus einen Einfluss auf die Angiogenese haben könnten.

4.2. Hämatopoetische cKit positive Stammzellen wirken proangiogen *in vivo*

Hämatopoetischen Stammzellen kommt im Rahmen der vaskulären Regeneration nach Ischämie eine wichtige Bedeutung zu [Rafii S 2003]. Es wurde gezeigt, dass es im Knochenmark durch eine TLR2 Stimulation zu einer Umverteilung der Stammzellen zu Gunsten der inflammatorischen Vorläuferzellen kommt und somit die TLR2 Aktivierung das angiogene Potential vermindert [King KY 2011]. Daher ist es interessant zu betrachten, welchen Einfluss eine TLR2 Defizienz auf diese Stammzellen haben könnte. Es konnte gezeigt werden, dass TLR2-defiziente cKit positive Stammzellen sowohl im Hinterlaufischämiemodell der Maus als auch in den *in vitro* Versuchen mit Endothelzellen zu einer verbesserten Angiogenese führten. Im direkten Vergleich mit Wildtyp stämmigen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass sich Unterschiede hinsichtlich der Kapillardichte und Reperfusion der Hinterläufe darstellten. Dabei war jedoch auch zu erkennen, dass die Behandlung mit Wildtyp stämmigen Stammzellen im Vergleich zu den mit PBS behandelten Kontrolltieren nach einer Ischämie per se mit einer verbesserten Durchblutung einhergeht. Dieser Effekt ist durch die bekannte unterstützende Funktion der Stammzellen in der Regeneration zu erklären [Rafii S 2003]. Jedoch ist dieser protektive Effekt bei den TLR2-defizienten Stammzellen nochmalig höher.

Die Auswahl der Stammzellen in Bezug auf die Expression des Stammzelloberflächenmarkers cKit (CD117) limitiert die Ergebnisse hinsichtlich ihrer

Spezifität und der genauen Charakterisierung dieser Stammzellen. Der Stammzelloberflächenmarker cKit ist sowohl auf murinen Hämangioblasten zur Zeit der embryonalen Entwicklung als auch auf hämatopoetischen Stammzellen und endothelialen Progenitorzellen im Adulten exprimiert [Kabrun 1997]. Die genaue Differenzierung und das Potential von hämatopoetischen Progenitorzellen hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber vaskulären regenerativen Prozessen wurden in den letzten Jahren neu definiert [Yoder M 2007]. Verschiedene Kombinationen von Oberflächenmarkern können unterschiedliche Typen von Progenitorzellen mit variablem Potential hinsichtlich ihrer Differenzierung in Endothelzellen selbst oder als Quelle von angiogenen Zytokinen identifizieren [Fadini GP 2012]. Mit Hilfe der Selektion des cKit konnte dargestellt werden, dass es sich bei den isolierten Zellen um Stammzellen handelt. Jedoch konnte man keine genaue Aussage hinsichtlich ihres Potentials der Differenzierung zu den unterschiedlichen Zelltypen treffen. Der entscheidende Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit mit Hilfe des cKit eine Vielzahl von Zellen zu isolieren, auch wenn nicht alle Zellen eine spezifische angiogene Tendenz aufweisen. Im Gegensatz dazu würde eine Selektierung nach mehreren spezifischen Oberflächenmarkern hinsichtlich ihres angiogenen Potentials nur einen Bruchteil der Menge an Zellen zu Tage fördern. Es wurde daher die Anwendung der cKit Selektion gewählt, da sie eine potentielle therapeutische Anwendung widerspiegelt. Würde man versuchen, Stammzellen für eine therapeutische Intervention nutzen zu wollen, wäre die Menge der gewonnenen Zellen aus einem Knochenmarkpunktat von enormer Bedeutung für die Anwendbarkeit dieser therapeutischen Methode. Durch eine hochspezifische Selektierung würde man möglicherweise die Zellen mit der höchsten angiogenen Potenz identifizieren, jedoch wäre die Anzahl dieser Zellen für eine adäquate Therapie zu gering.

Im **Matrigel-Plug-Modell** konnte dargestellt werden, dass eine subkutane Injektion von TLR2^{-/-} Stammzellen im Vergleich zu Wildtyp Stammzellen zu einer vermehrten Bildung von kapillarähnlichen Strukturen führt. Diese dargestellten Strukturen zeigen Netzwerke aus den zuvor markierten Stammzellen und den analog dazu dargestellten Zellkernen. Jedoch sind diese Strukturen nicht durch zuvor intrakardial injiziertes Lectin anfärbbar, was bedeutet, dass diese Strukturen nicht funktionell an den Blutkreislauf der Maus angeschlossen sind. Diese Tatsache gibt erste Hinweise darauf, dass TLR2^{-/-} Stammzellen wie vorbeschrieben eher einen supportiven Effekt

auf Endothelzellen haben und nicht die Tendenz, alleine neue Gefäße zu bilden, was ihrer therapeutischen Relevanz gerade in Bezug auf Ischämie bedingte Krankheiten erhebliche Bedeutung verleiht [Raffi S 2003].

4.3. Hämatopoetische cKit positive Stammzellen unterstützen die Endothelzellen in dem Prozess der Angiogenese

Die Angiogenese ist ein mehrschrittiger Prozess aus Migration, Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen [Carmeliet P 2000]. Um eine sichere Aussage darüber treffen zu können, in wieweit die $cKit^+$ $TLR2^{-/-}$ Stammzellen einen Effekt auf die Funktionalität in den Teilprozessen der Angiogenese haben, wurden drei verschiedenen *in vitro* Angiogenese Modelle gewählt, die jeweils unterschiedliche Aspekte des ganzheitlichen Prozesses der Angiogenese betrachten.

Matrigel-Angiogenese-Modell. In diesem Modell konnte dargestellt werden, dass eine gleichzeitige Inkubation mit $cKit^+$ $TLR2^{-/-}$ Stammzellen mit einer Erhöhung der Netzwerklänge und einer vermehrten Adhäsion der Stammzellen im Netzwerk einhergeht. Die Schwäche in diesem Modell der Angiogenese ist vor allem die zweifelhafte Formbildung der Endothelzellen, denn es sind eher Verbindungen von Ausläufern zwischen den Zellen als beginnende funktionelle Röhren, wie man es für ein Gefäß erwarten würde. Jedoch zeigt dieses Modell auf, mit welcher Tendenz sich die Endothelzellen zu einem Verbund organisieren, wenn sie unter unterschiedlichen Einflüssen stehen. Die Integration der Stammzellen in die Netzwerkstrukturen der Endothelzellen ist ebenfalls kritisch anzusehen, da dies keine für Stammzellen spezifische Eigenschaft ist. Es wurde gezeigt, dass auch andere Zellen sich in diese Netzwerkstrukturen der Endothelzellen integrieren können [Auerbach R 2003]. Jedoch zeigte sich nachweislich, dass $TLR2^{-/-}$ Stammzellen im Vergleich zu Stammzellen aus Wildtyptieren zu einer vermehrten Adhäsion neigen. Die Adhäsion ist einer der Teilprozesse der Stammzellmobilisierung und somit ein erster Schritt für die Unterstützung der Angiogenese. Diese Tendenz der Zellen zur Adhärenz könnte ihre Ursache zum Teil in der Zusammensetzung des Matrigels haben. Matrigel ist ein saures, gelartiges Medium, welches keine idealen Haftungseigenschaften für die Stammzellen aufweist und diese sich daher im Endothelzellverband organisieren.

Sphäroid-Angiogenese-Modell. Um diese Wirkung des Matrigels zu umgehen, wurde als zweites Modell das Sphäroid-Angiogenese-Modell gewählt. In diesem Modell dient ein Methylzellulose-Kollagen-Gemisch als Sprossungsmedium, welches eine physiologischere Zusammensetzung hat und der Struktur eines extrazellulären Gewebes entspricht. Im Gegensatz zur planaren Struktur des Matrigels wird hierbei die Bildung von Endothelsprossen im dreidimensionalen Raum aufgezeigt. Dafür wurden die Endothelzellen mit TLR2^{-/-} Stammzellen ko-inkubiert und nach einem Zeitraum von 48 Stunden hinsichtlich der neu gebildeten Sprossen und der Migration der Stammzellen entlang dieser Sprossen beurteilt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Sphäroid, welches nur aus Endothelzellen besteht, kaum in das umgebende Kollagen aussprosst, sondern diese Sprossung zunächst durch endotheliale Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel VEGF oder SDF-1 initiiert werden muss [Harrington EO 2007]. Bei einer Ko-Inkubation von Endothelzellen mit Wildtyp Stammzellen für 24 Stunden kommt es zu einer diskreten Aussprossung der Endothelzellen. Dies spricht dafür, dass Stammzellen als solche ein grundlegendes angiogenes Potential haben [Raffi S 2003]. Im Gegensatz dazu kommt es bei einer gleichzeitigen Inkubation von Endothelzellen und TLR2^{-/-} Stammzellen zu einer vermehrten Sprossung und Migration der Stammzellen entlang der Sprossen. Dies gibt Hinweise darauf, dass die angiogene Wirkung der TLR2^{-/-} Stammzellen eventuell auf eine parakrine Verstärkung der Angiogenese zurückzuführen ist und diese Stammzellen somit eine unterstützende Wirkung auf die Endothelzellen haben, jedoch nicht selbst an der Sprossung beteiligt sind.

Migrations-Modell. Die Migration von Endothelzellen ist, neben der Sprossung und Organisation von tubulären Strukturen, ein wichtiger Bestandteil im Prozess der Angiogenese. Um diesen Aspekt der Angiogenese zu betrachten, wurde als drittes Modell das Migrations-Modell gewählt, um die Fähigkeit der Endothelzellen zur gezielten Migration zu untersuchen. Es wurde dabei einen Beobachtungszeitraum von zwei bis acht Stunden nach der Wundsetzung gewählt, um den Prozess der Migration bereits vorhandener Endothelzellen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu beobachten, als den der Proliferation von neuen Endothelzellen. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es im Gegensatz zu unbehandelten Zellen bei den mit TLR2^{-/-} Stammzellen ko-inkubierten Endothelzellen bereits nach vier Stunden der Migration zu einer mehr verschlossenen Fläche kommt. In vergleichbaren Studien

wurde oftmals ein Beobachtungszeitraum von 24 bzw. 36 Stunden gewählt [Xu Z 2013; Saber V 2011], wodurch die Differenzierung zwischen einer Migration oder Proliferation der Endothelzellen unseres Erachtens nach schlechter zu trennen war.

Zusammenfassend kann man beschreiben, dass TLR2^{-/-} Stammzellen sowohl in der Formation von Netzwerkstrukturen, in der Aussprossung, als auch in der Migration von Endothelzellen unterstützend wirken. Diese Effekte sind möglicherweise auf einen parakrinen supportiven Effekt der TLR2^{-/-} Stammzellen zurückzuführen.

Der zu Grunde liegende Mechanismus dieser angiogenen Potenz der TLR2^{-/-} Stammzellen ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass TLR2^{-/-} Stammzellen ein erhöhtes basales Expressionslevel eines Schlüsselmoleküls des SDF1/CXCR4 Signalwegs namens AKT haben. Es ist bekannt, dass TLR2^{-/-} Mäuse eine erhöhte Expression und Aktivierung der MAP-Kinase AKT aufweisen und dass diese im Kontext der myokardialen Ischämie mit den kardio-protectiven Effekten der TLR2 Defizienz assoziiert ist [Mersmann J 2012]. Die MAP-Kinase AKT ist ein wichtiger Mediator bei der Mobilisierung von hämatopoetischen Stammzellen, was vermuten lässt, dass das Expressionslevel von AKT mit der Qualität der Adhäsion von Stammzellen im Rahmen der Neovaskularisation korreliert [Hur J 2007]. Diese Aussage und die Tatsache, dass die TLR2^{-/-} Stammzellen zu einer verbesserten Reperfusion nach Hinterlaufischämie führen, lässt darauf schließen, dass TLR2^{-/-} Stammzellen eine erhöhte Ansprechrate auf die chemotaktischen Reize im Prozess der Stammzellrekrutierung haben. Der endgültige Signalweg in TLR2^{-/-} Stammzellen ist jedoch noch immer ungeklärt.

Diese Erkenntnisse lassen darauf spekulieren, dass eine Anwendung von TLR2^{-/-} Stammzellen im Rahmen von ischämischen Krankheiten denkbar wäre. Die Anwendung von zellulären Stammzelltherapien wurde schon hinreichend diskutiert [Raffi S 2003]. Jedoch ist diese Vorstellung limitiert, da bisher noch keine adäquate Möglichkeit aufgezeigt wurde, Stammzellen von zukünftigen Patienten in TLR2^{-/-} Zellen umzuwandeln. Daher wurde die Überlegung angestellt, inwieweit mit Hilfe von TLR2-blockierenden-Antikörpern vielleicht ein ähnlicher Effekt impliziert werden könnte.

4.4. Die Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern hat einen protektiven Effekt nach Ischämie im Hinterlaufischämiemodell

Die Beurteilung der Reperfusion im Hinterlauf erfolgte durch eine Temperaturanalyse der Hinterläufe mit Hilfe einer Wärmebildkamera. Gul et al. konnten zeigen, dass es eine direkte Korrelation zwischen den Temperaturunterschieden in den Hinterläufen und der kapillären Perfusion gibt [2009]. Auch der direkte Vergleich des ligierten Beines mit dem unbehandelten Hinterlauf dient als sofortige Kontrolle der erfolgreichen Initiierung einer Ischämie im Hinterlauf.

Durch die Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass die dargestellten Kapillaren durch Endothelzellen gebildet wurden und dass sie direkt an den Blutkreislauf angeschlossen sind. Durch diese beiden Beobachtungen ist es möglich, die Situation der Angiogenese nach einer Ischämie adäquat zu beurteilen.

Die Reperfusion im Hinterlaufischämiemodell wird durch verschiedene Prozesse ermöglicht. Neben der Angiogenese ist auch Arteriogenese von Bedeutung [Carmeliet P 2000]. Die Angiogenese wird vor allem durch die Sprossung von neuen Kapillaren definiert - die Arteriogenese beschreibt hingegen das Wachstum und die Neuorganisation von bereits bestehenden Arteriolen. Beide Prozesse werden durch Hypoxie und Veränderung der Flussverhältnisse im Gewebe stimuliert und daher kann man in einem Hinterlaufischämiemodell nicht genau differenzieren, welcher der beiden Prozesse überwiegt, sondern kann lediglich eine Aussage über die funktionale Reperfusion nach einer Ischämie treffen.

Es konnte aufgezeigt werden, dass es nach einer intrakardialen Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern zu einer vermehrten Bildung von Kapillaren im Musculus gastrocnemius kommt und diese mit einer verbesserten Reperfusion des Hinterlaufs nach Ischämie einhergeht. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit denen der TLR2-defizienten Tieren, was bedeutet, dass die Behandlung mit TLR2-blockierenden-Antikörpern diesen Effekt imitiert. Jedoch kann man durch diese Ergebnisse noch nicht evaluieren, auf welche Weise die TLR2-blockierenden-Antikörper diesen Effekt verursacht. Daher wurde zunächst die Wirkung TLR2-blockierender-Antikörper auf humane Endothelzellen untersucht, um so mögliche Mechanismen zu identifizieren.

4.5. TLR2-blockierende-Antikörper stimulieren Endothelzellen hinsichtlich ihres angiogenen Potentials

Im Rahmen des Hinterlaufischämie Modells kommt es durch die Ligatur der Arteria femoralis immer zu einer Hypoxie in dem durch die Arterie versorgten Gebiet. Hypoxie ist der stärkste Reiz für die Angiogenese. Einer der wichtigsten durch Hypoxie induzierten Faktoren ist der Stromal cell derived Faktor-1(SDF-1) und sein Rezeptor CXCR4. Es wurde gezeigt, dass in diesen hypoxischen Regionen die Rekrutierung von Stammzellen durch das SDF-1/CXCR4 System induziert wird [Askari U 2003]. Neben diesem Potential der Stammzellmobilisierung spielt SDF-1 auch eine entscheidende Rolle im Prozess der Angiogenese. Daher wurde in den folgenden Untersuchungen immer der Vergleich mit diesem potenten Stimulator genutzt, um die Funktionalität der Modelle sowie eine Relation für das angiogenen Potential der Ergebnisse zu haben. Bei der Anwendung der TLR2-blockierenden-Antikörper konnte gezeigt werden, dass ein mono- sowie ein polyklonaler Antikörper denselben proangiogenen Effekt auf Endothelzellen hat wie der bekannte Stimulator SDF-1. Da diese Antikörper jedoch allein vom Aufbau sehr große chemische Gebilde sind, wurde zum Vergleich und Ausschluss einer Verzerrung der Ergebnisse weiterhin ein Kontroll-IgG mitgeführt, um auszuschließen, dass der angiogene Effekt allein durch die Größe dieser Moleküle zu Stande kommt [Meng G 2004]. Mit Hilfe von Titrationsreihen der Antikörper konnte gezeigt werden, dass es bereits ab einer Konzentration von 10µg/ml zu einer vermehrten Netzwerkbildung, einer erhöhten Aussprossung und zu einer vermehrten Migration von Endothelzellen kommt. Dabei ist durch eine Erhöhung der Konzentration keine Erhöhung der proangiogenen Effekte zu erzielen, was bedeutet, dass der maximale proangiogene Effekt in den Modellen bei 10µg/ml liegt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die 10µg/ml eine Schwellendosis der TLR2-blockierenden-Antikörper darstellen, da mindestens diese Konzentration genutzt werden muss, um einen signifikanten Effekt zu erzielen.

Im Vergleich dazu wurden auch TLR2 Liganden verwendet. Dabei nutzten man synthetische Liganden wie den TLR2/6 Liganden Pam3CSK4 und den TLR1/2 Liganden Pam2CSK4 sowie den natürlichen TLR2 Liganden Lipoteichonsäure(LTA). Hierbei konnte in den Modellen kein Unterschied zwischen der Stimulation des TLR2 und der Kontrolle dargestellt werden. In der Literatur hingegen ist beschrieben, dass

eine Aktivierung des TLR2 zu einer vermehrten Angiogenese führt [Xu Y 2013, West XZ 2010]. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass die Aktivierung von TLR2 auch immer zu einer inflammatorischen Reaktion führt und diese Immunantwort ebenfalls ein potenter Stimulator für Angiogenese ist. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass Angiopoetin-2 und die Matrix Metalloproteinasen 2 und 9 als Mediatoren des proangiogenen Effekts der TLR2 Stimulation im Zusammenhang mit der rheumatoiden Arthritis und der Entzündung der Synovialmembran agieren [Saber T 2011]. Die Stimulation des TLR2 induziert die Aktivierung von NF κ B, woraus die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen resultiert. Diese proinflammatorischen Zytokine können stimulierende Effekte auf Endothelzellen haben und Toll-like Rezeptoren könnten als potente Mediatoren im Rahmen dieser entzündungsvermittelten Angiogenese agieren [Grote K 2011].

In den *in vitro* Studien mit Nutzung der TLR2 Liganden ist die Zeit, in der die indirekten auto- und parakrinen Effekte auf die Endothelzellen vermittelt werden, der entscheidende Faktor. In den o.g. Studien wurde ein Beobachtungszeitraum von 24 Stunden für die Matrigel-Angiogenese-Modell bzw. 24 bis 30 Stunden für die Migrations-Modelle beschrieben. Im Vergleich dazu kann man einen schnellen proangiogenen Effekt nach bereits 6 bzw. 8 Stunden Beobachtung zeigen. Damit konnte dargestellt werden, dass die TLR2-blockierenden-Antikörper einen schnellen, direkten angiogenen Effekt auf die Endothelzellen haben.

4.6. Der proangiogene Effekt der TLR2-blockierenden-Antikörper ist durch eine Interaktion zwischen dem TLR2 und dem CXCR4 vermittelt

Im Rahmen der *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es bei einer Behandlung der Endothelzellen mit TLR2-blockierenden-Antikörpern zu einem ähnlich ausgeprägtem proangiogenem Effekt kommt, wie bei einer Stimulation mit dem bekannt potenten Stimulator SDF-1. Daraufhin wurde die Signalkaskade des SDF-1 in die Betrachtung mit einbezogen und es konnte dargestellt werden, dass eine Behandlung mit mono- oder polyklonalen TLR2-blockierenden-Antikörpern zu einer vergleichbaren Signaltransduktion in Endothelzellen führt wie SDF-1. Dabei konnte gezeigt werden, dass es zu einer Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 und

AKT, nicht jedoch zu einer Aktivierung der p38 kommt. Eine Inhibition der MAP-Kinasen AKT oder ERK1/2 führt zu einer kompletten Unterdrückung der TLR2-blockierenden-Antikörpern vermittelten proangiogenen Effekte. Dieser Effekt konnte durch eine Inhibition der p38 nicht gezeigt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Toll-like Rezeptoren im Immunsystem mit einer Reihe von homo- und heterotypischen Rezeptoren interagieren können. Der SDF-1 Rezeptor CXCR4 wurde als ein Teil des Mustererkennungsrezeptorkomplexes identifiziert und es wurde ein Crosstalk des TLR2 und CXCR4 im Rahmen der Pathogenerkennung beschrieben [Hajishengallis G 2008]. CXCR4 ist ein G_i-Protein gekoppelter Rezeptor und induziert die Aktivierung der MAP-Kinasen AKT und ERK1/2. In dieser Studie konnte aufgezeigt werden, dass es bei einer Inhibition des G_i-Proteins durch das Pertussistoxin zu einem Ausbleiben des TLR2-blockierenden-Antikörpern vermittelten proangiogenen Effekts kommt. Es wurde ebenfalls aufgezeigt, dass dieser proangiogene Effekt bei einer verminderten Expression des CXCR4 durch eine Transfektion mit CXCR4-siRNA unterdrückt wird. Diese Erkenntnisse geben erste Hinweise darauf, dass der proangiogene Effekt der TLR2-blockierenden-Antikörper durch den CXCR4 vermittelt sein könnte.

Mit Hilfe der Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass es bei einer Bindung von TLR2-blockierenden-Antikörpern zu einer Assoziation des CXCR4 mit dem TLR2 kommt. Dies liefert den endgültigen Hinweis darauf, dass der proangiogene Effekt einer Bindung von TLR2-blockierenden-Antikörpern durch eine CXCR4/TLR2 Rezeptorinteraktion vermittelt ist. Die Limitation in der Interpretation der Immunpräzipitation liegt in der Aufspaltungsmethodik der Membran. Denn man kann nicht ausschließen, dass sich in der Menge der CXCR4/TLR2 positiven Gruppe auch Bestandteile befinden, in denen sich der TLR2 und der CXCR4 einfach nur sehr nah beieinander in der Lipidraft der Membran befinden und es somit bei einer ungenügenden Spaltung dieser Lipidrafts zu einem falsch positiven Ergebnis kommt. Jedoch ist dieser methodische Effekt in allen Proben vorhanden und erklärt auch, warum der Western Blot der Kontrolle zu geringen Mengen positiv ist.

Zusammenfassend muss man differenzieren, dass die Effekte einer TLR2 Defizienz und die der TLR2-blockierenden-Antikörper wahrscheinlich auf unterschiedlichen zu Grunde liegenden Mechanismen beruhen. Der günstige Effekt einer TLR2 Defizienz

auf die Reperfusion und Rekapillarisation der Hinterläufe nach einer Ischämie beruht wahrscheinlich auf einer verbesserten Adhäsion und einer verstärkten angiogenen Unterstützung von TLR2-defizienten hämatopoetischen Stammzellen. Jedoch müssen in weiteren Studien die genaue Identität und Potenz von hämatopoetischen Stammzellen, die an der Vermittlung der TLR2 Defizienz beteiligt sind, untersucht werden.

Der Effekt der TLR2-blockierenden-Antikörper scheint direkt auf die Endothelzellen über einen TLR2/CXCR4 Crosstalk und die folgende Signalkaskade des SDF-1 zu wirken. Allerdings müssen weitere Studien die Rolle eines TLR2/CXCR4 Rezeptorcrosstalks *in vivo* aufzeigen.

Abschließend wurden mit diesen Ergebnissen erste mögliche Grundlagen für eine potentielle therapeutische Anwendung von TLR2-blockierenden-Antikörpern im Kontext der zum einen antiinflammatorischen und zum anderen proangiogenen Therapie aufgezeigt.

5. Zusammenfassung

Zahlreiche Studien deuten auf eine Rolle des Immunrezeptors Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) im Erhalt vaskulärer Funktionen hin. Eine Reduktion inflammatorischer Signaltransduktion im Rahmen einer TLR2 Defizienz ist mit einer Protektion der Gefäßfunktion assoziiert. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bislang jedoch ungeklärt. In dieser Studie wurde untersucht, inwieweit eine TLR2 Defizienz einen günstigen Effekt auf die endotheliale Neubildung von Kapillaren (Angiogenese) in *in vivo* Modellen der Maus sowie in *in vitro* Angiogenese-Modelle reifer Endothelzellen ausüben könnte. Ziel war es weiterhin zu beurteilen, inwiefern diese Effekte durch TLR2-blockierende-Antikörper nachvollzogen werden können und sich somit eine pharmakologische Reduktion der TLR2-vermittelten Signaltransduktion in Endothelzellen und vaskulären Stammzellen als therapeutische Strategie in der Behandlung von Gefäßerkrankungen eignen könnte.

In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine TLR2 Defizienz im *in vivo* Hinterlaufischämiemodell der Maus mit einer verstärkten Kapillarbildung nach Ischämie assoziiert ist und mit verbesserter Reperfusion nach Ligatur der A. femoralis einhergeht. Diese Effekte konnten auch durch Applikation TLR2-defizienter, hämatopoetischer Stammzellen in Wildtyp (WT) Mäusen nachvollzogen werden, was auf günstige Effekte einer TLR2 Defizienz auf die vaskuläre Unterstützungsfunktion dieser Stammzellen hindeutete. In *in vitro* Modellen zeigten sich passend dazu Stammzellen, welche aus dem Knochenmark TLR2-defizienter (TLR2^{-/-}) Mäuse isoliert wurden, welche potenter die angiogene Funktionen reifer Endothelzellen unterstützten im Vergleich zu aus WT Tieren isolierte Stammzellen. Gleichzeitig zeigte sich eine per se erhöhte angiogene Potenz TLR2^{-/-} Stammzellen im *in vivo* Matrigel-Plug Modell der Maus im Vergleich zu WT Stammzellen, was teilweise auf eine erhöhte Aktivität des AKT-Signaltransduktionsmolekül zurückgeführt werden konnte.

Vergleichbare Effekte einer TLR2-Defizienz konnten auch in WT Mäusen im *in vivo* Hinterlaufischämiemodell durch intraventrikuläre Applikation TLR2-blockierender Antikörper nach Ischämieinduktion nachvollzogen werden. TLR2-blockierende Antikörper förderten des Weiteren die kapilläre Netzwerkbildung reifer humaner Endothelzellen sowie deren angiogene Sprossung und Migration *in vitro*. Diese pro-

angiogenen Effekte waren vergleichbar mit der Wirkung des bekannten, wichtigen proangiogenen Zytokins Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1), welche durch Bindung an den CXCR-Rezeptor 4 (CXCR4) vermittelt werden. Wichtiger Weise ließen sich vergleichbare Effekte zu denen der TLR2-blockierenden Antikörper nicht durch Stimulation des endothelialen TLR2 mit synthetischen oder natürlichen Liganden nachvollziehen.

Im Rahmen immunologischer Funktionen des TLR2 war bereits eine Interaktion des TLR2 mit dem CXCR4 in Immunzellen beschrieben. Wir konnten im Rahmen dieser Studie mittels Immunpräzipitation, G-Protein-Inhibition sowie CXCR4-knock down zeigen, dass die proangiogenen Effekte der TLR2-blockierenden Antikörper spezifisch durch eine Interaktion des endothelialen TLR2 mit dem CXCR4 vermittelt waren und eine Aktivierung der kanonischen CXCR4 Signaltransduktion auslösten. Diese Effekte waren unabhängig von der Aktivierung der pro-inflammatorischen TLR2 Signalkaskaden.

Unsere Daten unterstützen somit das therapeutische Potenzial TLR2-blockierender Antikörper zum Erhalt der Endothelzellularfunktion im Rahmen vaskulärer Erkrankungen und identifizieren einen neuen molekularen Mechanismus an der Schnittstelle von Angiogenese und Inflammation. Die Bedeutung einer Behandlung mit TLR2-blockierenden Antikörpern wird somit in Addition zur Verringerung inflammatorischer Signaltransduktion um einen direkten, proangiogenen Mechanismus erweitert.

6. Literaturverzeichnis

Arslan F; Smeets MB; O'Neill LJ; Keogh B; McGuirk P; Timmers L et al. (2010): Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. In: *Circulation* 121 (1), S. 80–90.

Arumugam TV; Okun E; Tang SC; Thundyil J; Taylor SM; Woodruff TM (2009): Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. In: *Shock* 32 (1), S. 4–16.

Asahara T; Kawamoto A (2004): Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 287 (3), S. C572-9.

Askari AT; Unzek S; Popovic ZB; Goldman CK; Forudi F; Kiedrowski M et al. (2003): Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. In: *Lancet* 362 (9385), S. 697–703.

Auerbach R; Lewis R; Shinnars B; Kubai L; Akhtar N (2003): Angiogenesis assays: a critical overview. In: *Clin Chem* 49 (1), S. 32–40.

Bergt S; Guter A; Grub A; Wagner NM; Beltschany C; Langner S et al. (2013): Impact of Toll-like receptor 2 deficiency on survival and neurological function after cardiac arrest: a murine model of cardiopulmonary resuscitation. In: *PLoS ONE* 8 (9), S. e74944.

Bucci M; Vellecco V; Harrington L; Brancaleone V; Roviezzo F; Mattace Raso G et al. (2013): Cross-talk between toll-like receptor 4 (TLR4) and proteinase-activated receptor 2 (PAR 2) is involved in vascular function. In: *Br J Pharmacol* 168 (2), S. 411–420.

Carmeliet P (2000): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. In: *Nat. Med* 6 (4), S. 389–395.

Ceradini DJ; Kulkarni AR; Callaghan MJ; Tepper OM; Bastidas N; Kleinman ME et al. (2004): Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. In: *Nat Med* 10 (8), S. 858–864.

Curtin JF, Liu N; Candolfi M; Xiong W; Assi H; Yagiz K; Edwards MR; Michelsen KS; Kroeger KM; Liu C; Muhammad AK; Clark MC; Arditi M; Comin-Anduix B; Ribas A;

Lowenstein PR; Castro MG (2009): HMGB1 Mediates Endogenous TLR2 Activation and Brain Tumor Regression. In: PLoS Medicine 2009 13; 6(1):e10.

Dunne A; O'Neill LAJ (2005): Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. In: FEBS Letters 579 (15), S. 3330–3335.

Ehrentraut SF; Dorr A; Ehrentraut H; Lohner R; Lee SH; Hoefft A et al. (2012): Vascular dysfunction following polymicrobial sepsis: role of pattern recognition receptors. In: PLoS ONE 7 (9), S. e44531.

Fadini GP; Losordo D; Dimmeler S (2012): Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. In: Circ Res 110 (4), S. 624–637.

Fan J; Frey RS; Malik AB (2003): TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. In: J. Clin. Invest 112 (8), S. 1234–1243.

Fang S; Wei J; Pentimikko N; Leinonen H; Salven P; Goodell MA (2012): Generation of Functional Blood Vessels from a Single c-kit⁺ Adult Vascular Endothelial Stem Cell. In: PLoS Biol 10 (10), S. e1001407.

Faure E; Thomas L; Xu H; Medvedev A; Equils O; Arditi M (2001): Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. In: J. Immunol 166 (3), S. 2018–2024.

Favre J; Musette P; Douin-Echinard V; Laude K; Henry JP; Arnal JF et al. (2007): Toll-Like Receptors 2-Deficient Mice Are Protected Against Postischemic Coronary Endothelial Dysfunction. In: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 27 (5), S. 1064–1071.

Fitzner N; Clauberg S; Essmann F; Liebmann J; Kolb-Bachofen V (2008): Human Skin Endothelial Cells Can Express All 10 TLR Genes and Respond to Respective Ligands. In: Clinical and Vaccine Immunology 15 (1), S. 138–146.

Frantz S; Ertl G; Bauersachs J (2007): Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. In: Nat Clin Pract Cardiovasc Med 4 (8), S. 444–454.

Frantz S; Vincent KA; Feron O; Kelly RA (2005): Innate immunity and angiogenesis. In: *Circ Res* 96 (1), S. 15–26.

Furlani D; Donndorf P; Westien I; Ugurlucan M; Pittermann E; Wang W et al. (2012): HMGB-1 induces c-kit⁺ cell microvascular rolling and adhesion via both toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 of endothelial cells. In: *J. Cell. Mol. Med* 16 (5), S. 1094–1105.

Ganju RK; Brubaker SA; Meyer J; Dutt P; Yang Y; Qin S et al. (1998): The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. In: *J. Biol. Chem* 273 (36), S. 23169–23175.

Gee MS; Procopio WN; Makonnen S; Feldman MD; Yeilding NM; Lee WMF (2003): Tumor vessel development and maturation impose limits on the effectiveness of anti-vascular therapy. In: *Am. J. Pathol* 162 (1), S. 183–193.

Grote K; Schutt H; Schieffer B (2011): Toll-like receptors in angiogenesis. In: *ScientificWorldJournal* 11, S. 981–991.

Gul KM; Ahmadi N; Wang Z; Jamieson C; Nasir K; Metcalfe R et al. (2009): Digital thermal monitoring of vascular function: a novel tool to improve cardiovascular risk assessment. In: *Vasc Med* 14 (2), S. 143–148.

Hack CE; Zeerleder S (2001): The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. In: *Crit Care Med* 29 (7 Suppl), S. S21-7.

Hajishengallis G; Wang M; Liang S; Triantafilou M; Triantafilou K (2008): Pathogen induction of CXCR4TLR2 cross-talk impairs host defense function. In: *PNAS* (105; 36), S. 13532–13537.

Harrington EO, Lu Q, Rounds (2007): Endothelial Cell Apoptosis. In: *Endothelial Biomedicine* Aird WC, Cambridge University Press, New York 2007, S. 1081–1097.

Ho TK; Shiwen X; Abraham D; Tsui J; Baker D (2012): Stromal-Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 as Potential Target of Therapeutic Angiogenesis in Critical Leg Ischaemia. In: *Cardiology Research and Practice* 2012 (2), S. 1–7.

Ho TK; Tsui J; Xu S; Leoni P; Abraham DJ; Baker DM (2010): Angiogenic effects of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) variants in vitro and the in vivo

expressions of CXCL12 variants and CXCR4 in human critical leg ischemia. In: *Journal of Vascular Surgery* 51 (3), S. 689–699.

Hur J; Yoon CH; Lee CS; Kim TY; Oh Y; Park KW et al. (2007): Akt is a key modulator of endothelial progenitor cell trafficking in ischemic muscle. In: *Stem Cells* 25 (7), S. 1769–1778.

Huss R; Heil M; Moosmann S; Ziegelhoeffer T; Sagebiel S; Seliger C et al. (2004): Improved Arteriogenesis with Simultaneous Skeletal Muscle Repair in Ischemic Tissue by SCL+ Multipotent Adult Progenitor Cell Clones from Peripheral Blood. In: *J Vasc Res* 41 (5), S. 422–431.

Janeway C; Murphy KP (2009): *Janeway Immunologie*. 7. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl.; S.

JAX Mice Database (2013): JAX Mice Database - 022507 C.129(B6)-Tlr2/J; In: <http://jaxmice.jax.org/strain/022507.html>

Johnson GB, Brunn GJ; Kodaira Y; Platt JL (2002): Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via dection of soluble heparan sulfate by toll-like receptor 4. In: *J Immunol* (168), S. 5233–5239.

Kabrun N; Buhring HJ; Choi K; Ullrich A; Risau W; Keller G (1997): Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. In: *Development* 124 (10), S. 2039–2048.

Kalka C; Masuda H; Takahashi T; Kalka-Moll WM; Silver M; Kearney M et al. (2000): Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97 (7), S. 3422–3427.

Kanaya S; Nemoto E; Ogawa T; Shimauchi H (2009): Porphyromonas gingivalis fimbriae induce unique dendritic cell subsets via Toll-like receptor 2. In: *J Periodontal Res* 44 (4), S. 543–549.

Kanzler H; Barrat FJ; Hessel EM; Coffman RL (2007): Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. In: *Nat. Med* 13 (5), S. 552–559.

Kawakami A; Osaka M; Aikawa M; Uematsu S; Akira S; Libby P et al. (2008): Toll-Like Receptor 2 Mediates Apolipoprotein CIII-Induced Monocyte Activation: Retracted. In: *Circulation Research* 103 (12), S. 1402–1409.

King KY; Goodell MA (2011): Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. In: *Nat. Rev. Immunol* 11 (10), S. 685–692.

Korff T; Augustin, H. G. (1998): Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. In: *J Cell Biol* 143 (5), S. 1341–1352.

Kryczek I; Lange A; Mottram P et al (2005): CXCL12 and Vascular endothelial growth factor synergistically induce Neoangiogenesis in Human Ovarian Cancers. In: *Cancer Res* (65), S. 465–472.

Kuhlmann CRW; Schaefer CA; Reinhold L; Tillmanns H; Erdogan A (2005): Signalling mechanisms of SDF-induced endothelial cell proliferation and migration. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335 (4), S. 1107–1114.

Laitinen L (1987): Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. In: *Histochem J* 19 (4), S. 225–234.

Li TS (2003): Low angiogenic potency induced by the implantation of ex vivo expanded CD117+ stem cells. In: *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 286 (4), S. H1236.

Limbourg A; Korff T; Napp LC; Schaper W; Drexler H; Limbourg FP (2009): Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. In: *Nat Protoc* 4 (12), S. 1737–1748.

Lin E; Freedman JE; Beaulieu LM (2009): Innate Immunity and Toll-like Receptor Antagonists: A Potential Role in the Treatment of Cardiovascular Diseases. In: *Cardiovascular Therapeutics* 27 (2), S. 117–123.

Mangmool S; Kurose H (2011): Gi/o Protein-Dependent and -Independent Actions of Pertussis Toxin (PTX). In: *Toxins* 3 (12), S. 884–899.

Meng G; Rutz M; Schiemann M; Metzger J; Grabiec A; Schwandner R; Lippa PB; Ebel F; Busch DH; Bauer S; Wagner H; Kirschning CJ (2004): Antagonistic antibody

prevents toll-like receptor 2–driven lethal shock-like syndromes. In: *The Journal of Clinical Investigation* 2004 (113; 10).

Mersmann J; Tran N; Latsch K; Habeck K; Iskandar F; Zimmermann R; Zacharowski K (2012): Akt or phosphoinositide-3-kinase inhibition reverses cardio-protection in Toll-like receptor 2 deficient mice. In: *Resuscitation* 83 (11), S. 1404–1410. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2012.04.001.

Mullick AE; Soldau K; Kiosses WB; Bell TA; Tobias PS; Curtiss LK (2008): Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. In: *J. Exp. Med* 205 (2), S. 373–383.

Murdoch C (2000): CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. In: *Immunol Rev* 177, S. 175–184.

Murray JC (2001): Angiogenesis protocols. *Methods in molecular medicine*(46). In: Humana Press: Totowa, N.J..S. ISBN: 0896036987

Novo S; Coppola G; Milio G (2004): Critical limb ischemia: definition and natural history. In: *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 4 (3), S. 219–225.

Orlic D; Kajstura J; Chimenti S; Limana F; Jakoniuk I; Quaini F; Nadal-Ginard B; Bodine DM; Leri A; Anversa P (2001): Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. In: *PNAS* (98,18), S. 10344–10349.

Ozinsky A; Underhill DM; Fontenot JD; Hajjar AM; Smith KD; Wilson CB et al. (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97 (25), S. 13766–13771.

Park HD; Lee Y; Oh YK; Jung JG; Park YW; Myung K et al. (2011): Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor promotes metastasis by regulating TLR/CXCR4 activation. In: *Oncogene* 30 (2), S. 201–211.

Rafii S; Lyden D (2003): Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. In: *Nat. Med* 9 (6), S. 702–712.

Saber T; Veale DJ; Balogh E; McCormick J; Nicanultaigh S; Connolly M; Fearon U (2011): Toll-like receptor 2 induced angiogenesis and invasion is mediated through the Tie2 signalling pathway in rheumatoid arthritis. In: *PLoS ONE* 6 (8), S. e23540.

- Saw J**; Bhatt DL; Moliterno DJ; Brener SJ; Steinhubl SR; Lincoff AM et al. (2006): The influence of peripheral arterial disease on outcomes: a pooled analysis of mortality in eight large randomized percutaneous coronary intervention trials. In: *J. Am. Coll. Cardiol* 48 (8), S. 1567–1572. DOI: 10.1016/j.jacc.2006.03.067.
- Scheibner K**; Lutz MA; Boodoo S; Fenton MJ; Powell JD; Horton MR (2006): Hyaluronan Fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. In: *J Immunol* (177), S. 1272–1281.
- Schmid MA**; Takizawa H; Baumjohann DR; Saito Y; Manz MG (2011): Bone marrow dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes. In: *Blood* 118 (18), S. 4829–4840. DOI: 10.1182/blood-2011-03-344960.
- Shim H** (2009): Targeting CXCR4 in Brain Tumors. In: Erwin G. Meir (Hg.): *CNS Cancer: Humana Press (Cancer Drug Discovery and Development)*, S. 813–845.
- Soylu A**; Kizildağ S; Kavukçu S; Cingöz S; Türkmen M; Demir BK; Sakizli M (2010): TLR-2 Arg753Gln, TLR-4 Asp299Gly, and TLR-4 Thr399Ile polymorphisms in Henoch Schonlein purpura with and without renal involvement. In: *Rheumatol. Int* 30 (5), S. 667–670. DOI: 10.1007/s00296-009-1052-y.
- Taguchi T**; Mitcham JL; Dower SK; Sims JE; Testa JR (1996): Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. In: *Genomics* 32 (3), S. 486–488.
- Takeda K**; Akira S (2004): TLR signaling pathways. In: *Seminars in Immunology* 16 (1), S. 3–9.
- Tang J**; Wang J; Yang J; Kong X; Zheng F; Guo L et al. (2009): Mesenchymal stem cells over-expressing SDF-1 promote angiogenesis and improve heart function in experimental myocardial infarction in rats☆. In: *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 36 (4), S. 644–650.
- Termeer C**; Benedix F; Sleeman J; Fieber C; Voith U; Ahrens T; Miyake K; Freudenberg M; Galanos C (2002): Oligosaccharides of Hyaluronan Activate

Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4. In: J. Exp. Med. © The Rockefeller University Press (195), S. 99–111.

Vabulas RM; Wagner H; Schild H (2002): Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. In: Curr Top Microbiol Immunol 270, S. 169–184.

Venereau E; Schiraldi M; Ugucioni M; Bianchi ME (2013): HMGB1 and leukocyte migration during trauma and sterile inflammation. In: Mol Immunol 55 (1), S. 76–82.

Vlahakis SR; Villasis-Keever A; Gomez T; Vanegas M; Vlahakis N; Paya CV (2002): G Protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. In: J Immunol (169), S. 5546–5554.

Wagner NM; Bierhansl L; Noldge-Schomburg G; Vollmar B; Roesner JP (2013(1)): Toll-Like Receptor 2-Blocking Antibodies Promote Angiogenesis and Induce ERK1/2 and AKT Signaling via CXCR4 in Endothelial Cells. In: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 33 (8), S. 1943–1951.

Wagner NM; Bierhansl L; Butschkau A; Noeldge-Schomburg G; Roesner JP; Vollmar B (2013(2)): TLR2-deficiency of cKit⁺ bone marrow cells is associated with augmented potency to stimulate angiogenic processes. In: Int J Clin Exp Pathol 6 (12), S. 2813–2823.

West XZ; Malinin NL; Merkulova AA; Tischenko M; Kerr BA; Borden EC et al. (2010): Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. In: Nature 467 (7318), S. 972–976.

Wong MKK und Gotlieb AI (1998): The Reorganization of Microfilaments, Centrosomes, and Microtubules During In Vitro Small Wound Reendothelialization. In: The Journal of Cell Biology (107), S. 1777–1783.

Xu Q (2002): Role of Heat Shock Proteins in Atherosclerosis. In: Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 22 (10), S. 1547–1559.

Xu Y; Zhou Y; Lin H; Hu H; Wang Y; Xu G (2013): Toll-like receptor 2 in promoting angiogenesis after acute ischemic injury. In: Int J Mol Med 31 (3), S. 555–560

Yoder MC; Mead LE; Prater D; Krier TR; Mroueh KN; Li F et al. (2007): Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. In: Blood 109 (5), S. 1801–1809.

Ziegler G; Harhausen D; Schepers C; Hoffmann O; Röhr C; Prinz V et al. (2007): TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 359 (3), S. 574–579.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die verschiedenen Toll-like Rezeptoren und deren Liganden	3
Abbildung 2: Übersicht der Signaltransduktionswege des SDF-1	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung magnetische Stammzellisolation	16
Abbildung 4: PCR Analyse des TLR2 Genprodukts.....	18
Abbildung 5: Prinzip einer Immunpräzipitation.....	27
Abbildung 6: Aufnahmen der Thermografie	30
Abbildung 7: Temperaturdifferenzen im Hinterlauf bei Wildtyp und TLR2 ^{-/-} Tieren..	35
Abbildung 8: Immunhistochemie des M. gastrocnemius der Wildtyp- und TLR2 ^{-/-} Tiere.....	38
Abbildung 9: Ergebnisse der TLR2 ^{-/-} Stammzellen im Hinterlaufischämiemodell	42
Abbildung 10: Darstellung der Kapillarbildung von TLR2 ^{-/-} Stammzellen im Matrigelplug	43
Abbildung 11: TLR2 ^{-/-} Stammzellen im Matrigel-Angiogenese-Modell	45
Abbildung 12: TLR2 ^{-/-} Stammzellen im Sphäroid-Angiogenese-Modell.....	47
Abbildung 13: TLR2 ^{-/-} Stammzellen im Migrationsmodell	48
Abbildung 14: TLR2 ^{-/-} cKit ⁺ Stammzellen zeigen eine gleichbleibende CXCR4 Expression aber eine erhöhte basale Aktivierung des MAP-Kinase AKT	50
Abbildung 15: Ergebnisse des anti-TLR2 Antikörpers im Hinterlaufischämiemodell	53
Abbildung 16: TLR2-blockierende-Antikörper im Matrigel-Angiogenese-Modell.....	55
Abbildung 17: TLR2-blockierende-Antikörper im Sphäroid-Angiogenese-Modell	56
Abbildung 18: TLR2-blockierende-Antikörper im Migrationsmodell.....	58
Abbildung 19: TLR2 und TLR4 Liganden im Matrigel-Angiogenese-Modell	59
Abbildung 20: Western Blot für EKR1/2, AKT und p38 mit TLR2-blockierenden-Antikörper Behandlung.....	62

Abbildung 21: Western Blot für ERK1/2 und AKT mit TLR2 Liganden	63
Abbildung 22: Inhibitoren von ERK1/2, AKT und p38 im Matrigel-Angiogenese-Modell	64
Abbildung 23: Blockade des CXCR4 im Matrigel-Angiogenese-Modell	66
Abbildung 24: Behandlung mit CXCR4-siRNA im Matrigel-Angiogenese-Modell	67
Abbildung 25: Western Blot für ERK1/2 bei einer Behandlung mit CXCR4-siRNA..	68
Abbildung 26: Effekte des Petrussistoxin im Matrigel-Angiogenese-Modell und im Western Blot für ERK1/2	70
Abbildung 27: Immunpräzipitation für mit TLR2-blockierenden-Antikörpern behandelte Zellen.....	72
Abbildung 28: Immunpräzipitation für TLR2 Liganden	73

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Endotheliales Wachstumsmedium.....	14
Tabelle 2: MACS Puffer	15
Tabelle 3: Homburg Lysepuffer.....	24

7.3. Abkürzungsverzeichnis

A.	<u>A</u> rteria
AK	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
BCA	<u>B</u> icin <u>h</u> oninic <u>a</u> cid (Bicichoninsäure)
BSA	<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
CXCR4	<u>C</u> X <u>C</u> -Motiv-Chemokin <u>r</u> ezeptor <u>4</u>
DAMPs	<u>D</u> amage- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern molecules
DAPI	4',6- <u>d</u> iamidino-2- <u>p</u> henyl <u>i</u> ndole
DNA	<u>D</u> eoxyribon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> ccetat
ELISA	<u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
ERK	<u>E</u> xtracellular-signal <u>R</u> egulated <u>K</u> inases
FCS	<u>F</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum
FITC	<u>F</u> luorescein <u>i</u> sothiocyana <u>t</u> e
GAPDH	<u>G</u> lycerinaldehyd-3-phosphat- <u>D</u> ehydrogenase
G _i	<u>I</u> nhibitorisches <u>G</u> uaninnucleotid-bindendes Protein
HIF-1	<u>H</u> ypoxie-induzierter <u>F</u> aktor-1
HMGB-1	<u>H</u> igh- <u>M</u> obility- <u>G</u> roup-Protein <u>B</u> 1
HRP	<u>H</u> orseradish- <u>P</u> eroxidase
HSP	<u>H</u> itzes <u>s</u> chockprotein
HUVEC	<u>H</u> uman <u>U</u> mbilical <u>V</u> ein <u>E</u> ndothelial <u>C</u> ells
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IL-6	<u>I</u> nterleukin- <u>6</u>
IP	<u>I</u> mmunpräzipitation
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharide
LTA	<u>L</u> ipoteichoic <u>a</u> cid
M.	<u>M</u> usculus
MAP-Kinase	<u>M</u> itogen-activated protein kinases
NF κ B	<u>N</u> uklear <u>F</u> actor <u>k</u> appa <u>B</u>
PAMPs	<u>P</u> athogen- <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> atterns
pAVK	<u>P</u> eriphere arterielle <u>V</u> erschlu <u>s</u> s <u>k</u> rankheit
PBS	<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline

PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PI3K	<u>P</u> hospho <u>i</u> nositid- <u>3</u> - <u>K</u> inase
PRR	<u>P</u> attern- <u>r</u> ecognition <u>r</u> eceptors
PTX	<u>P</u> ertussis <u>t</u> ox <u>i</u> n
RNA	<u>R</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid
SDF-1	<u>S</u> tromal cell- <u>d</u> erived <u>f</u> actor <u>1</u>
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
SEM	<u>S</u> tandard <u>E</u> rror of the <u>M</u> ean
siRNA	<u>S</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> NA
TAK	<u>T</u> GF-beta <u>a</u> ctivated <u>k</u> inase
TNF α	<u>T</u> umor <u>n</u> ekrose <u>f</u> aktor- <u>\alpha</u>
TLR	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike <u>R</u> ezeptor
TLR2 ^{-/-}	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike <u>R</u> ezeptor <u>2</u> <u>D</u> efizienz
WT	<u>W</u> ild <u>t</u> yp
VEGF	<u>V</u> ascular <u>E</u> ndothelial <u>G</u> rowth <u>F</u> actor

7.4. Danksagung

Ich möchte Frau **Prof. Dr. med. Gabriele Nöldge-Schomburg**, Direktorin der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Rostock, meinen Dank dafür aussprechen, dass ich diese Arbeit als Doktorandin in ihrer Klinik absolvieren durfte.

Meinem Doktorvater **PD Dr. med. habil. Jan P. Roesner**, Oberarzt der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Rostock, danke ich sehr herzlich für das Überlassen der Thematik dieser Doktorarbeit und eine außergewöhnliche guten Betreuung. Darüber hinaus danke ich ihm für seine stetige Unterstützung bei dieser Arbeit, die Möglichkeit an wissenschaftlichen Kongressen beizuwohnen und sein stets offenes Ohr.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. med Nana-M. Wagner** für die zahlreichen und sehr lehrreichen Stunden im Labor und auch beim Schreiben dieser Arbeit. Mit ihrem außerordentlichen Engagement, ihrem Wissen und ihrer Leidenschaft für dieses Projekt hat sie mich stets freundschaftlich unterstützt. Ihr Beistand beschränkte sich dabei nicht nur auf diese Dissertation, sondern bezog sich auch auf viele weitere Probleme, denen man als Student der Medizin begegnet. Auf diese Weise eröffnete sie mir Chancen, die mir ohne ihre Hilfe wahrscheinlich verwehrt geblieben wären.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau **Prof. Dr.med. Brigitte Vollmar**, der Direktorin des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrem Institut durchzuführen. Ich danke ihr für die stets freundliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente und insbesondere für die vielen angeregten Diskussionen.

Weiterhin bedanke ich mich bei **Berit Blendow, Dorothea Franz, Maren Nerowski und Eva Lorbeer-Rehfeld** die mich mit ihrer medizinisch-technischen Erfahrung im Laufe dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Allen Mitarbeitern der Experimentellen Chirurgie, auch den hier nicht namentlich genannten, bin ich für die freundliche Zusammenarbeit, für ihre Hilfsbereitschaft und für das angenehme Arbeitsklima am Institut sehr dankbar.

Am Ende möchte ich mich auch bei **meiner Familie** und **Freunden** bedanken, da sie mir in all dieser Zeit mit viel Unterstützung, Kraft und Liebe zur Seite standen und dadurch diese Dissertation erst ermöglichten. Danke euch von Herzen.

7.5. Thesen zur Dissertation

„Der Toll-like Rezeptor 2 moduliert Endothelzellfunktionen und
Gefäßneubildungsprozesse

Bedeutung der Interaktion des TLR2 mit dem SDF-1/CXCR4 System“

1. Im Hinterlaufischämiemodell der Maus hat eine TLR2 Defizienz günstige Effekte auf die Wiederherstellung der Perfusion sowie die Zahl der Kapillaren im Wadenmuskel nach Ligatur der A. femoralis.
2. TLR2-defiziente hämatopoetische Stammzellen weisen eine größere angiogene Potenz auf im Vergleich zu Stammzellen mit Expression eines funktionellen TLR2-Proteins.
3. Die günstigen, proangiogenen Effekte einer TLR2 Defizienz sind durch Applikation TLR2-blockierender Antikörper *in vitro* und *in vivo* nachvollziehbar.
4. TLR2-blockierende Antikörper aktivieren dieselben Signaltransduktionswege (MAPKinasen AKT und ERK1/2) wie der bekannte, proangiogene Faktor SDF-1, indem sie eine Interaktion des TLR2 mit dem CXCR4 induzieren.
5. Der Nachweis einer Interaktion des TLR2 mit dem CXCR4 in Endothelzellen identifiziert einen bislang unbekanntem molekularen Mechanismus an der Schnittstelle von Angiogenese und Inflammation.
6. TLR2-blockierende Antikörper eignen sich zur Behandlung vaskulärer Erkrankungen durch günstige Effekte auf die Endothelzellfunktion.