

Mobilisation und Funktion von Endothelialen Progenitorzellen (EPC) durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems

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

Tobias Asdonk
aus Aachen

2012

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Nickenig
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Eicke Latz

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.09.2012

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Innere Medizin-Kardiologie/Angiologie/Pneumologie/Internistische Intensivmedizin
Universitätsklinikum Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| Einleitung | 9 |
| Atherosklerose | 9 |
| Endotheliale Dysfunktion | 10 |
| Oxidativer Stress | 11 |
| Endotheliale Mikropartikel | 12 |
| Atherosklerotischer Plaque | 13 |
| Plaque Ruptur | 14 |
| Endotheliale Progenitorzellen (EPC) | 15 |
| Immunsystem | 18 |
| Pattern recognition receptors (PRR) | 20 |
| Toll-like Rezeptoren (TLR) | 21 |
| TLR-3 | 22 |
| RIG-I | 23 |
| MDA-5 | 24 |
| Virale Liganden | 24 |
| Eigenes Forschungsvorhaben | 25 |
| Material und Methoden | 27 |
| Zellversuche - in vitro | 28 |
| Isolierung von Endothelialen Progenitorzellen für die Zellkultur | 28 |
| Gewinnung von Zellen aus murinen Milzen | 28 |
| Ficoll-Trennung zur Isolierung von mononukleären Zellen (MNC) | 28 |
| Zellstimulation | 30 |
| Mausversuche - in vivo | 30 |
| 1. Mausexperiment | 31 |
| 2. Mausexperiment | 31 |
| 3. Mausexperiment | 32 |
| 4. Mausexperiment | 32 |
| Organentnahme aus den Mäusen | 32 |

| | |
|--|----|
| Immunhistochemie | 32 |
| Bestimmung des Rezeptorexpressionsmusters | 33 |
| L-012 Chemiluminescence | 35 |
| Apoptose Assay | 36 |
| Scratch Assay | 36 |
| FACS (Fluorescence activated cell sorter) Messung | 36 |
| Carotis Injury | 38 |
| Transfusionsexperimente | 39 |
| Statistik | 39 |
| Ergebnisse | 40 |
| 1. Mausexperiment | 40 |
| In vitro Zellversuche | 41 |
| Immunhistochemie | 41 |
| Real-Time-PCR | 41 |
| Apoptose | 46 |
| L-012 Chemiluminescence | 48 |
| Migration und Proliferation | 51 |
| In vivo Tierversuche | 53 |
| 2. Mausexperiment | 53 |
| FACS | 53 |
| Knochenmark | 54 |
| Milz | 56 |
| CFU Hill | 56 |
| Late-outgrowth EPC | 58 |
| 3. Mausexperiment | 59 |
| FACS | 60 |
| CFU Hill | 63 |
| 4. Mausexperiment | 66 |
| Transfusionsexperiment | 66 |
| Diskussion | 69 |
| Auswirkung der Immunkompetenz von EPC und Endothelzellen | 69 |
| Exogene versus endogene Liganden | 70 |

| | |
|--|----|
| PRR und Atherosklerose | 71 |
| Therapeutische Optionen und zukünftige Forschung | 72 |
| Zusammenfassung | 74 |
| Literaturverzeichnis | 75 |
| Danksagung | 87 |
| Lebenslauf | 88 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| <i>3pRNA</i> | <i>RNA with triphosphate at the 5'end</i> |
| <i>ACE</i> | <i>angiotensin converting enzyme</i> |
| <i>AIM2</i> | <i>absent in melanoma 2</i> |
| <i>AP-1</i> | <i>activated protein-1</i> |
| <i>APC</i> | <i>antigen-presenting cell</i> |
| <i>BMS</i> | <i>bare-metal-stent</i> |
| <i>CAC</i> | <i>circulating angiogenic cell</i> |
| <i>CARD</i> | <i>N-terminal caspase recruitment domain</i> |
| <i>Cardif</i> | <i>CARD adaptor inducing IFN-β</i> |
| <i>CD</i> | <i>cluster of differentiation</i> |
| <i>CFU</i> | <i>colony forming unit</i> |
| <i>CXC-4</i> | <i>C-X-C chemokine receptor type-4</i> |
| <i>DAMP</i> | <i>danger-associated molecular pattern</i> |
| <i>DES</i> | <i>drug-eluting-stent</i> |
| <i>DAI</i> | <i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors</i> |
| <i>DNA</i> | <i>desoxyribonucleic acid</i> |
| <i>EBM-2</i> | <i>Endothelium Cell Basal Medium-2</i> |
| <i>EDRF</i> | <i>endothelium-derived-relaxing-factor</i> |
| <i>EC</i> | <i>endothelial cell</i> |
| <i>ECFC</i> | <i>endothelial colony forming cell</i> |
| <i>EMP</i> | <i>endothelial microparticle</i> |
| <i>EPC</i> | <i>endothelial progenitor/precursor cell</i> |
| <i>EGF</i> | <i>epidermal growth factor</i> |
| <i>FACS</i> | <i>fluorescence activated cell sorter</i> |
| <i>FADD</i> | <i>fas associated death domain</i> |
| <i>Flk-1</i> | <i>fetal liver kinase-1</i> |
| <i>G-CSF</i> | <i>granulocyte colony-stimulating factor</i> |
| <i>HIV</i> | <i>human immunodeficiency virus</i> |
| <i>HMGB-1</i> | <i>high-mobility group box protein-1</i> |
| <i>HMG-CoA</i> | <i>β-hydroxy-methyl-glutaryl-CoA</i> |

| | |
|-----------------------------------|---|
| <i>H₂O₂</i> | <i>hydrogen peroxide</i> |
| <i>HOCL</i> | <i>hypochlorite</i> |
| <i>HSP60</i> | <i>heat shock protein 60</i> |
| <i>ICAM-1</i> | <i>intracellular adhesion molecule-1</i> |
| <i>IL</i> | <i>interleukin</i> |
| <i>IRF-3</i> | <i>interferon regulatory factor-3</i> |
| <i>LDL</i> | <i>low density lipoprotein</i> |
| <i>LPS</i> | <i>lipopolysaccharide</i> |
| <i>LRR</i> | <i>leucin-rich repeat motifs</i> |
| <i>Mal</i> | <i>MyD88-adaptor like</i> |
| <i>MCP-1</i> | <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> |
| <i>MDA-5</i> | <i>melanoma differentiation-associated gene-5</i> |
| <i>MHC</i> | <i>major histocompatibility complex</i> |
| <i>MMP</i> | <i>matrix metalloprotease</i> |
| <i>MNC</i> | <i>mononuclear cell</i> |
| <i>MP</i> | <i>micro particle</i> |
| <i>MyD88</i> | <i>myeloid differentiation primary response protein 88</i> |
| <i>NADPH</i> | <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> |
| <i>NF-κB</i> | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| <i>NLR</i> | <i>NOD-like receptor</i> |
| <i>NO</i> | <i>nitric oxid</i> |
| <i>NOD</i> | <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i> |
| <i>O₂⁻</i> | <i>superoxide anion</i> |
| <i>OH</i> | <i>hydroxyl radical</i> |
| <i>ONOO⁻</i> | <i>peroxynitrite</i> |
| <i>PAMP</i> | <i>pathogen-associated molecular pattern</i> |
| <i>PIGF</i> | <i>placental growth factor</i> |
| <i>poly(I:C)</i> | <i>polyinosinic-polycytidylic acid</i> |
| <i>PRR</i> | <i>pattern-recognition-receptor</i> |
| <i>PTCA</i> | <i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i> |
| <i>RD</i> | <i>C-terminal repression domain</i> |

| | |
|-----------------|---|
| <i>RIG-I</i> | <i>retinoic acid inducible gene-1</i> |
| <i>RIP1</i> | <i>receptor-interacting serine-threonine kinase 1</i> |
| <i>RLR</i> | <i>RIG-I like receptor</i> |
| <i>RNA</i> | <i>ribonucleic acid</i> |
| <i>mRNA</i> | <i>messenger RNA</i> |
| <i>microRNA</i> | <i>microRNA</i> |
| <i>ROS</i> | <i>reactive oxygen species</i> |
| <i>SDF-1</i> | <i>stroma cell-derived factor-1</i> |
| <i>TIE-2</i> | <i>tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains-2</i> |
| <i>TICAM-1</i> | <i>toll-interleukin-1 receptor (TIR) domain containing adaptor molecule-1</i> |
| <i>TLR</i> | <i>toll-like receptor</i> |
| <i>TIR</i> | <i>toll-interleukin-1 receptor</i> |
| <i>TRAM</i> | <i>TRIF-related adaptor molecule</i> |
| <i>TRIF</i> | <i>TIR domain-containing adaptor-inducing interferon-β</i> |
| <i>VCAM-1</i> | <i>vascular cellular adhesion molecule-1</i> |
| <i>VEGFR-2</i> | <i>vascular endothelial growth factor receptor-2</i> |
| <i>VISA</i> | <i>virus induced signaling adaptor</i> |

Einleitung

Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronische Inflammation der Gefäßwand. Ihre Hauptmanifestationsformen sind die Koronare Herzkrankheit, welche zu Herzinfarkt und chronisch ischämischer Kardiomyopathie sowie Herzinsuffizienz führen kann, die periphere arterielle Verschlusskrankheit und die zerebrovaskuläre Insuffizienz bzw. der Schlaganfall. Diese sind die Haupttodesursachen in der westlichen Welt und werden voraussichtlich bis 2020 diesen Platz auch weltweit einnehmen (Murray und Lopez et al., 1997). Eine Reihe von Risikofaktoren wurde als ursächlich für die Manifestation der Atherosklerose beschrieben. Es handelt sich hauptsächlich um: Nikotinusus, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, fortgeschrittenes Alter, männliches Geschlecht und familiäre Belastung. Ebenfalls begünstigend wirken Übergewicht, cholesterinreiche hochkalorische Diät, körperliche Inaktivität, Hyperfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie, erhöhtes Lipoprotein(a), Hypertriglyzeridämie und Glucoseverwertungsstörung. Auch eine Beteiligung von Herpesviren und Chlamydia pneumoniae wurde beschrieben (Ross et al., 1999). Es kommt dabei zwischen den einzelnen Risikofaktoren zu wechselseitigen Beeinflussungen und überadditiven Effekten, sodass aus ihnen teilweise ein individuelles atherogenes Risikoprofil abgeleitet werden kann.

Atherosklerose selbst wird als stadienhafter, chronisch inflammatorischer Prozess der großen und mittleren Arterien im Sinne einer *repair-to-injury* Reaktion auf den pathogenen Einfluss der Risikofaktoren definiert (Ross et al., 1993). Prädisponiert sind Lokalisationen mit hämodynamischen Besonderheiten (abnehmender Blutfluss, Rückstrom, Totwasserzonen, Krümmungen), die sich zum Beispiel an der Bauchaorta, den Koronarien, der Arteria carotis interna, der Arteria femoralis oder den Abzweigungsstellen des zerebralen Circulus arteriosus Willisii finden (Cornhill et al., 1985, Wissler und Vesselinovitch et al., 1983).

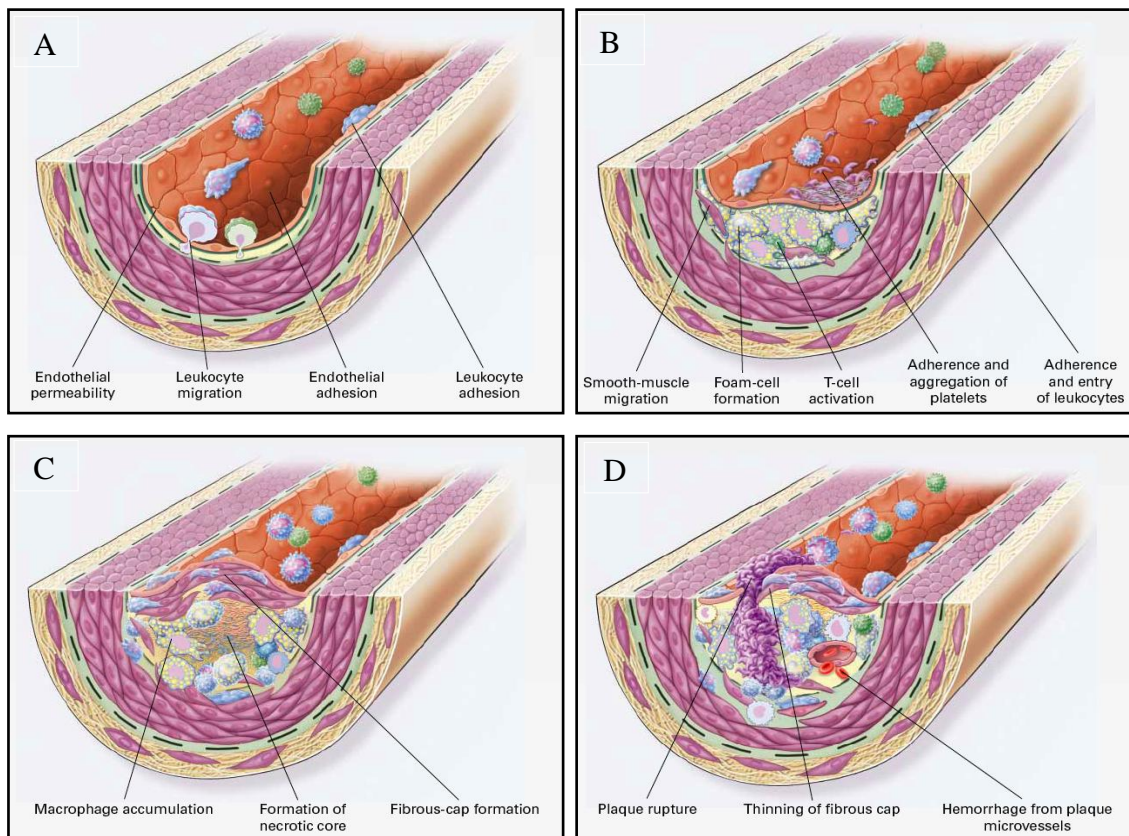


Abb. 1 Stadienhafter Verlauf der Atherosklerose (Ross et al., 1999)

Eine Aktivierung und Schädigung des Endothels führt zur Expression von Adhäsionsmolekülen, gefolgt von einer Leukozytendiapedese durch die Endothelschicht (A). Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung von Schaumzellen, der Migration und Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und der Formation einer atherosklerotischen Plaque (B). In fortgeschrittenen Stadien ist die Läsion durch die Akkumulation von Makrophagen, der Bildung eines nekrotischen Lipidkerns und einer fibrösen Plaquemembran gekennzeichnet (C), gefolgt von einer Plaqueruptur, Exposition des thrombogenen Inhalts in die Blutstrombahn und nachfolgender Thrombenbildung (D).

Endotheliale Dysfunktion

Noch bevor es zur Ausbildung einer atherosklerotischen Läsion kommt, ist eine Dysfunktion von Endothelzellen nachweisbar. Hierunter versteht man eine Beeinträchtigung der Endothel vermittelten Vasodilatation (Feletou und Vanhoutte et al., 2006). Dies wurde erstmals in Tiermodellen hypertensiver Ratten (Lockette et al., 1986) und nachfolgend auch in Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren (Ludmer et al., 1986) beobachtet. Kurz zuvor war beschrieben worden, dass die Acetylcholin vermittelte Vasodilatation der Gefäße obligat ein funktionsfähiges Endothel voraussetzt, welches zur Produktion von *endothelium-derived-relaxing-factor (EDRF)* oder auch *nitric oxid (NO)* befähigt ist (Furchgott und Zawadzki et al., 1980). *NO* selbst

kontrolliert nicht nur den Gefäßtonus, sondern inhibiert auch die Leukozytenadhäsion, Thrombozytenaggregation und Proliferation von Intima sowie glatten Gefäßmuskelzellen und ist somit ein essentielles parakrines Hormon für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase (Forstermann et al., 2008). Unter dem Begriff Endotheliale Dysfunktion versteht man folglich eine Funktionseinschränkung durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von *NO*, daneben kommt es zu einem zunehmenden Endothelzellverlust durch vermehrte Apoptose und verminderter Regenerationsfähigkeit. Die Endotheliale Dysfunktion ist nicht nur ein obligater Bestandteil in allen Stadien der Atherosklerose, sondern zusätzlich auch mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert (Halcox et al., 2002, Schachinger et al., 2000).

Oxidativer Stress

Die Bioverfügbarkeit von *NO* wird durch oxidativen Stress beeinträchtigt. Hierunter versteht man ein vermehrtes Vorkommen reaktionsfreudiger Sauerstoffradikale, sogenannter *reactive oxygen species (ROS)*, wie Superoxid Anion bzw. superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikal bzw. hydroxyl radical (OH^{\cdot}), Stickstoffmonoxid bzw. nitric oxid (NO^{\cdot}), Wasserstoffperoxid bzw. hydrogen peroxide (H_2O_2), Peroxynitrit bzw. peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) und Hypochlorit bzw. hypochlorite ($HOCL$), welche beim Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren vermehrt in der Gefäßwand nachgewiesen werden können. *ROS* reduzieren das verfügbare *NO* via Inaktivierung zu toxischem Peroxynitrit und tragen somit direkt zur Entstehung einer Endothelialen Dysfunktion bei. Zusätzlich schädigen die Sauerstoffradikale die sie umliegenden zellulären und extrazellulären Komponenten wie etwa *DNA*, Proteine oder Lipide. Quelle für Sauerstoffradikale sind beispielsweise die *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)* Oxidase, die Xanthinoxidase oder die mitochondrale Atmungskette (Forstermann et al., 2010).

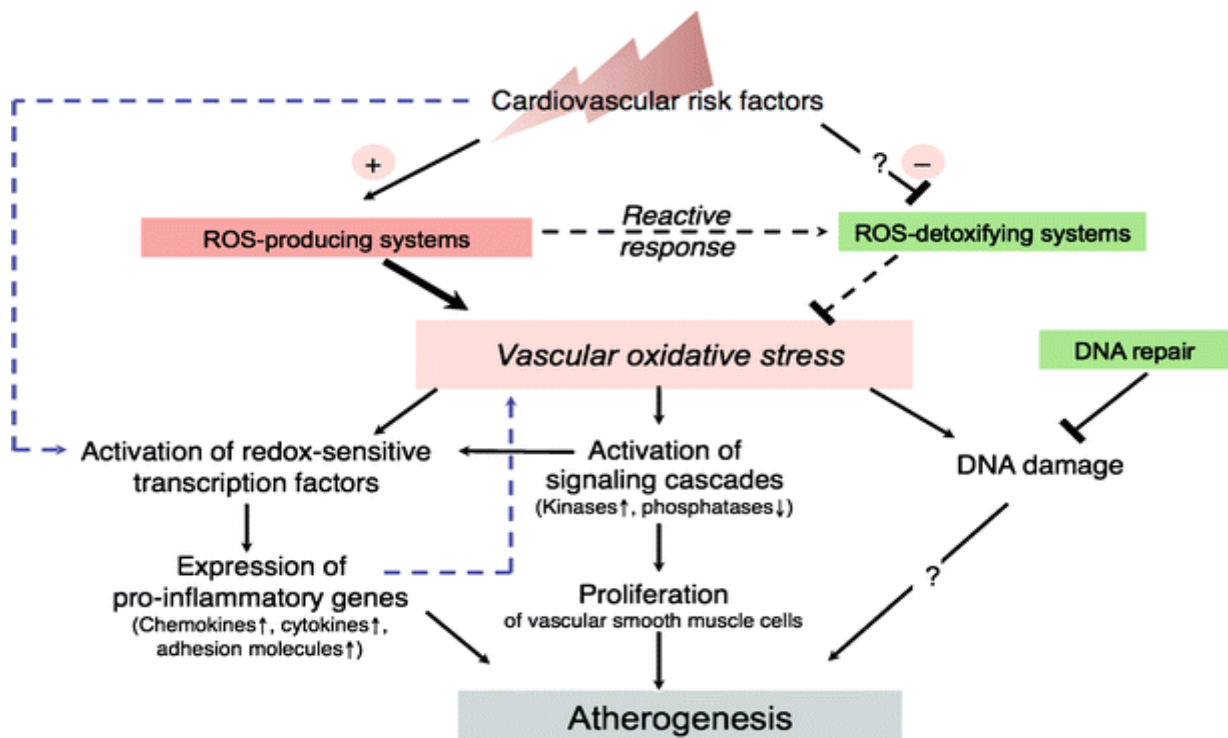


Abb. 2 Oxidativer Stress und Atherosklerose (Forstermann et al., 2010)

Kardiovaskuläre Risikofaktoren führen zu einem Ungleichgewicht prooxidativer Enzyme wie NADPH Oxidase, Xanthinoxidase oder der mitochondrialen Atmungskette gegenüber antioxidativen protektiven Enzymen wie Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase oder Katalase. Dies führt zur vermehrten Bildung proatherogener reaktionsfreudiger Sauerstoffradikale (oxidativer Stress), wodurch es zu einer DNA Schädigung, Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und einer vermehrten Expression proinflammatorischer Gene kommt.

Endotheliale Mikropartikel

Durch die Schädigung des Endothels kommt es zum Verlust seiner homöostatischen Eigenschaften, erhöhter parazellulärer Permeabilität, verminderter *NO* Produktion, Sekretion proinflammatorischer Zytokine, Wachstumsfaktoren und Chemokine wie *monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)* (Braunersreuther et al., 2007) sowie zur Expression von *intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)* und *vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)*, welche zur Rekrutierung von Makrophagen und T-Lymphozyten aus dem Blutstrom führen (Rudijanto et al., 2007). Apoptose und Zellaktivierung oder Zellverletzung führen zudem über eine Desintegration des Zytoskeletts mit konsekutiver Destabilisierung der Zellmembran zu einer Freisetzung von *Mikropartikeln (MP)* (Hugel et al., 2005). Dies sind submikroskopische Membranabschnürungen, welche eine Phospholipid-Doppelmembran und ein für den jeweiligen Zelltyp charakteristisches Lipid- bzw. Proteinprofil sowie charakteristische Membranantigene

besitzen. Beispiele für Zellen, welche *MP* freisetzen, sind die an der Atherosklerose beteiligten Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen, Leukozyten und Thrombozyten (VanWijk et al., 2003). *MP* besitzen prokoagulatorische und proinflammatorische Eigenschaften (Leroyer et al., 2008), etwa induzieren thrombozytäre *MP* die Freisetzung von *Interleukin-6 (IL-6)* und *Interleukin-8 (IL-8)* sowie die Expression der Adhäsionsmoleküle *ICAM-1*, *VCAM-1* und *E-Selektin*, was wiederum zu Leukozytenmigration und Diapedese beitragen kann. *MP*, welche von Endothelzellen stammen, werden als *Endotheliale Mikropartikel (EMP)* bezeichnet. Diese sind bei Patienten mit Atherosklerosemanifestationen wie akutem Koronarsyndrom erhöht (Bernal-Mizrachi et al., 2003) und tragen über eine Beeinträchtigung der *NO* Freisetzung aus Endothelzellen wiederum zur Entstehung einer Endothelialen Dysfunktion bei (Amabile et al., 2005). Zudem dienen *MP* als Transportvesikel für Proteine, *mRNA* und *microRNA* (Rautou und Mackman et al., 2012).

Atherosklerotischer Plaque

Eine weitere wichtige Rolle spielen *low density lipoprotein (LDL)* Partikel, welche Endothel- und glatte Gefäßmuskelzellen direkt schädigen (Griendling und Alexander et al., 1997, Morel et al., 1983, Navab et al., 1996) und ein wichtiger Bestandteil von atherosklerotischen Läsionen sind (Yla-Herttuala et al., 1989). Der Pathomechanismus ist hierbei die Oxidation von *LDL* etwa durch *ROS*, welches nachfolgend über *scavenger* Rezeptoren der Makrophagen internalisiert werden kann (Han et al., 1997), wodurch diese zu Schaumzellen, *foam cells* werden. Anfänglich kommt den Schaumzellen eine protektive Rolle zu, da sie am Abtransport des *LDL* beteiligt sind. Im weiteren Verlauf jedoch bilden sie chemotaktische Faktoren, wodurch es zu einer verstärkten Migration von Monozyten in die atherosklerotische Läsion kommt.

Erstes morphologisches Korrelat des atherosklerotischen Prozesses ist der sogenannte *fatty streak*, eine Ansammlung von T-Lymphozyten und aus Monozyten entstandenen Makrophagen, die initial die atherosklerotische Läsion bilden (Stary et al., 1994). Atherosklerotische Läsionen werden definiert als asymmetrisch verteilte, fokale Verdickungen der innersten Gefäßwandschicht, der Intima. Sie bestehen aus Zellen, Bindegewebe und Matrixelementen, Lipiden und Debris.

In allen Stadien der Atherosklerose sind hauptsächlich Makrophagen sowie T-Lymphozyten beteiligt (Jonasson et al., 1986). Durch die von diesen Zellgruppen sowie von Endothelzellen

produzierten proinflammatorischen Zytokine und Chemokine kommt es im Verlauf der andauernden Entzündungsreaktion zu einer weiteren Schädigung im Bereich der Läsion und zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen. Für den weiteren Verlauf entscheidend ist ein Wechsel des Phänotyps von glatten Gefäßmuskelzellen. Diese werden - im Gegensatz zu ihrem normalen Zustand als stationäre, für die Gefäßkontraktion zuständige Zellen - zur Proliferation und Migration von der Media in die Intima angeregt. Dort bilden sie extrazelluläre Matrix in Form von Proteoglykanen, Elastin und Kollagen, was zur Organisation der Läsion beiträgt. Denudiertes Endothel führt experimentell zu einer gesteigerten Proliferation glatter Muskelzellen, welches wiederum zur Neointimabildung führt (Lindner und Reidy et al., 1993). So entsteht die nächste Stufe, die sog. *intermediate lesion*. Die durch Muskelzellen verdickte Zellwand im Bereich der Läsion wird anfänglich noch durch eine Dilatation des Gefäßes kompensiert, sodass das Lumen unverändert bleibt (Glagov et al., 1987). Bei anhaltender Migration und Proliferation von Leukozyten und glatten Gefäßmuskelzellen im Läsionsbereich und Akkumulation von Bindegewebe wird dieser Mechanismus überfordert, so dass es schließlich zu einer Einengung des Lumens mit konsekutiver Veränderung der Blutströmungsverhältnisse kommt. Die besonders bei körperlicher Belastung resultierende Ischämie der abhängigen Körperteile macht sich klinisch als Angina pectoris, Claudicatio intermittens, Dyspnoe bzw. synkopale Ereignisse bemerkbar.

Plaque Ruptur

Im atherosklerotischen Plaque kommt es zum Zelltod von Schaumzellen, die einen nekrotischen Kern oder *necrotic core* bilden, welcher aus Debris und Lipiden besteht. Die durch Makrophagen induzierte Produktion fibrösen Gewebes durch die glatten Gefäßmuskelzellen führt zur Bildung einer Plaquekappe oder *fibrous cap*, welches den nekrotischen Bereich gegen das Gefäßlumen abgrenzt. Man spricht nun von einer *advanced* bzw. *complicated lesion*. In manchen Fällen kommt es nachfolgend zur Plaqueruptur. Eine Infiltration des *fibrous cap* mit Makrophagen und T-Lymphozyten bei gleichzeitig verminderter Anzahl von glatten Muskelzellen führt zu dessen Ausdünnung (Ross et al., 1999). Makrophagen werden von T-Lymphozyten zur Produktion von Proteasen, v.a. *MMP* (*matrixmetallo protease*) stimuliert, was zu einer Instabilität der Plaques führen kann (Schonbeck et al., 1997). Es kommt zu Rissen im *fibrous cap*, verbunden mit Einblutungen in die Plaque oder Freisetzung und Exposition von thrombogenem Plaqueinhalt in das Gefäßlumen (Schwartz et al., 2007). Die hiernach folgende Thrombosierung mit

Lumenobliteration bzw. die Embolisierung des Thrombus in abhängige Versorgungsgebiete ist der dem Herzinfarkt oder Schlaganfall zugrunde liegende Pathomechanismus (Arbustini et al., 1999).

Endotheliale Progenitorzellen (EPC)

Die allgemeine Vorstellung, dass die Regeneration von geschädigtem Endothel allein durch ortsständige ausdifferenzierte Endothelzellen gewährleistet wird, wurde mit der Erstbeschreibung von Zellen revolutioniert, welche sowohl Oberflächenmarker von hämatopoetischen Stammzellen wie *cluster of differentiation (CD) 133* als auch von Endothelzellen wie *CD34*, *fetal liver kinase-1 (Flk-1)*, *Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains-2 (TIE-2)* besitzen (Asahara et al., 1997). *EPC* dienen nach Mobilisation aus dem Knochenmark in das periphere Blut als Quelle für den Ersatz untergegangener Endothelzellen, indem sie ausdifferenzieren und sich in die Endothelschicht integrieren (Wassmann et al., 2006), zum anderen aber sind sie auch direkt zur *de novo* Gefäßbildung befähigt (Hirschi et al., 2008, Hur et al., 2004, Ingram et al., 2004, Lin et al., 2000). Weiterhin können sie über parakrine Mechanismen die Gefäßbildung regulieren (Rehman et al., 2003, Sieveking et al., 2008, Zengin et al., 2006).

Eine genaue Definition der *EPC* steht bis heute noch aus und ist aktuell Gegenstand kontroverser wissenschaftlicher Diskussionen (Timmermans et al., 2009). Die heute zumeist gebräuchliche Identifikation von *EPC* erfolgt über die Expression der Oberflächenmarker *CD133*, *CD34* und *vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2)* (Peichev et al., 2000, Reyes et al., 2002, Werner et al., 2005).

Bisher wurden durch verschiedene Kulturverfahren unterschiedliche Subgruppen der *EPC* beschrieben. *In vitro* unterscheidet man *late-outgrowth EPC* mit hohem Proliferationspotential, welche an der Neovaskularisation und Reendothelialisierung direkt beteiligt sind und auch als *endothelial colony-forming cells (ECFC)* bezeichnet werden (Hirschi et al., 2008, Hur et al., 2004, Van Craenenbroeck und Conraads et al.), von *early EPC*. Zu diesen werden sowohl die *colony forming units (CFU) Hill* als auch die *circulating angiogenic cells (CAC)* gerechnet. *Early EPC* tragen indirekt über die Sekretion parakriner Faktoren zur Endothelrestauration bei (Pearson et al., 2009, Sieveking et al., 2008, Steinmetz et al., 2009).

EPC spielen in allen Stadien der Atherosklerose und deren Folgezuständen wie Herzinfarkt und Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle.

| Stadium der Atherosklerose | EPC Funktion |
|---|--|
| frühe Endothelläsion (endotheliale Dysfunktion) | Endothelregeneration |
| Plaque Progression | Inkorporation an Prädilektionsstellen |
| fortgeschrittene rupturgefährdete Plaque | Neovaskularisierung, Destabilisierung |
| post Plaqueruptur | möglicher Beitrag zur Gefäßregeneration |
| Ballonangioplastie/Stentimplantation | Reendothelialisierung und verminderte Neointimaformation |
| myokardiale Ischämie und Infarkt | Mobilisierung und kardiale Regeneration |

Abb. 3 EPC Funktion in verschiedenen Stadien der Atherosklerose (Hristov und Weber et al., 2008)

Anzahl sowie Funktion von *EPC* sind mit Vorliegen und Schwere von kardiovaskulären Risikofaktoren invers korreliert (Fischer et al., 2008, Lippincott et al., 2008, Umemura et al., 2008, Vasa et al., 2001). Eine Umstellung von Ernährungs- und Lebensgewohnheiten, verbunden mit einer besseren Einstellung der kardiovaskulären Risikofaktoren, hat einen positiven Effekt auf *EPC* (Muller-Ehmsen et al., 2008, Steiner et al., 2005, Van Craenenbroeck und Conraads et al., 2010, Werner et al., 2007). Anzahl und Funktion der *EPC* sind weiterhin mit dem kardiovaskulären Verlauf von *KHK* Patienten korreliert. Eine höhere Zahl zirkulierender *EPC* ist signifikant mit einem niedrigeren Risiko für eine Revaskularisierung, Hospitalisierung und Tod durch kardiovaskuläre Ereignisse verbunden. Es ist daher denkbar, im Blut zirkulierende *EPC* als prognostischen bzw. diagnostischen kardiovaskulären Biomarker zu verwenden (Werner et al., 2005).

Normalerweise residieren *EPC* in Stammzellnischen im Endosteum des Knochenmarks. Über den *C-X-C chemokine receptor type-4 (CXCR-4)* sind sie an *stroma cell-derived factor-1 (SDF-1)* gebunden, welches von Endothelzellen und Osteoblasten exprimiert wird und somit als Anker für die *EPC* fungiert (Steinmetz et al., 2009). Auf diese Weise verbleibt normalerweise die Mehrheit der *EPC* im Knochenmark, freigesetzt wird jeweils nur ein geringer Teil (Adams und Scadden et al., 2006, Cottler-Fox et al., 2003, Lapidot et al., 2005, Ponomaryov et al., 2000). Ein weiterer Aufenthaltsort von *EPC* ist die Gefäßwand (Zengin et al., 2006). Mobilisation, Ausschwemmung

in das periphere Blut und das Dirigieren zum Zielgewebe unterliegt der Kontrolle verschiedener Zytokine und Hormone wie z.B. *SDF-1* (Yamaguchi et al., 2003), *placental growth factor (PIGF)* (Hattori et al., 2002) und Östrogenen (Strehlow et al., 2003).

Auch *EPC* unterliegen nachgewiesenermaßen der Seneszenz. Mit fortschreitendem Lebensalter kommt es zu einer erhöhten Zellalterung (Beausejour et al., 2007), die Anzahl an verfügbaren hämatologischen Stammzellen verringert sich und es kommt zu Funktionseinschränkungen z.B. bei Mobilisation und Homing (Xing et al., 2006). In diesen Patientenkollektiven ist daher mit einer eingeschränkten regenerativen Kapazität der *EPC* zu rechnen (Sharpless und DePinho et al., 2007).

Therapeutische Anwendungsmöglichkeiten von *EPC* wurden in zahlreichen tierexperimentellen und klinischen Studien untersucht. *EPC* tragen zur Regeneration von Gefäßen und damit auch zur Regeneration von durch Ischämie kompromittiertem Gewebe bei. So konnte die Gefäßneubildung in Tierversuchsmodellen durch die Gabe von *EPC* bei Infarktgeschehen verbessert werden (Kalka et al., 2000, Kawamoto et al., 2001), und auch in *hind limb ischemia* Tiermodellen resultierte eine durch *EPC* induzierte Neoangiogenese in einer verbesserten Reperfusion und Regeneration des ischämisch geschädigten Gewebes (Takahashi et al., 1999). Durch die intrakoronare Gabe von *EPC* bei Herzinfarktpatienten konnte eine verbesserte linksventrikuläre Pumpfunktion (Britten et al., 2003, Schachinger et al., 2004) sowie eine erniedrigte Rate an Reinfarkten, Hospitalisierungen und eine verminderte Mortalität erreicht werden (Schachinger et al., 2006, Schachinger et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von *EPC* in Koronarstents. Um die Rate von Restenose nach *percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA)* zu minimieren, wurden Stents entwickelt, welche in den Koronararterien nach Gefäßdilatiati on platziert werden. Um die hohe Restenosierungsrate der *bare-metal-stents (BMS)* zu reduzieren, wurden *drug-eluting-stents (DES)* eingesetzt, welche mit immunsuppressiven Substanzen wie z.B. Sirolimus beschichtet sind. Nachteilig ist hierbei jedoch die erhöhte Zahl an Stentthrombosen sowie die Notwendigkeit einer längeren Gabe von thrombozytenaggregationshemmenden Medikamenten einschließlich der damit verbundenen erhöhten Blutungsneigung. *EPC* sollen hier zu einer rascheren Reendothelisierung der thrombogenen Stentoberfläche beitragen, weshalb mit *CD 34* Antikörpern beschichtete Stents entwickelt wurden, welche zirkulierende *CD 34* positive Zellen binden sollen (Aoki et al., 2005). Eine andere Möglichkeit ist die Beschichtung von Stents mit transgenen *EPC*, wodurch inflammatorische Prozesse supprimiert werden sollen (Zhou et al., 2009).

Daneben ist ein Ansatz neben der Applikation von *ex vivo* kultivierten *EPC* zu therapeutischen Zwecken eine Erhöhung der Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden körpereigenen *EPC* durch vermehrte endogene Mobilisation aus dem Knochenmark. Es wurden verschiedene Substanzen identifiziert, die dies ermöglichen. Hierbei handelt es sich u. a. um Medikamente, die auch allgemein bei der Behandlung der Herzinsuffizienz bzw. bei Patienten nach stattgehabtem Myokardinfarkt Verwendung finden, wie z.B. *angiotensin converting enzyme (ACE)*-Inhibitoren (Wang et al., 2006), β -Blocker (Yao et al., 2008), *β -hydroxy-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA)*-Reduktase-Hemmer (Llevadot et al., 2001) und Thiazolidindione (Wang et al., 2006). Weitere Beispiele sind z.B. *VEGF* (Asahara et al., 1999), *granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF)* (Takahashi et al., 1999) und Erythropoetin (Heeschen et al., 2003). Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die körpereigenen *EPC* wie oben beschrieben durch die bei kardiovaskulären Patienten vorliegenden Risikofaktoren negativ beeinflusst werden (Hill et al., 2003).

Immunsystem

Eine wichtige Komponente der Atherosklerose ist die Beteiligung des Immunsystems, etwa über an der Plaquentstehung beteiligte Immunzellen wie Makrophagen, Lymphozyten, dendritische Zellen und Natürliche Killerzellen (Hansson et al., 2002). Das Gefäßsystem selbst kann ebenfalls als integraler Bestandteil des Immunsystems gesehen werden, dient es doch dem Transport von Immunzellen und Pathogenen im Blut, zwischen denen es folglich zum Kontakt mit nachfolgendem Immunisierungsprozess kommt. Wie oben beschrieben kann das Endothel via Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie über eine Expression von Adhäsionsmolekülen oder Präsentation von Antigenen über *major histocompatibility complex (MHC) II* (Getz et al., 2005) zur Rekrutierung, Aktivierung und Diapedese von Leukozyten und somit zum Entzündungsprozess beitragen.

Das Immunsystem ist für den Schutz des Körpers vor Umweltpathogenen wie z.B. Bakterien und Viren zuständig, außerdem für die Beseitigung von körpereigenen entarteten Zellen. Generell unterscheidet man zwischen dem angeborenen unspezifischen Immunsystem, auch *innate immune system*, das die erste Phase der Abwehr bestimmt, und dem selektiv wirkenden

erworbenen Immunsystem, auch *adaptive immune system*. Dessen hohe Antigen-spezifität muss im Laufe des Lebens durch Kontakt mit dem jeweiligen Antigen erworben werden.

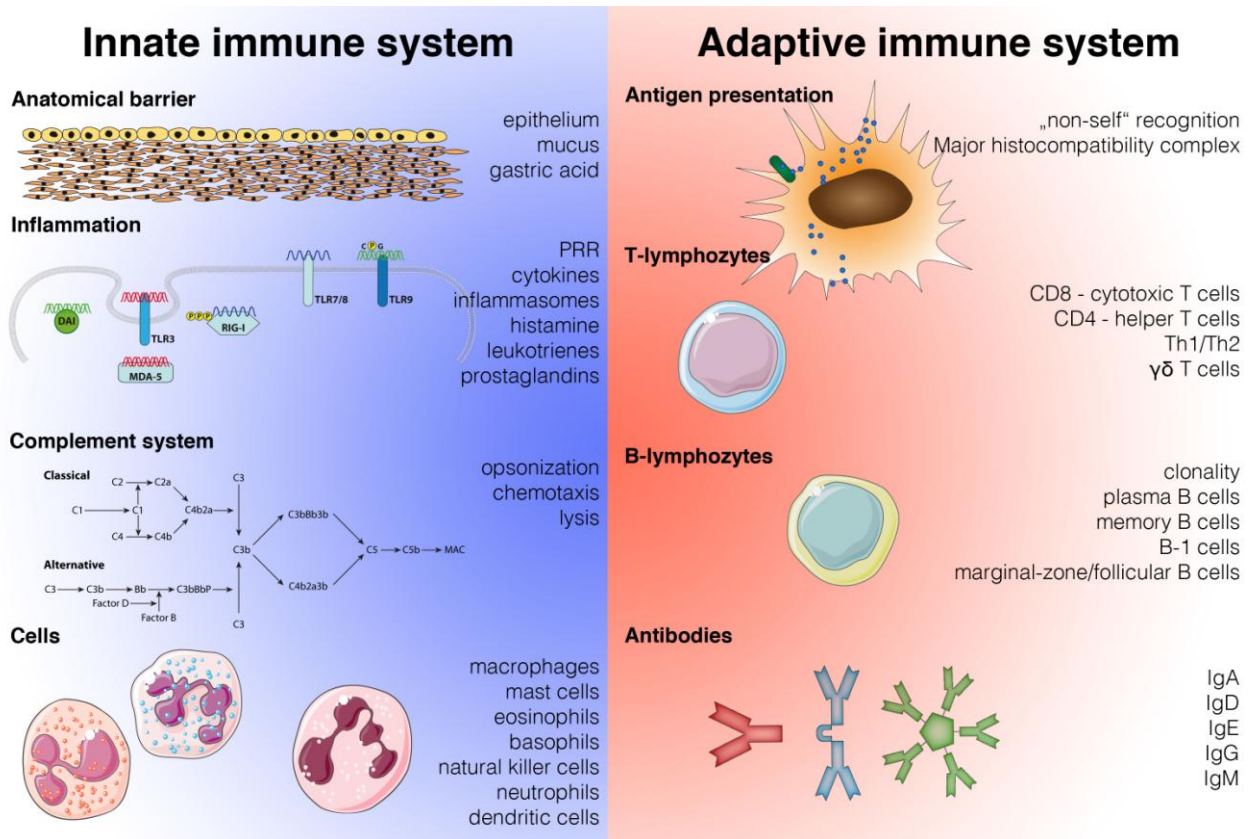


Abb. 4 Übersicht über den Aufbau des Immunsystems

Das unspezifische Immunsystem besteht aus verschiedenen Komponenten wie Epithelien, Komplementsystem, verschiedenen Zyto- und Chemokinen sowie einer Reihe von Zellen wie Makrophagen, Granulozyten oder dendritischen Zellen. Es ist für die erste schnelle Immunantwort verantwortlich und erkennt daher von Geburt an eine Vielzahl verschiedenster Pathogene. Das adaptive Immunsystems hingegen ist zu einer zielgerichteten Immunantwort, welche im Laufe des Lebens erworben werden muss, in der Lage. Es besteht aus T- und B-Lymphozyten mit ihren jeweiligen einzelnen Untergruppen. Eine Aktivierung erfolgt über Antigene, welche teilweise von Zellen des unspezifischen Immunsystems über MHC Moleküle präsentiert werden. T-Zellen werden unterteilt in T-Helfer Zellen, welche immunmodulatorische Aufgaben wie etwa die Aktivierung von B-Zellen haben, und zytotoxische T-Zellen, welche viral infizierte Zellen beseitigen können. B-Zellen können auch native Antigene erkennen und sezernieren daraufhin Antikörper, welche die jeweiligen Pathogene inaktivieren und deren Phagozytose erleichtern, was als Opsonierung bezeichnet wird.

Das phylogenetisch ältere unspezifische Immunsystem bildet die Basis für die alltägliche Eliminierung einer Vielzahl von Fremdstoffen, Viren, Bakterien oder Fungi, welche ubiquitär in der Umwelt vorkommen und welchen der Körper ständig exponiert ist. Die hier verwendeten Mechanismen bestehen von Geburt an. Dem unspezifischen Immunsystem zugehörig sind zur Phagozytose befähigte Zellen wie Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten und

Natürliche Killerzellen, das Komplementsystem, Defensine, Lysozyme und Akute-Phase-Proteine. Überwindet eine pathogene Substanz die körpereigene Barriere, z.B. Haut oder Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes, wird sie im Idealfall durch Phagozytose rasch beseitigt, so dass es gar nicht erst zu einer Infektion kommt. Makrophagen und dendritische Zellen bilden dabei durch ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation ein Bindeglied zum adaptiven Immunsystem. Die Zellen des unspezifischen Immunsystems sind zur Erkennung eines enorm breiten und heterogenen Spektrums an krankheitsverursachenden Substanzen in der Lage. Gleichzeitig müssen sie aber auch potentiell schädliche von harmlosen Erregern sowie exogene von endogenen Liganden unterscheiden, damit es nicht zu allergischen bzw. autoreaktiven Reaktionen kommt. Dies geschieht beispielsweise über *pattern-recognition-receptors (PRR)*.

Pattern recognition receptors (PRR)

PRR sind dem unspezifischen Immunsystem zugehörige Rezeptoren, welche auf die Erkennung einer Vielzahl von Liganden spezialisiert sind. Eine wichtige Determinante der Aktivierung des Immunsystems ist die Unterscheidung von exogenen teils infektiösen Antigenen, welche eine inflammatorische Antwort nach sich ziehen, und endogenen sterilen inflammatorischen Prozessen etwa nach Gewebetraumen oder Apoptose. Entsprechend unterscheidet man exogene *pathogen-associated molecular pattern (PAMP)* wie Umweltpathogene von Bakterien- oder Virenbestandteilen (Fukata et al., 2009) von endogenen *danger-associated molecular pattern (DAMP)*. Dieser Kategorie zugehörig sind etwa Hitzeschockproteine, Harnsäure, Cholesterinkristalle, oxidiertes *LDL* aber auch endogene Nukleinsäuren (Matzinger et al., 2002, Shi et al., 2003). Durch eine Unterscheidung von *PAMP* bzw. *DAMP* mit nachfolgender Initiierung angemessener, unterschiedlicher Immunreaktionen tragen *PRR* in essentieller Weise zur Aufrechterhaltung der Immunhomöostase bei (Sirisinha et al., 2011).

Innerhalb der *PRR* werden verschiedene Untergruppen differenziert:

- *Toll-like Rezeptoren (TLR)*, welche entweder auf der Zellmembran oder in Endosomen lokalisiert sind (Kawai und Akira et al., 2006)
- zytosolische *nucleotide binding and oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren (NLR)*

- zytosolische *retinoic acid inducible gene protein-1 (RIG-I)-like Rezeptoren (RLR)*, zu welchen *RIG-I*, *melanosoma differentiation associated gene-5 (MDA-5)* und *laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2)* gehören (Inohara et al., 2005, Liu und Gu et al., 2011).

Toll-like Rezeptoren (TLR)

TLR sind transmembranäre Glykoproteinrezeptoren. Die extrazelluläre Domäne besteht aus 19-25 sich wiederholenden Motiven, *leucin-rich repeat motifs (LRR)*, jedes jeweils 24-29 Aminosäuren lang (Bowie und O'Neill et al., 2000), welche für die Pathogenerkennung zuständig sind. Die Weitergabe der Information an die nachgeschalteten molekularen Signalwege erfolgt über die intrazelluläre *toll-interleukin-1 receptor (TIR) domain*. Generell werden zwei Hauptsignalwege unterschieden. Über *myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88)* erfolgt die Aktivierung von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB)* *activated protein-1 (AP-1)*, über *TIR-domain containing adapter inducing IFN-β (TRIF)* wird die Aktivierung von Typ I Interferon vermittelt (Creagh und O'Neill et al., 2006). Dies führt zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems und über die Produktion proinflammatorischer Zytokine zu einer Abwehrreaktion sowie zur Aktivierung von Antigen präsentierenden Zellen (Fukata et al., 2009).

| Toll-like Rezeptor | Ligand |
|--------------------|---|
| TLR-1 | Triacycle, Lipoproteine |
| TLR-2 | Lipoproteine, Peptidoglykan, Glycoinositolphospholipide, Zymosan, Phospholipomannan, Lipoteichonsäure, Hitzeschockproteine, Hyaluron, Membranproteine von Rötelviren, humanes Zytomegalievirus, Herpes simplex Virus Typ I |
| TLR-3 | lange Doppelstrang RNA, poly IC, kurze Einzelstrang RNA |
| TLR-4 | Lipopolysaccharide, Flavolipin, Hitzeschockproteine, Fibrinogen, Mannan, |

| | |
|--------|---|
| | Glycoinositolphospholipide, Taxol, F Protein von respiratory syncytial virus, murines retrovirales Membranprotein, Fibronectin, Heparansulfate, Hyaluronsäure |
| TLR-5 | Flagellin |
| TLR-6 | Diacyllipopeptide, Lipoteichonsäure, Zymosan |
| TLR-7 | Einzelstrang RNA, Imidazoquinoline |
| TLR-8 | Einzelstrang RNA, Imidazoquinoline |
| TLR-9 | Demethylierte CpG Motive |
| TLR-10 | Unbekannt |
| TLR-11 | Uropathogene Bakterien |
| TLR-12 | Unbekannt |
| TLR-13 | Unbekannt |

Abb. 5 Übersicht über die von Toll-like Rezeptoren detektierten Liganden (Fukata et al., 2009)

TLR-3

TLR-3 kommt sowohl in Endosomen als auch auf der Zellmembran vor. Dieser wird in zahlreichen Geweben wie Plazenta, Pankreas, Leber, Lunge, Herz und Hirn exprimiert und in verschiedenen Zellen gebildet, hierunter Dendritische Zellen, Makrophagen, Epithelzellen, Fibroblasten sowie Astrozyten. Der Rezeptor detektiert virale Doppelstrang *ribonucleic acid* (RNA) sowie dessen synthetisches Analogon *polyinosinic-polycytidylic acid* (*poly(I:C)*) (Matsumoto und Seya et al., 2008). *TLR-3* ist der einzige *toll-like* Rezeptor, der die nachgeschaltete Signalkaskade nicht über *MyD88* aktiviert (Akira et al., 2006). Das von *TLR-3* benutzte Adaptormolekül ist *toll-IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor molecule-1* (*TICAM-1*), welches auch *TRIF* genannt wird. Dies führt zur Aktivierung von *interferon regulatory factor* (*IRF3*), *NF-κB* sowie *AP-1* und nachfolgend zur Produktion von *IFN-β* und anderen inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. *TLR-3* ermöglicht dem Organismus somit eine Abwehrreaktion durch das angeborene Immunsystem und führt weiterhin zur Aktivierung und Differenzierung von Dendritischen Zellen, womit *TLR-3* als Bindeglied

zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem fungiert (Iwasaki und Medzhitov et al., 2004, Oshiumi et al., 2003, Yamamoto et al., 2003).

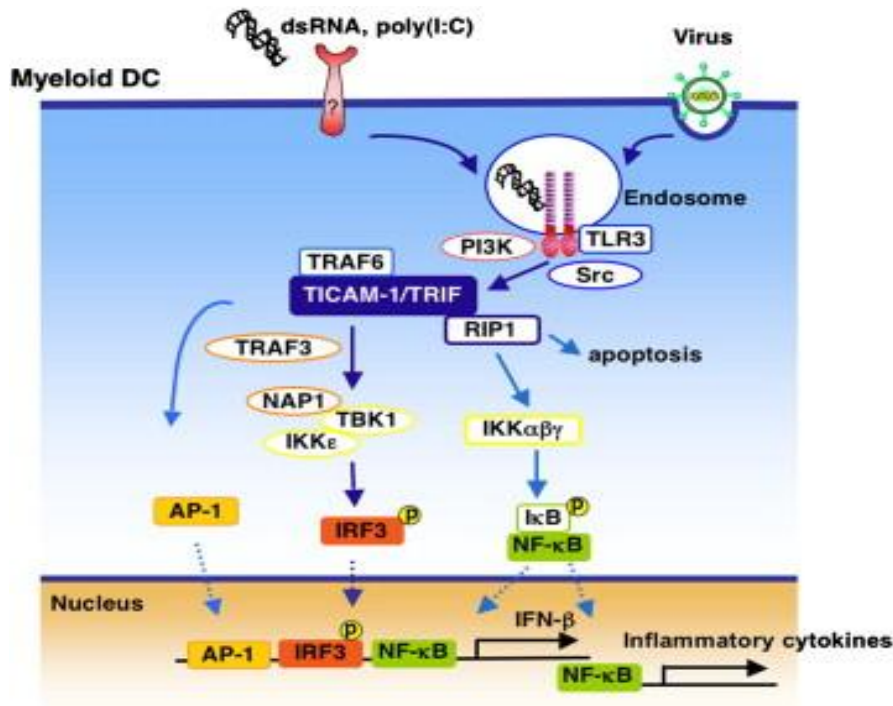


Abb. 6 TLR-3 abhängige Signaltransduktion

Endosomal lokalisiertes TLR-3 detektiert virale dsRNA bzw. poly IC. Hierdurch kommt es via das Adaptormolekül TICAM-1/Trif zu einer IRF3, NF-κB und AP-1 abhängigen Produktion von IFN-β sowie anderen inflammatorischen Zytokinen (Matsumoto und Seya et al., 2008).

RIG-I

RIG-I codiert für ein aus 925 Aminosäuren bestehendes Protein, welches zwei *N-terminal caspase recruitment domains (CARD)*, eine *DEXD/H box helicase domain* und eine *C-terminal repression domain (RD)* besitzt. Der Rezeptor ist im Zytoplasma lokalisiert und induziert nach Detektion viraler Doppelstrang RNA die Produktion von Interferon β (Yoneyama et al., 2004). Vertreten ist *RIG-I* zum Beispiel in Fibroblasten, Makrophagen und dendritischen Zellen (Kato et al., 2005). Nach Rezeptorstimulation erfolgt über *virus induced signaling adaptor (VISA)* bzw. *CARD adaptor inducing IFN-β (Cardif)* die Aktivierung von *interferon regulatory factor (IRF3)* und *NF-κB*. Dies resultiert in der Produktion inflammatorischer Zytokine oder Chemokine wie *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8* oder *IL-28* (Liu und Gu et al., 2011).

MDA-5

MDA-5 ist ebenfalls eine DExD/H Helicase, welche ubiquitär im Zytoplasma vorkommt und zwei *CARD* Domänen sowie eine Helicasen Domäne besitzt. *MDA-5* löst ebenso antivirale Immunreaktionen aus (Kang et al., 2002). Abhängige Signalmoleküle umfassen neben *Cardif*, *IRF3* und *NF-κB* *Fas associated death domain (FADD)* sowie *receptor-interacting serine-threonine kinase 1 (RIP1)*, was in der Produktion von *IFN-β* und anderen inflammatorischen Zytokinen resultiert (Barral et al., 2009).

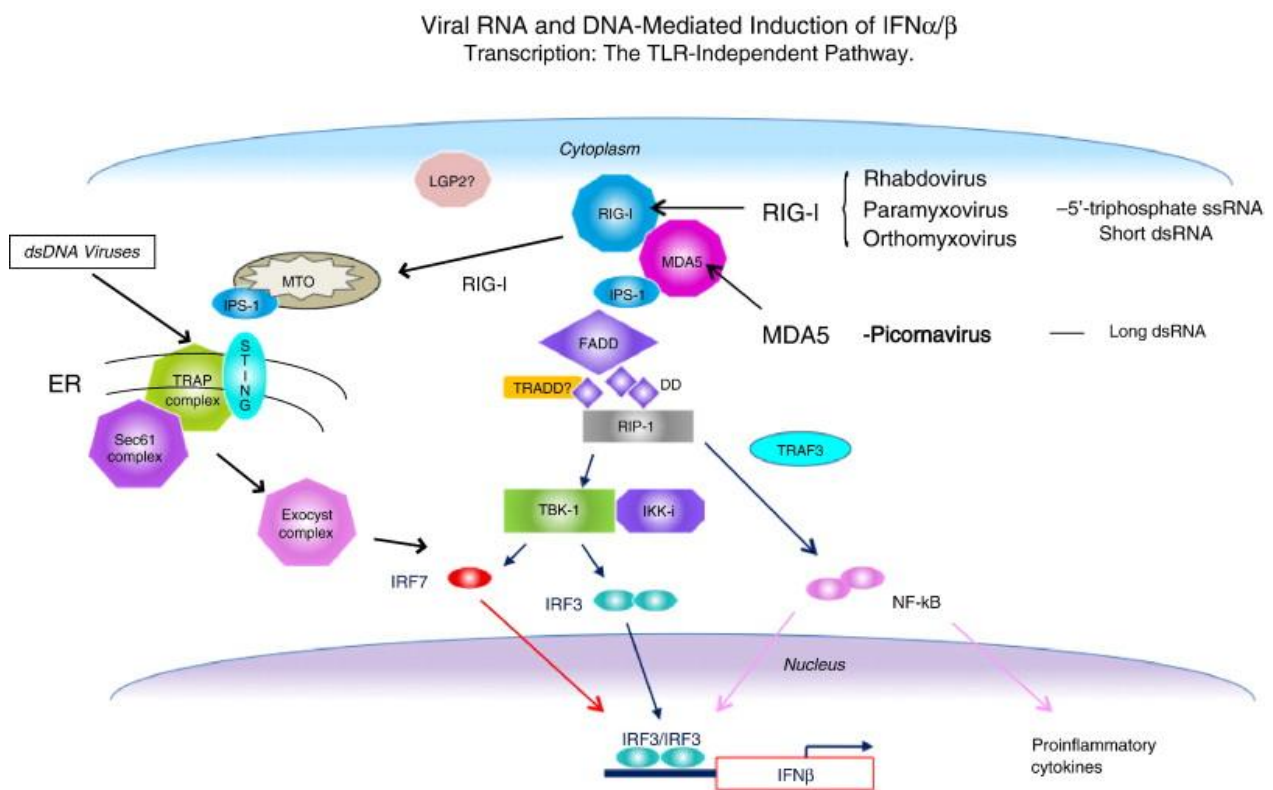


Abb. 7 RIG-I und MDA-5 Signaltransduktionswege (Barral et al., 2009)

Eine Stimulation von RIG-I und MDA-5 mit 5' Triphosphat RNA bzw. dsRNA führt über die nachgeschalteten Moleküle FADD/RIP-1 und IRF3 zu einer Aktivierung von $IFN-\beta$ Genen sowie zur Produktion proinflammatorischer Moleküle.

Virale Liganden

TLR-3 detektiert ebenso wie *RIG-I* virale Doppelstrang RNA. Daneben sind *TLR-3* wie *MDA-5* in der Lage, das synthetische RNA Analogon *poly IC* zu erkennen, nicht jedoch *RIG-I* (Gitlin et al.,

2006, Kato et al., 2006). *RIG-I* selbst erkennt virale Einzel- und Doppelstrang *RNA* mit einem Triphosphat am 5' Ende (*3pRNA*) (Hornung et al., 2006).

Weitere auf die Erkennung von viralen Nukleinsäuren spezialisierte *PRR* sind *TLR-7/8* (Einzelstrang *RNA*) (Heil et al., 2004), *TLR-9* (CpG-Motif *desoxyribonucleic acid (DNA)*) (Hemmi et al., 2000) sowie *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors (DAI)* (Takaoka et al., 2007) und *absent in melanoma 2 (AIM2)* (Doppelstrang *DNA*) (Hornung et al., 2009).

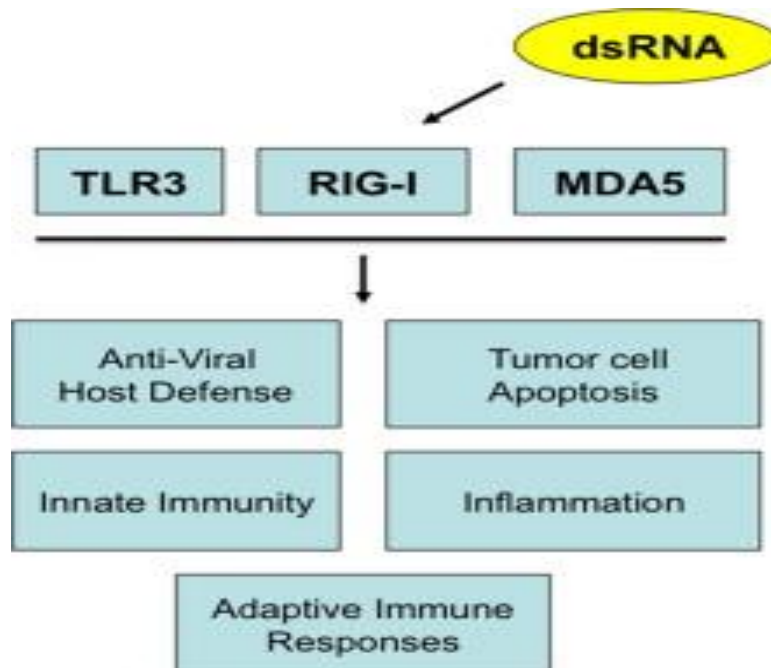


Abb. 8 Aktivierung des unspezifischen Immunsystems durch dsRNA

dsRNA löst über die Aktivierung von TLR-3, RIG-I und MDA-5 eine Reaktion des unspezifischen Immunsystems aus. Dies dient der Generierung einer entzündlichen Abwehrreaktion bzw. der Apoptose von Tumorzellen (Yu und Levine et al., 2011).

Eigenes Forschungsvorhaben

Die Atherosklerose wird als inflammatorischer Prozess der Gefäßwand angesehen und Zellen des Immunsystems sind an allen Stadien beteiligt. Zudem sind *TLR* sowohl in atherosklerotischen Plaques als auch in der Adventitia nachweisbar und auch Bestandteil vieler Zellen des kardiovaskulären Systems (Endothelzellen, Kardiomyozyten, Fibroblasten der Adventitia) sowie Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen). Daher wird angenommen, dass eine

Aktivierung von *TLR* durch exo- aber auch endogene Faktoren zu dem inflammatorischen Prozess der Atherosklerose beiträgt (de Kleijn und Pasterkamp et al., 2003, Edfeldt et al., 2002).

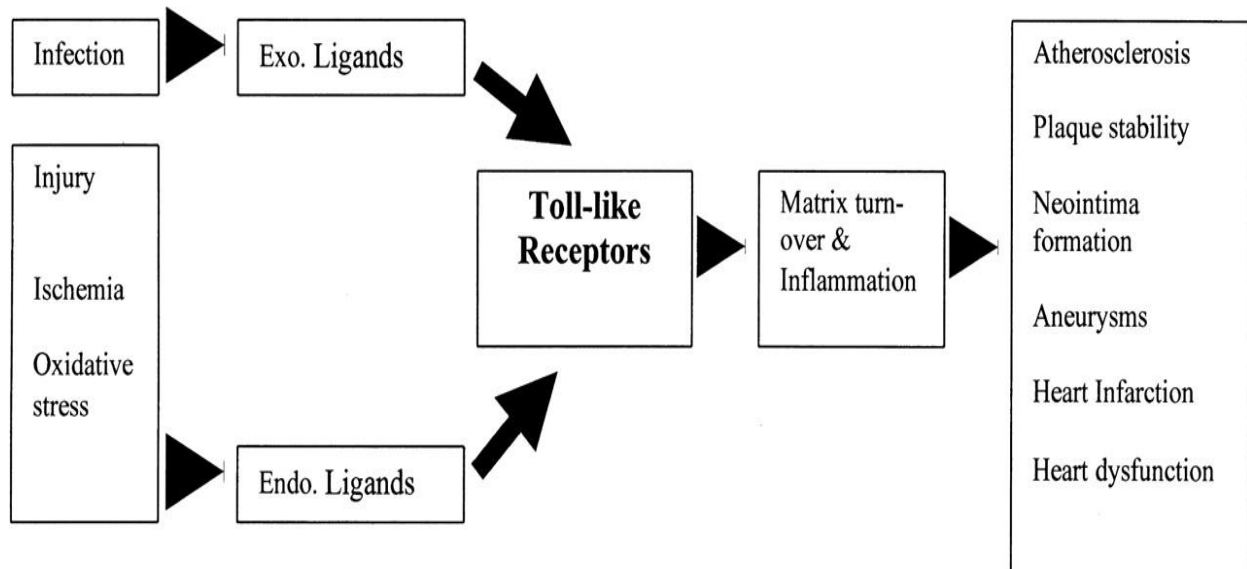


Abb. 9 TLR und Atherosklerose

Über eine Aktivierung von Toll-like Rezeptoren durch exogene aber auch endogene Liganden kommt es zu einer entzündlichen Reaktion, welche mitverantwortlich für die Entstehung der Atherosklerose mit ihren Komplikationen wie Herzinfarkt oder Herzinsuffizienz sein kann (de Kleijn und Pasterkamp et al., 2003).

Sowohl Endothelzellen als auch Endotheliale Progenitorzellen sind inflammatorischen Effekten unterworfen (Tousoulis et al., 2008). Da auch Endothelzellen *PRR* besitzen, vermuten wir, dass diese immunkompetent sind und dies für den atherosklerotischen Prozess von Bedeutung ist. Eigene Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass *in vivo* die Stimulation von *EC* mit Bestandteilen viraler Nukleinsäuren zu einer Hochregulation der jeweiligen *PRR* und Induktion eines inflammatorischen Prozesses führt.

Wir postulieren daher, dass Endothelzellen immunkompetent sind und dass eine virusähnliche Stimulation zur Endothelzell-Aktivierung führt, was proatherogene Prozesse begünstigen kann. Weiterhin postulieren wir, dass auch *EPC* als Vorläuferzellen der *EC* immunkompetent sind und dies bei den Vorgängen, die zur Atherosklerose führen, von Bedeutung ist. Über Immunregulation in *EPC* ist bisher wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit befasst sich hauptsächlich mit den immunologischen Vorgängen in *EPC*.

Material und Methoden

| Substanz | Details |
|------------------------|--|
| <i>RIG-I</i> Sense | 5' GGA CGT GGC AAA ACA AAT CAG 3' |
| <i>RIG-I</i> Antisense | 5' GCA ATG TCA ATG CCT TCA TCA 3' |
| <i>TLR-3</i> Sense | 5' CCT GGT TTG TTA ATT GGA TTA ACG 3' |
| <i>TLR-3</i> Antisense | 5' TGA GGT GGA GTG TTG CAA AGG 3' |
| <i>MDA-5</i> Sense | 5' TGG TCT CGT CAC CAA TGA AA 3' |
| <i>MDA-5</i> Antisense | 5' CTC CTG AAC CAC TGT GAG CA 3' |

Abb. 10 Übersicht über die verwendeten humanen Real-Time PCR Primer

| Name | Bezeichnung |
|--------------------------------|---|
| Fc - Block | Purified Rat Anti-Mouse <i>CD16/CD32</i> Mouse BD Fc Block TM |
| <i>VEGF2</i> bzw. <i>Flk-1</i> | PE Rat Anti-Mouse <i>Flk-1</i> |
| <i>Sca-1</i> | PE Rat Anti-Mouse Ly-6A/E |
| <i>CD31 / PECAM-1</i> | APC labeled Anti-Mouse <i>CD31 (PECAM-1)</i> |

| | |
|-----------|---------------------------------|
| Annexin V | FITC Annexin V |
| FITC | FITC Rat Ig G2a Isotype Control |
| PE | PE Rat Ig G2a Isotype Control |

Abb. 11 Übersicht über die verwendeten FACS Antikörper von BD Pharmingen™

Zellversuche - in vitro

Isolierung von Endothelialen Progenitorzellen für die Zellkultur

Gewinnung von Zellen aus murinen Milzen

- sterile Mausmilz in 10 ml 1 x PBS konservieren und von Fett befreien
- Milz in Petrischalendeckel mit 10 ml Milz-EDTA-Puffer geben und mittels gebogenen 25 g Kanülen vorsichtig die Zellen aus der Kapsel streichen
- Zellsuspension durch ZellStreamer in 50 ml Falcon pipettieren
- Deckel mit 5 ml Milz-EDTA-Puffer erneut spülen und ebenfalls durch ZellStreamer pipettieren

Ficoll-Trennung zur Isolierung von mononukleären Zellen (MNC)

Mononukleäre Zellen (MNC) werden aus humanem Buffy Code Blut bzw. einer Suspension aus Milz-EDTA-Puffer/Milzzellen der Maus mittels Ficoll-Dichtegradienten isoliert.

- 15 ml Biocoll Separating Solution (Biochrom AG) mit einem Gemisch aus 15 ml Buffy Code Blut bzw. 15 ml Suspension aus Milz-EDTA-Puffer/Milzzellen der Maus und 20 ml PBS in einem 50 ml Falcon überschichten

- Zentrifugation für 20 min bei 2400 Umdrehungen/min (U/min) bei Raumtemperatur ohne Bremse, es resultiert eine Trennung in 3 Phasen, wobei die untere die Erythrozyten, die mittlere die mononukleären Zellen und die obere Phase Serum enthält
- die mittlere Phase mittels 5 ml Pipette in einen neuen 50 ml Falcon überführen, diesen mit sterilem PBS auf 50 ml auffüllen
- Zentrifugation für 10 min bei 2400 U/min bei Raumtemperatur mit Bremse
- Überstand verwerfen und Pellet in 5 ml sterilem PBS resuspendieren
- Zentrifugation für 10 min bei 2400 U/min bei Raumtemperatur mit Bremse
- Überstand verwerfen und Pellet in ca 5 ml *Endothelium Cell Basal Medium-2 (EBM-2)*, Clonetics resuspendieren, anschließend die nicht zu lösenden Zellbestandteile mittels ZellStreamer aus der Lösung heraustrennen

Die Zahl der *mononukleären Zellen (MNC)* in der Zellsuspension wird mittels Neubauer Zählkammer ermittelt. Anschließend werden die Zellen auf Schalen bzw. Well-Platten ausgesät.

Folgendes Dosierungsschema wurde für die einzelnen Versuche verwendet:

| | | |
|----------------|---|---------------------------------------|
| RNA Isolation | : | $3 * 10^7$ Zellen auf 5 cm Schalen |
| L-012 Messung | : | $5 * 10^6$ Zellen auf 5 cm Schalen |
| Apoptose Essay | : | $1 * 10^4$ Zellen auf 96 Well-Platten |

Vor dem Aussäen werden die Schalen bzw. Well-Platten mit Fibronectin beschichtet (im Verhältnis 1/10 mit sterilem PBS gemischt). Anschließend werden Schalen bzw. Wells mit *EBM-2* Medium aufgefüllt.

Die *MNC* werden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ Begasung für 4 Tage bei 37°C inkubiert, bevor am 4. Tag das *EBM-2* Medium unter sterilen Bedingungen mit den oben genannten Zielvolumina gewechselt wird. Die *MNC* werden in der Zellkultur durch das Anwachsen auf Fibronectin weiter ausdifferenziert. Die nicht haftenden *MNC* werden beim Mediumwechsel am 4. Tag mit dem Überstand verworfen. Die mit *EBM-2* Medium ernährten und nach 7 Tagen auf dem Boden der Petrischalen wachsenden Zellen entsprechen *CAC* bzw. *early-EPC*. Diese Population zeichnet sich u.a. durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose von DiLDL und die Anfärbbarkeit mit Lectin aus.

Für eine Kultivierung von *late-outgrowth EPC* wird der Überstand nach 2 Tagen verworfen und alle 2 Tage das *EBM-2* Medium gewechselt. Nach ca. 14-21 Tagen entsprechen die Zellen *late-outgrowth EPC*.

Am 7. Tag erfolgt dann die Stimulation der *CAC* bzw. *early-EPC*.

Zellstimulation

Zieldosierungen:

| | |
|-------------------|-----------|
| <i>poly A</i> | : 1 µg/ml |
| <i>poly IC</i> | : 1 µg/ml |
| <i>poly IC nt</i> | : 4 µg/ml |
| <i>3pRNA</i> : | : 1 µg/ml |

Grundsätzlich können zwei verschiedene Mechanismen unterschieden werden. Bei einer Stimulation ohne Transfektion (nicht transfiziert oder nt) entfaltet die Substanz ihre Wirkung extrazellulär an der Zellmembran. Auf diese Weise wird in den Versuchen *TLR-3* durch *poly IC* stimuliert. Bei einer Stimulation mit Transfektion wird die Substanz an ein Transfektionsagens gekoppelt, wodurch der entstehende lipophile Komplex in der Lage ist, die Zellmembran zu überwinden und intrazellulär zu wirken. Das Transfektionsagens für *poly A*, *poly IC* und *3pRNA* ist Lipofectamin, welches in einem Verhältnis von 1:50 mit Optimum hinzugegeben wird. Hierdurch kann intrazellulär zyotosolisch *RIG-I* durch *3pRNA* und *MDA-5* durch *poly IC* stimuliert werden

Mausversuche - in vivo

Es wurden 4 Mausexperimente mit unterschiedlichem Versuchsaufbau durchgeführt. In den Tierexperimenten verwendete 8-12 Wochen alte Wild-Typ Mäuse (C 57BL/6J, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden bei 22°C mit einem 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus gehalten.

Ernährt wurden die Tiere mit Trockenfutter (Ssniff, Spezialdiäten, Soest) und Trinkwasser ad libitum.

1. Mausexperiment

20 Mäuse wurden in 4 Gruppen zu je 5 Tieren aufgeteilt. Die Stimulation erfolgte über 7 Tage an jedem zweiten Tag via Injektion in die Schwanzvene. Verwendet wurden HG 5%, *poly IC*, *poly A* und *3pRNA*. Als Transfektionsreagenz für *poly A*, *3pRNA* und *poly IC* diente JetPeiTM.

2. Mausexperiment

20 Wild-Typ Mäuse (C57BL/6J) wurden in 4 Gruppen zu je 5 Tieren aufgeteilt. Die Tiere wurden entsprechend den oben genannten Bedingungen gehalten und ernährt. Pro Gruppe erhielt je eine Maus HG 5%, *poly IC*, *poly IC nt* und *poly A*. Die Injektion erfolgte in die Schwanzvene. 24 h später wurden die Versuchstiere getötet und die Experimente durchgeführt.

| Substanz | Beschreibung | Menge pro Tier |
|-------------------|---|----------------|
| <i>poly A</i> | poly Adenosin | 32,5 µg |
| <i>poly IC</i> | Künstlich hergestellte Doppelstrang <i>RNA</i> | 32,5 µg |
| <i>poly IC nt</i> | Künstlich hergestellte Doppelstrang <i>RNA</i> | 100 µg |
| <i>3pRNA</i> | <i>RNA</i> mit Triphosphat Ende | 32,5 µg |
| JetPei | <i>RNA</i> Transfektionsreagenz | 32,5 µg |

Abb. 12 Übersicht über die verabreichten Testsubstanzen und Dosierungen

Die Dosierungen der Testsubstanzen waren im ersten und zweiten Mausexperiment identisch.

3. Mausexperiment

Je 10 Wild-Typ Mäuse (C57BL/6J) und *TLR-3* ^{-/-} Mäuse (C57BL/6J) wurden alle 48 h über einen Zeitraum von 7 Tagen mit jeweils 100 µg *poly IC nt* gelöst in 200 µl NaCl 0,9 % bzw. NaCl 0,9 % als Kontrolle via Injektion in die Schwanzvene behandelt.

4. Mausexperiment

10 Wochen alte Apo E ^{-/-} Mäuse (C57BL/6J Stamm) wurden 7 Wochen lang mit fett- und cholesterinreichem Futter ad libitum (Ssniff: 21 % Fett, 19,5% Casein, 1,25 % Cholesterin) ernährt. In der 5. Woche wurden sie einmalig und während der letzten 2 Wochen der Diät täglich mit jeweils 100 µg *poly IC nt* in 200 µl NaCl 0,9 % bzw. NaCl 0,9 % als Kontrolle via Injektion in die Schwanzvene behandelt.

Organentnahme aus den Mäusen

- Intraperitoneale Injektion von 300 µl Ketaminhydrochlorid/Xylazin Gemisch im Verhältnis 2:1 pro Maus
- nach Exitus letalis Eröffnung der Bauchdecke und Blutentnahme aus der Vena cava inferior mittels Heparin beschichteter Spritze
- Aufschneiden des Thorax und Abpräparation von Rippen, Zwerchfell und Lungen
- Entfernung der Milz zur Gewinnung mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Gradienten und anschließender Zellkultur
- Knochenmark für FACS Messung aus Femur und Tibia isolieren

Immunhistochemie

Für den Nachweis der Rezeptoren mittels immunhistochemischer Färbung werden unstimulierte *EPC* in 24 Well-Platten kultiviert. Anschließend werden diese in Aceton bei -20°C fixiert und nachfolgend zweifach mit *PBS* Lösung mit 0,025% Triton X-100 für 5 Minuten gewaschen. Nachfolgend werden die Zellen für 2 Stunden in 1% BSA mit *PBS* bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Primärantikörper (rabbit polyclonal DDX58 antibody, ab45428, rabbit polyclonal *TLR3* antibody, ab52429, rabbit polyclonal *MDA5* antibody, ab69983, Abcam) werden 1:1000 in 1% BSA mit PBS verdünnt und die Zellen mit diesem über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper wird ein TRITC konjugierter goat anti-rabbit secondary antibody 1:1000 verdünnt verwendet. Die Nuclei werden mittels DAPI mounting medium gefärbt.

Bestimmung des Rezeptorexpressionsmusters

Mit Hilfe des Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktionverfahrens kann man Aussagen über die Genexpression bestimmter Proteine treffen. Werden bestimmte Gene in den Zellen vermehrt transkribiert, nimmt auch die Menge der *mRNA* dieser Gene zu. Durch eine Reverse Transkription dieser *mRNA* in komplementäre *cDNA* und anschließender Real-Time-PCR wird die Menge an *mRNA* eines bestimmten Proteins gemessen und man kann eine quantitative Aussage über das Expressionsmuster bestimmter Gene in der Zelle machen.

RNA Isolation

Zunächst wird die *RNA*, die sich in den Zellen befindet, isoliert.

Versuchsablauf nach 24 bzw. 48 h Zellstimulation in vitro

- Überstände der 5 cm Schalen absaugen
- Schalen mit jeweils 5 ml unsterilem PBS waschen und hiernach erneut absaugen
- in die nun leeren Schalen unter dem Abzug jeweils 1 ml peqGold *RNA* Pure pipettieren
- die auf dem Boden der Schalen haftenden Zellen mittels Cell Scraper lösen und in jeweils ein Tube (Eppendorf) überführen
- Tube für 5 min bei RT inkubieren
- in jedes Tube jeweils 0,2 ml Chloroform pipettieren, 15 sek vortexen und 10 min bei RT inkubieren
- 5 min mit 12000 U/min bei 4°C zentrifugieren
- die nach der Zentrifugation resultierende Oberphase jeweils in ein neues Tube überführen
- in jedes Tube jeweils 1 ml Isopropanol dazugeben und für 10 sek vortexen
- alle Tubes für 15 min bei RT inkubieren und danach für 10 min mit 12000 U/min und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet in 0,5 ml 75 % Ethanol waschen
- Zentrifugation für 15 min mit 12000 U/min bei 4°C

- Überstand abpipettieren und das Pellet für ca. 10 min an der Luft trocknen, bis alle Flüssigkeit verdunstet ist
- Pellet in jeweils 20 µl *RNA*se freiem DEPC Wasser resuspendieren
- alle Tubes sofort zum Schutz vor *RNA*se Aktivität auf Eis lagern und dann zur Verbesserung der Löslichkeit für 5 min bei 65°C erhitzen

Beim Aufbewahren ist darauf zu achten, dass die *RNA* in den Tubes auf -80°C tiefgefroren werden.

RNA Bestimmung

Die Quantität und Qualität der *RNA* wird spektrophotometrisch an einem NanoDrop gemessen. Ein 260/280 nm Reihheitsquotient > 1,8 ist Voraussetzung für die nachfolgenden Versuche.

Reverse Transkription

Das Herstellen der *RNA* Ansätze erfolgt unter Verwendung des Reverse Transkriptase Omniscript RT Kit (200) entsprechend der Empfehlung von Quiagen RT. Anschließend werden die einzelnen Ansätze eine Stunde bei 37°C inkubiert, die resultierenden *cDNA* Proben können zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden.

Real-Time-PCR

Zur quantitativen Bestimmung der mRNA von *TLR-3*, *RIG-I* und *MDA-5* wird deren Expression auf die Expression des Housekeeping Gens 18S bezogen. 18S bezeichnet einen Teil der ribosomalen *RNA* (*rRNA*). Hierbei handelt es sich um ein nicht reguliertes, konstitutiv exprimiertes Gen, welches in eukaryontischen Zellen in gleicher Menge auch bei unterschiedlichen Bedingungen vorhanden ist. Setzt man die *cDNA* Menge von *TLR-3*, *RIG-I* und *MDA-5* jeweils in Relation zur Menge von 18S, kann man eine relative Aussage über die Expression des Zielgens treffen.

Versuchsaufbau :

Pro *cDNA* Ansatz werden folgende Substanzen benötigt:

| | |
|-------------------|-------|
| SYBR MM Puffer | 10 µl |
| FP Forward Primer | 1 µl |

| | |
|-------------------------------|-------------|
| RP Reverse Primer | 1 μ l |
| Template (<i>cDNA</i> Probe) | 1 μ l |
| DEPC Wasser | 8,6 μ l |

Von jeder *cDNA* Probe werden 3 Ansätze gemacht, hierbei muss immer die gleiche Menge *DNA* verwendet werden. Ebenso werden für die Primer der jeweiligen Rezeptoren jeweils 3 Leeransätze durchgeführt, wobei statt *cDNA* DEPC Wasser verwendet wird, um eine Kontamination der Primer mit *DNA* auszuschließen. Die Proben zu jeweils 20 μ l werden in die Mikroplatten pipettiert und mit Schutzfolie überklebt. Anschließend erfolgt die Auswertung mittels ABI-7500 Fast Real-Time PCR System.

L-012 Chemiluminescence

Die Freisetzung von *ROS* wurde entsprechend etablierten Methoden bestimmt (Daiber et al., 2004, Wassmann et al., 2004).

Versuchsablauf nach 24 h Zellstimulation:

Ansetzen des KH-Puffers

Herstellung von 1 M L-012 Stock: L-012 Pulver wird in DMSO mit einer Zielkonzentration von 30 μ g/ μ l gelöst.

- aus 5 cm Schalen Medium absaugen
- jede Schale mit 5 ml unsterilem PBS waschen
- jeweils 1 ml Trypsin in die Schalen pipettieren und bei 37°C 5 min inkubieren
- pro Schale 1 ml *EBM-2* Medium dazupipettieren
- Überstand von 2 ml pro Schale einige Male in der Schale auf- und abpipettieren und anschließend in ein 15 ml Falcon überführen
- 5 min mit 1000 U/min zentrifugieren
- Überstand abpipettieren und verwerfen
- 10 μ l L-012 Stock (1:100 mit PBS verdünnt) und 90 μ l KH Puffer werden unmittelbar vor Verwendung zu einer L-012 Endkonzentration von 100 μ mol/l vermischt, auf das Pellet gegeben und zur Lösung des Pellets 5x auf- und abpipettiert

Die Superoxid Freisetzung wird mittels Lumat LB 9501 (Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) ermittelt und als relative Chemiluminescence (RLU) in Prozent der Kontrolle gemessen.

Apoptose Assay

Die Versuchsdurchführung erfolgt unter Verwendung des „Cell Death Detection Elisa Plus“ entsprechend den Instruktionen zur Versuchsdurchführung von Roche. Für die Durchführung des Apoptose Essays werden 96 Well-Plates mit jeweils $1 \cdot 10^4$ Zellen verwendet. Der Versuch wird nach 24 h Stimulation durchgeführt. Die Messung erfolgte spektrophotometrisch bei 405 nm und einer Referenzmessung bei 490 nm. Die Apoptoserate wird angegeben als Anreicherungsfaktor (Absorptionsfaktor Probe/Absorptionsfaktor Kontrolle).

Scratch Assay

Die Scratch Versuche werden entsprechend etablierten Protokollen durchgeführt (Liang et al., 2007). *Late-outgrowth EPC* werden für 18 h mit 4 ng *poly IC nt* inkubiert und eine definierte Fläche der Petrischale freigekratzt. Anschließend wird die verbleibende zellfreie Fläche im zeitlichen Verlauf gemessen und mit der ursprünglich freigekratzten Fläche in Relation gesetzt als Maß für Migrations- und Proliferationskapazität der *EPC*.

FACS (Fluorescence activated cell sorter) Messung

Prinzip:

Die *FACS* Messung wurde entsprechend etablierten Protokollen durchgeführt (Werner et al., 2002). Im peripheren Blut zirkulierende murine *EPC* wurden anhand der Oberflächenmarker *stem cell antigen-1 (sca-1)* und *VEGF* bzw. *Flk-1* identifiziert.

Versuchsaufbau:

- Pharmalyse 1:10 mit Ampuva verdünnen
- Abnahme von 100 µl Vollblut aus der Vena cava inferior
- nach Hinzupipettieren von 3 ml verdünnter Pharmalyse 1 Minute vortexen
- Überstand nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1000 U/min verwerfen
- Probe mit *FACS* Puffer auf ein Gesamtvolumen von 100 µl auffüllen und jeweils 10 µl des FC Block Antikörpers hinzugeben
- anschließend 10 Minuten bei 4°C inkubieren
- je 10 µl von *Sca-1* und *VEGF* hinzugeben und anschließend 1 Minute vortexen
- Proben lichtgeschützt für 30 Minuten bei 4°C inkubieren
- je 2 x mit 2 ml *FACS*-Puffer auffüllen, anschließend vortexen und 10 min bei 4°C mit 1000 U/min zentrifugieren, dann Überstand absaugen
- resuspendieren in 0,5 ml PBS
- anschließend Messung mit *FACS*-Gerät (*FACS* Calibur, Becton Dickinson)

Leerkontrolle:

Zwecks Bestimmung der Eigenfluoreszenz der detektierten Zellen wird für jede Gruppe eine Leerkontrolle entsprechend des oben skizzierten Versuchsaufbaus ohne Zugabe von Antikörpern durchgeführt.

Isotypenkontrolle:

Zur Bestimmung der Fluoreszenzmenge, welche durch die nicht spezifisch gebundenen Antikörper verursacht wird, werden entsprechend des oben skizzierten Versuchsaufbaus unspezifische Maus IgG Antikörper zugefügt, welche im Anschluss selbst mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern markiert werden.

Die Analysen der Proben erfolgt mittels CellQuest Software (Becton Dickinson).

FACS Messung von endothelialen Mikropartikeln (EMP):

Murine *EMP* wurden anhand der Oberflächenmarker *CD31* (*PECAM-1* bzw. Endocam) und Annexin V identifiziert.

Versuchsaufbau:

- heparinisiertes Vollblut 15 Minuten bei 2000 U/min zentrifugieren
- Plasma in ein neues Tube überführen

- 2 Minuten bei 1300 U/min zentrifugieren
- Überstand in ein neues Tube überführen
- 50-100 µl Plasma mit 4 µl Anti *CD31* PE lichtgeschützt bei Raumtemperatur 45 Minuten inkubieren
- Zugabe von 5 µl Annexin V FITC, vortexen und lichtgeschützt bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubieren
- 200 µl Binding Puffer hinzugeben, vortexen
- Messung mittels *FACS* Gerät

FACS Messung von Knochenmark (KM)

- linken und rechten Femur und Tibia freipräparieren
- Knochenmark mit jeweils 1 ml *FACS*-Puffer ausspülen
- anschließend Zellseparation durch ZellStreamer in 50 ml Falcon
- Zentrifugation für 10 min mit 1000 U/min bei 4°C
- Überstand verwerfen und Pellet in 2 ml *FACS*-Puffer resuspendieren
- zu 50 µl der Zellsuspension 10 µl Fc-Block hinzugeben, vortexen und 10 min lichtgeschützt bei 4°C inkubieren
- jeweils 10 µl *VEGF/Scd-1* Antikörper hinzugeben
- vortexen und 30 min ohne Licht bei 4°C inkubieren
- je 2x mit 2 ml *FACS*-Puffer auffüllen, vortexen und 10 min mit 1000 U/min bei 4 °C zentrifugieren, dann Überstand verwerfen
- resuspendieren in 0,5 ml 1 PBS
- Messung mit *FACS*-Gerät

Carotis Injury

Bei narkotisierten Mäusen wird am 5. Tag der Behandlung mit *poly IC nt* vor der 3. Injektion die linke Arteria carotis communis auf einer Länge von 6 mm proximal der Bifurkation freipräpariert. Mittels zweimaliger Stromapplikation von 4 mA über je 2 Sekunden wird eine definierte Läsion von 4 mm Länge gesetzt. Die hierbei verwendete niedrige Spannung gewährleistet eine Koagulation bzw. Denudation v.a. der Endothelschicht des Gefäßes. Am 10. Tag wird den Versuchstieren 50 µl Evans Blue i.v. appliziert, welches an die nicht endothelialisierte Matrix bindet und so die Endothelläsion besser darstellt. Nach 5 Minuten Zirkulation werden die Tiere getötet und anschließend die Carotidenstücke in 0,9% NaCl aufbewahrt. Die noch denudierte Läsion wird mittels AxioVision 4.5.0 (Zeiss) bestimmt und in Relation zur Fläche der

ursprünglich zugefügten Läsion gesetzt, wodurch das Ausmaß der Reendothelialisierung bestimmt werden kann (denudierte Fläche pro Läsionsgesamtfläche in %).

Transfusionsexperimente

Die Transfusionsexperimente wurden entsprechend etablierten Protokollen durchgeführt (Ii et al., 2006). Wildtyp und *TLR-3* *-/-* Tiere wurden mittels Gefäßligatur über eine laterale Inzision an der Bauchwand splenektomiert. Die aus den Milzen der Tiere gewonnenen *EPC* wurden nach dem 1. Mediumwechsel am 4. Tag für 24 h mit *EBM-2* Medium als Kontrolle bzw. 4 ng/ml *poly I:C* inkubiert und anschließend täglich mit *EBM-2* Medium gewaschen. Am 7. Tag wurden je 5 x 1*10⁶ Wildtyp und *TLR-3* *-/-* *EPC* jeweils je 5 Wildtypmäusen, die wie oben beschrieben zuvor einer Endotheldenudation der A. carotis unterzogen wurden, via Injektion in die Schwanzvene appliziert. Nach 5 Tagen wurden die Tiere der 2 Gruppen getötet und die Reendothelialisierung bestimmt.

Statistik

Alle Ergebnisse werden vorgelegt als Mittelwert ± SEM (Standard Error Mean). Als signifikant werden Ergebnisse < 0,05 im 2 seitigen Student's t-Test bzw. ANOVA Test angenommen.

Ergebnisse

1. Mausexperiment

Ziel des 1. Mausexperiments war es, den Einfluss einer *PRR* Stimulation *in vivo* hinsichtlich der Auswirkungen auf die Endothelfunktion sowie die Zahl zirkulierender *EPC* zu untersuchen. Hierzu wurden 20 Mäuse in 4 Gruppen zu je 5 Tieren aufgeteilt. Die Stimulation erfolgte über 7 Tage an jedem zweiten Tag via Injektion in die Schwanzvene. Verwendet wurden HG 5%, *poly IC*, *poly A* und *3pRNA*. Als Transfektionsagenz für *poly A*, *3pRNA* und *poly IC* diente JetPeitm. Es zeigte sich, dass eine i.v. Applikation von *MDA-5* und *RIG-I* Liganden in Wildtyp Mäusen mit einer signifikanten Endothelzell dysfunktion sowie einem signifikanten Anstieg zirkulierender endothelialer Mikropartikel, welche von geschädigten, apoptotischen Endothelzellen freigesetzt werden, im Sinne einer Endothelaktivierung einhergeht. Zudem kommt es zu einem signifikanten Anstieg zirkulierender *EPC* im peripheren Blut unter *MDA-5* Stimulation, nicht aber nach *RIG-I* Stimulation. Weiterhin zeigt sich in Endothelzellen eine Hochregulation von *MDA-5* und *RIG-I* sowie eine gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine nach spezifischer *MDA-5* und *RIG-I* Stimulation.

Endothelzellen reagieren folglich immunkompetent in proinflammatorischer und proatherosklerotischer Weise. Aufgrund dieser Ergebnisse zur Immunregulation in Endothelzellen haben wir postuliert, dass auch deren Vorläuferzellen, die Endothelialen Progenitorzellen, immunkompetent sind und wie Endothelzellen über Rezeptoren des unspezifischen Immunsystems verfügen. Dies zu beweisen und weiterhin die Auswirkung einer *PRR* Aktivierung in *EPC* zu charakterisieren, war Ziel der im Folgenden dargestellten *in vitro* Experimente.

In vitro Zellversuche

Grundlage der Analyse der Einflüsse und Auswirkungen viraler *RNA*-Bestandteile auf die *EPC* war der Nachweis der jeweiligen Immunrezeptoren, über die *poly IC* und *3pRNA* von den Zellen detektiert werden. Mittels Immunhistochemie konnte die Rezeptorexpression von *TLR-3*, *MDA-5* und *RIG-I* in *EPC* nachgewiesen werden.

Immunhistochemie

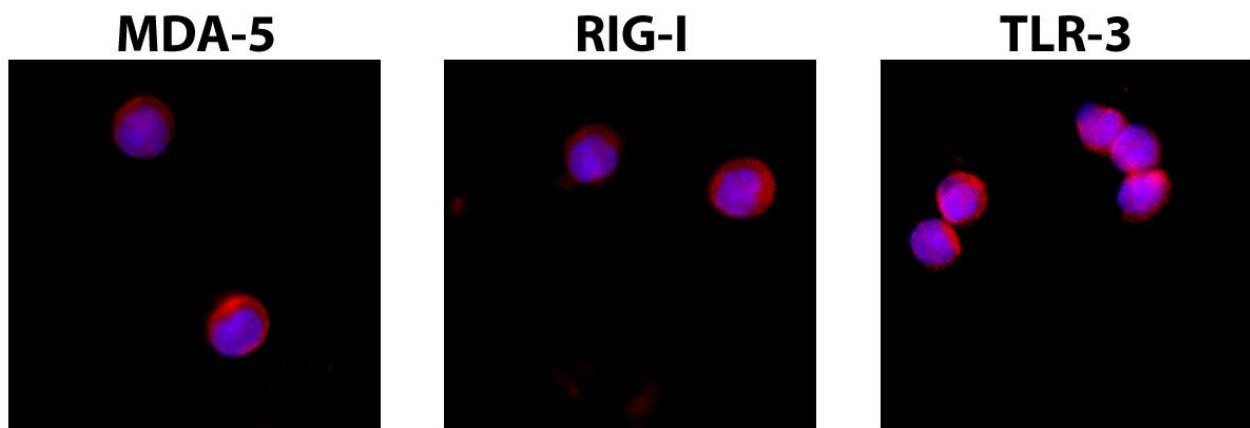


Abb. 13 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie wurden die Rezeptoren MDA-5, RIG-I und TLR-3 in unstimulierten *EPC* nachgewiesen.

Real-Time-PCR

Es ist bekannt, dass Rezeptoren unter andauernder Stimulation sowohl hoch- als auch herabreguliert werden können. Daher wurde die Rezeptorregulation in *EPC* nach 24 h bzw. 48 h Stimulation mittels Real-Time-PCR untersucht. Zur quantitativen Bestimmung der *mRNA* der Rezeptoren wurde deren Expression auf das konstitutiv exprimierte Housekeeping Gen 18S bezogen.

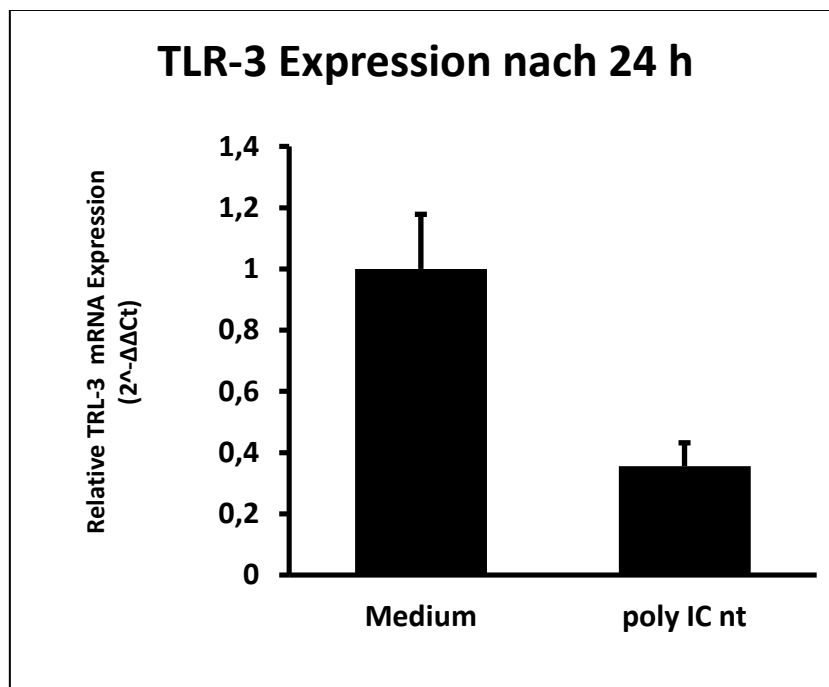


Abb. 14 Real-Time-PCR nach 24 h

Nach 24 h Stimulation kommt es zu einer Herabregulation des TLR-3 Rezeptors (poly IC nt 0.36 ± 0.08 vs. Kontrolle 1.0 ± 0.18 , $p > 0.05$).

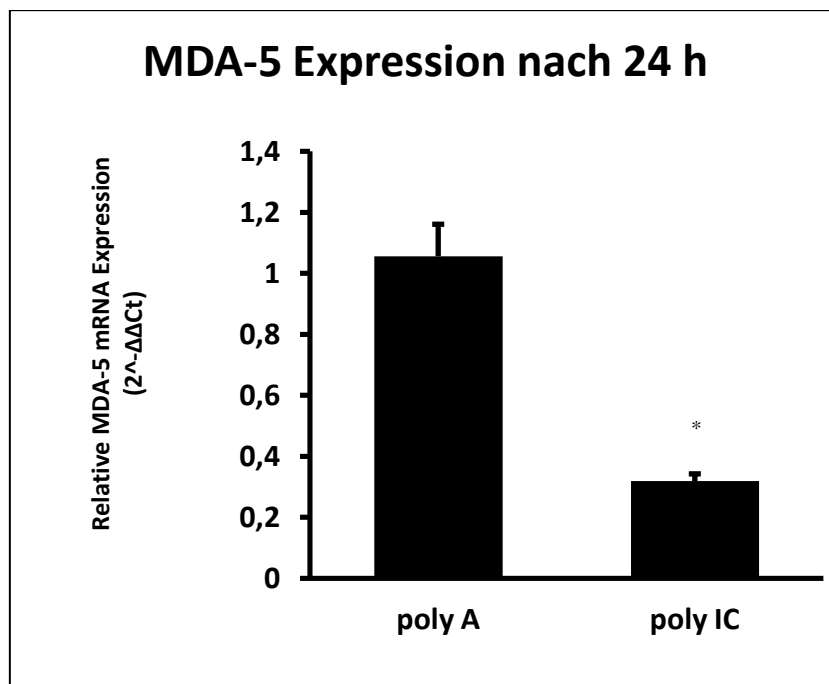


Abb. 15 Real-Time-PCR nach 24 h

Nach 24 h Stimulation kommt es zu einer signifikanten Herabregulation des MDA-5 Rezeptors (poly IC 0.32 ± 0.02 vs. poly A 1.06 ± 0.11 , $p < 0,05$).

Nach 24 stündiger *TLR-3* Stimulation kommt es zu einer nicht signifikanten Herabregulation des *TLR-3* Rezeptors (*poly IC* 0.36 ± 0.08 vs. Kontrolle $1 \pm 0,18$, $p > 0.05$). Auch *poly IC* führt nach 24 h Stimulation zu einer Herabregulation des *MDA-5* Rezeptors (*poly IC* 0.32 ± 0.02 vs. *poly A* 1.06 ± 0.11 , $p < 0,05$).

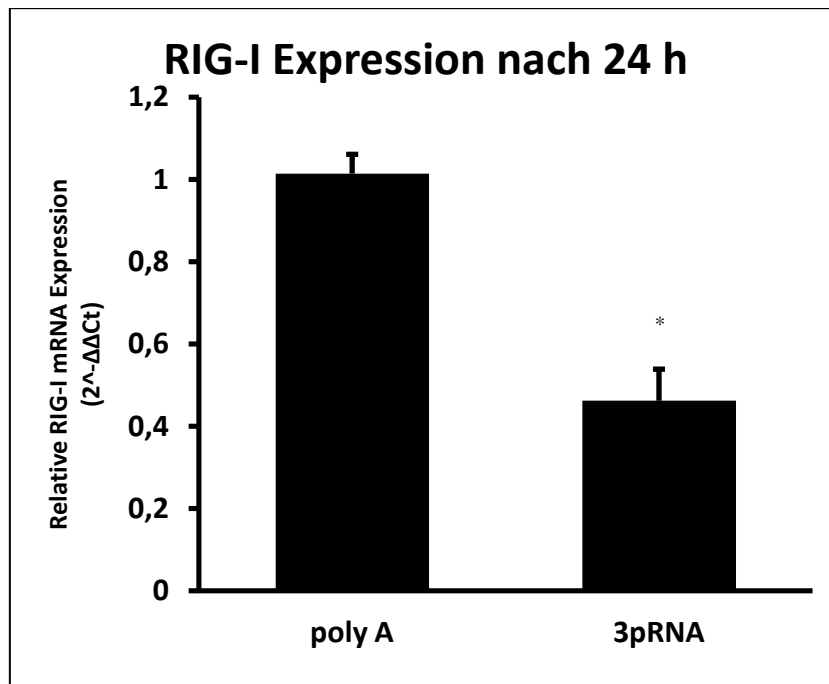


Abb. 16 Real-Time-PCR nach 24 h

Nach 24 h Stimulation kommt es zu einer signifikanten Herabregulation des *RIG-I* Rezeptors (*3pRNA* 0.46 ± 0.08 vs. *poly A* 1.01 ± 0.05 , $p < 0,05$).

Auch nach 24 h Stimulation mit dem Liganden *3pRNA* wird eine Herabregulation des zugehörigen *RIG-I* Rezeptors beobachtet (*3pRNA* 0.46 ± 0.08 vs. *poly A* 1.01 ± 0.05 , $p < 0.05$).

Alle 3 untersuchten Rezeptoren *TLR-3*, *MDA-5* und *RIG-I* werden somit nach 24 h Stimulation mit ihrem jeweiligen Liganden herabreguliert.

Anschließend wurde analog die Rezeptorexpression nach 48 h Stimulation untersucht.

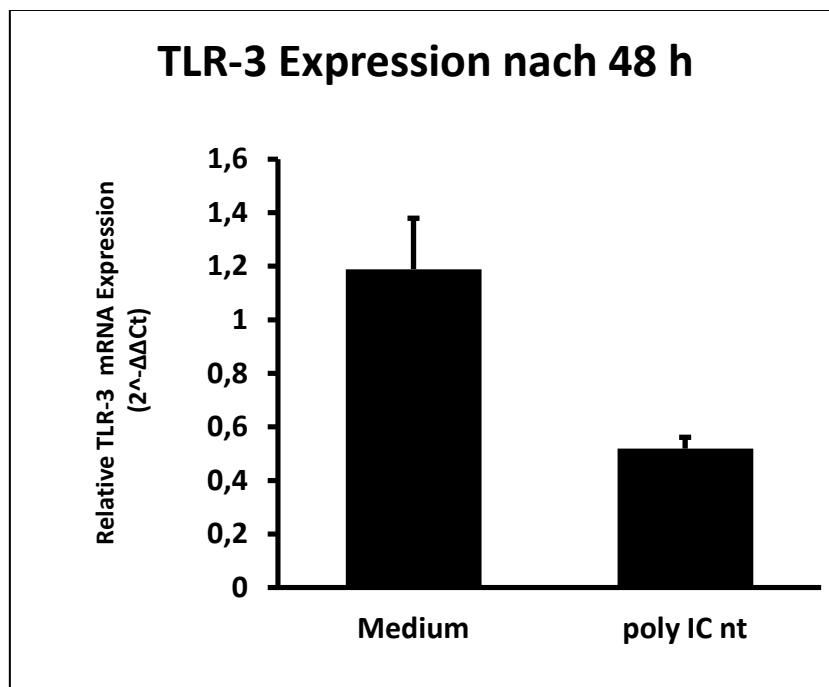


Abb. 17 Real-Time-PCR nach 48 h

Auch nach 48 h Stimulation kommt es zu einer nicht signifikanten Herabregulation des TLR-3 Rezeptors (poly IC nt 0.52 ± 0.04 vs. Kontrolle 1.19 ± 0.19 , $p > 0,05$).

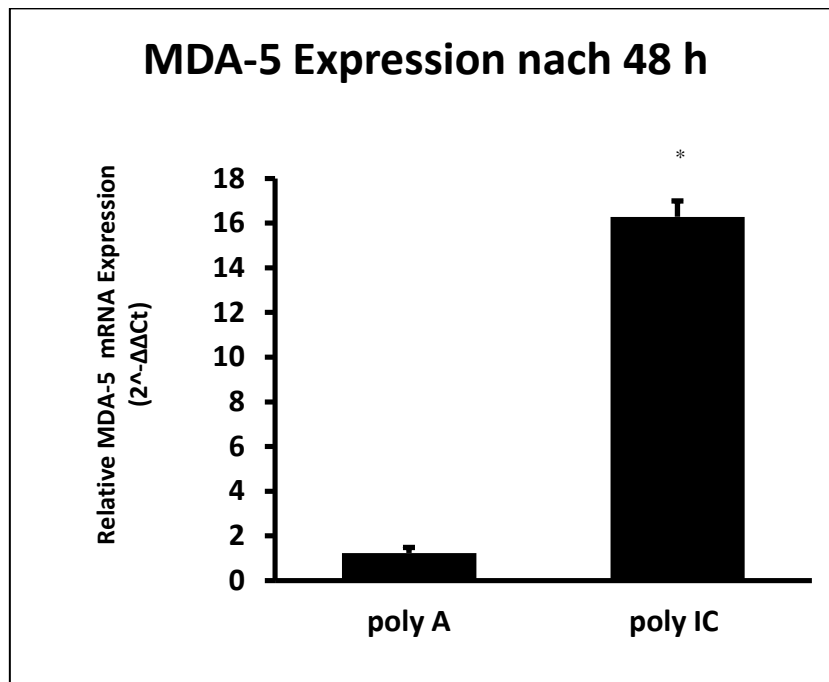


Abb. 18 Real-Time-PCR nach 48 h

Nach 48 h Stimulation kommt es zu einer signifikanten Hochregulation des MDA-5 Rezeptors (poly IC 16.28 ± 0.71 vs. poly A 1.23 ± 0.25 , $p < 0,05$).

Entsprechend der Ergebnisse nach 24 h zeigt der *TLR-3* Rezeptor auch nach 48 h Stimulation mit seinem Liganden *poly IC nt* eine nicht signifikante Herabregulation (*poly IC nt* 0.52 ± 0.04 vs. Kontrolle 1.19 ± 0.19 , $p > 0,05$). Abweichend von den Ergebnissen nach 24 h Stimulation zeigt der *MDA-5* Rezeptor nach 48 h Stimulation mit dem Liganden *poly IC* eine Hochregulation (*poly IC* 16.28 ± 0.71 vs. *poly A* 1.23 ± 0.25 , $p < 0,05$).

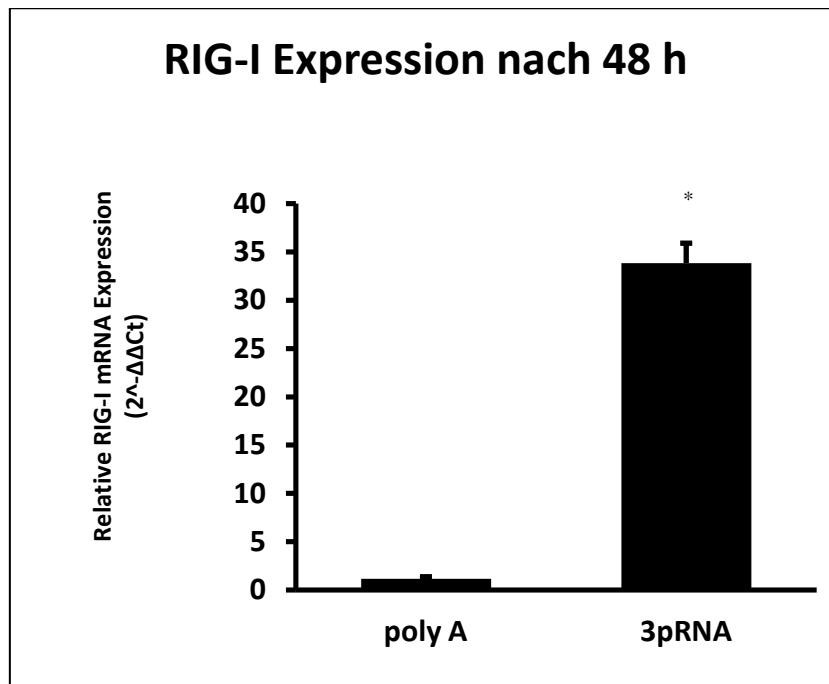


Abb. 19 Real-Time-PCR nach 48 h

Nach 48 h Stimulation kommt es zu einer signifikanten Hochregulation des RIG-I Rezeptors (3pRNA $33.84 \pm 2,07$ vs. poly A 1.16 ± 0.19 , $p < 0,05$).

Auch der *RIG-I* Rezeptor zeigt nach 48 h Stimulation mit dem Liganden *3pRNA* eine Hochregulation (*3pRNA* 33.84 ± 2.07 vs. *poly A* 1.16 ± 0.19 , $p < 0,05$).

Nach 48 h Stimulation zeigt somit nur *TLR-3* eine Herabregulation, *MDA-5* und *RIG-I* dagegen zeigen eine signifikante Hochregulation.

Die Experimente konnten beweisen, dass *EPC* verschiedene Rezeptoren des unspezifischen Immunsystems besitzen. Werden diese mit den spezifischen Liganden *in vitro* stimuliert, kommt es zu einer Veränderung des Expressionsmusters der Rezeptoren, nach 24 h zu einer Herabregulation, nach 48 h wird nur *TLR-3* herabreguliert, *MDA-5* und *RIG-I* dagegen hochreguliert. *EPC* sind folglich immunkompetent. Die Auswirkungen einer Rezeptorstimulation auf die Funktion der *EPC* wurde in den im Folgenden dargestellten Experimenten analysiert.

Apoptose

In der Pathogenese von atherosklerotischen Läsionen spielt die Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen eine wichtige Rolle. Zudem ist eine endotheliale Dysfunktion oftmals durch direkten Endothelschaden bzw. Apoptose vermittelt und eine gesteigerte Apoptose von Immun- und Endothelvorläuferzellen kompromittiert deren Funktionalität. Daher wurde die Apoptoserate in *EPC*, welche der Endothelrestauration dienen, nach 24 h Stimulation untersucht.

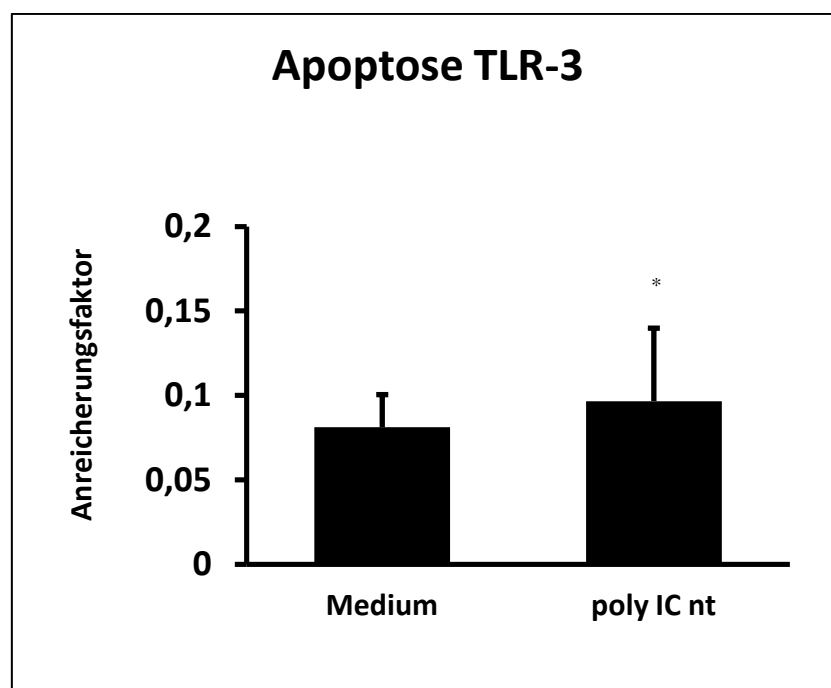


Abb. 20 Apoptose nach 24 h Stimulation

Im Vergleich zur Kontrolle führt eine TLR-3 Stimulation zu einer vermehrten Apoptose in *EPC* (poly IC nt 0.10 ± 0.04 vs. Medium 0.08 ± 0.02 , $p < 0.05$).

Eine *TLR-3* Stimulation führt in *EPC* zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate (*poly IC nt* 0.10 ± 0.04 vs. Medium 0.08 ± 0.02 , $p < 0.05$).

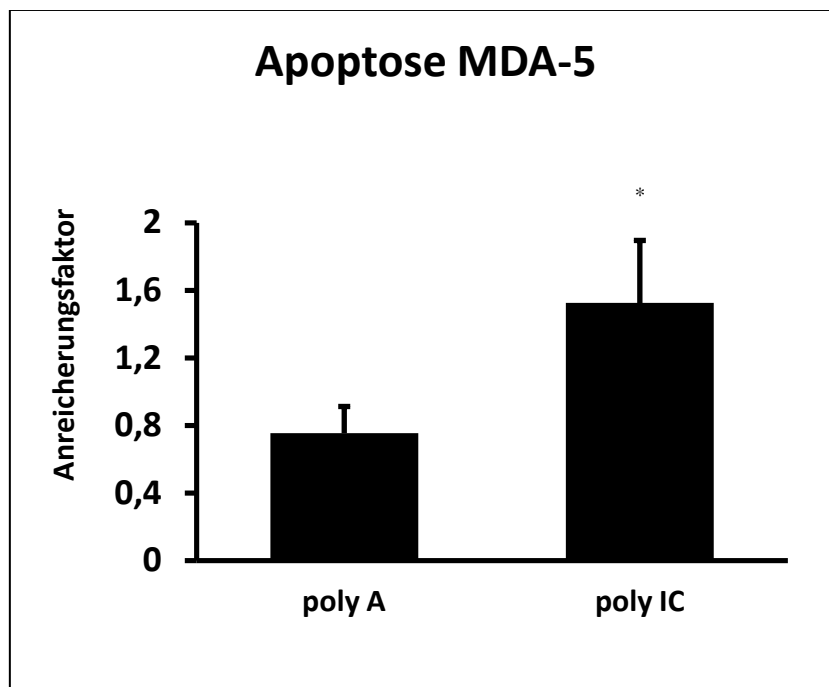


Abb. 21 Apoptose nach 24 h Stimulation

Eine MDA-5 Stimulation führt zu einer vermehrten Apoptose in EPC (poly IC $1,52 \pm 0,37$ vs. poly A $0,75 \pm 0,16$, $p < 0,05$).

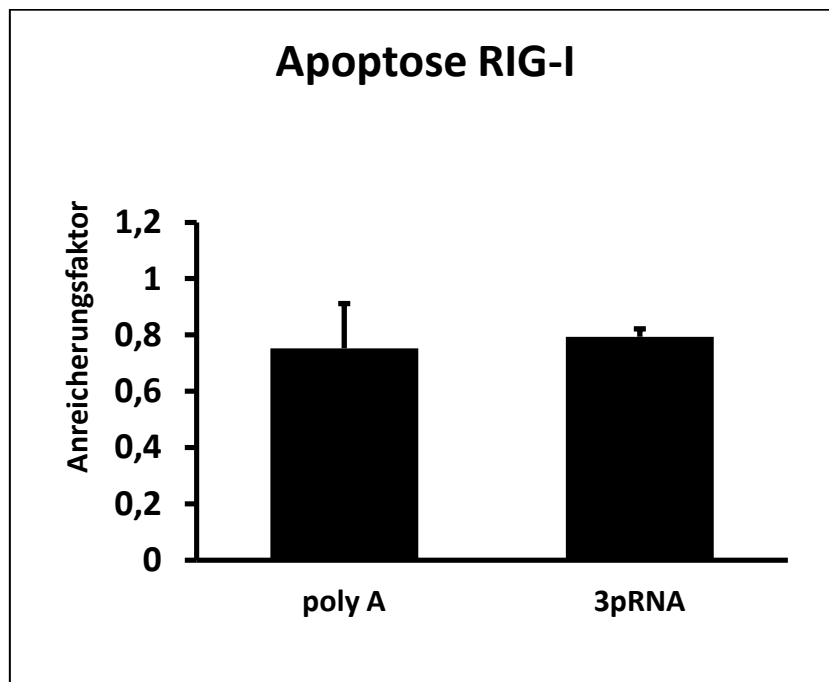


Abb. 22 Apoptose nach 24 h Stimulation

Eine RIG-I Stimulation führt nicht zu einer vermehrten Apoptose in EPC (3pRNA $0,79 \pm 0,03$ % vs. poly A $0,75 \pm 0,16$ %, $p > 0,05$).

Eine *MDA-5* Stimulation in *EPC* führt ebenfalls zu einer vermehrten Apoptoserate (*poly IC* $1,52 \pm 0,37$ vs. *poly A* $0,75 \pm 0,16$, $p < 0,05$). Dagegen führt eine *RIG-I* Stimulation in *EPC* nicht zu einer vermehrten Apoptoserate (*3pRNA* $0,79 \pm 0,03$ % vs. *poly A* $0,75 \pm 0,16$ %, $p > 0,05$).

L-012 Chemiluminescence

Eine Aktivierung des unspezifischen Immunsystems via *PRR* geht oftmals mit gesteigerter Radikalbildung einher, welche neben ihrer Funktion als Abwehrmechanismus auch in körpereigenen (Endothel)zellen oxidativen Stress induzieren kann. Die Bildung von *ROS* ist zudem eine wichtige Determinante im Prozess der Atherosklerose. Folglich wurde die Bildung von Radikalen nach zwei und vier Stunden Rezeptorstimulation untersucht.

Hierbei zeigt sich nach einer zweistündigen *TLR-3* Stimulation der *EPC* eine signifikant höhere Radikalfreisetzung im Vergleich zur Kontrolle (*poly IC nt* $460,62 \pm 159,67$ % vs. Kontrolle 100 ± 0 %, $p < 0,05$). Dies kann ebenfalls für eine zweistündige *MDA-5* Stimulation (*poly IC* $146,02 \pm 7,57$ % vs. *poly A* $81,48 \pm 7,01$ %, $p < 0,05$) bzw. eine 2 stündige *RIG-I* Stimulation (*3pRNA* $183,44 \pm 11,63$ % vs. *poly A* $81,48 \pm 7,01$ %, $p < 0,05$) nachgewiesen werden. Nach zwei Stunden zeigt sich somit für alle Rezeptoren eine deutlich erhöhte Rate an *ROS*.

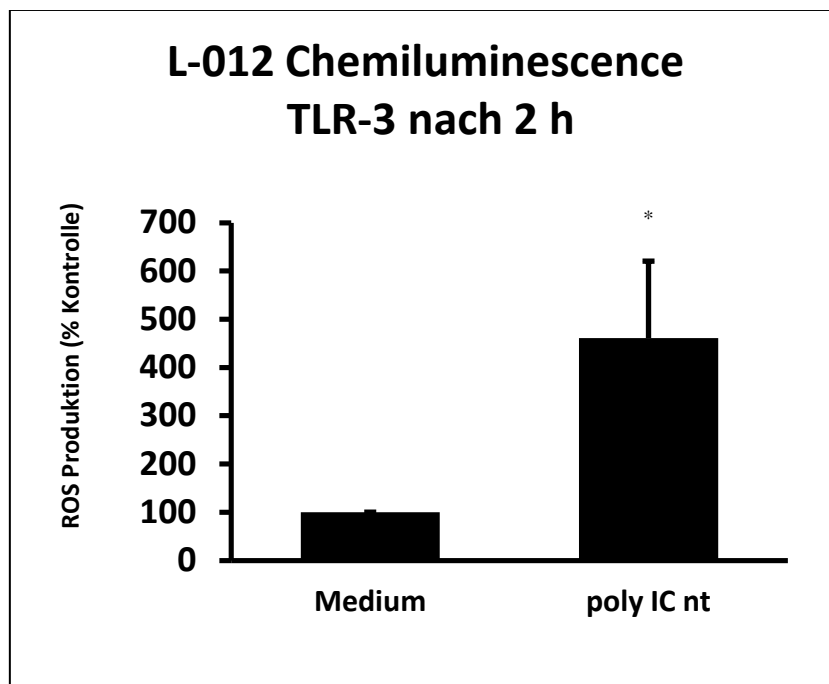


Abb. 23 L-012 Messung nach 2 h Stimulation

Im Vergleich zur Kontrolle führt eine TLR-3 Stimulation zu vermehrter Radikalbildung (poly IC nt $460.62 \pm 159.67\%$ vs. Kontrolle $100 \pm 0\%$, $p < 0,05$).

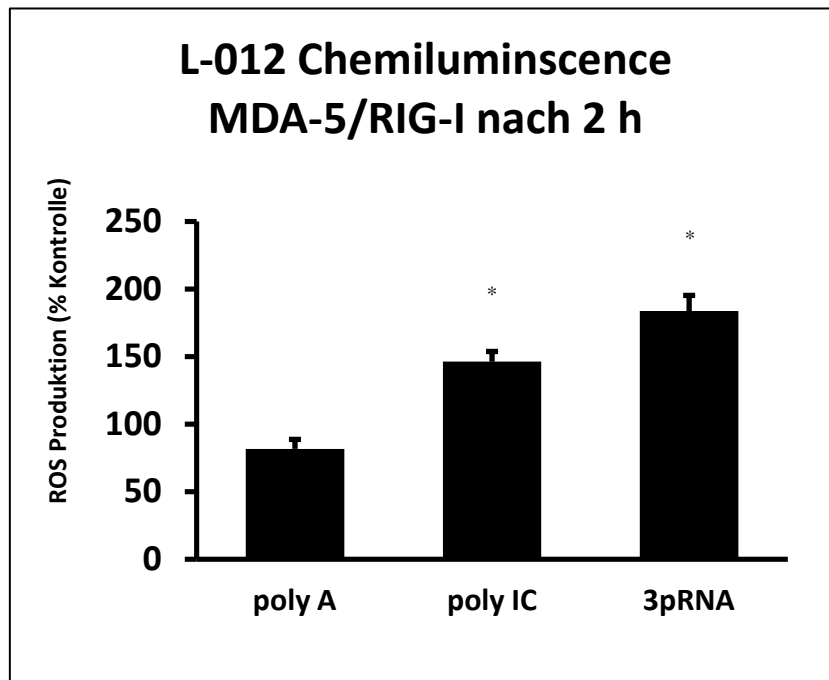


Abb. 24 L-012 Messung nach 2 h Stimulation

Nach MDA-5 Stimulation kommt es im Vergleich zu den Kontrollen zu vermehrter Radikalbildung (poly IC $146.02 \pm 7.57\%$ vs. poly A $81.48 \pm 7.01\%$, $p < 0,05$). Dies zeigt sich auch nach RIG-I Stimulation (3pRNA $183.44 \pm 11.63\%$ vs. poly A $81.48 \pm 7.01\%$, $p < 0,05$).

Da die Radikalbildung nach Rezeptorstimulation unterschiedlichen Kinetiken unterliegen kann, wurde die *ROS* Produktion in *EPC* im zeitlichen Verlauf auch nach vier Stunden Stimulation charakterisiert.

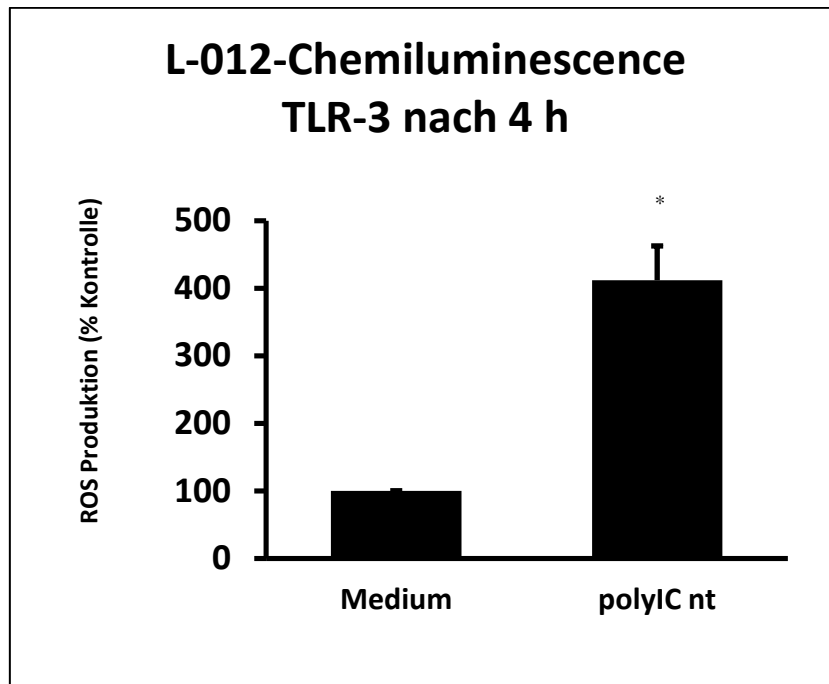


Abb. 25 L-012 Messung nach 4 h Stimulation

Nach 4 h TLR-3 Stimulation kommt es im Vergleich zur Kontrolle zu einer vermehrten Radikalbildung (poly IC nt 411.61 ± 50.82 % vs. Kontrolle 100 ± 0 %, $p < 0,05$).

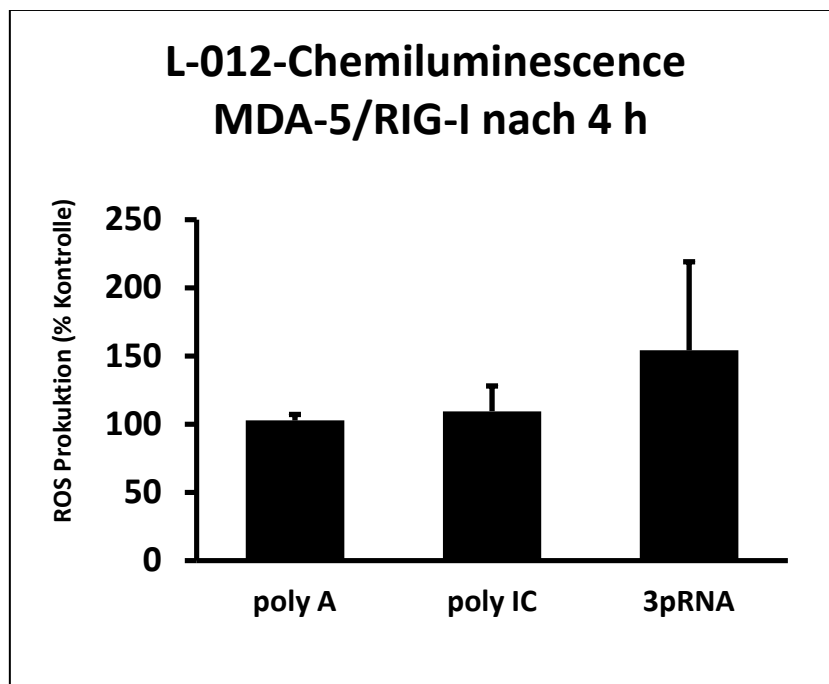


Abb. 26 L-012 Messung nach 4 h Stimulation

Nach 4 h MDA-5 Stimulation ist die Radikalbildung nicht erhöht (poly IC 109.41 ± 18.52 % vs. poly A 102.62 ± 4.42 %, $p > 0,05$). Nach 4 h RIG-I Stimulation zeigt sich eine nicht signifikante Erhöhung der Radikalbildung (3pRNA 154.04 ± 64.97 % vs. poly A 102.62 ± 4.42 %, $p > 0,05$).

Hierbei ist nach vier Stunden *TLR-3* Stimulation im Vergleich zur Kontrolle eine vermehrte Radikalbildung nachweisbar (poly IC nt 411.61 ± 50.82 % vs. Kontrolle 100 ± 0 %, $p < 0,05$). Nach vier Stunden MDA-5 Stimulation ist die Radikalbildung jedoch nicht erhöht (poly IC 109.41 ± 18.52 % vs. poly A 102.62 ± 4.42 %, $p > 0,05$), nach 4 h RIG-I Stimulation kommt es lediglich zu einem nicht signifikanten Anstieg (3pRNA 154.04 ± 64.97 % vs. poly A 102.62 ± 4.42 %, $p > 0,05$). Somit führt nur eine *TLR-3* Stimulation zu einer eindeutigen anhaltenden Radikalbildung in *EPC*, der nach 2 Stunden MDA5 bzw. RIG-I Stimulation nachweisbare Effekt tritt hier nach 4 Stunden nicht mehr auf.

Migration und Proliferation

Die Ergebnisse der Radikalmessungen legen Funktionseinbußen der *EPC* unter Stimulation nahe. Ein wichtiger Faktor für die Bestimmung der Integrität von *EPC* ist ihre Migrations- und Proliferationsfähigkeit. Um diese zu bestimmen, werden wie oben beschrieben *Late-outgrowth EPC* kultiviert. Wenn diese einen dichten Zellrasen bilden, wird eine definierte Fläche

freigekratzt und im zeitlichen Verlauf das erneute Einwachsen der Zellen in die freie Fläche photographisch dokumentiert. Je kleiner die verbleibende freie Fläche (in % der anfänglich freigekratzen Fläche), desto geringer ist das Migrations- und Proliferationspotential der *EPC*.

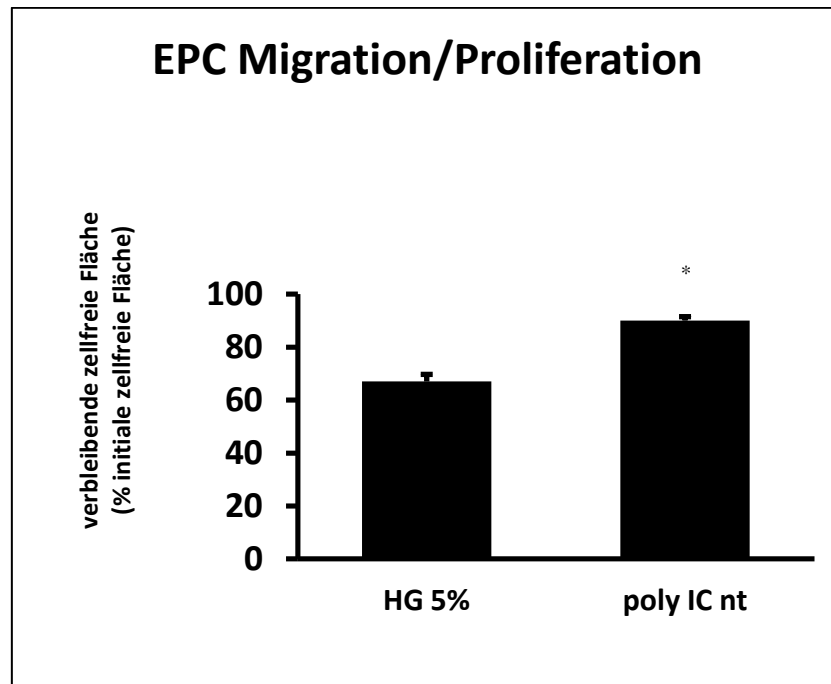


Abb. 27 Ergebnisse der Migrationsversuche

Nach TLR-3 Aktivierung ist die verbleibende zellfreie Fläche im Vergleich zur Kontrolle signifikant größer (poly IC nt 90 ± 1.50 % vs. HG 5% 67 ± 2.70 %, $p < 0,05$).

Die zellfreie Fläche ist nach *TLR-3* Stimulation deutlich größer als die verbleibende Fläche, wenn unstimulierte *EPC* untersucht werden (poly IC 90 nt ± 1.50 % vs. HG 5% 67 ± 2.70 %, $p < 0,05$). Es ist also von einer verminderten Fähigkeit der *EPC* zur Migration und Proliferaton auszugehen.

Die *in vitro* Experimente zeigen zusammenfassend, dass auch *EPC* immunkompetent sind und eine spezifische Stimulation mit proinflammatorischen und proatherosklerotischen Effekten einhergeht. Es kommt zu einer Veränderung des Rezeptorexpressionsmusters, vermehrter Radikalproduktion sowie zu einer verminderten Migrations- und Proliferationsfähigkeit und einer erhöhten Apoptoserate.

In vivo Tierversuche

2. Mausexperiment

Nachdem die Effekte einer spezifischen *TLR-3*, *MDA-5* und *RIG-I* Stimulation in *EPC in vitro* charakterisiert wurden, war das Ziel des 2. Mausexperimentes, den Einfluss einer spezifischen *PRR* Stimulation hinsichtlich der *EPC* Zahlen in den drei Kompartimenten peripheres Blut, Milz und Knochenmark *in vivo* zu analysieren. Die Experimente beschränkten sich hierbei auf *TLR-3* sowie *MDA-5*, da sich im Gegensatz zu diesen beiden Rezeptoren in den geschilderten Vorversuchen kein signifikanter *EPC* Anstieg im peripheren Blut nach spezifischer *RIG-I* Stimulation gezeigt hatte.

FACS

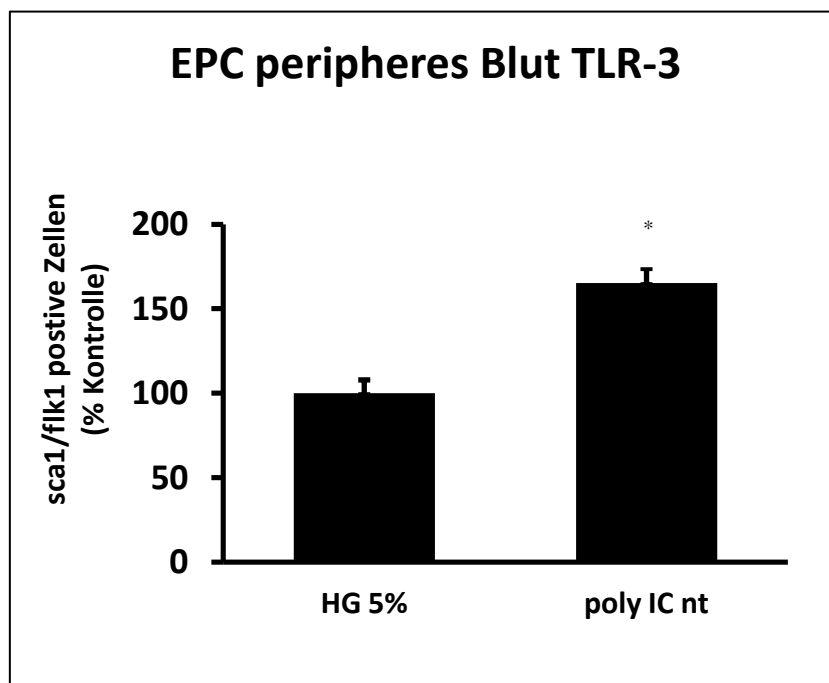


Abb. 28 Ergebnisse der FACS Messung für EPC im peripheren Blut nach TLR-3 Stimulation

Eine TLR-3 Stimulation mit poly IC nt führt zu einem signifikanten Anstieg der zirkulierenden EPC im Vergleich zur Kontrolle HG 5% (poly IC nt 165.16 ± 8.72 % vs. HG 5% 100 ± 7.87 %, $p < 0,05$).

Die Zahl zirkulierender *EPC* wurde mittels *FACS* Analyse quantifiziert. Nach *TLR-3* Stimulation kommt es zu einer Erhöhung zirkulierender *EPC* (*poly IC* 165.16 ± 8.72 % vs. HG 5% 100 ± 7.87 %, $p < 0,05$).

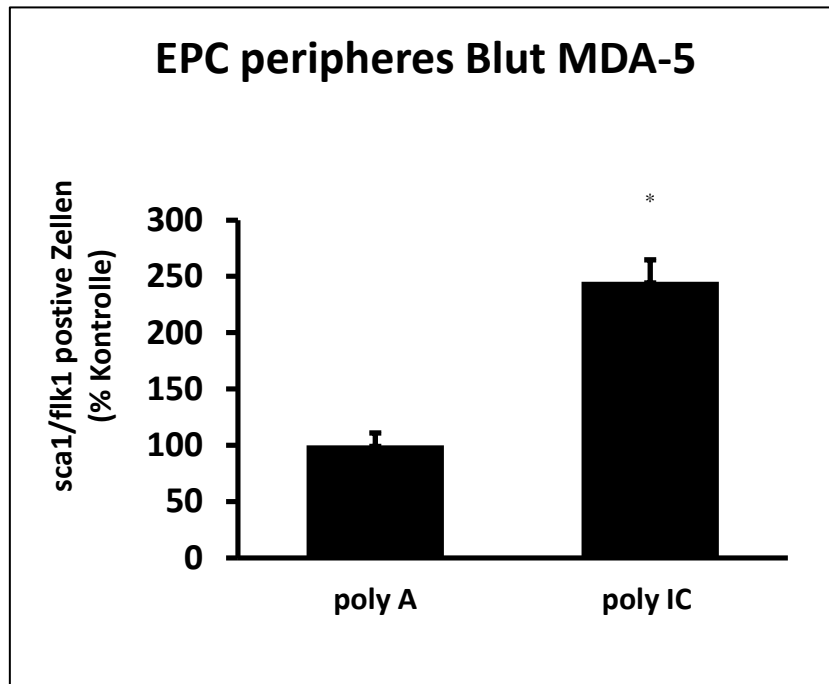


Abb 29 Ergebnisse der *FACS* Messung für *EPC* im peripheren Blut nach *MDA-5* Stimulation

Eine *MDA-5* Stimulation mit transfiziertem *poly IC* führt zu einer Erhöhung der zirkulierenden *EPC* im Vergleich zur Kontrolle *poly A* (*poly IC* 245.21 ± 19.55 % vs. *poly A* 100 ± 10.96 %, $p < 0,05$).

Eine *MDA-5* Stimulation verursacht nach 24 h einen deutlichen Anstieg zirkulierender *EPC* im Vergleich zur Kontrolle *poly A* (*poly IC* 245.21 ± 19.55 % vs. *poly A* 100 ± 10.96 %, $p < 0,05$).

Knochenmark

Wie beschrieben, sind *EPC* unter normalen Umständen in sogenannten Stammzellnischen im Knochenmark lokalisiert, von wo aus sie bei Bedarf vermehrt mobilisiert werden. Die Veränderungen der Anzahl der *EPC* im Knochenmark nach Stimulation wurde untersucht.

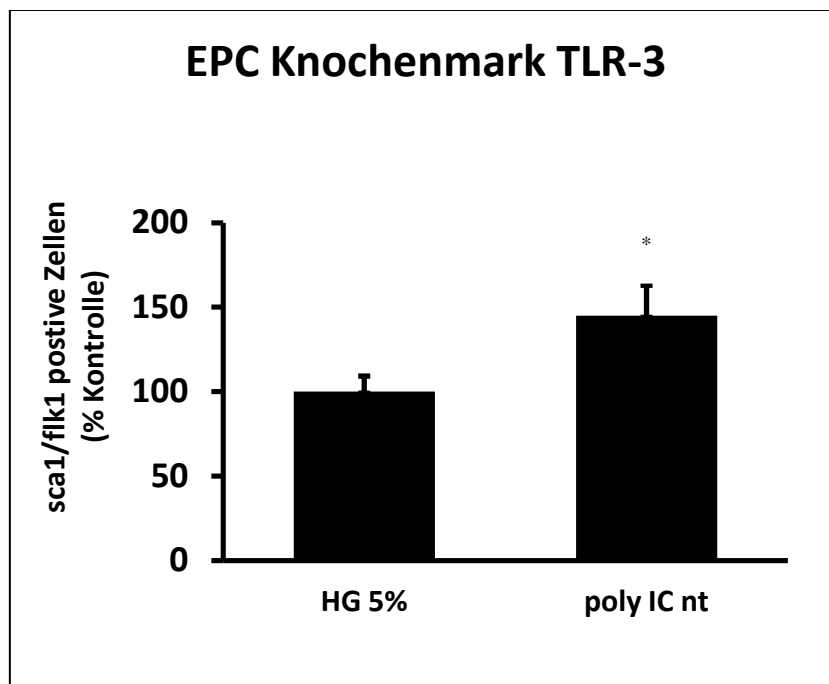


Abb. 30 Ergebnisse der FACS Messung für EPC im Knochenmark

Eine TLR-3 Stimulation mit poly IC nt führt zu einem leichten Anstieg der EPC im Knochenmark (poly IC nt 144.90 ± 18.06 % vs. HG 5% 100 ± 9.15 %, $p < 0,05$).

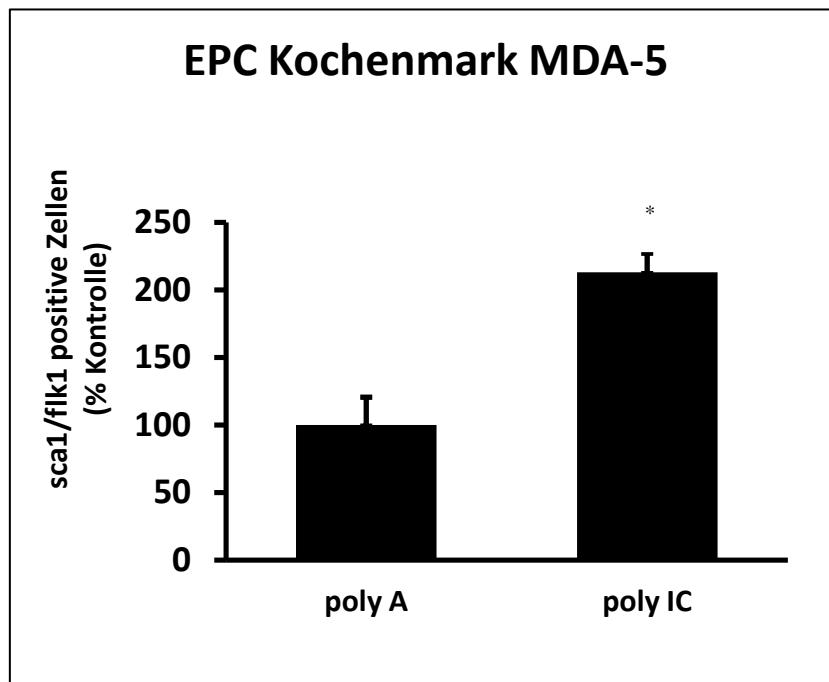


Abb. 31 Ergebnisse der FACS Messung für EPC im Knochenmark

Eine MDA-5 Stimulation mit poly IC verursacht einen signifikanten EPC Anstieg im Knochenmark (poly IC 212.90 ± 14.14 % vs. poly A 100 ± 20.43 %, $p < 0,05$).

Eine *TLR-3* Stimulation verursacht im Vergleich zur Kontrolle HG 5% einen Anstieg der *EPC* im Knochenmark (*poly IC nt* 144.90 ± 18.06 % vs. HG 5% 100 ± 9.15 , $p < 0,05$). Nach *MDA-5* Stimulation mit *poly IC* kommt es ebenfalls zu einer deutlichen Erhöhung der *EPC* im Knochenmark in Relation zur Kontrolle (*poly IC* 212.90 ± 14.14 % vs. *poly A* 100 ± 20.43 %, $p < 0,05$).

Milz

Die Milz dient als Reservoir für zirkulierende *EPC*. Diese lassen sich *ex vivo* zu *early EPC* bzw. *CFU Hill* und *late EPC* bzw. *late-outgrowth EPC* differenzieren. Die Anzahl der *CFU Hill* und die Fläche der *late-outgrowth* Kolonien sind ein Indikator für die Anzahl der in der Milz residierenden *EPC*.

CFU Hill

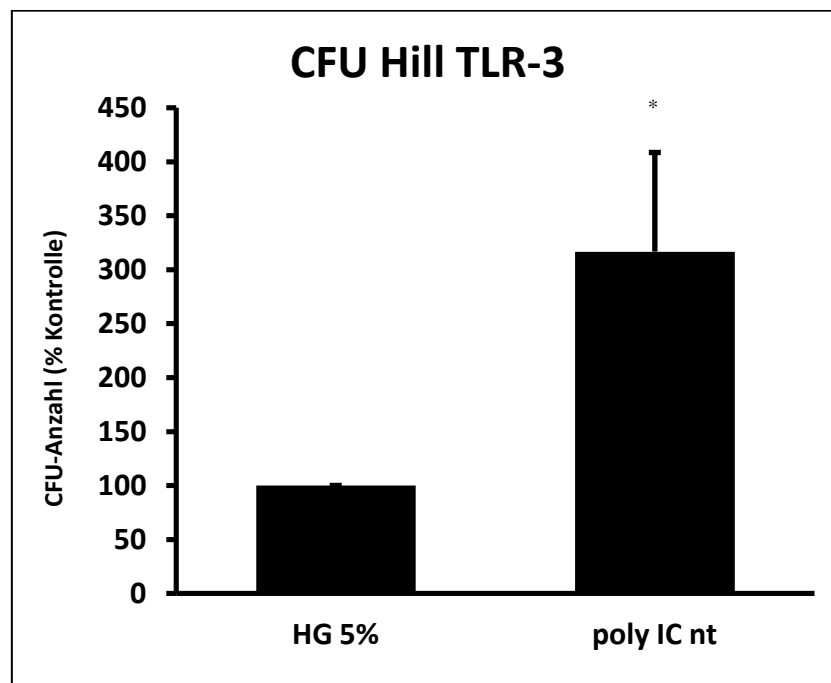


Abb. 32 CFU Hill Kolonien

Eine *TLR-3* Stimulation mit *poly IC nt* führt im Vergleich zur Kontrolle zu einem deutlichen Anstieg der *CFU Hill* (*poly IC nt* 316.67 ± 91.79 % vs. HG 5% $100 \pm 0\%$, $p < 0,05$).

Im Vergleich zur Kontrolle HG 5% kommt es nach *TLR-3* Stimulation mit *poly IC nt* zu einer vermehrten Bildung von *CFU Hill* durch die aus den Milzen der stimulierten Tiere gewonnenen *EPC* (*poly IC nt* 316.67 ± 91.79 % vs. HG 5% 100 ± 0 %, $p < 0,05$).

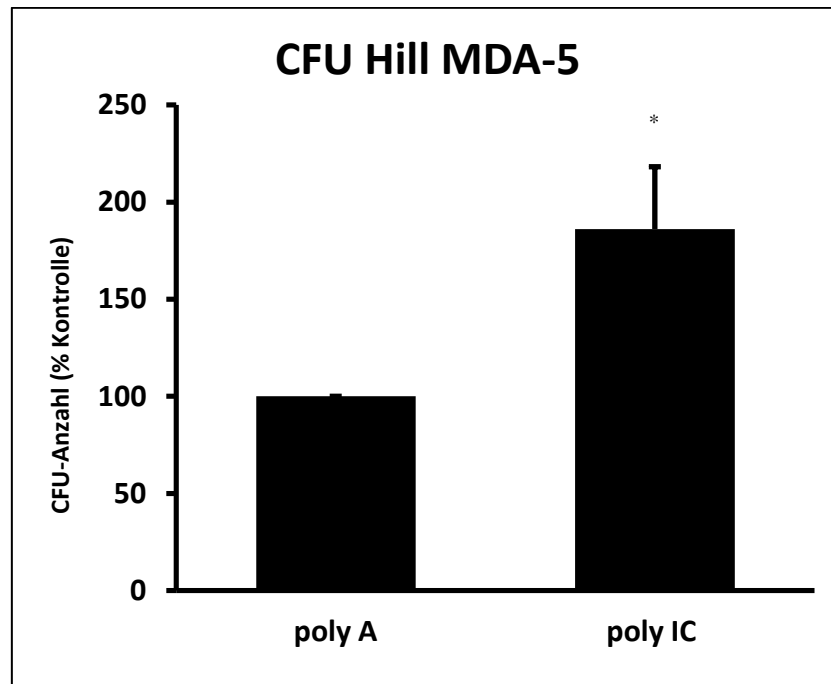


Abb. 33 CFU Hill Kolonien

Eine *MDA-5* Stimulation mit *poly IC* führt zu einem Anstieg der *CFU Hill* in der Milz (186.11 ± 32.03 % vs. *poly A* 100 ± 0 %, $p < 0,05$).

Im Vergleich zur Kontrolle *poly A* kommt es unter *MDA-5* Aktivierung mit *poly IC* zu einer vermehrten Bildung von *CFU Hill* durch die aus den Milzen der stimulierten Tiere gewonnenen *EPC* (186.11 ± 32.03 % vs. *poly A* 100 ± 0 %, $p < 0,05$).

Late-outgrowth EPC

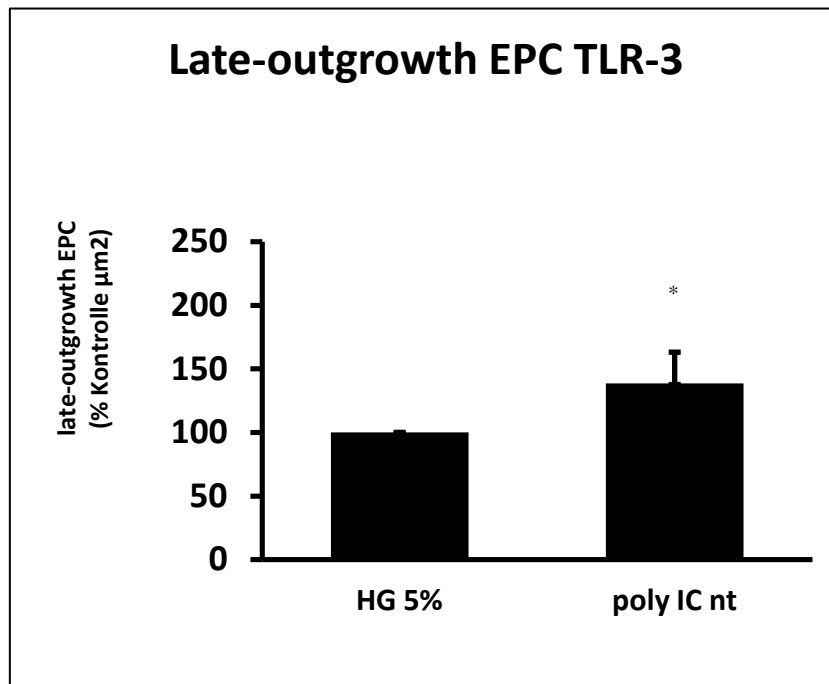


Abb. 34 Fläche der late-outgrowth EPC

Eine TLR-3 Stimulation mit poly IC nt führt zu einer Vergrößerung der late-outgrowth EPC Fläche im Vergleich zur Kontrolle HG 5% (poly IC nt 138.58 ± 24.44 % vs. HG 5% 100 ± 0 %, $p < 0,05$).

Die *late-outgrowth EPC* Fläche ist unter TLR-3 Stimulation im Vergleich zur Kontrolle HG 5% vergrößert (poly IC nt 138.58 ± 24.44 % vs. HG 5% 100 ± 0 %, $p < 0,05$).

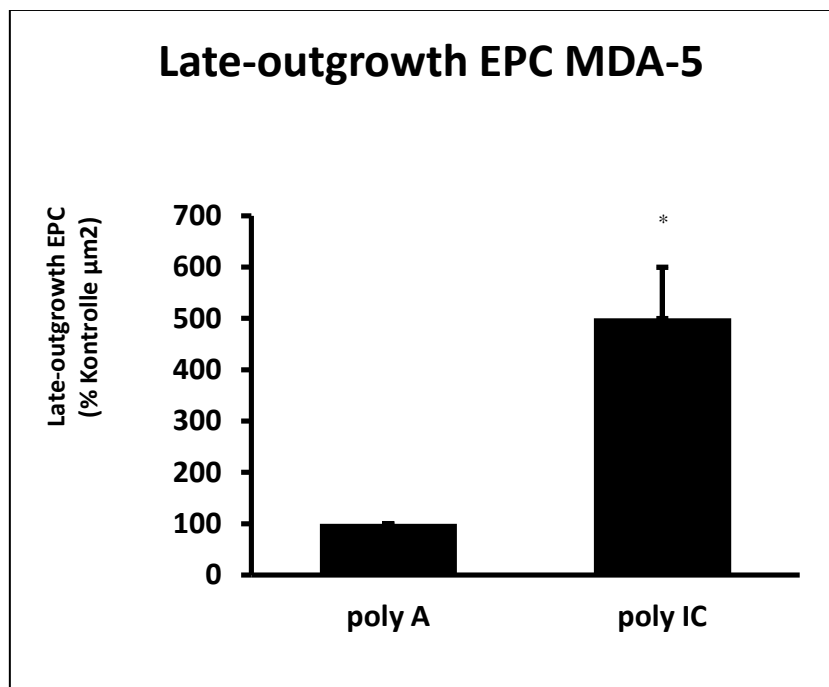


Abb. 35 Fläche der late-outgrowth EPC

Die MDA-5 Stimulation mit poly IC führt zu einem Anstieg der late-outgrowth EPC Fläche im Vergleich zur Kontrolle poly A (poly IC 500.58 ± 99.02 % vs. Kontrolle poly A 100 ± 0 %, $p < 0,05$).

Eine MDA-5 Stimulation mit poly IC führt im Vergleich zur Kontrolle zu einem Anstieg der late-outgrowth EPC in der Milz (poly IC 500.58 ± 99.02 % vs. Kontrolle poly A 100 ± 0 %, $p < 0,05$).

Somit zeigen sich für alle 3 Kompartimente - Knochenmark, peripheres Blut und Milz - nach Stimulation eine erhöhte Anzahl von EPC.

3. Mausexperiment

Hinsichtlich der Frage, ob diese Effekte direkt auf eine Rezeptorstimulation zurückzuführen sind und ob dies eine Rolle bei der Atherogenese spielt, wurde die EPC Zahl im peripheren Blut sowie die Zahl von CFU Hill in der Milz nach TLR-3 Stimulation in Wildtyp Mäusen, Apo E -/- Mäusen (und damit in einem Atherosklerosemodell) und in TLR-3 -/- Mäusen nach TLR-3 Stimulation mit poly IC *nt* bestimmt.

FACS

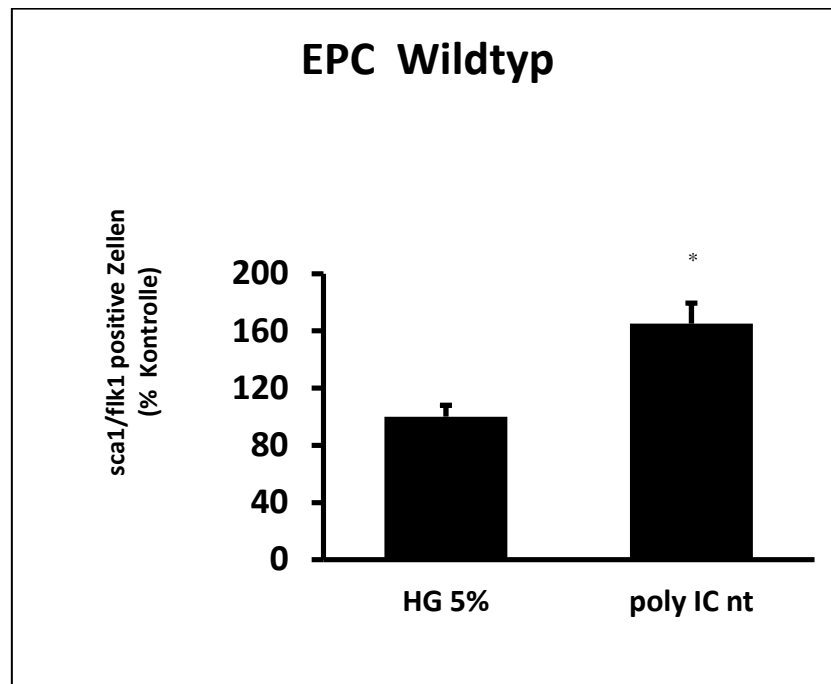


Abb. 36 FACS Analyse von Wildtyp Mäusen

Eine TLR-3 Stimulation von Wildtyp Mäusen mit poly IC nt führt in Vergleich zur Kontrolle HG 5% zu einem Anstieg zirkulierender EPC (poly IC nt 165 ± 14.4 % vs. Kontrolle 100 ± 7.9 %, $p < 0,05$).

Wildtyp Mäuse zeigen nach TLR-3 Stimulation mit poly IC nt eine erhöhte Anzahl zirkulierender EPC im Vergleich zur Kontrolle HG 5% (poly IC nt 165 ± 14.4 % vs. Kontrolle 100 ± 7.9 %, $p < 0,05$).

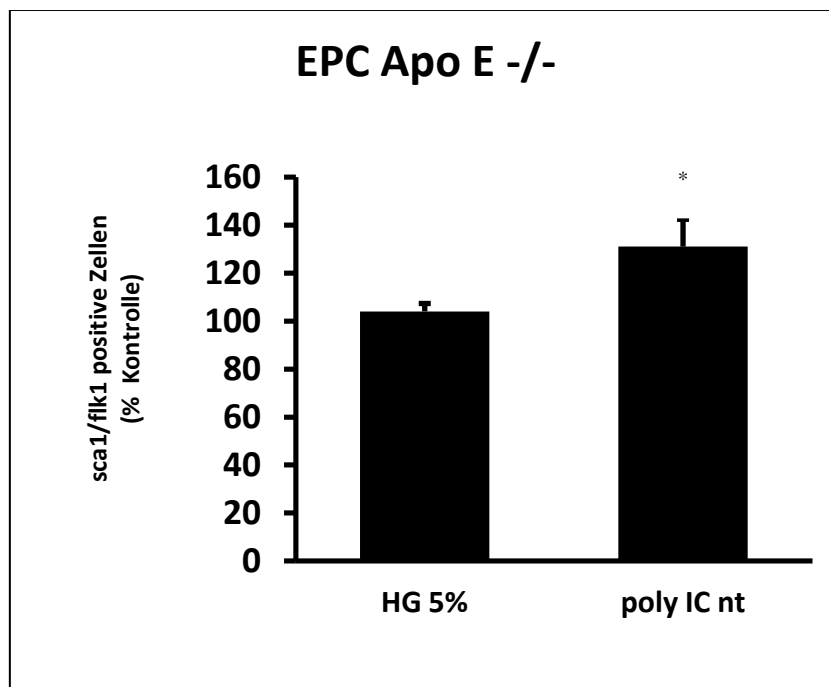


Abb. 37 FACS Analyse von Apo E -/- Mäusen

Die TLR-3 Stimulation führt in Apo E -/- Mäusen zu einem signifikanten EPC Anstieg im peripheren Blut (poly IC nt 131 ± 11.4 % vs. HG 5% 104 ± 3.3 %, $p < 0,05$).

Auch im Atherosklerosemodell bei Apo E -/- Mäusen kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der EPC im peripheren Blut nach TLR-3 Stimulation mit *poly IC nt* im Vergleich zur Kontrolle HG 5% (*poly IC nt* 131 ± 11.4 % vs. HG 5% 104 ± 3.3 %, $p < 0,05$).

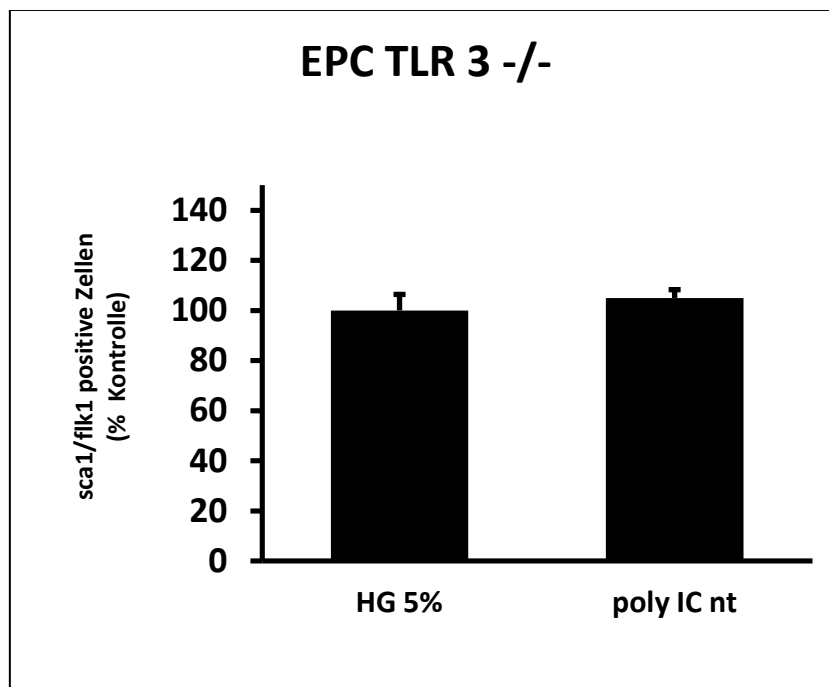


Abb. 38 FACS Analyse von TLR-3 -/- Mäusen

Bei TLR-3 -/- Mäusen zeigt sich nach TLR-3 Stimulation keine Erhöhung der zirkulierenden EPC (poly IC nt 105 ± 3.3 % vs. HG 5% 100 ± 6.4 %, $p > 0,05$).

Bei der Stimulation von TLR-3 -/- Mäusen ergibt sich ein anderes Bild. Die Stimulation mit poly IC nt ergibt hier verglichen mit der Kontrolle HG 5% keine Erhöhung der EPC (poly IC nt 105 ± 3.3 % vs. Kontrolle HG 5% 100 ± 6.4 %, $p > 0,05$).

Die Erhöhung der EPC im peripheren Blut durch TLR-3 Stimulation mit poly IC nt kann folglich sowohl in Wildtyp Mäusen als auch in einem Atherosklerosemodell direkt mit der Aktivierung von TLR-3 Rezeptoren assoziiert werden, denn in TLR-3 defizienten Mäusen hat poly IC nt keinen Effekt.

Weiterhin wurde der Einfluss einer TLR-3 Stimulation auf den EPC Pool in der Milz bei den verschiedenen Maustypen untersucht.

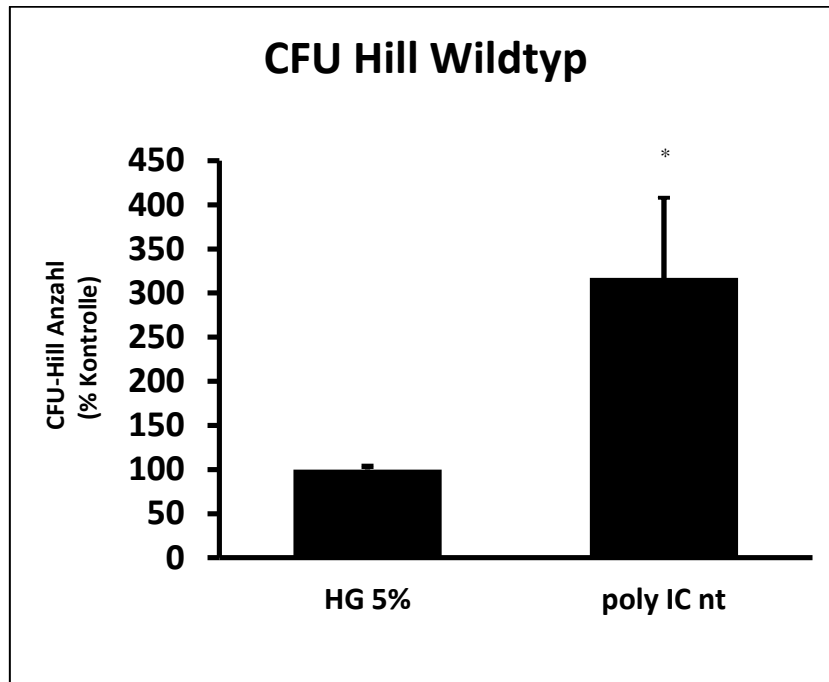
CFU Hill

Abb. 39 CFU Hill in Wildtyp Mäusen

Eine TLR-3 Stimulation in Wildtyp Mäusen mit poly IC nt führt im Vergleich zur Kontrolle zu einer ausgeprägten Erhöhung der CFU Hill (poly IC nt 317 ± 91.8 % vs. HG 5% 100 ± 3.6 %, $p < 0,05$).

Verglichen mit der Kontrolle kommt es nach TLR-3 Stimulation mit poly IC nt zu einer deutlichen Erhöhung der CFU Hill in den Milzen der stimulierten Wildtyp Mäuse (poly IC nt 317 ± 91.8 % vs. HG 5% 100 ± 3.6 %, $p < 0,05$).

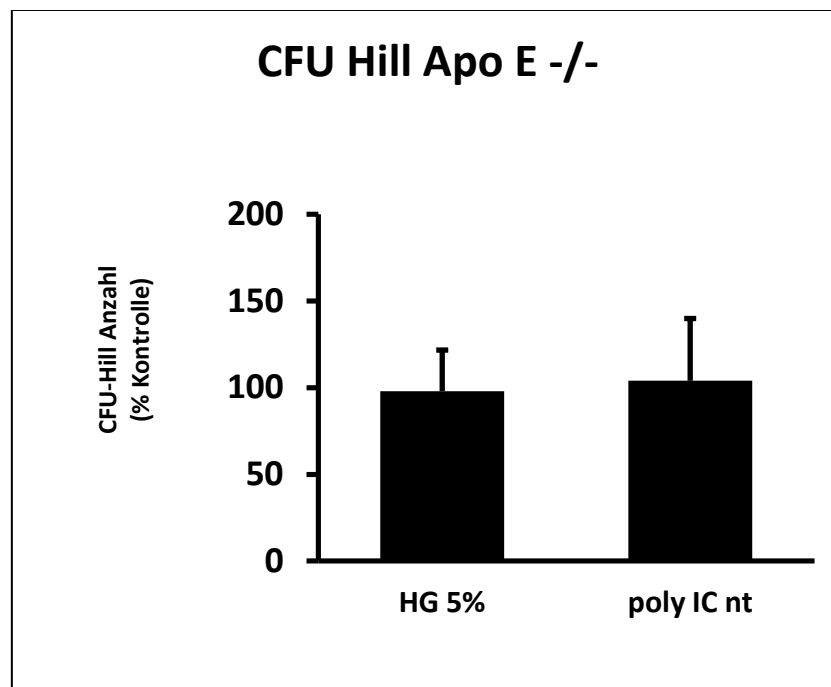


Abb. 40 CFU Hill in Apo E -/- Mäusen

Eine TLR-3 Stimulation mit poly IC nt hat in Apo E -/- Tieren keine Steigerung der CFU Hill zur Folge (poly IC nt 104 ± 35.9 % vs. HG 5% 98 ± 23.7 %, $p > 0,05$).

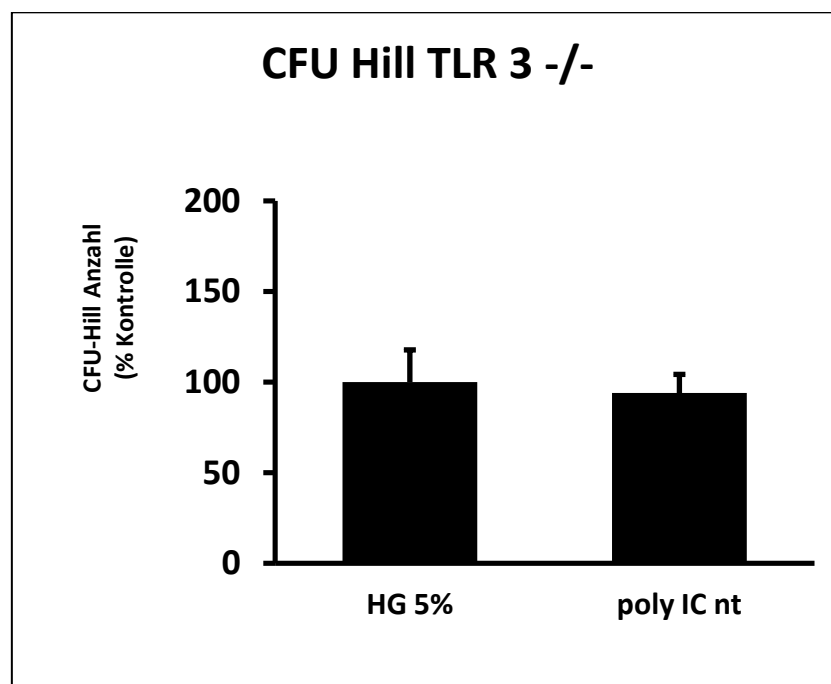


Abb 41 CFU Hill von TLR 3 -/- Mäusen

Eine Stimulation mit poly IC nt führt in TLR 3 -/- Mäusen nicht zu einem Anstieg der CFU Hill (poly IC nt 94 ± 10.3 % vs. HG 5% 100 ± 17.8 %, $p > 0,05$).

Eine *TLR-3* Stimulation bei Apo E $-/-$ Mäusen führt nicht zu einer Erhöhung der *CFU Hill* (*poly IC nt* $104 \pm 35.9\%$ vs. HG 5% $98 \pm 23.7\%$, $p > 0,05$). Bei den *TLR-3 -/-* Mäusen (*poly IC nt* $94 \pm 10.3\%$ vs. HG 5% $100 \pm 17.8\%$, $p > 0,05$) konnte keine Veränderung der *CFU Hill* festgestellt werden. Diese Resultate stimmen mit denen der *EPC* im peripheren Blut überein. In Apo E $-/-$ Mäusen ist das Ausbleiben der *EPC* Mobilisation auf ein dysfunktionales Knochenmark zurückzuführen, welches in seiner Proliferations- und Mobilisationskapazität eingeschränkt ist.

4. Mausexperiment

Transfusionsexperiment

Eine *PRR* Aktivierung führt *in vivo* neben einem *EMP* Anstieg zu einer Endothelialen Dysfunktion. Weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigen zudem eine nach *TLR-3* Aktivierung signifikant verminderte Reendothelialisierung in Wildtyp Mäusen nach Endotheldenudation der A. carotis communis, welche in *TLR-3* defizienten Mäusen nicht nachweisbar ist. Andererseits kommt es *in vitro* durch eine *PRR* Aktivierung zu einer erhöhten Radikalbildung und Apoptoserate sowie zu einer verminderten Proliferations- und Migrationsfähigkeit der *EPC*, wodurch die Zellen mutmaßlich in ihrer Reparationsfunktion kompromittiert sind, was wiederum eine Erklärung für den diskrepanten Befund erhöhter *EPC* Zahlen bei gleichzeitiger Endothelialer Dysfunktion sein kann.

Um die Funktion von *EPC* nach Stimulation *in vivo* zu untersuchen, wurden wie oben detailliert beschrieben *ex vivo* mit *poly IC nt* stimulierte Wildtyp und *TLR-3* *-/-* *EPC* Wildtyp Mäusen appliziert, denen zuvor eine Endotheldenudation der Carotiden zugefügt wurde. Anschließend wurde die Reendothelialisierung durch die jeweiligen *EPC* Gruppen quantifiziert.

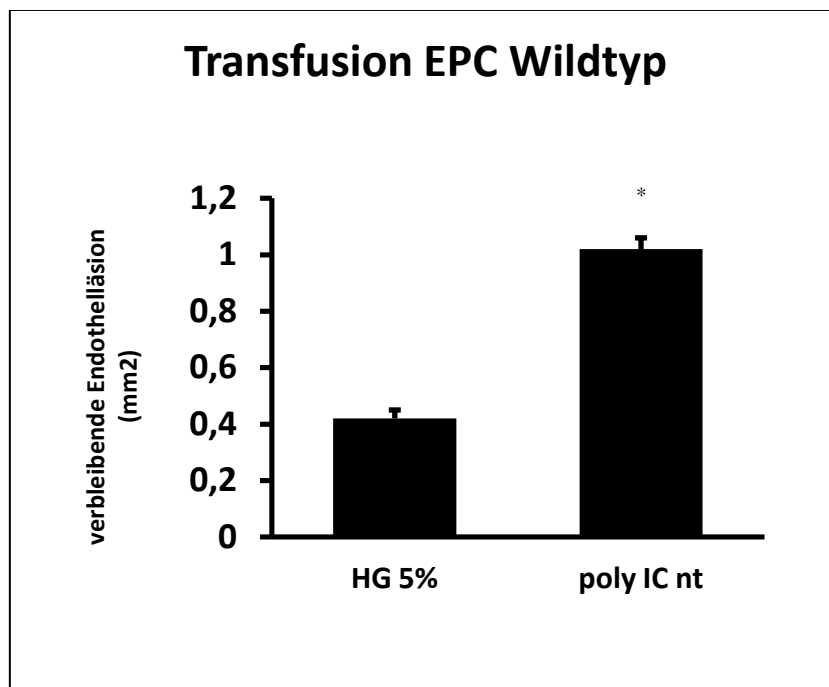


Abb. 42 Verbleibende Endothelläsion nach Infusion von stimulierten Wildtyp EPC

Eine *ex vivo* TLR-3 Stimulation von Wildtyp EPC führt im Vergleich zur Kontrolle zu einer größeren verbleibenden Endothelläsionsfläche (poly IC nt $1.02 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ vs. HG 5% $0.42 \pm 0.03 \text{ mm}^2$, $p < 0.05$). Die Reendothelialisierung durch die stimulierten EPC ist somit kompromittiert.

Die *ex vivo* TLR-3 Stimulation der aus Wildtyp Mäusen gewonnenen EPC mit *poly IC nt* führt nach Applikation zu einer deutlich verringerten Reendothelialisierung der Endotheldenudation (*poly IC nt* $1.02 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ vs. HG 5% $0.42 \pm 0.03 \text{ mm}^2$, $p < 0.05$). Diese EPC sind somit in ihrer Funktion durch die Rezeptorstimulation deutlich kompromittiert.

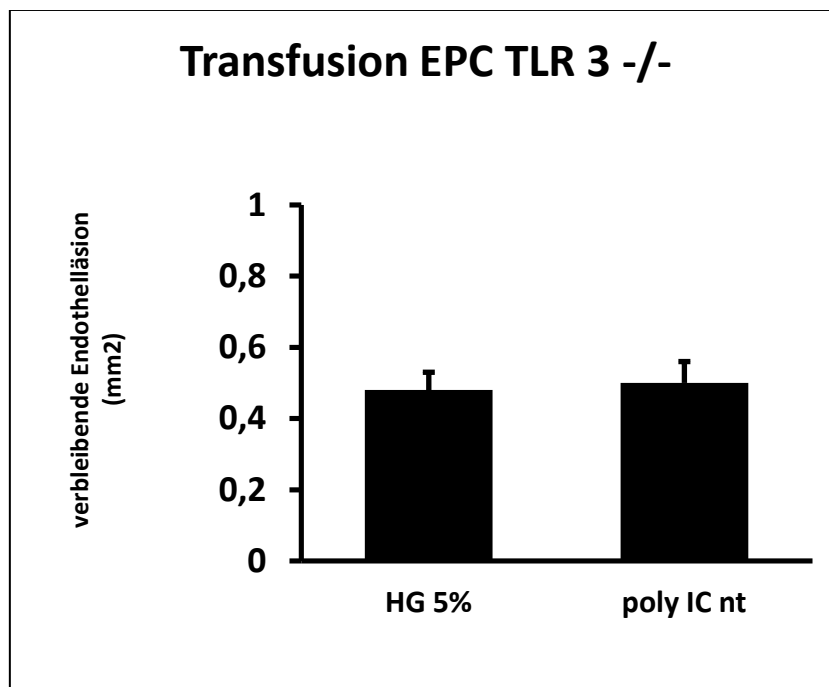


Abb. 43 Verbleibende Endothelläsion nach Infusion von stimulierten TLR 3 -/- EPC

Die Stimulation mit poly IC nt von EPC, welche aus TLR 3 -/- Mäusen gewonnen wurden, hat keinen Einfluss auf die Reendothelialisierung (poly IC nt $0.50 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ vs. HG 5% $0.48 \pm 0.05 \text{ mm}^2$, $p > 0,05$).

Werden jedoch mit *poly IC nt* stimulierte *EPC* aus *TLR-3 -/-* Mäusen infundiert, zeigt sich verglichen mit der Kontrolle nahezu kein Unterschied in der verbleibenden denudierten Endothelfläche (*poly IC nt* $0.50 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ vs. HG 5% $0.48 \pm 0.05 \text{ mm}^2$, $p > 0,05$).

Es kann somit festgestellt werden, dass die Stimulation mit *poly IC nt* das Reendothelialisierungspotential der Wildtyp *EPC* via *TLR-3* abhängiger Mechanismen *in vivo* einschränkt. *EPC* aus *TLR-3* defizienten Tieren zeigen nach Stimulation mit poly IC nt keine Funktionsveränderungen.

Diskussion

Auswirkung der Immunkompetenz von EPC und Endothelzellen

Um zu prüfen, ob das angeborene Immunsystem in der Endothelzellbiologie eine Rolle spielt, haben wir zunächst die Expression der *PRR* in *EPC* und *EC* untersucht. Beide Zelltypen exprimieren *TLR-3*, *MDA-5* und *RIG-I* und sind folglich immunkompetent. Stimulation dieser *PRR* führt in den Zielzellen jeweils zu spezifischen und teilweise unterschiedlichen Rezeptorexpressionsmustern, was auf gerichtete Funktionen der einzelnen Rezeptoren schließen lässt. Zwar führt *in vitro* eine *TLR-3*, *MDA-5* und *RIG-I* Stimulation allgemein zu vermehrten proatherosklerotischen Effekten wie Apoptose, oxidativem Stress und verminderter Migration und Proliferation, jedoch ergeben sich auch Unterschiede. So führt etwa eine *RIG-I* Aktivierung sowohl in Endothelzellen als auch *EPC* nicht zu einer gesteigerten Apoptose, wohl aber eine *MDA-5* und *TLR-3* Aktivierung. Im Gegensatz zu *TLR-3* ist nach *RIG-I* Stimulation die Endothelzellproliferation nicht eingeschränkt.

Für die Aktivierung von *MDA-5*, *RIG-I* und *TLR-3* konnte *in vivo* eine Endotheliale Dysfunktion nachgewiesen werden. *MDA-5* und *TLR-3* zeigen außerdem einen Anstieg zirkulierender *EPC*, nicht aber *RIG-I*. Im Falle von *TLR-3* konnte zudem eine verminderte Reendothelialisierung nach Endotheldenudation und eine verminderte Regeneration durch stimulierte *EPC* nachgewiesen werden.

Diese *EPC* Dysfunktion ist als Hauptgrund für die festgestellte Endotheldysfunktion bei gleichzeitig erhöhten prinzipiell Endothel protektiven *EPC* zu interpretieren. Die *EPC* Erhöhung selbst ist eher als reaktive Regulation auf einen induzierten Endothelschaden zu sehen. Zudem gilt die einer erhöhten *EPC* Anzahl zugeschriebenen positiven Beeinflussung der Endothelfunktion für Beobachtungen über längere Zeiträume (Rauscher et al., 2003, Werner et al., 2002). In den hier gezeigten Experimenten hingegen handelte es sich um akut induzierte Endothelschäden. Dieses Zeitfenster ist möglicherweise nicht ausreichend, damit die *EPC* ihrer Reparaturfunktion nachkommen – selbst bei vollständiger Funktionsfähigkeit. Zusätzlich hängt die Reendothelialisierung nicht nur von den *EPC* ab, sondern ist auch von der Funktion des Endothels selbst abhängig, welches in den Versuchen durch die Rezeptorstimulation nachweislich negativ beeinflusst wurde.

Welcher Anteil den hier gezeigten *PRR* mediierten proatherosklerotischen endothelialen Effekte am Gesamtprozess der Atherosklerose zukommt ist unklar, ebenso die bisher undefinierte Rolle der *EPC* als immunkompetente Zellen und ihre möglichen Interaktionen mit den restlichen Komponenten des Immunsystems.

Exogene versus endogene Liganden

PRR können durch exogene Faktoren stimuliert werden und schon seit längerem sind Hinweise bekannt, dass Infektionen im Zusammenspiel mit anderen Risikofaktoren eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose spielen könnten (Danesh et al., 1997). So sind akute Infektionen mit einem erhöhten Risiko für kardiale Ereignisse verbunden (Smeeth et al., 2004). Infektionserreger, welche in Studien mit Atherosklerose assoziiert wurden, umfassen sowohl bakterielle als auch virale Mikroorganismen: *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, Epstein Barr Virus, Herpes simplex und *human immunodeficiency virus (HIV)* (Desvarieux et al., 2005, Guan et al., 2008, Harskamp und van Ginkel et al., 2008, Michelsen et al., 2004). Mindestens zwei Mikroorganismen - Herpesvirus und *Chlamydia pneumoniae* - wurden in atherosklerotischen Läsionen direkt nachgewiesen (Hendrix et al., 1990, Jackson et al., 1997, Libby et al., 1997). Experimentellen Studien zeigen jedoch uneindeutige Ergebnisse. So wurde in manchen tierexperimentellen Arbeiten eine Progression der Atherosklerose durch systemische Applikation von pathogenen Mikroorganismen beschrieben (Ezzahiri et al., 2002, Lalla et al., 2003), was von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden konnte (Caligiuri et al., 2001, Mach et al., 2002). Auch konnte in Bezug auf bakterielle Infektionen für einen Antibiotikagebrauch kein Benefit hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen nachgewiesen werden (Jespersen et al., 2006, Wells et al., 2004). Die generelle Bedeutung von Infektionen bei der Atherosklerose ist folglich nicht abschließend zu beurteilen, jedoch scheint ihr keine dominante Rolle wie den gut etablierten Risikofaktoren Nikotinabusus oder Diabetes mellitus zuzukommen. Vor diesem Hintergrund ist eine signifikante Rolle viraler oder bakterieller Antigene hinsichtlich einer möglichen Triggerung der Atherosklerose durch eine Aktivierung von *PRR* kritisch zu sehen.

Andererseits können *PRR* aber auch endogene Faktoren, welche teilweise mit Gewebeschäden assoziiert sind, detektieren. Beispiele sind oxidiertes *LDL*, *heat shock protein 60 (HSB60)*, *high-mobility group box protein-1(HMGB-1)* oder Amyloid- β . (Hodgkinson und Ye et al., 2011). Dies

umfasst zudem endogene Nukleinsäuren. Jüngst wurde nachgewiesen, dass *TLR-3* nicht nur sehr kurze *RNA* Stücke von 21 oder mehr Nukleotiden vollkommen sequenzspezifisch detektieren kann (Kleinman et al., 2008), sondern dass auch bei Zellnekrose freigesetzte *RNA* über *TLR-3* eine Entzündungsreaktion auslösen kann (Kariko et al., 2004).

PRR und Atherosklerose

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene *EPC* Dysfunktion sowie die in Arbeiten unserer Arbeitsgruppe nachgewiesene analoge Beeinträchtigung von Endothelzellen unterstreicht das Konzept einer durch Aktivierung des unspezifischen Immunsystems via *PRR* ausgelösten proatherogenen Entzündungsreaktion des Gefäßsystems (de Kleijn und Pasterkamp et al., 2003), wobei diese These nun auch auf die Vorläuferzellen des Endothels ausgeweitet werden kann. Vor dem Hintergrund der in den Experimenten festgestellten proatherogene *EPC*/Endothelreaktion auf eine Stimulation mit Nukleinsäuren lässt zudem auch einen atherogenen *circulus vitiosus*, bestehend aus einem entzündlichem Prozess oder einer Endothelläsion, Apoptose und Nekrose von geschädigten Zellen, Freisetzung körpereigener *DNA* und *RNA* Fragmenten mit nachfolgender *PRR* Aktivierung und konsekutiven proatherosklerotischen Prozessen, was wiederum zu Apoptose und weiteren Zellschäden führt, denkbar erscheinen. Auf diese Weise könnte ein einmal in Gang gekommener atherosklerotischer Prozess sich selbst unterhalten, wobei ein Zellschaden immer zu einem weiteren führt. *TLR-3* könnte dabei eine exponierte Bedeutung zukommen, da nachgewiesen werden konnte, dass dessen Aktivierung mit *siRNA* die Vaskulogenese hemmt und am Endothel Apoptose, erhöhte *TLR-3* Expression und Dysfunktion des Endothels induziert (Cho et al., 2009), ähnlich den in unseren Experimenten festgestellten Ergebnissen.

Zum *circulus vitiosus* tragen möglicherweise neben endogenen Faktoren auch transiente Infektionen bei, während deren Bekämpfung durch das Immunsystem Genombestandteile von Viren oder Mikroorganismen freigesetzt werden, welche nachfolgend wiederum Rezeptoren des unspezifischen Immunsystems aktivieren. Somit könnten auch nicht infektiös ausgelöste Entzündungen oder Gewebeschäden gleich welcher Art wie etwa rheumatische Arthritiden über Zelluntergang und Freisetzung von endogenen Genombestandteilen in die Blutbahn einen Beitrag zu entzündlichen Gefäßveränderungen leisten. Dies passt zu der von Cavassani et al. postulierten

These von *TLR-3* als körpereigenem Sensor für nicht viral bedingte Nekrosen, etwa im Rahmen einer Peritonitis (Cavassani et al., 2008).

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass *RIG-I* neben seiner Funktion als intrazellulärer Virusdetektor auch bei chronisch inflammatorischen Prozessen wie rheumatoider Arthritis eine Rolle spielt. So wird *RIG-I* in Makrophagen der Intima im Rahmen von entzündlichen Gefäßprozessen exprimiert (Imaizumi et al., 2007), und kann neben viralen Nukleinsäuren durch *TNF α* , *IL-1 β* , oxidiertes *LDL* sowie durch mit Zellalterung assoziierte *DNA* Schäden hochreguliert werden (Liu et al., 2011). Die hier gezeigten *RIG-I* vermittelten proatherosklerotischen Effekte in *EPC* sowie die durch unsere Arbeitsgruppe demonstrierte Inhibition der Endothelfunktion ergänzen die Kenntnis über die Rolle von *RIG-I* in der Atherosklerose. Über die Bedeutung von *MDA-5* in Bezug auf Endothelfunktion und *EPC* ist bisher in der Literatur nichts beschrieben. Offensichtlich erstreckt sich die Auswirkung dieses Rezeptors nicht nur über die bisher beschriebene Immunerkennung viraler Infektionen, sondern ist auch eine Komponente der vaskulären Endothelbiologie.

Therapeutische Optionen und künftige Forschung

Ein bereits beschriebener möglicher Ansatz bei der Atherosklerose ist eine Augmentation des endogenen *EPC* Pools. Zwar führt eine *PRR* Aktivierung in den hier dargestellten Versuchen zu einer *EPC* Erhöhung, jedoch sind diese dysfunktional und in ihrer regenerativen Kapazität eingeschränkt. Vor diesem Hintergrund und der Tatsache, dass eine *PRR* Aktivierung die bereits atherosklerotisch bedingt eingeschränkte Endothelfunktion zusätzlich noch weiter vermindern würde, erscheint eine Aktivierung von *RIG-I*, *MDA-5* oder *TLR-3* zur *EPC* Mobilisation zu therapeutischen Zwecken nicht geeignet.

Andererseits erscheint eine medikamentöse Inhibition von *PRR* abhängigen Signalwegen, welche zu einer proinflammatorischen und proatherosklerotischen Reaktion führen, als eine interessante Option sowohl zur Prophylaxe beim Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren als auch bei bereits manifester Atherosklerose. Ebenso vorstellbar wäre die Anwendung einer entsprechenden Therapie bei kardiovaskulären Patienten zusätzlich zur Behandlung von bakteriellen oder viralen Infektionen, inflammatorischen autoimmunologischen Erkrankungen oder vor operativen Eingriffen, welche mit Gewebeschäden und damit der Freisetzung endogener Genombestandteile einhergehen, um den oben dargestellten *circulus vitiosus* zu verhindern. Hierbei ist jedoch die

genaue Kenntnis der jeweiligen den Rezeptoren nachgeschalteten Signalkaskaden zur Identifizierung möglicher Ansatzpunkte unabdingbare Voraussetzung für die Entwicklung inhibitorischer Ansätze. Beispiele für beschriebene *TLR-3* Inhibitoren sind A20, ein *NF- κ B* induzierbares Zinkfinger Protein (Wang et al., 2004), small-molecule Inhibitoren (Cheng et al., 2011) oder *TLR-3* Antikörper (Bunting et al., 2011). Künftige Forschungsbemühungen müssen jedoch zeigen, ob derartige inhibitorische Ansätze einen protektiven Einfluss auf die Endothelfunktion haben. Ob eine solche immunsuppressive Therapie aber breitflächig einsetzbar wäre, ist vor dem Hintergrund der wichtigen physiologischen Aufgaben der *PRR* zur Verhinderung von Infektionen kritisch zu sehen und setzt sicherlich ein tiefgreifenderes Verständnis der zugrunde liegenden Immunmechanismen voraus.

Zusammenfassung

In allen Stadien der Atherosklerose tragen *Endotheliale Progenitorzellen (EPC)* möglicherweise protektiv zur Endothelrestauration bei. Zugleich ist das angeborene Immunsystem eng in proatherosklerotischen Entzündungsprozessen involviert. Die Bedeutung der Aktivierung des angeborenen Immunsystems speziell über die *pattern-recognition-receptors (PRR)* *retinoic acid inducible gene-1 (RIG-I)*, *melanoma differentiation-associated gene-5 (MDA-5)* und *toll-like receptor-3 (TLR-3)* auf die Funktion und Mobilisation von *EPC* war Gegenstand der hier vorgelegten Dissertationsarbeit.

In vitro führt eine spezifische Stimulation der genannten Rezeptoren jeweils zu einer Veränderung des Rezeptorexpressionsmuster. Dies führt zu vermehrter Apoptose (*TLR-3*, *MDA-5*), oxidativem Stress (alle Rezeptoren) und im Falle von *TLR-3* zu einer verminderten Migration und Proliferation.

In vivo kommt es durch spezifische *MDA-5* und *TLR-3* Stimulation zusätzlich zu einer Erhöhung der *EPC* in den drei Kompartimenten Knochenmark, peripheres Blut und Milz. *In vivo* zeigen *TLR-3* Knockout Modelle, dass die Erhöhung der *EPC* im peripheren Blut und der Milz direkt durch eine *TLR-3* Aktivierung vermittelt wird. Im atherosklerotischen *ApoE* Knockout Tiermodell zeigt sich nach *TLR-3* Stimulation eine *EPC* Erhöhung im peripheren Blut, nicht aber in der Milz.

Die Diskrepanz zwischen einem erhöhten *EPC* Pool einerseits bei gleichzeitig beeinträchtigter Endothelfunktion andererseits kann durch ein vermindertes *EPC* Regenerationspotential erklärt werden, was in den *in vivo* Transfusionsexperimenten mit *TLR-3* stimulierten Wildtyp *EPC* und *TLR-3* defizienten *EPC* gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *EPC* die *PRR TLR-3*, *MDA-5* und *RIG-I* exprimieren und somit ebenso wie Endothelzellen als immunkompetent anzusehen sind. Eine spezifische Stimulation von *TLR-3* und *MDA-5* führt zu einer Erhöhung der *EPC* Zahl bei gleichzeitig proatherosklerotischen Effekten. Dies führt, wie am Beispiel von *TLR-3* gezeigt werden konnte, zu einem *in vivo* verminderten Regenerationspotential.

Literaturverzeichnis

Adams GB, Scadden DT. The hematopoietic stem cell in its place. *Nature immunology* 2006; 7: 333-337

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801

Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3381-3388

Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, Ong AT, McFadden EP, Sianos G, van der Giessen WJ, Regar E, de Feyter PJ, Davis HR, Rowland S, Kutryk MJ. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *Journal of the American College of Cardiology* 2005; 45: 1574-1579

Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, Burke AP, Bocciarelli M, Specchia G, Virmani R. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart* 1999; 82: 269-272

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

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999; 18: 3964-3972

Barral PM, Sarkar D, Su ZZ, Barber GN, DeSalle R, Racaniello VR, Fisher PB. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity. *Pharmacol Ther* 2009; 124: 219-234

Beausejour C. Bone marrow-derived cells: the influence of aging and cellular senescence. *Handbook of experimental pharmacology* 2007: 67-88

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

Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 508-514

Braunersreuther V, Mach F, Steffens S. The specific role of chemokines in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2007; 97: 714-721

Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003; 108: 2212-2218

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

Caligiuri G, Rottenberg M, Nicoletti A, Wigzell H, Hansson GK. Chlamydia pneumoniae infection does not induce or modify atherosclerosis in mice. *Circulation* 2001; 103: 2834-2838

Cavassani KA, Ishii M, Wen H, Schaller MA, Lincoln PM, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *J Exp Med* 2008; 205: 2609-2621

Cheng K, Wang X, Yin H. Small-molecule inhibitors of the TLR3/dsRNA complex. *J Am Chem Soc* 2011; 133: 3764-3767

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

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

Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D, Devine S. Stem cell mobilization. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology* 2003: 419-437

Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol* 2006; 27: 352-357

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

Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet* 1997; 350: 430-436

de Kleijn D, Pasterkamp G. Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 58-67

- Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR, Jr., Sacco RL, Papapanou PN. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Circulation* 2005; 111: 576-582
- Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002; 105: 1158-1161
- Ezzahiri R, Nelissen-Vrancken HJ, Kurvers HA, Stassen FR, Vliegen I, Grauls GE, van Pul MM, Kitslaar PJ, Bruggeman CA. *Chlamydia pneumoniae* (Chlamydia pneumoniae) accelerates the formation of complex atherosclerotic lesions in Apo E3-Leiden mice. *Cardiovasc Res* 2002; 56: 269-276
- Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H985-1002
- Fischer JC, Kudielka BM, von Kanel R, Siegrist J, Thayer JF, Fischer JE. Bone-marrow derived progenitor cells are associated with psychosocial determinants of health after controlling for classical biological and behavioral cardiovascular risk factors. *Brain, behavior, and immunity* 2008:
- Forstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch* 2010; 459: 923-939
- Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; 5: 338-349
- Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol* 2009; 21: 242-253
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-376
- Getz GS. Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Immune function in atherogenesis. *J Lipid Res* 2005; 46: 1-10
- Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 8459-8464
- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987; 316: 1371-1375
- Griendling KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation* 1997; 96: 3264-3265
- Guan XR, Li X, Xin XM, Jiang LX, Cui LY, Wang LF, Li HY. Influenza virus infection and risk of acute myocardial infarction. *Inflammation* 2008; 31: 266-272

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

Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* 1997; 272: 21654-21659

Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002; 91: 281-291

Harskamp RE, van Ginkel MW. Acute respiratory tract infections: a potential trigger for the acute coronary syndrome. *Ann Med* 2008; 40: 121-128

Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendriks J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* 2002; 8: 841-849

Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; 102: 1340-1346

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

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745
Hendrix MG, Salimans MM, van Boven CP, Bruggeman CA. High prevalence of latently present cytomegalovirus in arterial walls of patients suffering from grade III atherosclerosis. *Am J Pathol* 1990; 136: 23-28

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

Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008; 28: 1584-1595

Hodgkinson CP, Ye S. Toll-like receptors, their ligands, and atherosclerosis. *ScientificWorldJournal* 2011; 11: 437-453

Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; 458: 514-518

- Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; 314: 994-997
- Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells in vascular repair and remodeling. *Pharmacol Res* 2008; 58: 148-151
- Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)* 2005; 20: 22-27
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004; 24: 288-293
- Ii M, Takenaka H, Asai J, Ibusuki K, Mizukami Y, Maruyama K, Yoon YS, Wecker A, Luedemann C, Eaton E, Silver M, Thorne T, Losordo DW. Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res* 2006; 98: 697-704
- Imaizumi T, Yagihashi N, Kubota K, Yoshida H, Sakaki H, Yagihashi S, Kimura H, Satoh K. Expression of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) in macrophages: possible involvement of RIG-I in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2007; 14: 51-55
- Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004; 104: 2752-2760
- Inohara, Chamaillard, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 355-383
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995
- Jackson LA, Campbell LA, Schmidt RA, Kuo CC, Cappuccio AL, Lee MJ, Grayston JT. Specificity of detection of *Chlamydia pneumoniae* in cardiovascular atheroma: evaluation of the innocent bystander hypothesis. *Am J Pathol* 1997; 150: 1785-1790
- Jespersen CM, Als-Nielsen B, Damgaard M, Hansen JF, Hansen S, Helo OH, Hildebrandt P, Hilden J, Jensen GB, Kastrup J, Kolmos HJ, Kjoller E, Lind I, Nielsen H, Petersen L, Gluud C. Randomised placebo controlled multicentre trial to assess short term clarithromycin for patients with stable coronary heart disease: CLARICOR trial. *BMJ* 2006; 332: 22-27
- Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 131-138
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic

neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97: 3422-3427

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

Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 2004; 279: 12542-12550

Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005; 23: 19-28

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

Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006; 7: 131-137

Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634-637

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

Lalla E, Lamster IB, Hofmann MA, Bucciarelli L, Jerud AP, Tucker S, Lu Y, Papapanou PN, Schmidt AM. Oral infection with a periodontal pathogen accelerates early atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1405-1411

Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005; 106: 1901-1910

Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med* 2008; 263: 528-537

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2007; 2: 329-333

Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation* 1997; 96: 4095-4103

Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000; 105: 71-77

- Lindner V, Reidy MA. Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor by smooth muscle cells and endothelium in injured rat arteries. An en face study. *Circ Res* 1993; 73: 589-595
- Lippincott MF, Desai A, Zalos G, Carlow A, De Jesus J, Blum A, Smith K, Rodrigo M, Patibandla S, Chaudhry H, Glaser AP, Schenke WH, Csako G, Waclawiw MA, Cannon RO, 3rd. Predictors of endothelial function in employees with sedentary occupations in a worksite exercise program. *Am J Cardiol* 2008; 102: 820-824
- Liu F, Gu J. Retinoic acid inducible gene-I, more than a virus sensor. *Protein Cell* 2011; 2: 351-357
- Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 254-262
- Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 399-405
- Lockette W, Otsuka Y, Carretero O. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 1986; 8: II61-66
- Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315: 1046-1051
- Mach F, Sukhova GK, Michetti M, Libby P, Michetti P. Influence of Helicobacter pylori infection during atherogenesis in vivo in mice. *Circ Res* 2002; 90: E1-4
- Matsumoto M, Seya T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 805-812
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301-305
- Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Arditi M. TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis. *J Immunol* 2004; 173: 5901-5907
- Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res* 1983; 24: 1070-1076
- Muller-Ehmsen J, Braun D, Schneider T, Pfister R, Worm N, Wielckens K, Scheid C, Frommolt P, Flesch M. Decreased number of circulating progenitor cells in obesity: beneficial effects of weight reduction. *European heart journal* 2008; 29: 1560-1568
- Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997; 349: 1498-1504

Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 831-842

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

Pearson JD. Endothelial progenitor cells - hype or hope? *J Thromb Haemost* 2009; 7: 255-262

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

Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000; 106: 1331-1339

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

Rautou PE, Mackman N. Deletion of Microvesicles From the Circulation. *Circulation* 2012; 125: 1601-1604

Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003; 107: 1164-1169

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109: 337-346

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

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809

Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones* 2007; 39: 86-93

Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 44: 1690-1699

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

Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1210-1221

Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *European heart journal* 2006; 27: 2775-2783

Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Murphy C, Bonnefoy JY, Fabunmi RP, Libby P. Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells by T lymphocytes: a role for CD40 signaling in plaque rupture? *Circulation research* 1997; 81: 448-454

Schwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME, Falk E. Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 705-713

Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nature reviews* 2007; 8: 703-713

Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; 425: 516-521

Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, Ng MK. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *Journal of the American College of Cardiology* 2008; 51: 660-668

Sirisinha S. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2011; 29: 1-14

Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P, Vallance P. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med* 2004; 351: 2611-2618

Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; 89: 2462-2478

Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2005; 181: 305-310

Steinmetz M, Nickenig G, Werner N. [Perspectives of regenerative mechanisms in cardiovascular disease spotlighting endothelial progenitor cells]. *Med Klin (Munich)* 2009; 104: 287-295

Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Bohm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003; 107: 3059-3065

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-438

Takaoka A, Wang Z, Choi MK, Yanai H, Negishi H, Ban T, Lu Y, Miyagishi M, Kodama T, Honda K, Ohba Y, Taniguchi T. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 2007; 448: 501-505

Timmermans F, Plum J, Yoder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med* 2009; 13: 87-102

Tousoulis D, Andreou I, Antoniadis C, Tentolouris C, Stefanadis C. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2008; 201: 236-247

Umemura T, Soga J, Hidaka T, Takemoto H, Nakamura S, Jitsuiki D, Nishioka K, Goto C, Teragawa H, Yoshizumi M, Chayama K, Higashi Y. Aging and hypertension are independent risk factors for reduced number of circulating endothelial progenitor cells. *Am J Hypertens* 2008; 21: 1203-1209

Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. *Microvasc Res* 2010; 79: 184-192

Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. *Microvasc Res*; 79: 184-192

VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 277-287

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

Wang CH, Ting MK, Verma S, Kuo LT, Yang NI, Hsieh IC, Wang SY, Hung A, Cherng WJ. Pioglitazone increases the numbers and improves the functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with diabetes mellitus. *American heart journal* 2006; 152: 1051 e1051-1058

Wang CH, Verma S, Hsieh IC, Chen YJ, Kuo LT, Yang NI, Wang SY, Wu MY, Hsu CM, Cheng CW, Cherng WJ. Enalapril increases ischemia-induced endothelial progenitor cell mobilization

through manipulation of the CD26 system. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2006; 41: 34-43

Wang YY, Li L, Han KJ, Zhai Z, Shu HB. A20 is a potent inhibitor of TLR3- and Sendai virus-induced activation of NF-kappaB and ISRE and IFN-beta promoter. *FEBS Lett* 2004; 576: 86-90
Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, Schmid A, Schieffer B, Bohm M, Nickenig G. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation research* 2004; 94: 534-541

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

Wells BJ, Mainous AG, 3rd, Dickerson LM. Antibiotics for the secondary prevention of ischemic heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2004; 164: 2156-2161

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *The New England journal of medicine* 2005; 353: 999-1007

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

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

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

Xing Z, Ryan MA, Daria D, Nattamai KJ, Van Zant G, Wang L, Zheng Y, Geiger H. Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. *Blood* 2006; 108: 2190-2197

Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; 107: 1322-1328

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; 301: 640-643

Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, Katakawa M, Yamamoto C, Han Y, Ueno T, Kobayashi N, Matsumoto K. Effects of the antioxidative beta-blocker celiprolol on endothelial progenitor cells in hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2008; 21: 1062-1068

Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 1989; 84: 1086-1095

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

Yu M, Levine SJ. Toll-like receptor, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011; 22: 63-72

Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergun S. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 2006; 133: 1543-1551

Zhou Z, Shi S, Song M, Huang H, Chen K, Mi J, Li L, Chen G, Hou C, Huang G, Zhu C. Development of transgenic endothelial progenitor cell-seeded stents. *Journal of biomedical materials research* 2009; 91: 623-628

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Georg Nickenig für die freundliche Überlassung des Themas sowie die Schaffung und Bereitstellung der strukturellen Voraussetzungen für die Durchführung dieser Arbeit.

Bonfor danke ich für das Vertrauen und die Unterstützung, ohne die dieses Projekt in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Sebastian Zimmer für die ausgezeichnete Betreuung und Hilfe bei meiner Arbeit an dieser Dissertation und auch an anderen wissenschaftlichen Projekten. Seine fachliche und persönliche Unterstützung haben in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meiner Freundin Damorena Grigore danke ich für Ihre liebevolle Geduld und Hilfe beim Korrekturlesen.

Abschließend möchte ich meiner Familie ganz herzlich für ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines gesamten Studiums und auch darüber hinaus danken.