

Medizinische Universität Wien

Zentrum für Biomedizinische Forschung und Translationale Chirurgie

(Leiter: Univ. Prof. Dr. Bruno K. Podesser)

**Analyse von toll-like Rezeptoren in verkalkten  
glatten Muskelzellen *in vitro***

Bachelorarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Carina Bianca May

Wien, Juli 2023

Interne Betreuerin: Priv.-Doz. Dr.rer.nat. Sabina Hammer

Externe Betreuerin: Mag. Dr. Barbara Kapeller

Gutachter: Dr. Christof Bertram, PhD, Dipl.ACVP

## **Zusammenfassung**

Gefäßverkalkungen, auch Arteriosklerose genannt, zählen zu den häufigsten Herzkreislauferkrankungen, wobei sich Gefäßwände durch Ablagerungen verengen und verhärten, was zu ernsthaften gesundheitlichen Problemen führen kann.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Verkalkung und Lipopolysaccharid auf die Expression von toll-like Rezeptoren (TLR) in glatten Muskelzellen zu untersuchen. TLR sind Teil des angeborenen Immunsystems, jedoch ist ihre Expression nicht auf Immunzellen beschränkt, sie werden unter anderem auch von glatten Muskelzellen exprimiert. Nach Bindung eines exogenen oder endogenen Liganden an den Rezeptor werden Signalkaskaden ausgelöst, die eine Antwort des angeborenen Immunsystems auslösen. In weiterer Folge kommt es auch zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

Für dieses Projekt wurden glatte Muskelzellen der menschlichen Koronararterie mit organischem und anorganischem Phosphat inkubiert, um eine Kalzifizierung *in vitro* zu induzieren. Zur Beurteilung einer zytotoxischen Wirkung der verwendeten Phosphate auf die Zellen wurden Proliferationsanalysen mit Resazurin durchgeführt. Außerdem wurde die Zellzahl und Morphologie der Zellen mittels Schnellfärbung bestimmt. Zur Untersuchung von Kalkablagerungen wurde eine Alizarin-S-Färbung durchgeführt. Um die Expression von TLR auf RNA-Ebene zu untersuchen, wurde aus den Zellen RNA isoliert und mittels qPCR analysiert. Weiters wurden ausgewählte TLR mittels einer Immunfluoreszenzfärbung auf deren Proteinexpression untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Phosphatpuffer als auch Lipopolysaccharide einen Einfluss auf die Genexpression der toll-like Rezeptoren in glatten Muskelzellen haben. Weiters gibt es auch teils signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten organischen und anorganischen Phosphatpuffern.

Weitere Forschung ist jedoch notwendig, um die Einflüsse und molekularen Mechanismen hinter der Entstehung und Progression der Gefäßverkalkungen vollständig zu klären.

## **Abstract**

Vascular calcification, also known as atherosclerosis, is one of the most common cardiovascular diseases, with vessel walls narrowing and hardening due to calcium deposits, which can lead to serious health problems.

The aim of this work was to investigate the effect of calcification and lipopolysaccharide on the expression of toll-like receptors (TLR) in smooth muscle cells. TLR are part of the innate immune system, but their expression is not restricted to immune cells, they are also expressed by smooth muscle cells. Upon binding of an exogenous or endogenous ligand to the receptor, signaling cascades are triggered that elicit a response from the innate immune system. Subsequently, activation of the adaptive immune system also occurs.

For this project, human coronary artery smooth muscle cells were incubated with organic and inorganic phosphate to induce calcification in vitro. To assess a cytotoxic effect of the phosphates used on the cells, proliferation assays were performed with resazurin. Cell number and morphology of the cells were also determined by rapid staining. Alizarin S staining was performed to examine calcifications. To investigate the expression of TLR at the RNA level, RNA was isolated from the cells and analyzed by qPCR. Furthermore, selected TLR were examined for their protein expression by immunofluorescence staining.

The results show that both phosphate buffers and lipopolysaccharides have an influence on the gene expression of toll-like receptors in smooth muscle cells. Furthermore, there are also some significant differences between the organic and inorganic phosphate buffers used.

However, further research is needed to fully elucidate the influences and molecular mechanisms behind the development and progression of vascular calcifications.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Kardiovaskuläres System</b> .....	1
<b>1.1.1 Koronararterien</b> .....	2
<b>1.2 Gefäßverkalkungen</b> .....	3
<b>1.3 Toll-like Rezeptoren (TLR)</b> .....	5
<b>1.3.1 Exogene Liganden</b> .....	5
<b>1.3.2 Endogene Liganden</b> .....	7
<b>1.3.3 Signalwege</b> .....	7
<b>1.3.4 Arteriosklerose im Zusammenhang mit Infektionen</b> .....	8
<b>1.4 Ziel der Arbeit</b> .....	9
<b>2. Material und Methoden</b> .....	10
<b>2.1 Zellkultur</b> .....	10
<b>2.1.1 Kulturmedium</b> .....	10
<b>2.1.2 Auftauen kryokonservierter Zellen</b> .....	10
<b>2.1.3 Kultivierung der Zellen</b> .....	10
<b>2.1.4 Einfrieren der Zellen</b> .....	11
<b>2.1.5 Zellzählung</b> .....	11
<b>2.1.6 Kalzifizierung der Zellen</b> .....	12
<b>2.1.7 Fixierung der Zellen</b> .....	12
<b>2.2 Zellfärbung</b> .....	12
<b>2.2.1 Immunfluoreszenzfärbung</b> .....	12
<b>2.2.2 Alizarinrot-S-Färbung</b> .....	14
<b>2.2.3 Hemacolor-Schnellfärbung</b> .....	14
<b>2.3 Proliferationsanalyse</b> .....	15
<b>2.4 Analyse auf RNA-Ebene</b> .....	15
<b>2.4.1 Behandlung der Zellen</b> .....	15
<b>2.4.2 RNA-Isolierung</b> .....	16
<b>2.4.3 Quantifizierung der RNA</b> .....	16
<b>2.4.4 Synthese der komplementären DNA (cDNA)</b> .....	17
<b>2.4.5 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)</b> .....	18
<b>2.4.6 Statistische Analyse</b> .....	21

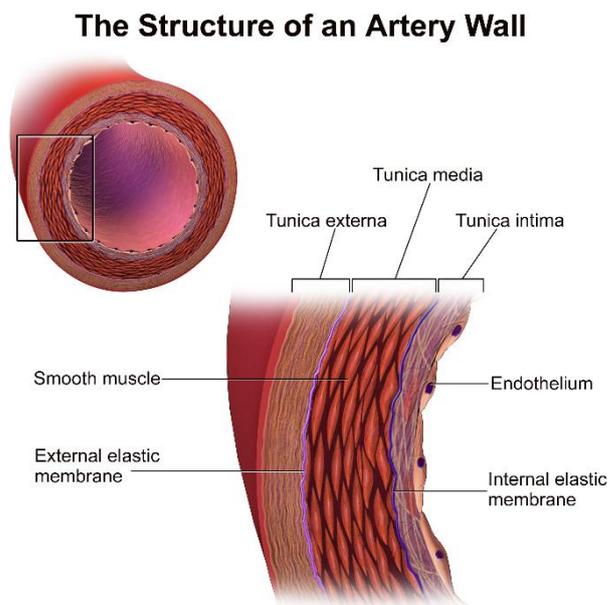
<b>3. Ergebnisse</b> .....	22
<b>3.1 Morphologie und Zellzahl</b> .....	22
<b>3.2 Proliferationsansatz</b> .....	23
<b>3.3 qPCR</b> .....	24
<b>3.4 Immunhistochemie</b> .....	34
<b>3.4.1 Charakterisierung der Zellen</b> .....	34
<b>3.4.2 TLR-Expression auf Proteinebene</b> .....	35
<b>4. Diskussion</b> .....	39
<b>5. Literaturverzeichnis</b> .....	41
<b>6. Anhang</b> .....	44
<b>6.1 Abbildungsverzeichnis</b> .....	44
<b>6.2 Tabellenverzeichnis</b> .....	46
<b>6.3 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	47

## 1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit. Schätzungen zufolge sterben jährlich rund 17,3 Millionen Menschen an den Folgen kardiovaskulärer Erkrankungen und laut Prognosen soll diese Zahl bis 2030 auf 23,6 Millionen Todesfälle pro Jahr ansteigen (1).

### 1.1 Kardiovaskuläres System

Das kardiovaskuläre System, bestehend aus dem Herzen und den Blutgefäßen, ist ein komplexes Transportsystem, welches sowohl der Versorgung der Organe mit Sauerstoff, Nährstoffen und Botenstoffen, als auch der Entsorgung von Stoffwechselendprodukten und Kohlendioxid dient. Blutgefäße, welche für den Transport des Blutes verantwortlich sind, sind Hohlorgane, welche aus mindestens einer, in der Regel aber aus drei Schichten (**Abb. 1**) bestehen und einen Hohlraum, das sogenannte Lumen, einschließen. Die äußerste Schicht oder *Tunica adventitia* enthält Kollagen und dient der Verankerung des Blutgefäßes mit dem umliegenden Gewebe und der Versorgung der Zellen des Blutgefäßes selbst. Die *Tunica media* oder mittlere Schicht enthält glatte Muskelzellen, welche den Innendurchmesser des Gefäßes regulieren können. Die innerste Schicht oder *Tunica intima* besteht aus Endothelzellen, welche das Lumen auskleiden (2).

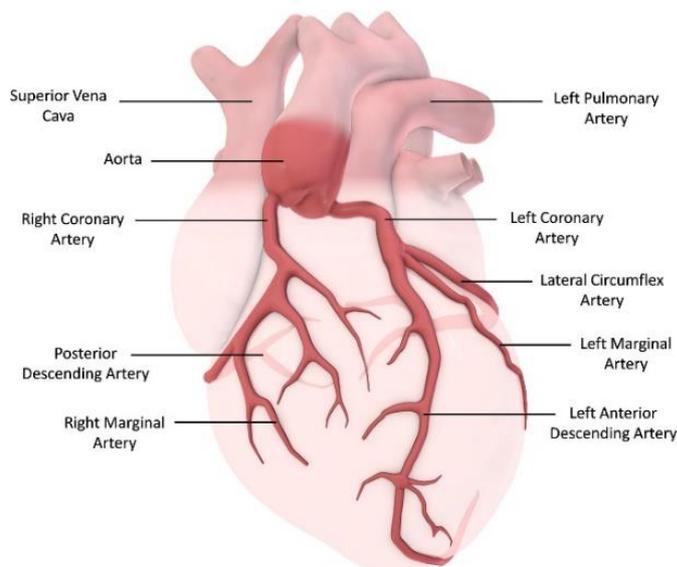


**Abb. 1:** Schematischer Aufbau eines Blutgefäßes (3)

Das Gefäßsystem besteht aus verschiedenen Arten von Blutgefäßen. Aus dem Herzen entspringt die Aorta, welche sich weiter in die Arterien und Arteriolen aufteilt. Diese transportieren sauerstoffreiches Blut und zweigen sich weiter in die Kapillaren auf. In diesen dünnwandigen Gefäßen findet der Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe statt. Die Kapillargefäße gehen anschließend in die Venolen und Venen über, welche sauerstoffarmes Blut zurück zum Herzen transportieren (4). Vom Herzen ausgehend wird desoxygeniertes Blut über den *Truncus pulmonalis* und die Lungenarterien den Kapillaren der Lunge zugeführt. Anschließend erfolgt in den Lungenalveolen der Gasaustausch und sauerstoffreiches Blut wird über die Lungenvenen zum Herzen zurücktransportiert (5).

### 1.1.1 Koronararterien

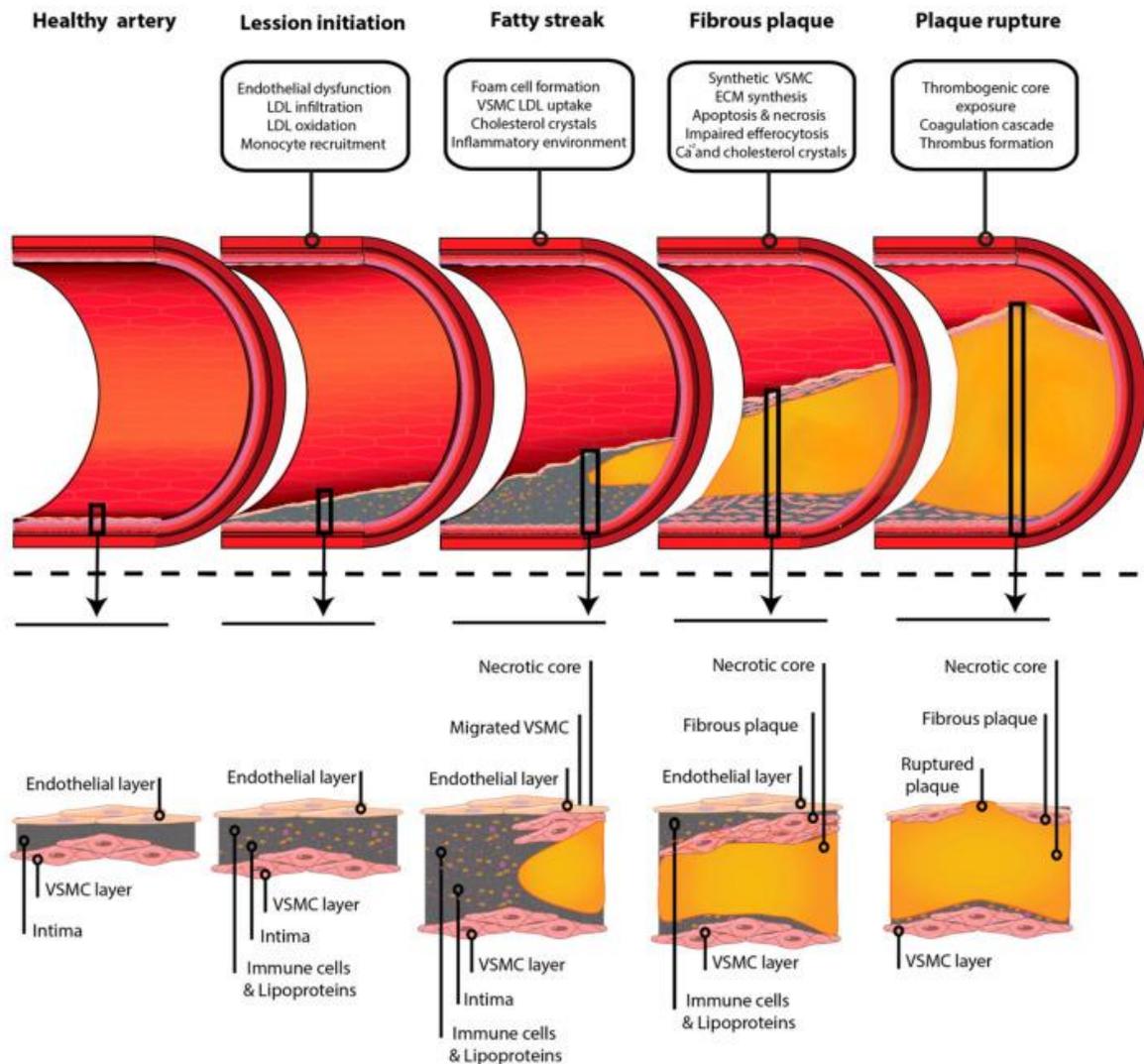
Das Herz selbst wird durch die Koronararterien, welche entlang des *sulcus conorarius* verlaufen, versorgt (**Abb. 2**). Aus der Aorta entspringen zwei primäre Koronararterien, die *Arteria coronaria sinistra* und die *Arteria coronaria dextra*. Diese zweigen sich in ihrem Verlauf in weitere kleine Äste ab. Die rechten Herzkranzgefäße versorgen den rechten Vorhof und Ventrikel, und die linken Herzkranzgefäße den linken Vorhof und die linke Herzkammer (6).



**Abb. 2:** Anatomie der Koronararterien (7)

## 1.2 Gefäßverkalkungen

Obwohl der Begriff Atherosklerose häufig als Synonym für Arteriosklerose verwendet wird, handelt es sich bei der Arteriosklerose um einen Sammelbegriff für arterielle Erkrankungen. Die Atherosklerose ist eine Form der Arteriosklerose (8) bei welcher es durch die Bildung von atherosklerotischen Plaques zu einer arteriellen Obstruktion und Ruptur der Plaques kommen kann (9). Die Entstehung atherosklerotischer Plaques setzt sich aus verschiedenen Stadien zusammen (**Abb. 3**) und beginnt ausgehend von einer endothelialen Dysfunktion gefolgt von einer Ansammlung von Plasmalipoproteinen in der *Tunica intima*, einer dadurch ausgelösten Entzündungsreaktion und der Einwanderung von Makrophagen (10). In der Fettstreifen-Phase nehmen Makrophagen Lipide auf und differenzieren sich zu Schaumzellen. Vaskuläre glatte Muskelzellen sind keine ausdifferenzierten Zellen und können sich auf Grund von physiologischen und pathologischen Einflüssen durch einen Phänotypwechsel zu Schaumzell-ähnlichen Zellen differenzieren (11). Während der Bildung des fibrinösen Plaques kommt es zu einer Einwanderung von glatten Gefäßmuskelzellen in die *Tunica intima*, welche einen synthetischen Phänotyp aufweisen. Sie zeichnen sich durch eine verringerte Expression von kontraktilen Proteinen und eine erhöhte Bildung von extrazellulärer Matrix Proteine aus. Sie bilden eine fasrige Kappe als Schutz um den nekrotischen Kern (12). Mit der Entwicklung der atherosklerotischen Plaques nimmt auch das Wachstum des nekrotischen Kerns auf Grund von absterbenden Makrophagen und der Hemmung der Efferozytose zu (13). Durch Apoptose, Nekrose und oxidativen Stress kann es zur Differenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen kommen, was zu einer Verkalkung der Plaques durch Ablagerung von Hydroxylapatit führt. Infolgedessen wird die Stabilität der Arterienwand reduziert und die Möglichkeit einer Plaqueruptur erhöht (9). Im Falle einer Ruptur wird die Gerinnungskaskade ausgelöst und ein Thrombus bildet sich. Zu den daraus resultierenden klinischen Komplikationen zählen Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt und Schlaganfall infolge einer Arterienverengung, oder die Entstehung eines Embolus, welcher durch Ablösung des Thrombus in der Blutbahn zirkuliert und den Blutfluss an einer anderen Stelle im Blutgefäßsystem blockiert (13).



**Abb. 3:** Entstehung und Progression eines atherosklerotischen Plaques (13). ECM extrazelluläre Matrix, LDL Low Density Lipoprotein, VSMC glatte Gefäßmuskulatur (vascular smooth muscle cells)

Eine weitere Form der Arteriosklerose ist die Verkalkung der *Tunica media*. Im Gegensatz zur Arteriosklerose kann sie ohne entzündliche Prozesse und Lipidansammlungen entstehen. Glatte Gefäßmuskulaturzellen reagieren auf osteogene Reize und differenzieren sich durch Änderung ihres Phänotyps zu Osteoblasten-ähnlichen Zellen. Als Ursache gelten unter anderem genetische Störungen, Urämie oder Seneszenz. Die mediale Gefäßverkalkung führt zu einer Steifheit des Blutgefäßes und Bluthochdruck, was zu einer Herzinsuffizienz führen kann. (9)

### 1.3 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Toll-like Rezeptoren gehören zu den Mustererkennungsrezeptoren (PRR, pattern recognition receptors) und sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen sowohl Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP, pathogen-associated molecular patterns), als auch Schaden-assoziierte molekulare Muster (DAMP, damage-associated molecular Patterns), welche aus Gewebeschäden oder Nekrose resultieren. Nach Bindung ihrer Liganden lösen TLR durch verschiedene Signalwege eine Immunreaktion aus (14).

Das Toll-Protein wurde erstmals bei *Drosophila melanogaster* beschrieben und bis heute wurden zehn humane und 13 murine TLR identifiziert (15). Je nach Lokalisation kann man extrazelluläre und intrazelluläre TLRs unterscheiden (**Abb. 4**): TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR 10 werden auf der Zelloberfläche exprimiert, während TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 im Cytoplasma lokalisiert sind (16). Die Expression von TLR ist nicht nur auf Immunzellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen beschränkt, sie werden auch von Nichtimmunzellen wie Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen exprimiert (17,18).

#### 1.3.1 Exogene Liganden

TLRs liegen Großteils als Homodimere vor, manche von ihnen sind jedoch Heterodimere.

TLR1: bildet zusammen mit TLR2 ein Heterodimer, um Triacyl-Lipopeptide von gramnegativen Bakterien zu erkennen (19).

TLR2: kann mit TLR1 oder TLR6 Heterodimere bilden, um Lipopeptide zu erkennen. Dieser Rezeptor kann jedoch auch eigenständig fungieren und andere PAMPs, ua. Peptidoglykan, registrieren (19).

TLR3: erkennt doppelsträngige RNA (dsRNA). Studien haben gezeigt, dass TLR3 auch mit small interfering RNA (siRNA) interagieren kann (20).

TLR4: erkennt u.a. Lipopolysaccharide (LPS) und Lipoteichonsäure (LTA) (19).

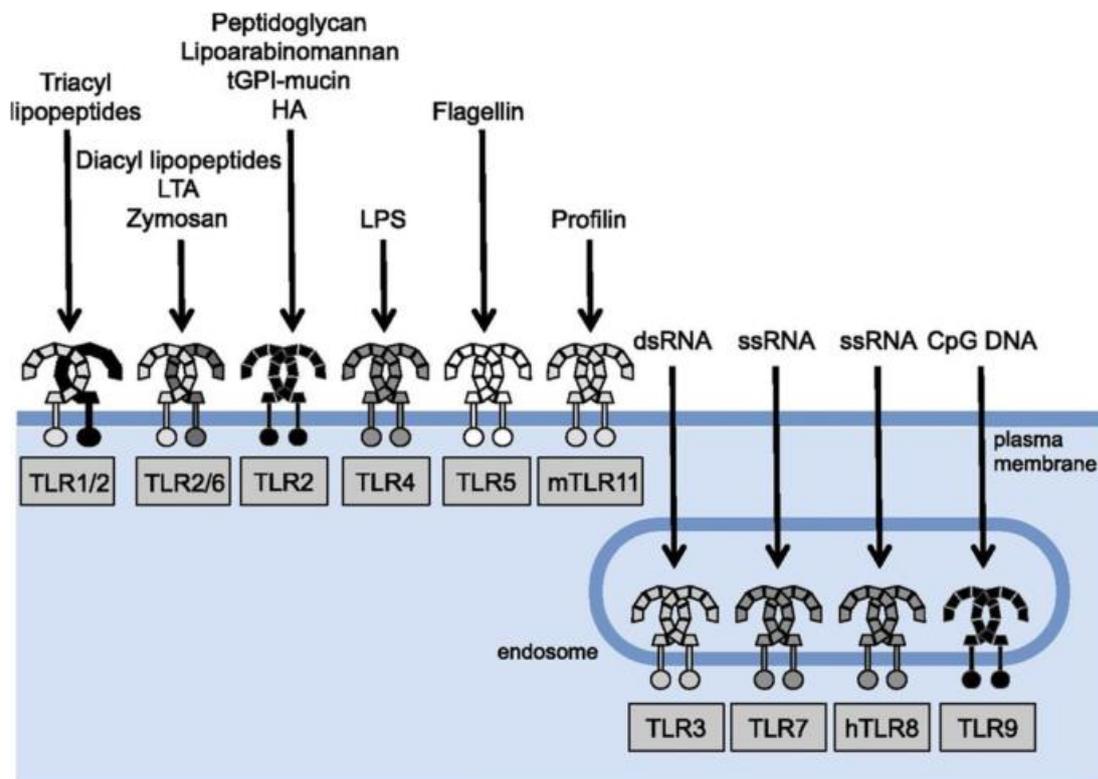
TLR5: registriert Flagellin, ein Protein, welches in den Flagellen von Bakterien vorkommt, mit Hilfe derer sie sich bewegen (21).

TLR6: bildet mit TLR2 ein Heterodimer, um Diacyl-Lipopeptide von grampositiven Bakterien zu erkennen (19).

TLR7 und TLR8: erkennen einzelsträngige RNA (ssRNA) (19).

TLR9: erkennt nicht methylierte CpG reiche DNA-Motive (19).

TLR10: ist der bis jetzt am wenigsten erforschte Rezeptor der TLR-Familie. Verschiedene Studien kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen, in welchen dem Rezeptor teils proinflammatorische, als auch entzündungshemmende Eigenschaften zugeschrieben wurden (22).



**Abb. 4:** Exogene Liganden und Lokalisation der toll-like Rezeptoren (16). dsRNA doppelsträngige RNA, HA Hyaluronsäure, hTLR humaner toll-like Rezeptor, LTA Lipoteichonsäure, mTLR muriner toll-like Rezeptor, ssRNA einzelsträngige RNA, TLR toll like-Rezeptor

### 1.3.2 Endogene Liganden

TLR können auch von endogenen Liganden bzw. von DAMPs aktiviert werden. Zu ihnen u.a. zählen nekrotische oder apoptotische Zellen, Hitzeschockproteine (Hsp) und extrazelluläre Matrixkomponenten (23).

### 1.3.3 Signalwege

Nach Bindung des Liganden an einen toll-like Rezeptor werden Signalwege ausgelöst, die durch die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Typ-1-Interferonen eine Antwort des angeborenen Immunsystems auslösen. In weiterer Folge kommt es auch zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Zwei Adapterproteine sind bei den TLR-Signalwegen von besonderer Bedeutung: der Myeloid-Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) und das TIR-Domänen enthaltende Adapterprotein-induzierendes Interferon (TRIF) (24).

MyD88-abhängiger Signalweg: MyD88 bindet an den zytoplasmatischen Teil des aktivierten Rezeptors und bindet in weiterer Folge IL-1R-assozierte Kinasen (IRAKs). Die Bindung von IRAK 4 und IRAK 1/2 führt zur Bildung Myddomsoms. IRAK 1/2 bindet den TNF-Rezeptor-assozierten Faktor 6 (TRAF6), welcher nachgeschaltete Signalwege aktiviert. Zu diesen zählt der NF $\kappa$ B-Signalweg, der Interferon-Regulierungsfaktor (IRF) 5/7 und die MAP-Kinase-Kaskade (25).

MyD88-unabhängiger Signalweg: diese Signalkaskade wird von TLR3 und TLR4 genutzt. Doch im Gegensatz zu TLR4, welcher beide Signalwege verwenden kann, ist TLR3 auf den TRIF-abhängigen Signalweg angewiesen. Zunächst bindet der Ligand an den Rezeptor und das Adapterprotein TRIF bindet an den aktivierten Rezeptor. In weiterer Folge kommt es über die Aktivierung des TNF-Rezeptor-assozierten Faktors (TRAF3) und des Interferonregulierungsfaktors (IRF3) zur Produktion von Interferon (14).



In weiteren Studien wurde auch Flagellin als Ligand von TLR5 als Stimulator für die Migration von glatten Muskelzellen bei Arteriosklerose untersucht. Über die TLR5-Nox4-Kaskade wird Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) gebildet.  $H_2O_2$  aktiviert über den NF $\kappa$ B-Signalweg die Produktion von Interleukin-6 (IL-6), was eine Entzündungsreaktion auslöst. Weiters wird auch die Migration von glatten Muskelzellen über die Rac-JNK-Kaskade induziert. Beide Ereignisse tragen zur Bildung einer neointimalen Hyperplasie im Rahmen der Atherosklerose bei (29).

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Um ein besseres Verständnis für die Entstehung und Progression von Gefäßverkalkungen zu erlangen, auch im Hinblick auf Prävention und künftige therapeutische Ansätze, wurde in dieser Arbeit die Expression von toll-like Rezeptoren in vaskulären glatten Muskelzellen untersucht.

Folgende Hypothesen sollen in dieser Arbeit überprüft werden:

1. Verkalkte glatte Muskelzellen zeigen einen signifikanten Unterschied in der Expression von toll-like Rezeptoren im Vergleich zu nicht verkalkten Zellen.
2. Die Expression von toll-like Rezeptoren in kalzifizierten und nicht kalzifizierten glatten Muskelzellen wird durch Lipopolysaccharide signifikant beeinflusst.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Kulturmedium**

Primäre glatte Muskelzellen der humanen Koronararterie (HCASMC, Gibco, USA) wurden in Medium 199 HEPES (M199, Gibco, USA) kultiviert. Das Kulturmedium wurde zusätzlich mit 20 % fetalem Kälberserum (FBS, Gibco, USA) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep, Gibco, USA) angereichert.

#### **2.1.2 Auftauen kryokonservierter Zellen**

Die bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden in einem Wasserbad mit 37 °C zügig innerhalb weniger Minuten aufgetaut. Dimethylsulfoxid (DMSO) besitzt bei Raumtemperatur zytotoxische Eigenschaften und wirkt als Zellgift. Um das enthaltene DMSO zu entfernen wurden die Zellen in 10 ml M199 transferiert und für acht Minuten mit 1200 Umdrehungen pro Minute (U/min) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension in eine sterile Zellkulturflasche überführt. Zur vollständigen Entfernung des DMSO wurde am nächsten Tag ein Medienwechsel durchgeführt.

#### **2.1.3 Kultivierung der Zellen**

Die Zellen wurden in einem Inkubator (HeraCell, Thermo Fisher, Österreich) mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Um das Anhaften der Zellen an den Boden der Zellkulturflaschen zu gewährleisten, wurde die Handhabung der Flaschen auf ein Minimum reduziert. Die Morphologie und Konfluenz der Zellen wurde täglich lichtmikroskopisch beurteilt. Bis zum Umsetzen der Zellen wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt. Um eine Hemmung des Wachstums durch eine zu hohe Zelldichte zu vermeiden, wurden die Zellen vor Erreichung der vollständigen Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Boden der Zellkulturflasche einmal mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, Gibco, USA) gespült. Zum Loslösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurden diese für fünf Minuten in einer

Trypsin- Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Lösung (Gibco, USA) bei 37 °C inkubiert. Die gelösten Zellen wurden zusammen mit Medium in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und für acht Minuten mit 1200 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet mit frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in neue Kulturflaschen ausgesetzt.

#### **2.1.4 Einfrieren der Zellen**

Die Zellen wurden in der exponentiellen Phase ihres Wachstums eingefroren. Die einzelnen Schritte zur Gewinnung des Zellpellets entsprechen jenen aus Punkt 2.1.3 Kultivierung der Zellen. Anschließend wurde das Zellpellet mit M199 und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, USA) resuspendiert und in Kryoröhrchen (Nunc, USA) transferiert. Um das Entstehen von Eiskristallen zu vermeiden, wurden die Zellen zunächst für mindestens 24 Stunden bei -80 °C gekühlt, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

#### **2.1.5 Zellzählung**

Für die Auszählung der Zellen wurden 50 µl der Suspension, welche die gelösten Zellen enthielt, mit 50 µl Trypanblau-Lösung 0,4 % (Sigma, USA) gefärbt und anschließend mittels Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf, während lebende Zellen nicht angefärbt werden. Im Anschluss wurde die Gesamtzellzahl wie folgt berechnet:

Gesamtzellzahl = Mittelwert ausgezählter Zellen \* Verdünnungsfaktor \* Volumen in ml \* 10<sup>4</sup>

Weiters wurde die Zellviabilität in Prozent berechnet:

Zellviabilität = (Lebende Zellen / Gesamte Zellen) \* 100

### 2.1.6 Kalzifizierung der Zellen

Um eine Kalzifizierung *in vitro* zu induzieren, wurden zwei Phosphatlösungen hergestellt, mit welchen die Zellen inkubiert wurden:

Anorganische Phosphatlösung (P1): 50 mM Natriumdihydrogenphosphat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) in PBS gelöst (Endkonzentration 2 mM)

Organische Phosphatlösung (P2): 10 mM  $\beta$ -Glycero-phosphat, 0,28 mM Ascorbinsäure, 10 nM Dexamethason in PBS gelöst

Zusätzlich wurden die Zellen für eine Stunde mit Lipopolysaccharid inkubiert:

Lipopolysaccharid (LPS, *Escherichia coli* O111:B4, Sigma, USA): 1 mg/ml (Endkonzentration 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

### 2.1.7 Fixierung der Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung und Untersuchung der Proteinexpression wurden HCASMC auf sterilen Glasplättchen in 24 Lochplatten (Corning Inc., USA) über sechs verschiedene Zeitpunkte hinweg kultiviert. Zur Fixierung der Zellen wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und 400  $\mu\text{l}$  Paraformaldehyd 4 % (PFA) pro Loch hinzugefügt. Anschließend wurden die Platten mit Folie verschlossen und bei 4 °C gelagert.

## 2.2 Zellfärbung

### 2.2.1 Immunfluoreszenzfärbung

Die fixierten Zellen wurden in einer 1x Tris-gepufferten Kochsalzlösung (TBS) gewaschen und anschließend für fünf Minuten mit Wasserstoffperoxid 3 % (Acros, USA) bei Raumtemperatur inkubiert, um die Aktivität der endogenen Peroxidase zu inhibieren. Zusätzlich wurden die Zellen für zehn Minuten mit einer Blockierungs-Lösung (2 % Pferdeserum, Vector Laboratories, USA), 1 % Bovines Serumalbumin (BSA, Sigma Aldrich, USA), 0,1 % Gelatine (Sigma Aldrich, USA), 0,1 % Triton X-100 (Sigma Aldrich, USA), 0,05 % Tween20 (Promega, USA), 0,01 M PBS) inkubiert, um unspezifische Bindungen während der Färbung zu vermeiden. Nach Auftragen der primären Antikörper wurden die Glasplättchen bei 4 °C über

Nacht inkubiert. Die Antikörper Smooth muscle actin, Desmin und Vimentin wurden zur Zellcharakterisierung und Kontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden die fixierten Zellen mit TBS anstelle eines primären Antikörpers inkubiert. Folgende primäre Antikörper wurden verwendet:

- Smooth muscle actin (SMA, Klon 1A4, Maus, monoklonaler Antikörper, Dako, Österreich), 1:50 mit TBS verdünnt
- Desmin (Klon D33, Maus, monoklonaler Antikörper, Dako, Österreich), 1:100 mit TBS verdünnt
- Vimentin (Klon V9, Maus, monoklonaler Antikörper, Dako, Österreich), 1:100 mit TBS verdünnt
- TLR 4 Antikörper (Klon 25, Maus, monoklonaler Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, USA), 1:100 mit TBS verdünnt
- TLR 6 polyklonaler Antikörper (Kaninchen, polyklonaler Antikörper, Bioss Antibodies, USA), 1:100 mit TBS verdünnt
- TLR 8 Antikörper (Klon D8, Maus, monoklonaler Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, USA), 1:100 mit TBS verdünnt
- TLR 9 Antikörper (Klon 26C593, Maus, monoklonaler Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, USA), 1:100 mit TBS verdünnt
- TLR 10 Antikörper (Klon 2A11, Maus, monoklonaler Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, USA), 1:50 mit TBS verdünnt

Am nächsten Tag wurde der sekundäre Antikörper (Anti-human-IgG, kreuzadsorbierter Sekundärantikörper, Ziege, Alexa Fluor 488, Thermo Fisher, USA, 1:50 mit TBS verdünnt) aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma, USA) gegengefärbt. Die Glasplättchen wurden auf Objektträgern mit einem Fluoreszenzschutz-Eindeckmedium (Dako, Österreich) eingebettet, mikroskopisch analysiert (Olympus BX60, Japan) und fotografiert (Nikon DN100, Japan) und mit der entsprechenden Software (Nuance 2.8.0) ausgewertet.

### **2.2.2 Alizarinrot-S-Färbung**

Zur Untersuchung von Kalkablagerungen als Reaktion auf osteogene Stimuli wurde eine Alizarinrot-S-Färbung durchgeführt. Kalziumphosphatreiche Plaques können mit dem roten kalziumbindenden Farbstoff Alizarinrot S sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden HCASMC für 14 Tage in einer 24 Lochplatte (Corning Inc., USA) kultiviert, wobei dreimal wöchentlich P1 oder P2 Puffer hinzugefügt wurde, um die Zellen zu kalzifizieren. Für die Färbung wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit gekühltem Methanol für 15 Minuten bei 4 °C fixiert. Nach Zugabe der Alizarinrot-S-Lösung (40 mM, pH = 4,1, in Extraktionspuffer (Essigsäure [w= 100 %, Merck, Deutschland], Ammoniumhydroxyd [NH<sub>4</sub>OH, w= 27 %, Sigma Aldrich, USA], Tween 20 [MP Biomedicals, USA] gelöst) wurde die Platte auf einem Thermomixer (Eppendorf, Deutschland) bei 300 U/min schüttelnd für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte mit destilliertem Wasser gespült, bis der überschüssige Farbstoff komplett entfernt wurde und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Zusätzlich wurde noch eine Gegenfärbung mit einer Hemacolor-Schnellfärbung durchgeführt.

### **2.2.3 Hemacolor-Schnellfärbung**

Zur Bestimmung der Zellzahl der Kontrolle und der mit P1 und P2 Puffer versetzten Zellen wurde eine Hemacolor-Schnellfärbung durchgeführt. Hierfür wurden HCASMC für drei Tage in einer 24 Lochplatte (Corning Inc., USA) kultiviert. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit gekühltem PBS gespült. Für die Färbung wurden drei Hemacolor-Lösungen (Merck, Deutschland) verwendet. Zunächst wurde die erste Lösung (Fixierlösung) aufgetragen, für 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend abgesaugt. Danach wurde die zweite Lösung (Eosin) gefolgt von der dritten Lösung (Methylenblau) aufgetragen und abgesaugt. Anschließend wurde die Platte mit destilliertem Wasser gespült und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die anschließende Zellzählung und Auswertung wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ durchgeführt.

### **2.3 Proliferationsanalyse**

Zur Beurteilung einer zytotoxischen Wirkung der verwendeten Phosphat-Puffer (P1 bzw. P2) auf die Zellen wurden Proliferationsanalysen mit Resazurin (Sigma-Aldrich, USA) durchgeführt. Resazurin selbst ist ein schwach fluoreszierender Farbstoff, jedoch entsteht bei dessen Reduktion in metabolisch aktiven Zellen das stark fluoreszierende Derivat Resorufin. Zytotoxische Stoffe hemmen das Redoxpotential der Zellen, was zu einer Verlangsamung oder Hemmung der Resorufin-Bildung führt. Für die verwendete Resazurin-Lösung wurde ein 30x Stock 1:66.6 mit PBS verdünnt woraus sich eine Ausgangskonzentration 0,18 mg/ml ergab. Für die Proliferationsanalyse wurden HCASMC in fünf 96 Lochplatten (Corning Inc., USA) in drei verschiedenen Zellkonzentrationen kultiviert. Jede Zellkonzentration wurde in Triplikaten bestehend aus unbehandelten, mit P1 Puffer inkubierten und mit P2 Puffer inkubierten Zellen angesetzt. Über den Zeitraum von fünf Tagen wurde täglich eine Platte mit Resazurin versetzt und gemessen. Hierfür wurde die Resazurin-Lösung mit dem Kulturmedium 1:10 verdünnt, was einer finalen Konzentration von 0,018 mg/ml entspricht. Für die Messung wurde zunächst das Medium aus den Platten vorsichtig abgesaugt, die verdünnte Resazurin-Lösung aufgetragen und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität mit einem Plattenlesegerät (VarioScan, Thermo Fisher, USA) gemessen.

### **2.4 Analyse auf RNA-Ebene**

#### **2.4.1 Behandlung der Zellen**

Für die RNA-Isolierung wurden zwei verschiedene Zellansätze hergestellt. Für den ersten Ansatz wurden HCASMC Kontrolle und mit P1 Puffer und P2 Puffer versetzt für 72 Stunden inkubiert. Für den zweiten Ansatz wurden die Zellen zusätzlich mit Lipopolysacchariden (LPS) inkubiert. Hierfür wurde ein LPS-Stock mit einer Konzentration von 1 mg/ml 1:25 mit serumfreiem Medium auf eine Konzentration von 40 µg/ml verdünnt. Diese LPS-Lösung wurde vor der Inkubation der Zellen mit Kultivierungsmedium 1:20 verdünnt, so dass die finale Konzentration 2 µg/ml pro Well betrug. Die Zellen wurden eine Stunde mit der LPS-Lösung inkubiert und anschließend die RNA extrahiert.

### 2.4.2 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der RNA wurde der FavorPrep™ Tissue Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen Biotech Corp., Taiwan) verwendet. Zunächst wurde das Medium abgesaugt, PBS hinzugefügt und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers losgelöst. Die gelösten Zellen wurden für acht Minuten mit 1200 U/min bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde mit 350 µl Lysepuffer (FARB-Puffer mit 1 % β- Mercaptoethanol) resuspendiert und für zwei Minuten mit 13.800 U/min durch eine Filtersäule filtriert. Dem Filtrat wurden 350 µl Ethanol 70 % hinzugefügt und gut gemischt. Die Probe wurde auf eine in einem Zentrifugenröhrchen befindliche Filtersäule aufgetragen und bei 13.800 U/min für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Filtersäule mit 500 µl Waschpuffer 1 mit 13.800 U/min für eine Minute gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen und die Filtersäule mit 750 µl Waschpuffer 2 mit 13.800 U/min für zwei Minuten gewaschen. Die Filtersäule wurde ein zweites Mal mit 750 µl Waschpuffer 2 gewaschen und anschließend bei 13.800 U/min für drei Minuten getrocknet. Für die Eluierung der RNA wurde die Filtersäule in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt, 30 µl RNase freies, doppelt destilliertes Wasser auf die Membran der Filtersäule aufgetragen und mit 13.800 U/min für zwei Minuten zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde photometrisch gemessen und bei -80 °C gelagert.

### 2.4.3 Quantifizierung der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch durch die Messung der Absorption in einer wässrigen Lösung im UV-Bereich von 260 und 280 Nanometer (nm) bestimmt. Eine Absorption von 1 bei 260 nm ( $A_{260}$ ) entspricht 40 µg/ml RNA. Daraus lässt sich die RNA-Konzentration wie folgt berechnen:

$$\text{RNA-Konzentration (}\mu\text{g/ml)} = A_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zur Bestimmung der Reinheit der RNA wurde der Quotient aus  $A_{260}/A_{280}$  ermittelt.

#### 2.4.4 Synthese der komplementären DNA (cDNA)

Für die reverse Transkription wurde ein Mastermix mit folgenden Komponenten vorbereitet (Tab. 1):

**Tab. 1:** Reverse Transkriptase Mastermix für eine Reaktion

Reagenz	Volumen
10x Reverse Transkriptase Puffer (Thermo Fisher, USA)	2 $\mu$ l
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, 100 mM, Thermo Fisher, USA)	0,8 $\mu$ l
Reverse Transkriptase Random Primer (Thermo Fisher, USA)	2 $\mu$ l
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (Thermo Fisher, USA)	1 $\mu$ l
Nuklease freies Wasser	4,2 $\mu$ l
Gesamt	10 $\mu$ l

Anschließend wurden 2  $\mu$ g RNA hinzugefügt. Für die Bindung des Primers an die RNA wurde der Reaktionsansatz für zehn Minuten bei 25 °C inkubiert, gefolgt von einer Inkubation bei 37 °C für zwei Stunden. Um die Enzymaktivität der Reversen Transkriptase zu stoppen wurde der Reaktionsansatz für fünf Minuten auf 85 °C erhitzt und anschließend bei 4 °C für zehn Minuten gekühlt. Die synthetisierte cDNA wurde im Anschluss daran für die quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) verwendet. Die restliche RNA wurde bei -80 °C gelagert.

### 2.4.5 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Zur Analyse der Expression von TLR im Zusammenhang mit Kalzifizierung und LPS-Behandlung wurden qPCRs durchgeführt. Für die qPCR wurde der GoTaq® qPCR Master Mix 2x (Promega, USA) verwendet. Dieser enthält einen dsDNA-bindenden Farbstoff, Carboxy-X-Rhodamin (CXR) Referenzfarbstoff, GoTaq® Hot Start Polymerase, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs und einen Reaktionspuffer. Dem Mastermix (**Tab. 2**) wurden Forward und Reverse Primer (Microsynth, Österreich) und Nuklease freies Wasser hinzugefügt (**Tab. 3**).

**Tab. 2:** qPCR Master Mix für eine Reaktion

Reagenz	Volumen
GoTaq® qPCR Master Mix 2x	12,5 µl
Forward Primer (10 pmol)	2,5 µl
Reverse Primer (10 pmol)	2,5µl
Nuklease freies Wasser	2,5µl
Gesamt	20µl

**Tab. 3:** Primer Sequenzen (qPCR)

Name	Primer 5' – 3' Sequenz	Tm	Länge	Acc. Nummer
GAPDH Human Forward	CCT GAA CAG TGT GGA TGA GAT G	62,1 °C	102 bp	NM_002046.5
GAPDH Human Reverse	GGA ATG GCT TCA AGG TAG TCT G	62,1 °C	102 bp	NM_002046.5
TLR 1 Human Forward	GGT CTC ATC CAC GTT CCT AAA G	62,2 °C	90 bp	NM_003263.4
TLR 1 Human Reverse	GTC AGA AGT CCA AAG CTC AGA TA	61,9 °C	90 bp	NM_003263.4
TLR 2 Human Forward	CCT ACT GGG TGG AGA ACC TTA T	62,8 °C	90 bp	NM_001318789.2
TLR 2 Human Reverse	CAGGAA TGA AGT CCC GCT TAT G	62,8 °C	90 bp	NM_001318789.2
TLR 3 Human Forward	CCC TGG TGG TCC CAT TTA TTT	62,4 °C	91 bp	NM_003265.3
TLR 3 Human Reverse	CTC AAC TGG GAT CTC GTC AAA G	62,4 °C	91 bp	NM_003265.3
TLR 4 Human Forward	GAT GAG GAC TGG GTA AGG AAT G	61,8 °C	102 bp	NM_138554.5
TLR 4 Human Reverse	GGC CAC ACC GGG AAT AAA	61,9 °C	102 bp	NM_003266.4
TLR 5 Human Forward	GGG TTT CCC TCT TCT CTC TTT C	61,9 °C	102 bp	NM_003268.6

TLR 5 Human Reverse	GAG TCA GAG TGA CAG TGC ATA C	62,0 °C	102 bp	NM_003268.6
TLR 6 Human Forward	CTG CAC TTG GGT TGA GAG TAT AG	62,2 °C	93 bp	NM_006068.5
TLR 6 Human Reverse	ACC TTG ATC CTG GGA GGT AA	62,2 °C	93 bp	NM_001394553.1
TLR 7 Human Forward	GAG GAC TCC AAG AGT GTG TAT TT	61,9 °C	115 bp	NM_016562.4
TLR 7 Human Reverse	CTT TGG TTT CTT CTC CCA TCC T	62,2 °C	115 bp	NM_016562.4
TLR 8 Human Forward	GCT ACA GGT CTC TTT CCA CAT C	62,2 °C	107 bp	NM_138636.5
TLR 8 Human Reverse	GTG GTA GCG CAG CTC ATT TA	62,4°C	107 bp	NM_013310.4
TLR 9 Human Forward	CCA CCC TGG AAG AGC TAA AC	62,0 °C	80 bp	NM_017442.4
TLR 9 Human Reverse	GGA CAG GGA TAT GAG GGA TTT G	61,9 °C	80 bp	NM_017442.4
TLR 10 Human Forward	TTG CAT TCC CAC CAG GTA TC	62,0 °C	90 bp	NM_030956.4
TLR 10 Human Reverse	AGC CCA CAT TTA CGC CTA TC	62,0 °C	90 bp	NM_001017388.3

Die synthetisierte cDNA wurde 1:5 mit Nuklease freiem Wasser verdünnt, 5 µl in jedes Well der PCR-Platte (Starlab, Deutschland) vorgelegt und 20 µl des Mastermixes hinzugefügt. Jede Probe wurde im Triplikate pipettiert. Die Platte wurde mit einem Klebefilm verschlossen, abzentrifugiert und in einem 7500 Real Time PCR Cycler (Applied Biosystems, USA) analysiert. Für diesen Versuch wurde die qPCR mit 50 Zyklen durchgeführt (**Tab. 4**).

**Tab. 4:** Programm Thermocycler (7500 Real Time PCR)

	Temperatur	Dauer
Aufwärmphase	50 °C	2 Minuten
Denaturierung	95 °C	10 Minuten
Cycling Stage	95 °C	15 Sekunden
	62 °C	1 Minute
Analyse der Schmelzkurve	95 °C	15 Sekunden
	60 °C	1 Minute
	95 °C	30 Sekunden
	60 °C	15 Sekunden

#### 2.4.6 Statistische Analyse

Alle Experimente wurden im Triplikate durchgeführt. Für die Auswertung der qPCR-Daten wurde die Delta-Delta-Ct-Methode ( $\Delta\Delta\text{-Ct}$ ) verwendet. Zunächst wurden die Werte aus den drei Experimenten gemittelt und für jede Probe der Delta-Ct ( $\Delta\text{-Ct}$ ) berechnet:

$$\Delta\text{-Ct} = \text{Ct (untersuchter Rezeptor)} - \text{Ct (Referenzgen)}$$

Anschließend wurde der  $\Delta\Delta\text{-Ct}$  für jede Probe berechnet:

$$\Delta\Delta\text{-Ct} = \Delta\text{Ct (untersuchter Rezeptor inkubiert)} - \Delta\text{Ct (untersuchter Rezeptor Kontrolle)}$$

Im Anschluss wurde die Fold-Genexpression berechnet:

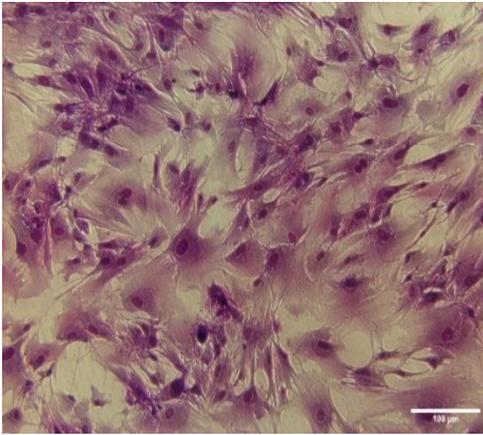
$$\text{Fold-Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta\text{-Ct}}$$

Die daraus resultierenden Daten wurden mit einem student t-Test oder mit einer nicht-parametrischen Gruppenstatistik (one-way Anova inklusive Bonferoni post-hoc-Test) überprüft. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

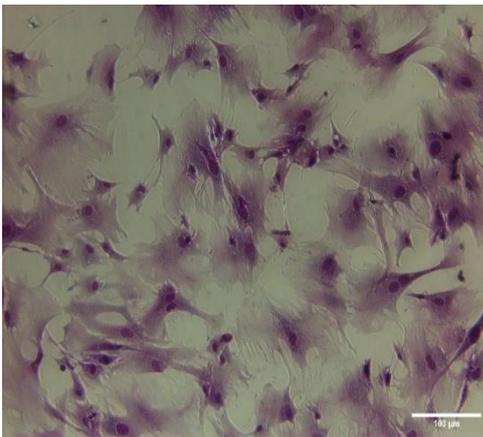
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Morphologie und Zellzahl

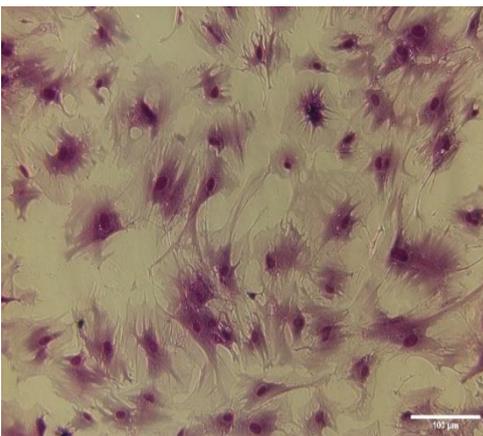
##### Kontrolle



##### P1 Puffer



##### P2 Puffer

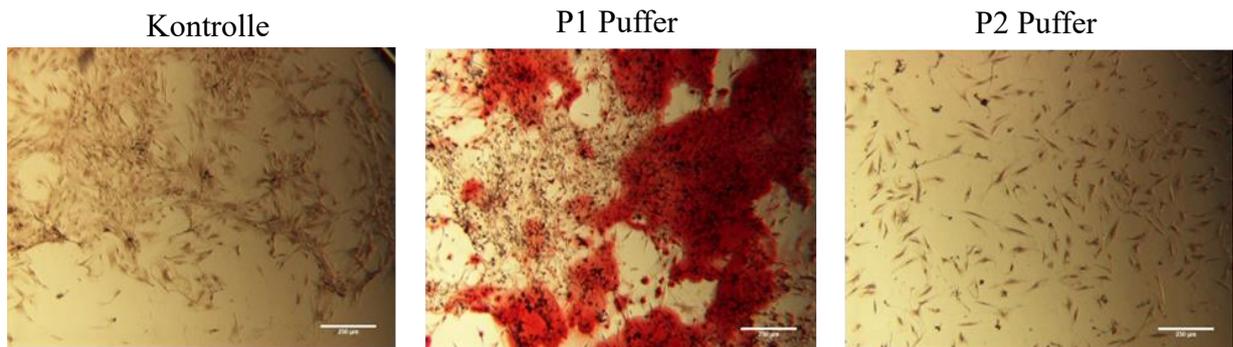


Zur Beurteilung der Morphologie und Zellzahl wurde wie unter 2.2.3 beschrieben eine Hemacolor-Schnellfärbung durchgeführt. Die glatten Muskelzellen der Kontrolle sind morphologisch betrachtet spindelförmig mit einem zentral gelegenen Zellkern. Nach der Inkubation mit P1 und P2 Puffer konnte lichtmikroskopisch eine Änderung im Aussehen der Zellen festgestellt werden. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen wirken sie rundlich, aufgequollen und sind deutlicher voneinander abgrenzbar (**Abb. 6**).

Eine Zellzählung mittels dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ ergab weiters, dass durch die Inkubation mit den Phosphatpuffern die Zellzahl reduziert wurde. Im Vergleich zur Kontrolle hat sich die Zahl der mit P1 Puffer inkubierten Zellen um 14 % und der mit P2 Puffern inkubierten Zellen um 49 % verringert.

**Abb. 6:** Morphologie der Inkubierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Messkala beträgt 100 µm.

Zum Nachweis von Kalkablagerungen wurde entsprechend 2.2.2 eine Alizarinrot-S-Färbung durchgeführt. Hier können bei der Kontrolle und den mit P2 Puffer versetzten Zellen keine Verfärbungen nachgewiesen werden. Bei den mit P1 Puffer inkubierten Zellen können die phosphatreichen Plaques deutlich durch den kalziumbindenden Farbstoff sichtbar gemacht werden (**Abb. 7**)



**Abb. 7:** Alizarinrot-S-Färbung zum Nachweis von phosphathaltigen Plaques. Die Messskala beträgt 250 µm.

### 3.2 Proliferationsansatz

HCASMC sind kontaktinhibierte Zellen, ihr Wachstum nimmt bei einer zu hohen Zelldichte ab. Daher wurde mittels einer Resazurinmessung bestimmt, welche eingesetzte Zellzahl zu welchem Zeitpunkt die höchste Proliferation aufweist. Anhand dieser Daten wurde der optimale Zeitpunkt für die Experimente ausgewählt.

Aus den Messungen resultiert, dass bei allen eingesetzten Zellzahlen, unabhängig davon, ob sie mit oder ohne Phosphatpuffern inkubiert waren, dass die Proliferation an Tag drei am höchsten ist. Weiters ergab die Proliferationsanalyse an Tag vier bei den Zellkonzentrationen  $5 \times 10^3$  und  $1 \times 10^4$  Zellen/Well, dass die Fluoreszenzintensität bei den mit P1 und P2 Puffern inkubierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert ist. Zwischen den mit Phosphatpuffern inkubierten Zellen gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz. Sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den mit P1 und P2 Puffer inkubierten Zellen ist die Fluoreszenzintensität bei einer Zellkonzentration von  $1 \times 10^4$  Zellen/Well signifikant höher als bei  $5 \times 10^3$  Zellen/Well.

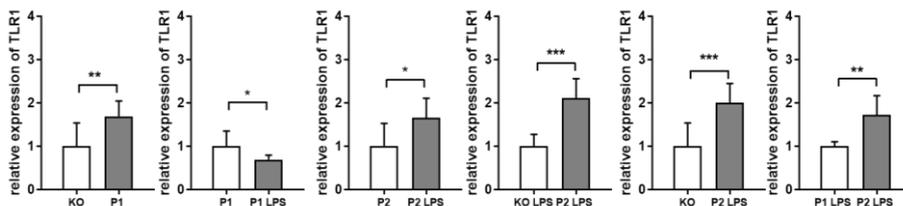
### 3.3 qPCR

Die Analyse der toll-like Rezeptoren auf RNA-Ebene wurde mittels qPCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob Kalzifizierung und LPS-Inkubation einen Einfluss auf die Genexpression haben.

TLR1: Der höchste Anstieg in der TLR1 RNA-Expression konnte durch Zugabe des P2 Puffer und LPS (2.0-facher Anstieg) detektiert werden. Eine Inkubation mit P1 Puffer zeigte eine Erhöhung (1.69-fach) in Vergleich zur Kontrolle (KO), während eine Inkubation P1 Puffer zusammen mit LPS eine Verringerung der Expression (0.69-fach) bei den glatten Muskelzellen zeigte. (Tab. 5 und Abb. 8).

**Tab. 5:** Expression von TLR1 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.

Bezug	Vergleich	Fold-Genexpression ( $\Delta\Delta\text{-Ct}^2$ )	p-Werte
KO	P1	1.69	0.0064
KO	P2	1.21	0.4286
P1	P2	0.71	0.1879
P1	P1 LPS	0.69	0.0322
P2	P2 LPS	1.66	0.0111
KO LPS	P1 LPS	1.23	0.0834
KO LPS	P2 LPS	2.11	0.0001
KO	KO LPS	0.95	0.8394
KO	P1 LPS	1.16	0.4359
KO	P2 LPS	2.0	0.0008
P1 LPS	P2 LPS	1.72	0.0011

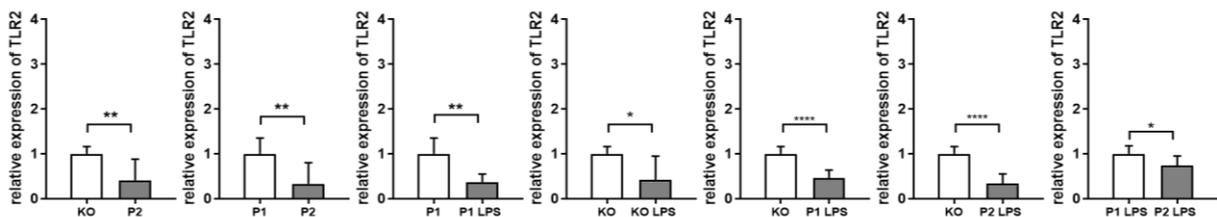


**Abb. 8:** Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus Tab. 5. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ . Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD, standard deviation) wieder.

**TLR2:** In HCASMC kommt es zu einer Verringerung der Expression von TLR2 durch die Zugabe von P2 Puffer (0.41-fach) und LPS (0.42-fach). Auch in Kombination führen P2 Puffer und LPS zu einer Verringerung der TLR2 RNA-Expression (0.34-fach). P1 Phosphatpuffer hat keinen signifikanten Einfluss auf die RNA-Expression von TLR 2 (1.24-fach) (**Tab. 6 und Abb. 9**).

**Tab. 6:** Expression von TLR2 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.

Bezug	Vergleich	Fold-Genexpression ( $\Delta\Delta\text{-Ct2}$ )	p-Werte
KO	P1	1.24	0.0908
KO	P2	0.41	0.0056
P1	P2	0.33	0.0037
P1	P1 LPS	0.37	0.0015
P2	P2 LPS	0.84	0.3757
KO LPS	P1 LPS	1.12	0.5446
KO LPS	P2 LPS	0.82	0.3660
KO	KO LPS	0.42	0.0112
KO	P1 LPS	0.46	< 0.0001
KO	P2 LPS	0.34	< 0.0001
P1 LPS	P2 LPS	0.74	0.0294

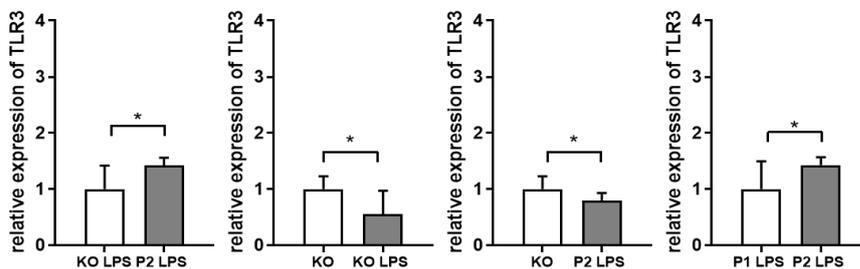


**Abb. 9:** Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus **Tab. 6**. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder.

**TLR3:** Durch die Zugabe beider Phosphatpuffer (P1 und P2 Puffer) kommt es zu keiner signifikanten Änderung in der Genexpression von TLR 3 (0.68-fach). Die Zugabe von P2 Puffer in Verbindung mit LPS bewirkt eine Erhöhung der TL3 RNA-Expression (1.42-fach) in den Zellen, jedoch sinkt die TL3 RNA-Expression (0.79-fach) im Vergleich mit den Kontrollzellen. Ebenso ist die Expression von TLR3 in Zellen, welche mit LPS inkubiert wurden im Vergleich mit den Kontrollzellen verringert (0.55-fach) (**Tab. 7 und Abb. 10**).

**Tab. 7:** Expression von TLR3 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.

Bezug	Vergleich	Fold-Genexpression ( $\Delta\Delta\text{-Ct}^2$ )	p-Werte
KO	P1	0.68	0.0809
KO	P2	0.68	0.0847
P1	P2	1.0	> 0.9999
P1	P1 LPS	0.80	0.3457
P2	P2 LPS	1.15	0.3443
KO LPS	P1 LPS	0.99	0.9666
KO LPS	P2 LPS	1.42	0.0390
KO	KO LPS	0.55	0.0399
KO	P1 LPS	0.55	0.0601
KO	P2 LPS	0.79	0.0443
P1 LPS	P2 LPS	1.43	0.0332

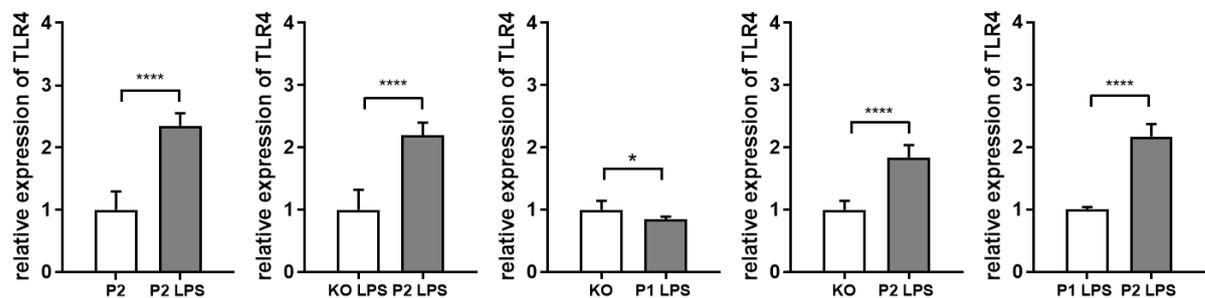


**Abb. 10:** Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus **Tab. 7**. \*= $p < 0.05$ . Fehlerbalken geben die SD wieder.

**TLR4:** Die Zugabe der Phosphatpuffer P1 und P2 bewirkt keine signifikante Änderung in der Genexpression von TLR4 in glatten Muskelzellen (0.91-fach bzw. 0.71-fach). Auch die Inkubation mit LPS führt zu keiner signifikanten Änderung der TLR4 Expression (0.84-fach). Die Kombination aus P2 Puffer und LPS führt jedoch zu einem Anstieg der TLR4-Expression (1.84-fach), während die Inkubation mit P1 Puffer und LPS zu einer Reduzierung der Genexpression (0.85-fach) verglichen mit der Kontrolle führt (**Tab. 8 und Abb. 11**).

**Tab. 8:** Expression von TLR4 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.

Bezug	Vergleich	Fold-Genexpression ( $\Delta\Delta\text{-Ct}^2$ )	p-Werte
KO	P1	0.91	0.5006
KO	P2	0.71	0.0883
P1	P2	0.86	0.4454
P1	P1 LPS	0.93	0.5787
P2	P2 LPS	2.35	< 0.0001
KO LPS	P1 LPS	1.01	0.9289
KO LPS	P2 LPS	2.20	< 0.0001
KO	KO LPS	0.84	0.2001
KO	P1 LPS	0.85	0.0141
KO	P2 LPS	1.84	< 0.0001
P1 LPS	P2 LPS	2.17	< 0.0001

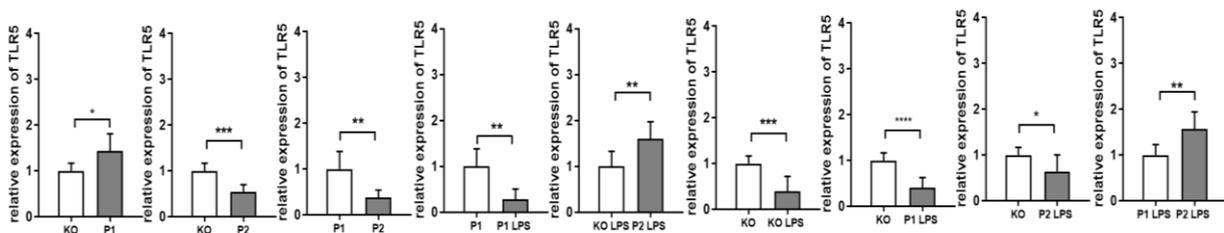


**Abb. 11:** Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus **Tab. 8**. \*= $p < 0.05$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder.

**TLR5:** Die Expression von TLR5 ist durch die Zugabe des P1 Puffers gestiegen (1.43-fach), während sie durch die Inkubation mit P2 im Vergleich zur Kontrolle gesunken ist (0.54-fach). Durch die Inkubation mit LPS ist die Expression von TLR5 verglichen mit der Kontrolle verringert (0.39-fach). Die Kombination aus Phosphatpuffer und LPS führt ebenfalls zu einer Reduzierung der Genexpression (0.40-fach bzw. 0.63-fach). In der Gruppe der mit LPS behandelten Zellen führt die zusätzliche Inkubation mit P2 Puffer zu einem Anstieg der Genexpression (1.60-fach) (**Tab. 9 und Abb. 12**).

**Tab. 9:** Expression von TLR5 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.

Bezug	Vergleich	Fold-Genexpression ( $\Delta\Delta\text{-Ct}^2$ )	p-Werte
KO	P1	1.43	0.0104
KO	P2	0.54	0.0001
P1	P2	0.38	0.0026
P1	P1 LPS	0.28	0.0012
P2	P2 LPS	1.16	0.3449
KO LPS	P1 LPS	1.02	0.9055
KO LPS	P2 LPS	1.60	0.0072
KO	KO LPS	0.39	0.0004
KO	P1 LPS	0.40	< 0.0001
KO	P2 LPS	0.63	0.0200
P1 LPS	P2 LPS	1.57	0.0054

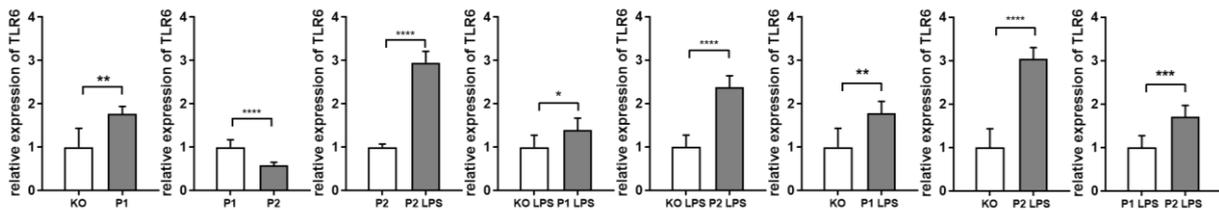


**Abb. 12:** Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus **Tab. 9**. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder.

**TLR6:** Die Inkubation mit P1 Puffer bewirkt eine Erhöhung der Genexpression von TLR6 (1.77-fach), während es durch die Zugabe von P2 Puffern zu keiner signifikanten Änderung kommt (1.03-fach). Die alleinige Zugabe von LPS bewirkt ebenfalls keine signifikante Veränderung in der Genexpression (1.28-fach), allerdings wird sie durch zusätzliche Inkubation mit den Phosphatpuffern P1 und P2 erhöht (1.78-fach bzw. 3.04-fach) (**Tab. 10 und Abb. 13**).

**Tab. 10:** Expression von TLR6 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.

Bezug	Vergleich	Fold-Genexpression ( $\Delta\Delta\text{-Ct}^2$ )	p-Werte
KO	P1	1.77	0.0060
KO	P2	1.03	0.8735
P1	P2	0.58	< 0.0001
P1	P1 LPS	1.0	> 0.999
P2	P2 LPS	2.95	< 0.0001
KO LPS	P1 LPS	1.39	0.0184
KO LPS	P2 LPS	2.38	< 0.0001
KO	KO LPS	1.28	0.1471
KO	P1 LPS	1.78	0.0040
KO	P2 LPS	3.04	< 0.0001
P1 LPS	P2 LPS	1.71	0.0002

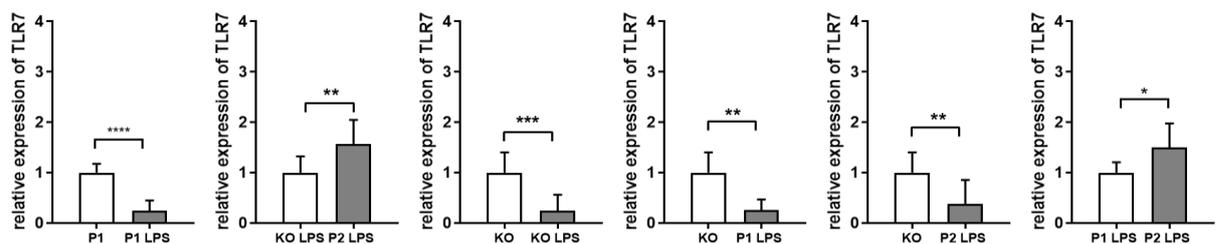


**Abb. 13:** Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus **Tab. 10**. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder.

TLR7: Die Zugabe von P1 und P2 Phosphatpuffer bewirkt keinen signifikanten Unterschied in der Genexpression (1.08-fach bzw. 0.74-fach). Durch die Inkubation mit LPS wird die Expression von TLR7 im Vergleich zu den nicht mit LPS inkubierten Zellen verringert (0.24-fach). In der Gruppe der mit LPS inkubierten Zellen steigt mit der Zugabe von P2 Puffer die Genexpression signifikant an (1.57-fach) (**Tab. 11 und Abb. 14**).

**Tab. 11:** Expression von TLR7 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.

Bezug	Vergleich	Fold-Genexpression ( $\Delta\Delta\text{-Ct}^2$ )	p-Werte
KO	P1	1.08	0.6348
KO	P2	0.74	0.2815
P1	P2	0.68	0.1691
P1	P1 LPS	0.24	< 0.0001
P2	P2 LPS	0.52	0.0774
KO LPS	P1 LPS	1.05	0.7435
KO LPS	P2 LPS	1.57	0.0092
KO	KO LPS	0.24	0.0004
KO	P1 LPS	0.26	0.0012
KO	P2 LPS	0.38	0.0091
P1 LPS	P2 LPS	1.50	0.0327

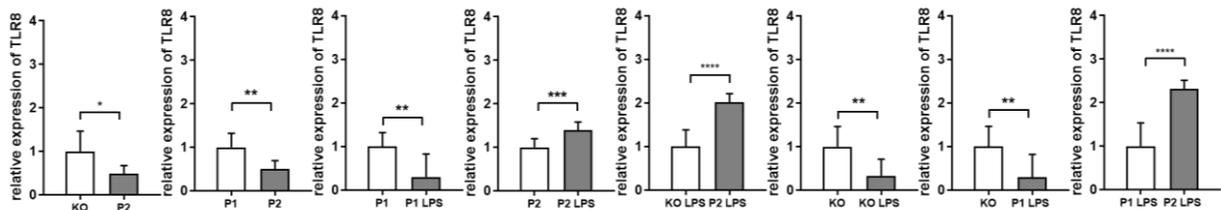


**Abb. 14:** Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus **Tab. 11**. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder.

**TLR8:** P2 Puffer führt zu einer verringerten Genexpression von TLR8 (0.48-fach), während es durch P1 Puffer zu keinen signifikanten Änderungen kommt (0.98-fach). Die Zugabe von LPS verringert die Expression von TLR8 (0.33-fach), auch in Verbindung mit P1 Puffer (0.29-fach). P2 Puffer hingegen führt zu einer Erhöhung der Genexpression in mit LPS inkubierten Zellen (2.02-fach) (**Tab. 12 und Abb. 15**).

**Tab. 12:** Expression von TLR8 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.

Bezug	Vergleich	Fold-Genexpression ( $\Delta\Delta\text{-Ct}^2$ )	p-Werte
KO	P1	0.98	0.9168
KO	P2	0.48	0.0106
P1	P2	0.50	0.0010
P1	P1 LPS	0.30	0.0038
P2	P2 LPS	1.39	0.0006
KO LPS	P1 LPS	0.87	0.5607
KO LPS	P2 LPS	2.02	< 0.0001
KO	KO LPS	0.33	0.0042
KO	P1 LPS	0.29	0.0083
KO	P2 LPS	0.67	0.0758
P1 LPS	P2 LPS	2.32	< 0.0001

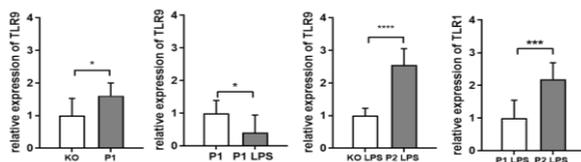


**Abb. 15:** Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus **Tab. 12**. \*= $p < 0.05$ , \*\*= $p < 0.01$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder.

**TLR9:** Die Inkubation glatter Muskelzellen mit P1 Puffer bewirkt eine Erhöhung der Genexpression von TLR9 (1.61-fach), während es durch die Zugabe von P2 Puffern zu keiner signifikanten Änderung kommt (0.93-fach). Die alleinige Zugabe von LPS bewirkt ebenfalls keine Veränderung in der Genexpression (0.55-fach). Durch die Inkubation mit LPS und P1 Puffer kommt es zu einer Verringerung der Expression von TLR9 (0.40-fach) im Vergleich zur Inkubation mit P1 Puffer ohne LPS. Bei den mit LPS inkubierten Zellen kommt es durch die Zugabe von P2 Puffer zu einem Anstieg der Genexpression (2.55-fach) (**Tab. 13 und Abb. 16**).

**Tab. 13:** Expression von TLR9 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.

Bezug	Vergleich	Fold-Genexpression ( $\Delta\Delta\text{-Ct}^2$ )	p-Werte
KO	P1	1.61	0.0129
KO	P2	0.93	0.7822
P1	P2	0.58	0.0737
P1	P1 LPS	0.40	0.0163
P2	P2 LPS	1.50	0.0567
KO LPS	P1 LPS	1.16	0.5119
KO LPS	P2 LPS	2.55	< 0.0001
KO	KO LPS	0.55	0.0715
KO	P1 LPS	0.64	0.1732
KO	P2 LPS	1.39	0.1268
P1 LPS	P2 LPS	2.19	0.0002



**Abb. 16:** Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus **Tab. 13**. \*= $p < 0.05$ , \*\*\*= $p < 0.001$ , \*\*\*\*= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder.

**TLR10:** Für die Analyse der RNA-Expression von TLR10 in glatten Muskelzellen konnten durch die qPCR keine verwertbaren Daten für eine weitere statistische Auswertung gewonnen werden.

**Tab. 14:** Überblick über die Unterschiede der Expression von TLR in vaskulären glatten Muskelzellen mittels der Fold-Genexpression ( $\Delta\Delta\text{-Ct}^2$ ). ns = nicht signifikant,  $\uparrow$  = Erhöhung der Genexpression,  $\downarrow$  = Verringerung der Genexpression

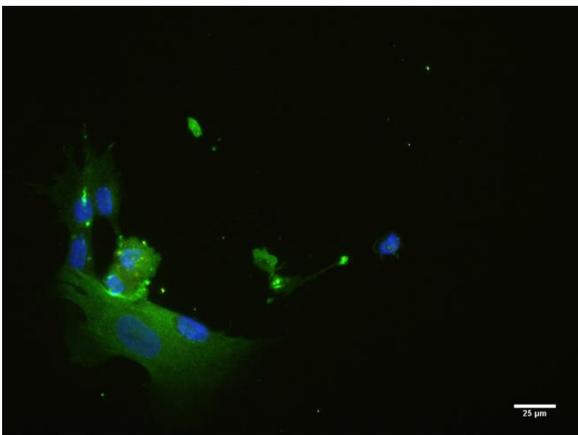
Bezug/ Vergleich	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9
KO/P1	$\uparrow$ (1.69)	ns (1.24)	ns (0.68)	ns (0.91)	$\uparrow$ (1.43)	$\uparrow$ (1.77)	ns (1.08)	ns (0.98)	$\uparrow$ (1.61)
KO/P2	ns (1.21)	$\downarrow$ (0.41)	ns (0.68)	ns (0.71)	$\downarrow$ (0.54)	ns (1.03)	ns (0.74)	$\downarrow$ (0.48)	ns (0.93)
P1/P2	ns (0.71)	$\downarrow$ (0.33)	ns (1.0)	ns (0.86)	$\downarrow$ (0.38)	$\downarrow$ (0.58)	ns (0.68)	$\downarrow$ (0.50)	ns (0.58)
P1/ P1 LPS	$\downarrow$ (0.69)	$\downarrow$ (0.37)	ns (0.80)	ns (0.93)	$\downarrow$ (0.28)	ns (1.0)	$\downarrow$ (0.24)	$\downarrow$ (0.30)	$\downarrow$ (0.40)
P2/ P2 LPS	$\uparrow$ (1.66)	ns (0.84)	ns (1.15)	$\uparrow$ (2.35)	ns (1.16)	$\uparrow$ (2.95)	ns (0.52)	$\uparrow$ (1.39)	ns (1.50)
KO LPS/ P1 LPS	ns (1.23)	ns (1.12)	ns (0.99)	ns (1.01)	ns (1.02)	$\uparrow$ (1.39)	ns (1.05)	ns (0.87)	ns (1.16)
KO LPS/ P2 LPS	$\uparrow$ (2.11)	ns (0.82)	$\uparrow$ (1.42)	$\uparrow$ (2.20)	$\uparrow$ (1.60)	$\uparrow$ (2.38)	$\uparrow$ (1.57)	$\uparrow$ (2.02)	$\uparrow$ (2.55)
KO/ KO LPS	ns (0.95)	$\downarrow$ (0.42)	$\downarrow$ (0.55)	ns (0.84)	$\downarrow$ (0.39)	ns (1.28)	$\downarrow$ (0.24)	$\downarrow$ (0.33)	ns (0.55)
KO/ P1 LPS	ns (1.16)	$\downarrow$ (0.46)	ns (0.55)	$\downarrow$ (0.85)	$\downarrow$ (0.40)	$\uparrow$ (1.78)	$\downarrow$ (0.26)	$\downarrow$ (0.29)	ns (0.64)
KO/ P2 LPS	$\uparrow$ (2.0)	$\downarrow$ (0.34)	$\downarrow$ (0.79)	$\uparrow$ (1.84)	$\downarrow$ (0.63)	$\uparrow$ (3.04)	$\downarrow$ (0.38)	ns (0.67)	ns (1.39)
P1 LPS/ P2 LPS	$\uparrow$ (1.72)	$\downarrow$ (0.74)	$\uparrow$ (1.43)	$\uparrow$ (2.17)	$\uparrow$ (1.57)	$\uparrow$ (1.71)	$\uparrow$ (1.50)	$\uparrow$ (2.32)	$\uparrow$ (2.19)

### 3.4 Immunhistochemie

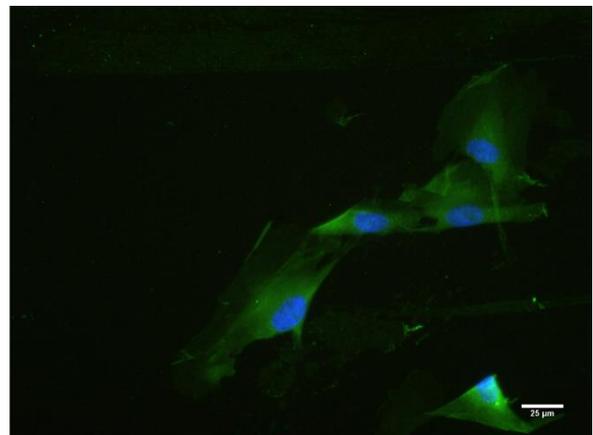
#### 3.4.1 Charakterisierung der Zellen

Die Proteinexpression in HCASMC wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Für die Zellcharakterisierung wurden die primären Antikörper Smooth Muscle Actin (SMA), Desmin und Vimentin als Marker für glatte Muskelzellen eingesetzt (**Abb. 17**). Diese Antikörper wurden als Positivkontrolle bei den Färbungen gegen die einzelnen TLR (**Abb. 19**) eingesetzt. Die nachfolgenden Abbildungen stehen repräsentativ für alle anderen Aufnahmen und wurden mit 400-facher Vergrößerung aufgenommen.

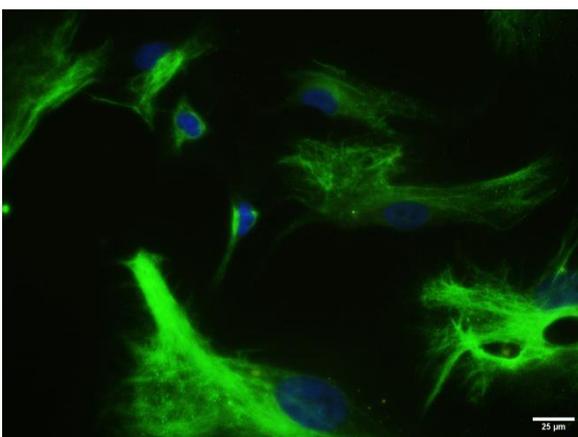
Smooth Muscle Actin Antikörper



Desmin Antikörper



Vimentin Antikörper



**Abb. 17:** Immunfluoreszenzfärbung HCASMC mit den primären Antikörpern smooth muscle actin, Desmin und Vimentin (grün) und DAPI (blau) zur Zellcharakterisierung. Die Messskala beträgt 25 µm.

### 3.4.2 TLR-Expression auf Proteinebene

Für die Untersuchung der Toll-like Rezeptoren in HCASMC auf Proteinebene wurden die Zellen über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen inkubiert, immunhistochemisch untersucht und anschließend die Intensität der Fluoreszenz ausgewertet. Die Expression der TLR wird durch die Fluoreszenzintensität definiert. Die Zellen wurden hierfür über sechs verschiedene Zeitpunkte hinweg kultiviert. Für die Tage eins, drei, vier, sieben und 14 wurden verwertbare Daten generiert, während für Tag null keine auswertbaren Ergebnisse gewonnen werden konnten.

TLR4: Bei den mit anorganischem Phosphat inkubierten Zellen wurde an allen Tagen die höchste Fluoreszenzintensität gemessen. Anhand der gemessenen Daten zeigt sich, dass die Intensität der Fluoreszenz bei den mit P1 Puffer inkubierten Zellen mit der Zellzahl korreliert. Bei Erhöhung der Zellzahl steigt die Fluoreszenzintensität, während sie bei einer Verringerung der Zellzahl absinkt. An Tag sieben ist sowohl die Intensität der Fluoreszenz als auch die Zahl der Zellen am höchsten. Bei den Kontrollzellen nimmt die Fluoreszenzintensität über den oben genannten Zeitraum stetig ab, obwohl die Zellzahl im Verlauf der 14 Tage immer weiter ansteigt. Bei den mit organischem Phosphat inkubierten Zellen steigt die Intensität der Fluoreszenz bis Tag sieben an und nimmt danach ab. Die Zahl, der mit P2 Puffer inkubierten Zellen, bleibt während den zwei Wochen annähernd konstant, ist jedoch an Tag sieben geringfügig erhöht.

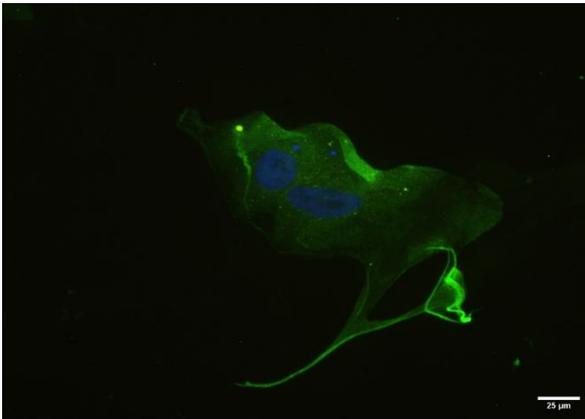
TLR6: Bei den nicht mit Phosphatpuffern inkubierten Zellen bleibt die Intensität der Fluoreszenz nahezu konstant, obwohl die Zahl der Zellen gegen Ende ansteigt. Bei den mit P1 Puffer inkubierten Zellen zeichnet sich wie bei TLR4 ein Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Zellzahl ab. Die Intensität der Fluoreszenz steigt mit zunehmender Zellzahl bzw. sinkt mit deren Abnahme. Auch hier wurde an Tag sieben ein erhöhtes Fluoreszenzsignal und die höchste Zellzahl während der 14 Tage gemessen. Bei den mit P2 Puffer inkubierten Zellen steigt die Intensität der Fluoreszenz stetig an, obwohl die Zellzahl ab Tag sieben abnimmt.

TLR8: Die Fluoreszenzintensität der Kontrollzellen sinkt zu Beginn, trotz konstanter Zellzahl, ab, steigt an Tag sieben gemeinsam mit der Zellzahl an und ist an Tag 14 zusammen mit der Zahl der Zellen reduziert. An Tag eins wurde bei den mit P1 Puffer inkubierten Zellen das intensivste Fluoreszenzsignal bei der geringsten Zellzahl gemessen. Im weiteren Verlauf kommt es trotz der Zunahme der Zellzahl, zunächst zu einer Reduktion der Intensität der Fluoreszenz an Tag drei, bevor diese wieder ansteigt. Allerdings konnte das starke Signal von Tag eins nicht mehr erreicht werden. Bei den mit P2 Puffer inkubierten Zellen nimmt die Fluoreszenzintensität kontinuierlich ab, während die Zahl der Zellen nach einem leichten Anstieg zu Beginn konstant bleibt.

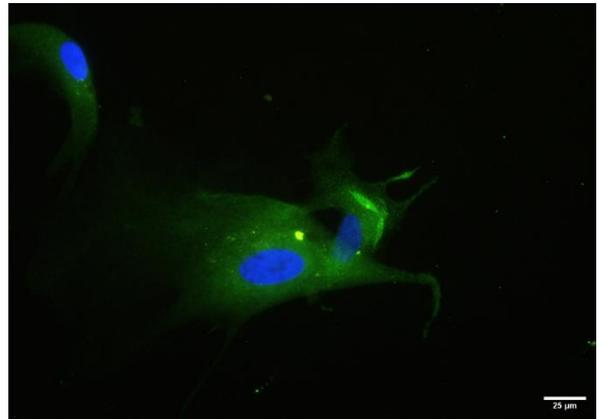
TLR9: Bei den Kontrollzellen steigt die Intensität der Fluoreszenz an Tag drei gemeinsam mit der Zellzahl leicht an. An Tag vier ist die Fluoreszenzintensität verringert, obwohl die Zahl der Zellen gleichbleibt. Die Intensität der Fluoreszenz ist an Tag sieben am höchsten, wobei sich auch die Zellzahl erhöht hat. An Tag 14 ist die Fluoreszenzintensität trotz Zunahme der Zellzahl erheblich reduziert (**Abb. 18**). Wie bei TLR8 ist die Fluoreszenzintensität bei den mit P1 Puffer inkubierten Zellen trotz geringster Zellzahl an Tag eins am höchsten. Die Intensität der Fluoreszenz ist im weiteren Verlauf gegenüber Tag eins stark reduziert, obwohl die Zahl der Zellen im Vergleich zu Tag eins erhöht ist. Bei den mit P2 Puffer inkubierten Zellen steigt die Fluoreszenzintensität gemeinsam mit der Zellzahl an und erreicht an Tag drei ihr Maximum. An Tag vier und sieben ist die Intensität der Fluoreszenz, ebenso wie die Zahl der Zellen reduziert. Die Fluoreszenzintensität steigt an Tag 14 trotz verringerter Zellzahl wieder deutlich an.

TLR10: Sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei den mit Phosphatpuffern inkubierten Zellen nimmt die Fluoreszenzintensität an Tag drei ab, steigt an Tag vier, nimmt an Tag sieben wieder ab und steigt an Tag 14 wieder an. Die Anzahl der Kontrollzellen erhöht sich über den Verlauf der zwei Wochen, während die Zahl der mit P1 inkubierten Zellen zunächst steigt, bevor sie an Tag 14 absinkt. Bei den mit P2 Puffer inkubierten Zellen bleibt die Zellzahl annähernd konstant.

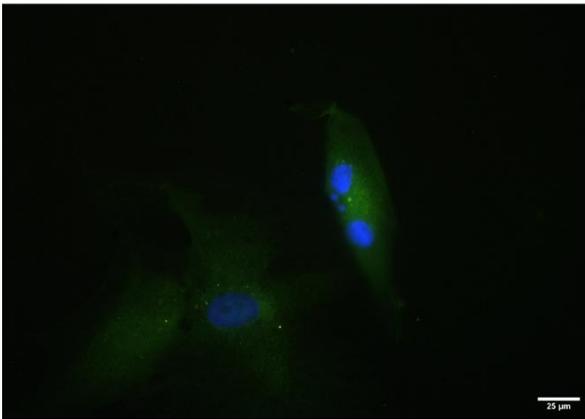
TLR9 Kontrolle Tag 1



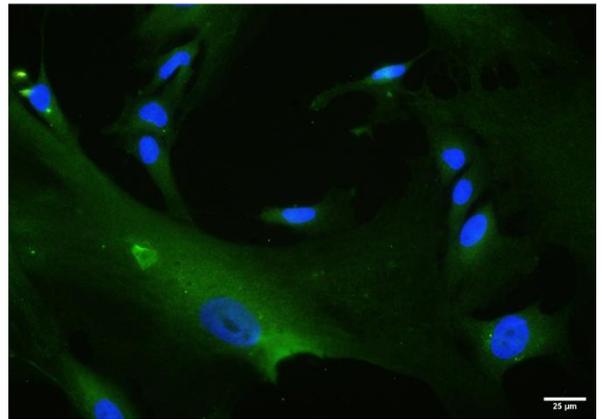
TLR9 Kontrolle Tag 3



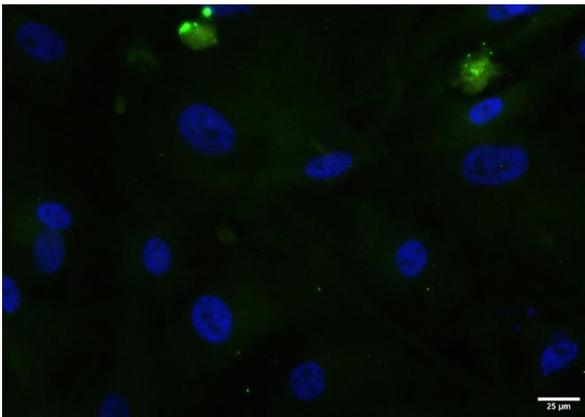
TLR9 Kontrolle Tag 4



TLR9 Kontrolle Tag 7

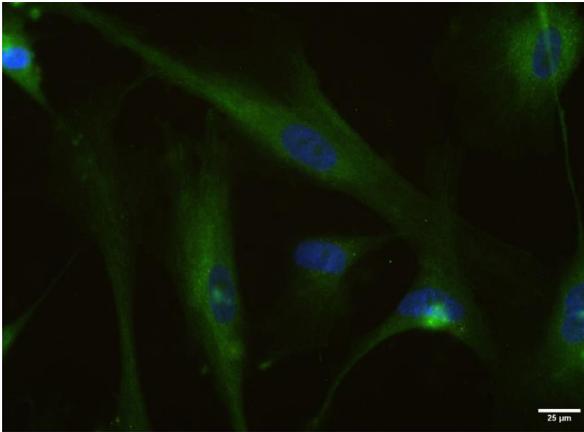


TLR9 Kontrolle Tag 14

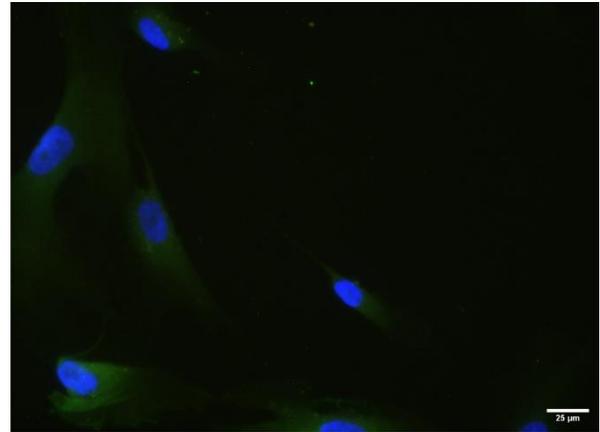


**Abb. 18:** Fluoreszenzintensität der mit dem primären Antikörper TLR9 (grün) und DAPI (blau) gefärbten Kontrollzellen über einen Verlauf von 14 Tagen. Die Messskala beträgt 25 µm.

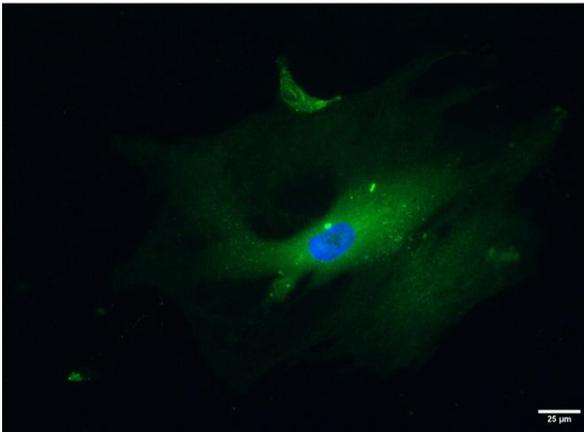
TLR4 Antikörper



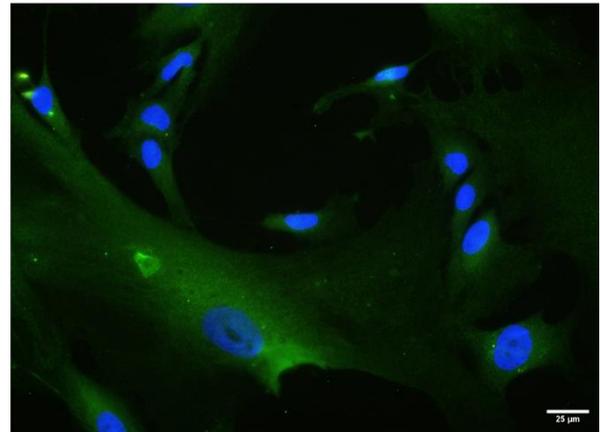
TLR6 Antikörper



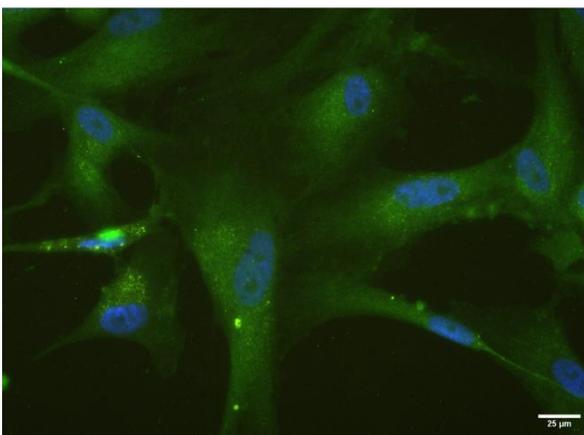
TLR8 Antikörper



TLR9 Antikörper



TLR10 Antikörper



**Abb. 19:** Immunfluoreszenzfärbung mit den primären Antikörpern TLR4, TLR6, TLR8, TLR9 und TLR10 (grün) und DAPI (blau). Die Messkala beträgt 25 µm.

#### 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es signifikante Unterschiede in der Genexpression von toll-like Rezeptoren in verkalkten und nicht verkalkten glatten Muskelzellen gibt. Sowohl die Zugabe von anorganischen und organischen Phosphatlösungen als auch die Inkubation mit Lipopolysacchariden haben einen Einfluss auf die Genexpression von toll-like Rezeptoren in humanen glatten Muskelzellen der Koronararterie *in vitro*.

Zunächst wurde durch eine Alizarinrot-S-Färbung bestätigt, dass die Zugabe mit anorganischem Phosphat im Medium zu deutlich sichtbaren Kalkablagerungen führt. Obwohl organisches Phosphat ebenfalls eine Kalzifizierung *in vitro* induziert (30), konnten optisch keine kalziumphosphatreichen Plaques nachgewiesen werden. Daher sollte der Versuch mit einer anschließenden photometrischen Messung wiederholt werden, um eventuelle Kalkablagerungen zu detektieren.

Hohe Phosphatkonzentrationen haben einen zytotoxischen Effekt auf Zellen (31). Dies wurde durch die Proliferationsanalyse mit Resazurin bestätigt, da die Fluoreszenzintensität der mit Phosphatpuffern inkubierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert ist. Weiters hat eine Hemacolor-Schnellfärbung und anschließende Zellzählung eine Reduktion der Zellzahl bei den mit P1 und P2 Puffer inkubierten Zellen ergeben.

Die statistische Auswertung der qPCR hat gezeigt, dass es durch die Inkubation mit Phosphaten und Lipopolysacchariden zu einer Änderung der Expression von toll-like Rezeptoren auf RNA-Ebene kommt. Diese ist teils signifikant erhöht, aber auch reduziert.

Eine Studie hat gezeigt, dass erhöhte Phosphatgehalte zu einer Hochregulierung von TLR4 in glatten Gefäßmuskelzellen führen (32). Dieser Effekt konnte durch unsere Untersuchungen nicht belegt werden. Die Zugabe der von uns gewählten Phosphatpuffer führt zu keiner signifikanten Änderung in der Expression von TLR4. Dies könnte daraus resultieren, dass der Auf- und Abbau von mRNA ein streng regulierter Prozess ist und die Transkription der RNA mit Erreichen der benötigten Translation in Proteine beendet wird. Der von uns gewählte Zeitpunkt für die Isolierung der RNA nach drei Tagen ergab sich aus den Daten der Proliferationsanalyse. Um eventuelle zeitliche Unterschiede in der Genexpression zu detektieren, sollte die Analyse des TLR4 mittels qPCR zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden.

Lipopolysaccharid als exogener Ligand des TLR4 hat ebenfalls einen Einfluss auf die Expression des Rezeptors in glatten Muskelzellen (33). Die statistische Auswertung unserer durch die qPCR gewonnenen Daten kann dies nicht bestätigen. Die Inkubation mit LPS führt zu keiner signifikanten Änderung in der Genexpression. In dieser Studie (33) wurden die Zellen über verschiedene Zeitpunkte hinweg mit LPS inkubiert, während in unseren Versuchen die RNA bereits nach einer Stunde isoliert wurde. Der Einfluss der Inkubationszeit mit Lipopolysacchariden auf die Genexpression von TLR4 in glatten Muskelzellen muss noch weiter untersucht werden.

Obwohl unsere Versuche die Erhöhung der Genexpression von TLR4 durch Phosphat oder LPS allein nicht reproduzieren konnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die Inkubation in Kombination mit organischem Phosphat und Lipopolysaccharid zu einem Anstieg der Genexpression von TLR4 führt.

Während die Proteinexpression von TLR10 immunhistochemisch nachgewiesen werden kann, ergab dessen Analyse auf RNA-Ebene mit diesem Zelltyp keine verwertbaren Ergebnisse. Auf Protein-Ebene konnten an Tag null für keinen Rezeptor Resultate erzielt werden. Die Fixierung der Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte sechs Stunden nach dem Aussäen der Zellen auf den Glasplättchen. Glatte Muskelzellen sind adhärente Zellen, sie haften während ihrer Proliferation und Wachstum an der Oberfläche ihres Kulturgefäßes. Die kurze Inkubationszeit könnte das Anheften der Zellen auf den Glasplättchen reduziert haben.

Die Auswertung der Immunhistochemie- und qPCR-Daten an Tag drei ergab, dass eine erhöhte Menge an RNA nicht gleichbedeutend mit einer erhöhten Proteinexpression ist. Beispielsweise ist in den mit P1 Puffer inkubierten Zellen die Expression von TLR6 auf RNA-Ebene erhöht, während die Fluoreszenzintensität gesunken ist. Die Änderung der RNA-Expression führt nicht automatisch zu einer Änderung der Proteinexpression (34).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Phosphat und Lipopolysaccharide die Expression von Toll-like-Rezeptoren in glatten Muskelzellen beeinflussen. Dies kann möglicherweise Entzündungen fördern und zu Gefäßverkalkungen beitragen. Es sind jedoch weitere Studien erforderlich, um die Mechanismen und Auswirkungen der phosphat- und LPS-induzierten TLR-Expression in glatten Muskelzellen vollständig zu verstehen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Herz-Kreislauf-Krankheiten [Internet]. [cited 2023 Jun 29]. Available from: <https://www.sozialministerium.at/Themen/Gesundheit/Nicht-uebertragbare-Krankheiten/Herz-Kreislauf-Krankheiten.html>
2. Taylor AM, Bordoni B. Histology, Blood Vascular System. [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553217/>
3. Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". *WikiJournal of Medicine* 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010
4. Tucker WD, Arora Y, Mahajan K. Anatomy, Blood Vessels. [Updated 2022 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470401/>
5. Larsen R. Physiologie des Herzens und des Kreislaufs. Anästhesie und Intensivmedizin für die Fachpflege. 2016;646–63. doi:10.1007/978-3-662-50444-4\_47
6. Ogobuiro I, Wehrle CJ, Tuma F. Anatomy, Thorax, Heart Coronary Arteries. [Updated 2022 Jul 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534790/>
7. Ramai D, Lai J, Monzidelis C, Reddy S. Coronary Artery Development: Origin, Malformations, and Translational Vascular Reparative Therapy. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 2018;23(4): 292-300. doi: 10.1177/1074248418769633
8. Debus ES, Torsello G, Schmitz-Rixen T, Flessenkämper I, Storck M, Wenk H, et al. Ursachen und Risikofaktoren der Arteriosklerose. *Gefäßchirurgie*. 2013;18(6):544–50. doi:10.1007/s00772-013-1233-6
9. Durham AL, Speer MY, Scatena M, Giachelli CM, Shanahan CM. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: Implications in atherosclerosis and arterial stiffness. *Cardiovascular Research*. 2018;114(4):590–600. doi:10.1093/cvr/cvy010
10. Wolf D, Ley K. Immunität und Entzündung Bei Arteriosklerose. *Herz*. 2019;44(2):107–20. doi:10.1007/s00059-019-4790-y
11. Gui Y, Zheng H, Cao RY. Foam cells in atherosclerosis: Novel insights into its origins, consequences, and molecular mechanisms. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;9. doi:10.3389/fcvm.2022.845942
12. Zhuge Y, Zhang J, Qian F, Wen Z, Niu C, Xu K, et al. Role of smooth muscle cells in cardiovascular disease. *International Journal of Biological Sciences*. 2020;16(14):2741–51. doi:10.7150/ijbs.49871

13. Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, Olaetxea JR, Alloza I, Vandembroeck K, et al. Pathophysiology of atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(6):3346. doi:10.3390/ijms23063346
14. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2021;6(1). doi:10.1038/s41392-021-00687-0
15. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *International Immunopharmacology*. 2018;59: 391–412. doi:10.1016/j.intimp.2018.03.002
16. El-Zayat SR, Sibaii H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: An overview. *Bulletin of the National Research Centre*. 2019;43(1). doi:10.1186/s42269-019-0227-2
17. Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P. *Immunité Naturelle. médecine/sciences*. 2007;23(1):67–74. doi:10.1051/medsci/200723167
18. Montero Vega MT, de Andrés Martín A. The significance of toll-like receptors in human diseases. *Allergologia et Immunopathologia*. 2009;37(5):252–63. doi:10.1016/j.aller.2009.04.004
19. Li B, Xia Y, Hu B. Infection and atherosclerosis: TLR-dependent pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2020;77(14):2751–69. doi:10.1007/s00018-020-03453-7
20. Cho, WG, Albuquerque, RJ, Kleinman, ME, Tarallo, V, Greco, A, Nozaki, M, et al. Small interfering RNA-induced TLR3 activation inhibits blood and lymphatic vessel growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, 106(17): 7137–7142. doi: 10.1073/pnas.0812317106
21. Hajam IA, Dar PA, Shahnawaz I, Jaume JC, Lee JH. Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. *Experimental Molecular Medicine*. 2017; 49(9). doi: 10.1038/emm.2017.172
22. Su, S, Tao, L, Deng, Z, Chen, W, Qin, S, Jiang, H. TLR10: Insights, controversies and potential utility as a therapeutic target. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2020; 93(4). doi:10.1111/sji.12988
23. Curtiss LK, Tobias PS. Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*. 2009; 50: S340-5. doi: 10.1194/jlr.R800056-JLR200
24. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461
25. Bayer AL, Alcaide P. MyD88: At the heart of inflammatory signaling and cardiovascular disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2021; 161: 75-85. doi: 10.1016/j.yjmcc.2021.08.001

26. Campbell LA, Rosenfeld ME. Infection and Atherosclerosis Development. *Archives of Medical Research*. 2015; 46(5): 339-50. doi: 10.1016/j.arcmed.2015.05.006
27. Jiang D, Li D, Cao L, Wang L, Zhu S, Xu T, et al. Positive feedback regulation of proliferation in vascular smooth muscle cells stimulated by lipopolysaccharide is mediated through the TLR 4/Rac1/Akt pathway. *PLoS One*. 2014;9(3). doi: 10.1371/journal.pone.0092398
28. Yin Q, Jiang D, Li L, Yang Y, Wu P, Luo Y, et al. LPS Promotes Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation Through the TLR4/Rac1/Akt Signalling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2018;44(6). doi: 10.1159/000486024
29. Kim J, Yoo JY, Suh JM, Park S, Kang D, Jo H, et al. The flagellin-TLR5-Nox4 axis promotes the migration of smooth muscle cells in atherosclerosis. *Experimental & Molecular Medicine*. 2019;51(7): 1-13. doi: 10.1038/s12276-019-0275-6
30. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. Beta-glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1995;15(11): 2003-9. doi: 10.1161/01.atv.15.11.2003.
31. Alexander, R, Debiec, N, Razzaque, MS, He, P. Inorganic phosphate-induced cytotoxicity. *IUBMB Life*. 2022;74: 117– 124. doi:10.1002/iub.2561
32. Zhang D, Bi X, Liu Y, Huang Y, Xiong J, Xu X, et al. High phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells is associated with the TLR4/NF-KB signaling pathway. *Kidney and Blood Pressure Research*. 2017;42(6):1205–15. doi:10.1159/000485874
33. Li H, He Y, Zhang J, Sun S, Sun B. Lipopolysaccharide regulates toll-like receptor 4 expression in human aortic smooth muscle cells. *Cell Biology International*. 2007; 31(8): 831-5. doi: 10.1016/j.cellbi.2007.01.034.
34. McHugh PC, Wright JA, Brown DR. Transcriptional regulation of the beta-synuclein 5'-promoter metal response element by metal transcription factor-1. *PLoS ONE*. 2011; 6(2). doi:10.1371/journal.pone.0017354

## 6. Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Schematischer Aufbau eines Blutgefäßes (3) .....	1
<b>Abb. 2:</b> Anatomie der Koronararterien (7) .....	2
<b>Abb. 3:</b> Entstehung und Progression eines atherosklerotischen Plaques (13). ECM extrazelluläre Matrix, LDL Low Density Lipoprotein, VMSC glatte Gefäßmuskulatur (vascular smooth muscle cells).....	4
<b>Abb. 4:</b> Exogene Liganden und Lokalisation der toll-like Rezeptoren (16). dsRNA doppelsträngige RNA, HA Hyaluronsäure, hTLR humaner toll-like Rezeptor, LTA Lipoteichonsäure, mTLR muriner toll-like Rezeptor, ssRNA einzelsträngige RNA, TLR toll like-Rezeptor.....	6
<b>Abb. 5:</b> MyD88-abhängiger und unabhängiger Signalweg (25).....	8
<b>Abb. 6:</b> Morphologie der Inkubierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Die Messskala beträgt 100 µm. ....	22
<b>Abb. 7:</b> Alizarinrot-S-Färbung zum Nachweis von phosphathaltigen Plaques. Die Messskala beträgt 250 µm. ....	23
<b>Abb. 8:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus <b>Tab. 5</b> . *= $p < 0.05$ , **= $p < 0.01$ , ***= $p < 0.001$ . Fehlerbalken geben die Standardabweichung (SD, standard deviation) wieder. ....	24
<b>Abb. 9:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus <b>Tab. 6</b> . *= $p < 0.05$ , **= $p < 0.01$ , ****= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder. ....	25
<b>Abb. 10:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus <b>Tab. 7</b> . *= $p < 0.05$ . Fehlerbalken geben die SD wieder. ....	26
<b>Abb. 11:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus <b>Tab. 8</b> . *= $p < 0.05$ , ****= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder. ....	27
<b>Abb. 12:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus <b>Tab. 9</b> . *= $p < 0.05$ , **= $p < 0.01$ , ***= $p < 0.001$ , ****= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder. ....	28
<b>Abb. 13:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus <b>Tab. 10</b> . *= $p < 0.05$ , **= $p < 0.01$ , ***= $p < 0.001$ , ****= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder. ....	29
<b>Abb. 14:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus <b>Tab. 11</b> . *= $p < 0.05$ , **= $p < 0.01$ , ***= $p < 0.001$ , ****= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder. ....	30
<b>Abb. 15:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus <b>Tab. 12</b> . *= $p < 0.05$ , **= $p < 0.01$ , ***= $p < 0.001$ , ****= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder. ....	31
<b>Abb. 16:</b> Graphische Darstellung der Ergebnisse mit signifikantem Unterschied aus <b>Tab. 13</b> . *= $p < 0.05$ , ***= $p < 0.001$ , ****= $p < 0.0001$ . Fehlerbalken geben die SD wieder. ....	32

- Abb. 17:** Immunfluoreszenzfärbung HCASMC mit den primären Antikörpern smooth muscle actin, Desmin und Vimentin (grün) und DAPI (blau) zur Zellcharakterisierung. Die Messskala beträgt 25 µm. .... 34
- Abb. 18:** Fluoreszenzintensität der mit dem primären Antikörper TLR9 (grün) und DAPI (blau) gefärbten Kontrollzellen über einen Verlauf von 14 Tagen. Die Messskala beträgt 25 µm. .... 37
- Abb. 19:** Immunfluoreszenzfärbung mit den primären Antikörpern TLR4, TLR6, TLR8, TLR9 und TLR10 (grün) und DAPI (blau). Die Messskala beträgt 25 µm. .... 38

## 6.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Reverse Transkriptase Mastermix für eine Reaktion.....	17
<b>Tab. 2:</b> qPCR Master Mix für eine Reaktion .....	18
<b>Tab. 3:</b> Primer Sequenzen (qPCR).....	19
<b>Tab. 4:</b> Programm Thermocycler (7500 Real Time PCR) .....	21
<b>Tab. 5:</b> Expression von TLR1 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.....	24
<b>Tab. 6:</b> Expression von TLR2 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.....	25
<b>Tab. 7:</b> Expression von TLR3 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.....	26
<b>Tab. 8:</b> Expression von TLR4 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.....	27
<b>Tab. 9:</b> Expression von TLR5 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.....	28
<b>Tab. 10:</b> Expression von TLR6 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.....	29
<b>Tab. 11:</b> Expression von TLR7 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.....	30
<b>Tab. 12:</b> Expression von TLR8 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.....	31
<b>Tab. 13:</b> Expression von TLR9 in glatten Muskelzellen, mit und ohne Zugabe von Phosphatpuffer und LPS.....	32
<b>Tab. 14:</b> Überblick über die Unterschiede der Expression von TLR in vaskulären glatten Muskelzellen mittels der Fold-Genexpression ( $\Delta\Delta\text{-Ct}^2$ ). ns = nicht signifikant, $\uparrow$ = Erhöhung der Genexpression, $\downarrow$ = Verringerung der Genexpression .....	33

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A <sub>260</sub>	Absorption bei 260 nm
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
DAMP	damage-associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsRNA	doppelsträngige RNA
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
HCASMC	Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells
HA	Hyaluronsäure
hsp	Hitzeschockproteine
hTLR/mTLR	Humaner toll-like Rezeptor/ muriner toll-like Rezeptor
IL-6	Interleukin-6
IRAK	IL-1R-assozierte Kinasen
IRF	Interferon-Regulierungsfaktors
KO	Kontrolle
LDL	Low Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LTA	Lipoteichonsäure
M199	Medium 199 HEPES
MyD88	Myeloid-Differenzierungsfaktor 88
NH <sub>4</sub> OH	Ammoniumhydroxyd
nm	Nanometer
P1	Anorganische Phosphatlösung
P2	Organische Phosphatlösung
PAMP	Pathogen-associated moleculare pattern
PBS	Phosphatgepufferten Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PRR	pattern recognition receptor
qPCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung (standard deviation)
siRNA	small interfering RNA
SMA	smooth muscle actin
ssRNA	einzelsträngige RNA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TLR	toll-like Rezeptor
TRAF3	TNF -Rezeptor-assozierte Faktor
TRAF6	TNF-Rezeptor-assozierten Faktor 6
TRIF	TIR-Domänen enthaltendes Adapterprotein-induzierendes Interferon
U/min	Umdrehungen pro Minute

VMSC	vascular smooth muscle cells
$\Delta$ -Ct	Delta-Ct