
Die Bedeutung des Toll-like Rezeptor 4
für die myokardiale Schädigung durch
Endotoxin und Ischämie-Reperfusion

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Heidi Stapel

aus Neuss

Bonn 2006

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2003 bis September 2006 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rainer Meyer am Institut für Physiologie 2 des Universitätsklinikums Bonn.

Tag der Promotion: 30.03.2007

Prüfungsausschuss:

Erstgutachter: Prof. Dr. Rainer Meyer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dieter Fürst

Fachnaher Gutachter: Prof. Dr. Norbert Koch

Fachangrenzender Gutachter: Prof. Dr. Christian Grohé

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2007

Meiner Familie

| | |
|--|------------------|
| <u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u> | <u>9</u> |
| <u>1 EINLEITUNG.....</u> | <u>1</u> |
| 1.1 EPIDEMIOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE KARDIOVASKULÄRER ERKRANKUNGEN..... | 1 |
| 1.1.1 PATHOLOGIE DES ISCHÄMIE-REPERFUSIONS-SCHADENS | 2 |
| 1.2 MYOKARDIALE PRÄKONDITIONIERUNG | 4 |
| 1.2.1 LPS-VORBEHANDLUNG | 5 |
| 1.2.2 ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG | 7 |
| 1.3 ANGEBORENE IMMUNABWEHR..... | 8 |
| 1.4 TOLL-LIKE REZEPTOREN UND IHRE LIGANDEN..... | 9 |
| 1.5 TLR4-SIGNALTRANSDUKTION | 11 |
| 1.6 REGULATION RELEVANTER INFLAMMATORISCHER MEDIATOREN..... | 13 |
| 1.7 ZIELE DER ARBEIT..... | 18 |
| <u>2 MATERIAL UND METHODEN</u> | <u>19</u> |
| 2.1 VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN..... | 19 |
| 2.2 VERSUCHSPROTOKOLL UND GRUPPENEINTEILUNG | 19 |
| 2.3 IN-VIVO-EINGRIFFE OKKLUSION REPERFUSION..... | 20 |
| 2.3.1 INSTRUMENTIERUNG OKKLUSION-REPERFUSION | 20 |
| 2.3.2 VORBEHANDLUNG UND PRÄKONDITIONIERUNG | 23 |
| 2.3.2.1 Versuchsprotokoll LPS-Vorbehandlung | 23 |
| 2.3.2.2 Versuchsprotokoll Ischämische Präkonditionierung..... | 25 |
| 2.3.3 INFARZIERUNG | 26 |
| 2.4 HISTOLOGISCHE VERFAHREN | 26 |
| 2.4.1 PHTHALOBLAU- UND TTC-FÄRBUNG | 26 |
| 2.4.1.1 In-vivo Phthaloblau-Färbung | 27 |
| 2.4.1.2 TTC-Färbung | 27 |
| 2.4.1.3 Planimetrische Auswertung | 28 |
| 2.4.2 AZANFÄRBUNG | 28 |
| 2.4.2.1 Fixierung des Herzgewebes | 28 |
| 2.4.2.2 Paraffin-Einbettung..... | 29 |
| 2.4.2.3 Schnitttechnik..... | 29 |
| 2.4.2.4 Azanfärbung..... | 29 |
| 2.5 IN VITRO-VERFAHREN..... | 30 |
| 2.5.1 ORGANENTNAHME | 30 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|------------------|
| 2.5.2 | RNA-ISOLATION | 31 |
| 2.5.3 | PROTEINISOLATION AUS ORGANEN | 31 |
| 2.5.3 | BICINCHINONSÄURE-ASSAY | 32 |
| 2.5.4 | ELECTRIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA) | 32 |
| 2.5.5 | RIBONUCLEASE PROTECTION ASSAY (RPA) | 33 |
| 2.5.6 | REAL TIME RT-PCR..... | 35 |
| 2.5.7 | WESTERN BLOT..... | 36 |
| 2.5.8 | ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) | 37 |
| 2.5.9 | ZYMOGRAPHIE | 37 |
| 2.6 | STATISTISCHE AUSWERTUNG | 38 |
| 2.7 | GERÄTE | 40 |
| 2.8 | CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMATERIAL..... | 42 |
| 3 | <u>ERGEBNISSE</u> | <u>46</u> |
| 3.1 | TIERZAHLEN | 46 |
| 3.2 | LPS-VORBEHANDLUNG..... | 46 |
| 3.2.1 | MORTALITÄTSRATEN | 46 |
| 3.2.2 | TTC-FÄRBUNG UND PLANIMETRISCHE AUSWERTUNG..... | 48 |
| 3.2.3 | AZANFÄRBUNG | 49 |
| 3.2.4 | CD14-PROTEINEXPRESSION..... | 50 |
| 3.2.5 | TLR2 UND TLR4 - mRNA-EXPRESSION | 51 |
| 3.2.6 | AKTIVITÄT DER TRANSKRIPTIONSFAKTOREN NFκB UND AP-1 | 53 |
| 3.2.7 | HIF1A-REGULATION | 54 |
| 3.2.8 | ADRENOMEDULLIN - mRNA-EXPRESSION..... | 56 |
| 3.2.9 | iNOS - mRNA-EXPRESSION..... | 57 |
| 3.2.10 | ZYTKINREGULATION..... | 58 |
| 3.2.10.1 | mRNA-Expression | 58 |
| 3.2.10.2 | Proteinexpression | 64 |
| 3.2.11 | ZYTKINREZEPTORREGULATION - TNFR1 mRNA-EXPRESSION | 66 |
| 3.2.12 | CHEMOKIN-MRNA-EXPRESSION | 66 |
| 3.2.13 | MMP- UND TIMP-REGULATION..... | 70 |
| 3.2.13.1 | mRNA-Expression | 70 |
| 3.2.13.2 | MMP / TIMP-Quotienten | 74 |
| 3.2.13.3 | Zymographische Aktivität..... | 76 |
| 3.3 | ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG | 79 |
| 3.3.1 | MORTALITÄTSRATEN | 80 |

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.3.2 | TTC-FÄRBUNG UND PLANIMETRISCHE AUSWERTUNG | 80 |
| 3.3.3 | CD14-PROTEINEXPRESSION | 82 |
| 3.3.4 | TLR2 UND TLR4 - mRNA-EXPRESSION | 83 |
| 3.3.5 | ZYTOKINE - mRNA-EXPRESSION | 84 |
| 3.3.6 | CHEMOKINE - mRNA-EXPRESSION | 86 |
| 3.3.7 | MMPs UND TIMPs | 88 |
| 3.3.7.1 | mRNA-Expression..... | 88 |
| 3.3.7.2 | MMP-TIMP-Quotienten | 91 |
| 4 | <u>DISKUSSION.....</u> | 92 |
| 4.1 | MAUS- UND INFARKTMODELL | 92 |
| 4.2 | EINFLUSS VON TLR4, LPS UND IPC AUF DIE INFARKTGRÖßE..... | 93 |
| 4.3 | EXPRESSIONSANALYSE MOLEKULARER MARKER - VORGÄNGE AN DER ZELLMEMBRAN.... | 96 |
| 4.3.1 | CD14-PROTEINEXPRESSION..... | 96 |
| 4.3.2 | TLR2- UND TLR4-EXPRESSION | 97 |
| 4.4 | EXPRESSIONSANALYSE MOLEKULARER MARKER – INTRAZELLULÄRE PROZESSE UND REGULATION VON ENTZÜNDUNGSMEDIATOREN..... | 99 |
| 4.4.1 | TRANSKRIPTIONSFAKTOR NFκB..... | 99 |
| 4.4.2 | HIF1A-REGULATION | 100 |
| 4.4.3 | ADM-EXPRESSION..... | 101 |
| 4.4.4 | INOS-EXPRESSION..... | 102 |
| 4.4.5 | ZYTOKINE..... | 105 |
| 4.4.6 | ZYTOKINREZEPTOREN..... | 109 |
| 4.4.7 | CHEMOKINE | 110 |
| 4.4.8 | MMPs UND TIMPs | 113 |
| 4.5 | BESONDERHEITEN DER ISCHÄMISCHEN PRÄKONDITIONIERUNG..... | 116 |
| 4.6 | SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK | 117 |
| 5 | <u>ZUSAMMENFASSUNG</u> | 120 |
| 6 | <u>TABELLENANHANG</u> | 122 |
| 7 | <u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u> | 127 |
| 8 | <u>DANKSAGUNG.....</u> | 150 |

INHALTSVERZEICHNIS

9 ERKLÄRUNG..... 151

10 PUBLIKATIONEN..... 152

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|---|
| AAR | area-at-risk |
| Abb. | Abbildung |
| ADM | Adrenomedullin |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ANP | atriales natriuretisches Peptid |
| AP-1 | Aktivatorprotein-1 |
| Aqua dest. | Destilliertes Wasser |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BAD | Bcl-xL/Bcl-2-Associated Death Promoter |
| Bax | Bcl-2 associated X protein |
| BCA | Bicinchinonsäure-Assay |
| Bcl-2 | B-cell chronic lymphatic leukemia/lymphoma type 2 |
| Bkg | background |
| C3H/HeN | Labormaus-Inzuchtlinie |
| C57Bl/6 | Labormaus-Inzuchtlinie |
| cAMP | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CD14 | cluster of differentiation-14 |
| cDNA | copy-DNA |
| CK | Creatinkinase |
| CpG | Cytidin – Phosphorsäure – Guanosin-Motiv |
| d | day |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------------|--|
| dsDNA | double-stranded DNA |
| dsRNA | double stranded RNA |
| DTT | Dithiothreitol |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| eIF2 α | eukaryotic initiation factor-2 α |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| ELR-Motiv | (Glu-Leu-Arg)-Motiv |
| EMMPRIN | Extracellular MMP Inducer |
| eNOS | endothelial nitric oxide synthase |
| ERK | extracellular signal-regulated kinase |
| <i>et al.</i> | et alii |
| EtOH | Ethanol |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| FN | Fibronektin |
| GLUT | Glukosetransporter |
| GPCR | G protein-coupled receptor |
| h | hours |
| HEPES | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid |
| HIF | Hypoxie induzierender Faktor |
| HRP | horse-radish peroxidase |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| i.p. | intraperitoneal |
| I/R | Ischämie/Reperfusion |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------|---|
| IA | Infarktareal |
| IFN | Interferon |
| IgG | Immunglobulin G |
| IKK | I κ B-Kinase |
| IL | Interleukin |
| iNOS | Induzierbare NO-Synthase |
| IP-10 | interferon- γ -inducible protein-10 |
| IPC | Ischämische Präkonditionierung |
| IRAK | IL-1 receptor associated kinase |
| IRF3 | interferon regulatory factor 3 |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| LAD | Linke anteriore deszendierende Koronararterie |
| LBP | LPS binding protein |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LTA | Lipoteichonsäure |
| LV | Linker Ventrikel |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MCP-1 | monocyte chemoattractant protein-1 |
| MD2 | myeloid differentiation 2 |
| MI | Myokardinfarkt |
| min | Minute |
| MIP | macrophage inflammatory protein |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------|--|
| MPT | mitochondrial permeability transition pore |
| mRNA | messenger RNA |
| mTOR | mammalian target of rapamycin |
| MW | Mittelwert |
| MyD88 | Myeloider Differenzierungsfaktor 88 |
| n | Anzahl |
| N.N. | nomen nominandum |
| NAAR | non-area-at-risk |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NFκB | nuclear transcription factor κB |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| ns | nicht significant |
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| p38 | MAPK |
| PBS | phosphate buffer saline |
| PHD | Prolyl-4-Hydrolase Domäne |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-Kinase |
| PKB | Proteinkinase B |
| PKC | Proteinkinase C |
| PKR | Proteinkinase R |
| PMN | poly-morphkernige neutrophile Granulozyten |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| Poly(dI-dC) | Poly-Desoxyinositoldesoxydytidin |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------|---|
| PRR | pattern recognition receptor |
| RANTES | regulated on activation, normal T cell expressed and secreted |
| RNA | ribonucleic acid |
| ROS | reactive oxygen species |
| RPA | ribonuclease protection assay |
| SAPK/JNK | stress-activated protein/c-Jun NH2-terminal kinase |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SEM | standard error of the mean |
| snRNP | small nuclear ribonucleoprotein particle |
| SOD | Superoxiddismutase |
| SOP | Scheinoperation |
| ssDNA | single-stranded DNA |
| ssRNA | single stranded RNA |
| STAT1 | signal transducer and activator of transcription 1 |
| Tab. | Tabelle |
| TACE/ADAM-17 | TNF α -converting enzyme / a disintegrin and metalloproteinase |
| TCA-3 | T-Cell activation gene |
| TGF | transforming growth factor |
| TIMP | tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases |
| TIR | Toll/IL-1 receptor domain |
| TIRAP | Toll/IL-1 receptor domain containing adapter protein |
| TLR | Toll-like receptor |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------|---|
| TLR4-D | Labormaus-Inzuchtlinie mit spontaner Mutation des TLR4 |
| TLR4-KO | Zuchtlinie auf C57Bl/6-Hintergrund mit TLR4-Knockout |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TNFR | TNF-Rezeptor |
| TRAF | TNF-receptor associated factor |
| TRAIL | TNF-related apoptosis inducing ligand |
| TRAM | TRIF-related adapter molecule |
| TRIF | Toll/IL-1R-domain containing adapter inducing IFN β |
| TTC | Triphenyltetrazoliumchlorid |
| VDAC | voltage dependent anion channel |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |
| vs. | versus |
| WT | Wildtyp (C57Bl/6 und C3H/HeN) |

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen

Erkrankungen des Herzkreislaufsystems stellen die häufigste Todesursache in Deutschland dar. 47 % der Todesfälle im Jahre 2003 konnten auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückgeführt werden. Von diesen waren 41 % durch ischämische Herzkrankheiten wie Atherosklerosen und Myokardinfarkte bedingt (Statistisches Bundesamt, 2005).

Atherosklerose zeichnet sich durch eine fortschreitende Stenose der Arterien aus. Bei einer Verengung der Herzkranzgefäße wird von koronarer Herzkrankheit (KHK) gesprochen. Eine Reihe von Risikofaktoren begünstigt die Entstehung einer KHK. Hierzu gehören Fettstoffwechselstörungen, Bluthochdruck, Rauchen, genetische Prädisposition, Alter, Geschlecht, Übergewicht und Diabetes mellitus (Goldbourt und Neufeld, 1986).

Ein Myokardinfarkt resultiert häufig aus einem akuten Verschluss einer Koronararterie in Folge einer Ruptur von atherosklerotischen Plaques. Dies induziert eine Minderperfusion des Herzens, das einer verringerten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung sowie einem verminderten Abtransport von Metaboliten ausgesetzt wird. Wesentlich für das Ausmaß der Myokardschädigung ist eine frühe Reperfusion. Allerdings kommt es dadurch zu einer reperfusionsbedingten Entzündungsreaktion, da im Zuge der Myokardschädigung kardiale zytosolische Proteine sowie Strukturproteine ins Blut gelangen. Diese Vorgänge sind im Kapitel 1.1.1 detailliert beschrieben. Zu den Mediatoren, die während einer Ischämie freigesetzt werden, gehören u.a. Hitzeschockproteine (HSPs), Sauerstoffradikale, Fibrinogen und Fibronectin (Nakano *et al.*, 1997, Ortmann *et al.*, 2000, Roth *et al.*, 1997).

1.1.1 Pathologie des Ischämie-Reperfusionsschadens

Der myokardiale Metabolismus verändert sich bei Ischämie radikal. Frühzeitige Reperfusion ist die Voraussetzung für den Erhalt des ischämischen Gewebes, kann den verursachten Schaden durch den Auswascheffekt jedoch auch vergrößern. Innerhalb weniger Sekunden Ischämie wird der Sauerstoffvorrat aus Zytoplasma und Myoglobin verbraucht und somit die oxidative Phosphorylierung sowie die mitochondriale ATP-Produktion gestört. Die Anpassung an den O₂-Bedarf geschieht vor allem durch Änderung des Gefäßwiderstandes, der von metabolischen, endothel-vermittelten und neurohumoralen Faktoren reguliert wird. Zum einen wirkt Sauerstoff als Vasokonstriktor, weshalb sich ein O₂-Mangel gefäßerweiternd auswirkt. Zum anderen sinkt die Menge der energiereichen Phosphate ATP und Kreatinphosphat und die Abbauprodukte wie anorganische Phosphate und Adenosin reichern sich an. Adenosin fungiert als endogenes, protektives Agens vasodilatorisch, reduziert den Sauerstoffbedarf durch seine negativ chrono-, dromo- und inotropen Effekte und vermindert die Thrombozytenaggregation sowie die Adhäsion von Neutrophilen am Endothel. Die Vasodilatoren ATP, ADP, Bradykinin, Histamin und Acetylcholin setzen Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel frei, welches in die Gefäßmuskulatur diffundiert, dort die Guanylylcyclase-Aktivität steigert und somit intrazellulär die Konzentration von cGMP erhöht. cGMP aktiviert die Proteinkinase C, wodurch die Gefäßmuskulatur relaxiert. Als neurohumorale Faktoren wirken Katecholamine zum einen vasokonstriktorisch an den α₁-Adrenozeptoren, die vorwiegend auf den epikardialen Gefäßen vorkommen, zum anderen vasodilatorisch an den β₂-Adrenozeptoren, die an den subendokardialen Gefäßen überwiegen (Böcker *et al.*, 2004).

Die Freisetzung von Fettsäuren durch Lipolyse wird bei myokardialer Ischämie durch Katecholamine begünstigt, während die β-Oxidation der Fettsäuren und der Citratzyklus jedoch gehemmt werden. Dies führt zu einer zytosolischen Akkumulation von Acyl-CoA und Inhibition des Adenin-Nukleotid-Translokators. Glykogenolyse und anaerobe Glykolyse laufen verstärkt ab und bewirken eine Ansammlung von Laktat, H⁺-Ionen und somit eine intrazelluläre Azidose (Silbernagl und Lang, 1998). Schließlich resultiert aus der Ansammlung von Protonen, Laktat und NADH eine Inhibition der Glykolyse und der damit verbundenen anaeroben Energieproduktion. Der ener-

gieabhängige Ionenaustausch kann nicht mehr kontrolliert werden und es kommt zum K^+ und Mg^{2+} -Ausstrom aus der Zelle sowie zum Na^+ und Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Dieser erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Gehalt aktiviert Phospholipasen, die die Phospholipidmembran lysieren können. Der zytosolische Ca^{2+} -Gehalt kann durch Ionenkanäle der Plasmamembran und durch Ausschüttung aus intrazellulären Strukturen, vor allem dem Sarkoplasmatischen Reticulum (SR), weiter ansteigen. Ca^{2+} sammelt sich außerdem in den Mitochondrien (Piper *et al.*, 2003). Die Umverteilung der Elektrolyte führt zu osmotischen Veränderungen und zellulären Ödemen. Die Degradation und Synthese von Proteinen ist gestört. Nach mehreren Minuten kommt es zu Veränderungen der Ultrastruktur, d.h. zu einem Verlust von Glykogengranula sowie Ödemen der Mitochondrien und des SR. Innerhalb von Stunden entstehen myokardiale Kontraktoren mit Ruptur der Myofibrillen und Dyslokation der Z-Scheiben; Mitochondrien, SR und Plasmamembran zerreißen. Intrazelluläre Makromoleküle gelangen während der ersten Stunde in das Interstitium und lytisch wirkende Enzyme werden innerhalb von ein bis vier Stunden aktiviert. Zelltod und Gewebsnekrose schreiten fort und lösen inflammatorische und fibrotische Prozesse aus, welche gleichzeitig die erste Instanz des kardialen Remodelling darstellen. Die Nekrose bewirkt eine Komplementaktivierung und die Generierung freier Radikale (aktivierter Sauerstoff und Sauerstoffintermediärprodukte: „Reaktive Oxygen Spezies“ (ROS)), was die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor α (TNF) initiiert. Diese gelangen bei der Reperfusion in den Organismus und lösen eine verstärkte Inflammation aus, aus der eine Chemokin- und Komplement-vermittelte Rekrutierung von Immunzellen ins Myokard resultiert.

ROS entstehen sowohl als Nebenprodukte bei Stoffwechselreaktionen als auch unter pathologischen Bedingungen. Radikalquellen stellen die Xanthinoxidase, die mitochondriale Atmungskette, die Cytochrom P450-Oxidase vermittelte Biotransformation, die peroxisomale β -Oxidation, die NADPH-Oxidase neutrophiler Granulozyten und die Autooxidation von Katecholaminen dar (Böcker *et al.*, 2004, Zorov *et al.*, 2006). Freie Radikale interagieren mit Proteinen, Kohlenhydraten, Fettsäuren, Phospholipiden und Nukleinsäuren, induzieren damit u.a. die Ruptur von mitochondrialen Membranen und Zellmembranen und lösen weitere inflammatorische Reaktionen

aus. Diese Ereignisse haben einen wesentlichen Anteil am Ausmaß des Reperfusionsschadens (Li und Jackson, 2002).

Apoptose spielt in den ersten zwei Wochen nach Infarkt eine wichtige Rolle. Auch in benachbarten Bereichen der ischämischen Zone bestimmt sie weit mehr die Infarktgröße als Nekrose, welche ausschließlich im ischämischen Areal selbst auftritt (Anversa *et al.*, 1998). Im Grenzbereich zwischen infarziertem und nicht-infarziertem Myokard konnten bedeutende Zahlen apoptotischer Zellen nachgewiesen werden (Bialik *et al.*, 1997, MacLellan und Schneider, 1997, Palojoki *et al.*, 2001, Saraste *et al.*, 1997). Die ischämische Nekrose ist durch den Ausfall der Ionenpumpen, dadurch bedingte Ca^{2+} -Überlastung und Na^+ -Einstrom sowie den darauffolgenden osmotischen Wassereinstrom und das Anschwellen der Zelle gekennzeichnet. Dies führt zur Ruptur der Zellmembran und zum Verlust der zellulären Integrität. Die Freisetzung des Zellinhaltes setzt einen inflammatorischen Prozess in Gang. Beim apoptotischen Zelltod bleibt die membranäre Integrität jedoch erhalten, so dass es nicht zur Inflammation kommt. Trotzdem verursacht Apoptose den Verlust großer Zellzahlen und bestimmt die Infarktgröße. Die Zelle pumpt Ionen, v.a. K^+ , nach außen und kontrahiert ihr Zytoskelett, wodurch die Zelle schrumpft, während die DNA durch Endonukleasen abgebaut wird. Membranäre Vesikel schnüren sich ab und werden von phagozytierenden Zellen aufgenommen. Ausgelöst wird der programmierte Zelltod durch viele unterschiedliche Mechanismen. Hierzu zählt die Ligandenbindung an Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie, die stress-induzierte Aktivierung von Proteinen der Bcl-2-Familie und Freisetzung mitochondrialer pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom c durch die veränderte Membranpermeabilität und die Öffnung mitochondrialer „Permeability Transition Pores“ (MPT) ins Zytoplasma sowie die Aktivierung verschiedener Proteolyse induzierender Effektorcaspasen (Valen, 2003, Zorov *et al.*, 2006).

1.2 Myokardiale Präkonditionierung

Eine myokardiale Protektion gegenüber einer ischämischen Schädigung kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Reize induziert werden. Hierzu zählen die klassische

lokale ischämische Präkonditionierung, aber auch systemische Stimuli wie Hypoxie, Hyperoxie, Hyper- und Hypothermie, Anästhetika, Virulenzfaktoren wie Lipopolysaccharid (LPS) und Lipoteichonsäure (LTA), Ischämie-Reperfusion anderer Organe wie Darm, Gehirn, Extremitäten („remote conditioning“) und lokale Postkonditionierung durch kurze I/R-Zyklen nach einer Ischämie (Maulik und Das, 2002, Przyklenk *et al.*, 2003, Tahep *et al.*, 2001, Zacharowski *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2003).

Zwischen ischämischer Toleranz und Endotoxintoleranz, einem hyporesponsiven Immunstatus in Folge wiederholter LPS-Applikationen, existieren beachtliche Übereinstimmungen. Sowohl eine ischämische als auch eine Endotoxintoleranz gliedern sich in zwei unterschiedliche zeitliche Perioden (Guo *et al.*, 1998, Ziegler-Heitbrock, 1995). In der frühen Phase induziert der auslösende Reiz nach wenigen Minuten eine ischämische Toleranz, in der späten Phase entwickelt sich der protektive Mechanismus durch de-novo-Proteinsynthese innerhalb mehrerer Stunden (Kariko *et al.*, 2004b).

1.2.1 LPS-Vorbehandlung

Aus einer Endotoxinämie nach Injektion von LPS, einem Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien, resultiert ein Anstieg inflammatorischer Mediatoren wie Nukleärer Faktor κ B (NF κ B), Mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK), Zytokine, Chemokine, NO, Matrixmetalloproteinasen (MMP) u.v.m.. Die Endotoxinämie ist charakterisiert durch Blutdruckabfall, gesteigerte Herzfrequenz und Fieber.

Eine LPS-Toleranz führt zu einer reduzierten Zytokinantwort (Ziegler-Heitbrock, 1995). Dieser Effekt wurde mit veränderten G-Protein-Gehalten, gesteigerter Phospholipase D und Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) – Expression und reduzierter Proteinkinase C, MAPK- und I κ B-Aktivität in Zusammenhang gebracht (Bowling *et al.*, 1995, Kraatz *et al.*, 1999a, Kraatz *et al.*, 1999b, Makhlof *et al.*, 1998, Medvedev *et al.*, 2000, Tominaga *et al.*, 1999, West *et al.*, 1997, Yoza *et al.*, 1998). Andere Arbeitsgruppen beschrieben eine Verminderung der IRAK-Aktivierung, MyD88- und TLR4-Proteinexpression bei gleichzeitigem Anstieg von LBP, CD14, MD2 und TLR2 (Fan und Cook, 2004) (siehe Kap. 1.5). Auch nach wiederholter LTA-Applikation wurde eine

Desensibilisierung beobachtet. Interessanterweise ist nach LTA oder LPS-Gabe die Zytokinantwort auf den jeweils anderen Stimulus abgeschwächt (Kreuztoleranz). LPS- und Kreuztoleranz könnten einerseits auf eine verminderte Aktivität von Adaptermolekülen, die den relevanten Signalkaskaden gemeinsam sind (MyD88, IRAK, TRAF, I κ B), zurückzuführen sein, andererseits intrazelluläre Feedback-Inhibitoren aktivieren, die die Signaltransduktion unterbinden (Lehner *et al.*, 2001, Medzhitov *et al.*, 1998, Yang *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 1999). Diese Vorgänge spielen möglicherweise auch bei der ischämischen Toleranz eine Rolle.

Der kardioprotektive Effekt von LPS wurde erstmals von Brown *et al.* publiziert (Brown *et al.*, 1989). Die Arbeitsgruppe wies nach, dass eine einmalige LPS-Stimulation vor Induktion eines Myokardinfarkts zur Auslösung einer ischämischen Toleranz ausreicht. Endotoxine lösten innerhalb von 60 min oxidativen Stress aus, welcher nach progressivem Anstieg von Antioxidantien zurück ging (Brown *et al.*, 1989, Maulik *et al.*, 1995, Rowland *et al.*, 1996). Maulik *et al.* beschrieben eine Zunahme von antioxidativen Enzymen wie Superoxiddismutase (SOD), Katalase, Glutathionperoxidase, -reduktase, sowie Thiolen und Ascorbin. Die protektive Wirkung gliedert sich jedoch in eine Vielzahl miteinander verknüpfter Mechanismen. Unter anderem wird eine Inhibition der NF κ B-Translokation in den Nukleus und eine verminderte kardiale Zytokinsynthese sowie TNF-Plasmakonzentration erzielt (Hiasa *et al.*, 2001; Shames *et al.*, 1998). Aber auch die Applikation von Zytokinen selbst wirkt protektiv (Belosjorow *et al.*, 1999, Hiasa *et al.*, 2001, Shames *et al.*, 1998). LPS ruft die Aktivierung von MAPKs hervor, andererseits induziert eine LPS-Toleranz eine p38- und ERK-Suppression (Geppert *et al.*, 1994, Kraatz *et al.*, 1999b, Tominaga *et al.*, 1999).

Eine andauernde LPS-Behandlung (16-24h) induziert im Herzen pro- und anti-apoptische Mechanismen und führt zu einem moderaten Anstieg der Apoptoserate (Li *et al.*, 2002a, McDonald *et al.*, 2000). Allerdings beobachteten Chao *et al.* einen zelltypspezifischen protektiven LPS-Effekt nur bei Kardiomyozyten, nicht jedoch in Endothelzellen aus humaner Nabelschnur (Chao *et al.*, 2005). Diese Beobachtung deckt sich mit Befunden aus Autopsieberichten, wonach sich bei Sepsispatienten geringe apoptotische Zellzahlen im Herzen, jedoch schwerwiegende Apoptoseraten bei Lymphozyten und gastrointestinalen Epithelzellen fanden (Hotchkiss *et al.*, 2000). Dieser

Befund ließ sich im Tiermodell reproduzieren (Hotchkiss *et al.*, 1997). Eine LPS-Vorbehandlung verbesserte die Überlebensrate und Funktion von Kardiomyozyten, die einer Hypoxie und Serumentzug ausgesetzt wurden (Chao *et al.*, 2005). Die $[Ca^{2+}]$ -Transiente und myozytäre Kontraktilität erhöhten sich, außerdem wurde IRAK1 aktiviert. Mit Hilfe von pharmakologischen Inhibitoren wiesen Chao *et al.* nach, dass die Signalwege via PI3K/Akt, ERK1/2 und IKK β den anti-apoptischen Effekt durch LPS vermittelten. Eine vermehrte IRAK1-Aktivierung konnte darüber hinaus auch im I/R-Tiermodell nachgewiesen werden. Apoptose von Kardiomyozyten spielt eine wichtige Rolle für die Größe des ischämischen Myokardschadens und ist sowohl im geschädigten humanen Herzen als auch in tierischen Infarkt- bzw. I/R-Modellen nachweisbar (Gottlieb *et al.*, 1994, Kajstura *et al.*, 1996, Olivetti *et al.*, 1996, Sam *et al.*, 2000, Saraste *et al.*, 1997, Wencker *et al.*, 2003, Yaoita *et al.*, 1998).

1.2.2 Ischämische Präkonditionierung

Der kardioprotektive Effekt durch ischämische Präkonditionierung (IPC) wurde 1986 von Murry *et al.* beschrieben und von Guo *et al.* erstmals erfolgreich in der Maus reproduziert (Guo *et al.*, 1998, Murry *et al.*, 1986). Seitdem wurde in einer Vielzahl von Studien gezeigt, dass IPC die Infarktgröße, die Häufigkeit von Arrhythmien durch Reperfusion sowie postischämische kontraktile Dysfunktionen signifikant reduziert. Die Kardioprotektion gliedert sich in eine frühe Phase, welche innerhalb weniger Minuten transienter Ischämie einsetzt und nach 1 - 2 h verschwindet, sowie eine späte Phase, die 12 - 24 h nach IPC einsetzt und etwa 72 h andauert. Jedoch ist der intrazelluläre Mechanismus, durch den IPC das Herz schützt, nur teilweise bekannt.

Zu den postulierten Mediatoren gehören Adenosin, Bradykinin, Morphine, Katecholamine und Acetylcholin, die nach Bindung an relevante Rezeptoren Protein Kinase C (PKC) aktivieren und ATP-sensitive K^+ -Kanäle phosphorylieren (Cason *et al.*, 1995). Daneben standen NO, ROS und HSPs im Zentrum der Forschung, letztere jedoch vor allem im Zusammenhang mit der späten Phase der Präkonditionierung (Bolli *et al.*, 1998, Hampton *et al.*, 2003). ROS bewirken eine posttranslationelle Modifikation redox-sensitiver Proteine in der frühen IPC-Phase und beeinflussen dadurch inflam-

matorische Prozesse (Otani, 2004). Auch pro-inflammatorischen Zytokinen wurde eine Beteiligung an der Pathogenese der IPC zugesprochen (Belosjorow *et al.*, 2003, Hiasa *et al.*, 2001). In präkonditioniertem Myokard fällt die intrazelluläre Azidose weniger schwerwiegend aus, ist der Abbau energiereicher Phosphate und der Verlust der Ionenhomöostase weniger stark und der Myokardschaden geringer.

IPC geht mit einer Heraufregulation anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Survivin einher, bei gleichzeitiger Reduktion der pro-apoptotischen Proteine Bax und p53 und des Transkriptionsfaktors AP-1 (Maulik *et al.*, 1999, Maulik *et al.*, 2000, Valen, 2003). Die Aktivierung der ERK-Kaskade wirkt anti-apoptotisch, hat somit einen positiven Einfluss auf die Infarktgröße und ist Bestandteil des IPC-Effektes (Bueno *et al.*, 2000, Ghosh *et al.*, 2000). Eine Inhibierung des ERK-Signalwegs unterbindet die Reduktion der Infarktgröße sowohl in der frühen als auch der späten Phase der IPC (Fryer *et al.*, 2001, Ravingerova *et al.*, 2003).

1.3 Angeborene Immunabwehr

Das Immunsystem bewahrt den Organismus vor Krankheitserregern und ist in die angeborene und die erworbene Immunabwehr zu unterteilen. Während letztere sich durch ihre Spezifität, Anpassungs- und Gedächtnisfähigkeit auszeichnet, die T- und B-Zellen ermöglichen, molekülspezifische Antikörper zu bilden, ist die angeborene Immunabwehr genetisch determiniert, zum Zeitpunkt der Geburt funktionsfähig und stellt somit die erste Instanz bei der Reaktion auf infektiöse Substanzen dar. Sie beruht auf einer mechanischen Barriere (Epi-/Dermis, Mucosa), Immunzellen wie Mastzellen, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten und schließlich Proteinen, die pathogene Faktoren erkennen.

Zur Diskriminierung dieser Virulenzfaktoren besitzt die angeborene Immunabwehr eine Reihe von phylogenetisch hochkonservierten Rezeptoren, genannt Mustererkennungsrezeptoren bzw. „Pattern Recognition Receptors“ (PRRs), die der spezifischen Erkennung von unterschiedlichen Pathogenen („Pathogen Associated Molecular Patterns“) dienen (Medzhitov und Janeway, Jr., 2000). Die wichtigste Rezeptorfamilie innerhalb der angeborenen Immunabwehr sind die Toll-Like Rezep-

toren (TLRs). Inzwischen wurden 13 TLRs beschrieben, aber noch nicht alle im Detail charakterisiert (Tab. 1.1) (Zhang *et al.*, 2004a). Zu den PRRs gehören außerdem CD14, Rezeptoren der „Advanced Glycation Endproducts“ (RAGE) und „Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)“-Rezeptoren (Bierhaus *et al.*, 2005, Ferrero *et al.*, 1993, Inohara *et al.*, 1999).

1.4 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Besonders intensiv setzte sich die Forschung bislang mit der Funktion von TLR2 und -4 auseinander. Auch ihre Rolle beim Myokardinfarkt wurde in ersten Ansätzen untersucht (Chong *et al.*, 2004, Oyama *et al.*, 2004, Shimamoto *et al.*, 2006, Shishido *et al.*, 2003). Zunächst wurde bekannt, dass TLR4 die LPS-Erkennung vermittelt, während TLR2 die Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien wie Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykan bindet (Hoshino *et al.*, 1999, Poltorak *et al.*, 1998b, Poltorak *et al.*, 1998a, Takeuchi *et al.*, 1999). Weitere TLRs identifizieren eine Vielzahl anderer Virulenzfaktoren wie doppelsträngige RNA (TLR3), bakterielles Flagellin (TLR5) oder bakterielle DNA (TLR9) (Alexopoulou *et al.*, 2001, Hayashi *et al.*, 2001, Hemmi *et al.*, 2000). In der Zwischenzeit konnten weitere TLR-Liganden endogenen Ursprungs beschrieben werden, welche durch Organschädigung und oxidativen Stress freigesetzt werden („Damage-Associated Molecular Patterns“). Obwohl frühere Ergebnisse womöglich auf Kontaminationen mit bakteriellen Bestandteilen zurückzuführen waren, gibt es nun gesicherte Erkenntnisse darüber, dass zu diesen Molekülen antimikrobielle Peptide (β -Defensin; \rightarrow TLR2- + TLR4-Antwort) (Biragyn *et al.*, 2002), ROS (\rightarrow TLR2-Antwort) (Frantz *et al.*, 2001), High Mobility Group Box 1-Proteine (HMGB1, \rightarrow TLR2, TLR4) (Park *et al.*, 2006), Surfactant Protein-A (SP-A, \rightarrow TLR4) (Guillot *et al.*, 2002), Fibrinogen (\rightarrow TLR4) (Smiley *et al.*, 2001), Fibronectin (\rightarrow TLR2, TLR4) (Okamura *et al.*, 2001, Su *et al.*, 2005), Hyaluronsäure (\rightarrow TLR2, TLR4) (Scheibner *et al.*, 2006, Termeer *et al.*, 2002) und HSP 60 und 70 (\rightarrow TLR2, TLR4) (Cohen-Sfady *et al.*, 2005, Satoh *et al.*, 2006) gehören. TLR3, -7, -8 und -9 sind in der Lage neben bakteriellen und viralen auch wirtseigene Nukleinsäuren zu erkennen (Heil *et al.*, 2004, Hemmi *et al.*, 2000, Kariko *et al.*, 2004a).

EINLEITUNG

| Rezeptor | Ligand | Ursprung des Liganden |
|----------|--|---|
| TLR1 | TLR2-Corezeptor Triacylierte Lipopeptide Lösliche Faktoren | Bakterien und Mycobakterien <i>Neisseria meningitidis</i> |
| TLR2 | Lipoprotein / Lipopeptide Peptidoglykan Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Phenol-lösliches Modulin Glycoinositolphospholipide Glycolipide Porine Atypisches Lipopolysaccharid Atypisches Lipopolysaccharid Zymosan Sauerstoffradikale β-Defensin High Mobility Group Protein Box 1 Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 Heat-shock Protein gp96 Fibronektin | Unterschiedliche Pathogene Gram-positive Bakterien Gram-positive Bakterien Mycobakterien <i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Pilze Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt |
| TLR3 | dsRNA mRNA | Viren Wirt |
| TLR4 | Lipopolysaccharide Taxol Fusionsprotein Hüllproteine Heat-shock Protein 22 Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 Heat-shock Protein gp96 Type III Repeat Domain A des Fibronektins β-Defensin High Mobility Group Box 1-Protein Surfactant Protein A Heparansulfat Hyaluronsäure Fibrinogen | Gram-negative Bakterien Pflanzen Syncytialer Atemwegsvirus Murines Mamacarcinomvirus Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt Wirt |
| TLR5 | Flagellin | Gram-negative Bakterien |
| TLR6 | TLR2-Corezeptor Diacylierte Lipopeptide | Mycobakterien |
| TLR7 | ssRNA ssRNA snRNPs | non-virale und virale ssRNA Wirt Wirt |
| TLR8 | ssRNA ssRNA | non-virale und virale ssRNA Wirt |
| TLR9 | CpG enthaltende DNA | Bakterien |
| TLR10 | Co-Rezeptor? N.N. | |
| TLR11 | | Uropathogenes <i>E.coli</i> |
| TLR12 | N.N. | |
| TLR13 | N.N. | |

Tab. 1.1. Natürliche Vorkommen exo- und endogener Liganden.

1.5 TLR4-Signaltransduktion

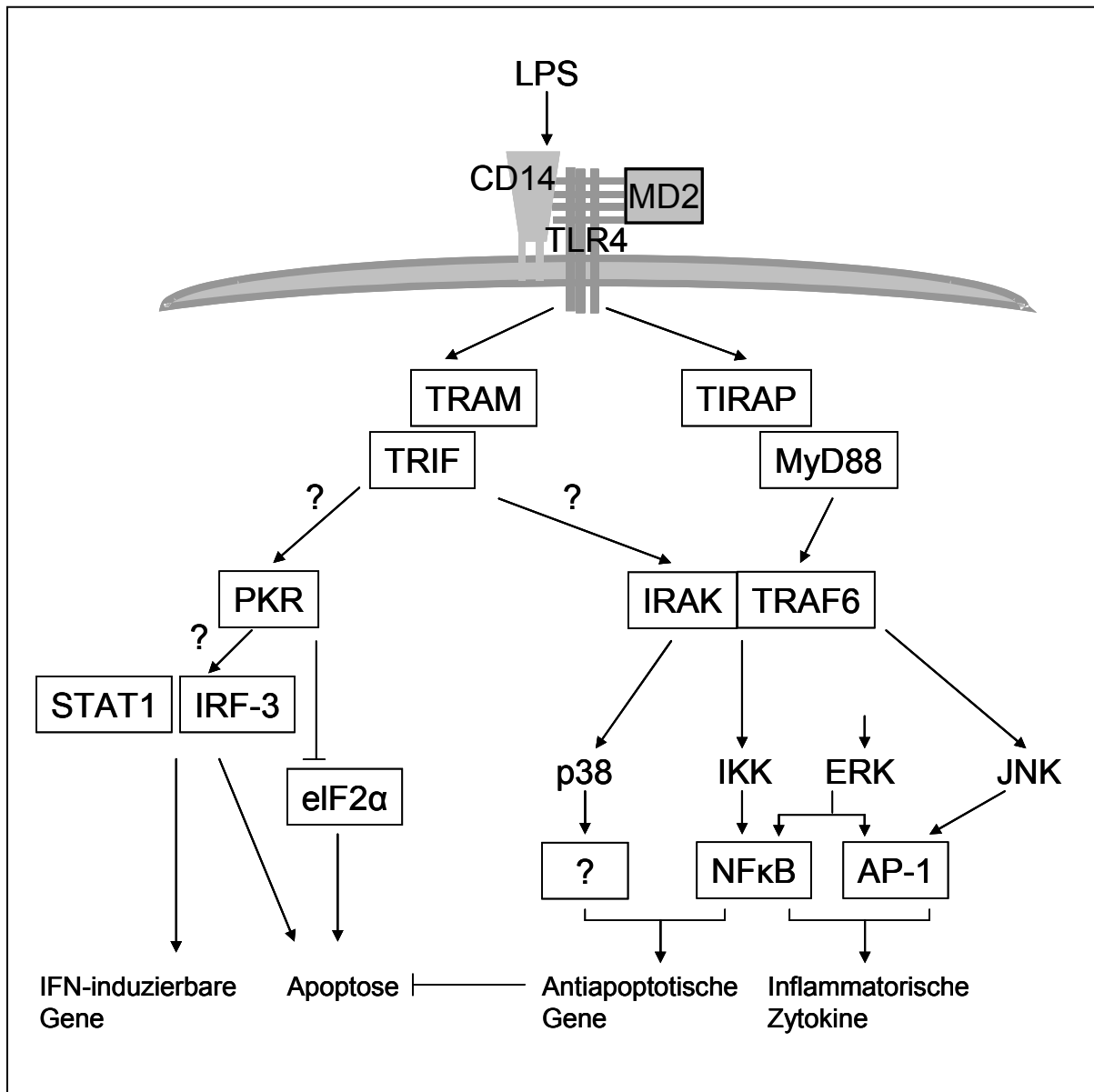


Abb. 1.1. LPS-Signaltransduktionsweg abgewandelt nach Hsu *et al.* (2004). Erklärung der Abkürzungen im Abkürzungsverzeichnis

Die Abbildung zeigt repräsentativ am Beispiel einer gram-negativen Sepsis die derzeitige pathophysiologische Vorstellung des Toll / Interleukin (IL)-1-Rezeptor-Signaltransduktionswegs (Abb. 1.1). Das Erkennen von Lipid-A, der biologisch wirksamen Struktur von LPS, erfordert die Anwesenheit des LPS-Bindungsproteins (LBP), welches oligomere LPS-Mizellen zu Monomeren umformt und so die CD14-Bindung

ermöglicht (Knuefermann *et al.*, 2002, Tobias *et al.*, 1986). CD14 ist ein 53kDa großes Glycophosphatidylinositol (GPI)-gebundenes Glykoprotein, das an der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und Granulozyten als LPS-Rezeptor fungiert (Ferrero *et al.*, 1993). Es besitzt keine transmembranäre Domäne und ist deshalb nicht alleine für die LPS-Signaltransduktion verantwortlich. Es existiert eine lösliche Form, die u.a. in humanem Serum nachgewiesen wurde, und durch den Einfluss von Proteasen von der Membranoberfläche gelöst wird. Lösliches CD14 (sCD14) konkurriert mit membrangebundenem CD14 (mCD14) um die LPS-Bindung. sCD14 kann in Zellen, die selbst kein CD14 exprimieren können, wie Endothel- und Epithelzellen sowie glatten Muskelzellen, die LPS-Antwort vermitteln, es durch die Bindung andererseits aber auch neutralisieren. CD14 bindet neben Lipoproteinen u.a. endogenes HSP60, HSP70 und Ceramid. Eine Änderung der Konformation und Zusammensetzung des CD14-Rezeptorclusters ermöglicht eine Liganden-spezifische Zellantwort (Pfeiffer *et al.*, 2001, Schmitz und Orso, 2002). Die LBP-Bindung an den CD14 / TLR4 / MD2-Rezeptorkomplex bewirkt eine Konformationsänderung der intrazellulären TIR (Toll/IL-1 Rezeptor)-Region. Mittels dieser transmembranären TLR4-Domäne gelangt das Signal in die Zelle und folgt einem MyD88-abhängigen oder unabhängigen Signaltransduktionsweg (Lien *et al.*, 2000)(Abb. 1.1). Bei der MyD88-unabhängigen Transduktion fungieren TRIF (TIR containing adapter including IFN β) und TRAM (TRIF related adapter molecule) als Adaptermoleküle distal von TLR4, welche die Spätphase einer NF κ B-Aktivierung vermitteln (Horng *et al.*, 2001, Horng *et al.*, 2002, Yamamoto *et al.*, 2003a, Yamamoto *et al.*, 2003b, Yamamoto *et al.*, 2002). Beim MyD88-abhängigen Weg werden die Adapterproteine MyD88 und TIRAP (TIR containing adapter protein) aus dem Zytoplasma rekrutiert. Sie verfügen über eine Struktur (TIR-Motiv), die der zytoplasmatischen TLR4-Domäne homolog ist und die Molekülinteraktion erlaubt. In der Folge rekrutiert MyD88 schließlich IRAK (IL-1 receptor associated kinase). Dieses Protein ist an der Phosphorylierung unterschiedlicher Signalmoleküle beteiligt und bildet seinerseits einen Komplex mit TRAF6 (TNF-receptor associated factor). Der IRAK / TRAF6-Komplex löst die Aktivierung der MAPK p38, SAPK / JNKs (stress-activated protein / c-Jun NH₂-terminal kinase), ERKs (extracellular signal-regulated kinase) und die Phosphorylierung und Degradierung von I κ B-Kinase (IKK) sowie die nukleäre Translokation von NF κ B aus. In der Promotorregion der meisten inflammatorisch relevanten Zytokine und Chemokine

wurden NFκB-Bindungsstellen nachgewiesen (Baldassare *et al.*, 1999, Burns *et al.*, 1998, Cario *et al.*, 2000, Hultmark, 1994, O'Neill und Greene, 1998, Takeuchi *et al.*, 2000, Wesche *et al.*, 1997, Yoshidome *et al.*, 1999). Darüber hinaus bewirkt TLR4 auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Fan und Cook, 2004).

Die Expression verschiedener PRRs konnte inzwischen nicht nur in Ganzherzpräparaten, sondern auch auf Kardiomyozyten selbst nachgewiesen werden (Cowan *et al.*, 2000, Frantz *et al.*, 1999, Frantz *et al.*, 2001, Tavener *et al.*, 2004). Die kardiale Relevanz dieser Rezeptoren wurde in ersten Studien an murinen Herzen untersucht (Baumgarten *et al.*, 2006b, Ha *et al.*, 2005, Oyama *et al.*, 2004, Stapel *et al.*, 2006).

Von besonderem Interesse ist die Vermutung, dass TLR4 nicht nur LPS bindet, sondern auch den Anfang der Signaltransduktion weiterer myokardial relevanter Liganden darstellt. So konnte gezeigt werden, dass HSP 60 und 70, Fibrinogen, Hyaluronsäure und Fibronectin Liganden für TLR4 darstellen (siehe Kap. 1.4). Diese aufgeführten Liganden sind am myokardialen Remodelling nach Ischämie oder bei Hypertrophie beteiligt. Insbesondere das Strukturprotein Fibronectin wird bei myokardialen Ischämien freigesetzt und könnte über die Anbindung an TLR4 in direkter Rückkopplung weitere Entzündungs- und Adaptationsprozesse regulieren (Okamura *et al.*, 2001). Es ist jedoch nicht bekannt, ob Organschädigungen unmittelbar die Rezeptorexpression beeinflussen. Eine veränderte TLR-Expression und die daraus resultierende Zytokinexpression wurde nach Endotoxin-Stimulation (Armstrong *et al.*, 2004, Marsik *et al.*, 2003), aber auch nach physiologischem Stress beobachtet (Lancaster *et al.*, 2005).

1.6 Regulation relevanter inflammatorischer Mediatoren

Die Auswahl der hier untersuchten molekularen Prozesse im Myokard umfasst Signalproteine der TLR4-Signalkette (TLR4, CD14, NFκB, AP-1) sowie relevante Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Chemokine, MMPs und TIMPs. Außerdem wurden Elemente mit besonderer Bedeutung bei Hypoxie bzw. Ischämie, nämlich der Hypoxie-induzierte Faktor1 (HIF1) und einige Zielgene (Adrenomedullin (ADM), iNOS

(induzierbare NO-Synthase)) berücksichtigt, deren Bedeutung bei der Entzündungsreaktion erst in jüngerer Zeit bekannt wurde.

Für die frühe Vermittlung einer inflammatorischen Antwort scheint eine kleine Zahl von Zytokinen eine besondere Bedeutung zu haben, die ihrerseits die Expression weiterer Zytokine regulieren. Bei einer lokalen Entzündungsreaktion wird TNF gebildet, welches sich systemisch ausbreitet. Seinerseits bewirkt es die Interleukin (IL)-1 β -Synthese und wirkt somit wie ein Verstärker der Entzündungsantwort. IL-1 β wiederum induziert über TIR-präsentierende Rezeptoren eine Signalkaskade, die in wesentlichen Teilen mit der TLR4-Signaltransduktion übereinstimmt. Virulenzfaktoren wie LPS aber auch kardiale Druckbelastung oder Ischämie induzieren die myokardiale Expression pro-inflammatorischer Zytokine (Baumgarten *et al.*, 2001, Baumgarten *et al.*, 2002, Belosjorow *et al.*, 1999, Dibbs *et al.*, 1999, Muller-Werdan *et al.*, 1998, Werdan und Muller-Werdan, 1996). Diese Mediatoren können in Folge von LPS eine myokardiale Dysfunktion bis hin zum linksventrikulären Pumpversagen verursachen (Werdan und Muller-Werdan, 1996). Sie induzieren aber auch adaptive Prozesse, die ein funktionserhaltendes Ziel haben (Baumgarten *et al.*, 2000). Die TNF-Erkennung via TNF-Rezeptor 1 (TNFR) und TNFR2 scheint nach I/R zytoprotektiv zu wirken und die Apoptoserate von Kardiomyozyten zu vermindern (Kurrelmeyer *et al.*, 2000). Andererseits kann eine TNF-Überexpression pro-apoptotisch wirken und dadurch Remodellingprozesse ermöglichen (Kubota *et al.*, 2001). Auch IL-1 β und IL-6 werden nach myokardialer Schädigung ähnlich wie TNF vom Kardiomyozyten selbst synthetisiert (Chandrasekar *et al.*, 2001, Gwechenberger *et al.*, 1999, Nossuli *et al.*, 2000).

Die „early response genes“ wie TNF und IL-1 β aktivieren Makrophagen, Fibroblasten, Epithel-, Endothelzellen und Kardiomyozyten, die ihrerseits inflammatorische Zytokine und Chemokine produzieren, welche die Einwanderung von Leukozyten aus dem Blut an den Entzündungsort herbeiführen. Darüber hinaus beeinflussen Chemokine Adhäsionsvorgänge am Endothel, transendotheliale Migration der Leukozyten, Exozytose, Bildung von bioaktiven Lipiden, Ca²⁺-Mobilisierung, ROS-Freisetzung, Modulation von Angiogenese und Fibrosierung. Während des Infarkt-heilungsprozesses werden Chemokine verstärkt exprimiert (Frangogiannis und Entman, 2005). Bei Chemokinen handelt es sich um 7-16 kDa kleine Proteine, die

anhand der Cystein-Sequenz in vier unterschiedliche Gruppen unterteilt werden (Frangogiannis und Entman, 2005). Die beiden Hauptgruppen, CXC- und CC-Chemokine, unterscheiden sich durch die Position der beiden ersten Cysteine (C), die entweder durch eine Aminosäure (X) getrennt oder direkt benachbart sind. CXC-Chemokine mit ELR (Glu-Leu-Arg)-Motiv aktivieren neutrophile Granulozyten, ELR-negative CXC-Chemokine besitzen diese Eigenschaft nicht (Strieter *et al.*, 1995). Demgegenüber wirken CC-Chemokine hauptsächlich auf Monozyten, Lymphozyten, eosinophile und basophile Granulozyten. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 α , -1 β , -2, RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), T-Cell Activation Gene (TCA)-3 und Eotaxin gehören zur Gruppe der CC-Chemokine während es sich beim Interferon- γ -inducible Protein (IP)-10 um ein ELR-negatives CXC-Chemokin handelt, welches Neutrophilen gegenüber inaktiv ist. Lymphotactin, welches nur auf Lymphozyten chemotaktisch wirkt, bildet die C-Untergruppe, bei der zwei von vier Cysteinresten fehlen (Frangogiannis und Entman, 2005).

Kommt es zu einem Myokardinfarkt, werden Immunzellen ins ischämische Gewebe rekrutiert, induzieren eine inflammatorische Reaktion und phagozytieren tote Zellen. Etwa 2 - 3 Tage nach Infarkt werden Matrixproteine wie Fibronectin abgelagert; Myofibroblasten wandern ein und synthetisieren Kollagen. In diesem Granulationsgewebe steigt nach einer Woche die Aktivität von kollagenolytischen Matrixmetalloproteinasen an (Cleutjens *et al.*, 1995). Ein Gleichgewicht von Synthese und Degradation des zunehmend verknüpften Kollagen stellt sich ein; es kommt zur Angiogenese im Wundheilungsgebiet (Frangogiannis, 2004). Im letzten Stadium des Reparaturprozesses wandern die Entzündungszellen aus dem Infarktareal ab und hinterlassen eine Infarktnarbe aus einem vollständig vernetzten Kollagengerüst.

Die Degradation der extrazellulären Matrix (EZM) wird durch Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und deren spezifische Inhibitoren (TIMPs) reguliert (Siwik *et al.*, 2001). Die EZM stellt das interstitielle Grundgerüst des Herzens dar, in das Kardiomyozyten und Kapillaren integriert sind. Sie setzt sich aus Matrixproteinen, Basalmembranproteinen, Proteoglykanen, Glucosaminoglykanen und Signalmolekülen zusammen, bewahrt die strukturelle Integrität der Kardiomyozyten und ermöglicht auf diese Weise die Kontraktion des Herzmuskels (Bashey *et al.*, 1992); (Stamenkovic,

2003). Folglich kann ein ungünstiger Verlauf des linksventrikulären Remodellings zur kardialen Dysfunktion führen. Von inflammatorischen und kardialen Zellen freigesetzte MMPs sind an der Kollagendegradation und –synthese, aber auch an Zellmigration und Angiogenese beteiligt. Zu ihren Substraten zählen u.a. Kollagen, Fibronectin, Laminin, Proteoglykane, Elastin, Interleukine, Angiotensin I, Plasminogen und α_2 -Makroglobulin, welches gleichzeitig einen unspezifischen MMP-Inhibitor im Plasma darstellt (Lindsey, 2004). Induziert wird die MMP-Synthese und –Aktivierung durch Zytokine (TNF, IL-1 β , IL-6), Wachstumsfaktoren (TGF β), Hormone (Angiotensin II, Endothelin-1, Norepinephrin), Hypoxie, ROS u.a. via AP-1 und NF κ B (Bradham *et al.*, 2002, Coker *et al.*, 2001, Creemers *et al.*, 2001, Deschamps und Spinale, 2006, Siwik und Colucci, 2004). Aktivierend agieren EMMPRIN (Extracellular MMP Inducer) und membrane type-MMP (mt-MMP), welche von Myozyten nach einem Myokardinfarkt vermehrt exprimiert werden (Spinale *et al.*, 2000).

Das kardiale Remodelling nach MI bringt im Laufe der darauffolgenden Monate bis zur fertigen Infarkt Narbe molekulare, zelluläre und funktionelle Veränderungen mit sich: Im Verlauf des Remodellingprozesses degradieren Matrixmetalloproteinasen zunächst Kollagenfibrillen. Im darauffolgenden kompensatorischen Abschnitt kehrt die MMP-Aktivität und Kollagensynthese zum Normalzustand zurück während die Kardiomyozyten sukzessiv hypertrophieren. Die abschließende Phase zeichnet sich durch eine wiederum erhöhte MMP-Aktivität und Fibrosierung aus. Der Reparaturprozess muss streng regulierend in einem Gleichgewicht aus Kollagensynthese und –abbau ablaufen. Eine übermäßige Kollagenablagerung führt zu ventrikulärer Dysfunktion und schließlich Herzversagen, während eine mangelnde Kollagensynthese bzw. übermäßige Kollagendegradation zu ventrikulärer Dilatation und womöglich sogar Ruptur des Myokards führt.

Die Regulation der MMPs erfolgt auf Ebene der Transkription, Translation, Sekretion und Aktivierung sowie Inhibition. Alle TIMPs inhibieren jeweils alle MMPs, unterscheiden sich jedoch in ihrer Affinität und werden ebenso wie MMPs in verschiedenen Organen differentiell synthetisiert (Lindsey, 2004, Pagenstecher *et al.*, 2000). Beispielsweise wird TIMP-4 herzspezifisch konstitutiv exprimiert (Liu *et al.*, 1997). Über seine Funktion als MMP-Inhibitor hinaus wurden für TIMP-3 pro-apoptische Eigenschaften und das Unterbinden von Zellmigration und Angiogenese nachge-

wiesen, da es TACE/ADAM-17 (TNF α -converting enzyme/a disintegrin and metalloproteinase) und damit auch die Entstehung löslichen TNFs inhibiert (Black, 2004, Fedak *et al.*, 2003).

Durch Hypoxie und Ischämie wird der Transkriptionsfaktor HIF1 aktiviert. Bei HIF1 handelt es sich um ein Heterodimer, das aus der 120 kDa HIF1 α -Untereinheit sowie der 91-94 kDa großen HIF1 β -Untereinheit besteht (Lee *et al.*, 2004). Unter normoxischen Bedingungen wird HIF1 α durch die HIF1 Prolyl-4-Hydrolase 1 – 3 (PHD) hydroxyliert. Bei Hypoxie steigt die Menge von HIF-1 α und stimuliert die Transkription von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Die Zellen des angeborenen Immunsystems erhalten ihre Energie nahezu vollständig aus der Glykolyse, was das Überleben unter hypoxischen Bedingungen erleichtert. Die Regulation der meisten Proteine, die für die Anpassung an solche Bedingungen benötigt werden, erfolgt durch transkriptionelle Kontrolle. Der Transkriptionsfaktor HIF1 bindet an eine konservierte Sequenz im Hypoxia Response Element der regulierten Gene. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden über einhundert HIF1 Zielgene identifiziert. Dadurch reguliert HIF1 Prozesse wie Angiogenese (ADM, VEGF), Apoptose (ADM, Bcl-2), Zellproliferation, Vasomotorik (Endothelin-1, ADM, iNOS, ANP), Energiemetabolismus (Glukosetransporter (GLUT), versch. Enzyme der Glykolyse) uvm.. HIF1 α verfügt über eine Sauerstoff-abhängige Degradierungsdomäne, die die Proteinstabilität gewährleistet und unter normoxischen Bedingungen hydroxyliert wird. Unter hypoxischen Bedingungen ist O₂ als Substrat der PHD nicht verfügbar und HIF1 α kann mit HIF1 β dimerisieren. HIF1 wird nicht nur O₂-abhängig reguliert, sondern spielt auch bei Normoxie eine Rolle bei Zelltod, Immunantworten und Adaption an mechanischen Stress, da es z.B. durch verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren und NO aktiviert werden kann (Blouin *et al.*, 2004, Frede *et al.*, 2006).

Hypoxie beeinflusst die Bildung von NO durch Induktion der iNOS, deren Transkription durch HIF1 verstärkt wird. Drei verschiedene NO-Synthasen erzeugen NO aus L-Arginin (Moncada *et al.*, 1991). Neuronale (nNOS) und endotheliale (eNOS) NOS werden konstitutiv exprimiert und Ca²⁺-abhängig reguliert. Sie synthetisieren nur geringe NO-Mengen. Im Gegensatz dazu produziert die durch Zytokine induzierte iNOS große Mengen NO. Die basale NO-Synthese durch eNOS reguliert Gefäßtonus, Blutdruck und Gewebedurchblutung. Hohe NO-Spiegel können einer-

seits toxisch auf Mikroben und Parasiten wirken, andererseits aber auch körpereigene, gesunde Zellen schädigen.

NO wirkt seinerseits steigernd oder hemmend auf die HIF1 vermittelte Induktion von Hypoxie-induzierbaren Genen wie Erythropoietin und VEGF ein. ROS beeinträchtigen die Expression von HIF1 α in hypoxischen Zellen und die DNA-Bindungsaktivität von HIF1. Außerdem konnte gezeigt werden, dass HIF1 α sogar unter normoxischen Bedingungen durch ROS, welche von Zytokinen induziert wurden, in der Expression verstärkt wird (Sandau *et al.*, 2000).

Zu den HIF1-Zielgenen gehört auch Adrenomedullin. Dieses wird aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit der Calcitonin-/ „calcitonin gene-related peptides“ (CGRP)-Familie zugeordnet und besitzt einen deutlichen vasorelaxierenden Effekt (Sabates *et al.*, 1997). Dieser wird einerseits über eine direkte Relaxation der glatten Muskelzellen durch Aktivierung der Adenylylcyclase, andererseits über einen indirekten Mechanismus durch Freisetzung von NO aus dem Endothel vermittelt. Adrenomedullin wird durch unterschiedliche pathologische Zustände nicht nur des kardiovaskulären Systems freigesetzt. Hierzu zählen Hypoxie und Ischämie, Hyperglykämie, Bluthochdruck, Herzinsuffizienz, Myokardinfarkt, septischer Schock u.a. (Eto *et al.*, 2003).

1.7 Ziele der Arbeit

Ziel des Projektes war es, die Bedeutung des TLR4 für den myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden zu untersuchen. Darüber hinaus sollte seine Rolle bei der Vermittlung einer LPS-Vorbehandlung sowie einer ischämischen Präkonditionierung aufgeklärt und etwaige Gemeinsamkeiten der protektiven Mechanismen ermittelt werden. Hierzu wurde der Effekt einer TLR4-Defizienz sowie der beiden Präkonditionierungsarten auf die Infarktgröße mittels histologischer Färbetechniken analysiert. Weiterhin wurde die Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren zu diesen Daten in Beziehung gesetzt und deren Bedeutung bei der Vermittlung des kardioprotektiven Effektes erfasst.

2 Material und Methoden

Detaillierte Angaben zu den Herstellern bzw. Lieferanten von Geräten und Chemikalien finden sich in den Kapiteln 2.7 und 2.8.

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere wurden 8-12 Wochen alte männliche Mäuse verwendet. Zuchtpärchen der Inzuchtlinien C3H/HeN, C3H/HeJ und C57Bl/6 wurden bei Charles River erworben und im institutseigenen Tierstall gezüchtet. Bei C3H/HeN und C57Bl/6-Stämmen handelt es sich um Wildtyp-Mäuse (WT), während C3H/HeJ-Mäuse einen LPS-hyporesponsiven Phänotyp besitzen (TLR4-defizient, TLR4-D), der durch eine Punktmutation und den Austausch von Prolin gegen Histidin in der intrazytoplasmatischen Region des TLR4 zustande kommt (Qureshi *et al.*, 1999). TLR4-Knockout (KO)-Zuchtpaare mit C57Bl/6- Hintergrund, die eine vollständige Deletion des TLR4 aufweisen, stellte uns Dr. S. Akira zur Verfügung (Akira *et al.*, 2000). Die Aufzucht und Haltung der Tiere erfolgte entsprechend artgerechter, gesundheitlicher und qualitativer Kriterien in Gruppen von fünf Tieren in transparenten, einzeln belüfteten Polycarbonat-Käfigen der Größe 365 x 207 x 140 mm (Länge x Breite x Höhe). Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20 - 22°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Als Einstreu wurde Altromin-Tiereinstreu-Granulat verwendet. Futter (Altromin Standarddiät Maus und Ratte) und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Eine Genehmigung der Tierversuche durch die Bezirksregierung Köln lag vor (Aktenzeichen 50.203.2-BN43 13/02, 50.203.2-BN43 32/04).

2.2 Versuchsprotokoll und Gruppeneinteilung

Alle Mäuse wurden einem operativen Eingriff unterzogen, um eine Ligatur der linken anterioren deszendierenden Koronararterie (LAD) vornehmen zu können (siehe 2.3.1). Es wurde ein sogenanntes Closed-Chest-Modell angewendet, das eine

gegenüber der Instrumentierung um 5-7 Tage versetzte Infarzierung vorsah. Diese zeitliche Verzögerung vermindert den Einfluss von inflammatorischen Mediatoren, welche infolge des operativen Traumas freigesetzt werden, auf die nachfolgenden Versuchsbedingungen (Nossuli *et al.*, 2000).

Nach der Wundheilung folgten entweder eine Vorbehandlung mit Lipopolysaccharid (LPS) oder eine ischämische Präkonditionierung (IPC) sowie unterschiedliche Ischämie-Reperfusion-Protokolle (I/R) (siehe 2.3.2). Ein Teil der Herzen wurde nach 24 h Reperfusion gefärbt, um die Infarktgröße vermessen zu können. Bei allen übrigen Tieren wurden nach 1 - 6 h Reperfusion Herzen und Serum für unterschiedliche molekularbiologische Untersuchungen gewonnen.

2.3 In-vivo-Eingriffe Okklusion Reperfusion

2.3.1 Instrumentierung Okklusion-Reperfusion

Die Einleitung der Narkose erfolgte in einer Inhalationsbox mit 2 Vol. % Isofluran und einem O₂-Frischgasfluss von 1 l / min. Im Anschluss daran wurde das Tier auf einem temperierten Operationstisch (37°C) fixiert. Die Anästhesie wurde bis zur Intubation durch einen Nasenkonus fortgeführt. Nach dem Enthaaren und Desinfizieren (Betasisodona) des Operationsgebietes wurde bei 6-facher Vergrößerung unter stereomikroskopischer Sicht (ZEISS OP-Mikroskop) ein medianer Hautschnitt von der Mandibula bis zum Processus xiphoideus durchgeführt. Die beiden subkutan liegenden Speicheldrüsenlappen wurden median stumpf getrennt und die Intubationskanüle des Beatmungsgerätes (MiniVent) unter Sichtkontrolle endotracheal eingeführt. Die Beatmung erfolgte bei einem Atemzugvolumen von 200 µl und einer Atemfrequenz von 110 Atemzügen pro Minute (Abb. 2.1A, B).

Bei der nachfolgenden Thorakotomie wurde der Thorax vom 2. bis zum 4. Inter-costalraum parasternal eröffnet. Mittels zweier Retraktoren wurden die Wundränder gespreizt und die beiden Thymuslappen - sofern sichtbar - nach lateral verschoben und mit den Retraktoren fixiert.

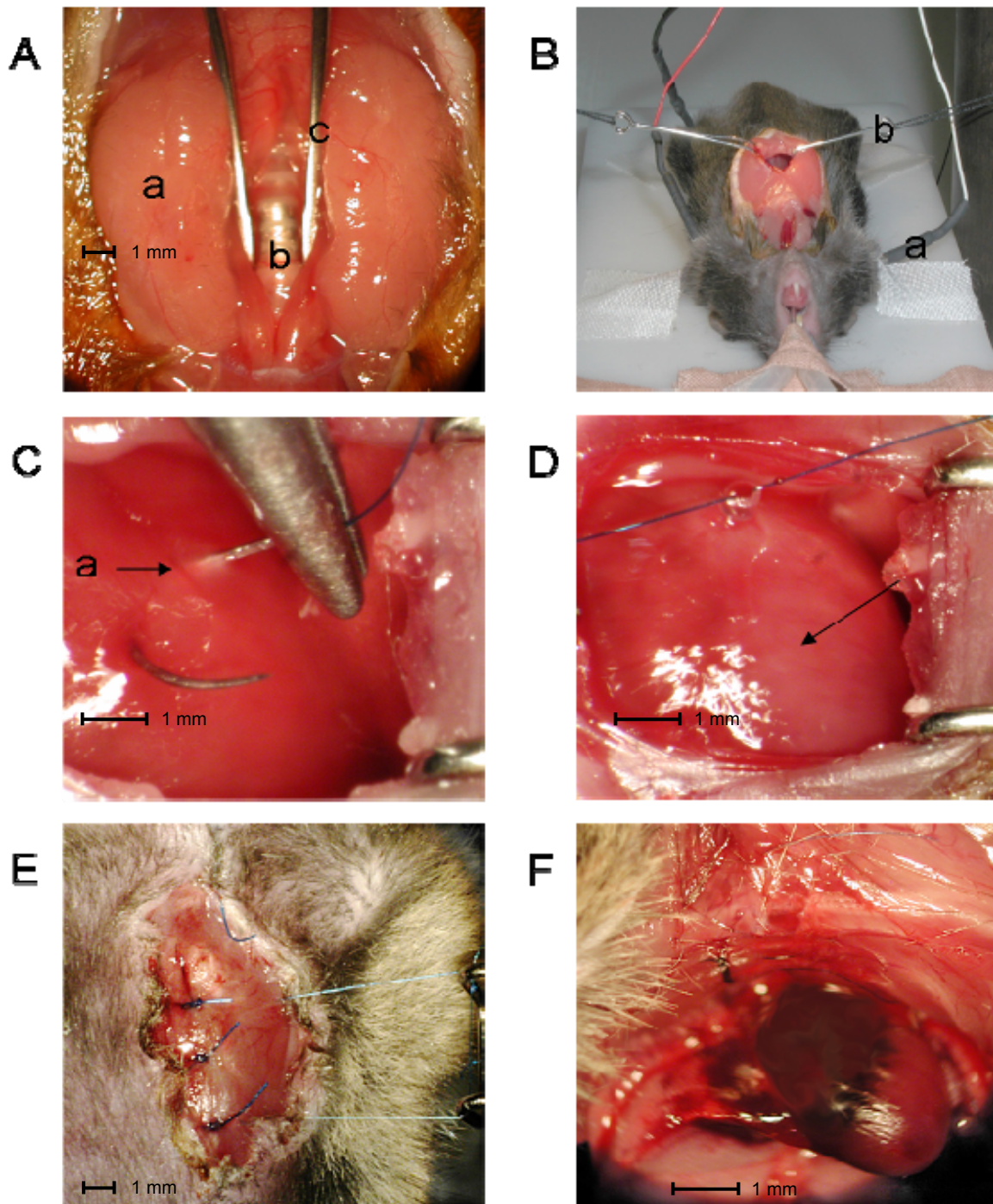


Abb. 2.1. Ablauf der Instrumentierung. A Intubationsmethode. Halsbereich der Maus, Ventralansicht nach Hautschnitt und Präparation der Trachea. (a) Glandulae mandibulares, (b) Trachea mit Endotrachealkanüle, (c) stumpfe Pinzette. B Thorakotomie. (a) EKG Elektroden, (b) Retraktoren. C Setzen des Ligaturfadens unter der LAD (a). D Überprüfung des korrekten Sitzes des Okkluders durch sichtbare Blässe im minderperfundierten Myokard apikal der LAD-Ligatur (Pfeil). E Präparation der Haut und Okklusion 5 d nach OP. F Blaufärbung des distalen, nicht LAD-versorgten Myokards.

Bei 16-facher Vergrößerung wurde ein monofiler Faden der Stärke 8-0 unterhalb der LAD, ca. 1-3 mm von der Spitze des linken Aurikels entfernt, durchgeführt (Abb. 2.1C). Die Faden-Enden wurden durch ein 0,5 mm langes Stück eines Polyethylen-Schlauchs, der als Okkluder später die LAD verschließt, geschoben. Die korrekte Positionierung des Okkluders wurde durch eine kurze Okklusion überprüft, die zu einer sichtbaren Blässe des minderperfundierten Myokards apikal der LAD-Ligatur führte (Abb. 2.1D). Anschließend wurde je ein Fadenende mit einer Nadel (Kalt-Nadel, Größe 3) durch den 2. und 4. Intercostalraum nach außen verlegt und dort miteinander verknotet, so dass eine Schlaufe entstand. Diese wurde in eine Hauttasche verlegt und der Thorax anschließend bei 6-facher Vergrößerung mit einem monofilen Faden der Stärke 6-0 durch mehrere Einzelheft-Nähte verschlossen. Die Haut wurde mit einem monofilen Faden der Stärke 6-0 fortlaufend genäht. Nach Beendigung der Isofluranzufuhr wurde das Tier bei Rückkehr zu einer regelmäßigen Spontanatmung extubiert. Unter einer Wärmelampe wurde die Maus bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose überwacht. Zur postoperativen Schmerztherapie erhielt jede Maus vor Abfluten des Isoflurans einen Bolus von 0,1 ml Temgesic-NaCl (0,0015 mg Temgesic/Tier).

2.3.2 Vorbehandlung und Präkonditionierung

2.3.2.1 Versuchsprotokoll LPS-Vorbehandlung

In dieser Studie wurden C3H/HeN bzw. C57Bl/6 (WT) und TLR4-defiziente C3H/HeJ (TLR4-D) bzw. TLR4-KO eingesetzt. Die Verwendung der unterschiedlichen Mausstämmen ist darauf zurückzuführen, dass als LPS-hyporesponsive Mauslinie zunächst nur der beschriebene C3H/HeJ-Stamm zur Verfügung stand. Erst im Verlauf des Projektes war es möglich, TLR4-KO-Mäuse zu erhalten. Bei der Etablierung des Infarktmodells erwiesen sich die beiden Wildtypstämme als unterschiedlich sensitiv, so dass zu Beginn der Versuchsserie bei C3H/HeN und C3H/HeJ-Mäusen eine Infarktdauer von 60 min notwendig war, um messbare Infarktgrößen zu erreichen. In den entsprechenden Versuchen an C57Bl/6 und TLR4-KO-Mäusen wurden mit 30 minütiger Ischämie reproduzierbare Infarktgrößen, bei einer gleichzeitig verringerten Letalität, erzielt.

Nach Operation zur Implantation des Okklusionsfadens wurden die Tiere in folgende Gruppen aufgeteilt:

Gruppe 1: WT, PBS (Phosphatpufferlösung), Okklusion

Gruppe 2: TLR4-D/KO, PBS, Okklusion

Gruppe 3: WT, LPS-Vorbehandlung, Okklusion

Gruppe 4: TLR4-D/KO, LPS-Vorbehandlung, Okklusion

Alle Gruppen erhielten 16 h vor der Infarzierung entweder eine PBS- (Gruppe 1, 2) oder LPS-Injektion (Gruppe 3, 4; 1 mg LPS /kg Körpergewicht) (Abb. 2.2). Die planimetrischen Vermessungen des Infarktareals beschränkten sich auf diese vier Gruppen und wurden bei den Stämmen C3H/HeN und C3H/HeJ nach 60 min Ischämie durchgeführt.

In die anschließenden molekularbiologischen Untersuchungen wurden vier zusätzliche Gruppen einbezogen. Die im Folgenden „schein-operiert“ (SOP) genannten Tiere durchliefen den gleichen Versuchsablauf bestehend aus Instrumentierung,

Vorbehandlung und Propofol-Narkose (siehe 2.3.3), jedoch wurde auf eine Okklusion der LAD verzichtet. Jeweils die Hälfte der WT und TLR4-D bzw. KO-Mäuse erhielt eine PBS- bzw. LPS-Injektion.

Gruppe 5: WT, PBS, schein-operiert

Gruppe 6: WT, LPS, schein-operiert

Gruppe 7: TLR4-D/KO, PBS, schein-operiert

Gruppe 8: TLR4-D/KO, LPS, schein-operiert

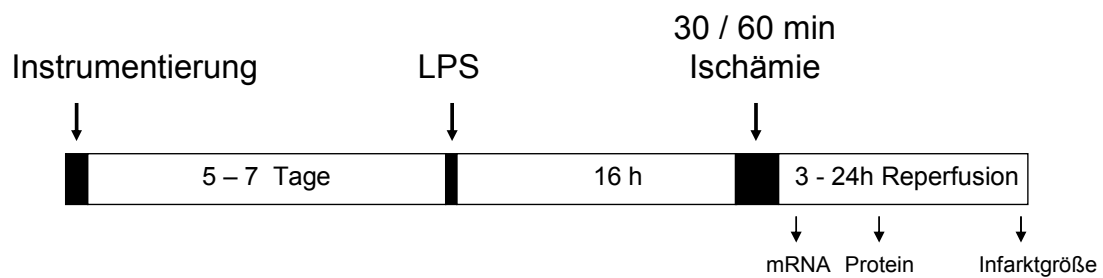


Abb. 2.2. Versuchsablauf der LPS-Vorbehandlung.

2.3.2.2 Versuchsprotokoll Ischämische Präkonditionierung

Bei den Versuchen zur ischämischen Präkonditionierung (IPC) wurden C57Bl/6 und TLR4-KO-Mäuse verwendet und nach Operation in folgende Gruppen aufgeteilt:

Gruppe 1: WT, Okklusion

Gruppe 2: TLR4-KO, Okklusion

Gruppe 3: WT, IPC + Okklusion

Gruppe 4: TLR4-KO, IPC+ Okklusion

Die Infarktareale dieser Gruppen wurden planimetrisch vermessen. In die molekularbiologischen Untersuchungen gingen zudem die Daten von unbehandelten Kontrolltieren beiderlei Genotyps ein.

Die Gruppen 3 und 4 wurden vor der Okklusion der LAD (30 min) ischämisch präkonditioniert, indem sie drei alternierenden Zyklen bestehend aus 5 min Okklusion und 5 min Reperfusion ausgesetzt wurden (Abb. 2.3). Zwischen die IPC-Zyklen und die anschließende 30 min Infarzierung wurde eine 10 min Reperfusionsphase eingeschoben.

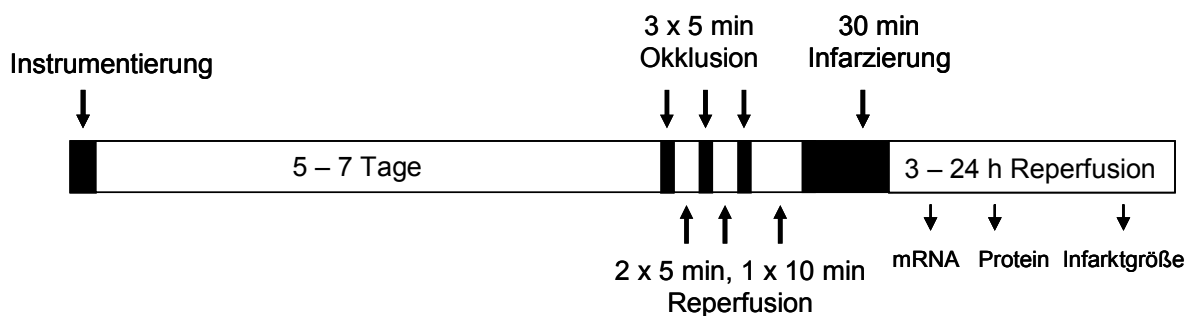


Abb. 2.3. Versuchsprotokoll der ischämischen Präkonditionierung.

2.3.3 Infarzierung

Vor Infarzierung erhielten die Tiere eine einleitende 1 % Propofol-Dosis von 0,2 ml (100 mg/kg). Um die Sedierung aufrecht zu erhalten, wurde Propofol für die Dauer der Ischämie bei Bedarf wiederholt injiziert. Zur bipolaren EKG-Standard-Ableitung nach Einthoven II wurden drei Elektroden in die rechte Vorderextremität sowie beide Füße eingestochen und die elektrische Potentialänderung zwischen rechter Vorderextremität und linkem Fuß gemessen. Zur Konstanthaltung der Körpertemperatur auf 37°C wurde eine Temperatursonde rektal eingeführt. Die Sonde war mit einem Temperaturregler gekoppelt, der bei Unterschreiten der Soll-Temperatur von 37°C automatisch eine Wärmelampe hinzuschaltete. Durch Anschluss der Elektroden an ein Power Lab Data Acquisition System und mit Hilfe der dazugehörigen Software (Chart vor Windows 4.2) erfolgte die Aufzeichnung der EKG-Daten.

Die Hautnaht wurde so weit geöffnet, dass die in der Hauttasche befindlichen Ligaturfäden freigelegt werden konnten. Mittels eines Retraktors wurde der Faden gespannt, um die Okklusion der LAD zu erzielen (Abb. 2.1E), und eine ST-Streckenhebung im EKG wurde als positives Ischämie-Zeichen gewertet.

2.4 *Histologische Verfahren*

2.4.1 Phthaloblau- und TTC-Färbung

Die Färbung erfolgte in zwei aufeinander folgenden Schritten. Zunächst wurde zwischen dem zum Zeitpunkt der LAD-Ligatur ischämischen Areal (Area-at-Risk, AAR) und dem weiterhin perfundierten Bereich (Non-Area-at-Risk, AAR) differenziert. Im zweiten Schritt fand innerhalb des ischämischen Areals die Unterscheidung von vitalem und abgestorbenem Myokard statt.

2.4.1.1 In-vivo Phthaloblau-Färbung

Die Anästhesie und Intubation erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben. Ein Hautschnitt wurde zur Intubation, Freilegung und Durchtrennung der Ligaturfäden durchgeführt. Nach Laparotomie, ventraler Eröffnung des Zwerchfells entlang des Rippenbogens und Rippenresektion wurde das Sternum fixiert, um Aufsicht auf das somit freiliegende Myokard zu erhalten. Das umgebende Perikard sowie Verwachsungen mit dem Sternum wurden gelöst und die Ligaturfäden verknotet, um die Perfusion der Area-at-Risk zu verhindern. 0,5 ml einer 5 % Phthaloblau-Lösung in NaCl wurden in den linken Ventrikel injiziert, verteilten sich durch die Koronarien im Myokard, so dass eine Blaufärbung der perfundierten Myokardareale (NAAR) zu beobachten war (Abb. 2.1F). Im Anschluss daran wurde das Herz entnommen, in PBS gespült und die Vorhöfe sowie der rechte Ventrikel entfernt.

2.4.1.2 TTC-Färbung

Das Herz wurde in tiefgekühltem 2-Methylbutan schockgefroren (-160°C), um eine ausreichende Festigkeit des Gewebes zu erzielen und sofort in eine Schneidvorrichtung eingebracht. Nach Herstellung von 1 mm dicken Schnitten wurden diese bei 37°C für 20 min in 1,5 % Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) inkubiert. Durch die Dehydrogenasen der vitalen Zellen wurde das farblose TTC zu der rotgefärbten Verbindung Triphenyl-Formazan reduziert, während das infarzierte Myokard ungefärbt blieb. Danach wurden die Schnitte 30 min in 4 % Formalin fixiert, anschließend auf Objektträger überführt, durch einen Mikroskop-Kameraaufsatz digital fotografiert (22,4 fache Vergrößerung) und mit einer Software planimetrisch vermessen (siehe 2.4.1.3).

2.4.1.3 Planimetrische Auswertung

Die digitalisierten Schnitte wurden mit der Software Image J (Version 1.29, NIH, USA) ausgewertet.

Die Vorder- und Rückseite jedes 1 mm dicken Schnittes wurde planimetrisch vermessen und aus diesen beiden Daten ein Mittelwert gebildet. Aus der Addition jener Mittelwerte konnte auf das Gesamtvolumen des Ventrikelgewebes geschlossen werden. Das Ventrikellumen ging nicht in die Berechnung ein.

Vermessen wurden

1. Infarktareal (IA): weißes, nekrotisches Gewebe
2. Area-at-risk (AAR): Myokard, welches durch die LAD perfundiert wird; beinhaltet neben dem IA auch vitales, rötliches Gewebe
3. Non-area-at-risk (NAAR): blau gefärbtes Gewebe, welches nicht durch die LAD versorgt und nicht von der Ischämie betroffen war
4. Linker Ventrikel (LV): Gesamtgröße

Basierend auf diesen Angaben wurden die Quotienten von AAR zu LV und IA zu AAR bzw. LV errechnet.

2.4.2 Azanfärbung

Hierfür wurden WT- und TLR4-D-Herzen nach 14 d Reperfusion entnommen, fixiert und mit Azan gefärbt, um den Anteil kollagenen Bindegewebes erkennen zu können.

2.4.2.1 Fixierung des Herzgewebes

Die entnommenen Herzen wurden zunächst 5 min mit EGTA-Lösung (36°C, pH 7.4) retrograd durch die Aorta perfundiert. Danach wurden sie 10 min mit Formalin (4 % in

PBS) perfundiert und anschließend in Formalin gelagert. Nach 24 h wurden die Herzen in Leitungswasser überführt und über 3 Tage fließend gewässert.

2.4.2.2 Paraffin-Einbettung

Nach der Entwässerung in einer aufsteigenden Isopropanolreihe (je 2 h in 30, 50, 60, 70 %) wurden die Herzen mit Hilfe eines Einbettautomaten über das Intermedium Methylbenzoat in Paraffin eingebettet und drei Tage später in frischem Paraffin eingeblockt.

2.4.2.3 Schnitttechnik

Mit einem Rotationsmikrotom wurden von den Paraffinblöckchen Serienschnitte mit 8 µm Dicke angefertigt. Diese wurden in einem handwarmen Wasserbad mit einem Pinsel gestreckt und danach auf einen beschichteten Objektträger aufgebracht. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Objektträger in einen Wärmeschrank (60°C) verbracht und dort bis zur Färbung gelagert.

2.4.2.4 Azanfärbung

Bei dieser Färbemethode wird kollagenes Bindegewebe scharf blau und Muskelgewebe rot bis violett gefärbt.

Nach Entparaffinisierung, Alkoholreihe und Wässerung wurden die Schnitte 6 min mit einer vorgewärmten Azokarminlösung gefärbt. Im Anschluss an das Abspülen mit Aqua dest. wurde 10 min mit Anilinalkohol differenziert und danach 1 min mit Essigsäurealkohol behandelt. Die Präparate wurden nun 3 h in 5%iger Phosphorwolframsäure gebeizt. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua dest. abgespült, um dann mit Anilinblau-Orange-G-Essigsäure 5 min gefärbt zu werden. Nach Abspülen mit Aqua dest. erfolgten eine Differenzierung in 96%igem Isopropanol, eine Behandlung

mit 100%igem Isopropanol und danach mit Xylol. Nach Betropfen mit Entellan wurden die Präparate eingedeckelt.

2.5 *In vitro*-Verfahren

2.5.1 Organentnahme

Zur Organentnahme wurden die Tiere zunächst in einer Kammer mit Isofluran betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Nach dem Tod des Tieres wurde das Herz zur Analyse entnommen, in PBS gewaschen und Aorta sowie Vorhöfe entfernt. Etwa 1 ml Blut wurden gewonnen und nach Zentrifugation der koagulierten Blutprobe in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß für 10 min bei 4°C und 550 x g wurde das überstehende Serum entnommen und in ELISA sowie Zymographie eingesetzt. Herz und Serum wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Eppendorf-Gefäßen bei -80°C gelagert.

2.5.2 RNA-Isolation

Vor der Zerkleinerung des Gewebes, wurde der Homogenisator in 4M GIT (Guanidin Thiocyanat) und DEPC-Wasser (0,1% Diethylpyrocarbonat in 1 l H₂O) gereinigt. Die Organe wurden gefroren in TRIzol gegeben (je 100 mg Gewebe 1 ml TRIzol), homogenisiert und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden je ml TRIzol 0,2 ml Chloroform zugegeben, geschüttelt und wieder 10 min auf Eis inkubiert. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 740 x g wurde die oberste Phase abgenommen, mit 0,5 ml Isopropanol je ml TRIzol vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde 20 min bei 740 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 6 ml 75 % EtOH gewaschen, zentrifugiert und der Überstand wiederum abgenommen. Anschließend trocknete das Pellet an der Luft und wurde in 200 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.5.3 Proteinisolation aus Organen

Die Proteinisolation wurde mit Hilfe des NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kits durchgeführt. Nach Angaben des Herstellers wurden die Organe auf Trockeneis pulverisiert und dem Gewicht entsprechend CER I-Puffer (10 fache Menge des Organgewichts) hinzugefügt, der mit den Proteaseinhibitoren Benzamidin (0,5 mg/ml), Aprotinin (2 µg/ml), Leupeptin (2 µg/ml) sowie PMSF (0,75 mM) versetzt war. Nach Durchmischung und 10 minütiger Inkubationszeit folgte der Zusatz von CER II-Puffer. Die Lösung wurde 1 min inkubiert und 5 min bei 4°C zentrifugiert (16.110 x g). Der Überstand (zytoplasmatische Phase) wurde in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß transferiert. Das verbleibende Pellet wurde in CER-Puffer resuspendiert, vermischt und für weitere 4 x 10 min inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation (16.110 x g) wurde der Überstand (nukleäre Phase) entnommen.

2.5.3 Bicinchinonsäure-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Bicinchinonsäure-Assay (BCA) durchgeführt. Hierbei wurde zur Probe BCA und Kupfersulfatlösung hinzu gegeben und im Kupfer-Protein-Komplex Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert. BCA bildete mit Cu^+ einen spezifischen Farbstoffkomplex. Dieser diente als sensitiver kolorimetrischer Nachweis von Proteinen bei einer Wellenlänge von 562 nm. Nach Herstellerprotokoll wurden 2 μl Probe mit jeweils 980 μl Reagenz A und 20 μl Reagenz B vermischt. Im Anschluss an eine 30 minütige Inkubationsphase bei 37°C erfolgte der quantitative Protein-Nachweis im Photometer.

2.5.4 Electric Mobility Shift Assay (EMSA)

Mittels EMSA kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen untersucht werden. Das als spezifische DNA-Sequenz eingesetzte Oligonukleotid ist radioaktiv markiert, so dass die sich ausbildenden Transkriptionsfaktor-DNA-Komplexe radiographisch detektiert werden können. Als Nachweis für eine spezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA dient die Kompetition des markierten Oligonukleotides mit einem unmarkierten Oligonukleotid (im Überschuss). Um die Identität von Transkriptionsfaktor-DNA-Komplexen zu belegen, wird den Proben ein Transkriptionsfaktor-spezifischer Antikörper zugegeben. Transkriptionsfaktor-spezifische DNA-Komplexe werden dadurch im EMSA-Gel retardiert. Das Prinzip beruht darauf, dass Protein-DNA-Komplexe in der Elektrophorese langsamer laufen als freie DNA. Die Identität des DNA-bindenden Proteins wird durch Zugabe von spezifischen Antikörpern festgestellt (Super Shift).

Zu Beginn des Versuches wurden AP-1 bzw. NF κ B-komplementäre Oligonukleotide mit γ -Phosphor³²-ATP radioaktiv markiert. Die „hot probe“ wurde aus 12,75 μl Aqua dest., 5 μl 2,5 x „Forward Reaction Buffer“, 3,73 μl (5 pmol) Konsensus-Sequenz-Oligonukleotid, 2,5 μl γ P³²-ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 3000 Ci/mmol) und 1 μl (10 u) T4 Polynukleotidkinase hergestellt und 20 min bei 37°C, anschließend 15 min bei 65°C im Heizblock inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde in Chromatographiesäulen (Micro

Bio-Spin® 6 Chromatography Columns) überführt, mit 550 x g zentrifugiert und das Effluat, welches das radioaktiv markierte Oligonukleotid enthielt, entnommen.

Zu 20 µg der nukleären Extrakte wurde ein radioaktiver Bindungsmix (4 mM Tris-Cl, pH 7.9; 12 mM HEPES, 1 mM DTT, 60 mM KCl, 10 % Glycerol, 1 mM EDTA, 2 mg Poly(dI-dC), 20.000 cpm der radioaktiv markierten Oligonukleotide) zugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Spezifität der DNA-Protein-Bindung wurde durch einen 50 fachen Überschuss des unmarkierten Oligonukleotids überprüft (Kompetition).

Für Super Shift-Assays wurden die nukleären Extrakte mit 2 mg polyklonalem anti-p50 oder anti-p65 Antikörper vor Zugabe der radioaktiv markierten Probe zum Bindungsmix inkubiert.

Die DNA-Protein-Komplexe wurden 2 h bei 30 mA auf einem 4 % Polyacrylamidgel in 0,5 % Tris-Borat-EDTA Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die EMSA-Gele wurden mit Whatman-Papier von den Glasplatten abgenommen und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Anschließend wurden die Gele für 1 h Vakuum-getrocknet, über Nacht in einer Phosphoimager-Kassetten gelagert und mit einem Phosphoimager gescannt.

2.5.5 Ribonuclease Protection Assay (RPA)

Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mittels eines RPAs. Dieser radioaktive Assay ermöglicht die zeitgleiche Analyse verschiedener Gene. Das Verfahren beruht auf der Verwendung radioaktiv markierter RNA-Fragmente, die komplementär zum untersuchten Zielgen sind, dieses binden und somit nach Detektion der emittierten β -Strahlung eine quantitative Erfassung der Genexpression ermöglichen.

Maus-Template-Sets zur Messung der mRNA-Expression von Zytokinen, Chemokinen, MMPs und TLR-Rezeptoren wurden bei BD Bioscience erworben. Zur Hybridisierung der isolierten RNA wurde zunächst eine zur gesuchten RNA komplementäre, synthetisierte Antisense-Nucleinsäure radioaktiv markiert (UPP = unprotected probe). Hierzu wurden 1 µl RNasin (RNase Inhibitor, der RNA während Inkubationszeiten

vor Abbau schützt), 1 µl GACU Pool (Ribonucleinsäuren), 2 µl DTT, 4 µl Transkriptionspuffer, 1 µl Template RNA, 10 µl α -P³²-UTP und 1 µl T7 RNA-Polymerase vermischt und inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 2 µl DNase und, nach weiterer Inkubationspause, 26 µl 20mM EDTA, 25 µl citratgepuffertes Phenol (pH 4.7), 25 µl Chloroform / Isoamylalkohol (50:1) sowie 2 µl Hefe t-RNA. Die obere Phase wurde nach Zentrifugation abpipettiert und mit 50 µl Chloroform / Isoamylalkohol (50:1) vermischt, wiederum zentrifugiert (16.110 x g) und erneut die obere Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 50 µl 4 M Ammoniumacetat und 250 µl 100 % EtOH vermischt und für eine Stunde bei -80°C präzipitiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand entsorgt und das Pellet mit 100 µl 90 % igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde in 30 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert. 20µg RNA der entsprechenden Proben wurden getrocknet. Die Pellets wurden in 8 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert, mit 2 µl radioaktiv markierter RNA (UPP) versetzt und über Nacht bei 90°C inkubiert. Zum Schutz vor Verdunstung wurde Mineralöl aufgetropft.

Aus 7,5 ml Sequagel Complete, 20 ml Sequagel 6 und 300 µl 10 % APS wurde ein Polyacrylamidgel hergestellt und zwischen silikonisierte Glasplatten gegossen. Je Probe wurden 100 µl RNase-Mix (2,5 ml RNase-Puffer, 6 µl RNase A + T1) unter das Öl pipettiert und 30 min bei 90°C inkubiert. Hierdurch wurden einzelsträngige RNA und Überhänge im RNA-RNA-Hybridmolekül hydrolysiert. Anschließend wurde die gesamte Flüssigkeit unter dem Öl abpipettiert und mit je 18 µl eines Proteinase K Cocktails (390 µl Proteinase K-Puffer, 30 µl Proteinase K, 30 µl Hefe tRNA) vermengt. Nach 15 minütiger Inkubation bei 37°C wurden 65 µl citratgepuffertes Phenol und 65 µl Chloroform-Isoamylgemisch hinzugegeben, gemischt und zentrifugiert (16.110 x g). Die obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß transferiert, mit 120 µl 4 M Ammoniumacetat und 650 µl 100 % EtOH vermengt und für 60 min bei -80°C präzipitiert. Danach wurde 15 min zentrifugiert (16.110 x g), der Überstand entsorgt und mit 100 µl 90 % EtOH gewaschen. Nach Entfernen des Alkohols trockneten die Pellets an der Luft. Zwischenzeitlich lief das Gel 1 h bei 50 W vor. Die getrockneten Pellets wurden in 5 µl Ladepuffer resuspendiert, bei 90°C 3 min inkubiert, um einzelsträngige RNA zu erhalten, danach sofort in eine eisgekühlte Box gestellt und auf das Gel aufgetragen. Auch die UPP wurde mit

Loading-Puffer 1:100 verdünnt und aufgetragen. Anschließend lief das Gel 1 h 40 min bei 60 W. Die Glasplatten wurden gelöst, das Gel mit Whatman-Papier von der Glasplatte abgenommen und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Daraufhin wurden die Gele für 45 min bei 80°C Vakuum-getrocknet. Hiernach wurde das Gel in eine Kassette überführt und belichtete für 3 Tage einen Röntgenfilm, der Dokumentationszwecken diente. Abschließend wurde das Gel 1 d in einer Phosphoimager-Kassette gelagert, die belichtete Platte mit einem Phosphoimager gescannt und diese hochauflösende Aufnahme quantitativ ausgewertet.

Die Bandenintensität wurde mit Hilfe des Programms AIDA v3.5 (Raytest, Deutschland) quantifiziert und die Signale nach Hintergrund-Reduktion ins Verhältnis zum ribosomalen „House-keeping“ Gen L32 gesetzt (AU = arbitrary units).

2.5.6 Real time RT-PCR

Auch die bei der Reverse-Transcriptase PCR eingesetzte RNA wurde mit Hilfe der oben beschriebenen Guanidin Thiocyanat - Phenol - Chloroform – Extraktionsmethode gewonnen (siehe 2.5.2). Zur Initiation der DNA-Synthese wurde ein Oligo-(d)-T₁₅-Primer für Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase verwendet und 1 µg RNA zu cDNA umgeschrieben. Vor der real-time PCR wurde zur Abschätzung der spezifischen cDNA-Menge eine qualitative PCR des „House-keeping“ Gens β-Aktin sowie von HIF1α, ADM, iNOS, TNFα, IL-1β, IL-6 und TNFR1 durchgeführt. Die entstandenen PCR-Produkte wurden auf Ethidiumbromid gefärbten 1,5 %-Agarosegelen aufgetrennt. Primer für die real-time PCR wurden mit der Primer Express Software (Applied Biosystems) berechnet (Suchparameter: Amplicongröße 100 bp, Annealing-Temperatur 60°C, GC-Gehalt 60%)(

Tab. 2.1).

Die Real-time PCR wurde unter Verwendung von SYBR grün als Fluoreszenzfarbstoff im Gene Amp 5700 Sequence Detection System durchgeführt. Die in der real-time PCR eingesetzten cDNA-Standards wurden aus den spezifischen PCR-Produkten mit einem DNA-Aufreinigungskit gewonnen. Die Menge der Standard-cDNA wurde photometrisch bestimmt. Die Standardkonzentrationen variierten

zwischen 100 und 0,1 fg/ μ l. Die Quantifizierung fand in einer „Two-step real-time“ PCR statt (10 min Denaturierung bei 95°C, 40 Zyklen à 15 sek bei 95°C und 1 min bei 60°C). Die Menge der spezifischen cDNA wurde in Mikrogramm der Gesamt-RNA angegeben.

| Primer | 5´ | 3´ | Amplicon |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|----------|
| β -actin | ccc tct gaa ccc taa ggc ca | ggg aca aca cag cct gga tg | 100 |
| HIF-1 α | gaa atg gcc cag tga gaa aa | ctt cca cgt tgc tga ctt ga | 151 |
| ADM | cgc agt tcc gaa aga agt gg | cca gtt gtg ttc tgc tcg tcc | 150 |
| iNOS | aca tcg acc cgt cca cag tat | cag agg ggt agg ctt gtc tc | 100 |
| TNF α | cgg ggt gat cgg tcc cca aag | gga ggg cgt tgg cgc gct gg | 151 |
| IL-1 β | cct ctc cag cca agc ttc ct | ttt gga agc agc cct tca tc | 150 |
| IL-6 | tcc tac ccc aat ttc caa tgc | cat aac gca cta ggt ttg ccg | 150 |
| TNFR1p55 | tac ctc ctc cgc ttg caa at | gag tag act tcg ggc ctc cac | 151 |

Tab. 2.1. Primerpaare für Real-time RT-PCR.

2.5.7 Western Blot

Die Regulation der CD14- und HIF-1 α -Proteinexpression wurde im Western Blot nachgewiesen.

80 μ g Protein je Probe, gewonnen wie unter 2.5.3 beschrieben, wurden auf einem 7,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt und durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C super) übertragen und für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert. Die Membran wurde bei 4°C über Nacht in 5 % Milchpulver-TBST-Lösung (Tris-HCl, NaCl, 0,05% Tween 20) inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Zur Immundetektion wurde die Membran 1 h mit dem Primärantikörper (CD14 bzw. HIF-1 α) inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein monoklonaler Antikörper (Anti-Ratte bzw. Anti-Kaninchen) verwendet.

2.5.8 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Um die TNF-, IL-1 β - und IL-6-Proteinexpression zu bestimmen, wurde ein ELISA durchgeführt.

Tiefgefrorene Organe wurden mit 1 ml ELISA-Puffer (PBS, 1 μ l/ml Triton X-100, 1 μ l/ml PMSF (250 mM in Isopropanol), Proteaseinhibitoren) homogenisiert. Die Proben wurden für 20 min auf Eis inkubiert, homogenisiert, 15 min bei 16.110 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand im ELISA eingesetzt.

Die ELISAs wurden dem Herstellerprotokoll (R&D Systems) entsprechend durchgeführt. Dabei wurden Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatten verwendet, die das relevante Antigen banden, so dass andere nicht gebundene Konstituenten gewaschen werden konnten. Mit Hilfe der an den Antikörper gekoppelten Enzyme wurde anschließend eine Farbreaktion ausgelöst und die Stärke der Farbreaktion photometrisch mittels eines ELISA-Readers gemessen. Die Stärke der Farbreaktion war proportional zur Konzentration des untersuchten Proteins in der Probe.

2.5.9 Zymographie

Zwischen zwei Glasplatten wurde ein 1 mm dickes, 7,5 %iges Trenngel mit 0,3 % Gelatine gegossen und für ca. 2 h zur Polymerisation in den Kühlschrank gestellt (Trenngel: 1,9 ml 30 % Acrylamid, 1,87 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8.6), 62,5 μ l 10% SDS, 3,5 ml Aqua dest., 11,25 mg Gelatine A, 11,25 mg Gelatine B, 62,5 μ l Temed, 62,5 μ l APS). Dieses wurde anschließend mit einem 3 %igen Sammelgel überschichtet, in welches der Kamm eingeführt wurde (Sammelgel: 1,58 ml Aqua dest., 0,63 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6.8), 0,25 ml 30 % Acrylamid, 37,5 μ l 10 % APS, 1,88 μ l Temed, 25 μ l 10 % SDS). Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in der Elektrophoresekammer mit 1x Laufpuffer überschichtet und der Kamm entfernt (10 x Laufpuffer pH 8.3 (1 L): 29 g Tris-Base, 144 g Glycin, 10 g SDS, auffüllen mit Aqua dest.). Der Proteingehalt der Proben wurde mit einem BCA-Kit bestimmt (siehe 2.5.3). 40 μ g Protein je Probe wurden 3:1 mit 2x Probenpuffer vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (2 x Probenpuffer (10 ml): 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6.8,

4,0 ml 10 % SDS, 2,0 ml 4 % Glycerin (w/v), 0,5 ml 0,1 % Bromphenolblau, auffüllen mit Aqua dest.). Bei dem hinzugefügten SDS handelt es sich um ein anionisches Detergenz, das die Eigenladungen der Proteine überdeckt, so dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen (ca. 1,4 g SDS/ g Protein), um ein gleichartiges Laufverhalten bei der Elektrophorese zu erreichen.

Proben, Proteinstandard sowie Positivkontrolle (murine MMP-9) wurden auf das Gel aufgetragen. Anschließend liefen sie bei 40 V ein und wurden 90 min bei 125 V aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde das Sammelgel mit einem Skalpell abgetrennt und das Trenngel zur Entfernung des SDS mit 1x Renaturierungspuffer 3 x 20 min im Schüttler gewaschen (10 x Renaturierungspuffer: 25 % TritonX-100 in Aqua dest. (Volumen (v) / v)). Das Triton X wurde mit Inkubationspuffer 3 x 10 min aus dem Gel entfernt (10 x Inkubationspuffer (1 L): 12,1 g Tris-Base, 63,0 g Tris-HCl, 117,0 g NaCl, 7,4 g CaCl₂, 2,0 ml Brij 35, auffüllen mit Aqua dest.). Im Anschluss wurden die Gele mit Parafilm abgedeckt und im Inkubationspuffer für maximal 72 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Abgiessen des Puffers wurde in Coomassie-Färbelösung für 30 min gefärbt, die Färbelösung dann abgegossen und 30 min entfärbt, bis weiße Banden zu erkennen waren (Färbelösung: 450 ml Aqua dest. mit 0,1 % Brilliant Blau R 250, 450 ml Methanol, 90 ml Essigsäure; Entfärbelösung: 520 ml Aqua dest., 450 ml Methanol, 30 ml Essigsäure). Das Gel wurde auf einem Weißlichttisch liegend durchleuchtet und das Ergebnis mit einer Kamera fotografisch festgehalten. Die Auswertung erfolgte mit AIDA.

2.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurden bei allen Tiergruppen die Mittelwerte (M) und Standardfehler (SEM) errechnet. Unter Verwendung des Statistikprogramms Prism v4.0 wurden mit Hilfe einer ein- oder zweifaktoriellen ANOVA und anschließendem Posthoc-Test nach Bonferroni Signifikanzen ermittelt. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ galten als signifikant. In besonderen Fällen wurden die I/R-Werte zusätzlich als Berechnung des Vielfachen der jeweiligen SOP-Gruppe angegeben. Hierbei wurde jeder einzelne mRNA-Wert der zwei korrelierenden

Gruppen auf den mittleren mRNA-Gehalt der SOP-Gruppe normiert. Mit den erhaltenen Einzelwerten wurde wie oben beschrieben weiter verfahren (ANOVA). Dieses Verfahren ermöglichte eine isolierte Betrachtung des I/R-Effektes und berücksichtigte Unterschiede in den SOP-Werten nach Vorbehandlung bzw. zwischen verschiedenen Genotypen.

2.7 Geräte

Tierhaltung

| | |
|--|---|
| Käfige Makrolon, Typ II L | Charles River Deutschland GmbH |
| Standarddiätfutter Maus und Ratte | Altromin GmbH und Co. KG |
| Tiereinstreu-Granulat | Altromin GmbH und Co. KG, Lage-Lippe, Deutschland |
| Zuchttiere (C57Bl/6, C3H/HeN, C3H/HeJ) | Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland |
| Zuchttiere TLR4-Knockout | Dr. S. Akira (Osaka University, Japan) |

In vivo-Eingriffe

| | |
|--|--|
| Endotrachealkanüle Ø 1,0 und 1,2mm | Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland |
| Kalt-Nadeln, Größe 3 | Fine Science Tools, Inc. |
| MiniVent Typ 845 | Hugo Sachs Elektronik |
| Operationsbesteck (Knopfpinzetten, Augenschere, Castroviejo-Nadelhalter) | Allgaier Instrumente, Frittlingen, Deutschland |
| Operationsmikroskop | OpMi-191294, Zeiss, Oberkochen, Deutschland |
| Power Lab Data Acquisition System | ADInstruments, Spechbach, Deutschland |
| Wärmebad | Rhema-Labortechnik, Hofheim, Deutschland |
| Zentrifuge, Model 5415R | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland |

Molekularbiologische Arbeitsmittel

| | |
|---|------------------------------------|
| Biophotometer | Eppendorf AG |
| ELISA Reader, Expert | Asys HiTech, Eugendorf, Österreich |
| Gelkammer | BioRad |
| Gene Amp 5700 Sequence Detection System | Applied Biosystems |
| Maxi-Gelkammer | BioRad |
| Mini-Gelkammern | BioRad, München, Deutschland |
| Phosphoimager FLA3000 | Fuji, Düsseldorf |
| Power Supply Elektrophorese | BioRad |
| Thermomixer comfort | Eppendorf AG |

Histologie

| | |
|----------------------------|-------------------------------|
| Rotationsmikrotom HM 355 S | Micron, Aschheim, Deutschland |
|----------------------------|-------------------------------|

Software

| | |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| AIDA Geldokumentationssoftware | Raytest, Straubenhardt , Deutschland |
| Chart for Windows 4.2 | ADInstruments |
| Primer Express Software | Applied Biosystems, Weiterstadt, |
| Prism v4.0 | GraphPad Software, San Diego, USA |

2.8 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

| Anwendung | Bezeichnung | | Hersteller |
|---------------------|--|---|--|
| ELISA | mIL-1 β ELISA Kit | | R&D Systems, Minneapolis, USA |
| ELISA | mIL-6 ELISA Kit | | R&D Systems |
| ELISA | mTNF ELISA Kit | | R&D Systems |
| ELISA, Proteinisol. | Phenylmethylsulfonyl (PMSF) | #P7626, 0,2M in Isopropanol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland |
| ELISA | Proteaseinhibitoren | #1836153 | Roche, D-Mannheim |
| ELISA, Zymogr. | TritonX-100 | | Sigma-Aldrich |
| EMSA | 5 x "Binding Buffer" | 60 mM Hepes, 20 mM Tris, 300 mM KCl, 5 mM EDTA, 50 % Glycerol, 5 mM DTT, pH 7.9 | Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland |
| EMSA | AP-1 Oligonukleotide | | Santa Cruz Biotechnology |
| EMSA | Borsäure | #B-6768 | Sigma-Aldrich |
| EMSA | Forward Reaction Buffer | | Gibco |
| EMSA | HEPES | | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| EMSA | Micro Bio-Spin® 6 Chromatography Columns | | BioRad, München, Deutschland |
| EMSA | NF κ B p50-Antikörper | #sc-114 | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA |
| EMSA | NF κ B p65-Antikörper | #sc-109 | Santa Cruz Biotechnology |
| EMSA | NF κ B-Oligonukleotide | #sc-2505, 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' | Santa Cruz Biotechnology |
| EMSA | Poly(dI-dC) | | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland |
| EMSA | T4 Polynukleotidkinase | | Gibco |
| EMSA | γ P32-ATP | | Amersham |
| EMSA, Zymogr. | Tris-HCl | | Sigma-Aldrich |
| Histologie | Anillinblau | | Division Chroma, Münster, Deutschland |
| Histologie | Deckgläser | | Menzel-Gläser |
| Histologie | Entellan® | Eindeckmedium | Merck |
| Histologie | Eosin G, 0,5 % | | Merck |
| Histologie | Formalin 4% | | Merck |
| Histologie | Histowax | Paraffin | Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland |
| Histologie | Methylbenzoat | | Merck |
| Histologie | Objektträger Super Frost Plus | | Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland |
| Histologie | Orange G Certistain ® | | Merck |
| Histologie | Wolframatophosphorsäure | | Merck |
| Histologie | Xylol | | Merck |

MATERIAL UND METHODEN

| Anwendung | Bezeichnung | | Hersteller |
|--------------------------------|-------------------------|--|---|
| Operation | 2-Methylbutan | #277258 | Sigma-Aldrich |
| Operation | 6-0 Prolene Fäden, BV-1 | | Ethicon GmbH, D-Norderstedt |
| Operation | 8-0 Prolene Fäden, BV-1 | | Ethicon |
| Operation | Betaisodona ® | | Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland |
| Operation | Disoprivan ®, 1% | Propofol | Astra Zeneca, Wedel, Deutschland |
| Operation | Formalin 4% | verdünnt mit PBS | Merck |
| Operation | Isofluran (Forene®) | | Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden |
| Operation | Lipopolysaccharid | aus E.coli 0111:B4, #L2630, Phenol-Extraktion | Sigma-Aldrich |
| Operation | PBS | | Gibco |
| Operation | PE-Schlauch, Ø 0,5 mm | | Sims-Portex, Hythe, Kent, UK |
| Operation | Phthaloblau | Dispersionsfarbe | Heubach, Langelsheim, Deutschland |
| Operation | Temgesic® | Injektionslösung 0,3 mg/ml Buprenorphinhydrochlorid | Essex Pharma GmbH, München, Deutschland |
| Operation | TTC | Triphenyltetrazolumchlorid | Sigma-Aldrich |
| Proteinisolation | Aprotinin | 2 mg/ml, #A6279 | Sigma-Aldrich |
| Proteinisolation | BCA Assay Kit | #23225 | Perbio Science, D-Bonn |
| Proteinisolation | Benzamidin | 250 mg/ml, #B2009 | Sigma-Aldrich |
| Proteinisolation | Bicinchinonsäure-Assay | | Perbio |
| Proteinisolation | Leupeptin | #L2884, 2 mg/ml | Sigma-Aldrich |
| Proteinisolation | NE-PER Kit | Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit | Perbio |
| RNA-Isolation | DEPC | Diethylpyrocarbonat | Sigma-Aldrich |
| RNA-Isolation | Guanidin Thiocyanat | GIT, #G6639 | Sigma-Aldrich |
| RNA-Isolation | TRIzol | #15596-018 | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| RNA-Isolation, RPA, Zymogr. | Ethanol | | Merck |

MATERIAL UND METHODEN

| Anwendung | Bezeichnung | | Hersteller |
|--------------|--|--|---|
| RPA | [α -P32] UTP | | Amersham |
| RPA | Chloroform | #C2432 | Sigma-Aldrich |
| RPA | Filterpapier | | Whatman, D-Dassel |
| RPA | Isoamylalkohol | #I9392 | Sigma-Aldrich |
| RPA | Isopropanol | #1096341011 | Merck |
| RPA | Mineralöl | #M5904 | Sigma-Aldrich |
| RPA | mouse CK-5 Multi-Probe Template Set | Chemokin-Panel, #551943 (RANTES, MIP-1 α , - β , MIP-2, Eotaxin, Lymphotactin, MCP-1, L32, GAPDH) | BD Biosciences, San Diego, CA, USA |
| RPA | mouse Custom Riboquant Set | iNOS, IL-1 β , IL-6, TNF, TLR2, TLR4, L32, GAPDH | BD Biosciences |
| RPA | mouse MMP-1 Multi Probe Template Set | MMP-Panel, #551276 (MMP-1, -2, -3, -8, -9, TIMP-1-4, L32, GAPDH) | BD Biosciences |
| RPA | Phenol, Citrat-gepuffert | | AppliChem GmbH, D-Darmstadt |
| RPA | RiboQuant RPA Starter Package | enth. RNasin, GACU-Pool, DTT, Transkriptionspuffer, T7-RNA-Polymerase, DNase, EDTA, Ammoniumacetat, Hybridisierungspuffer, RNase-Puffer, RNase A + T1, Proteinase K, Yeast-tRNA, Proteinase K-Puffer, Loading Buffer | BD Biosciences |
| RPA | SequaGel-6 | #EC-836 | Biozym Diagnostics, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| RPA | SigmaCote | | Sigma-Aldrich |
| RPA, Zymogr. | Polyacrylamidlösung 29:1 | | BioRad |
| RPA, Zymogr. | Temed | #161-0800 | BioRad |
| rtPCR | Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase | | Promega, Mannheim, Deutschland |
| rtPCR | DNA-Purification Kit | | Roche |
| rtPCR | Primer | | Invitrogen |

MATERIAL UND METHODEN

| Anwendung | Bezeichnung | | Hersteller |
|--------------|---------------------------------------|---|--|
| Western Blot | Anti-HIF-1 α rabbit polyclonal | NB 100-449 | Novus Biologicals, Littleton, CO, USA |
| Western Blot | Anti-rat, HRP | PO162 | DAKO Cytomatation GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Western Blot | Bovine Serum Albumin | | PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland |
| Western Blot | CD14-Antikörper | #552738, monoklonaler Ratte anti-Maus CD14 Antikörper | BD Biosciences |
| Western Blot | Chromatographiebögen | | VWR International, Darmstadt, Deutschland |
| Western Blot | Goat-anti-rabbit | | Sigma |
| Western Blot | Hybond-C extra, Nitrocellulosemembran | | GE Healthcare, D-München |
| WB, Zymogr. | Precision Blue Standard | | BioRad |
| Western Blot | Qentix Western Blot Signal Enhancer | | Perbio |
| Western Blot | Tween-20 | | VWR |
| Zymographie | Ammoniumpersulfat | APS, #161-0700 | BioRad |
| Zymographie | Brij 35 | | Sigma-Aldrich |
| Zymographie | Brilliant Blau R 250 | | BioRad |
| Zymographie | Bromphenolblau | | BioRad |
| Zymographie | Essigsäure | | Merck |
| Zymographie | Gelatine A | Herkunft: Schwein | Sigma-Aldrich |
| Zymographie | Gelatine B | Herkunft: Rind | Sigma-Aldrich |
| Zymographie | Glycerin | | Merck |
| Zymographie | Glycin | | Merck |
| Zymographie | Methanol | | VWR |
| Zymographie | murine MMP-9 | #cc069 | Chemicon, Hampshire, UK |
| Zymographie | SDS | Sodiumdodecylsulfat | Sigma-Aldrich |
| Zymographie | Tris-Base | | Sigma-Aldrich |

3 Ergebnisse

3.1 Tierzahlen

Insgesamt gingen die Daten von 600 Tieren in die Arbeit ein. Die Mortalitätsraten unterschieden sich je nach Versuchsprotokoll und Vorbehandlung und werden in den jeweiligen Kapiteln dargestellt (3.2.1 und 3.3.1).

3.2 LPS-Vorbehandlung

Um den Einfluss einer LPS-Vorbehandlung auf eine nachfolgende myokardiale Ischämie zu untersuchen, wurden insgesamt bis zu acht verschiedene Gruppen miteinander verglichen (siehe 2.3.2.1). Die Versuche wurden mit verschiedenen Genotypen durchgeführt und jeweils vier Gruppen untersucht: 1. SOP PBS, 2. I/R PBS, 3. SOP LPS und 4. I/R LPS. Die verwendeten Genotypen werden im Detail in den einzelnen Kapiteln erörtert.

3.2.1 Mortalitätsraten

Die Letalität während der Instrumentierung war im Wesentlichen auf die Faktoren In-/Extubation und auf einen Pneumothorax zurückzuführen. Bei der Infarzierung spielte insbesondere die Verabreichung des Propofols eine Rolle, welches je nach Vorbehandlung in unterschiedlichen Dosierungen injiziert werden musste und in einigen Fällen zu Atemdepression führte. Die Gesamtzahl der verwendeten Tiere sowie die Letalitätsrate in den jeweiligen Studienabschnitten wird in Tab. 3.1 dargestellt.

Bei der Entwicklung des Modells der LPS-Vorbehandlung musste zunächst eine geeignete LPS-Dosierung gefunden werden. In Anlehnung an die Studie von Zacharowski *et al.* sollte die Vorbehandlung 16 h vor Infarkt stattfinden (Zacharowski *et al.*, 2000). In dem bereits etablierten Sepsismodell unserer Arbeitsgruppe wurde

| | |
|--------------------------------------|-----|
| Gesamtzahl der Mäuse | 382 |
| Planimetrie: | |
| Färbungen gesamt | 58 |
| davon verwertbar | 48 |
| Organentnahmen für Molekularbiologie | 212 |
| Todesfälle | 64 |
| bei Instrumentierung | 13 |
| nach Instrumentierung | 5 |
| nach LPS-Stimulation | 2 |
| bei Infarkt | 42 |
| während Reperfusionphase | 2 |

Tab. 3.1: Tierzahlen im Projekt LPS-Vorbehandlung.

mit einer LPS-Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht für einen maximalen Zeitraum von 6 h stimuliert (Baumgarten *et al.*, 2006c). Diese LPS-Konzentration bewirkt ein Sepsis-ähnliches Krankheitsbild mit sehr schlechtem Allgemeinzustand. Deshalb musste eine geringere Dosis, die jedoch eine präkonditionierende Wirkung aufweisen sollte, gefunden werden. Erste Versuche mit 5 mg LPS/kg Körpergewicht führten noch immer zu einem stark verschlechterten Allgemeinbefinden der Tiere sowie zum schnellen Tod unter Propofol und Ischämie. Eine Reduktion der LPS-Dosis auf 1 mg/kg Körpergewicht wurde erfolgreich getestet und daraufhin beibehalten.

3.2.2 TTC-Färbung und planimetrische Auswertung

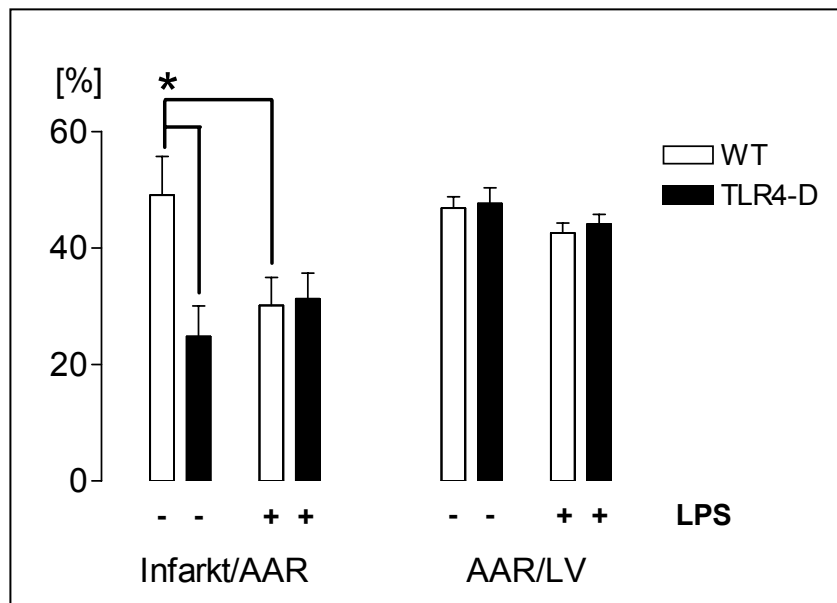


Abb. 3.1: Planimetrische Vermessung der Infarktareale. Verhältnis von Infarktgröße zu Area-at-risk und AAR zu linkem Ventrikel (LV). * $p < 0,05$.

Die Infarktgröße wurde nach 60 min Okklusion der LAD und 24 h Reperfusion vermessen. Die Okklusion der LAD führte in dem verwendeten Modell zu einer durchschnittlichen AAR-Größe von 45 % des linken Ventrikels (LV) in beiden Mausstämmen (C3H/HeN, C3H/HeJ). Die Unterschiede in der Größe variierten nur geringfügig zwischen 42,6 und 47,7 % / LV. Dies deutet auf eine gute Reproduzierbarkeit der experimentell initiierten Malperfusion hin.

TLR4-D-Mäuse wiesen mit 30,3 % \pm 4,81 (Mittelwert \pm SEM; $n = 17$) gegenüber WT-Mäusen mit 49,8 % \pm 6,66 ($n = 13$) ein signifikant kleineres IA auf (Abb. 3.1). Eine LPS-Vorbehandlung bewirkte eine signifikante Verkleinerung des IA bei WT-Mäusen (24,8 % \pm 5,28; $n = 10$), während eine LPS-Injektion bei TLR4-D keine Veränderungen des IA herbeiführte. Diese Daten zeigen, dass LPS in dem verwendeten Mausmodell zu einer veränderten Antwort auf ein Ischämie-Reperfusion-Ereignis führt. Ein solcher Einfluss wurde bei TLR4-D-Mäusen jedoch nicht gefunden. TLR4-Defizienz und LPS-Vorbehandlung reduzierten das IA in vergleichbarem Ausmaß.

3.2.3 Azanfärbung

Nach 14 d Reperfusion wurden einige Herzen von WT- und TLR4-D-Mäusen entnommen und mit Azan gefärbt um eventuelle Unterschiede im Ausmaß der fibrotischen Areale kenntlich zu machen. In Übereinstimmung mit der TTC-Färbung zeigten TLR4-D-Hezen lokale, auf die Vorderwand begrenzte Infarktbereiche, während sich das größere Fibroseareal von WT-Mäusen nahezu durch den ganzen linken Ventrikel zog (Abb. 3.2).

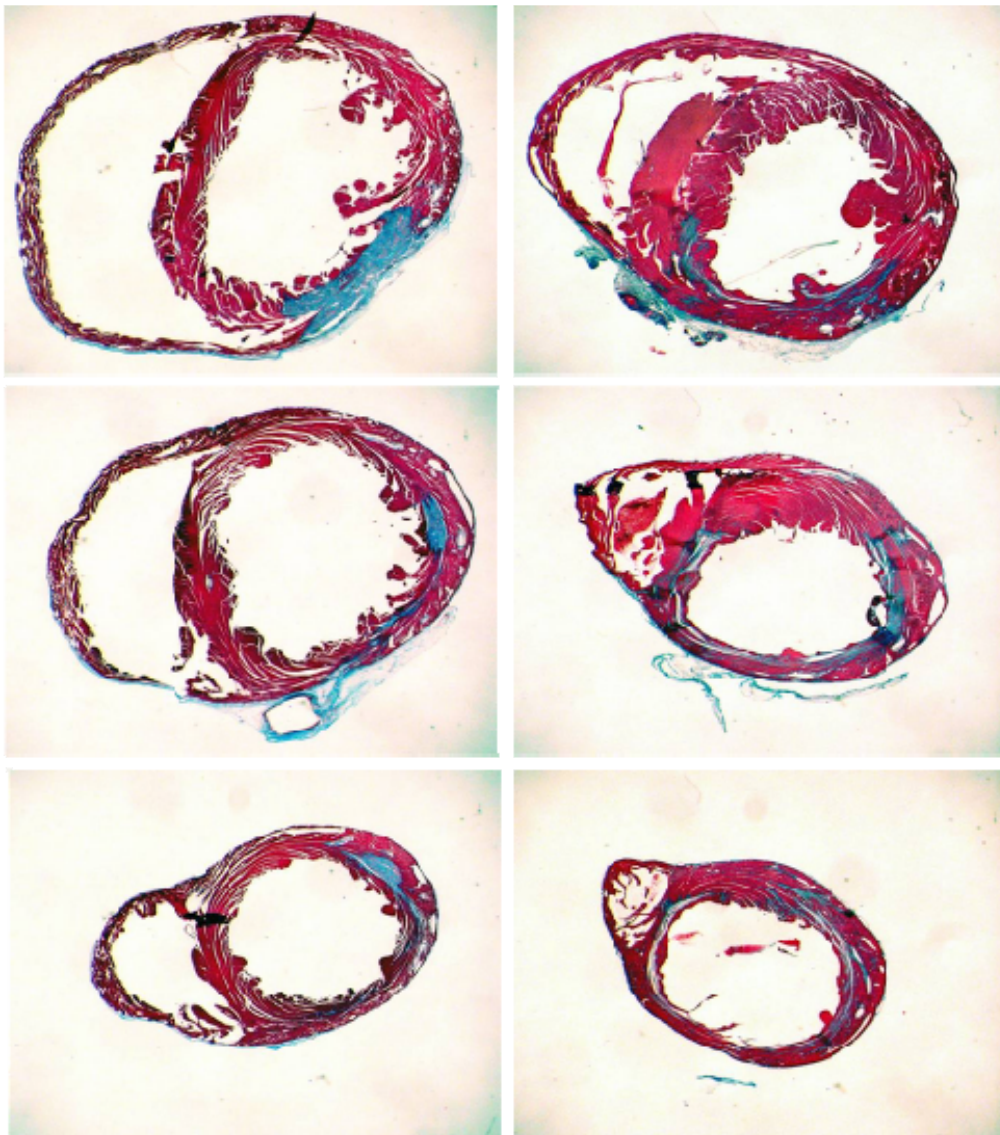


Abb. 3.2: Azanfärbung von Herzen nach 60 min Okklusion und 14 d Reperfusion. Links: aufeinanderfolgende Serienschritte des gleichen TLR4-D-Herzens, rechts: WT-Herz.

3.2.4 CD14-Proteinexpression

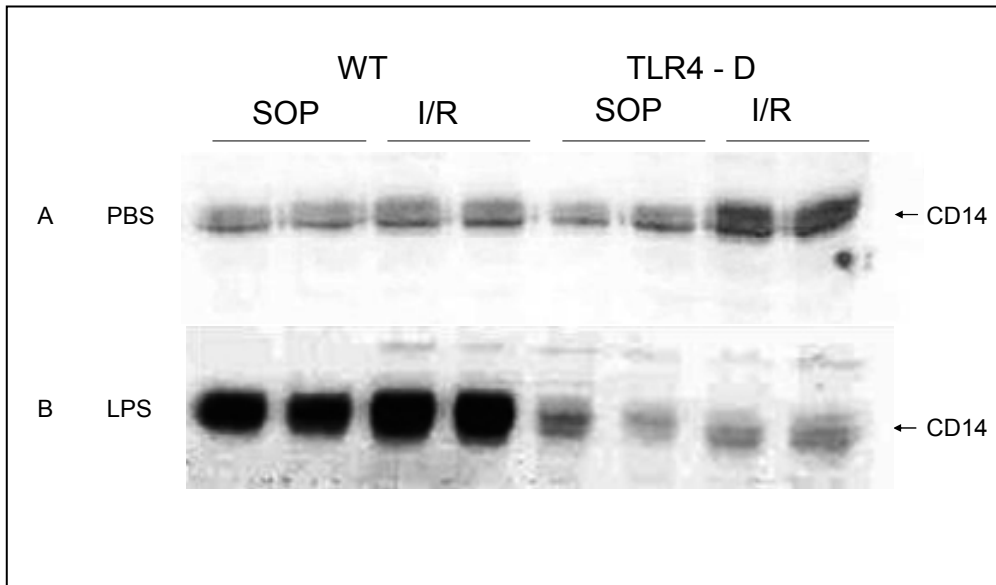


Abb. 3.3: CD14-Proteinexpression. Western Blot, A: PBS (Expositionsdauer 1'15“) B: LPS (Expositionsdauer 10“). Die unterschiedliche Bandenintensität von schein-operierten TLR4-D-Mäusen nach PBS und LPS-Stimulation ist auf verschiedene Expositionsdauern zurückzuführen.

Die CD14-Proteinexpression von WT und TLR4-D-Herzen wurde mithilfe eines Western Blots untersucht (Abb. 3.3). I/R induzierte nach 6 h Reperfusion einen geringen Anstieg der CD-14-Proteinexpression. Nach LPS-Vorbehandlung zeigten nur WT-, nicht jedoch TLR4-D-Mäuse, eine verstärkte CD14-Proteinexpression, welche durch I/R nochmals gering erhöht wurde.

3.2.5 TLR2 und TLR4 - mRNA-Expression

Der Einfluss der LPS-Vorbehandlung auf die TLR4 mRNA-Expression und eine mögliche Kreuzinduktion der TLR2-Expression wurde im RPA untersucht. Zudem interessierten die Rezeptoren aufgrund ihrer Eigenschaft, neben bakteriellen Zellwandbestandteilen endogene Liganden zu binden.

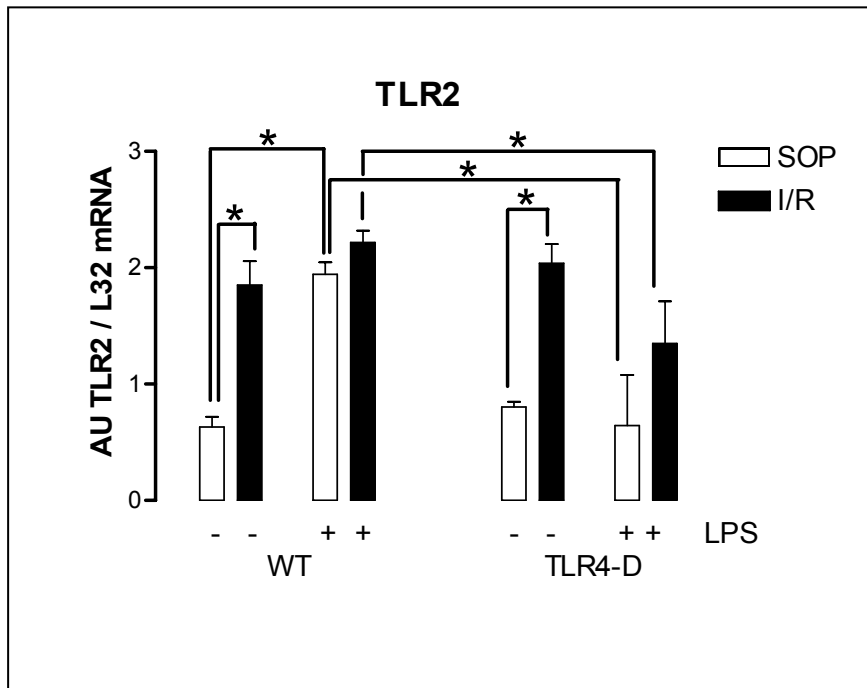


Abb. 3.4: TLR2 mRNA-Expression. * $p < 0,05$, $n = 5$.

Die TLR2 mRNA-Basalexpression un behandelter WT und TLR4-D-Mäuse unterschied sich nicht. Bei scheinoperierten WT-Mäusen induzierte die LPS-Applikation eine vermehrte TLR2 mRNA-Expression ($0,63 \pm 0,09$ (WT SOP PBS) vs. $1,94 \pm 0,10$ (WT SOP LPS), $p < 0,05$) (Abb. 3.4). Ein Effekt durch LPS war bei TLR4-D-Mäusen nicht zu beobachten. Beide WT-Gruppen (SOP, I/R) wiesen nach LPS-Gabe gegenüber LPS-stimulierten TLR4-D-Mäusen eine signifikant erhöhte TLR2-Expression auf ($1,94 \pm 0,10$ (WT SOP LPS) vs. $0,65 \pm 0,43$ (TLR4-D SOP LPS); $2,22 \pm 0,10$ (WT I/R LPS) vs. $1,35 \pm 0,36$ (TLR4-D I/R LPS)). Die TLR2 mRNA-Expression wurde durch I/R erhöht und erreichte sowohl bei PBS-behandelten WT als auch TLR4-D-Mäusen das Signifikanzniveau ($0,63 \pm 0,09$ (WT SOP PBS) vs. $1,85 \pm 0,21$ (WT I/R PBS); $0,80 \pm 0,04$ (TLR4-D SOP PBS) vs. $2,04 \pm 0,16$ (TLR4-D I/R PBS)).

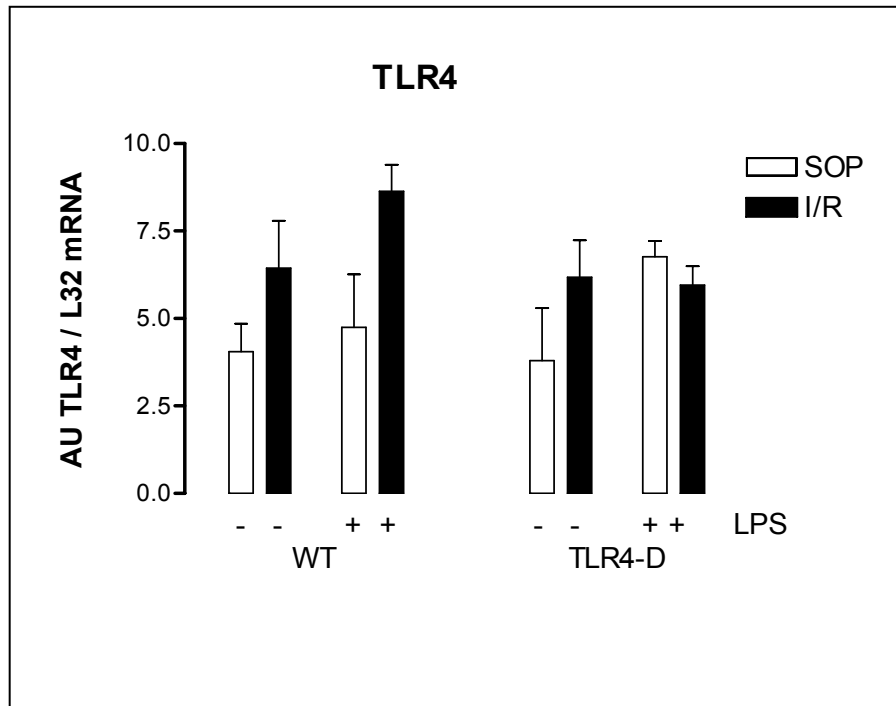


Abb. 3.5: TLR4 mRNA-Expression. * $p < 0,05$, $n = 5$.

In der Basalexpression des exprimierten TLR4 unterschieden sich WT und TLR4-D-Mäuse nicht, da es sich bei TLR4-D um einen TLR4-exprimierenden Phänotyp mit Punktmutation der intrazytoplasmatischen Domäne des TLR4 handelt ($4,05 \pm 0,80$ (WT SOP PBS) vs. $3,80 \pm 1,50$ (TLR4-D SOP PBS), ns) (Abb. 3.5). Die LPS-Applikation hatte keinen Einfluss auf die TLR4 mRNA-Expression. Insgesamt unterschied sich die mRNA-Expression des TLR4 zwischen I/R- und SOP-Gruppen (2-Wege ANOVA, $p < 0,05$), wies jedoch im Vergleich der Einzelgruppen keine Signifikanz auf ($4,05 \pm 0,80$ (WT SOP PBS) vs. $6,44 \pm 1,36$ (WT I/R PBS), ns).

3.2.6 Aktivität der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1

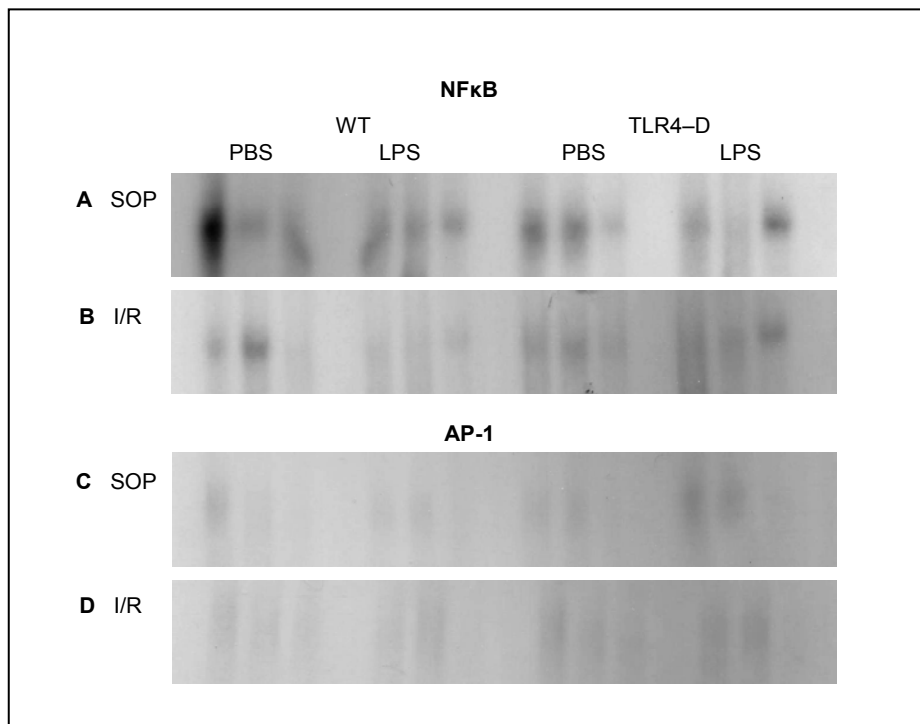


Abb. 3.6: DNA-Bindungsaktivität von NFκB und AP-1 im EMSA. Expositionsdauer: A >> 96 h, B und C 96 h, D 120 h.

Um die DNA-Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren und etwaige Einflüsse von LPS-Vorbehandlung, I/R bzw. des TLR4 feststellen zu können, wurden Herzen nach 60 min Okklusion und 60 min Reperfusion entnommen. Da es bei diesem Experiment keinen internen Standard gab, und es sich nur um ein einzelnes, wegweisendes Experiment handelte, eigneten sich die erhobenen Daten nicht für eine statistische Auswertung. Stattdessen wurde eine Autoradiographie angefertigt, auf der Unterschiede jedoch kaum erkennbar sind (Abb. 3.6). Hinsichtlich der NFκB-Aktivität waren zwischen SOP-Gruppen keine Unterschiede zu erkennen. Die WT PBS I/R-Gruppe variierte sehr stark während die WT LPS I/R-Gruppe durchgehend eine schwache NFκB-Aktivität entwickelte. Die AP-1-EMSA's zeigten trotz langer Expositionszeiten keine deutlichen Banden und werden deshalb nicht weiter diskutiert. Um verwertbare Ergebnisse zur Transkriptionsfaktoraktivität zu erhalten, sind weitere methodische Experimente notwendig.

3.2.7 HIF1 α -Regulation

Um die Prozesse nach LPS-Stimulation, Ischämie und etwaige TLR4-Einflüsse auf den Transkriptionsfaktor HIF und seine Zielgene ADM und iNOS untersuchen zu können, wurden Herzen aus WT (C57Bl/6) und TLR4-KO-Mäusen entnommen.

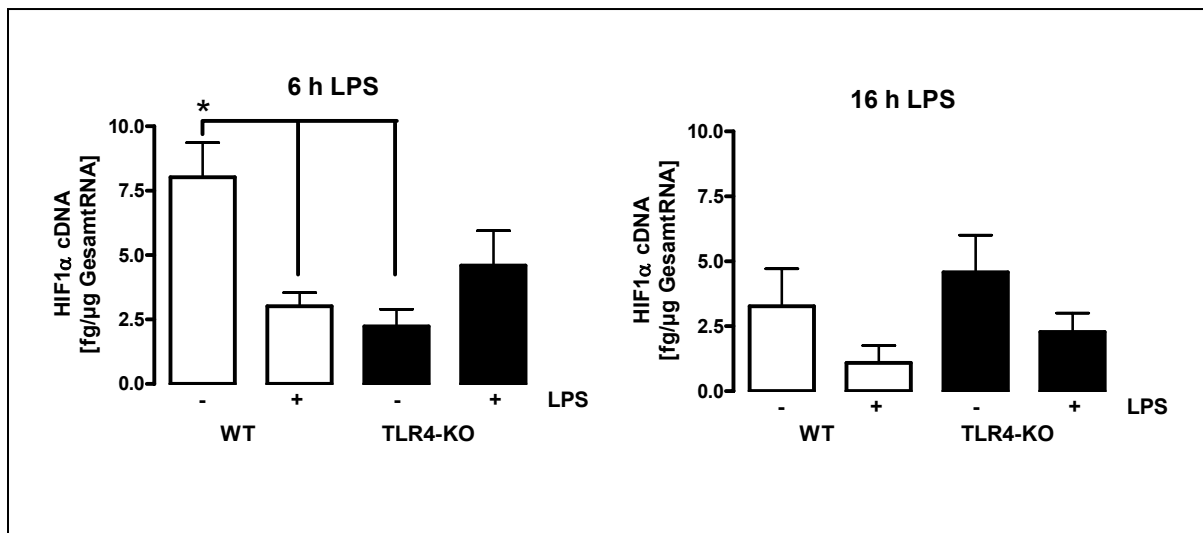


Abb. 3.7: HIF1 α mRNA-Expression nach 6 und 16 h LPS-Stimulation. * $p < 0,05$, $n = 5$.

Nach 6 h war die HIF1 α mRNA-Expression in allen Gruppen, außer in der WT-Gruppe nach PBS-Injektion, niedrig (Abb. 3.7). Demgegenüber erhöhte LPS die Proteinexpression in WT-Herzen (Abb. 3.8). Die Herzen von TLR4-KO-Mäusen zeigten keine signifikanten Unterschiede in der HIF-Expression in Abhängigkeit von PBS oder LPS.

Zum Zeitpunkt der Infarktinduktion nach 16 h LPS-Wirkung bewirkte LPS in beiden Genotypen eine Reduktion der mRNA-Expression um die Hälfte (ns) (Abb. 3.7). Die Proteinexpression unterschied sich zwischen den Gruppen zu diesem Zeitpunkt nicht mehr.

Nach beendeter Ischämie fanden sich keinerlei Unterschiede in Abhängigkeit von LPS-Vorbehandlung oder Genotyp (vgl. Abb. 3.7, Abb. 3.9). In allen Gruppen stieg die HIF1 α mRNA-Expression, im Vergleich zu den 16 h-Daten, auf den gleichen Wert an bzw. blieb im Fall der TLR4-KO-Gruppe gleich hoch (WT PBS: $3,3 \pm 1,4$ (SOP) vs.

4,7 ± 0,5 (I/R); WT LPS: 1,1 ± 0,7 (SOP) vs. 4,5 ± 0,5 (I/R); TLR4-KO PBS: 4,6 ± 1,4 (SOP) vs. 4,5 ± 0,4 (I/R).

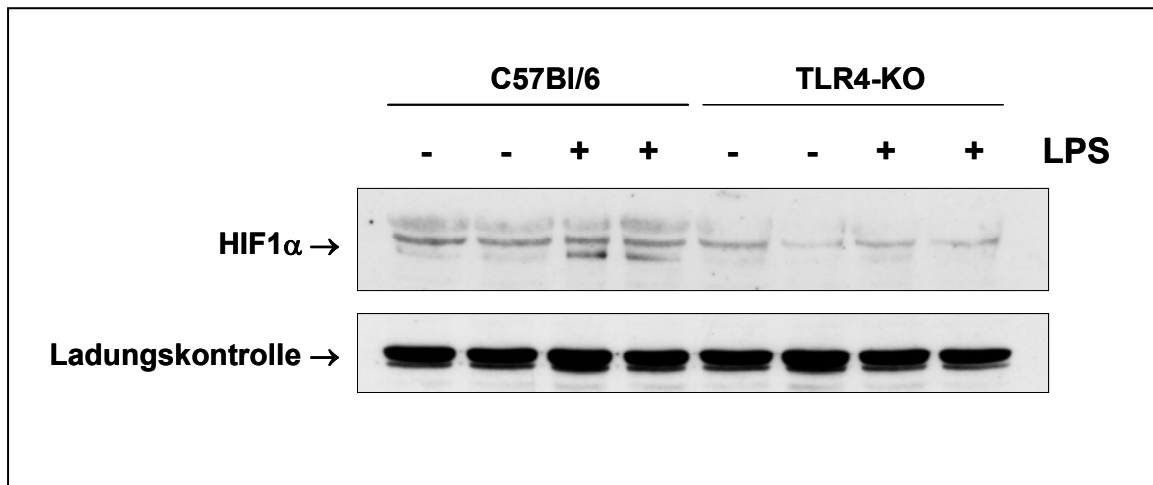


Abb. 3.8: HIF1 α -Proteinexpression nach 6 h LPS-Stimulation. Nur die untere Bande der sichtbaren Doppelbande stellt die HIF1 α -Expression dar. Diese ist lediglich nach LPS-Stimulation von WT-Mäuse nachweisbar.

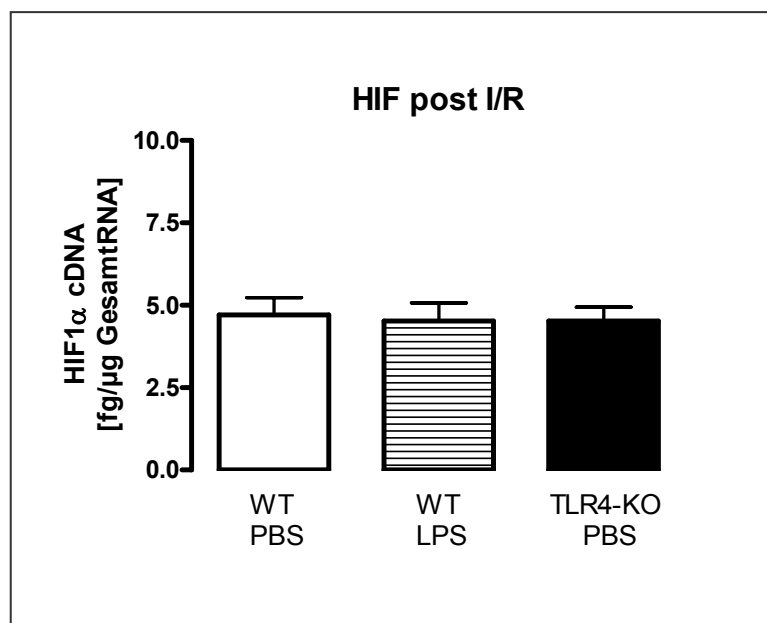


Abb. 3.9: HIF-1 α mRNA-Expression nach 60 min Ischämie und 180 min Reperfusion. WT: n = 5, TLR4-KO: n = 3.

3.2.8 Adrenomedullin - mRNA-Expression

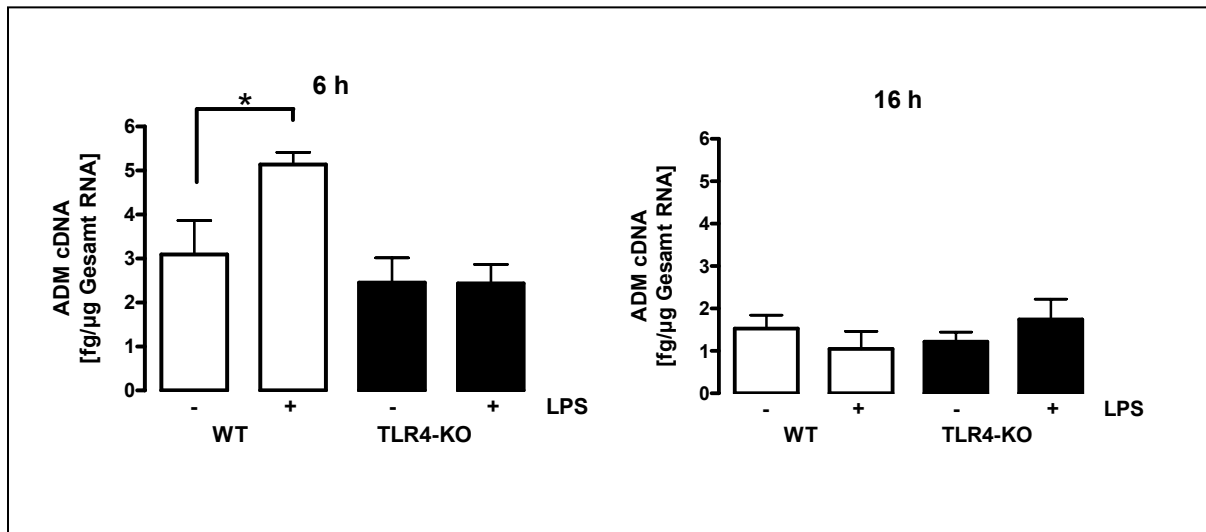


Abb. 3.10: ADM mRNA-Expression nach 6 und 16 h PBS oder LPS-Stimulation. * $p < 0,05$, $n = 5$.

Nach 6 h LPS-Wirkung war die Genexpression des HIF1-Zielgens ADM gegenüber PBS bei WT-Mäusen signifikant erhöht ($3,09 \pm 0,77$ (WT PBS) vs. $5,14 \pm 0,28$ (WT LPS)), $n = 5$ (Abb. 3.10). Herzen ohne TLR4 zeigten unabhängig von LPS eine niedrige ADM-Expression.

Zum Zeitpunkt der Infarktinduktion nach 16 h LPS-Wirkung wies die ADM-Expression zwischen den Gruppen keine signifikante Unterschiede auf (Abb. 3.10).

Im Vergleich zu diesen Werten vor Infarkt bewirkte I/R eine Erhöhung der ADM-Expression um das 3,7-fache (WT PBS: $1,5 \pm 0,3$ (SOP) vs. $5,5 \pm 2,8$ (I/R) fg ADM cDNA/µg Gesamt-RNA) bzw. 4-fache (WT LPS: $1,0 \pm 0,4$ (SOP) vs. $4,1 \pm 1,0$ (I/R)). Am stärksten fiel die ADM-Induktion durch I/R jedoch in Herzen von TLR4-KO-Mäusen aus, welche eine um den Faktor 20 gesteigerte mRNA-Expression aufwiesen ($1,2 \pm 0,2$ vs. $24,4 \pm 8,8$), die sich signifikant von der WT ADM-Expression unterschied (vgl. Abb. 3.10, Abb. 3.11).

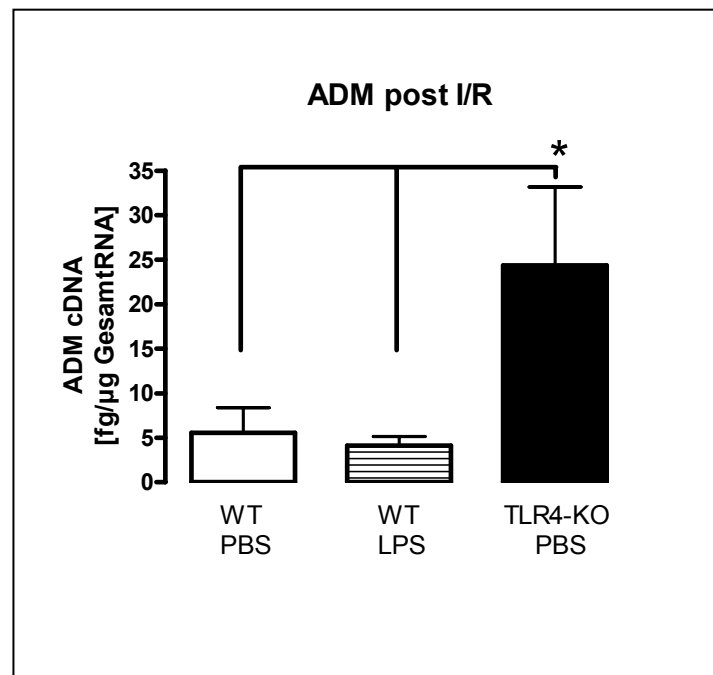


Abb. 3.11: ADM mRNA-Expression nach 60 min Ischämie und 180 min Reperfusion.

*p < 0,05, WT: n = 5, TLR4-KO: n = 3.

3.2.9 iNOS - mRNA-Expression

LPS induziert die NO-Produktion via iNOS. Aus diesem Grund wurde die iNOS-Expression mittels real time RT-PCR untersucht.

Die Basalexpression unterschied sich zwischen WT und TLR4-KO nicht (Abb. 3.12). LPS induzierte in WT-Herzen nach 6 h eine Verstärkung der iNOS mRNA-Expression um den Faktor 40 während in den übrigen Gruppen die Werte an der Detektionsgrenze lagen. Nach 16 h war in der LPS-Gruppe die iNOS-Expression ebenfalls unter die Detektionsgrenze zurückgegangen. Auch in Folge von Ischämie und 3 h Reperfusion erfolgte keine iNOS-Expression über die Detektionsgrenze hinaus.

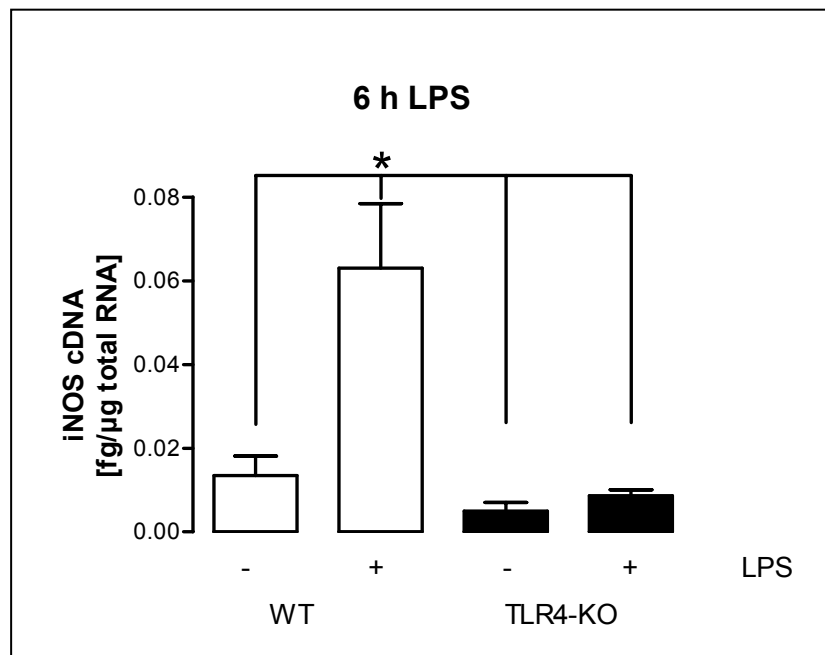


Abb. 3.12: iNOS mRNA-Expression. * $p < 0,05$. $n = 5$.

3.2.10 Zytokinregulation

Die Aktivierung von TLR4, Endotoxinämie und Ischämie induzieren die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Deshalb wurde die myokardiale Zytokinexpression im Herzen und Serum zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS-Vorbehandlung und Okklusion-Reperfusion bestimmt. Die Quantifizierung der mRNA-Expression im Herzen erfolgte mittels Real time RT-PCR und RPA, die Proteinexpression in Herz und Serum durch ELISA.

3.2.10.1 mRNA-Expression

Nach 6 und 16 h LPS-Stimulation von WT und TLR4-KO-Mäusen wurde die Zytokin-Expression mittels real-time RT-PCR untersucht ($n=5$). Die Quantifizierung der Zytokine TNF, IL-1 β und IL-6 deutete nach 6 h LPS-Präkonditionierung auf eine deutliche TLR4-abhängige LPS-Induktion aller drei Zytokine hin. Die mRNA-Expression erhöhte sich gegenüber unstimulierten WT-Mäusen (C57Bl/6) um ein

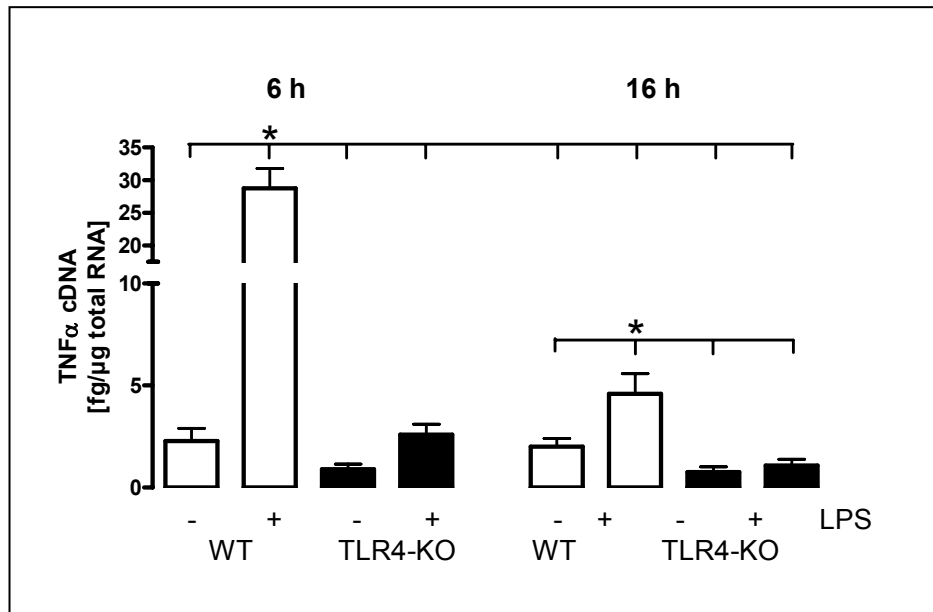


Abb. 3.13: TNF mRNA-Expression nach 6 und 16 h PBS bzw. LPS-Stimulation.

* $p < 0,05$, $n = 5$.

Vielfaches. TLR4-KO-Mäuse wiesen nach LPS keine Veränderungen der Zytokin-expression auf und unterschieden sich in der Basalexpression nicht vom WT.

Die TNF-Expression der LPS-behandelten WT war nach 6 h gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erhöht (Abb. 3.13). Im Vergleich zu PBS-behandelten WT stieg die Expression um das 13-fache an ($2,28 \pm 0,62$ (WT PBS) vs. $28,74 \pm 3,05$ (WT LPS)). Nach 16 h LPS zeigte sich ein signifikanter Rückgang gegenüber dem 6 h-Wert (WT 6 h LPS $28,74 \pm 3,05$ vs. $4,59 \pm 0,99$ (16 h)), jedoch bestand nach 16 h LPS noch immer ein signifikanter Unterschied zu den übrigen Gruppen.

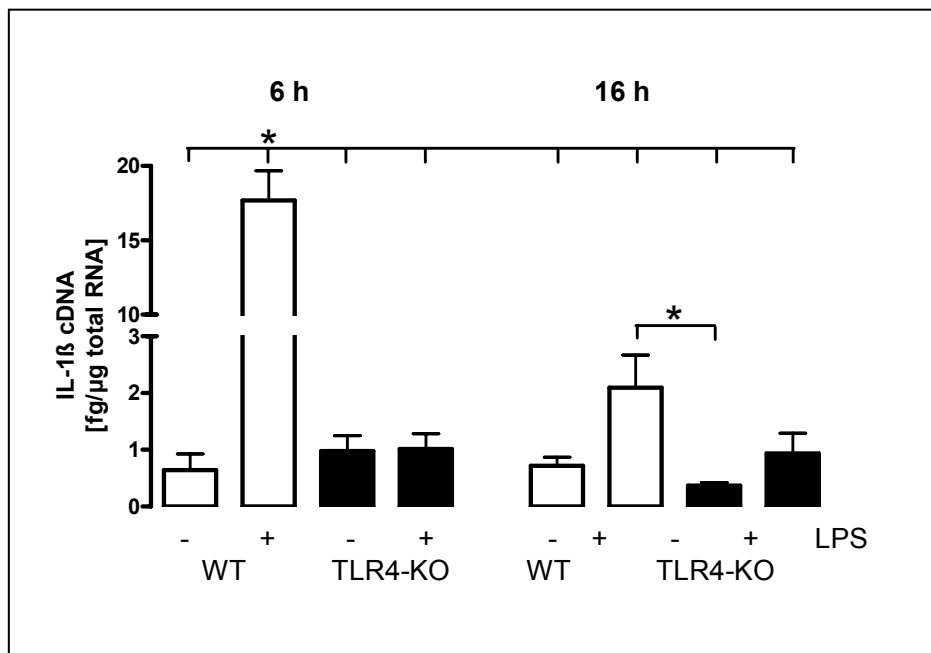


Abb. 3.14: IL-1 β mRNA-Expression nach 6 und 16 h PBS bzw. LPS-Stimulation.

* $p < 0,05$, $n = 5$.

Ähnlich verhielt sich die IL-1 β -Expression (Abb. 3.14). LPS induzierte nach 6 h einen signifikanten, 28-fachen IL-1 β -Anstieg in WT von $0,64 \pm 0,28$ (WT PBS) auf $17,68 \pm 1,99$ (WT LPS). Nach 16 h LPS war die IL-1 β -Expression rückläufig ($2,09 \pm 0,58$) und unterschied sich nicht mehr signifikant von PBS WT.

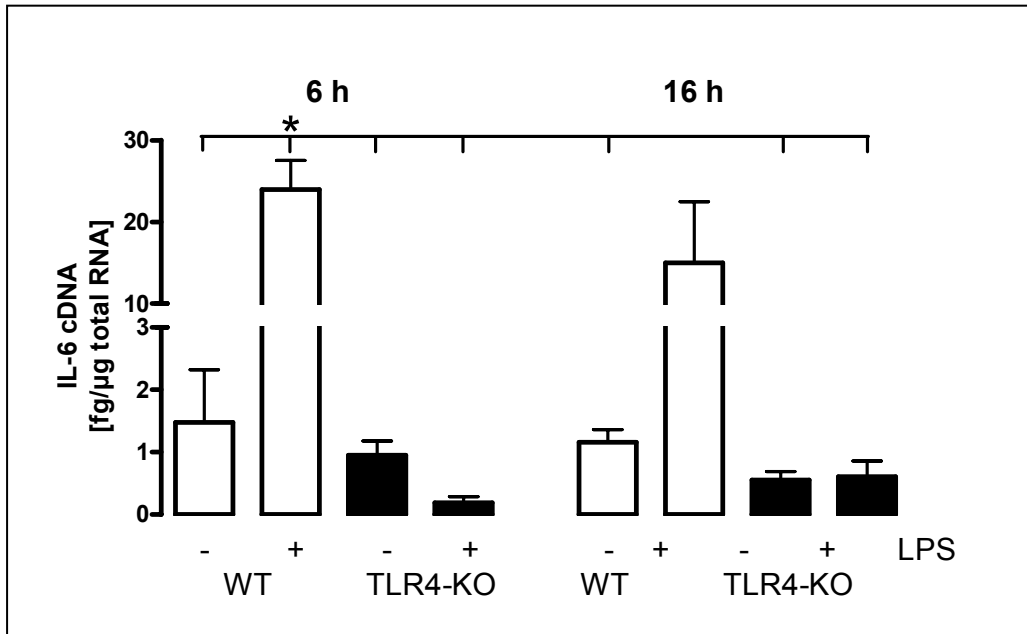


Abb. 3.15: IL-6 mRNA-Expression nach 6 und 16 h PBS bzw. LPS-Stimulation.

* $p < 0,05$, $n = 5$.

WT exprimierten nach 6 h LPS signifikant mehr IL-6 als unbehandelte WT und TLR4-KO-Mäuse ($1,48 \pm 0,84$ (WT PBS) vs. $23,96 \pm 3,56$ (WT LPS))(Abb. 3.15). Nach 16 h war die Expression in einzelnen LPS-vorbehandelten WT-Tieren noch immer hoch ($14,98 \pm 7,49$), unterschied sich jedoch im Mittel nicht von anderen Gruppen.

Die TNF, IL-1 β und IL-6 mRNA-Expressionen gemessen im RPA nach 16 h LPS-Vorbehandlung, 60 min Ischämie und 3 h Reperfusion wurde durch den Einflussfaktor I/R signifikant erhöht (2-Wege ANOVA) (Abb. 3.16). Im Einzelgruppenvergleich der mRNA-Expression (Bonferroni Posthoc-Test, n = 5) resultierten jedoch nur aus der IL-6 Induktion signifikante Unterschiede. Die Regulation erfolgte unabhängig von den Genotypen WT (C3H/HeN) und TLR4-D (C3H/HeJ). Eine signifikante Einflussnahme durch LPS-Vorbehandlung konnte nicht nachgewiesen werden.

Die TNF-Expression scheinoperierter Mäuse (PBS) betrug $0,39 \pm 0,03$ (WT) bzw. $0,57 \pm 0,12$ (TLR4-D) und lag unter den Werten LPS-vorbehandelter SOP-Mäuse (WT: $0,69 \pm 0,16$; TLR4: $1,0 \pm 0,29$). Durch I/R stieg die Expression jeweils auf einen Mittelwert von 1,5 (WT, TLR4-D) an, bzw. nach LPS auf $1,83 \pm 0,79$ (WT) und $1,90 \pm 0,28$ (TLR4-D).

Unbehandelte (PBS SOP) Mäuse wiesen einen IL-1 β -Spiegel von $0,87 \pm 0,31$ (WT) und $1,60 \pm 0,45$ (TLR4-D) auf. Nach LPS-Vorbehandlung lag dieser in WT mit $2,33 \pm 0,62$ höher (ns) und veränderte sich bei TLR4-D nicht ($1,034 \pm 0,24$). Den höchsten Anstieg nach I/R verzeichnete die WT PBS-Gruppe mit $10,53 \pm 4,82$ (ns). Die Übrigen (WT LPS, TLR4-D PBS und LPS) zeichneten sich durch gesteigerte, gemittelte Expressionswerte von 5,08 bis 7,10 aus.

Die Quantifizierung der IL-6 mRNA-Expression lieferte signifikante Unterschiede aller I/R-Gruppen verglichen mit dem jeweiligen SOP-Wert. WT PBS exprimierte nach I/R am meisten IL-6 ($1,97 \pm 0,13$ (SOP) vs. $11,25 \pm 2,72$ (I/R)). Der Anstieg durch I/R innerhalb der weiteren Paarungen fiel etwas geringer aus (WT LPS: $2,246 \pm 0,37$ vs. $9,04 \pm 1,97$; TLR4-D PBS: $1,82 \pm 0,19$ vs. $9,44 \pm 1,41$; TLR4-D LPS: $1,80 \pm 0,22$ vs. $7,44 \pm 0,49$).

Die Normierung der I/R-Werte auf die SOP-Daten ermöglichte eine isolierte Betrachtung des I/R-Effektes auf die Zytokinexpression und berücksichtigte Vorbehandlung und Genotyp. Bei allen I/R-Gruppen kam es zu einem IL-6-Zytokinanstieg (Bonferroni Posthoc-Test). Die Analyse von TNF und IL-1 β ergab jedoch, dass im Einzelgruppenvergleich lediglich in der WT PBS-Gruppe ein signifikanter Anstieg nach I/R erfolgte (Bonferroni Posthoc-Test). LPS-vorbehandelte

und TLR4-D-Mäuse wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen SOP und I/R hinsichtlich der TNF und IL-1 β mRNA-Expression auf.

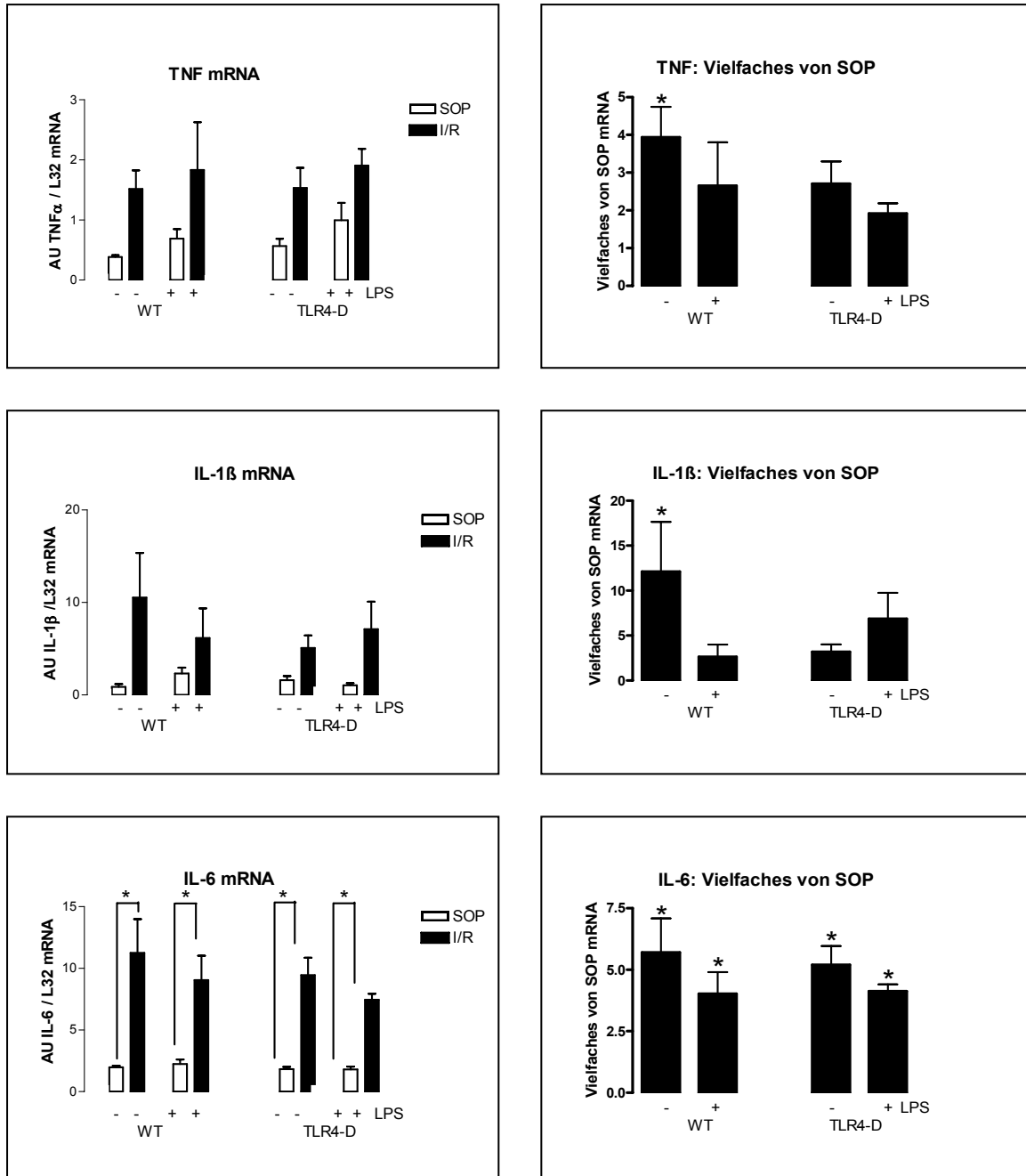


Abb. 3.16: mRNA-Expression der Zytokine TNF, IL-1 β und IL-6 nach 60 min Ischämie und 180 min Reperfusion. * p < 0,05 vs. SOP. Die linke Grafik zeigt die mRNA-Quantifizierung nach Normierung auf L32 in allen acht untersuchten Gruppen. In der rechten Abbildung ist die Berechnung des Vielfachen der jeweiligen SOP-Gruppe dargestellt.

3.2.10.2 Proteinexpression

Die Quantifizierung der Zytokin-Proteinexpression erfolgte im ELISA. Zunächst soll die Situation im Herzen besprochen werden. Generell wurde die IL-6-Expression am stärksten durch I/R beeinflusst. Bei beiden Genotypen führte I/R zu einem signifikanten Anstieg, der bei TLR4-D geringer ausfiel, wobei sich zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede ergaben ($8,0 \pm 1,1$ pg/mg Protein (TLR4-D PBS I/R) vs. $16,0 \pm 3,2$ pg/mg Protein (WT PBS I/R), $p < 0,05$, $n = 5$). Vergleichbare Effekte zeigten sich auch bei IL-1 β und TNF, jedoch waren die Unterschiede in der Regel nicht signifikant. Eine Ausnahme stellt der signifikante Anstieg des IL-1 β -Proteins bei WT nach I/R dar. Zwischen SOP-Gruppen gab es keine genotyp-abhängigen Unterschiede in Bezug auf TNF und IL-1 β , allerdings lag die IL-6-Expression bei TLR4-D-Mäusen signifikant über der der WT-Mäuse ($1,85 \pm 0,23$ vs. $0,94 \pm 0,22$ pg/mg Protein, $p < 0,05$).

Alle untersuchten Zytokine wurden im Serum der WT-Mäuse nach I/R um ein Vielfaches stärker exprimiert als bei TLR4-D-Mäusen. Der TNF-Serumspiegel von WT-Tieren lag um das 11,9-fache über dem der TLR4-D-Mäuse ($491,1 \pm 138,6$ pg/ml (WT I/R) vs. $41,2 \pm 9,6$ pg/ml (TLR4-D), $p < 0,05$). Die IL-1 β -Expression war in der WT-Gruppe 3,7-fach höher als bei TLR4-D ($314,9 \pm 76,3$ pg/ml vs. $85,9 \pm 32,2$ pg/ml, $p < 0,05$). Die TNF- und IL-1 β -Serumspiegel von TLR4-D unterschieden sich in Folge von I/R nicht von denen nach SOP. Die IL-6-Expression der WT-Mäuse nach I/R war 1,6 mal höher im Vergleich zu TLR4-D-Mäusen ($1890,6 \pm 78,6$ pg/ml (WT) vs. $1178,1 \pm 314,2$ pg/ml (TLR4-D), ns). Beide Mausstämme wiesen signifikante Unterschiede nach I/R im Vergleich zu SOP auf.

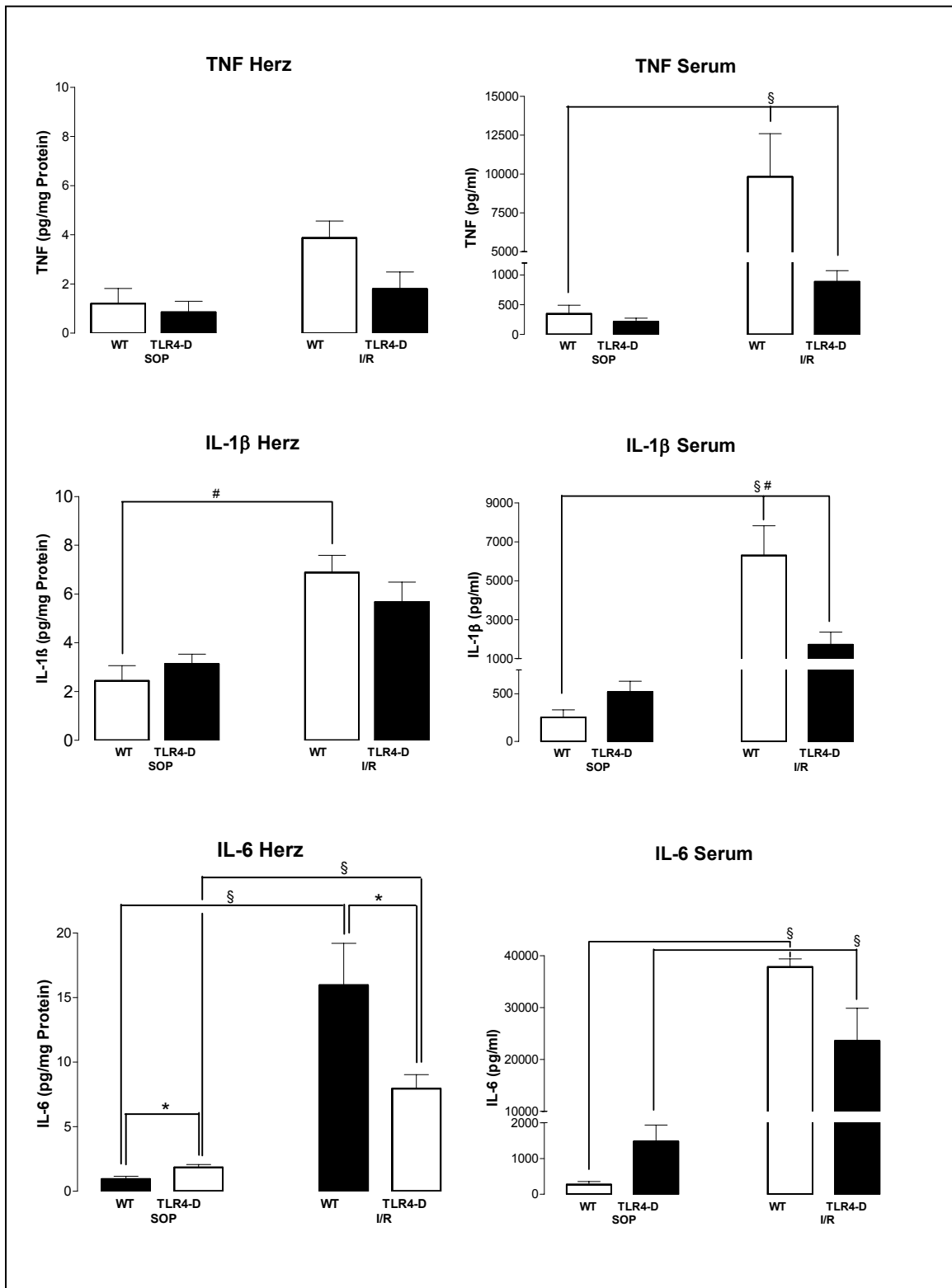


Abb. 3.17: Proteinexpression der Zytokine IL-1 β , TNF und IL-6 in Herz und Serum nach SOP und I/2h Rep.

3.2.11 Zytokinrezeptorregulation - TNFR1 mRNA-Expression

Die mRNA-Expression des TNFR1 wurde ausschließlich nach I/R in den Herzen von WT und TLR4-KO-Mäusen untersucht. Die Expression unterschied sich nicht zwischen den Genotypen und wurde auch durch eine vorangegangene LPS-Vorbehandlung nicht beeinflusst.

3.2.12 Chemokin-mRNA-Expression

Die „early response cytokines“ TNF, IL-1 β und IL-6 induzieren die Ausschüttung von Chemokinen. Hierbei handelt es sich um chemotaktisch wirkende Zytokine, die eine Einwanderung von Immunzellen ins Entzündungsgebiet bewirken.

Die Chemokinexpression innerhalb der einzelnen Gruppen war sehr variabel. Deswegen wurde im Bonferroni Posthoc-Test für keines der untersuchten Chemokine ein signifikanter Unterschied gefunden. Eine Gesamtanalyse aller Chemokinwerte in Abhängigkeit von I/R, LPS und Genotyp ergab jedoch, dass I/R in WT- nach PBS und in TLR4-Mäusen sowohl nach PBS als auch nach LPS einen Anstieg der Chemokinexpression bewirkte. LPS induzierte nur bei WT eine verstärkte Chemokinexpression. Diese stieg nach I/R nicht weiter an.

Die mRNA-Expression von Lymphotactin war im Verhältnis zu den übrigen Chemokinen um ein Vielfaches geringer. Die höchste mRNA-Expression wiesen RANTES, MIP-2 und MCP-1 auf (Tab. 6.4).

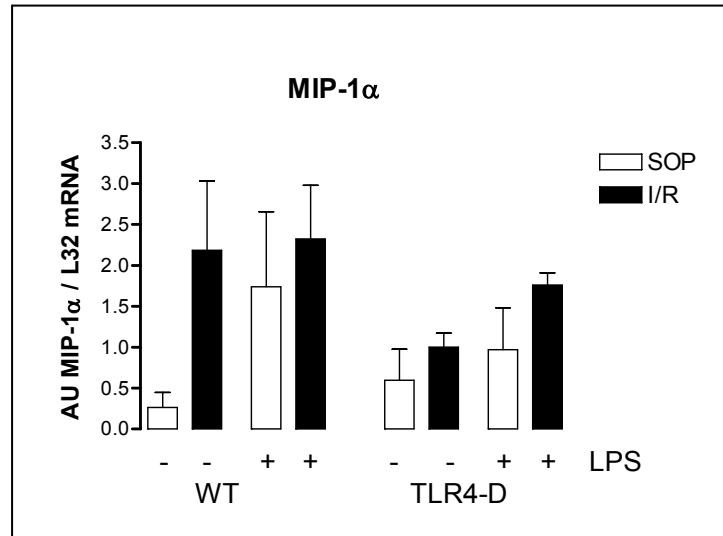


Abb. 3.18: mRNA-Expression von MIP-1α.

Die Ergebnisse des 2-Wege-ANOVAs deuten auf eine Induktion der mRNA-Expression von MIP-1α und MCP-1 durch I/R unabhängig vom Genotyp hin (Abb. 3.18, Abb. 3.19; $p < 0,05$). Die höchste Differenz zwischen SOP und I/R hinsichtlich der MIP-1 α-Expression wiesen WT PBS auf ($0,26 \pm 0,19$ (SOP) vs. $2,19 \pm 0,85$ (I/R), ns). Die MIP-1α-Expression von LPS-behandelten WT war in der SOP Gruppe bereits hoch ($1,74 \pm 0,92$) und steigerte sich durch I/R nicht nennenswert ($2,32 \pm 0,66$). Die mRNA-Werte der TLR4-D-Mäuse nach I/R waren vergleichsweise niedriger ($0,60 \pm 0,38$ (PBS SOP) vs. $1,00 \pm 0,17$ (PBS I/R); $0,97 \pm 0,51$ (LPS SOP); $1,76 \pm 0,15$ (LPS I/R)).

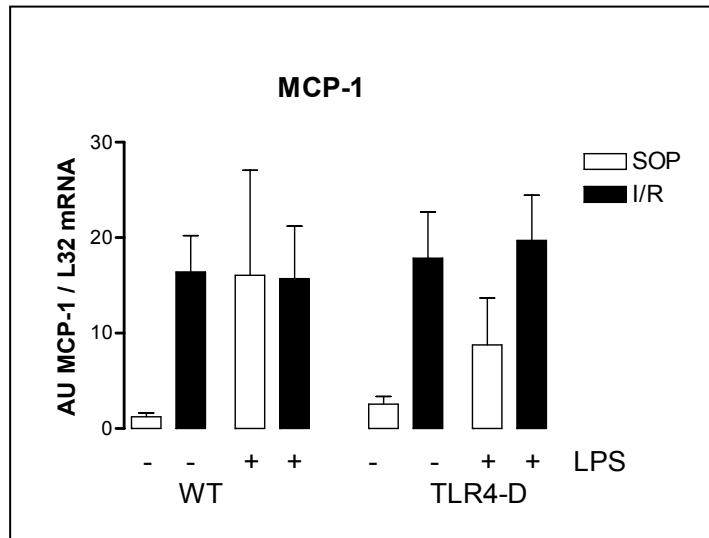


Abb. 3.19: mRNA-Expression von MCP-1.

Die MCP-1 mRNA-Expression von WT-Mäusen stimmte mit den genannten Verhältnissen bei MIP-1 α überein ($1,23 \pm 0,42$ (PBS SOP) vs. $16,42 \pm 3,80$ (PBS I/R); $16,07 \pm 11,0$ (LPS SOP) vs. $15,71 \pm 5,51$ (LPS I/R)). Die MCP-1-Expression von TLR4-D-Mäusen entsprach in etwa den jeweiligen WT PBS-Daten.

WT und TLR-D unterschieden sich signifikant in der Eotaxin-Expression, welche bei TLR4-D unabhängig von der Behandlung erhöht war (WT: 1,05 - 1,56; TLR4-D: 2,37 - 3,07; 2-Wege-ANOVA, $p < 0,05$) (Abb. 3.20).

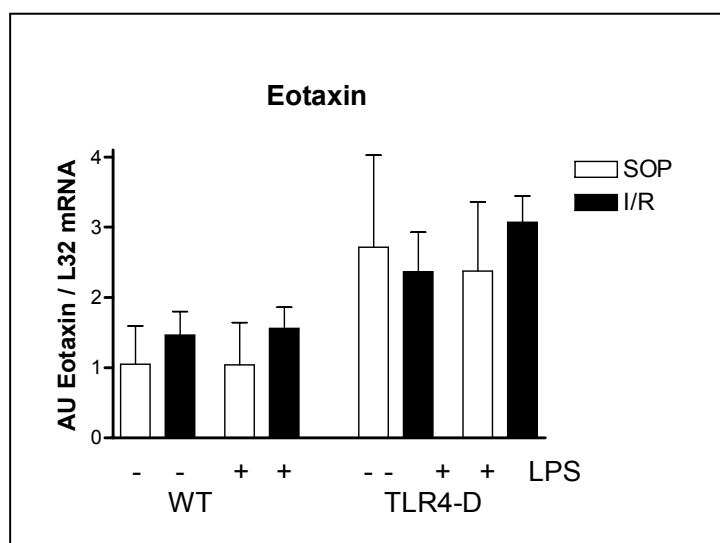


Abb. 3.20: mRNA-Expression von Eotaxin.

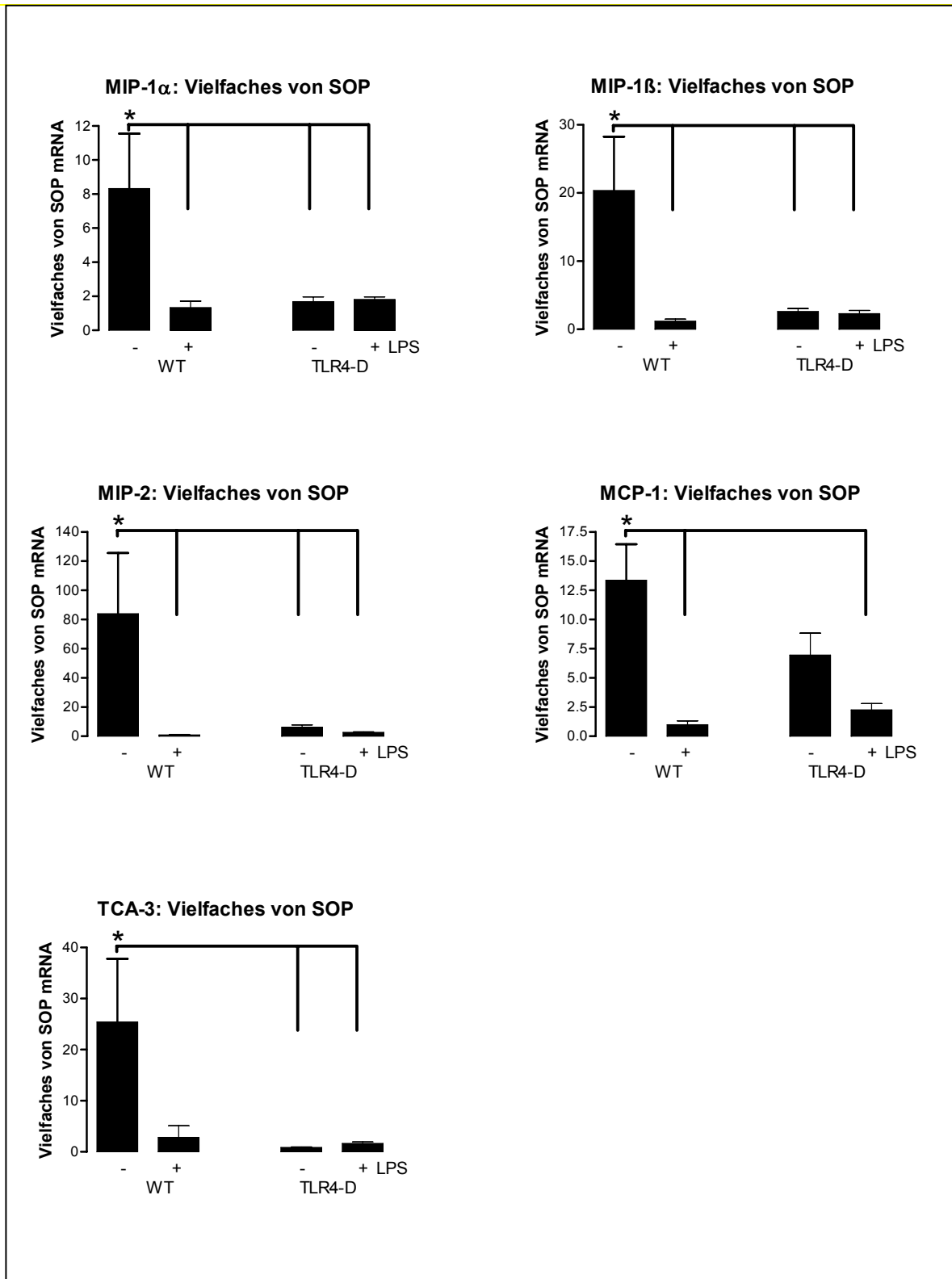


Abb. 3.21: Vielfaches der SOP Chemokin mRNA-Expression. * $p < 0,05$ vs. PBS SOP und weitere Gruppen wie angegeben.

Wie in Kapitel 3.2.10.1 wurde auch für die Chemokin mRNA-Expression nach I/R das Vielfache der SOP-Werte errechnet (Abb. 3.21). Denn die Gesamtanalyse der Chemokindaten ergab, dass sich WT und TLR4-D in der basalen Chemokin-expression unterschieden. Die Darstellung des SOP-Vielfachen trägt diesem Umstand Rechnung und berücksichtigt zudem, dass es nach LPS-Präkonditionierung zu einer Verstärkung der Chemokin mRNA-Expression kam, I/R jedoch nur eine geringe Chemokininduktion bewirkte. MIP-1 α , - β , -2, MCP-1 und TCA-3 wurden nur in der WT PBS-Gruppe durch I/R signifikant gegenüber SOP erhöht. Darüberhinaus unterschied sich der Expressionsanstieg der genannten Chemokine bei WT PBS I/R auch signifikant von den meisten anderen I/R-Gruppen.

3.2.13 MMP- und TIMP-Regulation

3.2.13.1 mRNA-Expression

Das MMP / TIMP System spielt eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen im Allgemeinen und beim kardialen Remodelling nach Ischämie im Besonderen (Lalu *et al.*, 2004); (Lindsey *et al.*, 2003). Um den Einfluss von MMPs auf die Infarktgröße zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression von MMPs und TIMPs gemessen. Alle Gruppen wurden nach 3 h Reperfusion untersucht. Ergänzend wurde eine Messreihe nach 24h Reperfusion durchgeführt. Allerdings beschränkte sich diese Analyse lediglich auf die Unterschiede zwischen WT und TLR4-D-Mäusen und ließ LPS-Effekte außer Acht.

Der potentielle Einfluss einer Okklusion auf MMPs wurde durch Quantifizierung der mRNA-Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8 und MMP-9 untersucht (Abb. 3.22, Tab. 6.2). Die basale MMP- und TIMP-Expression der Herzen aller untersuchten Mäuse unterschied sich zwischen WT- und TLR4-D-Gruppen nicht, wohl aber z.T. zwischen den Wildtypstämmen. MMP-1 mRNA wurde im Vergleich zu den übrigen MMPs am niedrigsten exprimiert. Durch Okklusion wurde die MMP-1 mRNA-Expression sowohl in WT als auch TLR4-D-Herzen unabhängig von der Vorbehandlung verstärkt, erreichte jedoch nur in der WT LPS I/R- und der TLR4-D PBS I/R-Gruppen im Vergleich zur jeweiligen SOP-Gruppe das Signifikanzniveau.

Trotzdem blieb auch in diesen Gruppen die Menge des exprimierten MMP-1 hinter den übrigen MMPs zurück. Die MMP-1-Expression fiel nach 24 h Reperfusion sogar unter den Ausgangswert von SOP-Mäusen und war signifikant geringer als 3 h nach dem Infarkt.

Unter den analysierten MMPs wies MMP-2 die höchste mRNA-Expression auf, die jedoch von LPS-Vorbehandlung und Okklusion unbeeinflusst blieb. Die MMP-2 mRNA-Expression veränderte sich auch nach 24 h Reperfusion nicht.

LPS-Vorbehandlung erhöhte die Expression von MMP-3-mRNA in SOP WT-Mäusen um das dreifache, I/R hatte jedoch keine Auswirkung. Im Vergleich zur SOP-Gruppe war MMP-3 hingegen in beiden Genotypen nach 24 h Reperfusion, in TLR4-D-Mäusen außerdem in Relation zur dreistündigen Reperfusion signifikant erhöht. Zudem wiesen TLR4-D-Mäuse nach Ischämie und 24h Reperfusion eine höhere MMP-3-Expression auf als WT.

Die MMP-8 und MMP-9 mRNA-Expression veränderte sich in ähnlichem Maße wie MMP-3 und wurde durch LPS-Stimulation signifikant erhöht. Zudem stieg MMP-8 mit zunehmender Reperfusionsdauer signifikant an. Sowohl WT als auch TLR4-D-Mäuse zeigten eine gesteigerte mRNA-Expression im Vergleich zu SOP. Ausserdem war der Unterschied zwischen 3 und 24 h Reperfusion bei TLR4-D signifikant. Sowohl MMP-8 als auch MMP-9 wurden TLR4-abhängig reguliert und stiegen in WT nach I/R weniger stark als in den vergleichbaren TLR4-D-Gruppen. Die MMP-9 mRNA-Expression unterschied sich nach 24 h in beiden Genotypen signifikant sowohl von SOP als auch 3 h reperfundierten Tieren.

Die Gesamt-MMP-Expression erreichte nur nach LPS-Gabe bei WT-Mäusen das Signifikanzniveau und war auf die expressionssteigernde Wirkung von LPS auf MMP-3, -8 und -9 zurückzuführen. Nach 24 h Reperfusion konnte eine TLR4-abhängige Regulation von MMP-3, -8, -9 beobachtet werden, die durch WT-Mäuse signifikant geringer exprimiert wurden.

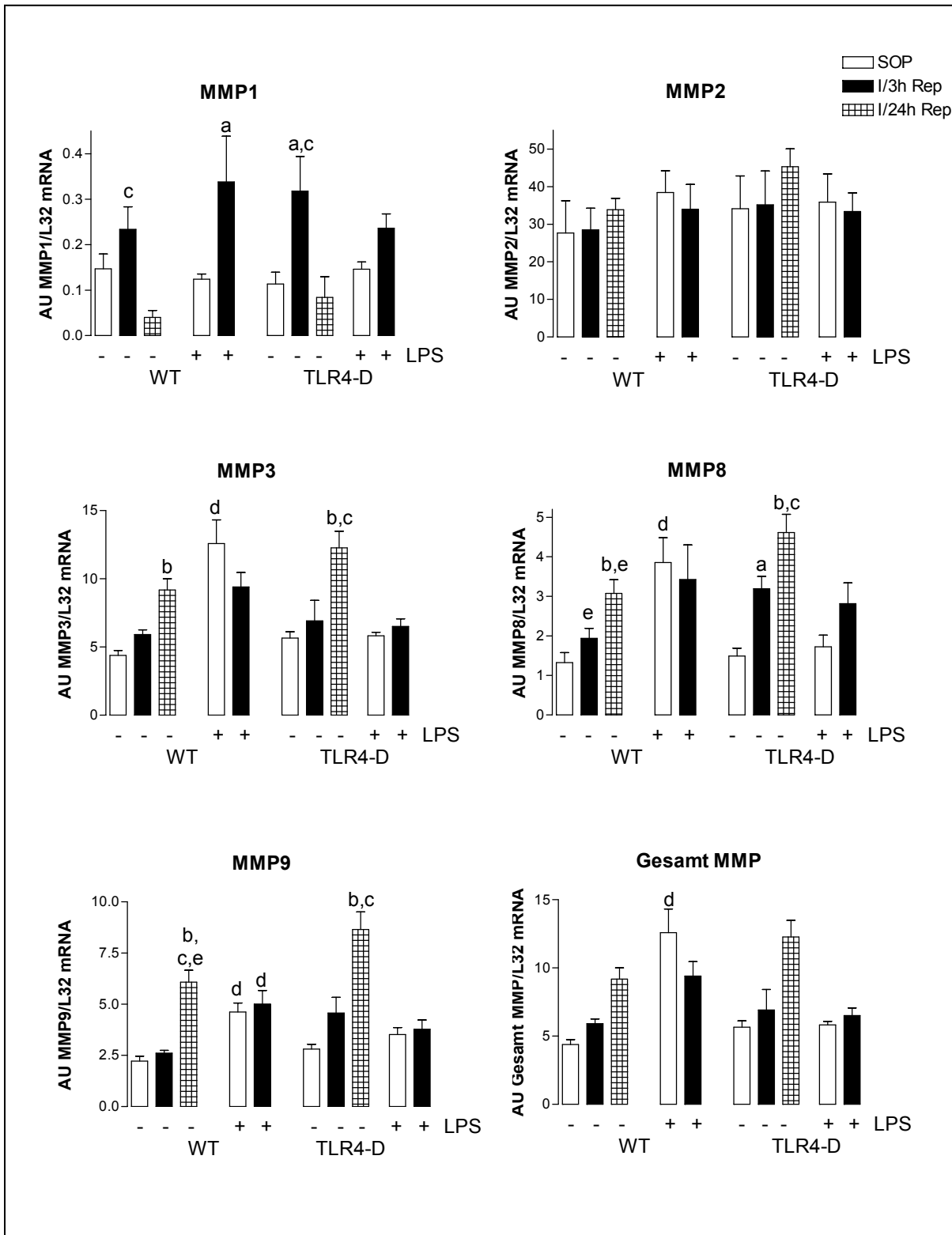


Abb. 3.22: mRNA-Expression von MMPs. P-Werte der einzelnen Gruppen untereinander wurden mit einem Bonferroni-Posthoc-Test berechnet (2-Wege ANOVA). a: ($p < 0,05$) I/3h Rep vs SOP; b: I/24h Rep. vs SOP, c: I/24h Rep vs I/3h Rep, d: PBS vs. LPS; e: WT vs. TLR4-D. Mittelwerte \pm SEM; $n=5$; außer PBS SOP-Gruppen und WT 24h Rep: $n=3$).

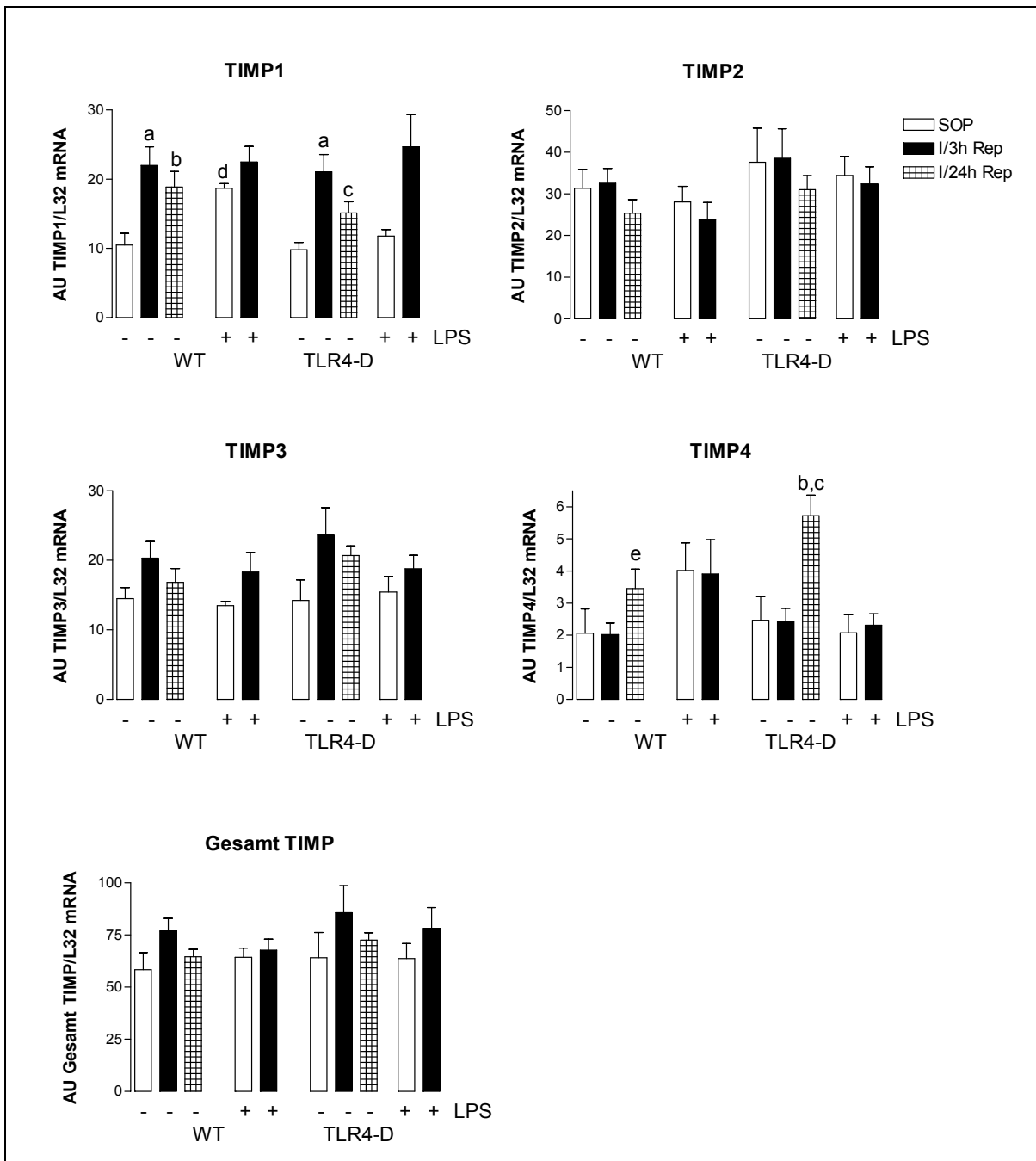


Abb. 3.23: mRNA-Expression von TIMP 1-4 und Gesamt-TIMP-Expression. P-Werte der einzelnen Gruppen untereinander wurden mit einem Bonferroni-Posthoc-Test berechnet (2-Wege ANOVA). a: ($p < 0,05$) 1/3h Rep vs SOP; b: 1/24h Rep. vs SOP, c: 1/24h Rep vs 1/3h Rep, d: PBS vs. LPS; e: WT vs. TLR4-D. Mittelwerte \pm SEM; $n=5$; außer PBS SOP-Gruppen und WT 24h Rep: $n=3$).

Die statistische Untersuchung der Gesamt-TIMP mRNA-Expression ergab keine Unterschiede. Nur die separate Analyse der jeweiligen TIMPs deutete auf Veränderungen hin. Die mRNA der TIMPs 1-4 konnte unter Kontrollbedingungen (SOP PBS) in den Herzen beider Genotypen nachgewiesen werden. TIMP-2 mRNA am stärksten und das herzspezifische TIMP-4 am niedrigsten exprimierte (Abb. 3.23).

LPS behandelte SOP WT-Mäuse wiesen eine erhöhte TIMP-1 mRNA-Expression auf, die sich durch Okklusion nicht weiter veränderte. In allen übrigen Gruppen induzierte I/R eine erhöhte TIMP-1 mRNA-Expression. In Relation zum 3 h Reperfusionswert sank die TIMP-1 mRNA-Expression (TLR4-D) nach 24 h, war jedoch noch immer höher als in SOP-Tieren (WT).

Der hohe basale TIMP-2 mRNA-Wert wurde durch keine der angewendeten Interventionen verändert. Im Allgemeinen wurde die TIMP-3 mRNA-Expression durch Okklusion erhöht (2-Wege ANOVA $p < 0,05$). Jedoch liessen sich im Post Hoc Test keine einzelnen Unterschiede nachweisen.

Die herzspezifische TIMP-4 mRNA-Expression verdoppelte sich bei WT-Mäusen durch LPS-Stimulation und blieb in TLR4-D-Mäusen unverändert. TIMP-4 wurde nach 24 h Reperfusion ausschließlich in TLR4-D-Mäusen induziert und erhöhte sich sowohl im Verhältnis zur SOP als auch zu 3 h reperfundierten Tieren signifikant.

3.2.13.2 MMP / TIMP-Quotienten

Für die Regulation der EZM-Degradation und das Remodelling ist das Verhältnis der MMPs zu TIMPs entscheidend (Kaden *et al.*, 2003, Lanchou *et al.*, 2003, Pagenstecher *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurden die Quotienten errechnet und einige repräsentative Kombinationen in Abb. 3.24 sowie Tab. 6.3 gezeigt.

In den Herzen von WT-Mäusen war ein Anstieg des MMP / TIMP-Gesamtverhältnisses nach LPS-Vorbehandlung zu beobachten, der im Wesentlichen auf einen Anstieg der Quotienten von MMP-2 / TIMP-2, MMP-3 / TIMP-1 und MMP-9 / TIMP-3 zurückzuführen war. Demgegenüber bewirkte LPS in TLR4-D-Herzen keine Veränderung. Die Ischämie gefolgt von 3 h Reperfusion beeinflusste das

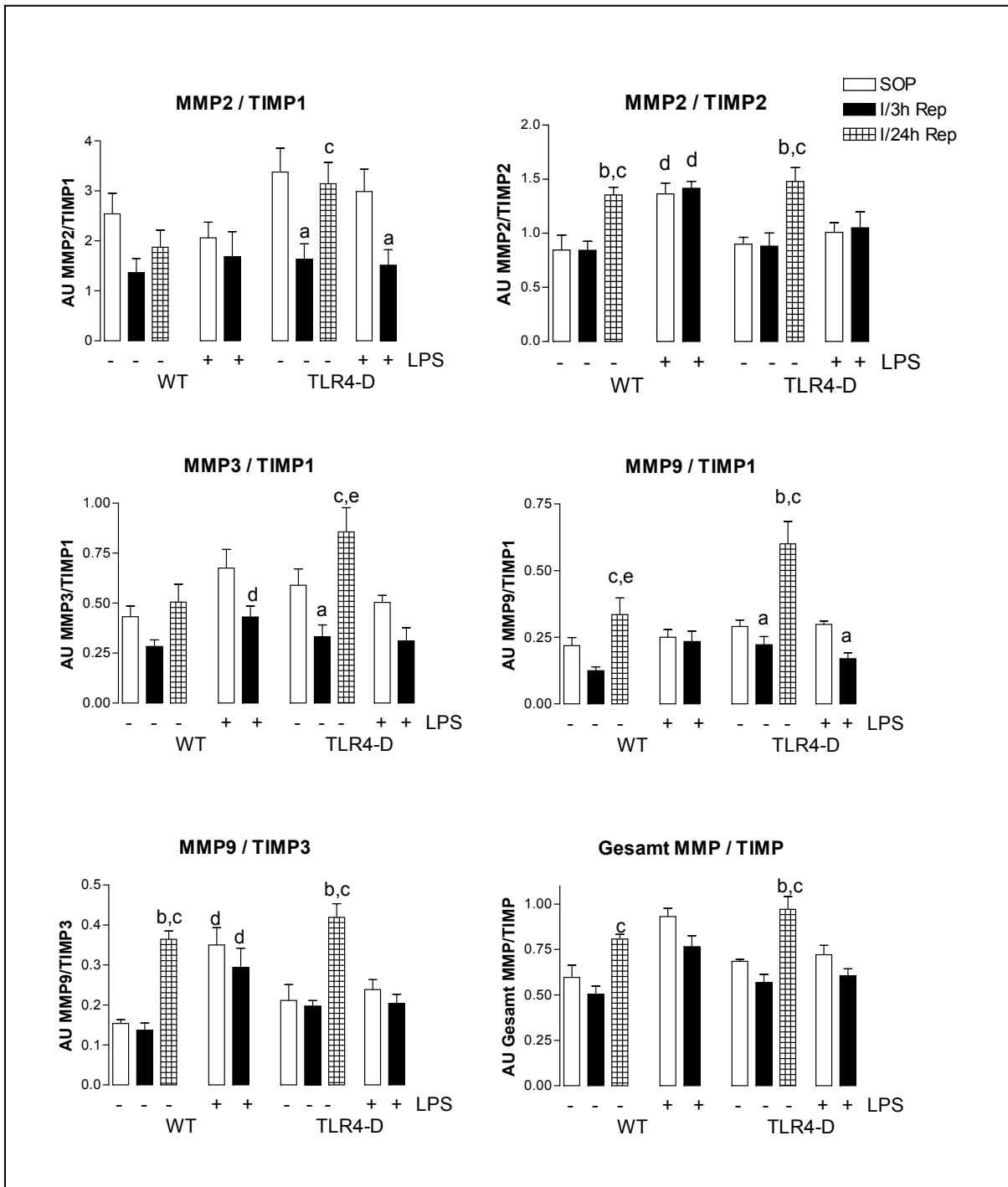


Abb. 3.24: MMP-TIMP-Quotienten. P-Werte der einzelnen Gruppen untereinander wurden mit einem Bonferroni-Posthoc-Test berechnet (2-Wege ANOVA). a: ($p < 0,05$) I/3h Rep vs SOP; b: I/24h Rep. vs SOP, c: I/24h Rep vs I/3h Rep, d: PBS vs. LPS; e: WT vs. TLR4-D. Mittelwerte \pm SEM; $n=5$; außer PBS SOP-Gruppen und WT 24h Rep: $n=3$).

MMP / TIMP-Verhältnis nicht. Nach 24 h Reperfusion war der MMP/TIMP-Gesamtquotient hingegen bei beiden Genotypen in ähnlichem Maße erhöht wie durch LPS-Behandlung bei WT-Mäusen. Auf diesen Gesamtwert nahm das signifikant erhöhte MMP-2/TIMP-2-Verhältnis einen wesentlichen Einfluss.

3.2.13.3 Zymographische Aktivität

Mit Hilfe von Zymographie-Assays wurde untersucht, ob die beobachteten Veränderungen in der mRNA-Expression mit der zymographischen Aktivität der MMPs korrelierten. In der Gelatine-Zymographie konnte die Aktivität von MMP-2 und -9 nachgewiesen werden.

Obwohl MMP-2 auf mRNA-Ebene in größerem Maße exprimiert wurde als MMP-9, unterschied sich die Aktivität der beiden Enzyme in SOP-Tieren nicht (Abb. 3.25A). Nach LPS-Stimulation kam es beim WT zu einem signifikanten Anstieg der enzymatischen MMP-2-Aktivität im Vergleich zu TLR4-D-Mäusen ($128,6 \pm 17,74$ vs. $74,14 \pm 5,29$ AU). I/R-Bedingungen beeinflussten die MMP-2-Aktivität nicht.

Eine Veränderung der MMP-9-Aktivität nach LPS-Vorbehandlung war bei SOP-Mäusen unabhängig vom Genotyp nicht nachweisbar. In allen Gruppen stieg die MMP-9-Aktivität nach I/R an (Abb. 3.25B). In PBS-behandelten WT-Mäusen fiel dieser Anstieg stärker aus als bei TLR4-D-Mäusen. Zwischen PBS- und LPS-stimulierten WT-Mäusen traten in Folge einer I/R keine Unterschiede zu Tage. In infarzierten TLR4-D-Mäusen entwickelte sich nach LPS-Vorbehandlung jedoch eine signifikante MMP-9-Aktivitätssteigerung im Vergleich zu nicht vorbehandelten Mäusen (Abb. 3.26).

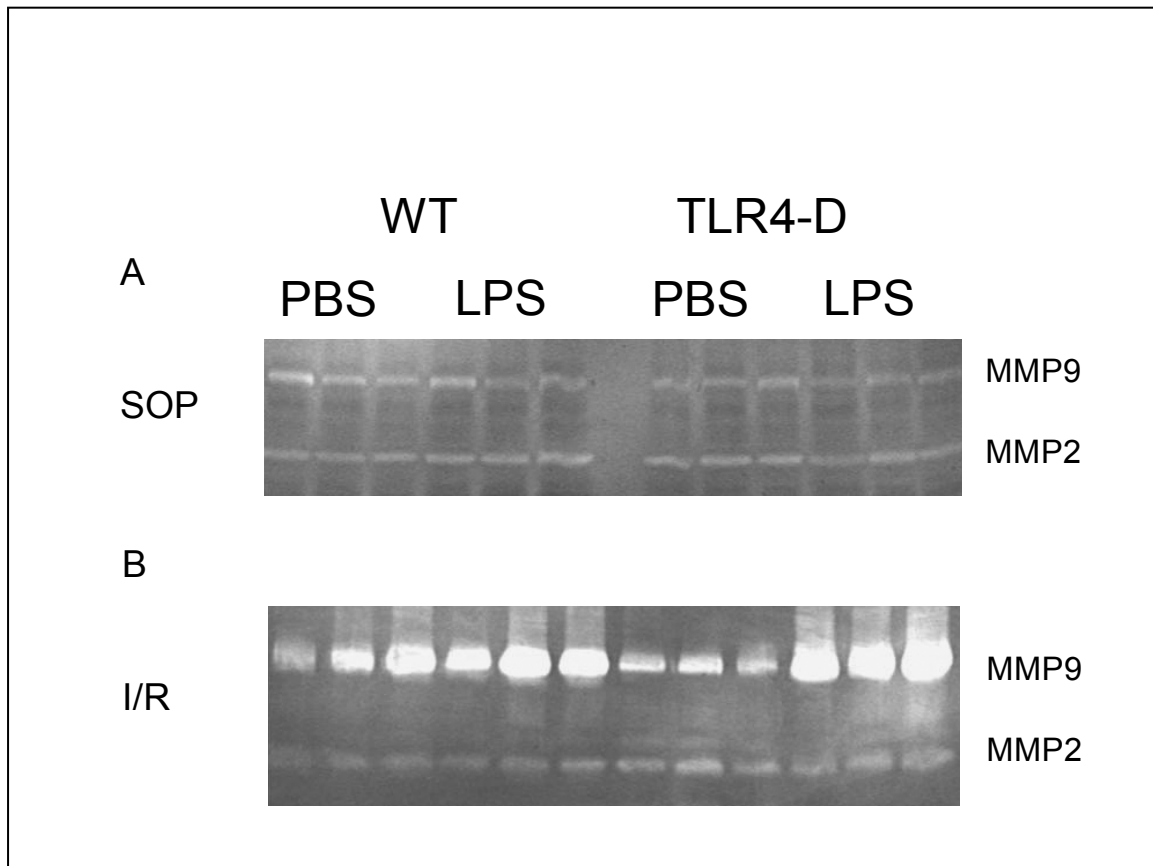


Abb. 3.25: Zymographische Aktivität auf Gelatinegelele nach SOP (A) und I/R (B). Die 72 kDa-Bande entspricht MMP-2, 92 kDa entsprechen MMP-9. Banden mit größeren Molekülmassen (< 92 kDa) sind typisch für MMP-9, welches von Neutrophilen freigesetzt wird (Passi *et al.*, 1999). n=3.

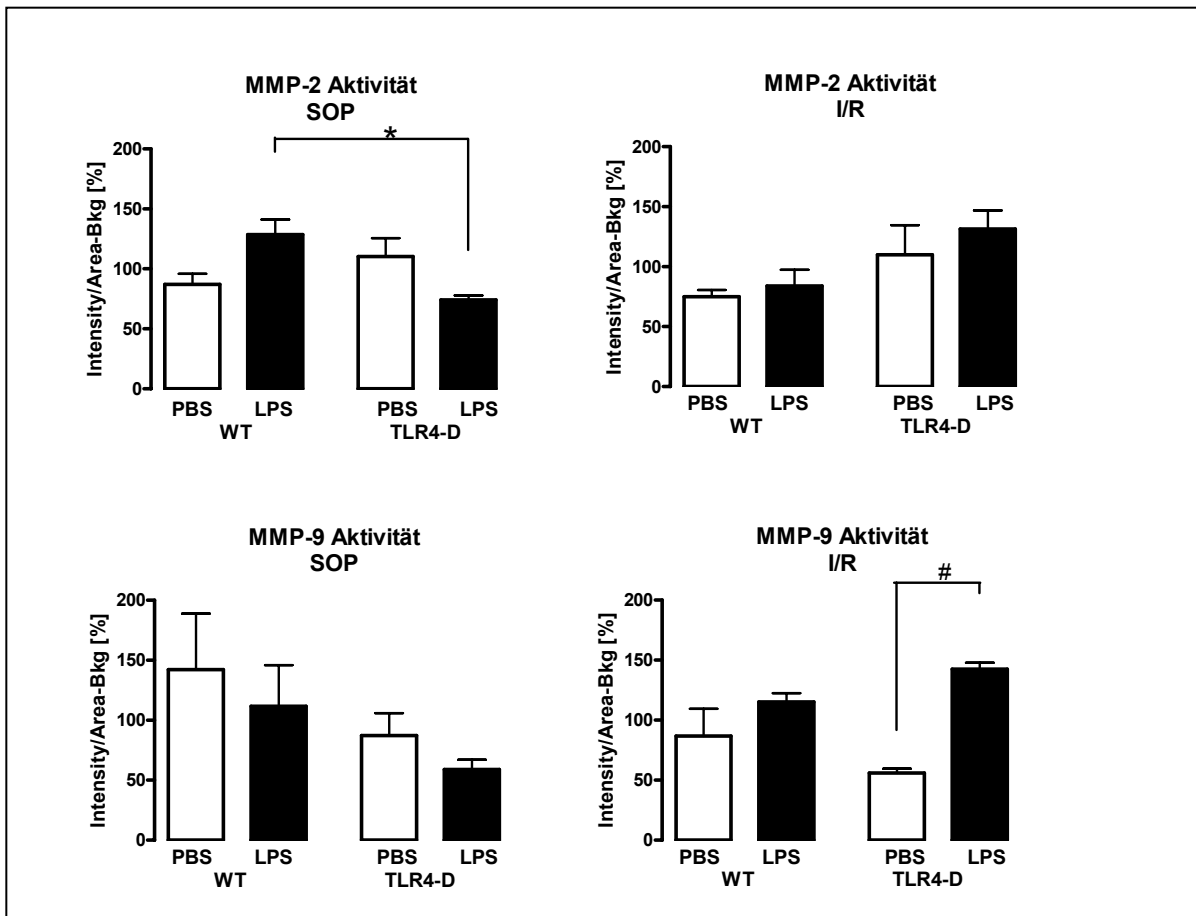


Abb. 3.26: Quantifizierung der zymographischen MMP-2- und -9-Aktivität. Die densitometrische Auswertung und Normierung der Banden erfolgte für jedes Gel und die beiden MMPs getrennt, so dass kein Vergleich zwischen den einzelnen Grafiken möglich ist.

3.3 Ischämische Präkonditionierung

Da zum Zeitpunkt der Experimente zur ischämischen Präkonditionierung ein TLR4-KO-Mausmodell auf C57Bl/6-Hintergrund zur Verfügung stand, wurde die Versuchsreihe mit C57Bl/6 und TLR4-KO-Mäusen und nicht mit C3H/HeN- und C3H/HeJ-Mäusen durchgeführt. Durch den vollständigen Knockout des TLR4-Rezeptors konnte eine verbleibende Restaktivität des mutierten TLR4-Rezeptors, wie es bei TLR4-D-Mäusen der Fall ist, ausgeschlossen werden.

Vor Erstellung des endgültigen IPC-Protokolls war eine Reihe von Vorversuchen notwendig. In der Literatur wurden unterschiedliche Präkonditionierungszeiten an verschiedenen Tiermodellen wie Ratte, Schwein, Kaninchen, Hund und Maus beschrieben (Behrends *et al.*, 2000, Belosjorow *et al.*, 1999, Fisher und Marber, 2002, Guo *et al.*, 1998, Hiasa *et al.*, 2001). In den meisten Studien wurden Open-Chest-Modelle verwendet. Die Präkonditionierungsmodelle verwendeten einen einmaligen Okklusions-Reperfusionsschritt bis hin zu 6 intermittierenden Zyklen. Weiterhin unterschied sich die Dauer der anschließenden Ischämie, welche je nach Spezies 30 bis 90 Minuten betrug.

Im Gegensatz zu dem Protokoll, das bei C3H/HeN und -J-Mäusen nach der LPS-Vorbehandlung Anwendung fand, erwies sich eine 60minütige Okklusion bei C57Bl/6-Mäusen im Anschluss an die ischämische Präkonditionierung als weniger geeignet. Denn aus den intermittierenden Ischämie-Reperfusionsszyklen sowie der anschließenden 60 min dauernden Ischämie resultierte eine stark verlängerte Gesamtversuchsdauer, die zu einer erhöhten Mortalitätsrate führte und bei den überlebenden Tieren zudem keine präkonditionierenden Effekte erkennen ließ. Zunächst erfolgten Vorversuche (n = 5 - 8) mit einigen ausgewählten Präkonditionierungszeiten aus der Literatur, bis schließlich ein reproduzierbarer präkonditionierender Effekt zu beobachten war und das Protokoll beibehalten wurde (siehe Punkt 3.). Gemäß des Versuchsprotokolls von Fisher (Fisher und Marber, 2002) wurde die Ischämiedauer auf eine 30 minütige Okklusionsphase verkürzt.

1. 10 min Okklusion, 15 min Reperfusion, 60 min Okklusion, 24h Reperfusion: → kein präkonditionierender Effekt nachweisbar

2. 6 x 4 min Okklusion, 6 x 4 min Reperfusion, 1 x 10 min Reperfusion, 60 min Okklusion, 24 h Reperfusion: → keine präkonditionierender Effekt nachweisbar
3. abwechselnd je 3 x 5 min Okklusion / Reperfusion, 10 min Reperfusion, anschließend 30 min Okklusion, 24 h Reperfusion: Endfassung des Versuchsprotokolls zur ischämischen Präkonditionierung

3.3.1 Mortalitätsraten

Die in Abschnitt 3.2.1 dargestellten Risikofaktoren treffen auch auf dieses Projekt zu. Die Gesamtzahl der verwendeten Tiere sowie die Letalitätsrate in den jeweiligen Studienabschnitten sind in Tab. 3.2 dargestellt.

| | |
|-------------------------------------|-----|
| Gesamtzahl der Mäuse | 192 |
| Planimetrie: | |
| Färbungen gesamt | 45 |
| davon verwertbar | 45 |
| Organentnahme für Molekularbiologie | 108 |
| Todesfälle | 39 |
| bei Instrumentierung | 23 |
| nach Instrumentierung | 3 |
| bei Infarkt | 13 |

Tab. 3.2: Tierzahlen im Projekt „Ischämische Präkonditionierung“

3.3.2 TTC-Färbung und planimetrische Auswertung

Zunächst wurde die Infarktgröße ohne vorhergehende IPC nach 30 min Ischämie und 24 h Reperfusion vermessen, um den Befund aus 3.2.2 auch in den hier untersuchten Mauslinien bestätigen zu können. Die AAR unterschied sich zwischen WT

und TLR4-KO mit 47,4 % / LV bzw. 46,9 % / LV nicht, was wiederum auf eine gute Reproduzierbarkeit der Instrumentierung hindeutet (Abb. 3.27).

WT-Mäuse wiesen im Verhältnis zur AAR ein IA von 14,6 % ± 2,2 auf (n = 9), das sich gegenüber TLR4-KO mit 9,3 % ± 1,9 (n = 12) jedoch nicht signifikant unter-

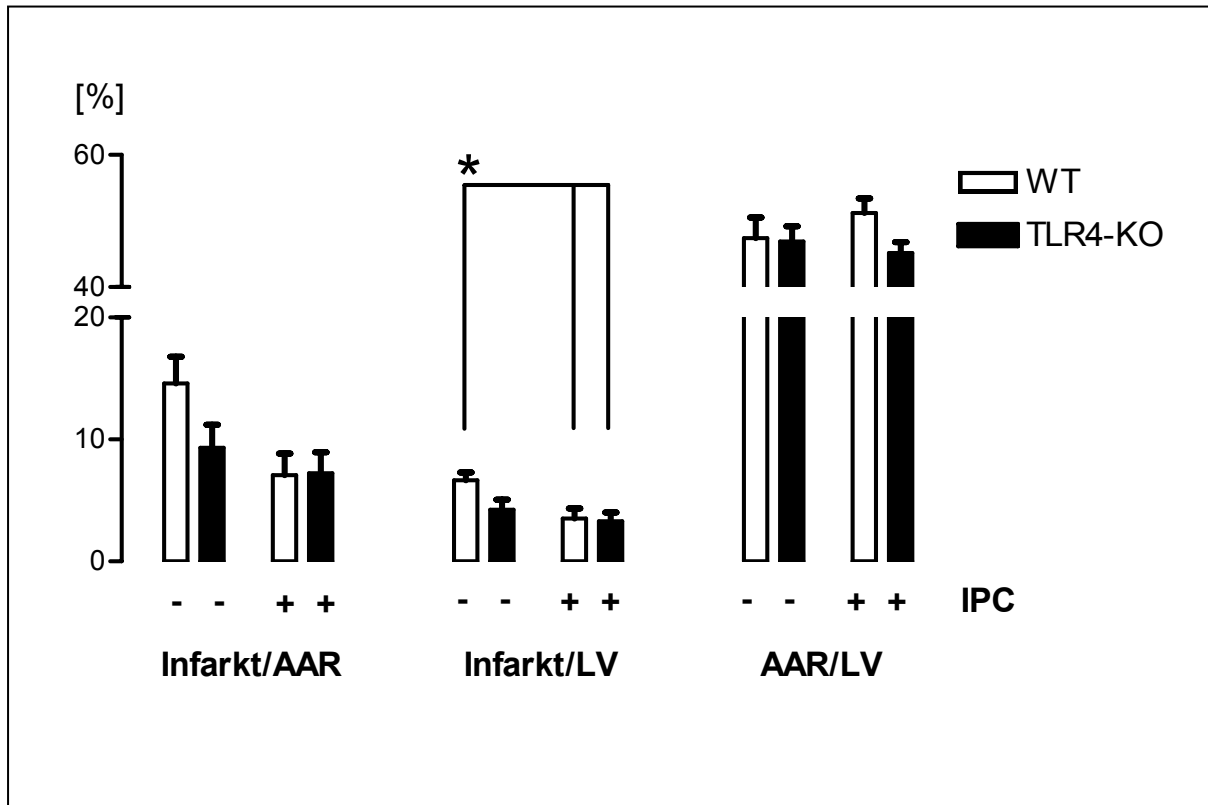


Abb. 3.27: Planimetrische Vermessung der Infarktareale. Verhältnis von Infarktgröße zu Area-at-Risk (AAR) bzw. linkem Ventrikel (LV) und AAR zu LV. * p < 0,05 (One-Way-ANOVA).

schied. Wurde allerdings der Quotient IA / LV gebildet, manifestierte sich mit 6,7 % ± 0,7 zu 4,2 % ± 0,8 ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (p < 0,05, t-Test).

Die Vorbehandlung nach einem IPC-Protokoll führte zu einem signifikant kleineren IA in der WT-Gruppe (n = 9; 7,1 % ± 1,8 (IA/AAR)(ns) bzw. 3,5 % ± 0,8 (IA/LV), p < 0,05, ANOVA). Bei TLR4-KO führte die Präkonditionierung zu keiner signifikanten Reduktion der Infarktgröße (n = 8; 7,2 % ± 1,7 (IA/AAR) bzw. 3,3 % ± 0,7 (IA/LV)).

3.3.3 CD14-Proteinexpression

SOP und I/R-Gruppen wiesen, anders als in 3.2.4 gezeigt, keine nennenswerten Unterschiede in der CD14-Proteinexpression auf (Abb. 3.28). Allerdings wurden die untersuchten Herzen bereits nach 3 h Reperfusion entnommen, was den Zeitraum der Proteinexpression einschränkte. Nach IPC veränderte sich das Expressionsmuster verglichen mit I/R alleine nicht. Auch die beiden Genotypen zeigten eine vergleichbare CD14-Expression (Abb. 3.29).

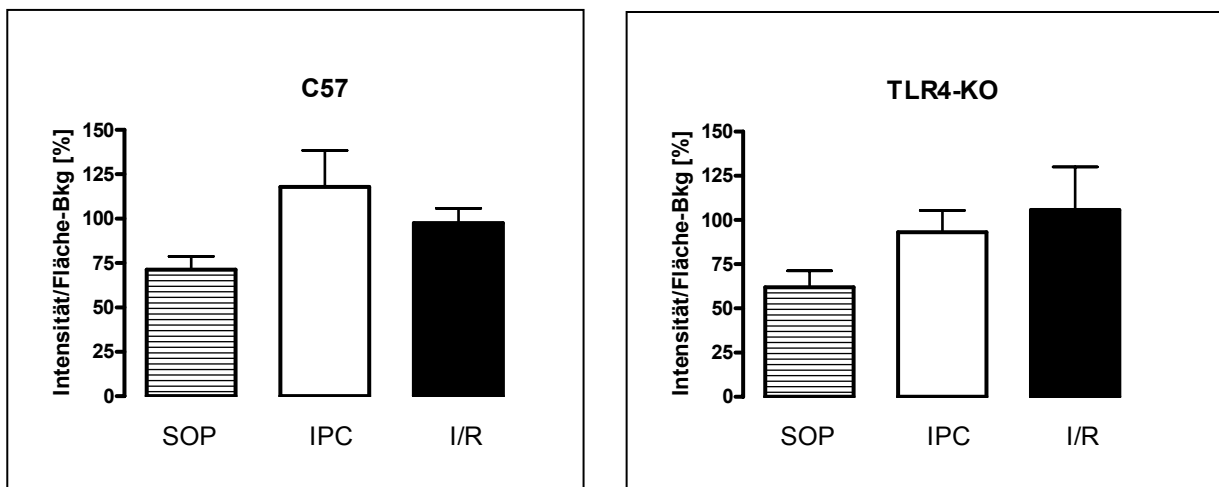


Abb. 3.28: CD14-Proteinexpression. Densitometrische Auswertung der myokardialen CD14-Expression nach IPC und I/R bei WT und TLR4-KO-Mäusen. n = 3.

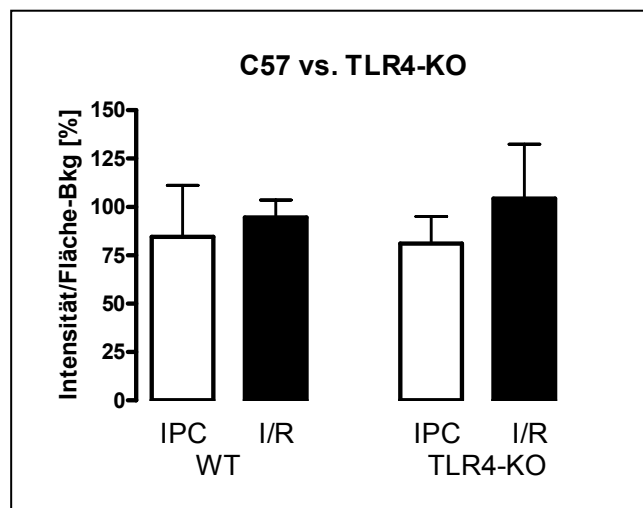


Abb. 3.29: CD14-Proteinexpression. Densitometrische Auswertung. Vergleich der myokardialen CD14-Proteinexpression von C57 und TLR4-KO nach IPC und I/R. n = 3.

3.3.4 TLR2 und TLR4 - mRNA-Expression

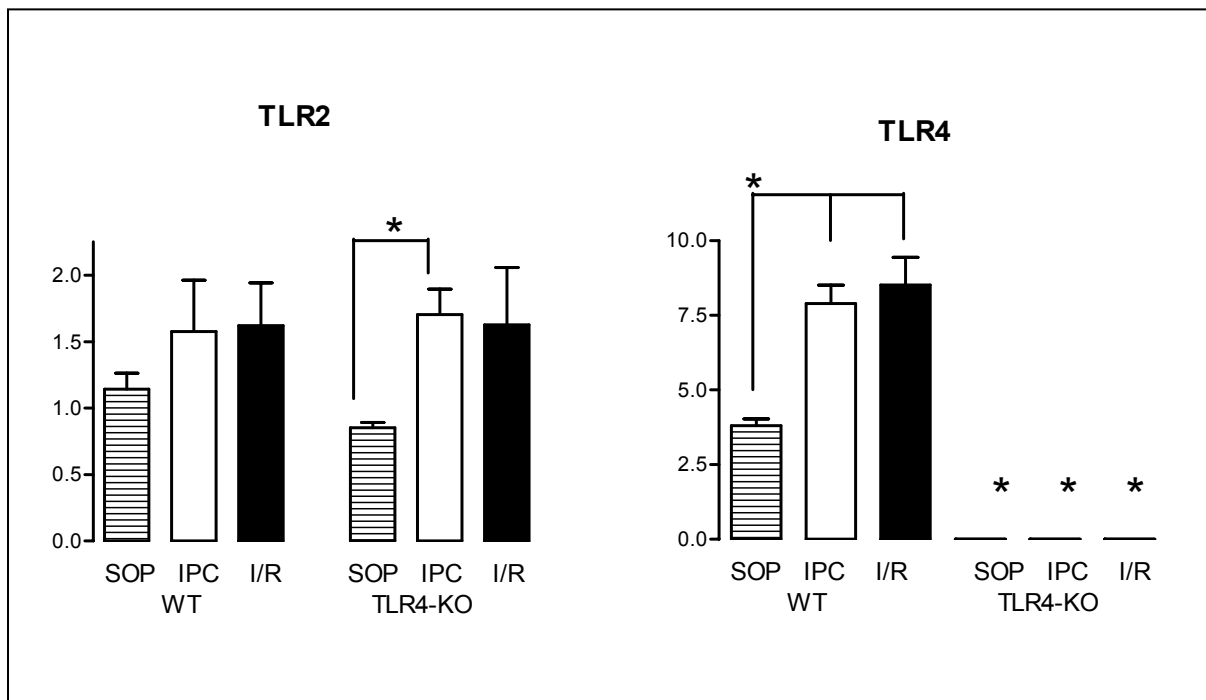


Abb. 3.30: TLR2 und -4 mRNA-Expression. * p < 0,05. SOP n = 8, übrige n = 5.

Der Einfluss von I/R auf die Rezeptorexpression von TLR2 und TLR4 mRNA wurde auch in den für das IPC-Projekt verwendeten Genotypen untersucht, um etwaige Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen bestimmen zu können und den Einfluss der IPC zu testen (Abb. 3.30).

Die Basalexpression von TLR2 mRNA unterschied sich zwischen WT und TLR4-KO nicht signifikant und stimmte mit dem Niveau von C3H/HeN und -J-Mäusen überein (siehe 3.2.5). Die TLR2 mRNA-Expression wurde durch IPC + I/R oder I/R alleine bei WT nicht reguliert (Abb. 3.30). Lediglich bei TLR4-KO-Tieren erreichte der Anstieg in der IPC-Gruppe das Signifikanzniveau ($1,70 \pm 0,19$ (TLR4-KO IPC) vs. $0,85 \pm 0,04$ (TLR4-KO SOP)).

Die Mittelwerte der TLR4 mRNA-Expression bei WT SOP unterschieden sich nicht von denen der C3H/HeN und -J-Mäuse (siehe 3.2.5). Die TLR4-Expression bei WT-Mäusen wurde sowohl in der IPC + I/R- als auch in der I/R-Gruppe signifikant

verstärkt. Die Präkonditionierung selbst verursachte keine veränderte TLR4-Regulation unter Ischämiebedingungen.

3.3.5 Zytokine - mRNA-Expression

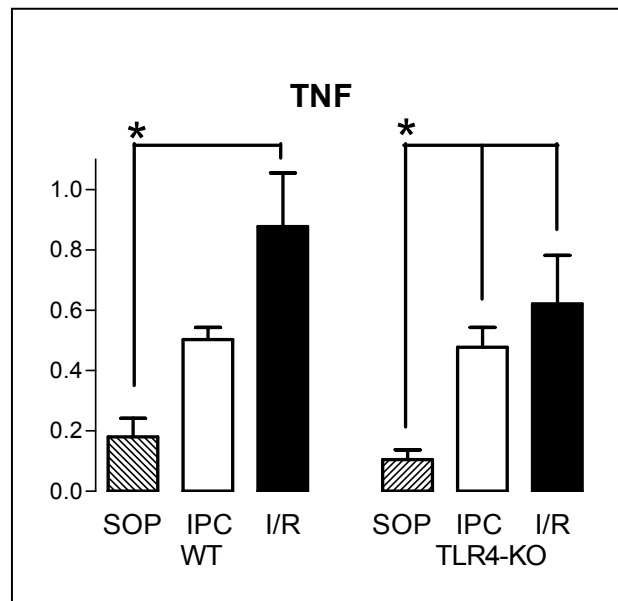


Abb. 3.31 : TNF mRNA-Expression. * $p < 0,05$. SOP $n = 8$, übrige $n = 5$.

Sowohl Herzen aus WT als auch TLR4-KO-Mäusen wiesen nach I/R eine signifikant erhöhte TNF-Expression auf, divergierten untereinander jedoch nicht (Abb. 3.31). Während sich die TNF-Werte präkonditionierter WT-Mäuse weder von SOP noch von I/R-Mäusen signifikant unterschieden, war die TNF-Expression der Gruppe TLR4-KO IPC signifikant unterschiedlich von unbehandelten TLR4-KO-Mäusen.

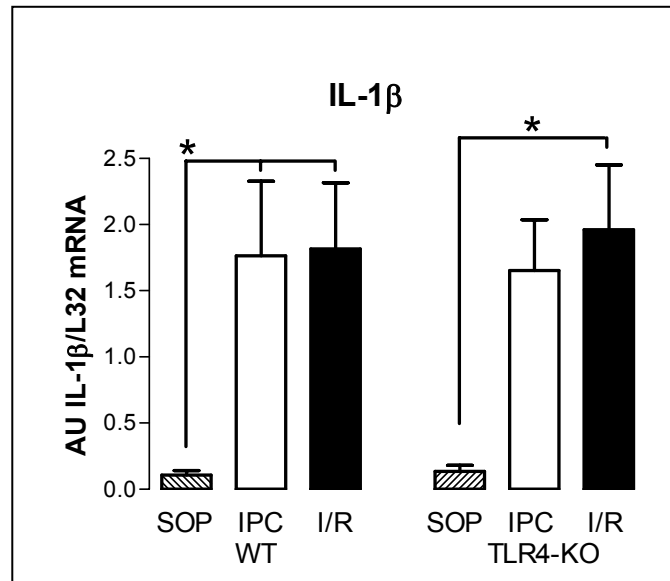


Abb. 3.32: IL-1 β mRNA-Expression. * p < 0,05. SOP n = 8, übrige n = 5.

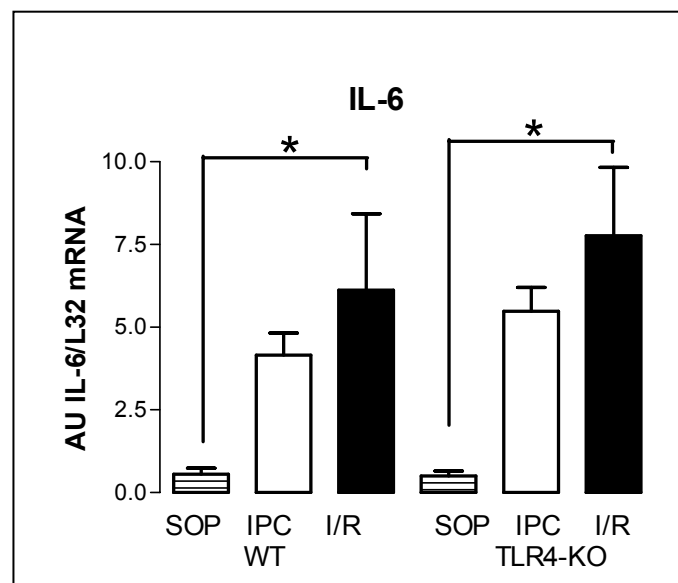


Abb. 3.33: IL-6 mRNA-Expression. * p < 0,05. SOP n = 8, übrige n = 5.

I/R führte bei WT und TLR4-KO zu einer signifikant erhöhten IL-1 β mRNA-Expression, die durch IPC nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.32). In gleichem Maße stieg die IL-1 β mRNA von WT nach IPC + I/R an.

IL-6 wurde durch I/R induziert und führte bei beiden Genotypen zu einer signifikanten Steigerung der mRNA-Expression (Abb. 3.33). Unterschiede hinsichtlich der IL-1 β und IL-6 mRNA-Expression wurden zwischen den Genotypen nicht nachgewiesen.

3.3.6 Chemokine - mRNA-Expression

Scheinoperierte Mäuse exprimierten nur geringe Mengen Chemokine. Die höchste basale Expression zeigten Rantes und TCA-3. Die Chemokine IP-10 und Lymphotactin lagen unterhalb der Nachweisgrenze und werden deshalb nicht in der Tabelle aufgeführt (Tab. 6.4).

Alle untersuchten Chemokine mit Ausnahme von TCA-3 wurden unabhängig vom untersuchten Genotyp durch IPC + I/R bzw. I/R moduliert (2-Wege-ANOVA).

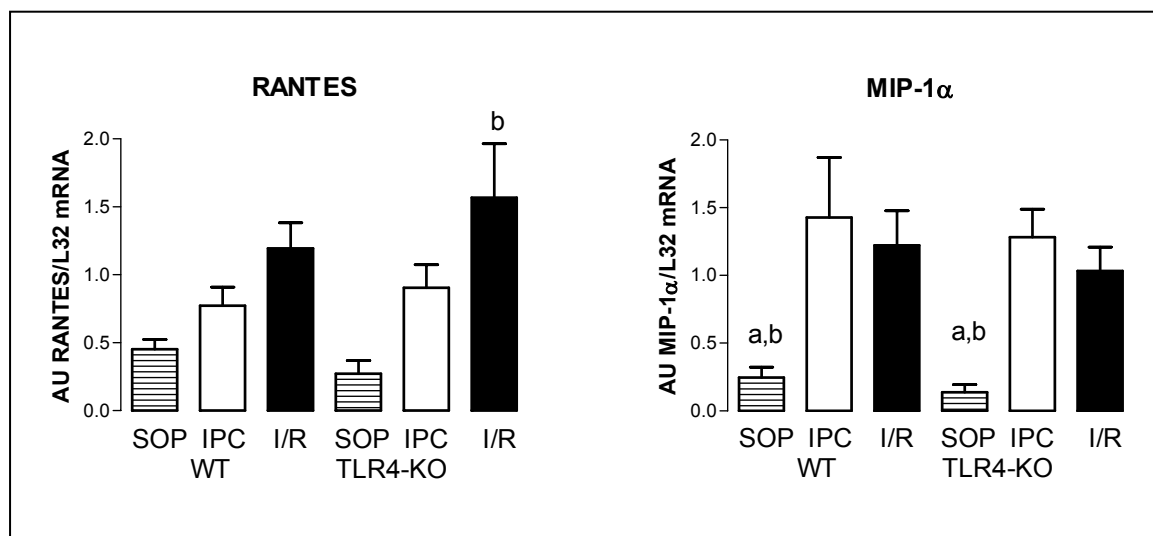


Abb. 3.34: RANTES und MIP-1α mRNA-Expression. a: ($p < 0,05$) IPC vs SOP, b: I/R vs SOP. SOP n = 8, übrige n = 5.

Die mRNA-Expression von RANTES stieg nach Okklusion im Vergleich zur SOP-Gruppe um das 2,6-fache (WT, ns) bzw. 5,8-fache an (TLR4-KO, $p < 0,05$) (Abb. 3.34). Eine vorangegangene IPC induzierte lediglich einen 1,7-fachen (WT, ns) bzw. 3,4-fachen (TLR4-KO, ns) Anstieg der Expression. Dieser Unterschied zwischen präkonditionierten und nicht präkonditionierten Tieren nach I/R konnte im 2-Wege-ANOVA bestätigt werden, erreichte jedoch im Einzelgruppenvergleich nicht das Signifikanzniveau.

MIP-1α wurde durch I/R in beiden Genotypen signifikant vermehrt exprimiert (WT: 4,9-fach vs. SOP; TLR4-KO: 7,4-fach vs. SOP) (Abb. 3.34). In präkonditionierten Tieren stieg die mRNA-Expression sogar um das 5,7-fache (WT) bzw. 9,1-fache

(TLR4-KO). Ähnlich verhielt sich die mRNA-Expression von MIP-1 β und MIP-2. MIP-1 β wurde nach IPC gefolgt von I/R stärker induziert als von I/R alleine. IPC führte zu einer 18,3-fachen (WT, ns) bzw. 75,7-fachen (TLR4-KO, $p < 0,05$), I/R zu einer 13,9-fachen (WT, ns) bzw. 34-fachen Steigerung (TLR4-KO, ns). Noch höher fiel die MIP-2-Induktion aus, die sich nach IPC + I/R um das 202-fache (WT, $p < 0,05$) bzw. 210,5-fache (TLR4-KO, ns) und nach I/R alleine um das 173-fache (WT, $p < 0,05$) bzw. 211-fache (TLR4-KO, ns) vermehrte.

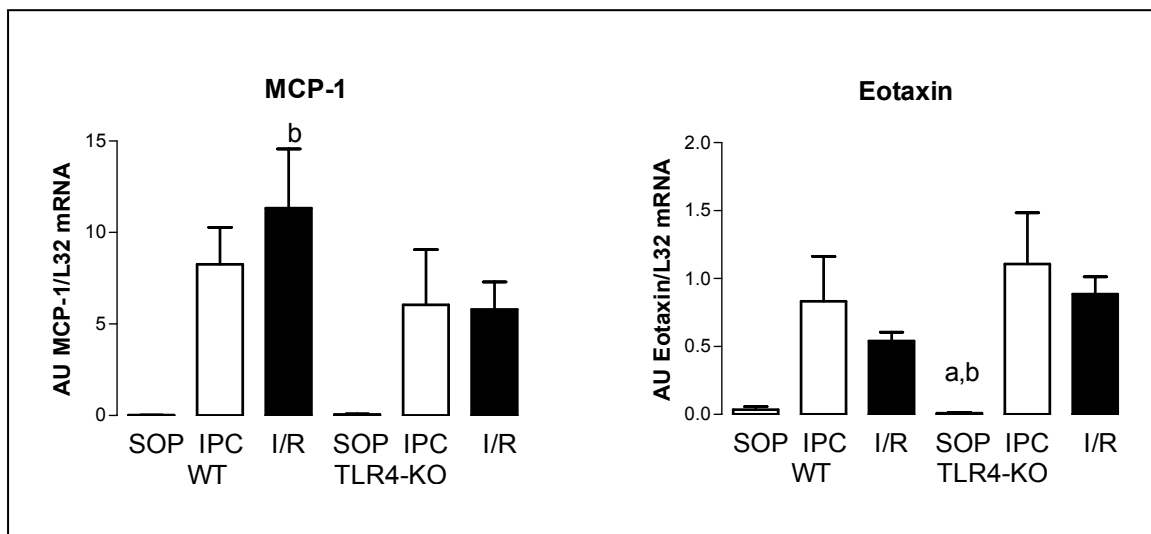


Abb. 3.35: MCP-1 und Eotaxin mRNA-Expression. a: ($p < 0,05$) IPC vs SOP, b: I/R vs SOP. SOP n = 8, übrige n = 5.

Eine ebenfalls stark erhöhte Expression im Vergleich zu unbehandelten Tieren wies MCP-1 auf (IPC + I/R: 413-fach (WT, ns), 101-fach (TLR4-KO, ns), I/R: 567-fach (WT, $p < 0,05$), 97-fach (TLR4-KO, ns)(Abb. 3.35). IPC und I/R beeinflussten die TCA-3 mRNA-Expression nicht. Eotaxin stieg durch Präkonditionierung und Ischämie um das 20,8-fache (WT, ns) bzw. 111-fache (TLR4-KO, $p < 0,05$) und nach I/R weniger stark um das 9-fache (WT, $p < 0,05$) bzw. 89-fache (TLR4-KO, $p < 0,05$) an (Abb. 3.35).

3.3.7 MMPs und TIMPs

3.3.7.1 mRNA-Expression

Scheinoperierte Mäuse exprimierten MMPs nur in geringen Mengen. Die Modulation durch IPC + I/R und I/R erfolgte unabhängig vom Genotyp.

Die MMP-1 mRNA-Expression war im Vergleich zu den übrigen MMPs am geringsten (Abb. 3.36, Tab. 6.5). Durch Ischämie (IPC gefolgt von I/R und I/R alleine) wurde die mRNA-Expression in beiden Genotypen verstärkt, erreichte jedoch nur bei WT nach I/R das Signifikanzniveau. Die höchste basale Expression zeigte MMP-2. Im Gegensatz zu den dargestellten MMP-Ergebnissen der zuvorbeschriebenen Studie (LPS und I/R, siehe 3.2.13.1), stieg die mRNA-Expression von MMP-2 nach I/R signifikant an und vervierfachte sich unabhängig vom Genotyp und Präkonditionierung. Auch MMP-3 reagierte auf I/R bzw. IPC mit einem Anstieg der Expression (ns). Beide IPC-Gruppen wiesen eine signifikant erhöhte Expression von MMP-8 auf. Zudem unterschied sich die IPC TLR4-KO-Gruppe signifikant von der I/R-Gruppe ($1,00 \pm 0,30$ (IPC) vs. $0,43 \pm 0,08$ (I/R)). MMP-9 wurde in beiden WT-Gruppen verstärkt exprimiert, bei TLR4-KO wurde die Signifikanz lediglich nach IPC erreicht. Die Gesamtexpression aller MMPs unterschied sich sowohl nach IPC als auch nach I/R in beiden Genotypen signifikant von SOP.

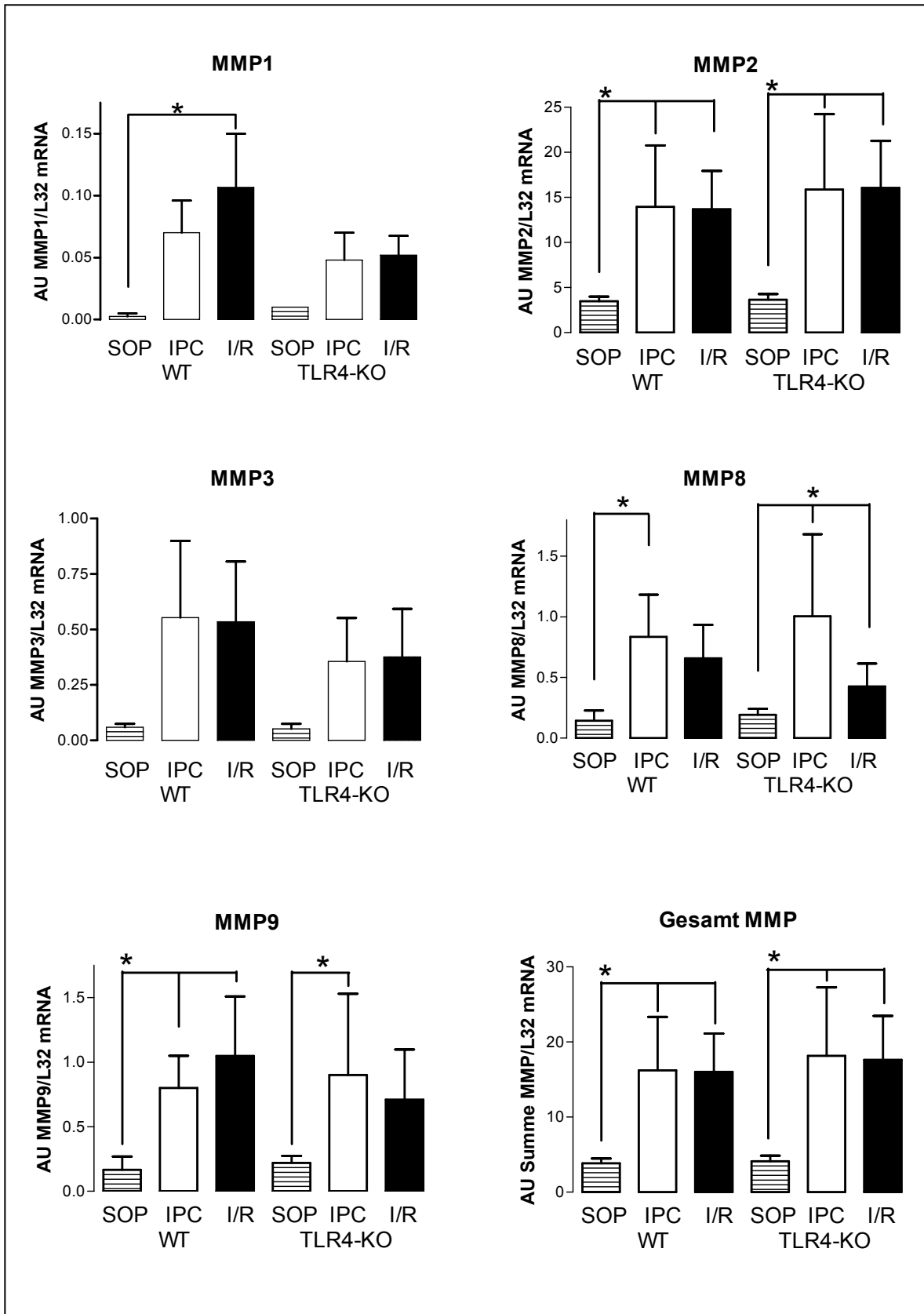


Abb. 3.36: MMP mRNA-Expression. * p < 0,05.

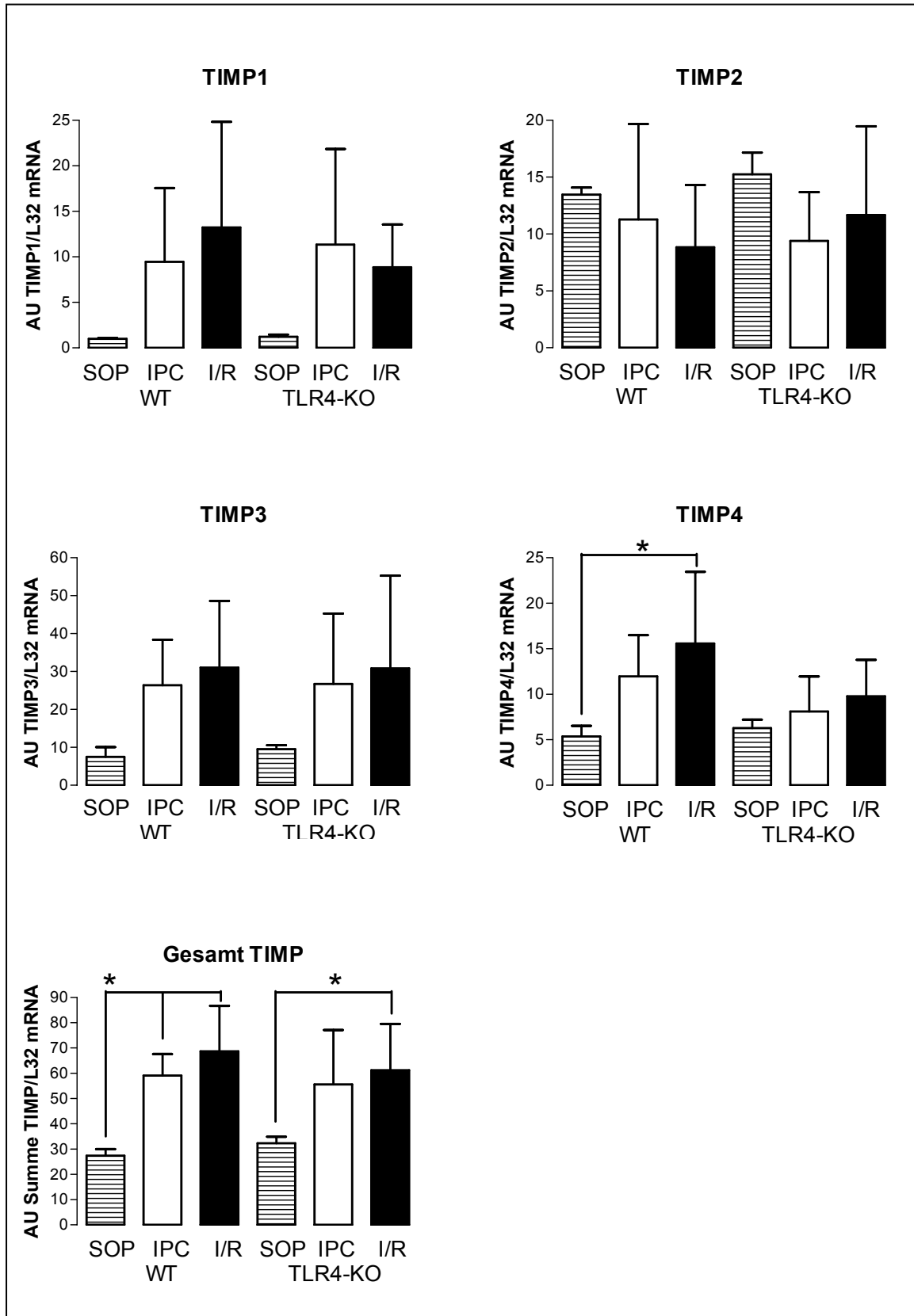


Abb. 3.37: TIMP mRNA-Expression. * p < 0,05.

Die Auswertung der untersuchten TIMPs zeichnete sich durch eine große Variabilität aus, so dass TIMP-1, -2 und -3 keine signifikanten Unterschiede des Einzelgruppenvergleichs zeigten (Abb. 3.37). TIMP-4 unterschied sich nur in Bezug auf die WT - Gruppe nach I/R signifikant von SOP. Jedoch ergab die Errechnung der TIMP-Gesamtexpression, dass IPC (WT) und I/R (WT, TLR4-KO) eine signifikante TIMP-Induktion bewirkte.

3.3.7.2 MMP-TIMP-Quotienten

Aufgrund der hohen Variabilität der TIMP-Expression innerhalb der untersuchten Gruppen, ergaben die statistischen Untersuchungen der einzelnen MMP-TIMP-Quotienten keine signifikanten Unterschiede. Lediglich der Quotient der Gesamtsumme aller MMPs und TIMPs wies bei TLR4-KO-Mäusen nach IPC und I/R einen signifikant höheren Wert im Vergleich zur SOP-Gruppe auf (Abb. 3.38).

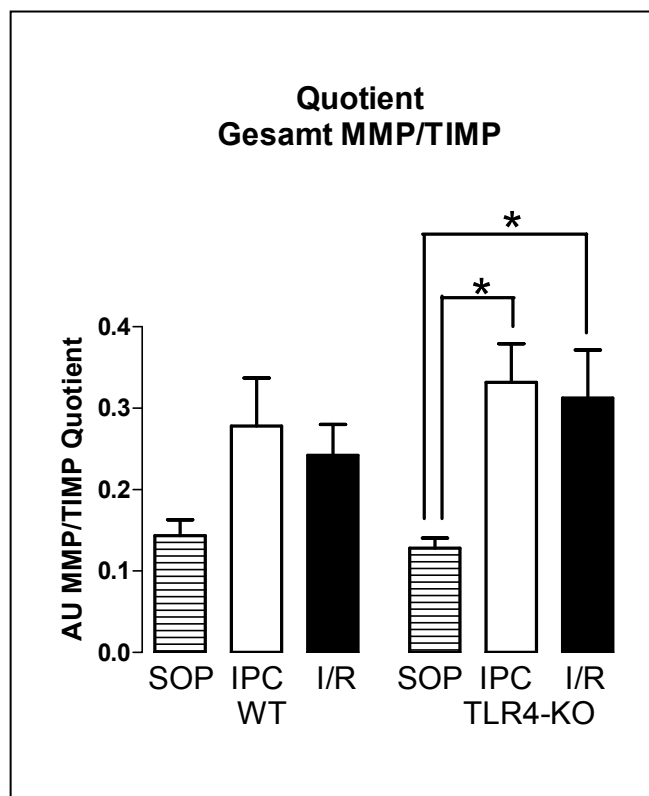


Abb. 3.38: Verhältnis von MMP- zu TIMP-Gesamt-mRNA.

4 Diskussion

Das vorliegende Projekt analysierte in einem sogenannten „Closed-Chest“-Modell den Einfluss von TLR4 und unterschiedlichen präkonditionierenden Mechanismen auf die Infarktgröße.

4.1 Maus- und Infarktmodell

Das Mausmodell vereint in sich die Vorzüge einer hohen Reproduktionsrate bei geringer Tragzeit und die Möglichkeit, transgene Tiere zu erzeugen. In Bezug auf die ventrikuläre Struktur ist das Mausherz dem Menschen vergleichbar (Doevendans *et al.*, 1998). Unterschiede finden sich im Bereich der Atria und deren venösen Zuflüssen. Die Koronaranatomie differiert geringfügig zwischen unterschiedlichen Säugetierspezies. Kleinsäugerherzen besitzen im Gegensatz zu Großsäugern einen höheren Energiebedarf. Umgerechnet auf Körpergewicht und -oberfläche unterscheiden sich Herzzeitvolumen und der kardiale Index zwischen Maus und Mensch nicht (Barbee *et al.*, 1992). Trotzdem finden sich zwischen verschiedenen Mauslinien unterschiedliche Werte physiologischer Parameter wie Herz- und Körpergewicht, Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck (Doevendans *et al.*, 1998).

Das Closed-chest-Modell nach Nossuli birgt im Gegensatz zum häufiger verwendeten Open-chest-Modell nicht die Gefahr unerwünschter Einflüsse durch inflammatorische Mediatoren, die während der Instrumentierung freigesetzt werden. Außerdem ermöglicht es die Verwendung unterschiedlicher Anästhetika bei Implantation des Okkluders einerseits und späterer Ischämie andererseits (Coetzee *et al.*, 1993, Ismaeil *et al.*, 1999, Nossuli *et al.*, 2000, Pagel *et al.*, 1995). Isofluran ist als volatives Anästhetikum leichter zu steuern als Injektionsanästhetika. Allerdings wirkt es präkonditionierend und wurde deshalb nur bei der Operation zur Okkluderimplantation verwendet. Versuche an Kaninchen und Hunden ergaben, dass ein präkonditionierender Effekt bereits nach 15- bzw. 30 minütiger Isofluranbehandlung unmittelbar vor Okklusion eintrat und zu einer Verminderung der Infarktgröße in gleichem Umfang, wie nach IPC führte (Cason *et al.*, 1997, Kersten *et al.*, 1997).

Präkonditionierende Effekte auf die Ischämie sollten jedoch vermieden werden. Darum wurde hierbei Propofol eingesetzt, welches bei Infarktstudien an Kaninchen einen geringeren Einfluss auf die Infarktgröße nahm (Cope *et al.*, 1997) und in isoliert-perfundierten Rattenherzen das Infarktareal gegenüber unbehandelten Herzen nicht beeinflusste (Ebel *et al.*, 1999). Trotzdem wurde auch Propofol in mehreren Studien eine kardioprotektive Wirkung zugeschrieben. Allerdings wurden diese vorwiegend an isoliert perfundierten Rattenherzen vorgenommen und setzten sehr hohe Dosierungen voraus, welche weit über der *in vivo* messbaren Plasmakonzentration lagen (Kato und Foex, 2002, Ko *et al.*, 1997, Kokita *et al.*, 1998). Beide Anästhetika reduzieren freie Radikale, unterbinden den Ca^{2+} -Einstrom und die Neutrophilen-Aktivität, jedoch wirkt Propofol nicht präkonditionierend (Cope *et al.*, 1997, Kato und Foex, 2002, Zaugg *et al.*, 2002). Isofluran hingegen aktiviert ATP-sensitive K^+ -Kanäle, PKC und Adenosinrezeptoren genau wie die ischämische Präkonditionierung (Cope *et al.*, 1997, Ismaeil *et al.*, 1999). Ein Zusammenhang von Membranfluidität und kardioprotektivem Effekt der Anästhetika wurde in der Literatur mehrfach beschrieben (Kariko *et al.*, 2004b). Anästhetika supprimieren die Immunantwort auf Endotoxin- und Zytokinapplikation (Plachinta *et al.*, 2003). Dies deutet darauf hin, dass unspezifisch mehrere Rezeptoren inhibiert werden. Auch Kariko *et al.* postulierten, dass die Interaktion von Signaltransduktionsproteinen in Folge der erhöhten Membranfluidität durch Anästhetika unterbunden wird. In der Lipid-Doppelschicht befindliche Caveolae sind Mikrodomänen mit einer hohen Dichte an Signaltransduktionsproteinen, deren Interaktion in Membranen mit höherer Fluidität beeinträchtigt wird. Daraus könnten eine Inhibition von Signaltransduktion und Immunantwort und die schnelle ischämische Toleranz resultieren.

4.2 Einfluss von TLR4, LPS und IPC auf die Infarktgröße

Die vorgestellten Daten zeigen, dass WT-Mäuse im Vergleich zu TLR4-defizienten und KO-Tieren nach I/R einen etwa 50 % größeren Myokardinfarkt aufweisen. Das Ausmaß der Infarktnarbe wurde in der vorliegenden Untersuchung nach 24 h Reperfusion planimetrisch vermessen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von Chong *et al.* nach 2 h Reperfusion (C3H/HeN (WT), C3H/HeJ (TLR4-D)) und Oyama

et al. (WT: C3H/OuJ, C57Bl/10, TLR4-D: C3H/HeJ, C57Bl/10 ScCr) nach ebenfalls 24 h Reperfusion und TTC-Färbung erzielt (Chong *et al.*, 2004, Oyama *et al.*, 2004). Allerdings nutzten beide Arbeitsgruppen ein Open-chest-Modell welches Instrumentierung und Okklusion in einem einzigen Arbeitsschritt vereint. Interessanterweise zeigten sich bei Chong *et al.* bereits nach 2 h Reperfusion die qualitativ gleichen Infarktgrößenunterschiede wie in der vorliegenden Studie und in der Arbeit von Oyama *et al.* nach 24 h Reperfusion. Da die Infarktgrößen zwischen den verschiedenen Studien nicht direkt vergleichbar sind, lässt sich daraus nicht folgern, dass Vorgänge, die später als 2 h nach Reperfusion ablaufen für die Infarktgröße irrelevant sind.

In Anlehnung an die Arbeiten von Zacharowski *et al.* wurde eine LPS-Injektion 16 h vor Infarkt verabreicht (Zacharowski *et al.*, 2000). Dies verringerte die Infarktgröße bei Ratten um 65 %. Sowohl durch LPS-Vorbehandlung als auch IPC halbierte sich ausschließlich in WT-Mäusen die Infarktgröße im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Zur protektiven Wirkung von LPS im Zusammenhang mit TLR4-Defizienz liegen keine vergleichbaren Studien am Mausmodell vor. Damit bestätigen und erweitern die vorliegenden Ergebnisse kürzlich in der Literatur erschienene Daten (Chong *et al.*, 2004, Oyama *et al.*, 2004). Die gezeigten Infarktreaktionen sind also als valide einzuschätzen.

Ein ähnliches Ergebnis wie hier mit TLR4-defizienten Mäusen gezeigt, präsentierten Shishido *et al.* nach einer I/R-Studie an WT und TLR2-KO-Mäusen, da TLR2-KO-Mäuse kleinere Infarkte ausbildeten als WT-Tiere (Shishido *et al.*, 2003). Andererseits ließen Versuche von Frantz *et al.* mit isolierten Hamsterkardiomyozyten darauf schließen, dass die Blockade von TLR2 die Zytotoxizität nach oxidativem Stress sogar erhöht und TLR2 anti-apoptotische Effekte vermittelt (Frantz *et al.*, 2001).

Guo *et al.* führten die ersten IPC-Studien im Mausmodell durch und konnten in der frühen IPC-Phase eine Reduktion der Infarktgröße um 75 % erzielen (Guo *et al.*, 1998). Die in der vorliegenden Studie mit der frühen IPC erzielten Infarktreaktionen waren etwas geringer als die von Guo *et al.* vorgestellten was sicherlich an dem eingesetzten Mausstamm und den etwas anderen Versuchsbedingungen lag. Über

die früheren Ergebnisse hinausgehend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in TLR4-KO keine IPC möglich war. Wie die frühe, durch IPC-induzierte, ischämische Toleranz mit der TLR4-Signaltransduktion zusammenhängt ist jedoch unklar. Beide Genotypen zeigten nach IPC einen gleich großen Infarkt, doch nur bei WT-Mäusen stellte sich ein signifikanter Unterschied zu unbehandelten I/R-Tieren dar. Dies könnte möglicherweise auch auf ein methodisches Problem zurückzuführen sein. Aus einer 30 minütigen Ischämie resultierte selbst bei unbehandelten WT-Mäuse nur ein relativ kleiner Infarkt. Eine prozentual kleine weitere Verringerung eines ohnehin schon kleinen Infarktes lässt sich nur schwer nachweisen, so dass ein zusätzlicher protektiver Einfluss der TLR4-Defizienz hier evtl. nicht sichtbar wurde.

Die Daten demonstrieren die Abhängigkeit des Infarktareals von einer TLR4-Antwort. Die in der Einleitung genannten TLR4-Liganden wie HSPs, HMGB1, Hyaluronsäure, Fibronectin und Fibrinogen können bei einer Ischämie sezerniert werden und durch den TLR4-Signaltransduktionsweg Entzündungsmediatoren freisetzen (Hollestelle *et al.*, 2004, Izuishi *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2005, Smiley *et al.*, 2001, Taylor *et al.*, 2004, Waldenstrom *et al.*, 1991). Die TLR4-vermittelte Zellantwort auf diese Liganden bestimmt möglicherweise die Größe eines Infarktes. Hierfür sprechen auch die Erkenntnisse einer aktuellen Studie von Shimamoto *et al.*, in der durch eine Vorbehandlung mit dem TLR4-Antagonisten Eritoran ebenfalls eine Abschwächung des I/R-Schadens erzielt wurde (Shimamoto *et al.*, 2006).

Einerseits reduzierte eine LPS-Vorbehandlung TLR4-vermittelt die Infarktgröße, andererseits führte die Defizienz des TLR4-Signalweges selbst auch zu einer kleineren Infarktgröße. TLR4-D-Mäuse, die mit LPS präkonditioniert wurden, wiesen keine weitere Verminderung des Infarktareals auf. Diese Beobachtungen scheinen widersprüchlich zu sein, da der LPS-Effekt durch TLR4 vermittelt wird, ein Verlust dieses Rezeptors jedoch den gleichen Effekt auf die Infarktgröße verursacht. Trotzdem lassen sich beide Beobachtungen in einer einheitlichen Arbeitshypothese zusammenfassen:

1. Die durch I/R induzierte Entzündungsantwort bestimmt die Infarktgröße mit.
2. Eine verringerte Entzündungsantwort nach I/R führt zu einem kleineren Infarkt.

3. Ursache für die verringerte Entzündungsantwort kann eine LPS-Präkonditionierung sein, die die Antwort auf einen zweiten Reiz abschwächt. Ursache kann auch ein Funktionsverlust des TLR4-Signalwegs sein, der per se zu einer geringeren Entzündungsantwort führt.

In der folgenden Diskussion sollen die Vorgänge während der Präkonditionierung und Entstehung eines Infarktes in Bezug auf die vorgestellte Hypothese besprochen werden. Dabei wird der zeitlichen Abfolge der Veränderungen im infarzierten Gewebe gefolgt, die hier nochmals kurz beschrieben ist. Während der Ischämie kommt es zu den in der Einleitung (Kap. 1.1.1) erwähnten Ionenverschiebungen, die jedoch in Bezug auf die Fragestellung dieser Untersuchung eine untergeordnete Rolle spielen. Wichtiger sind hierbei entzündliche Vorgänge, die offensichtlich ihren Startpunkt in der Aktivierung des TLR4 nehmen.

Daher werden zunächst die direkt mit TLR4 gekoppelten Vorgänge in der Membran besprochen. Durch die Aktivierung von TLR4 werden NFκB-abhängige Gene induziert z.B. HIF, iNOS und Zytokine. Zytokine können neben vielen anderen Wirkungen auch die Expression von Chemokinen auslösen. Chemokine selbst führen zur Chemotaxis von Zellen des Immunsystems. Diese Zellen sind am Umbau der Infarktnarbe beteiligt und sezernieren dabei MMPs.

4.3 Expressionsanalyse molekularer Marker - Vorgänge an der Zellmembran

4.3.1 CD14-Proteinexpression

In unbehandelten WT- und TLR4-D-Herzen war die CD14 Expression niedrig (Kap. 3.2.5). In WT-Herzen wurde die CD14-Expression durch LPS-Stimulation massiv erhöht, in den TLR4-D Herzen reagierte die CD14-Expression nicht auf LPS. In beiden Genotypen wurde die CD14-Expression durch I/R in geringem Maße verstärkt. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass zum Organentnahmezeitpunkt die LPS-Stimulation bereits 23 h zurück lag während die Ischämie 6 h zuvor stattfand. Die Proteinexpression in Folge von I/R könnte also durchaus zu einem späteren Zeitpunkt

ansteigen. Im IPC-Projekt wurde ein ähnlich geringer Einfluss auf CD14 durch Ischämie allein beobachtet. Jedoch erfolgte die Proteinmessung schon nach 3 h Reperfusion an einer geringen Tierzahl weshalb die Unterschiede der Expression hier möglicherweise nicht signifikant waren. Dies könnte auch der Grund für den fehlenden Einfluss der ischämischen Präkonditionierung auf die CD14-Expression sein.

Die Induzierbarkeit von CD14 durch LPS wurde bereits vielfach beschrieben (Comstock *et al.*, 1998, Knuefermann *et al.*, 2002). Eine Steigerung der CD14-Expression durch einen anderen Reiz in Form einer Drucküberlastung des Herzens in Folge einer transaortalen Konstriktion (TAK) konnte kürzlich erstmals von unserer Arbeitsgruppe publiziert werden (Baumgarten *et al.*, 2006a).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zwar eine deutliche CD14-Induktion in den LPS präkonditionierten Tieren mit kleinem Infarkt, jedoch ist CD14 in den TLR4-D-Tieren mit kleinem Infarkt niedrig. Die präkonditionierende Wirkung von LPS lässt sich nicht durch die erhöhte CD14-Expression erklären; denn hierdurch könnte man eine verstärkte Immunantwort erwarten, wie sie auch unter ähnlichen Bedingungen von unserer Arbeitsgruppe kürzlich gezeigt wurde (Baumgarten *et al.*, 2006a). Allerdings ist auch bekannt, dass neben membrangebundenem CD14 eine lösliche Form (sCD14) vorkommt, welche neben LPS möglicherweise freie endogene Liganden antagonisieren kann, die durch eine kardiale Schädigung freigesetzt werden. Ein gehäuftes Vorkommen von sCD14 könnte somit die Immunantwort reduzieren, da weniger Liganden an membrangebundenem CD14 binden und eine Signaltransduktion bewirken können. Jedoch war es mit der in der vorliegenden Studie durchgeführten Technik nicht möglich, zwischen löslichem und membranständigem CD14 zu differenzieren.

4.3.2 TLR2- und TLR4-Expression

LPS führte zu einer stärkeren TLR2-Expression bei den WT SOP-Mäusen, während TLR4 nicht signifikant erhöht wurde (Kap. 3.2.6). Bei den TLR4-D-Tieren blieb die TLR2-Expression von LPS unbeeinflusst. Dagegen wurde sowohl TLR2- als auch TLR4-mRNA durch I/R in beiden Genotypen vermehrt exprimiert. In den IPC-

Experimenten zeigte sich wieder derselbe Einfluss von I/R, jedoch führte die IPC zu keiner weiteren Steigerung (Kap. 3.3.4).

Im Gegensatz hierzu berichten andere Publikationen von einer vermehrten LPS-induzierten TLR4 mRNA-Expression, die nach 2 h LPS anstieg, nach 4 h ihr Maximum erreichte und nach 24 h noch immer über dem 0 h-Ausgangswert lag (Baumgarten *et al.*, 2001, Frantz *et al.*, 1999). In einem murinen Infarktmodell wurde erst nach 4 d permanenter Okklusion ein signifikanter Anstieg der TLR4 mRNA-Expression beobachtet (Frantz *et al.*, 1999). Immunhistochemische Färbungen von Frantz *et al.* (1999) zeigten, dass sich das diffuse Muster angefärbten TLR4s in normalem Myokard nach Ischämie veränderte und es zu einer TLR4-Konzentration im Randbereich des Infarktes kam.

Die Induktion der TLR2 mRNA- und Proteinexpression wurde bislang nur in I/R-Versuchen an Niere und Leber gemessen (Kim *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2004b). In der Niere fand sich nach I/R eine konzertierte Expressionssteigerung von TLR2 und TLR4. Dies stimmt mit dem Expressionsmuster in den vorgestellten Ergebnissen weitgehend überein und ist womöglich auf die Bildung bzw. Bindung endogener TLR2- und -4-Liganden zurückzuführen, welche durch einen Myokardschaden freigesetzt wurden. Für eine Bindung endogener Liganden an TLR2 spricht auch der hier vorgestellte Befund, dass I/R in TLR4-D-Tieren eine Steigerung der TLR2-Expression bewirkt.

Zwar stellt LPS keinen TLR2-Liganden dar, induziert aber durch Kreuztoleranz sehr wohl die Expression von TLR2 via TLR4 (Faure *et al.*, 2001, Nilsen *et al.*, 2004). Mittlerweile wurde mehrfach beschrieben, dass die Stimulation mit Virulenzfaktoren, z.B. LPS, nicht nur eine Endotoxintoleranz gegenüber einem zweiten gleichartigen Stimulus bewirkt, sondern es zum Phänomen der Kreuztoleranz kommt. Dadurch hatte ein zweiter Reiz z.B. in Form von LTA oder CpG ebenfalls eine abgeschwächte Immunantwort zur Folge (Dalpke *et al.*, 2005, Dobrovolskaia *et al.*, 2003, Jacinto *et al.*, 2002). Allerdings korrelierte dieses Verhalten nicht mit einer Verstärkung oder Verminderung der TLR-Expression, sondern induziert vielmehr distale Veränderungen auf der Ebene von Adapterproteinen.

Die in dieser Studie gezeigte LPS- und I/R-abhängige Expressionserhöhung von TLR2 kann die präkonditionierende Wirkung von LPS und die protektive Wirkung von TLR4-Defizienz nicht erklären; denn eine erhöhte TLR2-Expression würde eher zu einer verstärkten Immunantwort führen und nicht zu der hier in der Arbeitshypothese vorgeschlagenen verringerten Immunantwort.

4.4 Expressionsanalyse molekularer Marker – intrazelluläre Prozesse und Regulation von Entzündungsmediatoren

4.4.1 Transkriptionsfaktor NF κ B

Der in Abbildung 1.1 vorgestellte TLR4-abhängige Signalweg führt zur Aktivierung von NF κ B. Eine LPS-Stimulation, wie bei der Präkonditionierung, sollte also zu einer NF κ B-Aktivierung führen. Dies wurde auch schon von unserer Arbeitsgruppe und anderen mehrfach gezeigt (Baumgarten *et al.*, 2006b, Baumgarten *et al.*, 2001, Frantz *et al.*, 1999). Dabei wurde die NF κ B-Aktivität transient für ca. 6 h mit einem Maximum nach 1 h erhöht. Vergleichbare Experimente wurden hier nicht durchgeführt, da die Befunde als gesichert angesehen wurden. In dieser Studie wurde ein darüberhinausgehendes Experiment geplant und die NF κ B-Aktivität nach der I/R verfolgt. Entsprechend der Arbeitshypothese sollte die LPS-Präkonditionierung zu einer verringerten NF κ B-Aktivität bei einem zweiten Stimulus in Form der I/R führen. Bei TLR4-D-Tieren würde man per se eine verringerte NF κ B-Aktivität erwarten. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese ist die Beobachtung, dass eine Inhibierung der NF κ B-Aktivität die Infarktgröße vermindern kann (Kis *et al.*, 2003, Morishita *et al.*, 1997). Also sollte auch in den vorgestellten Experimenten die NF κ B-Aktivität in den Gruppen mit kleinem Infarkt reduziert sein. Eine Regulation der NF κ B-Aktivität war jedoch nicht zweifelsfrei feststellbar.

Im Gegensatz zu dem hier vorgestellten beispielhaften Experiment stehen die Ergebnisse von Hiasa *et al.*, die an Ratten nach LPS-Gabe und auch nach ischämischer Präkonditionierung zunächst eine erhöhte NF κ B-Aktivität vor Beginn des Infarktes beobachteten. Darüberhinaus kam es in der Reperfusionphase zu

einer Reduktion der NF κ B-Aktivität, die mit einer Infarktgrößenverminderung einherging (Hiasa *et al.*, 2001). Chong *et al.* verglichen WT und TLR4-D-Mäuse nach I/R und fanden eine reduzierte NF κ B- und AP1-Bindungsaktivität bei defizienten Tieren (Chong *et al.*, 2004).

4.4.2 HIF1 α -Regulation

Folgt man dem TLR4-abhängigen Signalweg, so stellt HIF1 α für NF κ B ein Zielgen dar; denn Frede *et al.* konnten zeigen, dass LPS eine höhere mRNA- und Proteinexpression durch Bindung von NF κ B am HIF1 α -Promoter bewirkte (Frede *et al.*, 2006). Daher erschien es sinnvoll, eine Beteiligung von HIF1 α zu untersuchen.

Arbeitshypothese der Untersuchungen war es, Hinweise auf eine potentiell veränderte HIF1 α -Aktivität zum Zeitpunkt der Infarktinduktion nach 16 h LPS bzw. Unterschiede zwischen den Genotypen zu finden. In den vorgestellten Ergebnissen war das HIF1 α -Protein bei WT-Mäusen 6 h nach der LPS-Präkonditionierung erhöht. Nach 16 h, also zu Beginn der Ischämie, war das HIF1 α -Protein bereits wieder auf die Ausgangskonzentration zurückgegangen (Kap. 3.2.8). Bei den TLR4-KO Tieren blieb das HIF1 α -Protein sowohl 6 als auch 16 h nach LPS-Präkonditionierung unbeeinflusst. Die ebenfalls untersuchte HIF1 α mRNA-Expression war in allen Gruppen, außer der WT-Kontrolle 6 h nach PBS-Injektion, relativ niedrig. Inwiefern dieser erhöhte Wert in der WT-Kontrolle, der nicht mit der Proteinexpression korrelierte, zu Stande kommt, lässt sich nicht erklären.

Der Transkriptionsfaktor HIF1 besteht aus einer konstitutiv exprimierten β - und einer regulierten α -Untereinheit. Unter normoxischen Bedingungen wird das HIF1 α -Protein post-translatorisch hydroxyliert, nach Bindung an das von Hippel-Lindau-Protein ubiquitiniert und anschließend proteolytisch abgebaut (Lee *et al.*, 2004). Unter hypoxischen Bedingungen wird die Hydroxylierung unterbunden, was zu einem Anstieg des HIF1 α -Proteins und Expression von HIF1-Zielgenen führt. Diese regulieren Angiogenese, Sauerstofftransport, Glukosemetabolismus und Gefäßtonus (Bracken *et al.*, 2003). Neben Hypoxie fördern inflammatorische Stimuli die HIF1 α -Anreicherung und Aktivität (Frede *et al.*, 2006, Hellwig-Burgel *et al.*, 2005). Die pro-

inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF sowie LPS induzierten in humanen Leberzellen und Monozyten sowie murinen Makrophagen eine vermehrte HIF1 α mRNA-Expression und Proteinstabilität unter normoxischen Bedingungen (Blouin *et al.*, 2004, Frede *et al.*, 2006, Hellwig-Burgel *et al.*, 1999).

Nach I/R unterschied sich die HIF1 α mRNA-Expression nicht zwischen WT-, LPS-vorbehandelten und TLR4-KO-Mäusen und korrelierte damit nicht mit der Infarktgröße. Vergleicht man in den WT-Tieren die HIF1 α -mRNA vor der Ischämie mit dem Wert danach, dann sieht man einen Anstieg nach I/R. Dies stimmt mit den Angaben aus der Literatur überein, dass die HIF1 α -Transkription *in vivo* nach wenigen Minuten Ischämie lang anhaltend verstärkt wird (Guerra *et al.*, 2006, Jurgensen *et al.*, 2004). Wie schon oben erwähnt ist die alleinige Betrachtung der HIF1 α -mRNA nicht so aussagekräftig wie die Messung der Proteinkonzentration, die noch aussteht.

In der Literatur wird HIF1 α ein protektiver Einfluss bei einer Ischämie zugeschrieben. In *in vivo* und *in vitro* Versuchen wurde durch vorangehende Hypoxie ein präkonditionierender Effekt via HIF1 α erzeugt (Cai *et al.*, 2003, Date *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2003). Aus einer Überexpression von HIF1 α sowie der Inhibition von HIF1 α denaturierenden Proteinen resultierte ein verminderter I/R-Schaden und die vermehrte Expression der HIF1 α -Zielgene VEGF, GLUT-1 und -4, HSP70 und iNOS (Date *et al.*, 2005, Kido *et al.*, 2005, Natarajan *et al.*, 2005, Ockaili *et al.*, 2005). Da in der vorliegenden Studie zwar 6 h nicht jedoch 16 h nach dem LPS-Stimulus ein HIF1 α -Proteinanstieg zu beobachten war, erschien es sinnvoll, die Zielgene von HIF1 α zu untersuchen. Hier wurden ADM und iNOS betrachtet.

4.4.3 ADM-Expression

Beim HIF1-Zielgen ADM handelt es sich um ein hypotensiv, vasodilatierend und immunmodulierend wirkendes Peptid, welches in Kardiomyozyten (Bell *et al.*, 2006), Endothel-, glatten Muskel- und Tumorzellen sowie Monozyten und Makrophagen identifiziert wurde und durch Hypoxie induzierbar ist (Beltowski und Jamroz, 2004). ADM erhöhte *in vivo* die linksventrikuläre Kontraktilität (Nagaya *et al.*, 1999, Parkes und May, 1997) und übte *in vitro* einen positiv inotropen Einfluss aus (Szokodi *et al.*,

1998). Es wird in kardiovaskulärem Gewebe durch inflammatorische Zytokine (Horio *et al.*, 1998), NO, Angiotensin II, Endothelin-1 und metabolische Faktoren wie Ischämie und Hyperglykämie reguliert (Eto *et al.*, 2003).

In den hier vorgestellten Experimenten bewirkte LPS eine vermehrte ADM mRNA-Expression nach 6 h, die nach 16 h nicht mehr nachweisbar war. Dies bedeutet allerdings nicht, dass auch das ADM-Protein zu diesem Zeitpunkt schon wieder erniedrigt war. Die hier gezeigte LPS-abhängige ADM-Expression steht im Einklang mit der Beobachtung erhöhten ADMs im Plasma von Sepsispatienten. Auch murine Makrophagen sowie humane Monozyten exprimierten ADM nach LPS-Stimulation (Frede *et al.*, 2006, Hirata *et al.*, 1996, Zaks-Zilberman *et al.*, 1998).

Nach der Ischämie stieg die ADM mRNA-Expression im Vergleich zum 16 h-Wert in allen Gruppen an, signifikant am höchsten in den TLR4-KO-Herzen. Erhöhtes Plasma-ADM fand sich auch bei Patienten nach Myokardinfarkt (Eto *et al.*, 2003). Chao *et al.* beschrieben, dass Ratten nach adenoviralem Gentransfer von ADM vor Myokardschäden durch I/R geschützt waren (Chao und Chao, 2002). Die hier beobachtete hohe ADM-Expression in TLR4-KO-Herzen nach I/R steht in Übereinstimmung mit dem beschriebenen kardioprotektiven Einfluss von ADM. In isoliert perfundierten Rattenherzen aktivierte Ischämie die ADM-Ausschüttung, welche durch Vasodilatation der Koronarien die myokardiale Durchblutung verbessern kann (Belloni *et al.*, 2004). Die Verbesserung der myokardialen Durchblutung könnte auch den präkonditionierenden LPS-Einfluss erklären; denn bislang unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die ADM mRNA-Expression nach 6 und 16 h LPS in der Aorta sehr hoch war. Es ist zu vermuten, dass ADM durch LPS auch in den Koronargefäßen erhöht wird. Dadurch könnte während der Okklusion durch zeitgleiche Vasodilatation der Koronarien im Randbereich des Infarktgebietes mehr Sauerstoff die AAR versorgen und somit die Infarktgröße positiv beeinflussen.

4.4.4 iNOS-Expression

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass LPS eine vermehrte myokardiale iNOS mRNA-Expression nach 6 h induzierte. Nach 16 h, zu Beginn der Ischämie, war

keine iNOS mRNA-Expression mehr messbar. Ebenso wenig konnte nach I/R eine iNOS-Induktion nachgewiesen werden.

Sepsis bzw. Endotoxinämie führen bekanntermaßen zu Vasodilatation und myokardialer Dysfunktion und bewirken eine vermehrte NO-Produktion via iNOS. Kontrovers diskutiert wird der Einsatz von iNOS-Inhibitoren, um den Verlauf einer Sepsis durch Erhöhung des peripheren Widerstandes und bessere Organperfusion positiv zu beeinflussen (Lee *et al.*, 2005). Trotzdem wird vermutet, dass die kardioprotektive Wirkung von LPS bei I/R wesentlich durch iNOS begründet ist, weil es vasodilatativ, antiadhäsiv und -oxidativ wirken kann (Muller *et al.*, 2002).

Wang *et al.* führten eine 24 h LPS-Vorbehandlung von Ratten mit anschließender I/R durch. Bei unbehandelten Tieren stieg die iNOS mRNA- und Proteinexpression nach 4 bzw. 6 h LPS signifikant an, nicht jedoch bei Tieren, die iNOS-Inhibitoren erhalten hatten. Nach 24 h, also direkt vor der Ischämie, waren iNOS-mRNA und -Protein nicht mehr nachweisbar (Wang *et al.*, 2002), was mit den hier erhobenen Daten nach 16 h LPS übereinstimmt. LPS-behandelte Tiere mit inhibierter iNOS unterschieden sich in der Infarktgröße nicht von gänzlich unbehandelten Wildtypmäusen. Demzufolge ist die LPS-induzierte iNOS-Aktivität notwendig für die kardioprotektive Wirkung, obwohl zu Beginn der I/R kein erhöhtes Protein mehr nachweisbar war.

Zhao *et al.* und Tosaki *et al.* untersuchten an Kaninchen- und Rattenherzen die kardioprotektive Wirkung des TLR4-Liganden Monophosphoryl Lipid A (MLA), einem LPS-Derivat, und fanden ebenfalls heraus, dass dem kardioprotektiven Effekt eine iNOS-Aktivierung mit einem Maximum nach 6 - 8 h zu Grunde liegt (Tosaki *et al.*, 1998, Zhao *et al.*, 1997). Xi *et al.* untermauerten diese Bedeutung in Versuchen an iNOS-Knockout-Mäusen, die nicht durch MLA präkonditionierbar waren (Xi und Kukreja, 2000).

Die positiven und negativen Einflüsse von NO und seinen Reaktionsprodukten sowohl im Zusammenhang mit Sepsis als auch MI sind vielfältig und noch immer nicht vollständig aufgeklärt. NO inhibiert die Adhäsion und Infiltration von Neutrophilen und kann dadurch die Infarktgröße reduzieren (Lefer *et al.*, 1993, Simpson *et al.*, 1990). Die Zell-Zell-Interaktion aktivierter Neutrophiler mit Kardiomyozyten bzw.

Endothelzellen hat proteolytische und zytotoxische Folgen, da die Freisetzung von ROS durch Neutrophile andere Zellen oxidativ schädigen kann (Simpson *et al.*, 1990). Jedoch ist mittlerweile bekannt, dass NO in Immunzellen einen biphasischen Effekt auf die NFκB-Aktivität ausübt: Niedrige NO-Konzentrationen steigern die Zytokin- und iNOS-Expression durch Verstärkung der NFκB-Aktivität während hohe Dosen die iNOS-Expression durch Nitrosierung der p50 Einheit von NFκB und Stabilisierung der IκB-mRNA inhibieren (Connelly *et al.*, 2001). Bei einer Infektion oder zellulären Schädigung ermöglicht dieser Mechanismus durch vermehrte NO-induzierte NFκB-Aktivierung zunächst die Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen und die Rekrutierung von Immunzellen, welche wiederum iNOS exprimieren und durch vermehrte NO-Synthese die NFκB-Aktivität wieder reduzieren. Dies könnte der Grund für den nur vorübergehenden Anstieg der iNOS-Expression im Herzgewebe sein. Wie unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, war die iNOS-Expression nach 16 h LPS in Aorten sehr hoch, was auch für andere Gefäße wie die Koronarien gelten sollte. Dies könnte die schon im vorigen Kapitel beschriebene Wirkung von ADM unterstützen.

Unklar ist, wie die fehlende iNOS-Induktion nach I/R in den gezeigten Daten zu erklären ist. Zingarelli *et al.* beobachteten während 60 min Reperfusion eine sukzessive Erhöhung der iNOS mRNA-Expression in murinen Herzen (Zingarelli *et al.*, 2002). Plasmanitrit stieg bereits nach 60 min Okklusion signifikant an. Vielleicht wurde die iNOS-mRNA in der hier vorgestellten Studie zu spät bestimmt. Feng *et al.* wiesen im nicht-infarzierten Areal muriner, allerdings permanent okkludierter, Herzen auch noch nach fünf Tagen erhöhte iNOS mRNA-Expression sowie nach 5 und 30 Tagen erhöhte Plasma-Nitrit- bzw. Nitratspiegel nach (Feng *et al.*, 2001).

Bei der frühen ischämischen Präkonditionierung spielt iNOS keine Rolle und wurde auch nicht untersucht. Während die frühe IPC-Phase durch die Aktivierung zellulärer Kinasen (PKC, MAPK) und weitere beschriebene Mechanismen zustande kommt (Kapitel 1.2.2), ermöglicht eine vermehrte Expression kardioprotektiver Gene die Entwicklung einer späten IPC-Phase (Guo *et al.*, 1998). Sowohl die vermehrte Aktivierung von NOS durch späte IPC als auch eine pharmakologisch induzierte NO-Produktion schützte vor den Auswirkungen einer Ischämie (Bolli *et al.*, 1998, Dawn und Bolli, 2002).

4.4.5 Zytokine

Die Aktivierung von NF κ B induziert die Expression inflammatorischer Zytokine. Die mRNA-Expression von TNF, IL-1 β und IL-6 wurde nach LPS bzw. IPC und I/R in Abhängigkeit von TLR4 untersucht. Zytokine werden sowohl während einer Endotoxinämie und Sepsis als auch nach MI frühzeitig induziert (Blackwell und Christman, 1996, Nossuli *et al.*, 2000). Eine wesentliche Entdeckung der aktuellen Forschung war, dass beide Prozesse via TLR4 reguliert werden können (Baumgarten *et al.*, 2001, Chong *et al.*, 2004, Oyama *et al.*, 2004). Gemäß unserer Arbeitshypothese erwarteten wir in Folge einer LPS-Präkonditionierung einen Anstieg der Zytokinexpression vor der Ischämie und eine Verringerung der Expression während der Reperfusion. Weiterhin sollte nach unserer Hypothese eine verminderte Zytokininduktion nach I/R auch in Folge einer Präkonditionierung durch IPC sowie bei TLR4-defizienten Tieren auftreten.

Die vorgestellten Daten weisen eine massive LPS-Induktion der untersuchten Zytokine ausschließlich bei WT-Mäusen auf, welche nach 6 h am höchsten und nach 16 h rückläufig war. Dies entsprach unserer Arbeitshypothese. Jedoch hatte weder die LPS-Vorbehandlung noch die IPC eine Auswirkung auf die myokardiale Zytokinexpression nach I/R. Im Anschluss an die Ischämie stieg in allen Gruppen die mRNA-Expression an. Auch auf Proteinebene zeigte sich nach I/R eine Zytokininduktion im Herzen, die bei TLR4-D-Mäusen deutlich schwächer ausfiel. Im infarzierten Herzen war die Menge des IL-6-Proteins in TLR4-D- signifikant geringer als in WT-Mäusen. Zwischen unseren mRNA- und den Proteinexpressionsdaten gibt es also eine Divergenz. Möglicherweise war der Zeitpunkt der Messung der mRNA in dieser Studie mit drei Stunden zu spät gewählt, so dass vorher vorhandene Differenzen sich bereits wieder ausgeglichen hatten.

Um einen direkten Vergleich mit den in der Literatur veröffentlichten Daten zu ermöglichen, wurden die Werte in gleicher Weise normiert wie bei Chong *et al.* (Chong *et al.*, 2004, Shimamoto *et al.*, 2006). Dabei werden die Werte nach I/R als „Vielfaches“ der jeweiligen SOP angegeben, man sieht also den durch I/R hervorgerufenen Anstieg isoliert von der Vorbehandlung. In unbehandelten WT führte I/R zu einem signifikanten Anstieg von TNF, IL-1 β und IL-6, während in den Gruppen mit kleinem

Infarkt, also dem LPS präkonditionierten WT und den beiden TLR4-D Gruppen, weder TNF noch IL-1 β durch den Infarkt signifikant über das Ausgangsniveau hinaus erhöht wurden. Lediglich IL-6 stieg in allen Gruppen unabhängig von der Infarktgröße an. In der Studie von Chong *et al.* wurden nur die beiden Gruppen WT und TLR4-D miteinander verglichen. Dabei waren die Ergebnisse generell mit den vorliegenden vergleichbar. Durch Gruppen mit LPS-Präkonditionierung und den zusätzlichen Nachweis der Proteinexpression im Herzen und im Serum geht die vorliegende Studie allerdings über die Befunde von Chong *et al.* (Chong *et al.*, 2004) deutlich hinaus. Die Proteinexpression aller Serumzytokine war bei TLR4-D- gegenüber WT-Mäusen nach I/R signifikant reduziert, wie man es nach unserer Arbeitshypothese auch erwarten würde.

Hiasa *et al.* verglichen die einer I/R folgende Zytokinexpression nach vorhergehender LPS- oder ischämischer Präkonditionierung von Ratten (Hiasa *et al.*, 2001). In der Kontrollgruppe wurde keines der Zytokine vor I/R detektiert. Nach 1 h Reperfusion begann eine vermehrte mRNA-Expression, die ihr Maximum nach 2 h erreichte. Nach 3 h Reperfusion fielen die Werte für IL-1 β und TNF mRNA ab während die IL-6-Expression hoch blieb. In den vorbehandelten Gruppen fielen bereits vor I/R hohe Zytokinspiegel auf, die in der LPS-Gruppe nach 30 min, bei der IPC-Gruppe nach 60 min Reperfusion unter den Werten der Kontrollgruppe lagen. Die Ergebnisse dieser Studie entsprechen weitgehend unserer Arbeitshypothese, allerdings wurde in dieser Studie eine mögliche Beteiligung von TLR4 nicht berücksichtigt, die hier im Vordergrund steht. Aus den Ergebnissen von Hiasa *et al.* ergibt sich ein verhältnismäßig schneller Anstieg und Abfall der Zytokin-mRNA nach I/R. Dies könnte dazu führen, dass Differenzen der mRNA-Expression zu anderen als den hier gemessenen Zeitpunkten ausgeprägter sein könnten. Die Wichtigkeit des zeitlichen Verlaufes der Zytokinexpression zeigte sich auch in Befunden an Patienten, die vor Beginn einer kardiopulmonären Bypassoperation einer IPC unterzogen wurden. Diese exprimierten in der post-interventionellen Reperusionsphase genau so viel TNF, IL-6, -8 und -10 wie Patienten in der nicht präkonditionierten Vergleichsgruppe. Jedoch resultierte aus der IPC nach 20 h Reperfusion eine signifikante IL-6-Reduktion im Plasma (Wei *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Studie kam es trotz der TLR4-Defizienz auch in den TLR4-D Tieren zu einer Zytokininduktion nach I/R. Dies deutet darauf hin, dass neben TLR4 weitere Rezeptoren an der Signaltransduktion beteiligt sind. Wie bereits erwähnt, existieren zahlreiche endogene Liganden die z.B. via TLR2 erkannt werden und gleichfalls eine inflammatorische Antwort auslösen könnten. Es ist bekannt, dass TLR2-KO-Mäuse ebenfalls verminderte Infarkte bilden (Shishido *et al.*, 2003). Dies erklärt, weshalb auch TLR4-D-Mäuse eine Reaktion auf I/R zeigen.

Die bisher diskutierten Befunde geben die jeweiligen Zytokinspiegel wieder, ohne auf deren Wirkung im Einzelnen einzugehen, daher soll im folgenden Abschnitt die Funktion der verschiedenen Zytokine im Geschehen der I/R erläutert werden. Das früh synthetisierte, proximal in der Signalkaskade stehende TNF spielt eine wichtige Rolle bei der Koordination inflammatorischer Antworten u.a. auf Endotoxine und Ischämie. Im Zentrum der Regulation weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren wie IL-1 β und IL-6 stehend, lenkt es auch Remodellingprozesse durch Induktion von MMPs, TIMPs, VEGF, u.a., und kann sich durch positive Rückkopplung via NF κ B selbst amplifizieren (Nian *et al.*, 2004). Ferner findet eine Zytokinamplifikation durch infiltrierende Entzündungszellen statt. Gemeinsam mit weiteren Mitgliedern der TNF-Familie, dem Fas-Liganden und TRAIL, wird es als „death inducing ligand“ mit zytotoxischer Wirkung bezeichnet (Nakajima *et al.*, 2003). In *in vitro*-Versuchen induzierte TNF die Aktivierung pro-apoptotischer Gene (Bajaj und Sharma, 2006, Chen und Tu, 2002). Belosjorow *et al.* bewirkten durch Einsatz eines TNF-Antikörpers eine Infarktgrößenreduktion (Belosjorow *et al.*, 2003). Auch die antagonistische Wirkung insbesondere des löslichen TNF-Rezeptors reduzierte die TNF-Bioaktivität und damit die Infarktgröße (Sugano *et al.*, 2004). Die biologische TNF-Aktivität ist jedoch ambivalent. So konnten *in vivo* und *in vitro* Studien zeigen, dass TNF in der Lage ist, Kardiomyozyten vor hypoxischen und ischämischen Schäden zu bewahren (Eddy *et al.*, 1992, Nakano *et al.*, 1998). Auch IL-1 β ist ein früh exprimiertes Zytokin, welches in seiner biologischen Aktivität der von TNF ähnelt und ebenfalls durch I/R und Endotoxine induziert wird (Baumgarten *et al.*, 2001, Nian *et al.*, 2004). IL-6 induziert die Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche von Myozyten. Dies befähigt Neutrophile zur Adhäsion an und Schädigung von Kardiomyozyten auf drei unterschiedliche Weisen: 1) Freisetzung von ROS, 2)

Degranulation von Proteasen / Elastasen, 3) Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten und Thrombozyten aktivierenden Faktoren (Gwechenberger *et al.*, 1999); (Jordan *et al.*, 1999). IL-6 wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen produziert zu denen Kardiomyozyten, Monozyten / Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Mastzellen, Neutrophile und viele andere gehören (Birdsall *et al.*, 1997, Gwechenberger *et al.*, 1999). Die Proteinexpression von TNF, IL-1 β und IL-6 in Herz und Serum TLR4-defizienter Tiere fiel in den vorgestellten Ergebnissen nach I/R deutlich geringer aus. Somit ist auch die pro-apoptotische Bioaktivität von TNF und IL-1 β reduziert. Der verringerte IL-6-Spiegel im Herzen könnte zu einer verminderten Infiltration von Immunzellen führen. Dadurch würde der schädigende Einfluss auf das Myokardgewebe kleiner, was wiederum mit einer kleineren Infarktgröße übereinstimmt.

Unterschiedlichen Literaturangaben zufolge unterdrücken sowohl LPS als auch IPC die Zytokinexpression von TNF, IL-6 und IL-1 β nach I/R. Insbesondere die Assoziation der LPS-Wirkung mit TNF wurde in einigen *in vitro* und *in vivo* Studien untersucht. Mehrere Autoren beschrieben als Folge einer Präkonditionierung einen Anstieg der TNF-Expression und dadurch eine Rekrutierung und Aktivierung inflammatorischer Zellen und Präkonditionierung (Belosjorow *et al.*, 1999, Smith *et al.*, 2002b, Smith *et al.*, 2002a). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte durch Präkonditionierung mit LPS ein TNF-Anstieg hervorgerufen werden. Eine Applikation von TNF allein ohne vorherige Gabe von LPS wirkte auch präkonditionierend (Belosjorow *et al.*, 2003). Dies deutet darauf hin, dass TNF einen wichtigen Schritt in der Signaltransduktion der Präkonditionierung darstellt. Allerdings ist TNF nur partiell verantwortlich für den LPS-Effekt, d.h. LPS wirkt auch kardioprotektiv, wenn TNF neutralisiert oder dessen Expression unterbunden wird (Meng *et al.*, 1997). Wie im vorangehenden Abschnitt erwähnt, nimmt die Schädigung des Myokards in Folge einer reduzierten Zytokinausschüttung nach I/R vermutlich ab.

Ein kardioprotektiv wirkender Stimulus kann nicht nur die Synthese pro-inflammatorischer, sondern auch die anti-inflammatorischer Zytokine induzieren, die jedoch in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurden.

4.4.6 Zytokinrezeptoren

Die Wirkung der Zytokine wird nicht allein durch ihre Konzentration bestimmt sondern auch durch die Bindung an Zytokinrezeptoren. Man kann zwei Klassen von Zytokinrezeptoren unterscheiden, solche die eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen und nicht signalisierende, die durch Bindung die Menge des aktiven Zytokins reduzieren und damit deren Aktivität vermindern können. Nicht signalisierende Rezeptoren, auch „Decoy“-Rezeptoren genannt, wurden bislang für verschiedene Interleukine und TNF identifiziert. Eine hohe Zytokinkonzentration kann also durch eine gleichzeitig hohe Konzentration von „Decoy“-Rezeptoren antagonisiert werden. Ein LPS-Stimulus induziert, wie oben beschrieben, Zytokine, zusätzlich vermag er eventuell auch die Konzentration von deren Rezeptoren zu beeinflussen. Auch im Falle einer TLR4-Defizienz kann eine veränderte Rezeptorregulation Einfluss auf die Zytokinsignalwege nehmen. Deshalb erschien es sinnvoll, auch die Expression von Zytokinrezeptoren am Beispiel des TNFR1 zu untersuchen.

Die TNFR1-Spiegel unterschieden sich nicht zwischen WT und TLR4-KO nach I/R und auch eine LPS-Vorbehandlung beeinflusste ihre Expression nicht. In einer vergleichbaren Studie untersuchten Baumgarten *et al.* die Auswirkung einer myokardialen Schädigung in Folge einer TAK auf die Zytokinrezeptorexpression von TNFR1 und -2, und konnten in keinem Fall eine signifikante Veränderung beobachten (Baumgarten *et al.*, 2002). Semenza *et al.* beschrieben erhöhte TNFR2-Werte nach Myokardinfarkt (Semenza, 1998).

An die Transmembrandomänen schließt sich bei TNFR1 eine intrazelluläre „death domain“ an, die nach TNF-Aktivierung das Adapterprotein TRADD rekrutiert und die Apoptose einleitet oder den anti-apoptotischen, pro-inflammatorischen NFκB-Signaltransduktionsweg einschlägt. Im Gegensatz hierzu besitzt TNFR2 eine intrazelluläre Bindungsstelle für TRAF-Moleküle. Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Affinität zu löslichem und membranständigem TNF: TNFR1 bindet lösliches TNF besser während TNFR2 membranständiges TNF bevorzugt (Grell *et al.*, 1998). Bei pathologischen Prozessen steigt die Menge von gelöstem TNFR1 und TNFR2 durch Abspaltung von der Membran an (Schroder *et al.*, 1995). Das „TNF-alpha converting enzyme“ (TACE/ADAM-17) treibt diesen proteolytischen Prozess, hervorgerufen

durch die Präsenz von TNF und LPS, voran. Obwohl die TNFR1-Expression in den vorgestellten Ergebnissen gleich blieb, ist es dennoch möglich, dass sich das Verhältnis von löslichen zu membranständigen Rezeptoren änderte und damit zu einer verminderten Entzündungsreaktion führen konnte. Wang *et al.* demonstrierten, dass bei Endotoxintoleranz sTNFR1 hochreguliert und das Verhältnis von TNF zu TNFR1 im Vergleich zu einer singulären LPS-Injektion umgekehrt wird (Wang *et al.*, 2004). Ein *in vivo* Anstieg von sTNFR1 verbesserte die kardiale Funktion und reduzierte die Infarktgröße in einem Ratten-I/R-Modell (Sugano *et al.*, 2004). Ein TNFR1/TNFR2-Doppelknockout führte bei Mäusen zu einer 40 % Infarktvergrößerung. Zudem beschleunigte und verstärkte sich die Apoptoserate dieser Tiere (Kurrelmeyer *et al.*, 2000). Somit könnte die sTNFR-Expression auch in der hier vorgestellten Studie von Relevanz sein. Um festzustellen, ob eine Korrelation von TNFR und Infarktgröße in Präkonditionierungsmodellen und in Abhängigkeit von TLR4 besteht, sind jedoch weitergehende Untersuchungen notwendig.

4.4.7 Chemokine

Pathologische Einflüsse auf das Myokard induzieren in Folge einer inflammatorischen Antwort auch die Expression von Chemokinen. Entsprechend hat in den vorliegenden Experimenten I/R die Gesamtchemokinexpression sowohl in WT als auch in TLR4-D Tieren erhöht. Eine LPS-Vorbehandlung als weiterer pathologischer Stimulus bewirkte in WT-Tieren ebenfalls eine Verstärkung der Expression aller untersuchter Chemokine, wie auch schon von Kadokami *et al.* gezeigt (Kadokami *et al.*, 2001). Der LPS-abhängige Chemokinanstieg ergab sich nur bei einer Gesamtbetrachtung aller Chemokine. Auf der Ebene einzelner Chemokine zeigten sich keine Unterschiede. Im Fall der TLR4-D-Tiere führte die LPS-Gabe nicht zu einer veränderten Chemokinexpression. In LPS-behandelten WT Tieren steigerte I/R die Chemokinexpression nicht über das Niveau einer alleinigen LPS-Stimulation hinaus. Das bedeutet, dass der eigentlich zu erwartende Effekt der I/R nicht eintrat. Nach Normierung der Anstiege auf das „Vielfache“ nach Chong *et al.* (Chong *et al.*, 2004) (vgl. Kap.) zeigte sich in der Kontrollgruppe in den meisten Chemokinen auch im einzelnen (MIP-1 α , - β , MIP-2, MCP-1 und TCA-3) ein signifikanter Anstieg hervor-

gerufen durch I/R. Im Gegensatz dazu verhinderte die LPS-Präkonditionierung in allen untersuchten Chemokinen den I/R-abhängigen Anstieg genau wie es unsere Arbeitshypothese vorhersagt. Die Art der Normierung lässt also mögliche Unterschiede deutlicher hervortreten als der alleinige Vergleich der mRNA-Expression.

Auch bei den Experimenten mit IPC erhöhte I/R generell die Chemokinexpression unabhängig vom Genotyp. Im Gegensatz zu den Infarktgrößen ergab sich in der Chemokinexpression zwischen der WT I/R und der WT IPC I/R-Gruppe kein Unterschied. Dies stimmt nicht mit unserer Arbeitshypothese überein, nach der eine verringerte Chemokinexpression in der Gruppe WT IPC I/R und TLR4-KO I/R zu erwarten gewesen wäre.

3 - 4 h nach I/R kommt es zur Chemotaxis, Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, wobei die Anzahl infiltrierender Zellen mit der Masse infarzierten Gewebes korreliert (Simpson *et al.*, 1990). Dabei dienen Chemokine als chemotaktisch wirkende Zytokine, die die Wanderung von Leukozyten ins Entzündungsgebiet regulieren. Sie induzieren u.a. die Infiltration von Neutrophilen und die anschließende Degranulation von MMP-9 aus Neutrophilen. Außerdem regulieren sie die Aktivität von Fibroblasten und somit die Kollagensynthese (Gharaee-Kermani *et al.*, 1996, Opendakker *et al.*, 2001). Versuche mit humanen Fibroblasten zeigten, dass MCP-1 die MMP-1, MMP-2 und TIMP-1 mRNA- und Proteinexpression regulierte (Yamamoto *et al.*, 2000)(vgl. Kap. 4.4.8). Chemokine ermöglichen durch die Infiltration von Makrophagen und Mastzellen und darauffolgende Zytokin- sowie Wachstumsfaktor-expression die Fibroblastenproliferation und die Neovaskularisierung, was Voraussetzung für effektive Reparaturprozesse und Narbenbildung ist. Weiterhin kann eine langanhaltende Chemokininduktion und inflammatorische Antwort eine Myokardschädigung bewirken (Hayashidani *et al.*, 2003b).

Die Expression von MIP-1 α , - β , -2 und MCP-1 stieg in unterschiedlichen MI-Modellen gleichermaßen an (Frangogiannis *et al.*, 2002, Frangogiannis *et al.*, 2001, Frangogiannis, 2004, Kukielka *et al.*, 1995, Kumar *et al.*, 1997, Massey *et al.*, 1995). Dies gilt auch für die in der vorliegenden Studie präsentierten Versuche. Aus der Literatur ist bekannt, dass MIPs zu den früh induzierten Chemokinen gehören (Chandrasekar *et al.*, 2001, Frangogiannis und Entman, 2005) und MIP-2 die

nachfolgende MCP-1-Expression reguliert (Tarzami *et al.*, 2002). Eine Reduktion der MCP-1 Konzentration durch Anti-MCP-1 Gentherapie oder durch MCP-1 Knockout reduzierte nach I/R die Dilatation des LV, die kontraktile Dysfunktion, die interstitielle Fibrose, die Makrophagenrekrutierung und die Expression von myokardialen TNF und TGF β (Frangogiannis und Entman, 2005, Hayashidani *et al.*, 2003b). Daraus lässt sich schlußfolgern, dass eine durch Ischämie hervorgerufene MCP-1-Erhöhung den Infarktschaden verstärkt. In Übereinstimmung damit beobachteten verschiedene Arbeitsgruppen, dass TLR4-Defizienz bzw. TLR4-Antagonisierung die Induktion von MCP-1 und MIPs sowie die Neutrophileninfiltration nach I/R verminderte und auch zu einem verringerten Infarkt führte (Chong *et al.*, 2004, Oyama *et al.*, 2004, Shimamoto *et al.*, 2006). Die vorliegende Studie bestätigt diese Befunde und stellt den Zusammenhang erstmals vollständig für MIP-1 α , - β , MIP-2, MCP-1 und TCA-3 dar.

Chemokine scheinen im Gegensatz zu ihrer schädigenden Wirkung nach I/R bei einer Erhöhung vor der Ischämie eher einen positiven Einfluss auf das Infarktgeschehen auszuüben; denn eine LPS-Vorbehandlung im Rahmen der Präkonditionierung bewirkte in WT-Tieren eine verstärkte Expression der Chemokine vor dem Infarkt bei gleichzeitiger Reduktion der Infarktgröße. Ein vergleichbarer Mechanismus liegt möglicherweise den Ergebnissen von Martire *et al.* (2003) zugrunde, die durch eine myokardiale MCP-1-Überexpression eine Verringerung der Infarktgröße erreichten. Ihre transgenen Mäuse mit einer auf Kardiomyozyten beschränkten MCP-1 Überexpression wiesen eine chronische Infiltration und Aktivierung von Leukozyten im Herzen auf (Martire *et al.*, 2003). Ein in-vitro Experiment mit Kardiomyozyten zeigte, dass die Expression von MCP-1 den Hypoxie-induzierten Zelltod herabsetzen konnte (Tarzami *et al.*, 2002), auf diese Weise könnte ein erhöhter MCP-1-Spiegel vor Ischämie protektiv wirken. Gleichzeitig ist auch bekannt, dass LPS die Expression von Adhäsionsmolekülen vermindert und dadurch die Einwanderung von Immunzellen ins Myokard unterdrückt (Lipton *et al.*, 2001). Die LPS-Gabe führte Lipton *et al.* zufolge nach I/R zu einer reduzierten Infiltration und inflammatorischen Immunantwort von Immunzellen.

Cheng *et al.* führten eine LPS-Stimulation an Mäusen mit unterschiedlichem Eotaxinstatus aus. Hierbei beobachteten sie, dass die Anwesenheit von Eotaxin die Infiltration von Neutrophilen verringert und schlussfolgerten, dass die konstitutive

Eotaxin-Expression in Lunge, Herz und weiteren Organen akute inflammatorische Prozesse möglicherweise abschwächt (Cheng *et al.*, 2002). Die erhöhte Eotaxin-Expression von TLR4-D-Mäusen in der vorliegenden Studie könnte demnach ihre verminderte Infarktgröße begünstigen. Jedoch besteht kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Eotaxinexpression und Funktion des TLR4, da TLR4-KO-Mäuse eine normale Eotaxinexpression aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein Anstieg der Chemokine vor Ischämie sich eher protektiv auf das Infarktgeschehen auswirkt, während der durch die Ischämie selbst induzierte Chemokinanstieg mit der Größe des Infarktschadens korreliert. Interessanterweise hat I/R nach Präkonditionierung mit LPS keinen weiteren Anstieg der Chemokinexpression zur Folge gehabt. Die Chemokinexpression folgt also unserer Arbeitshypothese, LPS Präkonditionierung verhindere den I/R abhängigen Chemokinanstieg. TLR-4-Defizienz verringert ebenfalls den I/R abhängigen Chemokinanstieg.

Die Ergebnisse der IPC zu Chemokinen lassen sich nicht im Rahmen unserer Arbeitshypothese erklären; denn es bestand keine Korrelation zwischen der Infarktgröße und der Chemokinexpression.

4.4.8 MMPs und TIMPs

Nach LPS-Applikation war eine generelle Erhöhung des kardialen MMP/TIMP-mRNA Quotienten bei WT-Mäusen zu beobachten, welche vor allem auf den Anstieg der Einzelwerte von MMP-3, -8, -9 sowie TIMP-1 und TIMP-4 zurückzuführen war. Dabei wird TIMP-4 ausschließlich im Herzen exprimiert (Li *et al.*, 2002b, Liu *et al.*, 1997). Verstärkte myokardiale MMP-3, -8 und -9 mRNA-Spiegel in Folge einer LPS-Behandlung wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Lalu *et al.*, 2004, Warner *et al.*, 2004). Außerdem erhöhte LPS hier den MMP-2/TIMP-2-Quotienten, der mit der erhöhten zymographischen Aktivität nach 23 h LPS korreliert. Wenige Studien haben die Funktion des myokardialen MMP-2 während einer Endotoxinämie untersucht. Lalu *et al.* fanden im Gegensatz zu den vorgestellten Ergebnissen nach LPS eine verringerte Proteinaktivität und Expression sowohl in

Herzen als auch im Plasma von Ratten. Innerhalb von 24 h gingen die Werte auf das Ausgangsniveau zurück (Lalu *et al.*, 2004). Wie erwartet induzierte LPS Veränderungen der MMP mRNA-Expression nur in WT-Herzen. Allerdings korrelierten die Unterschiede der mRNA-Expression nicht mit entsprechenden Veränderungen der zymographischen Aktivität von MMP-2 und -9. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass MMPs auf Ebene der Transkription, Translation, Sekretion, Aktivierung der Zymogene zu aktiven Proteasen sowie schließlich durch Proteaseinhibitoren reguliert werden.

Nach 3 h Reperfusion war in keiner Gruppe eine Veränderung des Gesamtverhältnisses von MMP/TIMP zu beobachten. Vor allem TIMP-1 und TIMP-3 reagierten nach 3 h Reperfusion mit einem Expressionsanstieg in beiden Genotypen. TIMP-3 ist ein wichtiger Regulator inflammatorischer Reaktionen, der auch verantwortlich zeichnet für die TNF-Signalinduktion (Fedak *et al.*, 2004). In den vorliegenden Experimenten wurde der Anstieg der TIMPs ausgeglichen durch eine Verstärkung der MMP-1 mRNA-Expression, MMP-2, -3, -8 und -9 blieben nahezu unverändert. Eine MMP-2-Induktion wurde in einigen Studien erst im späteren Verlauf des Remodelling beobachtet (Hayashidani *et al.*, 2003a, Lindsey, 2004). Cheung *et al.* beschrieben jedoch dass in einem Ischämiemodell am isoliert-perfundierten Rattenherzen schon nach wenigen Minuten vermehrt pro-MMP-2 und MMP-2-Protein gemessen werden konnten (Cheung *et al.*, 2000). Trotz der erhöhten TIMP-Expression förderte I/R einen Anstieg der MMP-9-Aktivität nach 3 h Reperfusion, welche bei WT stärker ausfiel als bei TLR4-D. Dies ist möglicherweise auf technische Schwierigkeiten bei der Zymographie zurückzuführen, die im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

Während in den WT C3H-Mäusen nach 3 h Reperfusion noch keine Veränderung des MMP/TIMP-Verhältnisses eingetreten war, kam es nach 24 h zu einem deutlichen Anstieg, was auf die verstärkte Expression aller MMPs mit Ausnahme von MMP-1 zurückzuführen war. Die nach 3 h Reperfusion erhöhte TIMP-1 und -3 mRNA-Expression war nach 24 h wieder rückläufig. Die TIMP-2-Expression fiel nach 24 h Reperfusionszeit unter das Ausgangsniveau ab. Außerdem konnte zu diesem Zeitpunkt ein TLR4-abhängiger Anstieg von MMP-3, -8, -9 und TIMP-4 beobachtet werden.

Ein Anstieg des Gesamtquotienten zeigte sich im Fall der C57Bl/6-Mäuse bereits nach 3 h. Er war bei diesen besonders auf einen Anstieg der mRNA-Expression von MMP-1, -2 und -9 sowie von TIMP-4 zurückzuführen. IPC übte keinen zusätzlichen Einfluss auf die Expression nach I/R aus.

Von besonderem Interesse war die Kombination von LPS-Vorbehandlung und I/R. Bei WT-C3H-Herzen, sowohl SOP als auch I/R, bewirkte LPS eine Erhöhung des Gesamt-MMP/TIMP-Quotienten, während dieser bei TLR4-D unbeeinflusst blieb. Eine vorangegangene LPS-Applikation führte zu einem ausgeprägteren Anstieg der MMP-9-Aktivität in TLR4-D-Herzen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde bereits früher von einer LPS-abhängigen MMP-9-Aktivierung in isolierten Makrophagen aus TLR4-D-Mäusen berichtet (Jin *et al.*, 1999). Eine *in vivo* LPS-Behandlung induzierte die MMP-3, -9 und TIMP-1-Expression in der Milz, jedoch nicht in Gehirn, Leber oder Niere von TLR4-D-Mäusen (Pagenstecher *et al.*, 2000). Weitere Studien zeigten in der Vergangenheit, dass C3H/HeJ-Mäuse nicht vollkommen unfähig sind, eine LPS-Antwort zu entwickeln. Zellen dieser Tiere können teilweise, verlangsamt oder schwach auf LPS durch NFκB-Aktivierung, Mangan-Superoxid-Dismutase- oder Secretory Leukocyte Protease Inhibitor-Expression reagieren (Ding *et al.*, 1995, Gibbs *et al.*, 1992, Jin *et al.*, 1997).

Darüberhinaus besteht nach 6 h Reperfusion ein Missverhältnis zwischen Genexpression und gelatinolytischer Aktivität von MMP-2 und -9 in den vorgestellten Daten. Dieses ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass MMP-9 aus infiltrierenden Immunzellen sezerniert wird, was eine Neusynthese und damit eine mRNA-Transkription unnötig macht (Masure *et al.*, 1991, Opdenakker *et al.*, 2001). Darüber hinaus könnte die unter Zymographiebedingungen beobachtete Aktivität über der tatsächlichen im intakten Gewebe liegen, da inaktive MMP-TIMP-Komplexe während der Prozedur dissoziieren und MMPs freigeben (Pagenstecher *et al.*, 2000).

Infarktgröße und MMP bzw. TIMP mRNA-Expression korrelierten nicht, da Tiere ohne Vorbehandlung die größten Infarkte entwickelten, obwohl ihre MMP/TIMP-Quotienten denen von TLR4-D-Mäusen mit kleinen Infarktarealen glichen. Im Gegensatz dazu zeigten LPS-behandelte WT-Mäuse kleine Infarkte bei gleichzeitig hohen MMP/TIMP-Quotienten. Dies stimmt mit der Annahme überein, dass eine frühzeitige

MMP-Induktion während der Reperfusionphase zur Entfernung von Matrixbestandteilen und nekrotischen Myozyten, Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, Induktion inflammatorischer Mediatoren und erhöhter Permeabilität der Kapillaren führt (Lindsey *et al.*, 2001). Lindsey *et al.* berichteten, dass MMP-9 innerhalb der ersten 60 min Reperfusion im Myokard ausgeschüttet wird, zusätzlich beobachteten Lalu *et al.* einen schnellen MMP-9-Anstieg nach 60 min LPS (Lalu *et al.*, 2004, Lindsey *et al.*, 2001). Jedoch bleibt die Funktion von MMP-9 bei der LPS-Antwort unklar. Neben seinen Funktionen beim EZM-Abbau kann MMP-9 außerdem die Aktivierung von pro-IL-1 β zu IL-1 β einleiten. Ferner ist es in der Lage, das humane CXC-ELR-Chemokin IL-8 zu aktivieren, was zu einer Neutrophilenaktivierung und Chemotaxis führt. Andere humane CXC-Chemokine wurden durch MMP-9 degradiert während CC-Chemokine unbeeinflusst blieben (Opdenakker *et al.*, 2001).

4.5 Besonderheiten der ischämischen Präkonditionierung

In einem Teil dieser Studie wurde der Zusammenhang zwischen früher IPC und TLR4 untersucht. In diesen Experimenten wurde in Wildtypmäusen eine IPC-induzierte Verminderung des Infarktareals auf das Niveau von TLR4-KO-Mäusen beobachtet. In TLR4-KO-Mäusen führte die frühe IPC zu keiner weiteren Reduktion des Infarktareals. Die IPC hatte keinen deutlichen Einfluß auf die inflammatorische Antwort nach I/R. Dieser Befund spricht dafür, dass die in der Literatur beschriebenen Mechanismen wie Aktivierung ATP-abhängiger K⁺-Kanäle sowie PKC und MAPK bei der kardioprotektiven Wirkung der IPC im Vordergrund stehen. Die hier vorgestellten Befunde, dass IPC und TLR4-KO nicht additiv wirken, sprechen zwar für eine Beteiligung des TLR4 Signalweges auch am Mechanismus der frühen IPC. Dies ist jedoch aus methodischen Gründen unsicher, da die TLR4-KO Tiere unter den gewählten Versuchsbedingungen nur ein Infarktareal von 9,3% aufwiesen. Eine weitere Verringerung des Infarktareals ist nur schwer nachzuweisen. Sollten beide Wege unabhängig sein wäre durch IPC eine Verminderung der Infarktgröße auch bei TLR4-KO zu erwarten gewesen. Aus ihrem Fehlen kann man, einerseits wegen der methodischen Probleme und andererseits auch wegen der bisher bekannten Mechanismen der IPC, nicht auf einen gemeinsamen Signalweg schließen.

Die bislang beschriebenen, durch myokardiale Schädigung freigesetzten endogenen TLR4-Liganden geraten durch Nekrose nach einer dauerhaften Ischämie von mindestens 10 – 15 min in den Kreislauf. Intermittierende, präkonditionierende I/R-Zyklen bewirken zwar oxidativen Stress, setzen aber vermutlich noch keinen der bekannten TLR4-Liganden frei. Wie bereits erwähnt, trägt die Entstehung von ROS, die durch I/R generiert werden, zur IPC bei. ROS bewirken eine posttranslationelle Modifikation redox-sensitiver Proteine in der frühen IPC-Phase, andererseits führen sie durch eine vermehrte Lipidperoxidation zu einer veränderten Membranfluidität, was unspezifisch Rezeptoren und Signaltransduktion inhibiert und die inflammatorische Reaktion auf eine MI abschwächt (Otani, 2004, Oxhorn und Buxton, 2003, Sergent *et al.*, 2005). Die positive Korrelation von Membranfluidität und Kardioprotektivität steht jedoch im Widerspruch zu einer aktuellen Studie, bei der sich herausstellte, dass der kardioprotektive Effekt von IPC mit der Membranintegrität verknüpft war (Patel *et al.*, 2006). Unter Berücksichtigung dieser aktuellen Daten ist es mit dem derzeitigen Wissensstand folglich nicht möglich, eine schlüssige Erklärung abzugeben. Jedenfalls scheint sich die kardioprotektive Wirkung der IPC nicht mit der hier formulierten Arbeitshypothese erfassen zu lassen.

4.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorgestellte Studie zeigt, dass die Aktivierung der TLR4-Signaltransduktion für das Ausmaß einer kardialen Schädigung und die Intensität der inflammatorischen Antwort mitverantwortlich ist. WT-Mäuse weisen im Vergleich zu TLR4-D- und -KO-Tieren einen 50% größeren Infarkt auf. Sowohl durch LPS-Vorbehandlung als auch IPC halbierte sich ausschließlich in WT-Mäusen die Infarktgröße im Vergleich zu nicht präkonditionierten Tieren.

Um dieses Phänomen zu erklären, wurde die Expression von Membranproteinen, NFkB-assoziierten Genen wie HIF, iNOS, Zytokinen, Chemokinen und MMPs untersucht. Dabei wurde der Arbeitshypothese gefolgt, dass eine verringerte Entzündungsantwort nach I/R zu einem kleineren Infarkt führt.

Die untersuchten PRRs, CD14, TLR4 und TLR2, wurden zwar durch LPS- und I/R reguliert, jedoch ließ sich kein direkter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß des myokardialen Schadens und ihrer Expression erkennen. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Übereinstimmung zwischen dem Infarktareal und einer reduzierten Synthese von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen; denn beide wurden sowohl nach LPS-Präkonditionierung wie auch bei TLR4-Defizienz durch I/R vermindert induziert. Nachdem eine Vielzahl endogener TLR4-Liganden beschrieben wurde, die durch Zelltod und EZM-Degradation nach I/R freigesetzt werden, erklärt sich womöglich, weshalb die inflammatorische Antwort bei TLR4-defizienten Mäusen geringer ausfällt.

Erstmals wurde in diesem Kontext die Funktion von HIF und seinen Zielgenen untersucht. LPS induzierte einen transienten Anstieg von HIF, ADM und iNOS. Inwieweit die HIF-Zielgene ursächlich mit der Infarktgröße verknüpft sind, lässt sich an Hand der vorliegenden Daten noch nicht entscheiden. Daher erscheint es sinnvoll, in weiteren Versuchen die Funktion dieser und weiterer HIF-Zielgene wie GLUT ausführlicher zu untersuchen.

Potential für zukünftige Studien über präkonditionierende Effekte und TLR4 könnte die Analyse von anti-inflammatorischen Mediatoren, sCD14, Zytokinrezeptoren und TACE sowie Feedbackinhibitoren der TLR4-Signaltransduktionskette bieten, die bisher nicht untersucht wurden und möglicherweise durch Gegenregulation das Ausmaß der Inflammation eindämmen.

In der präsentierten Arbeit wurden erstmals Mediatoren wie Chemokine und MMPs, die wesentlich mit dem Remodelling verknüpft sind, im Zusammenhang mit präkonditionierenden Mechanismen und TLR4 untersucht. Da die MMP-Expression und die Infarktgrößen in dieser Studie nicht korrelierten, lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen kein direkter Einfluß der MMP-Expression auf den myokardialen Schaden herleiten.

Die vorgestellten Daten zeigen, dass TLR4 ein Mediator des Ischämie-Reperfusionsschadens ist. TLR4-Defizienz und TLR4-vermittelte LPS-Präkonditionierung reduzieren die Infarktgröße und die inflammatorische Antwort. Damit stellt TLR4 ein thera-

apeutisches Ziel bei der Behandlung von Myokardinfarkt und sepsis-ähnlichen Krankheitsbildern dar. In klinischen Studien kam der TLR4-Antagonist E5564, ein strukturelles Lipid A-Analogon des LPS, bei der Behandlung von Sepsis und in kardiovaskulären Interventionen bereits zum Einsatz. Die Verwendung von E5564 in zukünftigen Ischämie-Reperfusionen-Studien könnte Aufschluss darüber geben, ob der Einsatz eines TLR4-Antagonisten den Myokardschaden positiv beeinflusst.

5 Zusammenfassung

TLR4 vermittelt als Rezeptor für LPS aber auch endogene Komponenten wie Fibronectin, HSPs und Hyaluronsäure die Immunantwort auf Endotoxinämie und myokardiale Ischämie-Reperfusionsschäden. Es ist bekannt, dass verschiedene Interventionen vor einer Ischämie den Grad der Schädigung abschwächen können. Eine Vorbehandlung (Präkonditionierung) mit dem TLR4-Liganden LPS wirkt kardioprotektiv und vermindert die Infarktgröße. Auch eine ischämische Präkonditionierung in Form kurzer intermittierender Ischämie-Reperfusionen unmittelbar vor einer Ischämie reduziert den Myokardschaden. In der vorgestellten Studie sollte zunächst die Rolle des TLR4 bei der Ischämie-Reperfusion geklärt werden und zudem seine Funktion bei der Vermittlung kardioprotektiver Mechanismen eingehend untersucht werden.

Zur Erzeugung einer transienten Ischämie durch Verschluss der linken anterioren descendierenden Koronararterie wurde Wildtyp- und TLR4-defizienten Mäusen ein Okkluder implantiert. Nach abgeschlossener Wundheilung („closed chest“-Modell) wurde 5-7 Tage nach Instrumentierung ein Myokardinfarkt induziert. In zwei weitergehenden Teilstudien wurde die Ischämie entweder 16 h nach vorheriger LPS-Stimulation oder aber unmittelbar nach ischämischer Präkonditionierung eingeleitet. Nach erfolgreicher Reperfusion wurden die Herzen histologisch untersucht oder die Expression inflammatorischer Mediatoren in den Organen bestimmt.

TLR4-defiziente Mäuse bildeten kleinere Infarkte als Wildtypmäuse aus und exprimierten nach I/R mehr ADM-, jedoch kam es zu einem geringeren Zytokin- (TNF, IL-1 β , IL-6) und Chemokinanstieg (MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, MCP-1 und TCA-3) in Herz und Serum als bei WT. Die Aktivierung von TLR4 ist also maßgeblich verantwortlich für das Ausmaß der myokardialen Schädigung und die Intensität der inflammatorischen Antwort. Eine LPS-Applikation verringerte die Infarktgröße bei Wildtypmäusen. Die LPS-Injektion alleine erhöhte vorübergehend die Expression von HIF1 α -Protein, ADM-, iNOS-, TNF-, IL-1 β - und IL-6-mRNA. Außerdem bewirkte LPS TLR4-abhängig eine Reduktion der inflammatorischen Antwort auf I/R in Form eines verringerten Zytokin- und Chemokinanstiegs. Unabhängig von der Ischämie wurde bei Wildtypmäusen nach LPS eine verstärkte Expression von CD14-Protein, TLR2-,

MMP-3, -8 und -9 mRNA, sowie MMP-2-Aktivität gemessen. Diese korrelierte jedoch nicht mit der Infarktgröße.

In der IPC-Studie stellte sich heraus, dass IPC die Infarktgröße von Wildtyp-, nicht jedoch TLR4-KO-Mäusen verminderte und die inflammatorische Antwort reduzierte. Dies schlug sich in einer geringeren Expression von TNF, IL-6, Chemokinen, MMPs und TIMPs nieder. Nach IPC unterschieden sich WT- und TLR4-KO-Mäuse hinsichtlich der Infarktgröße und Mediatorexpression nicht. Hinsichtlich einer Bedeutung von TLR4 für die IPC bedarf es jedoch weitergehender Untersuchungen.

Die vorgestellten Daten zeigen, dass TLR4 ein Mediator des Ischämie-Reperfusionsschadens ist. Aus einer TLR4-Defizienz resultiert eine geringere inflammatorische Antwort auf eine Ischämie und auch die TLR4-vermittelte LPS-Präkonditionierung bewirkt eine reduzierte Expression inflammatorischer Mediatoren nach dem zweiten, ischämischen Reiz. Diese verringerte Entzündungsreaktion führt in beiden Fällen zu einer verminderten Infarktgröße. Damit stellt TLR4 ein therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Myokardinfarkt und sepsis-ähnlichen Krankheitsbildern dar.

6 Tabellenanhang

| | Genotype | PBS | | LPS | | Two-way ANOVA |
|--------------|----------|----------------|------------------|------------------|------------------|---------------|
| | | Sham | I/R | Sham | I/R | |
| Lymphotactin | WT | 0,01 ± 0,01 | 0,19 ± 0,16 | 0,06 ± 0,03 | 0,02 ± 0,01 | |
| | TLR4-D | 0,01 ± 0,01 | 0,00 ± 0,00 | 0,05 ± 0,03 | 0,03 ± 0,01 | |
| RANTES | WT | 0,66 ± 0,24 | 45,95 ± 28,46 | 23,06 ± 9,56 | 43,02 ± 30,66 | |
| | TLR4-D | 1,13 ± 0,05 | 1,40 ± 1,09 | 7,45 ± 6,54 | 11,46 ± 5,04 | |
| MIP-1β | WT | 0,14 ± 0,08 | 2,85 ± 1,11 | 2,63 ± 1,92 | 3,11 ± 0,83 | |
| | TLR4-D | 0,40 ± 0,22 | 1,06 ± 0,17 | 1,28 ± 0,54 | 2,92 ± 0,59 | |
| MIP-1α | WT | 0,26 ± 0,19 | 2,19 ± 0,85 | 1,74 ± 0,92 | 2,32 ± 0,66 | I/R ↑ |
| | TLR4-D | 0,60 ± 0,38 | 1,00 ± 0,17 | 0,97 ± 0,51 | 1,76 ± 0,15 | I/R ↑ |
| MIP-2 | WT | 0,14 ± 0,09 | 11,34 ± 5,60 | 13,12 ± 11,80 | 11,15 ± 4,86 | |
| | TLR4-D | 1,08 ± 0,59 | 6,65 ± 1,76 | 5,78 ± 4,82 | 15,36 ± 2,09 | |
| IP-10 | WT | 0,01 ± 0,0 | 0,79 ± 0,54 | 0,92 ± 0,30 | 1,50 ± 1,13 | |
| | TLR4-D | 0,13 ± 0,02 | 0,03 ± 0,00 | 0,22 ± 0,21 | 0,37 ± 0,19 | |
| MCP-1 | WT | 1,23 ± 0,41 | 16,42 ± 3,80 | 16,07 ± 10,99 | 15,71 ± 5,51 | I/R ↑ |
| | TLR4-D | 2,57 ± 0,80 | 17,85 ± 4,84 | 8,76 ± 4,92 | 19,71 ± 4,74 | I/R ↑ |
| TCA-3 | WT | 0,07 ± 0,03 | 1,72 ± 0,83 | 2,14 ± 0,58 | 6,05 ± 4,88 | |
| | TLR4-D | 0,56 ± 0,36 | 0,48 ± 0,07 | 0,74 ± 0,37 | 1,21 ± 0,22 | |
| Eotaxin | WT | 1,05 ± 0,54 | 1,47 ± 0,33 | 1,04 ± 0,60 | 1,56 ± 0,30 | TLR4 ↓ |
| | TLR4-D | 2,71 ± 1,31 | 2,37 ± 0,56 | 2,38 ± 0,98 | 3,07 ± 0,38 | |

Tab. 6.1: Chemokin mRNA-Expression bei WT- und TLR4-D-Mäusen. Die Einflüsse der Parameter LPS, Okklusion und Genotyp (TLR4) wurden im 2-Wege-ANOVA getestet und in der letzten Zeile zusammengefasst. I/R ↑ verdeutlicht eine Induktion durch I/R zwischen den Gruppen in einer Zeile. TLR4 ↑ symbolisiert eine vermehrte Expression in den WT PBS Gruppen verglichen mit TLR4-D PBS. n = 4.

TABELLENANHANG

| | Genotyp | PBS | | | LPS | | Zwei-Weg-ANOVA |
|-------------|---------|---------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| | | Sham | I/3h Rep | I/24h Rep | Sham | I/R | |
| MMP1 | WT | 0,15 ± 0,03 | 0,23 ± 0,05 | 0,04 ± 0,02 ^c | 0,12 ± 0,01 | 0,34 ± 0,10 ^a | I/3h Rep ↑ I/24h Rep ↓ |
| | TLR4-D | 0,11 ± 0,03 | 0,32 ± 0,08 ^a | 0,08 ± 0,05 ^c | 0,15 ± 0,02 | 0,24 ± 0,03 | I/3h Rep ↑ I/24h Rep ↓ |
| MMP2 | WT | 27,65 ± 8,59 | 28,47 ± 5,80 | 33,87 ± 3,00 | 38,44 ± 5,78 | 34,00 ± 6,57 | |
| | TLR4-D | 34,13 ± 8,69 | 35,18 ± 9,00 | 45,30 ± 4,74 | 35,87 ± 7,51 | 33,38 ± 4,96 | |
| MMP3 | WT | 4,38 ± 0,36 | 5,92 ± 0,34 | 9,19 ± 0,82 ^b | 12,58 ± 1,75 ^d | 9,41 ± 1,04 | TLR4+↓ LPS ↑ I/24h Rep ↑ |
| | TLR4-D | 5,65 ± 0,46 | 6,92 ± 1,49 ^a | 12,27 ± 1,21 ^{b,c} | 5,82 ± 0,26 | 6,50 ± 0,57 | I/24h Rep ↑ |
| MMP8 | WT | 1,32 ± 0,25 | 1,94 ± 0,25 ^e | 3,07 ± 0,35 ^{b,e} | 3,86 ± 0,63 ^d | 3,42 ± 0,88 | TLR4+↓ LPS ↑ I/24h Rep ↑ |
| | TLR4-D | 1,49 ± 0,20 | 3,19 ± 0,31 ^a | 4,61 ± 0,47 ^{b,c} | 1,72 ± 0,29 | 2,82 ± 0,52 | I/24h Rep ↑ |
| MMP9 | WT | 2,22 ± 0,25 | 2,61 ± 0,14 | 6,08 ± 0,59 ^{b,c,e} | 4,62 ± 0,44 ^d | 5,01 ± 0,66 ^d | TLR4+↓ LPS ↑ I/24h Rep ↑ |
| | TLR4-D | 2,82 ± 0,23 | 4,57 ± 0,76 | 8,65 ± 0,85 ^{b,c} | 3,52 ± 0,35 | 3,78 ± 0,46 | LPS ↑ |
| Gesamt MMP | WT | 35,71 ± 15,46 | 39,17 ± 13,01 | 52,25 ± 4,55 | 59,62 ± 9,34 ^d | 52,17 ± 14,60 | |
| | TLR4-D | 44,20 ± 15,57 | 50,18 ± 23,76 | 70,91 ± 6,98 | 47,08 ± 18,67 | 46,71 ± 11,62 | I/3h Rep ↓ I/24h Rep ↑ |
| TIMP1 | WT | 10,49 ± 1,70 | 21,99 ± 2,69 ^a | 18,87 ± 2,24 ^b | 18,69 ± 0,67 ^d | 22,48 ± 2,25 | LPS ↑ I/3h Rep ↑ I/24h Rep ↑ |
| | TLR4-D | 9,81 ± 1,04 | 21,07 ± 2,50 ^a | 15,15 ± 1,59 ^c | 11,78 ± 0,94 | 24,68 ± 4,70 | I/3h Rep ↑ I/24h Rep ↑ |
| TIMP2 | WT | 31,33 ± 4,53 | 32,56 ± 3,56 | 25,35 ± 3,30 | 28,07 ± 3,75 | 23,81 ± 4,12 | |
| | TLR4-D | 37,62 ± 8,18 | 38,58 ± 7,06 ^a | 31,01 ± 3,35 | 34,44 ± 4,58 | 32,39 ± 4,12 | |
| TIMP3 | WT | 14,48 ± 1,62 | 20,32 ± 2,39 | 16,83 ± 1,99 | 13,48 ± 0,64 | 18,31 ± 2,81 | I/3h Rep ↑ |
| | TLR4-D | 14,24 ± 2,95 | 23,65 ± 3,93 ^a | 20,70 ± 1,39 | 15,44 ± 2,25 | 18,78 ± 1,95 | I/3h Rep ↑ |
| TIMP4 | WT | 2,06 ± 0,76 | 2,02 ± 0,37 | 3,45 ± 0,61 ^e | 4,01 ± 0,86 | 3,91 ± 1,07 | TLR4+↓ LPS ↑ |
| | TLR4-D | 2,47 ± 0,74 | 2,44 ± 0,40 | 5,72 ± 0,64 ^{b,c} | 2,08 ± 0,56 | 2,31 ± 0,39 | I/24h Rep ↑ |
| Gesamt TIMP | WT | 58,36 ± 14,15 | 76,88 ± 13,68 | 64,50 ± 3,66 | 64,26 ± 9,87 | 67,72 ± 11,82 | |
| | TLR4-D | 64,14 ± 11,82 | 85,73 ± 28,62 | 72,58 ± 3,47 | 63,73 ± 15,90 | 78,16 ± 22,26 | |

Tab. 6.2: mRNA Expression von MMPs und TIMPs. Die Einflüsse der Parameter LPS, Ischämie gefolgt von 3 h und 24 h Reperfusion und Genotyp (WT, TLR4-D) wurden im 2-Wege-ANOVA getestet und in der letzten Zeile zusammengefasst. I/3h Rep ↑ ↓ verdeutlicht eine Induktion bzw. Reduktion durch I/R (3h) im Vergleich zu SOP. Ebenso wird 24 h Rep ↑ ↓ verwendet. LPS ↑ ↓ gibt eine Induktion durch LPS im Vergleich zur jeweiligen PBS-Gruppe wieder. TLR4 ↓ verdeutlicht eine Reduktion in der WT PBS Gruppe im Vergleich zu TLR4-D PBS. P-Werte des Einzelgruppenvergleichs wurden mit einem Bonferroni-Posthoc-Test berechnet. a: (p < 0,05) I/3h Rep vs SOP; b: I/24h Rep. vs SOP, c: I/24h Rep vs I/3h Rep, d: PBS vs. LPS; e: WT vs. TLR4-D. Mittelwerte ± SEM; n=5; außer PBS SOP-Gruppen und WT 24h Rep: n=3).

TABELLENANHANG

| | Genotyp | PBS | | | LPS | | Zwei-Weg-ANOVA |
|------------------|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------------------|
| | | Sham | I/3h Rep | I/24h Rep | Sham | I/R | |
| MMP2 / TIMP1 | WT | 2,54 ± 0,41 | 1,36 ± 0,28 | 1,88 ± 0,34 | 2,06 ± 0,31 | 1,69 ± 0,50 | I/R ↓ TLR4 ↓ |
| | TLR4-D | 3,38 ± 0,48 | 1,63 ± 0,31 | 3,15 ± 0,43 | 2,99 ± 0,45 | 1,52 ± 0,30 | I/3h Rep ↓ |
| MMP2 / TIMP2 | WT | 0,85 ± 0,14 | 0,84 ± 0,08 | 1,34 ± 0,07 | 1,36 ± 0,09 | 1,42 ± 0,07 | LPS ↑ I/24h Rep ↑ |
| | TLR4-D | 0,90 ± 0,06 | 0,88 ± 0,12 | 1,48 ± 0,13 | 1,01 ± 0,09 | 1,05 ± 0,15 | I/24h Rep ↑ |
| MMP3 / TIMP1 | WT | 0,43 ± 0,05 | 0,28 ± 0,03 | 0,51 ± 0,09 | 0,68 ± 0,09 | 0,43 ± 0,05 | I/3h Rep ↓ TLR4 ↓ LPS ↑ |
| | TLR4-D | 0,59 ± 0,08 | 0,33 ± 0,06 | 0,86 ± 0,12 | 0,50 ± 0,04 | 0,31 ± 0,07 | I/3h Rep ↓ I/24h Rep ↑ |
| MMP9 / TIMP1 | WT | 0,22 ± 0,03 | 0,13 ± 0,02 | 0,34 ± 0,10 | 0,25 ± 0,03 | 0,23 ± 0,04 | TLR4+ ↓ I/3h Rep ↓ I/24h Rep ↑ |
| | TLR4-D | 0,29 ± 0,02 | 0,22 ± 0,03 | 0,60 ± 0,08 | 0,30 ± 0,01 | 0,17 ± 0,02 | I/3h Rep ↓ I/24h Rep ↑ |
| MMP9 / TIMP3 | WT | 0,15 ± 0,01 | 0,13 ± 0,02 | 0,36 ± 0,02 | 0,35 ± 0,04 | 0,29 ± 0,05 | TLR4+ ↓ LPS ↑ I/24h Rep ↑ |
| | TLR4-D | 0,21 ± 0,04 | 0,20 ± 0,01 | 0,42 ± 0,03 | 0,24 ± 0,03 | 0,20 ± 0,02 | I/24h Rep ↑ |
| Total MMP / TIMP | WT | 0,60 ± 0,07 | 0,50 ± 0,05 | 0,81 ± 0,03 | 0,93 ± 0,05 | 0,76 ± 0,06 | TLR4+ ↓ I/3h Rep ↓ LPS ↑ I/24h Rep ↑ |
| | TLR4-D | 0,69 ± 0,01 | 0,57 ± 0,04 | 0,97 ± 0,07 | 0,72 ± 0,05 | 0,61 ± 0,04 | I/3h Rep ↓ I/24h Rep ↑ |

Tab. 6.3: MMP-TIMP-Quotienten bei WT- und TLR4-D-Mäusen. Die Einflüsse der Parameter LPS, Okklusion und Genotyp (TLR4) wurden im 2-Wege-ANOVA getestet und in der letzten Zeile zusammengefasst. I/R ↑ ↓ verdeutlicht eine Induktion bzw. Reduktion durch I/R zwischen zwei vergleichbaren Gruppen in einer Zeile. LPS ↑ ↓ wird in einer ähnlichen Weise verwendet. TLR4 ↓ verdeutlicht eine Reduktion in der WT PBS Gruppe im Vergleich zu TLR4-D PBS. P-Werte der einzelnen Gruppen untereinander wurden mit einem Bonferroni-Posthoc-Test berechnet. a: (p < 0,05) I/3h Rep vs SOP; b: I/24h Rep. vs SOP, c: I/24h Rep vs I/3h Rep, d: PBS vs. LPS; e: WT vs. TLR4-D. Mittelwerte ± SEM; n=5; außer PBS SOP-Gruppen und WT 24h Rep: n=3).

TABELLENANHANG

| | Genotyp | SOP | IPC + I/R | I/R |
|---------|---------|--------------------|----------------|-----------------|
| RANTES | WT | 0,45 ± 0,07 | 0,77 ± 0,14 | 1,19 ± 0,10 |
| | TLR4-KO | 0,27 ± b 0,10 | 0,91 ± 0,17 | 1,57 ± 0,40 |
| MIP-1α | WT | 0,25 ± a,b 0,08 | 1,43 ± 0,44 | 1,22 ± 0,26 |
| | TLR4-KO | 0,14 ± a,b 0,06 | 1,28 ± 0,21 | 1,03 ± 0,18 |
| MIP-1β | WT | 0,08 ± 0,03 | 1,46 ± 0,52 | 1,11 ± 0,45 |
| | TLR4-KO | 0,03 ± a 0,02 | 2,27 ± 0,68 | 1,02 ± 0,33 |
| MIP-2 | WT | 0,03 ± a,b 0,01 | 6,05 ± 2,53 | 5,20 ± 1,74 |
| | TLR4-KO | 0,02 ± 0,00 | 4,21 ± 1,08 | 4,22 ± 0,28 |
| MCP-1 | WT | 0,02 ± b 0,01 | 8,26 ± 2,03 | 11,33 ± 3,24 |
| | TLR4-KO | 0,06 ± 0,03 | 6,04 ± 3,03 | 5,79 ± 1,50 |
| TCA-3 | WT | 0,59 ± 0,02 | 0,38 ± 0,11 | 0,50 ± 0,16 |
| | TLR4-KO | 0,50 ± 0,16 | 0,45 ± 0,21 | 0,82 ± 0,33 |
| Eotaxin | WT | 0,04 ± 0,02 | 0,83 ± 0,33 | 0,54 ± 0,07 |
| | TLR4-KO | 0,01 ± a,b 0,00 | 1,11 ± 0,38 | 0,89 ± 0,13 |

Tab. 6.4 Chemokin-mRNA-Expression bei WT- und TLR4-KO-Mäusen. Die Einflüsse der Parameter IPC und I/R wurden mittels 2-Wege-ANOVA getestet. P-Werte der einzelnen Gruppen untereinander wurden mit einem Bonferroni-Posthoc-Test berechnet. Mittelwerte ± SEM. a: ($p < 0,05$) IPC vs SOP, b: I/R vs SOP. (WT SOP, WT IPC, TLR4-KO SOP je $n = 4$, TLR4-KO I/R $n = 5$, WT I/R, TLR4-KO IPC $n = 6$).

TABELLENANHANG

| | Genotype | SOP | IPC + I/R | I/R |
|-------------|----------|------------|-----------|----------|
| MMP-1 | WT | 0,003 ± b | 0,07 ± | 0,11 ± |
| | | 0,003 | 0,03 | 0,04 |
| MMP-1 | TLR4-KO | 0,01 ± | 0,05 ± | 0,05 ± |
| | | 0,00 | 0,02 | 0,02 |
| MMP-2 | WT | 3,48 ± a,b | 13,95 ± | 13,67 ± |
| | | 0,26 | 3,05 | 1,74 |
| MMP-2 | TLR4-KO | 3,64 ± a,b | 15,86 ± | 16,04 ± |
| | | 0,31 | 3,75 | 2,33 |
| MMP-3 | WT | 0,06 ± | 0,55 ± | 0,54 ± |
| | | 0,02 | 0,35 | 2,71 |
| MMP-3 | TLR4-KO | 0,05 ± | 0,36 ± | 0,38 ± |
| | | 0,02 | 0,20 | 0,22 |
| MMP-8 | WT | 0,14 ± a | 0,83 ± | 0,66 ± |
| | | 0,04 | 0,16 | 0,11 |
| MMP-8 | TLR4-KO | 0,19 ± a | 1,00 ± | 0,43 ± c |
| | | 0,02 | 0,30 | 0,08 |
| MMP-9 | WT | 0,17 ± a,b | 0,80 ± | 1,05 ± |
| | | 0,05 | 0,11 | 0,19 |
| MMP-9 | TLR4-KO | 0,22 ± a | 0,90 ± | 0,71 ± |
| | | 0,03 | 0,28 | 0,17 |
| Gesamt MMP | WT | 3,85 ± a,b | 16,21 ± | 16,02 ± |
| | | 0,32 | 3,19 | 2,08 |
| Gesamt MMP | TLR4-KO | 4,12 ± a,b | 18,17 ± | 17,61 ± |
| | | 0,38 | 4,07 | 2,62 |
| TIMP-1 | WT | 0,99 ± | 9,45 ± | 13,21 ± |
| | | 0,05 | 3,63 | 4,74 |
| TIMP-1 | TLR4-KO | 1,21 ± | 11,34 ± | 8,85 ± |
| | | 0,11 | 4,70 | 2,10 |
| TIMP-2 | WT | 13,46 ± | 11,28 ± | 8,84 ± |
| | | 0,31 | 3,76 | 2,23 |
| TIMP-2 | TLR4-KO | 15,25 ± | 9,39 ± | 11,68 ± |
| | | 0,95 | 1,92 | 3,48 |
| TIMP-3 | WT | 7,49 ± | 26,40 ± | 31,04 ± |
| | | 1,29 | 5,35 | 7,15 |
| TIMP-3 | TLR4-KO | 9,53 ± | 26,72 ± | 30,83 ± |
| | | 0,52 | 8305 | 10,94 |
| TIMP-4 | WT | 5,36 b | 11,97 | 15,58 |
| | | 0,59 | 2,03 | 3,22 |
| TIMP-4 | TLR4-KO | 6,29 | 8,12 | 9,78 |
| | | 0,47 | 1,71 | 1,79 |
| Gesamt TIMP | WT | 27,30 a,b | 59,09 | 68,67 |
| | | 1,34 | 3,81 | 7,31 |
| Gesamt TIMP | TLR4-KO | 32,27 b | 55,57 | 61,13 |
| | | 1,29 | 9,60 | 8,21 |

Tab. 6.5: MMP- und TIMP-mRNA-Expression bei WT- und TLR4-KO-Mäusen. Die Einflüsse der Parameter IPC und I/R wurden mittels 2-Wege-ANOVA getestet. P-Werte der einzelnen Gruppen untereinander wurden mit einem Bonferroni-Posthoc-Test berechnet. Mittelwerte ± SEM. a: (p < 0,05) IPC vs SOP, b: I/R vs SOP, c: IPC vs I/R. (WT SOP, TLR4-KO SOP je n = 4, WT IPC, TLR4-KO I/R n = 5, WT I/R, TLR4-KO IPC n = 6).

7 Literaturverzeichnis

- Akira S, Hoshino K, Kaisho T. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *J Endotoxin Res* 2000; (6): 383-387.
- Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R, Flavell R A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; (413): 732-738.
- Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 1998; (93 Suppl 3): 8-12.
- Armstrong L, Medford A R, Hunter K J, Uppington K M, Millar A B. Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. *Clin Exp Immunol* 2004; (136): 312-319.
- Bajaj G, Sharma R K. TNF-alpha-mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; (345): 1558-1564.
- Baldassare J J, Bi Y, Bellone C J. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 beta transcription. *J Immunol* 1999; (162): 5367-5373.
- Barbee R W, Perry B D, Re R N, Murgo J P. Microsphere and dilution techniques for the determination of blood flows and volumes in conscious mice. *Am J Physiol* 1992; (263): R728-R733.
- Bashey R I, Martinez-Hernandez A, Jimenez S A. Isolation, characterization, and localization of cardiac collagen type VI. Associations with other extracellular matrix components. *Circ Res* 1992; (70): 1006-1017.
- Baumgarten G, Kim S C, Stapel H, Vervolgyi V, Bittig A, Hoeft A, Meyer R, Grohe C, Knuefermann P. Myocardial injury modulates the innate immune system and changes myocardial sensitivity. *Basic Res Cardiol* 2006a; (101): 427-435.
- Baumgarten G, Knuefermann P, Kalra D, Gao F, Taffet G E, Michael L, Blackshear P J, Carballo E, Sivasubramanian N, Mann D L. Load-dependent and -independent regulation of proinflammatory cytokine and cytokine receptor gene expression in the adult mammalian heart. *Circulation* 2002; (105): 2192-2197.
- Baumgarten G, Knuefermann P, Mann D L. Cytokines as emerging targets in the treatment of heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2000; (10): 216-223.
- Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N, Sivasubramanian N, Mann D L, Vallejo J G. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. *J Infect Dis* 2001; (183): 1617-1624.
- Baumgarten G, Knuefermann P, Schuhmacher G, Vervolgyi V, von R J, Dreiner U, Fink K, Djoufack C, Hoeft A, Grohe C, Knowlton A A, Meyer R. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 2006b; (25): 43-49.

- Baumgarten G, Knuefermann P, Wrigge H, Putensen C, Stapel H, Fink K, Meyer R, Hoeft A, Grohe C. Role of Toll-like receptor 4 for the pathogenesis of acute lung injury in Gram-negative sepsis. *Eur J Anaesthesiol* 2006c;1-8.
- Behrends M, Schulz R, Post H, Alexandrov A, Belosjorow S, Michel M C, Heusch G. Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol* 2000; (279): H1111-H1119.
- Bell D, Zhao Y Y, Kelso E J, McHenry E M, Rush L M, Lamont V M, Nicholls D P, McDermott B J. Upregulation of adrenomedullin and its receptor components during cardiomyocyte hypertrophy induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Am J Physiol* 2006; (290): H904-H914.
- Belloni A S, Guidolin D, Ceretta S, Bova S, Nussdorfer G G. Acute effect of ischemia on adrenomedullin immunoreactivity in the rat heart: an immunocytochemical study. *Int J Mol Med* 2004; (14): 71-73.
- Belosjorow S, Bolle I, Duschin A, Heusch G, Schulz R. TNF-alpha antibodies are as effective as ischemic preconditioning in reducing infarct size in rabbits. *Am J Physiol* 2003; (284): H927-H930.
- Belosjorow S, Schulz R, Dorge H, Schade F U, Heusch G. Endotoxin and ischemic preconditioning: TNF-alpha concentration and myocardial infarct development in rabbits. *Am J Physiol* 1999; (277): H2470-H2475.
- Beltowski J, Jamroz A. Adrenomedullin--what do we know 10 years since its discovery? *Pol J Pharmacol* 2004; (56): 5-27.
- Bialik S, Geenen D L, Sasson I E, Cheng R, Horner J W, Evans S M, Lord E M, Koch C J, Kitsis R N. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* 1997; (100): 1363-1372.
- Bierhaus A, Humpert P M, Stern D M, Arnold B, Nawroth P P. Advanced glycation end product receptor-mediated cellular dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 2005; (1043): 676-680.
- Biragyn A, Ruffini P A, Leifer C A, Klyushnenkova E, Shakhov A, Chertov O, Shirakawa A K, Farber J M, Segal D M, Oppenheim J J, Kwak L W. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 2002; (298): 1025-1029.
- Birdsall H H, Green D M, Trial J, Youker K A, Burns A R, MacKay C R, LaRosa G J, Hawkins H K, Smith C W, Michael L H, Entman M L, Rossen R D. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation* 1997; (95): 684-692.
- Black R A. TIMP3 checks inflammation. *Nat Genet* 2004; (36): 934-935.

- Blackwell T S, Christman J W. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996; (77): 110-117.
- Blouin C C, Page E L, Soucy G M, Richard D E. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood* 2004; (103): 1124-1130.
- Böcker W, Denk H, Heitz U. *Pathologie*. Elsevier - Urban & Fischer, München, 2004.
- Bolli R, Dawn B, Tang X L, Qiu Y, Ping P, Xuan Y T, Jones W K, Takano H, Guo Y, Zhang J. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol* 1998; (93): 325-338.
- Bowling W M, Hafenrichter D G, Flye M W, Callery M P. Endotoxin tolerance alters phospholipase C-gamma 1 and phosphatidylinositol-3'-kinase expression in peritoneal macrophages. *J Surg Res* 1995; (58): 592-598.
- Bracken C P, Whitelaw M L, Peet D J. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci* 2003; (60): 1376-1393.
- Bradham W S, Moe G, Wendt K A, Scott A A, König A, Romanova M, Naik G, Spinale F G. TNF-alpha and myocardial matrix metalloproteinases in heart failure: relationship to LV remodeling. *Am J Physiol* 2002; (282): H1288-H1295.
- Brown J M, Grosso M A, Terada L S, Whitman G J, Banerjee A, White C W, Harken A H, Repine J E. Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; (86): 2516-2520.
- Bueno O F, De Windt L J, Tymitz K M, Witt S A, Kimball T R, Klevitsky R, Hewett T E, Jones S P, Lefer D J, Peng C F, Kitsis R N, Molkenkin J D. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 2000; (19): 6341-6350.
- Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer J L, Di M F, French L, Tschopp J. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 1998; (273): 12203-12209.
- Cai Z, Manalo D J, Wei G, Rodriguez E R, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier J L, Semenza G L. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003; (108): 79-85.
- Cario E, Rosenberg I M, Brandwein S L, Beck P L, Reinecker H C, Podolsky D K. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000; (164): 966-972.
- Cason B A, Gamperl A K, Slocum R E, Hickey R F. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* 1997; (87): 1182-1190.

- Cason B A, Gordon H J, Avery E G, Hickey R F. The role of ATP sensitive potassium channels in myocardial protection. *J Card Surg* 1995; (10): 441-444.
- Chandrasekar B, Smith J B, Freeman G L. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-kappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation* 2001; (103): 2296-2302.
- Chao J, Chao L. The Role of Adrenomedullin in Cardiovascular and Renal Function. *Drug News Perspect* 2002; (15): 511-518.
- Chao W, Shen Y, Zhu X, Zhao H, Novikov M, Schmidt U, Rosenzweig A. Lipopolysaccharide improves cardiomyocyte survival and function after serum deprivation. *J Biol Chem* 2005; (280): 21997-22005.
- Chen Q M, Tu V C. Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications. *Am J Cardiovasc Drugs* 2002; (2): 43-57.
- Cheng S S, Lukacs N W, Kunkel S L. Eotaxin/CCL11 is a negative regulator of neutrophil recruitment in a murine model of endotoxemia. *Exp Mol Pathol* 2002; (73): 1-8.
- Cheung P Y, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski M W, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation* 2000; (101): 1833-1839.
- Chong A J, Shimamoto A, Hampton C R, Takayama H, Spring D J, Rothnie C L, Yada M, Pohlman T H, Verrier E D. Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; (128): 170-179.
- Cleutjens J P, Kandala J C, Guarda E, Guntaka R V, Weber K T. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1995; (27): 1281-1292.
- Coetzee A, Skein W, Genade S, Lochner A. Enflurane and isoflurane reduce reperfusion dysfunction in the isolated rat heart. *Anesth Analg* 1993; (76): 602-608.
- Cohen-Sfady M, Nussbaum G, Pevsner-Fischer M, Mor F, Carmi P, Zanin-Zhorov A, Lider O, Cohen I R. Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *J Immunol* 2005; (175): 3594-3602.
- Coker M L, Jolly J R, Joffs C, Etoh T, Holder J R, Bond B R, Spinale F G. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol* 2001; (281): H543-H551.
- Comstock K L, Krown K A, Page M T, Martin D, Ho P, Pedraza M, Castro E N, Nakajima N, Glembotski C C, Quintana P J, Sabbadini R A. LPS-induced TNF-alpha release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J Mol Cell Cardiol* 1998; (30): 2761-2775.

- Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs A J. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol* 2001; (166): 3873-3881.
- Cope D K, Impastato W K, Cohen M V, Downey J M. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 1997; (86): 699-709.
- Cowan D B, Poutias D N, del Nido P J, McGowan F X, Jr. CD14-independent activation of cardiomyocyte signal transduction by bacterial endotoxin. *Am J Physiol* 2000; (279): H619-H629.
- Creemers E E, Cleutjens J P, Smits J F, Daemen M J. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res* 2001; (89): 201-210.
- Dalpke A H, Lehner M D, Hartung T, Heeg K. Differential effects of CpG-DNA in Toll-like receptor-2/-4/-9 tolerance and cross-tolerance. *Immunology* 2005; (116): 203-212.
- Date T, Mochizuki S, Belanger A J, Yamakawa M, Luo Z, Vincent K A, Cheng S H, Gregory R J, Jiang C. Expression of constitutively stable hybrid hypoxia-inducible factor-1alpha protects cultured rat cardiomyocytes against simulated ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 2005; (288): C314-C320.
- Dawn B, Bolli R. Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 2002; (962): 18-41.
- Deschamps A M, Spinale F G. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res* 2006; (69): 666-676.
- Dibbs Z, Kurrelmeyer K, Kalra D, Seta Y, Wang F, Bozkurt B, Baumgarten G, Sivasubramanian N, Mann D L. Cytokines in heart failure: pathogenetic mechanisms and potential treatment. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; (111): 423-428.
- Ding A, Hwang S, Lander H M, Xie Q W. Macrophages derived from C3H/HeJ (Lpsd) mice respond to bacterial lipopolysaccharide by activating NF-kappa B. *J Leukoc Biol* 1995; (57): 174-179.
- Dobrovolskaia M A, Medvedev A E, Thomas K E, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, Cody M J, Michalek S M, Rice N R, Vogel S N. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol* 2003; (170): 508-519.
- Doevendans P A, Daemen M J, de Muinck E D, Smits J F. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 1998; (39): 34-49.

- Ebel D, Schlack W, Comfere T, Preckel B, Thamer V. Effect of propofol on reperfusion injury after regional ischaemia in the isolated rat heart. *Br J Anaesth* 1999; (83): 903-908.
- Eddy L J, Goeddel D V, Wong G H. Tumor necrosis factor-alpha pretreatment is protective in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; (184): 1056-1059.
- Eto T, Kato J, Kitamura K. Regulation of production and secretion of adrenomedullin in the cardiovascular system. *Regul Pept* 2003; (112): 61-69.
- Fan H, Cook J A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* 2004; (10): 71-84.
- Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol* 2001; (166): 2018-2024.
- Fedak P W, Altamentova S M, Weisel R D, Nili N, Ohno N, Verma S, Lee T Y, Kiani C, Mickle D A, Strauss B H, Li R K. Matrix remodeling in experimental and human heart failure: a possible regulatory role for TIMP-3. *Am J Physiol* 2003; (284): H626-H634.
- Fedak P W, Smookler D S, Kassiri Z, Ohno N, Leco K J, Verma S, Mickle D A, Watson K L, Hojilla C V, Cruz W, Weisel R D, Li R K, Khokha R. TIMP-3 Deficiency Leads to Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 2004.
- Feng Q, Lu X, Jones D L, Shen J, Arnold J M. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2001; (104): 700-704.
- Ferrero E, Jiao D, Tsuberi B Z, Tesio L, Rong G W, Haziot A, Goyert S M. Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; (90): 2380-2384.
- Fisher S G, Marber M S. An in vivo model of ischaemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the mouse heart. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2002; (48): 161-169.
- Frangogiannis N G. Chemokines in the ischemic myocardium: from inflammation to fibrosis. *Inflamm Res* 2004; (53): 585-595.
- Frangogiannis N G, Entman M L. Chemokines in myocardial ischemia. *Trends Cardiovasc Med* 2005; (15): 163-169.
- Frangogiannis N G, Mendoza L H, Lewallen M, Michael L H, Smith C W, Entman M L. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *FASEB J* 2001; (15): 1428-1430.

- Frangogiannis N G, Smith C W, Entman M L. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; (53): 31-47.
- Frantz S, Kelly R A, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2001; (276): 5197-5203.
- Frantz S, Kobzik L, Kim Y D, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee R T, Kelly R A. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* 1999; (104): 271-280.
- Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* 2006; (396): 517-527.
- Fryer R M, Pratt P F, Hsu A K, Gross G J. Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; (296): 642-649.
- Geppert T D, Whitehurst C E, Thompson P, Beutler B. Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the ras/raf-1/MEK/MAPK pathway. *Mol Med* 1994; (1): 93-103.
- Gharaee-Kermani M, Denholm E M, Phan S H. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996; (271): 17779-17784.
- Ghosh S, Ng L L, Talwar S, Squire I B, Galinanes M. Cardiotrophin-1 protects the human myocardium from ischemic injury. Comparison with the first and second window of protection by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2000; (48): 440-447.
- Gibbs L S, Del Vecchio P J, Shaffer J B. Mn and Cu/Zn SOD expression in cells from LPS-sensitive and LPS-resistant mice. *Free Radic Biol Med* 1992; (12): 107-111.
- Goldbourt U, Neufeld H N. Genetic aspects of arteriosclerosis. *Arteriosclerosis* 1986; (6): 357-377.
- Gottlieb R A, Burleson K O, Kloner R A, Babior B M, Engler R L. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; (94): 1621-1628.
- Grell M, Wajant H, Zimmermann G, Scheurich P. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; (95): 570-575.
- Guerra M S, Roncon-Albuquerque R, Jr., Lourenco A P, Falcao-Pires I, Cibrao-Coutinho P, Leite-Moreira A F. Remote myocardium gene expression after 30 and 120 min of ischaemia in the rat. *Exp Physiol* 2006; (91): 473-480.

- Guillot L, Balloy V, McCormack F X, Golenbock D T, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2002; (168): 5989-5992.
- Guo Y, Wu W J, Qiu Y, Tang X L, Yang Z, Bolli R. Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol* 1998; (275): H1375-H1387.
- Gwechenberger M, Mendoza L H, Youker K A, Frangogiannis N G, Smith C W, Michael L H, Entman M L. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* 1999; (99): 546-551.
- Ha T, Li Y, Hua F, Ma J, Gao X, Kelley J, Zhao A, Haddad G E, Williams D L, William B, I, Kao R L, Li C. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. *Cardiovasc Res* 2005; (68): 224-234.
- Hampton C R, Shimamoto A, Rothnie C L, Griscavage-Ennis J, Chong A, Dix D J, Verrier E D, Pohlman T H. HSP70.1 and -70.3 are required for late-phase protection induced by ischemic preconditioning of mouse hearts. *Am J Physiol* 2003; (285): H866-H874.
- Hayashi F, Smith K D, Ozinsky A, Hawn T R, Yi E C, Goodlett D R, Eng J K, Akira S, Underhill D M, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; (410): 1099-1103.
- Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, Shiomi T, Matsusaka H, Kubota T, Imanaka-Yoshida K, Itoh T, Takeshita A. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol* 2003a; (285): H1229-H1235.
- Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Ikeuchi M, Matsusaka H, Suematsu N, Wen J, Egashira K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2003b; (108): 2134-2140.
- 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.
- Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; (94): 1561-1567.
- Hellwig-Burgel T, Stiehl D P, Wagner A E, Metzen E, Jelkmann W. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res* 2005; (25): 297-310.
- 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.

- Hiasa G, Hamada M, Ikeda S, Hiwada K. Ischemic preconditioning and lipopolysaccharide attenuate nuclear factor-kappaB activation and gene expression of inflammatory cytokines in the ischemia-reperfused rat heart. *Jpn Circ J* 2001; (65): 984-990.
- Hirata Y, Mitaka C, Sato K, Nagura T, Tsunoda Y, Amaha K, Marumo F. Increased circulating adrenomedullin, a novel vasodilatory peptide, in sepsis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; (81): 1449-1453.
- Hollestelle S C, De Vries M R, Van Keulen J K, Schoneveld A H, Vink A, Strijder C F, Van Middelaar B J, Pasterkamp G, Quax P H, de Kleijn D P. Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling. *Circulation* 2004; (109): 393-398.
- Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, Nagaya N, Matsuo H, Takishita S, Kangawa K. Production and secretion of adrenomedullin in cultured rat cardiac myocytes and nonmyocytes: stimulation by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 1998; (139): 4576-4580.
- Horng T, Barton G M, Flavell R A, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002; (420): 329-333.
- Horng T, Barton G M, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; (2): 835-841.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999; (162): 3749-3752.
- Hotchkiss R S, Schmiegel R E, Jr., Swanson P E, Freeman B D, Tinsley K W, Cobb J P, Karl I E, Buchman T G. Rapid onset of intestinal epithelial and lymphocyte apoptotic cell death in patients with trauma and shock. *Crit Care Med* 2000; (28): 3207-3217.
- Hotchkiss R S, Swanson P E, Cobb J P, Jacobson A, Buchman T G, Karl I E. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 1997; (25): 1298-1307.
- Hultmark D. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; (199): 144-146.
- Inohara N, Koseki T, del P L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 1999; (274): 14560-14567.
- Ismaeil M S, Tkachenko I, Gamperl A K, Hickey R F, Cason B A. Mechanisms of isoflurane-induced myocardial preconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 1999; (90): 812-821.

- Izuishi K, Tsung A, Jeyabalan G, Critchlow N D, Li J, Tracey K J, Demarco R A, Lotze M T, Fink M P, Geller D A, Billiar T R. Cutting Edge: High-Mobility Group Box 1 preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* 2006; (176): 7154-7158.
- Jacinto R, Hartung T, McCall C, Li L. Lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced tolerance and cross-tolerance: distinct alterations in IL-1 receptor-associated kinase. *J Immunol* 2002; (168): 6136-6141.
- Jin F, Nathan C F, Ding A. Paradoxical preservation of a lipopolysaccharide response in C3H/HeJ macrophages: induction of matrix metalloproteinase-9. *J Immunol* 1999; (162): 3596-3600.
- Jin F Y, Nathan C, Radzioch D, Ding A. Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* 1997; (88): 417-426.
- Jordan J E, Zhao Z Q, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1999; (43): 860-878.
- Jurgensen J S, Rosenberger C, Wiesener M S, Warnecke C, Horstrup J H, Grafe M, Philipp S, Griethe W, Maxwell P H, Frei U, Bachmann S, Willenbrock R, Eckardt K U. Persistent induction of HIF-1 α and -2 α in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium. *FASEB J* 2004; (18): 1415-1417.
- Kaden J J, Dempfle C E, Sueselbeck T, Brueckmann M, Poerner T C, Haghi D, Haase K K, Borggreffe M. Time-dependent changes in the plasma concentration of matrix metalloproteinase 9 after acute myocardial infarction. *Cardiology* 2003; (99): 140-144.
- Kadokami T, McTiernan C F, Kubota T, Frye C S, Bounoutas G S, Robbins P D, Watkins S C, Feldman A M. Effects of soluble TNF receptor treatment on lipopolysaccharide-induced myocardial cytokine expression. *Am J Physiol* 2001; (280): H2281-H2291.
- Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark W A, Sonnenblick E H, Krajewski S, Reed J C, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; (74): 86-107.
- Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 2004a; (279): 12542-12550.
- Kariko K, Weissman D, Welsh F A. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling--a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004b; (24): 1288-1304.
- Kato R, Foex P. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can J Anaesth* 2002; (49): 777-791.

- Kersten J R, Schmeling T J, Pagel P S, Gross G J, Warltier D C. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 1997; (87): 361-370.
- Kido M, Du L, Sullivan C C, Li X, Deutsch R, Jamieson S W, Thistlethwaite P A. Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse. *J Am Coll Cardiol* 2005; (46): 2116-2124.
- Kim B S, Lim S W, Li C, Kim J S, Sun B K, Ahn K O, Han S W, Kim J, Yang C W. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation* 2005; (79): 1370-1377.
- Kis A, Yellon D M, Baxter G F. Role of nuclear factor-kappa B activation in acute ischaemia-reperfusion injury in myocardium. *Br J Pharmacol* 2003; (138): 894-900.
- Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert S M, Carabello B A, Mann D L, Vallejo J G. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2002; (106): 2608-2615.
- Ko S H, Yu C W, Lee S K, Choe H, Chung M J, Kwak Y G, Chae S W, Song H S. Propofol attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Anesth Analg* 1997; (85): 719-724.
- Kokita N, Hara A, Abiko Y, Arakawa J, Hashizume H, Namiki A. Propofol improves functional and metabolic recovery in ischemic reperfused isolated rat hearts. *Anesth Analg* 1998; (86): 252-258.
- Kraatz J, Clair L, Rodriguez J L, West M A. In vitro macrophage endotoxin tolerance: defective in vitro macrophage map kinase signal transduction after LPS pretreatment is not present in macrophages from C3H/HeJ endotoxin resistant mice. *Shock* 1999a; (11): 58-63.
- Kraatz J, Clair L, Rodriguez J L, West M A. Macrophage TNF secretion in endotoxin tolerance: role of SAPK, p38, and MAPK. *J Surg Res* 1999b; (83): 158-164.
- Kubota T, Miyagishima M, Frye C S, Alber S M, Bounoutas G S, Kadokami T, Watkins S C, McTiernan C F, Feldman A M. Overexpression of tumor necrosis factor- alpha activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001; (33): 1331-1344.
- Kukielka G L, Smith C W, LaRosa G J, Manning A M, Mendoza L H, Daly T J, Hughes B J, Youker K A, Hawkins H K, Michael L H, . Interleukin-8 gene induction in the myocardium after ischemia and reperfusion in vivo. *J Clin Invest* 1995; (95): 89-103.
- Kumar A G, Ballantyne C M, Michael L H, Kukielka G L, Youker K A, Lindsey M L, Hawkins H K, Birdsall H H, MacKay C R, LaRosa G J, Rossen R D, Smith C W,

- Entman M L. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in the small veins of the ischemic and reperfused canine myocardium. *Circulation* 1997; (95): 693-700.
- Kurrelmeyer K M, Michael L H, Baumgarten G, Taffet G E, Peschon J J, Sivasubramanian N, Entman M L, Mann D L. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; (97): 5456-5461.
- Lalu M M, Csont T, Schulz R. Matrix metalloproteinase activities are altered in the heart and plasma during endotoxemia. *Crit Care Med* 2004; (32): 1332-1337.
- Lancaster G I, Khan Q, Drysdale P, Wallace F, Jeukendrup A E, Drayson M T, Gleeson M. The physiological regulation of toll-like receptor expression and function in humans. *J Physiol* 2005; (563): 945-955.
- Lanchou J, Corbel M, Tanguy M, Germain N, Boichot E, Theret N, Clement B, Lagente V, Malledant Y. Imbalance between matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med* 2003; (31): 536-542.
- Lee C C, Lin N T, Hsu Y H, Chen H I. Inducible nitric oxide synthase inhibition potentiates multiple organ dysfunction induced by endotoxin in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; (45): 396-403.
- Lee J W, Bae S H, Jeong J W, Kim S H, Kim K W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004; (36): 1-12.
- Lefer D J, Nakanishi K, Johnston W E, Vinten-Johansen J. Antineutrophil and myocardial protecting actions of a novel nitric oxide donor after acute myocardial ischemia and reperfusion of dogs. *Circulation* 1993; (88): 2337-2350.
- Lehner M D, Morath S, Michelsen K S, Schumann R R, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001; (166): 5161-5167.
- Li C, Jackson R M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol* 2002; (282): C227-C241.
- Li H L, Suzuki J, Bayna E, Zhang F M, Dalle M E, Clark A, Engler R L, Lew W Y. Lipopolysaccharide induces apoptosis in adult rat ventricular myocytes via cardiac AT(1) receptors. *Am J Physiol* 2002a; (283): H461-H467.
- Li Y Y, Kadokami T, Wang P, McTiernan C F, Feldman A M. MMP inhibition modulates TNF-alpha transgenic mouse phenotype early in the development of heart failure. *Am J Physiol* 2002b; (282): H983-H989.
- Lien E, Means T K, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton M J, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg R W, Ingalls R R, Golenbock D T. Toll-

- like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000; (105): 497-504.
- Lindsey M, Wedin K, Brown M D, Keller C, Evans A J, Smolen J, Burns A R, Rossen R D, Michael L, Entman M. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 2001; (103): 2181-2187.
- Lindsey M L. MMP induction and inhibition in myocardial infarction. *Heart Fail Rev* 2004; (9): 7-19.
- Lindsey M L, Mann D L, Entman M L, Spinale F G. Extracellular matrix remodeling following myocardial injury. *Ann Med* 2003; (35): 316-326.
- Lipton B P, Delcarpio J B, McDonough K H. Effects of endotoxin on neutrophil-mediated ischemia/reperfusion injury in the rat heart in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; (226): 320-327.
- Liu X, Wu X, Cai L, Tang C, Su J. Hypoxic preconditioning of cardiomyocytes and cardioprotection: phosphorylation of HIF-1 α induced by p42/p44 mitogen-activated protein kinases is involved. *Pathophysiology* 2003; (9): 201-205.
- Liu Y E, Wang M, Greene J, Su J, Ullrich S, Li H, Sheng S, Alexander P, Sang Q A, Shi Y E. Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *J Biol Chem* 1997; (272): 20479-20483.
- MacLellan W R, Schneider M D. Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1997; (81): 137-144.
- Makhlouf M, Zingarelli B, Halushka P V, Cook J A. Endotoxin tolerance alters macrophage membrane regulatory G proteins. *Prog Clin Biol Res* 1998; (397): 217-226.
- Marsik C, Mayr F, Cardona F, Derhaschnig U, Wagner O F, Jilma B. Endotoxaemia modulates Toll-like receptors on leucocytes in humans. *Br J Haematol* 2003; (121): 653-656.
- Martire A, Fernandez B, Buehler A, Strohm C, Schaper J, Zimmermann R, Kolattukudy P E, Schaper W. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice mimics ischemic preconditioning through SAPK/JNK1/2 activation. *Cardiovasc Res* 2003; (57): 523-534.
- Massey K D, Strieter R M, Kunkel S L, Danforth J M, Standiford T J. Cardiac myocytes release leukocyte-stimulating factors. *Am J Physiol* 1995; (269): H980-H987.
- Masure S, Proost P, van D J, Opendakker G. Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. Release by the activating peptide interleukin-8. *Eur J Biochem* 1991; (198): 391-398.

- Maulik N, Das D K. Potentiation of angiogenic response by ischemic and hypoxic preconditioning of the heart. *J Cell Mol Med* 2002; (6): 13-24.
- Maulik N, Goswami S, Galang N, Das D K. Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NF-kappaB on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation. *FEBS Lett* 1999; (443): 331-336.
- Maulik N, Sasaki H, Addya S, Das D K. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors. *FEBS Lett* 2000; (485): 7-12.
- Maulik N, Watanabe M, Engelman D, Engelman R M, Kagan V E, Kisin E, Tyurin V, Cordis G A, Das D K. Myocardial adaptation to ischemia by oxidative stress induced by endotoxin. *Am J Physiol* 1995; (269): C907-C916.
- McDonald T E, Grinman M N, Carthy C M, Walley K R. Endotoxin infusion in rats induces apoptotic and survival pathways in hearts. *Am J Physiol* 2000; (279): H2053-H2061.
- Medvedev A E, Kopydlowski K M, Vogel S N. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000; (164): 5564-5574.
- Medzhitov R, Janeway C A, Jr. How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol* 2000; (12): 185-188.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway C A, Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; (2): 253-258.
- Meng X, Ao L, Brown J M, Meldrum D R, Sheridan B C, Cain B S, Banerjee A, Harken A H. LPS induces late cardiac functional protection against ischemia independent of cardiac and circulating TNF-alpha. *Am J Physiol* 1997; (273): H1894-H1902.
- Moncada S, Palmer R M, Higgs E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; (43): 109-142.
- Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T. In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 1997; (3): 894-899.
- Muller S, Gewaltig M T, Kojda G. [Vasoprotection through vascular nitric oxide. Molecular basis of antiatherosclerotic actions]. *Med Monatsschr Pharm* 2002; (25): 45-51.
- Muller-Werdan U, Schumann H, Loppnow H, Fuchs R, Darmer D, Stadler J, Holtz J, Werdan K. Endotoxin and tumor necrosis factor alpha exert a similar

- proinflammatory effect in neonatal rat cardiomyocytes, but have different cardiodepressant profiles. *J Mol Cell Cardiol* 1998; (30): 1027-1036.
- Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; (74): 1124-1136.
- Nagaya N, Nishikimi T, Horio T, Yoshihara F, Kanazawa A, Matsuo H, Kangawa K. Cardiovascular and renal effects of adrenomedullin in rats with heart failure. *Am J Physiol* 1999; (276): R213-R218.
- Nakajima H, Yanase N, Oshima K, Sasame A, Hara T, Fukazawa S, Takata R, Hata K, Mukai K, Yamashina A, Mizuguchi J. Enhanced expression of the apoptosis inducing ligand TRAIL in mononuclear cells after myocardial infarction. *Jpn Heart J* 2003; (44): 833-844.
- Nakano M, Knowlton A A, Dibbs Z, Mann D L. Tumor necrosis factor-alpha confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circulation* 1998; (97): 1392-1400.
- Nakano M, Mann D L, Knowlton A A. Blocking the endogenous increase in HSP 72 increases susceptibility to hypoxia and reoxygenation in isolated adult feline cardiocytes. *Circulation* 1997; (95): 1523-1531.
- Natarajan R, Salloum F N, Fisher B J, Kukreja R C, Fowler A A, III. Hypoxia inducible factor-1 activation by prolyl 4-hydroxylase-2 gene silencing attenuates myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res* 2005; (98): 133-140.
- Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004; (94): 1543-1553.
- Nilsen N J, Nonstad U, Khan N, Knetter C F, Akira S, Sundan A, Espevik T, Lien E. Lipopolysaccharide and double-stranded RNA upregulate toll-like receptor 2 independently of myeloid differentiation factor 88. *J Biol Chem* 2004; (279): 39727-35.
- Nossuli T O, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet G E, Ballantyne C M, Michael L H, Entman M L. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol* 2000; (278): H1049-H1055.
- O'Neill L A, Greene C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 1998; (63): 650-657.
- Ockaili R, Natarajan R, Salloum F, Fisher B J, Jones D, Fowler A A, III, Kukreja R C. HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. *Am J Physiol* 2005; (289): H542-H548.

- Okamura Y, Watari M, Jerud E S, Young D W, Ishizaka S T, Rose J, Chow J C, Strauss J F, III. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; (276): 10229-10233.
- Olivetti G, Quaini F, Sala R, Lagrasta C, Corradi D, Bonacina E, Gambert S R, Cigola E, Anversa P. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; (28): 2005-2016.
- Opdenakker G, Van den Steen P E, Dubois B, Nelissen I, Van C E, Masure S, Proost P, van D J. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001; (69): 851-859.
- Ortmann C, Pfeiffer H, Brinkmann B. A comparative study on the immunohistochemical detection of early myocardial damage. *Int J Legal Med* 2000; (113): 215-220.
- Otani H. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid Redox Signal* 2004; (6): 449-469.
- Oxhorn B C, Buxton I L. Caveolar compartmentation of caspase-3 in cardiac endothelial cells. *Cell Signal* 2003; (15): 489-496.
- Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly R A, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004; (109): 784-789.
- Pagel P S, Hettrick D A, Lowe D, Tessmer J P, Warltier D C. Desflurane and isoflurane exert modest beneficial actions on left ventricular diastolic function during myocardial ischemia in dogs. *Anesthesiology* 1995; (83): 1021-1035.
- Pagenstecher A, Stalder A K, Kincaid C L, Volk B, Campbell I L. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitor genes in lipopolysaccharide-induced endotoxemia in mice. *Am J Pathol* 2000; (157): 197-210.
- Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki L M, Tikkanen I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol* 2001; (280): H2726-H2731.
- Park J S, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim J Y, Strassheim D, Sohn J W, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol* 2006; (290): C917-C924.
- Parkes D G, May C N. Direct cardiac and vascular actions of adrenomedullin in conscious sheep. *Br J Pharmacol* 1997; (120): 1179-1185.
- Passi A, Negrini D, Albertini R, Miserocchi G, De L G. The sensitivity of versican from rabbit lung to gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) and its involvement in the development of hydraulic lung edema. *FEBS Lett* 1999; (456): 93-96.

- Patel H H, Head B P, Petersen H N, Niesman I R, Huang D, Gross G J, Insel P A, Roth D M. Protection of adult rat cardiac myocytes from ischemic cell death: role of caveolar microdomains and delta-opioid receptors. *Am J Physiol* 2006; (291): H344-H350.
- Pfeiffer A, Bottcher A, Orso E, Kapinsky M, Nagy P, Bodnar A, Spreitzer I, Liebisch G, Drobnik W, Gempel K, Horn M, Holmer S, Hartung T, Multhoff G, Schutz G, Schindler H, Ulmer A J, Heine H, Stelter F, Schutt C, Rothe G, Szollosi J, Damjanovich S, Schmitz G. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol* 2001; (31): 3153-3164.
- Piper H M, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2003; (75): S644-S648.
- Plachinta R V, Hayes J K, Cerilli L A, Rich G F. Isoflurane pretreatment inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Anesthesiology* 2003; (98): 89-95.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M Y, Huffel C V, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998a; (282): 2085-2088.
- Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu M Y, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan E K, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel S N, Beutler B. Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 1998b; (24): 340-355.
- Przyklenk K, Darling C E, Dickson E W, Whittaker P. Cardioprotection 'outside the box'--the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2003; (98): 149-157.
- Qureshi S T, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore K J, Gros P, Malo D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 1999; (189): 615-625.
- Ravingerova T, Barancik M, Strniskova M. Mitogen-activated protein kinases: a new therapeutic target in cardiac pathology. *Mol Cell Biochem* 2003; (247): 127-138.
- Roth E, Lantos J, Temes G, Varga G, Paroczai M, Karpati E. Cardioprotection during heart ischemia-reperfusion. *Acta Chir Hung* 1997; (36): 306-309.
- Rowland R T, Cleveland J C, Meng X, Ao L, Harken A H, Brown J M. A single endotoxin challenge induces delayed myocardial protection against infarction. *J Surg Res* 1996; (63): 193-198.
- Sabates B L, Pigott J D, Choe E U, Cruz M P, Lipton H L, Hyman A L, Flint L M, Ferrara J J. Adrenomedullin mediates coronary vasodilation through adenosine receptors and K(ATP) channels. *J Surg Res* 1997; (67): 163-168.

- Sam F, Sawyer D B, Chang D L, Eberli F R, Ngoy S, Jain M, Amin J, Apstein C S, Colucci W S. Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart. *Am J Physiol* 2000; (279): H422-H428.
- Sandau K B, Faus H G, Brune B. Induction of hypoxia-inducible-factor 1 by nitric oxide is mediated via the PI 3K pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; (278): 263-267.
- Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki L M. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; (95): 320-323.
- Satoh M, Shimoda Y, Akatsu T, Ishikawa Y, Minami Y, Nakamura M. Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte Toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 2006; (8): 810-815.
- Scheibner K A, Lutz M A, Boodoo S, Fenton M J, Powell J D, Horton M R. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 2006; (177): 1272-1281.
- Schmitz G, Orso E. CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors. *Curr Opin Lipidol* 2002; (13): 513-521.
- Schroder J, Stuber F, Gallati H, Schade F U, Kremer B. Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis. *Infection* 1995; (23): 143-148.
- Semenza G L. Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin Med* 1998; (131): 207-214.
- Sergent O, Pereira M, Belhomme C, Chevanne M, Huc L, Lagadic-Gossmann D. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; (313): 104-111.
- Shames B D, Meldrum D R, Selzman C H, Pulido E J, Cain B S, Banerjee A, Harken A H, Meng X. Increased levels of myocardial I κ B-alpha protein promote tolerance to endotoxin. *Am J Physiol* 1998; (275): H1084-H1091.
- Shimamoto A, Chong A J, Yada M, Shomura S, Takayama H, Fleisig A J, Agnew M L, Hampton C R, Rothnie C L, Spring D J, Pohlman T H, Shimpo H, Verrier E D. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2006; (114): I270-I274.
- Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, Shibata Y, Nitobe J, Miyamoto T, Takahashi H, Arimoto T, Maeda K, Yamakawa M, Takeuchi O, Akira S, Takeishi Y, Kubota I. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2003; (108): 2905-2910.
- Silbernagl S, Lang F. *Taschenatlas der Pathophysiologie*. 1998.
- Simpson P J, Todd R F, III, Mickelson J K, Fantone J C, Gallagher K P, Lee K A, Tamura Y, Cronin M, Lucchesi B R. Sustained limitation of myocardial reperfusion

- injury by a monoclonal antibody that alters leukocyte function. *Circulation* 1990; (81): 226-237.
- Siwik D A, Colucci W S. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Fail Rev* 2004; (9): 43-51.
- Siwik D A, Pagano P J, Colucci W S. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol* 2001; (280): C53-C60.
- Smiley S T, King J A, Hancock W W. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001; (167): 2887-2894.
- Smith R M, Lecour S, Sack M N. Innate immunity and cardiac preconditioning: a putative intrinsic cardioprotective program. *Cardiovasc Res* 2002a; (55): 474-482.
- Smith R M, Suleman N, McCarthy J, Sack M N. Classic ischemic but not pharmacologic preconditioning is abrogated following genetic ablation of the TNFalpha gene. *Cardiovasc Res* 2002b; (55): 553-560.
- Spinale F G, Coker M L, Heung L J, Bond B R, Gunasinghe H R, Etoh T, Goldberg A T, Zellner J L, Crumbley A J. A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 2000; (102): 1944-1949.
- Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003; (200): 448-464.
- Stapel H, Kim S C, Osterkamp S, Knuefermann P, Hoefft A, Meyer R, Grohe C, Baumgarten G. Toll-like receptor 4 modulates myocardial ischaemia-reperfusion injury: Role of matrix metalloproteinases. *Eur J Heart Fail* 2006; (8): 665-672.
- Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2003. Statistisches Bundesamt 2005; (Fachserie 12 / Reihe 4).
- Strieter R M, Polverini P J, Kunkel S L, Arenberg D A, Burdick M D, Kasper J, Dzuiba J, van D J, Walz A, Marriott D. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995; (270): 27348-27357.
- Su S L, Tsai C D, Lee C H, Salter D M, Lee H S. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 by IL-1beta and fibronectin fragments in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; (13): 879-886.
- Sugano M, Tsuchida K, Hata T, Makino N. In vivo transfer of soluble TNF-alpha receptor 1 gene improves cardiac function and reduces infarct size after myocardial infarction in rats. *FASEB J* 2004; (18): 911-913.
- Szokodi I, Kinnunen P, Tavi P, Weckstrom M, Toth M, Ruskoaho H. Evidence for cAMP-independent mechanisms mediating the effects of adrenomedullin, a new inotropic peptide. *Circulation* 1998; (97): 1062-1070.

- Tahep I P, Valen G, Starkopf J, Kairane C, Zilmer M, Vaage J. Pretreating rats with hyperoxia attenuates ischemia-reperfusion injury of the heart. *Life Sci* 2001; (68): 1629-1640.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; (11): 443-451.
- Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 2000; (12): 113-117.
- Tarzami S T, Cheng R, Miao W, Kitsis R N, Berman J W. Chemokine expression in myocardial ischemia: MIP-2 dependent MCP-1 expression protects cardiomyocytes from cell death. *J Mol Cell Cardiol* 2002; (34): 209-221.
- Tavener S A, Long E M, Robbins S M, McRae K M, Van R H, Kubes P. Immune cell Toll-like receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia. *Circ Res* 2004; (95): 700-707.
- Taylor K R, Trowbridge J M, Rudisill J A, Termeer C C, Simon J C, Gallo R L. Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem* 2004; (279): 17079-17084.
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon J C. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002; (195): 99-111.
- Tobias P S, Soldau K, Ulevitch R J. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986; (164): 777-793.
- Tominaga K, Saito S, Matsuura M, Nakano M. Lipopolysaccharide tolerance in murine peritoneal macrophages induces downregulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway through mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB cascades, but not lipopolysaccharide-incorporation steps. *Biochim Biophys Acta* 1999; (1450): 130-144.
- Tosaki A, Maulik N, Elliott G T, Blasig I E, Engelman R M, Das D K. Preconditioning of rat heart with monophosphoryl lipid A: a role for nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; (285): 1274-1279.
- Valen G. The basic biology of apoptosis and its implications for cardiac function and viability. *Ann Thorac Surg* 2003; (75): S656-S660.
- Waldenstrom A, Martinussen H J, Gerdin B, Hallgren R. Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 1991; (88): 1622-1628.

- Wang M, Meng X, Tsai B, Wang J F, Turrentine M, Brown J W, Meldrum D R. Preconditioning up-regulates the soluble TNF receptor I response to endotoxin. *J Surg Res* 2004; (121): 20-24.
- Wang Y P, Sato C, Mizoguchi K, Yamashita Y, Oe M, Maeta H. Lipopolysaccharide triggers late preconditioning against myocardial infarction via inducible nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 2002; (56): 33-42.
- Warner R L, Bhagavathula N, Nerusu K C, Lateef H, Younkin E, Johnson K J, Varani J. Matrix metalloproteinases in acute inflammation: induction of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts and epithelial cells following exposure to pro-inflammatory mediators in vitro. *Exp Mol Pathol* 2004; (76): 189-195.
- Wei M, Kuukasjarvi P, Laurikka J, Pehkonen E, Kaukinen S, Laine S, Tarkka M. Cytokine responses in patients undergoing coronary artery bypass surgery after ischemic preconditioning. *Scand Cardiovasc J* 2001; (35): 142-146.
- Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor S M, Shirani J, Armstrong R C, Kitsis R N. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J Clin Invest* 2003; (111): 1497-1504.
- Werdan K, Muller-Werdan U. Elucidating molecular mechanisms of septic cardiomyopathy-the cardiomyocyte model. *Mol Cell Biochem* 1996; (163-164): 291-303.
- Wesche H, Henzel W J, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997; (7): 837-847.
- West M A, LeMieur T, Clair L, Bellingham J, Rodriguez J L. Protein kinase C regulates macrophage tumor necrosis factor secretion: direct protein kinase C activation restores tumor necrosis factor production in endotoxin tolerance. *Surgery* 1997; (122): 204-211.
- Xi L, Kukreja R C. Pivotal role of nitric oxide in delayed pharmacological preconditioning against myocardial infarction. *Toxicology* 2000; (155): 37-44.
- 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* 2003a; (301): 640-643.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003b; (4): 1144-1150.
- Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002; (169): 6668-6672.

- Yamamoto T, Eckes B, Mauch C, Hartmann K, Krieg T. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances gene expression and synthesis of matrix metalloproteinase-1 in human fibroblasts by an autocrine IL-1 alpha loop. *J Immunol* 2000; (164): 6174-6179.
- Yang R B, Mark M R, Gray A, Huang A, Xie M H, Zhang M, Goddard A, Wood W I, Gurney A L, Godowski P J. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998; (395): 284-288.
- Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998; (97): 276-281.
- Yoshidome H, Kato A, Edwards M J, Lentsch A B. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology* 1999; (30): 203-208.
- Yoza B, LaRue K, McCall C. Molecular mechanisms responsible for endotoxin tolerance. *Prog Clin Biol Res* 1998; (397): 209-215.
- Zacharowski K, Frank S, Otto M, Chatterjee P K, Cuzzocrea S, Hafner G, Pfeilschifter J, Thiernemann C. Lipoteichoic acid induces delayed protection in the rat heart: A comparison with endotoxin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; (20): 1521-1528.
- Zaks-Zilberman M, Salkowski C A, Elsasser T, Cuttitta F, Vogel S N. Induction of adrenomedullin mRNA and protein by lipopolysaccharide and paclitaxel (Taxol) in murine macrophages. *Infect Immun* 1998; (66): 4669-4675.
- Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn D R, Pasch T, Garcia C, Schaub M C. Differential effects of anesthetics on mitochondrial K(ATP) channel activity and cardiomyocyte protection. *Anesthesiology* 2002; (97): 15-23.
- Zhang D, Zhang G, Hayden M S, Greenblatt M B, Bussey C, Flavell R A, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004a; (303): 1522-1526.
- Zhang F X, Kirschning C J, Mancinelli R, Xu X P, Jin Y, Faure E, Mantovani A, Rothe M, Muzio M, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor-kappaB through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 1999; (274): 7611-7614.
- Zhang J, Wu H, Wang L, Zhang J, Wang H, Zheng Q. TLR2 mRNA upregulation in ischemic lobes in mouse partial hepatic ischemia/reperfusion injury model. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004b; (24): 144-146.
- Zhao L, Weber P A, Smith J R, Comerford M L, Elliott G T. Role of inducible nitric oxide synthase in pharmacological "preconditioning" with monophosphoryl lipid A. *J Mol Cell Cardiol* 1997; (29): 1567-1576.

- Zhao Z Q, Corvera J S, Halkos M E, Kerendi F, Wang N P, Guyton R A, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 2003; (285): H579-H588.
- Ziegler-Heitbrock H W. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm* 1995; (45): 13-26.
- Zingarelli B, Hake P W, Yang Z, O'Connor M, Denenberg A, Wong H R. Absence of inducible nitric oxide synthase modulates early reperfusion-induced NF-kappaB and AP-1 activation and enhances myocardial damage. *FASEB J* 2002; (16): 327-342.
- Zorov D B, Juhaszova M, Sollott S J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochim Biophys Acta* 2006; (1757): 509-517.

8 Danksagung

Allen, die mich im Verlauf meiner Promotion unterstützt haben, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen. Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Rainer Meyer (Institut für Physiologie 2) und Herrn Dr. Georg Baumgarten (Klinik für Anästhesiologie) für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Überlassung des Themas, und ihnen sowie Herrn Dr. Pascal Knüfermann und Prof. Christian Grohé für die freundliche Betreuung, Unterstützung, stete Bereitschaft und Ansprechbarkeit
- Herrn Prof. Dieter Fürst (Institut für Zellbiologie), für die Übernahme der Betreuung an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Fachgruppe Biologie
- Stilla Frede (Institut für Physiologie, Universitätsklinik Essen) für ihre Kooperationsbereitschaft und Beratung rund um das HIF-Projekt sowie Patricia Freytag für die Durchführung der real-time PCRs
- Dirk Böker, Patrik Efferz und Hanne Bock für die technische Unterstützung und das offene Ohr bei allen Fragen der Versuchsdurchführung
- Steffen Osterkamp für die Einarbeitung in die OP-Methode
- den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die wunderschöne gemeinsame Zeit und Unterstützung – nicht nur bei der Promotion – und die daraus erwachsene Freundschaft
- Thomas Wagner für die Vermittlung in diese Arbeitsgruppe

9 Erklärung

Ich erkläre, die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen, die ich in der Dissertation angegeben habe, angefertigt zu haben. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche gekennzeichnet. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten.

10 Publikationen

Stapel, H., Kim, S. C., Osterkamp, S., Knuefermann, P., Hoeft, A., Meyer, R., Grohe, C., & Baumgarten, G. Toll-like receptor 4 modulates myocardial ischaemia-reperfusion injury: Role of matrix metalloproteinases. *Eur. J Heart Fail* 2006; 8: 665-672.

Baumgarten, G., Kim, S. C., **Stapel, H.**, Vervolgyi, V., Bittig, A., Hoeft, A., Meyer, R., Grohe, C., & Knuefermann, P. Myocardial injury modulates the innate immune system and changes myocardial sensitivity. *Basic Res. Cardiol* 2006; 101: 427-435.

Baumgarten, G., Knuefermann, P., Wrigge, H., Putensen, C., **Stapel, H.**, Fink, K., Meyer, R., Hoeft, A., Grohé, C. Role of Toll-like receptor 4 for the pathogenesis of acute lung injury in Gram-negative sepsis. *Eur. J. Anaesthesiol* 2006; 23: 1041-1048.