

**Der Einfluss des Toll-like Rezeptor 9  
auf die Kontraktilität  
isolierter Herzmuskelzellen**

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

**Myriam Christina Rüdiger**  
aus Leverkusen

2008

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Meyer
2. Gutachter: Herr PD Dr. med. Knüfermann

Tag der Mündlichen Prüfung: 08. Oktober 2008

Aus dem Physiologischen Institut  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Univ. Prof. Dr. Dieter Swandulla

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.





# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1    Definition und Inzidenz des Krankheitsbildes Sepsis .....	<b>10</b>
1.2    Hypothetische Pathogenese der kardialen Kontraktilitätsminderung in der Sepsis.....	<b>13</b>
1.3    Fragestellung dieser Arbeit .....	<b>17</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1    Versuchstiere .....	<b>18</b>
2.2    Präparation vitaler Kardiomyozyten .....	<b>19</b>
2.3    Inkubation .....	<b>25</b>
2.4    Messstand und Messmethoden .....	<b>26</b>
2.4.1    Versuchsstand .....	<b>26</b>
2.4.1.1    Inverses Mikroskop .....	<b>27</b>
2.4.1.2    Versuchskammer .....	<b>28</b>
2.4.1.3    Perfusion .....	<b>29</b>
2.4.1.4    Externe Stimulation .....	<b>30</b>
2.4.2    Quantifizierung der Sarkomerverkürzung.....	<b>30</b>
2.5    Durchführung der Messung .....	<b>33</b>
2.5.1    Fixierung der Zellen in der Messkammer .....	<b>33</b>
2.5.2    Messprotokolle .....	<b>34</b>
2.5.2.1    Zeitreihe mit CpG-ODN .....	<b>34</b>
2.5.2.2    Kontrollgruppe .....	<b>34</b>
2.5.2.3    Messungen der Kontraktilität unter CpG-Inkubation mit iNOS-Inhibitor SMT.....	<b>34</b>
2.6    Stimulantien .....	<b>35</b>
2.6.1    Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Oligonukleotide (CpG-ODN) .....	<b>35</b>
2.6.2    S-Methylisothioharnstoff .....	<b>36</b>
2.7    Auswertung .....	<b>36</b>
2.7.1    Auswertung der Sarkomerverkürzungen .....	<b>36</b>
2.7.2    Baseline-Korrektur .....	<b>39</b>

2.8	Statistische Auswertung .....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
3.1	Wirkung von CpG auf das Verkürzungsverhalten von Kardiomyozyten ...	41
3.1.1	Verkürzungsverhalten im Gleichgewicht .....	42
3.1.1.1	Verkürzungsamplitude .....	42
3.1.1.2	Verkürzungsgeschwindigkeit .....	43
3.1.1.3	Relaxationsgeschwindigkeit .....	44
3.1.1.4	Ruhsarkomerlänge .....	45
3.1.1.5	Verkürzungsdauer .....	46
3.1.2	Zeitreihe der CpG-Inkubation .....	47
3.2	Aufhebung des CpG-Effekts auf die Kontraktilität der Herzmuskelzellen durch Inkubation mit dem iNOS-Inhibitors S-Methylisothioharnstoff.....	50
3.2.1	Verkürzungsamplitude.....	50
3.2.2	Verkürzungsgeschwindigkeit.....	52
3.2.3	Relaxationsgeschwindigkeit .....	53
3.2.4	Ruhsarkomerlänge .....	54
3.2.5	Verkürzungsdauer .....	55
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>57</b>
4.1	Validität der Methoden .....	57
4.2	Hypothetischer Signalweg von TLR9 zur kardialen Depression .....	59
4.3	Auswirkungen von CpG- Oligonukleotiden auf die Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyozyten in Abhängigkeit von TLR 9 .....	60
4.4	Die Rolle von iNOS in der Vermittlung des kardiodepressiven Effektes von CpG.....	63
4.5	Ausblick .....	64
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Tabellenanhang .....</b>	<b>68</b>
6.1	Zusammensetzung der Lösungen und Medien .....	68
6.2	Tabellarische Aufstellung der Messwerte .....	70
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>85</b>

## Abkürzungsverzeichnis:

ACCP	American College of Chest Physicians
Arg	Arginin
BSA	bovines Serumalbumin
CD-14	Glykoprotein auf Membranen der myeloischen Zellreihe, Rezeptor für LPS
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
CpG-ODN	CpG- Oligodesoxynukleotid
Ca <sup>+</sup>	ionisiertes Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DD	Death domain der MyD88
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGTA	Ethylene glycol tetra acetic acid. Chelatbildner mit hoher Affinität zu Ca <sup>2+</sup>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ein immunologisches Nachweisverfahren
Fa.	Firma
Gly	Glycin
h	Stunde
HEPES	Hydroxyethylpiperazinyl-ethansulfonsäure
Hz	Hertz [1/s]
Ile	Isoleucin
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
Inc.	Incorporated
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase
IRAKSs	IL-1-Rezeptor-assozierten Kinasen
K <sup>+</sup>	ionisiertes Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	MAP-Kinase ( engl. mitogen activated kinase)
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule; Maßeinheit für den Druck
mM	millimolar
mmMol	Millimol
μl	Microliter
μm	Micrometer
μMol	Micromol
mRNA	messenger- RNA
MODS	multiple organ dysfunction syndrome, Multiorganversagen
ms	Millisekunden
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloid-Differenzierungsprotein 88
n	Anzahl
NFκB	nukleärer Faktor κB
Na <sup>+</sup>	ionisiertes Natrium
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAMP	pathogen associated molecular pattern, Pathogen-assoziierte molekulare Muster
pH	potential Hydrogenii – “Stärke des Wasserstoffes” (negativer dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionenkonzentration)
Pro	Prolin
PRRs	pattern recognition receptors
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SD	standard deviation, Standardabweichung
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwertes
Ser	Serin
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SMT	S-Methylisothioharnstoff

TRAF6	TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TLR	Toll-like-Rezeptor
Tyr	Tyrosin
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition und Inzidenz des Krankheitsbildes Sepsis

Im landläufigen Verständnis der Erkrankung ist Sepsis eine „außer Kontrolle geratene“, disseminierte bakterielle Infektion, welche im Regelfall einem lokalen Fokus entspringt. Kennzeichnend ist, dass das Immunsystem des Patienten die ursprüngliche Infektion nicht mehr lokal einzudämmen vermag. Zu den unspezifischen Symptomen gehören Dysregulation der Körpertemperatur (sowohl Hypo- als auch Hyperthermie), Leukozytose sowie Leukopenie, Tachykardie und Tachypnoe.

Für die Diagnose und Therapie der Sepsis ist es allerdings von Nöten, sowohl eine genauere und differenziertere Definition als auch ein genaues Verständnis der Pathologie zu haben.

Schon in der Antike war das Krankheitsbild der Sepsis als generalisierte Infektion bekannt, der Begriff der Sepsis wurde bereits durch Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) geprägt (griechisch σήπω: "faul machen") (Kreymann, 1996). Der persische Arzt und Gelehrte Abu Ali ibn Sina beschrieb Sepsis als Krankheitsbild, in dem die Fäulnis des Blutes mit Fieber einherginge, dennoch blieb die Medizin bis zum 19. Jahrhundert eine Erklärung über die Genese der Sepsis schuldig.

Erst Ignaz Semmelweises (1818-1865) stellte Untersuchungen über die Ursache von Infektionen im Wochenbett in der Geburtshilflichen Klinik des Allgemeinen Krankenhauses in Wien an. Diese mündeten in seiner Theorie, dass „Leichenteilchen“ die Verursacher des Puerperalfiebers seien. Leichenteilchen wurden ihm zufolge von Medizinstudenten bei Obduktionen von den Leichen aufgenommen und durch die Untersuchung an den Wöchnerinnen „in das Blutgefäßsystem“ verbracht (Semmelweis, 1861). Semmelweis selbst wurde von vielen seiner Kollegen aufgrund seiner Theorien und der Schuldzuweisung an unhygienisch arbeitende Ärzte massiv angefeindet (Gortvay, 1977). Erst die Entdeckung des Bakteriums durch Louis Pasteur 1857 legten den Grundstein für ein Verständnis der tatsächlichen Pathophysiologie von Infektionskrankheiten (Debré und Forster, 1998).

So gab die Definition der Sepsis durch Hugo Schottmüller auf dem Kongress der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 1914 bereits vereinfachend unser heutiges Bild der Sepsis wieder:

*„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Kreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“*

(Schottmüller, 1914)

Auch wenn das Verständnis der Krankheitsgenese sich änderte, war vor der Entdeckung der Antibiotika kaum eine Möglichkeit der kausalen Therapie gegeben. Neben einer lediglich symptomatischen Behandlung entschied letztlich die Immunkompetenz des Patienten über Genesung oder letalen Ausgang.

Heute besitzen wir die Mittel, den Erreger mit einem Antibiotogramm zu typisieren und gezielt antibiotisch zu behandeln. Die moderne Intensivmedizin ermöglicht uns ein hohes Maß der symptomatischen Therapie, welche den Patienten stabilisieren kann, bis die kausale Therapie greift. All das bedeutet, dass ein weitaus differenzierteres Herangehen an die lebensbedrohliche Erkrankung notwendig ist, um die Therapieoptionen angemessen auszuschöpfen. Um jedoch diese Werkzeuge der modernen Medizin auch tatsächlich gezielt einsetzen zu können, muss der unspezifische Begriff der Sepsis mit unspezifischen Symptomen der Temperaturdysregulation, der Aktivierung der Immunantwort sowie der Herz- und Kreislaufdysfunktion differenzierter betrachtet werden. Die Diagnose „Sepsis“ alleine reicht nicht mehr aus, es müssen Kategorien geschaffen werden, welche aussagekräftig für Prognose und Procedere sind.

Die heute noch weitgehend gültige Klassifikation der Sepsis wurde während der Konsensus-Konferenz der ACCP (American College of Chest Physicians) und der SCCM (Society of Critical Care Medicine) 1992 entwickelt (ACCP/SCCM, 1992).

Dort wurde der Begriff des SIRS eingeführt und der Schweregrad der Erkrankung eingeteilt in SIRS/Sepsis, schweres SIRS/schweres Sepsis, septischer/SIRS-Schock und MODS (Multiorganversagen). Das SIRS (systemic inflammatory response syndrom) bezeichnet die generalisierte entzündliche Abwehrreaktion des Körpers auf immunologische, chemische oder traumatische (Operationen, großflächige Verbrennungen etc.) Einflüsse oder schwere, generalisierte Erkrankungen, in der mindestens zwei der oben genannten klinischen Symptome einer Sepsis erfüllt sind. Es fehlt jedoch der positive Erregernachweis.

<b>Diagnosekriterien für SIRS, Sepsis und schwere Sepsis (modifiziert nach der ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz)</b>	
<b>I</b>	<b>Nachweis der Infektion:</b> Differenzierung zwischen Sepsis und SIRS
<b>II</b>	<b>Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS):</b> Mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt.
	Hyper- (> 38°C) oder Hypothermie (< 36°C)
	Tachykardie: Herzfrequenz >90/min
	Tachypnoe: Atemfrequenz >20 oder Hyperventilation (PaCO <sub>2</sub> <4.3 kPa bzw. 33 mmHg)
	Leukozytose (>12.000 Leukozyten/µl) oder Leukopenie (<4000/µl) oder >10 % unreife neutrophile Granulozyten im Differentialblutbild
<b>III</b>	<b>Schwere Sepsis / SIRS</b> Zusätzlich zu den oben genannten mindestens ein Kriterium erfüllt.
	Akute Organdysfunktion: kardiovaskulär (Hypoperfusion, Hypotension), renal (Oligo- bis Anurie), respiratorisch (Hypoxie), hämatologisch (akute Thrombozytopenie, DD: Verlustkoagulopathie bei Blutungen), metabolisch (Azidose)
<b>IV</b>	<b>Septischer Schock / SIRS-Schock</b>
	Sepsis/ SIRS mit kardiovaskulärer Dysfunktion (über die Dauer mehr als einer Stunde einen systolischen RR < 90 mmHg oder einen MAD < 70 mmHg trotz adäquater Volumen- und/oder Katecholamintherapie)
<b>V</b>	<b>MODS (multiple organ dysfunction syndrome)</b>
	Dermaßen ausgeprägte Organschädigung/-dysfunktion, so dass die Homöostase ohne Intervention nicht mehr aufrechterhalten werden kann.

**Tabelle 1:** Kategorien der Diagnosestellung in der Sepsis, modifiziert nach der ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz

Wird als Ursache eines SIRS eine Infektion nachgewiesen, sind die Kriterien der Sepsis erfüllt (siehe Tabelle 1). Der Erregernachweis kann zum Beispiel mit Hilfe eines Abstriches aus einer

purulenten Wunde, als Nachweis von Leukozyten in einer normalerweise sterilen Körperflüssigkeit oder mit Hilfe von Blutkulturen direkt bei Bakteriämie erfolgen.

Die schwere Sepsis und der septische Schock sind trotz der modernen Intensivmedizin immer noch die häufigste Todesursache auf nichtkardiologischen Intensivstationen. In einer Studie über die Prävalenz und Mortalität von Patienten auf Intensivstationen in Deutschland von SepNet (dem Deutschen Kompetenznetzwerk für Sepsis) wurden 3.877 Patienten auf den Intensivstationen von 310 Krankenhäusern miteinander verglichen. Dabei wurde über den Zeitraum von 24 Stunden (von 6:00 Uhr morgens bis 6:00 Uhr des Folgetages) das Vorliegen von Infektionen, Sepsis, SIRS und Multiorganversagen dokumentiert. Danach beträgt die Prävalenz der Sepsis 12,4 % und 10,7 % für das Vorliegen einer schweren Sepsis. Von 415 Patienten mit einer schweren Sepsis verstarben 55,2 %, davon 48,4 % auf den Intensivstationen, 6,8 % auf Normalstation. Dieselbe Studie geht von ungefähr 79.000 Neuerkrankungen pro Jahr für die Sepsis und 75.000 für die schwere Sepsis aus, das heißt 116 beziehungsweise 110 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner pro Jahr (Engel und Brunkhorst, 2007).

Im Vergleich dazu liegt die Inzidenz der Herzinsuffizienz bei 240, die des Brustkrebses bei 110 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner (Brunkhorst, 2004). Schon jetzt ist also die Inzidenz schwerer Verläufe von septischen Erkrankungen vergleichbar der so genannter Volkskrankheiten. Mit der Vergreisung unserer Gesellschaft nimmt die Anzahl älterer, multimorbider Patienten im Krankenhaus und auch auf Intensivstationen zu. Weiterhin muss man davon ausgehen, dass die Dauer und das Ausmaß der Intensivtherapien durch den medizinischen Fortschritt zunehmen werden. Beides trägt dazu bei, dass die Inzidenz der Sepsis in den kommenden Jahren weiter steigen wird.

## **1.2 Hypothetische Pathogenese der kardialen Kontraktilitätsminderung in der Sepsis**

Limitierend im Verlauf der Erkrankung ist häufig die Beteiligung des Herzens, da die meisten anderen Organfunktionen wie die der Lunge und der Nieren zumindest passager durch technische Maßnahmen ersetzt werden können. Laut Parrillo et al. ist im Todesfall in 50% das Multiorganversagen, in 40% die nicht beherrschbare Vasodilatation mit konsekutivem hämodynamischen Schock und in 10% die akute septische Kardiomyopathie ursächlich (Parrillo et al., 1990).

Dabei reduzieren nicht nur Senkung von Vor- und Nachlast durch die generalisierte Vasodilatation die kardiale Pumpleistung, sondern der Herzmuskel wird direkt durch bakterielle Einflüsse geschädigt. Die unzureichende myokardiale Leistung führt zu einer weiteren Zentralisation und Minderperfusion der bereits unterversorgten Organe und damit zu weiterer Organschädigung bis hin zum Multiorganversagen und Tod.

Trotz des Fortschrittes der antibiotischen Therapie und der Möglichkeiten der symptomatisch-unterstützenden Therapie (wie z.B. Katecholamine, Flüssigkeitssubstitution etc.), hat sich die Prognose kaum verbessern lassen, es ist also dringend erforderlich, die genaue Pathophysiologie der septischen Kardiomyopathie zu erforschen, um Ansätze einer effektiven kausalen Therapie zu finden.

Spezies übergreifend zeichnen sich Mikroorganismen dadurch aus, gewisse Merkmale innezuhaben, welche sie von eukaryoten Zellen unterscheiden. Diese Merkmale werden als „Pathogen-assoziierte molekulare Muster“ (englisch *pathogen associated molecular patterns*, **PAMPs**) bezeichnet. Dies sind zum Beispiel charakteristische Komponenten der Zellwand von Bakterien (Lipopolysaccharide), Peptide oder Zuckermoleküle, die in dieser Form nicht im eukaryoten Organismus vorkommen. Daher ist unser angeborenes Immunsystem bereits ohne Sensibilisierung durch einen vorhergegangenen Kontakt mit dem prokaryoten Antigen in der Lage, pathogene Agenzien zu erkennen und zu bekämpfen. In der Regel sind diese PAMPs hoch konserviert, das heißt, sie unterliegen keinen Mutationen, die ihre Struktur so verändern könnten, dass sie durch die angeborene Immunabwehr nicht mehr erfasst werden.

Erkannt werden PAMPs durch so genannte PRRs, *pattern recognition receptors*, welche bei Zellen des Immunsystems weit verbreitet sind. Diese können in die Zelloberfläche eingebaut, aber auch als Bestandteil intrazellulärer Kompartimente sowie als sezernierte Form vorliegen. Eine wichtige Untergruppe der PRRs wurde in der Mitte der 1990 Jahre eher zufällig in *Drosophila melanogaster* von der Forschungsgruppe um die Nobelpreisträgerin Christiane Nüsslein-Volhard entdeckt. Es stellte sich heraus, dass Toll-like-defiziente Fruchtfliegen viel anfälliger gegen Pilzinfektionen waren als Wildtyp-Tiere. Seitdem sind bei den verschiedensten Spezies analoge Toll-like-Rezeptoren entdeckt worden, sowohl in allen Vertebraten als auch in primitiveren Organismen wie der Fruchtfliege, ja sogar in Pflanzen (Übersichtsartikel: Siegmund-Schultze, 2007).

Bis heute sind beim Menschen 10 verschiedene Untertypen festgestellt worden, welche unterschiedliche PAMPs erkennen (Lakhani und Bogue, 2003; Mukhopadhyay et al., 2004; Pällson-McDermont und O' Neill, 2004). Allen ist ein vergleichbarer Aufbau gemein: eine extrazelluläre,

leuzinreiche Rezeptor-Region sowie eine intrazelluläre Domäne. Durch den transmembranären Verlauf werden Reize ins Zytoplasma vermittelt werden (Kopp und Medzhitov, 1999).

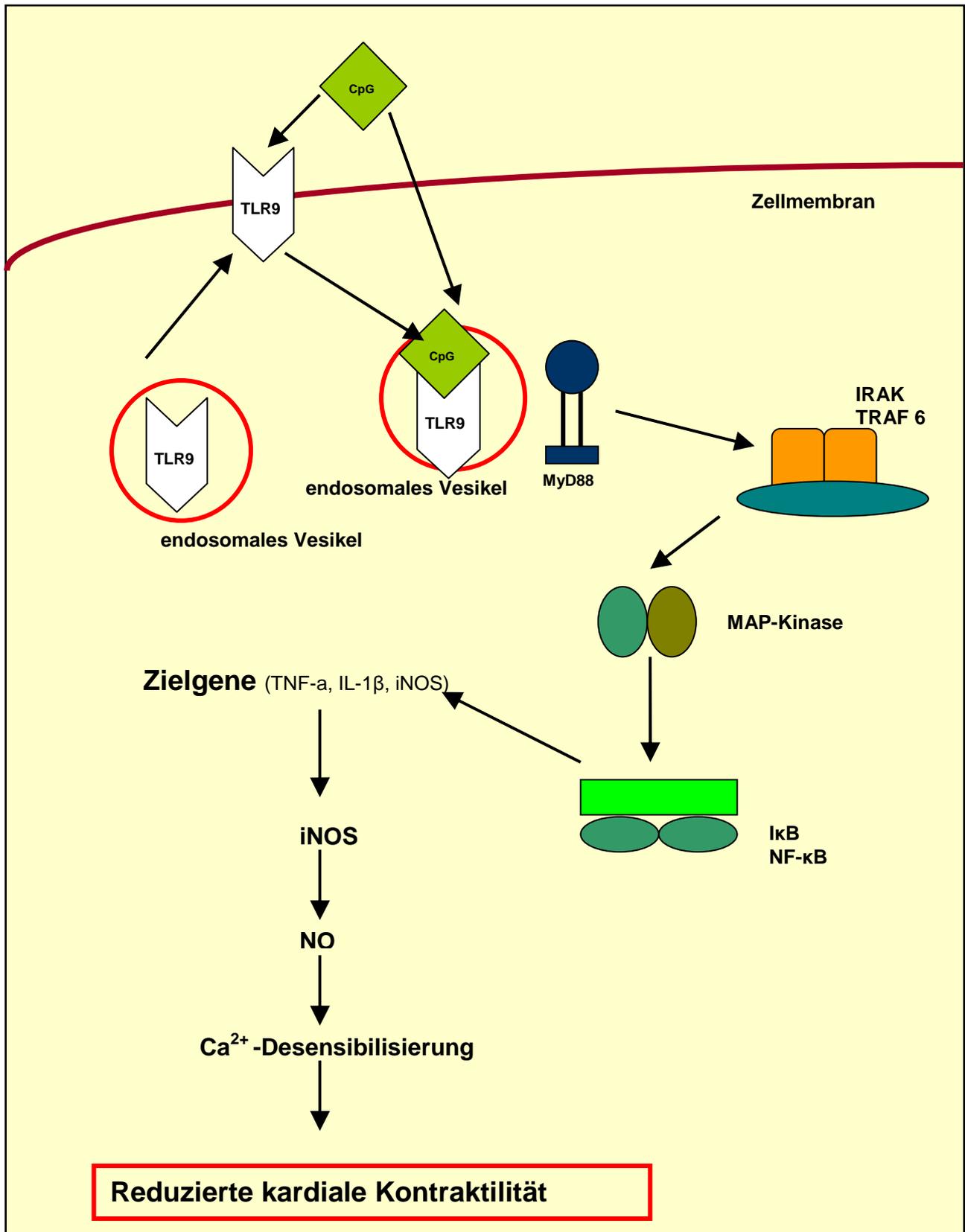
Vorhergegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass durch Lipopolysaccharid-Bestandteile von Bakterienmembranen TLR4- und CD14- vermittelt in Kardiomyozyten die Bildung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ebenso wie Stickstoffmonoxid induziert wird. Diese führen zu einer Verminderung der linksventrikulären Pumpfunktion (Baumgarten et al., 2001; Knuefermann et al. 2002b) und zu einer Verringerung der Einzelzellkontraktilität (Baumgarten et al., 2006).

Sparwasser et al. (1997) zeigten, dass Bakterien-DNA (CpG-Motive) durch Bindung an TLR9 über das angeborene Immunsystem zu Beeinträchtigungen verschiedener Organsysteme führt. Der genaue Signalweg einer TLR9-vermittelten Kontraktilitätsminderung durch bakterielle DNA ist bis dato unbekannt. Der bisher erarbeitete bzw. hypothetische Signalweg ist in Abbildung 1 dargestellt und wird im Folgenden erläutert.

Angenommen wird, dass TLR9 in der Zellmembran und/oder der Membran lysosomaler Vesikel der Kardiomyozyten sitzt und dort direkt CpG-Oligonukleotide bindet. Daraufhin interagiert TLR9 mit dem Myeloid-Differenzierungsprotein 88 (MyD88) (Kopp und Medzhitov, 1999). Dieses besitzt eine so genannte death domain (DD). Die DD wurde zuerst bei Proteinen beschrieben, die an der Regulation der Apoptose beteiligt waren und gelangte so zu ihrem Namen (Lakhani und Bogue, 2003). Nicht nur in der Apoptose, sondern z.B. auch bei der Vermittlung von Zytotoxizität oder der Aktivierung von Transkriptionsvorgängen unterstützen DDs die Protein-Protein-Interaktion (ebenfalls Kopp und Medzhitov, 1999).

Aktiviert von TLR9 bindet MyD88 an einen Rezeptorkomplex aus IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAKSs). Diese werden durch Phosphorylierung aktiviert und interagieren nach Dissoziation von dem MyD88-TLR-Komplex mit dem TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) (Akira, 2003; Lakhani und Bogue, 2003; Rensing, 2003). TRAF6 aktiviert wiederum die MAP-Kinase-Kaskade (MAP: engl. mitogen activated kinase). Schlussendlich führt der Signalweg über eine Aktivierung von NF $\kappa$ B und anderen Transkriptionsfaktoren zu einer erhöhten Transkription NF $\kappa$ B abhängiger Zielgene (Vollmer, 2006).

Angenommen wurde für diese Arbeit, dass auf diesem Wege in einer von CpG-Oligonukleotiden stimulierten Zelle in erhöhtem Maße induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) gebildet wird.



**Abbildung 1:** Hypothetischer Signaltransduktionsweg ausgehend von TLR 9, nähere Erläuterung im Text

### 1.3 Fragestellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll die Signalkaskade des TLR9 in der Kardiomyozyte untersucht werden. Im Gegensatz zur Wirbeltier-DNA liegt in bakterieller DNA das Dinucleotid aus Cytosin und Guanosen unmethyliert vor (CpG = Cytosin-phosphatidyl-Guanosin), DNA-Sequenzen mit unmethyliertem CpG-Motiv dienen also als PAMPs.

Hypothetisch stimulieren sie den TLR9 in der Myokardzelle, woraufhin eine Signalkaskade die Expression von Genen auslöst, welche wiederum NO-vermittelt die Kontraktilität der Kardiomyozyten herabsetzen (siehe Abbildung 1).

Verwendet wurde während dieser Versuchsreihe das CpG-Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-TCC-ATG-ACG-TTC-CTG-ATG-CT-3' zur Stimulation der TLR9-Rezeptoren.

Angenommen wird eine Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS). Das von der iNOS synthetisierte Stickstoffmonoxid führt zu einer Minderung der kardialen Kontraktilität. Dieser Schritt soll mit Hilfe des selektiven iNOS-Inhibitors S-Methylisothioharnstoff (SMT) nachgewiesen werden.

Trifft der oben beschriebene hypothetische Signalweg zu, dann führt eine Inkubation von Kardiomyozyten mit CpG-Oligonukleotiden zu einer Senkung der Kontraktilität. Die Zugabe von SMT jedoch sollte den CpG-Effekt aufheben und eine Erholung des kardiodepressive Einflusses zur Folge haben.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 verwendet, die dem Wildtyp entsprechen und keine genetische Veränderung bezüglich ihrer TLR-Rezeptoren aufweisen. Die Tiere stammten aus institutseigener Zucht, die Stammeltern der Zuchtlinie aus den Charles River Laboratories (deutsche Niederlassung in Sulzfeld). Es handelte sich ausschließlich um weibliche Tiere, um einen möglichen Einfluss des Geschlechts auszuschließen. Das Alter der Tiere lag zwischen 12 und 20 Wochen. Werden ältere Tiere zur Gewinnung von Kardiomyozyten genutzt, ist die Ausbeute vitaler Zellen deutlich geringer.

Die Haltung erfolgte unter Berücksichtigung geltender tierschutzrechtlicher und hygienischer Gesichtspunkte. Die transparenten Polycarbonkäfige befanden sich unter kontrollierten Umweltbedingungen in einem belüfteten Regalsystem (bei 20-22°C, 50% Luftfeuchtigkeit sowie ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus). Futter und Wasser wurde den Tieren unbegrenzt zur Verfügung gestellt. Die Geschlechtertrennung der Jungtiere erfolgte im Alter von 28 Tagen vor der Geschlechtsreife der Männchen. Bei Entnahme der Versuchstiere vor Präparationsbeginn wurde das Geschlecht der Mäuse noch einmal überprüft.

Nach der Gewinnung der Kardiomyozyten wurden die Zellen eines Tieres in drei Gruppen unterteilt. Untersucht wurden die Kardiomyozyten unmittelbar nach der Isolation als unbelastete Kontrollgruppe vitaler Kardiomyozyten, gelagert in Messtyrode, nach 5 stündiger Inkubation im Kulturmedium versetzt mit bakterieller CpG-Oligonukleotidlösung und nach 5 stündiger Inkubation im Kulturmedium mit CpG- und SMT-Zusatz (siehe Tabelle 2).

	<b>Gruppenbezeichnung</b>
Messung unmittelbar nach der Isolation, Zellen gelagert in Messtyrode	Gruppe Kon – 0 h
Messung nach 4 bis max. 6 h in Zellkultur mit CpG-Zusatz	Gruppe CpG – 5 h
Messung nach 4 bis max. 6 h in Zellkultur mit CPG- und SMT-Zusatz	Gruppe SMT – 5 h

**Tabelle 2:** *Gruppenbezeichnung*

Die Altersverteilung und Anzahl der Tiere den einzelnen Gruppen zugeordnet zeigt Tabelle 3.

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl der Tiere pro Gruppe</b>	<b>Mittelwert des Altes (in Tagen)</b>	<b>Standardabweichung (in Tagen)</b>
Kon – 0 h	8	103	23
CpG – 5 h	18	117	18
SMT – 5 h	8	102	23

**Tabelle 3:** *Altersverteilung der Versuchstiere in den einzelnen Gruppen*

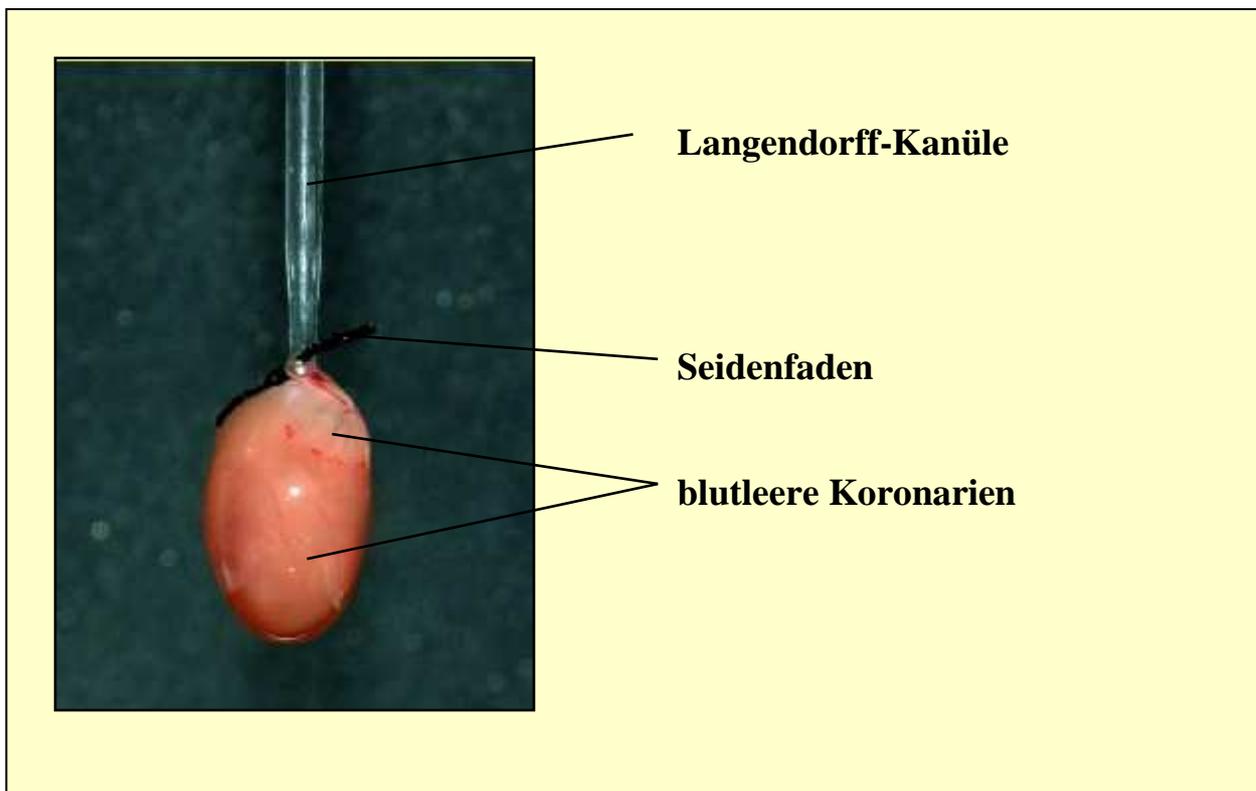
In einer zuvor angelegten Zeitreihe mit 30 Tieren wurde festgestellt, ab wie viel Stunden Inkubationszeit im Kulturmedium mit CpG mit einer Verminderung der Kontraktilität zu rechnen ist. Dabei wurde zum Zeitpunkt 0, nach 1, 2, 3, 4, 5 und 6 h Inkubationszeit gemessen. Es zeigte sich, dass der Effekt erstmalig nach 3 h Inkubation auftritt und nach ca. 5 h Inkubationszeit maximal wird. In die Gruppe CpG – 5 h gingen zusätzlich zu der eigentlichen Messung auch Daten aus oben genannter Zeitreihe ein, daher die deutlich höhere Anzahl der Tiere in der Gruppe (siehe Kapitel 2.5.2.3).

## **2.2 Präparation vitaler Kardiomyozyten**

Für die Kontraktilitätsmessung sind enzymatisch aus dem Zellverband gelöste, vitale Myozyten notwendig, welche mit Hilfe der retrograden Perfusion nach Langendorff aus Mäuseherzen gewonnen werden.

Die Versuchstiere werden nach einer ca. 30 sekundigen Äthernarkose durch Genickbruch getötet. Mit Schere und chirurgischer Pinzette werden die Mäuse laparotomiert, der Thorax transdiaphragmal eröffnet. Die Lungen werden vorsichtig an den Hilii abgetrennt und entfernt, um das Herz im Perikardbeutel darzustellen. Es erfolgt die Durchtrennung des Gefäßbündels, wobei ein möglichst langer Stamm der Aorta ascendens am Herzen belassen werden soll, möglichst viel umgebendes Fett- und Bindegewebe allerdings abpräpariert werden muss. Das Herz wird schonend in EGTA-Tyrode überführt (siehe Tabelle 4), darin erfolgt unter der Vergrößerung einer Stereolupe eine weitere Befreiung von Lungen-, Perikard- und Bindegewebsresten. Es darf dabei keine Herzhöhle eröffnet werden, da sonst bei der retrograden Perfusion nicht ausreichend Druck aufgebracht werden kann, um die Koronarien zu perfundieren.

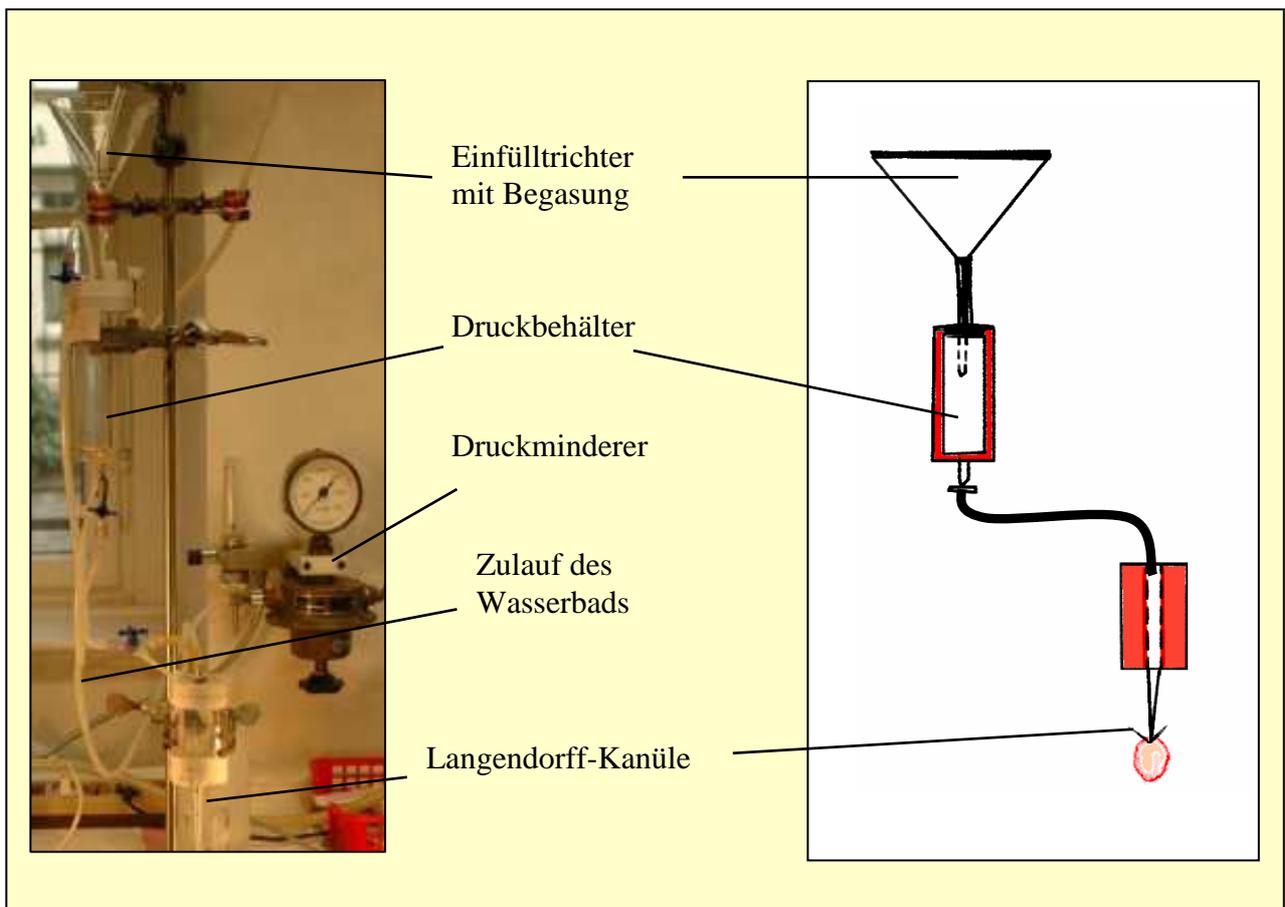
Unter mikroskopischer Kontrolle wird eine mit EGTA-Tyrode gefüllte Langendorff-Kanüle durch die Aorta in den linken Ventrikel geschoben. Mit einem Seidenfaden wird die Aorta auf dem Schaft der Kanüle dicht fixiert und die Kanüle über einen weichen Gummischlauch flexibel aber dicht mit dem Perfusionssystem verbunden (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3).



**Abbildung 2:** Aufgezogenes Herz während der Perfusion mit EGTA-Tyrode. Die Koronarien sind blutleer und erscheinen transparent.

Zwischen Tötung der Maus und Überführung des Herzens an das Perfusionssystem dürfen nicht mehr als maximal 8-10 Minuten vergehen, sonst ist mit hypoxischen Absterben des Gewebes und somit mit einer verminderten Ausbeute vitaler Zellen zu rechnen.

Die im Perfusionssystem verwendeten Lösungen werden vor Einleitung in das Herz oxygeniert und auf 36°C erwärmt. Die Langendorff-Perfusionsanlage besteht aus einem Einfülltrichter, in dem mit Hilfe einer Begasungsfrite die jeweilige Lösung mit Sauerstoff angereichert wird. Durch die Oxygenierung kann eine Verbesserung der Ausbeute erreicht werden. Über einen Druckbehälter wird der Perfusionsdruck optimiert, dabei sind Werte um maximal 500 mmWs tolerabel. Höhere Drücke zerstören das Gewebe, niedrige Drücke reichen häufig nicht für eine suffiziente Perfusion aus. Über ein Schlauchsystem, verbunden mit einem Wasserbad, wird die perfundierende Lösung angewärmt. Außerdem können bei Bedarf zwei Schreibtischlampen auf das Herz gerichtet werden, um eine Temperatur von 34° bis 36°C aufrecht zu erhalten.



**Abbildung 3:** Modifizierte Langendorff-Perfusionsanlage

Zur Entfernung des verbleibenden Blutes in Koronarien und Herzkammern wird zu Beginn mit einem relativ hohen Druck perfundiert, nach den ersten Sekunden wird dieser zur Schonung des Organs und zur Gewährleistung einer ausreichenden Verweildauer der Lösungen im Herzen gesenkt. Als Maß für den Fluss wird regelmäßig die Tropfgeschwindigkeit der vom Herzen abtropfenden Lösung kontrolliert. Ebenso wird in regelmäßigen Abständen die Temperatur überprüft und durch die Entfernung der Lampen zum Herzen beeinflusst. Bei einer hohen Durchflussschwindigkeit sinkt wegen der kurzen Zeit der Lösung im Wärmeaustauscher die Temperatur des Herzens, genauso wie sie bei langsamem oder sistierendem Durchfluss steigt.

Spontankontraktionen des Herzens sind vor der Perfusion möglich und sprechen für die Vitalität des Organs und eine kurze Überführungszeit. Zusammensetzung, Reihenfolge und Dauer der einzelnen Lösungen beruhen auf dem von Achenbach et al. (1985) entwickelten und von Meyer (1989) angepassten Schemas. Zusammensetzungen der Lösungen finden sich in Tabelle 4 und Tabelle 5 sowie im Tabellenanhang (Kapitel 6).

Initial wird fünf Minuten mit EGTA-Tyrode zur Senkung des Gesamt-Kalziums (Chelator-Wirkung von EGTA) der Kardiomyozyten auf weniger als  $10^{-4}\text{M}$  (Meyer, 1989) und zur Spülung des Herzens und der Koronarien perfundiert. Nach Ablauf der fünf Minuten und ordnungsgemäßer Kanülierung sowie Fixierung des Herzens sind Herzkammern und Koronarien blutleer. Letztere erscheinen mit wasserklarer Lösung gefüllt transparent, das Herz bläht sich prallelastisch. Etwasige Thromben in den Herzkammern zeigen sich als dunkle Schatten und lösen sich meist während der ersten Perfusionsschritte auf. Ein kleiner, persistierender Thrombus hat keine nennenswerte Auswirkung auf die Ausbeute der Präparation.

Zum Wechsel der Lösungen wird das Druckgefäß entlastet und die verbleibende erste Lösung abgelassen. Dann wird die neue Lösung nach einer ca. 30 sekundigen Begasung mit Sauerstoff im Einfülltrichter in den Druckbehälter gelassen.

Als zweite Lösung wird über fünf Minuten eine Hoch-Kalium-Lösung perfundiert, die Kaliumkonzentration entspricht der intrazellulären Konzentration. Über eine Erhöhung des extrazellulären Kaliums und eine Erhöhung der  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit führt diese zu einer Verminderung des Ruhopotentials. Durch diese Depolarisation werden die zur Muskelaktivität benötigten schnellen  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^+$ -Kanäle inaktiviert, wodurch es zu einer Schonung der Myozyten kommt. Durch das Ausbleiben der Verkürzungen und daher durch einen deutlich herabgesetzten Stoffwechsel der Myozyten sinkt der Sauerstoffbedarf der Zellen während der Kardioplegie auf ein Erhaltungsniveau.

Die Hoch-Kalium-Lösung wird in den folgenden Schritten als Wasch-Lösung zwischen den enzymatischen Lösungen verwendet. Diese werden auf der Basis der Hoch-Kalium-Lösung unter Enzym-Zusatz hergestellt (siehe Tabelle 5).

Substanz	EGTA-Tyrode	Messtyrode
KCl (Merck)	4 mM	4 mM
NaCl (Merck)	135 mM	135 mM
CaCl <sub>2</sub> (Merck)	-	1,8 mM
MgCl <sub>2</sub> (Merck)	1 mM	1 mM
HEPES (Merck)	2 mM	2 mM
BSA (Sigma)	-	1 mg/ml
Trypsinhibitor (Sigma)	-	0,017 mg/ml
Glucose (Merck)	-	9 mM
EGTA (Serva)	2,6 mM	-
pH – Wert (NaOH-titriert)	7,4	7,4

**Tabelle 4:** Zusammensetzung der Präparations- und Perfusionslösung EGTA-Tyrode sowie der Messtyrode

Nun folgt die Isolierung der einzelnen Zellen aus dem Zellverband durch enzymatische Lösungen. Zunächst wird zehn Minuten mit Trypsin-Lösung (Lösung 2 in Tabelle 5) perfundiert. Dabei handelt es sich um die Hoch-Kalium-Lösung mit einem Zusatz von 0,4 mg/ml Trypsin (Roche, Mannheim) mit der Aktivität von 25 BAEE-Units/ml<sup>1</sup>.

Trypsin ist eine Endopeptidase und spaltet regioselektiv Proteinverbindungen nach den basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und auch nach modifiziertem Cystein. Bei der Zellgewinnung für Zellkulturen wird aus Rinderpankreas gewonnenes Trypsin verwendet, um adhärente Zellen aus deren Verband zu lösen. Behandelt man die Zellen nicht zu lange mit Trypsin, werden nur die extrazellulären Proteine gelöst, die Zellen selbst nicht beschädigt.

Der Erfolg der Lyse durch die Trypsin- und die folgende Kollagenase-Lösung lässt sich abschätzen, wenn während der Perfusion die vom Herzen abtropfende Lösung zunehmende Viskosität

<sup>1</sup> Eine BAEE-Unit (S&T-Unit) katalysiert eine Änderung in der photometrischen Absorption von 0,001/min bei einer Wellenlänge von 253nm, unter 25°C und pH 7,6, in einer Reaktionsausgabe von 3,2 ml. Ca. 270 BAEE-Units entsprechen einer Internationalen Unit.

entwickelt. Dabei bildet das lysierte Material eine milchige, visköse, schleimig anmutende Substanz, die sich in kurze Fäden ziehen lässt. Das gesamte Präparat zeigt eine aufgeweichte und aufgequollene Konsistenz. Es dauert 5-10 min bis die beschriebenen Effekte eintreten.

Nach Anwendung der Trypsin-Lösung wird diese durch 2-3 minütige Perfusion mit der Hochkalium-Lösung wieder ausgewaschen.

Der fünfte Schritt besteht in der Anwendung einer Kollagenase-Lösung (Lösung 3 in Tabelle 5) für 10-15 min. Das aus *Clostridium histolyticum* gewonnene Enzym (Sigma-Aldrich, Steinheim, Typ L) spaltet spezifisch Proteinverbindungen der Aminosäuresequenz GLY-PRO-X-GLY-PRO, wobei X für eine beliebige Aminosäure steht.

Während der Perfusion mit der Kollagenase-Lösung steigt die Tropfgeschwindigkeit zum Ende durch den aufgelösten Zellverband stark an und weist so auf eine gelingende Präparation hin.

Substanz	Hochkalium-Lösung	Trypsinlösung	Kollagenaselösung
KCl (Merck)	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl (Merck)	4 mM	4 mM	4 mM
CaCl <sub>2</sub> (Merck)	0,02 mM	0,02 mM	0,02 mM
MgCl <sub>2</sub> (Merck)	1 mM	1 mM	1 mM
HEPES (Merck)	4 mM	4 mM	4 mM
Glucose (Merck)	9 mM	9 mM	9 mM
Kalium-Glutamat (Fluka)	130 mM	130 mM	130 mM
Trypsin (Roche)	-	0,4 mg/ml	-
Kollagenase Typ L (Sigma)	-	-	0,375 mg/ml
pH – Wert (KOH-titriert)	7,4	7,4	7,4

**Tabelle 5:** Zusammensetzung der Hochkaliumlösung, der Trypsin- und der Kollagenaselösung

Nach Abschluss der enzymatischen Verdauung wird das Herz von der Langendorff-Kanüle gelöst, in temperierte Präparationstyrode (entspricht der Messtyrode, Lösung 2 in Tabelle 4) überführt und mit einer kleinen Schere zerschnitten. Um das Lösen der Myozyten zu erleichtern, werden die Herzstücke wenige Minuten vorsichtig mit einer Glaspipette umgerührt. Eine zunehmende Trübung der Lösung zeigt den Erfolg der Präparation, das heißt die Herauslösung der Zellen aus ihrem Verband an. Um die vitalen Myozyten vor den aus den abgestorbenen Zellen frei werdenden Enzymen zu schützen, ist der Präparationstyrode Rinder-Serumalbumin (BSA) und Trypsininhibitor (beide Sigma-Aldrich) beigelegt.

Die entstandene trübe Lösung wird durch Nylongaze der Maschenweite 125 µm gefiltert, einzelne Myozyten passieren die Gaze, größere Gewebstücke nicht. Die Suspension wird in zwei Portionen in zwei Reagenzgläser aufgeteilt und kurz bei niedriger Drehzahl zentrifugiert. Dabei sinken die intakten, länglichen Zellen zu Boden und bilden einen Bodensatz von bräunlicher Färbung, die abgestorbenen, runden Zellen bleiben suspendiert und können so im Überstand abpipettiert werden.

Der Bodensatz wird nun in Kulturmedium resuspendiert und zu einer weiteren Aufreinigung vitaler Zellen zehn Minuten zur Sedimentation in einen Wärmeschrank bei 37°C gestellt. Nach der Sedimentation wird erneut der Überstand abpipettiert und verworfen, das Sediment hat nun idealer Weise eine hellere, gelbliche Färbung. Eine Portion der erhaltenen Zellen wird zur Inkubation in Kulturmedium verbracht, die zweite Portion zur sofortigen Messung des Zeitpunktes 0 h in Messtyrode suspendiert. Diese werden bei Zimmertemperatur in einem Erlenmeyer-Kolben aufbewahrt und zur Verbesserung der Überlebenszeit der Zellen vor Verschluss des Kolbens mit reinem Sauerstoff begast.

### **2.3. Inkubation**

Da die Wirkung von CpG auf die Myozyten im Verlauf über mehrere Stunden gemessen werden soll, ist es notwendig, die gewonnenen Zellen über einen längeren Zeitraum in einem guten Zustand zu erhalten. Bei Aufbewahrung in Messtyrode lässt die Vitalität der Zellen schnell nach, bereits eine Stunde nach Präparation empfiehlt es sich, Zellen zur Messung zu verwenden, welche in Kulturmedium bei 37°C im Wärmeschrank aufbewahrt wurden. Bei schwindender Vitalität zeigen die Myozyten eine erhöhte Spontanaktivität, abgestorbene Zellen verlieren ihre längliche

Form und gleichmäßige Streifung und verformen sich zu Kugeln. Um die Zellen in einem physiologischerem Medium zu erhalten, wird eine Kurzzeitkultur verwendet (Zusammensetzung siehe Tabelle 6).

Zum Erstellen der Zeitreihe werden die gewonnenen Zellen auf zwei Ansätze verteilt, einer Hälfte wird CpG in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zugesetzt, die andere Hälfte wird im Kulturmedium ohne Zusatz inkubiert. Beide Ansätze werden in Petrischalen im Brutschrank bei 31°C und O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Begasung (95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>) gelagert.

Substanz	Herkunft	Anteil
Fetales Kälberserum	Gibco, Grand Island, NY, USA	10 %
Minimal essential medium	Gibco, Grand Island, NY, USA	5 %
Gentamicin	Gibco, Grand Island, NY, USA	50 $\mu\text{g/ml}$
Dulbecco's mean eagle medium	Gibco, Grand Island, NY, USA	ad 100 %

**Tabelle 6:** Zusammensetzung des Kurzzeit-Kulturmediums

## 2.4. Messstand und Messmethoden

### 2.4.1 Versuchsstand

Am Versuchsstand müssen die isolierten Myozyten nicht nur unter kontrollierten, reproduzierbaren Bedingungen zu Verkürzungen einer bestimmten Frequenz angeregt werden, sondern es muss auch möglich sein, diese Verkürzungen aufzuzeichnen und auszuwerten. Des Weiteren muss eine geeignete Umgebung für die Zellen geschaffen werden, das heißt eine konstante Temperatur von 36°C und stetig frische Perfusion mit der nährstoffreichen Messtyrode. Die einzelnen Komponenten der benutzten Apparatur werden im Folgenden in ihren funktionellen Einheiten erläutert.



**Abbildung 4:** *Versuchsstand: 1 Mikroskop Axiovert 135 TV, 2 IonOptix Myo Cam, 3 Perfusionsystem, 4 Julabo F10 Wärmebad, 5 HyoFlo Absaugpumpe, 6 IonOptix HyperSwitch, 7 Transformator für die Xenonlampe, 8 IonOptix Fluorescence System Interface, 9 IonOptix Kamerasteuerung, 10 Verstärker, 11 Kontrollmonitor Datenerfassung, 12 Grass SD 9 Reizgerät, 13 Kontrollmonitor für Reizsteuerung*

#### **2.4.1.1 Inverses Mikroskop**

Als Mikroskop dient das Axiovert 135 TV der Firma Carl Zeiss, Oberkochen. Auf dem Objektisch trägt es die Versuchskammer (siehe 2.4.1.2 und Abbildungen 4 und 5), eine spezielle Kamera ist zur Aufzeichnung der Kontraktionen und Übermittlung der Bilddaten an den auswertenden Computer angeschlossen. Installiert ist das Mikroskop auf einem schwingungsgedämpften Tisch, welcher aus einem Metallgestell mit einer mechanisch entkoppelten, quarzsandgefüllten Edelstahlwanne und einer darauf liegenden Granitplatte besteht. Dieser wurde von der Werkstatt des physiologischen Instituts angefertigt.

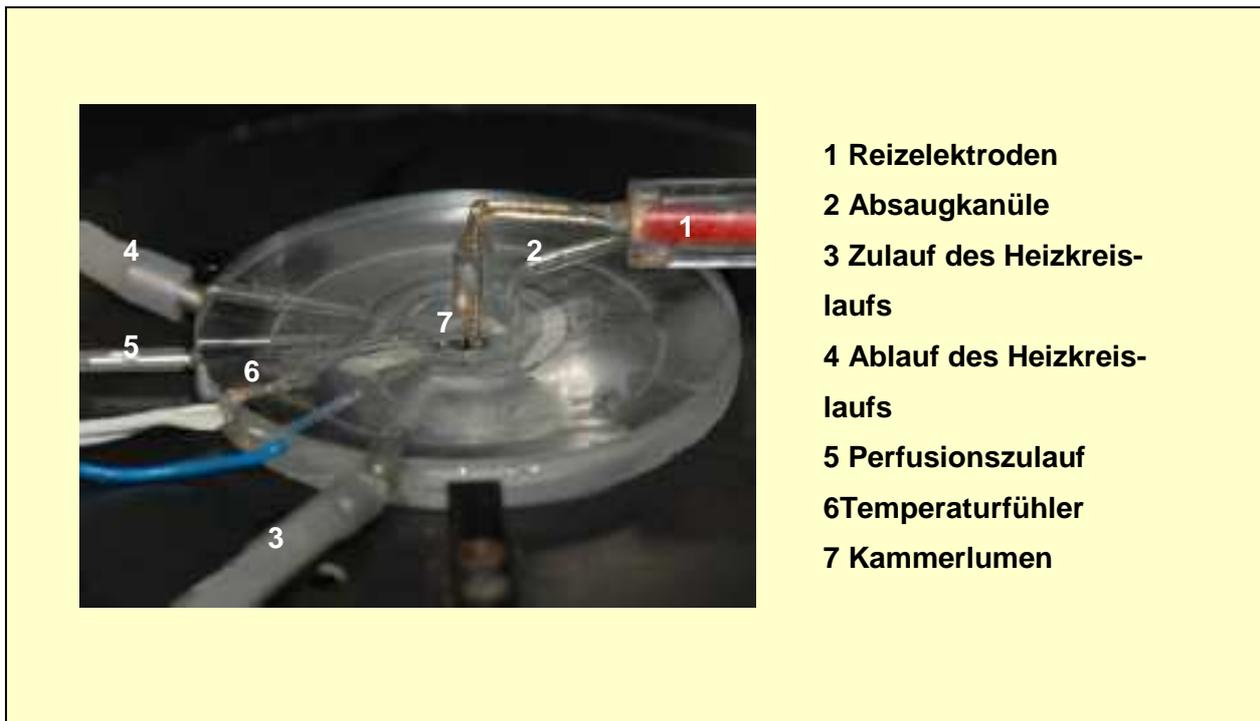
### 2.4.1.2 Versuchskammer

Bei der Versuchskammer handelt es sich um eine ebenfalls eigens von der Werkstatt des physiologischen Institutes hergestellte runde Acryl-Kammer, deren Boden ein aufgeklebtes Deckglas der Stärke Null bildet. Nach oben ist die Kammer offen. Der Außendurchmesser beträgt 50 mm. Die Versuchskammer wird auf dem Gleittisch des Mikroskops federnd eingeklemmt und kann vor dem Objektiv verschoben werden.

Knapp über dem Kammerboden befindet sich ein Zulauf, über eine gebogene Glaskapillare an der Oberseite wird die Perfusionslösung kontinuierlich abgesaugt. So ist eine gleich bleibende, stets frische Durchspülung der Versuchskammer gewährleistet. Umlaufend in der Wand der Acrylkammer ist ein von der Perfusion getrennter Wasserumlauf zum Beheizen der Versuchskammer eingelassen. Ein elektronischer Temperaturfühler ist in der Kammer eingebaut und mit der Steuerung eines externen Wärmebades (Julabo F10; Julabo Inc., Allentown, PA, USA) verbunden. Dieses Wasserbad temperiert und pumpt den Wasserkreislauf. Beides gewährleistet die gleich bleibende Temperatur von  $36^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  und einen konstanten, strömungsarmen Flüssigkeitsspiegel. Für die Wasserzuleitung des Perfusionssystems wurden Perfusorenspritzen (Fa. Braun Medical AG, Melsungen) verwendet, welche zur Erzeugung eines konstanten hydrostatischen Druckes in einer Lochleiste, 30 cm höher als die Versuchskammer, angebracht werden. Über einen Tropfenzähler (Exadrop, ebenfalls Fa. Braun) und Drei-Wege-Hähne ist die Durchflussrate regulierbar.

Durch eine Unterdruckpumpe unter Zwischenschaltung einer Saugflasche wird über die oben erwähnte Glaskapillare eine stete Absaugung erreicht. Die Kapillare ist schräg angeschliffen, ragt senkrecht von oben in die Versuchskammer und ermöglicht ein Abreißen des Flüssigkeitsfilms ohne Verwirbelung. Durch den tiefen Zulauf auf Höhe der abgesenkten Reizelektroden (siehe Kapitel 2.4.1.3 und Abbildung 5) soll eine vollständige und gleichmäßige Perfusion erreicht werden.

Bei einem Kammerinhalt von ca. 0,4 bis 0,6 ml führt ein konstanter Fluss von 70 ml/h zu einem mehrfachen Austausch der gesamten Kammerflüssigkeit pro Minute.



**Abbildung 5:** Versuchskammer mit Reizelektroden

### 2.4.1.3 Perfusion

Die Perfusion der Versuchskammer muss mehrere Bedingungen erfüllen. Läuft sie zu schnell, dann werden die Zellen fortgeschwemmt. Außerdem kann eine Temperatur von 36°C nicht erhalten werden. Geschieht die Perfusion zu langsam, dann erhitzt sich das Lumen der Versuchskammer zu stark und die Zellen werden nicht ausreichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt. So muss die Perfusion gleichmäßig und möglichst ohne Wirbel erfolgen.

Der Kolben einer 50 ml fassenden Perfusorspritze wird circa 30 cm über der Versuchskammer in einer Lochleiste befestigt. Dieser Höhenunterschied gewährleistet den hydrostatischen Druck, der ausreicht, um den nötigen Perfusionsdruck aufzubringen. Mit Hilfe eines Tropfenzähler (Exa-drop®, Fa. Braun) kann die Tropfgeschwindigkeit während der Messung konstant auf 70 Tropfen pro Minute, zum Spülen auf über 250 Tropfen pro Minute eingestellt werden. Die Leitung zwischen Perfusorspritze und Versuchskammer wird über einen Wärmeaustauscher, versorgt von demselben Wärmebad wie die Kammer, auf 36 °C erwärmt.

Die Absaugkapillare ist über einen Schlauch mit einer Absaugpumpe (HyoFlo, Herts, UK) und einer Auffangflasche verbunden. Durch den erzeugten Unterdruck gelingt eine gleichmäßige Ab-

saugung. Die knapp über der Flüssigkeitsoberfläche angebrachte Glaskapillare erlaubt eine Absaugung weitgehend ohne Turbulenzen.

#### **2.4.1.4 Externe Stimulation**

Durch eine externe Reizung, die zu einem Aktionspotential führt, kann bei vorgegebener Frequenz eine Verkürzung der Kardiomyozyten ausgelöst werden. Erregt wurden die Zellen mit Hilfe des Reizgerätes SD 9 der Firma Grass (Quincy, MA, USA) mit biphasischen Rechtecksimpulsen. Es wurden die Frequenzen 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Hz angewendet, jeweils mit einer Reizdauer von 0,4 ms pro Einzelreiz und einer Spannung von 30 Volt. Diese Reize genügen, um ein Aktionspotential auszulösen.

Die in der Versuchskammer befindliche Reizelektrode besteht aus zwei parallel angeordneten, 0,8 mm starken Golddrähten, welche mittels eines Mikromanipulators präzise über der zu stimulierenden Zelle positioniert werden können.

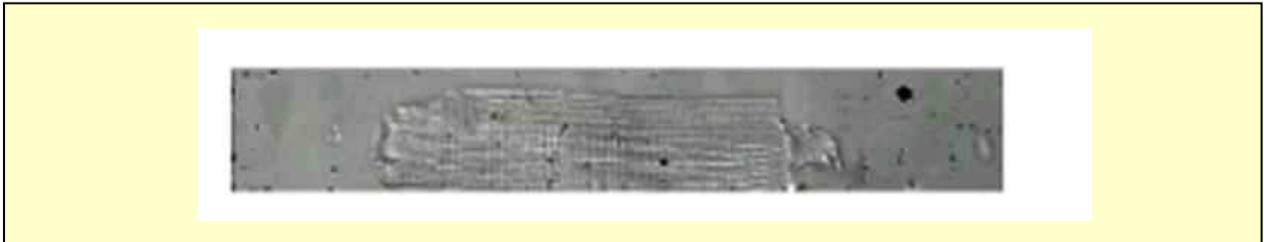
Der Stimulator wird von einem PC unter Zwischenschaltung eines Interfaces (Digidata 1200 von Axon Instruments, Union City, CA, USA) und eines Verstärkers (Werkstatt des Physiologischen Instituts) angesteuert (siehe Abbildung 4). Mit Hilfe des Programms Pclamp (ebenfalls Axon Instruments) entwickelte Reizroutinen laufen automatisch ab, womit eine gleich bleibende Stimulation und Reproduzierbarkeit jedes Messganges gegeben ist.

Bei jeder Stimulationsfrequenz durchlaufen die Zellen zwanzig Verkürzungen, die Reizserien werden in der Abfolge 0,5, 10, 1, 8, 2, 6 und 4 Hz appliziert. Die Abwechslung zwischen hohen und niedrigen Frequenzen wird gewählt, um einen Einfluss durch Gewöhnung der Zellen an eine langsam steigende bzw. fallende Frequenzreihe auszuschließen. Zwischen dem letzten Reiz der vorangegangenen Frequenzfolge und der nächsten Serie liegt eine Stimulationspause von 30 Sekunden.

#### **2.4.2 Quantifizierung der Sarkomerverkürzung**

Die Sarkomerverkürzung wird als Maß der Kontraktilität gemessen. Dabei wird sich der Querstreifung der Herzmuskelzelle bedient: wie in der Skelettmuskulatur sind die Myofilamente Myo-

sin und Aktin regelmäßig angeordnet. Dadurch ergibt sich die lichtmikroskopisch darstellbare charakteristische Querstreifung, wobei der Abstand zwischen zwei dunklen Streifen der Länge eines Sarkomers entspricht (Abbildung 6).



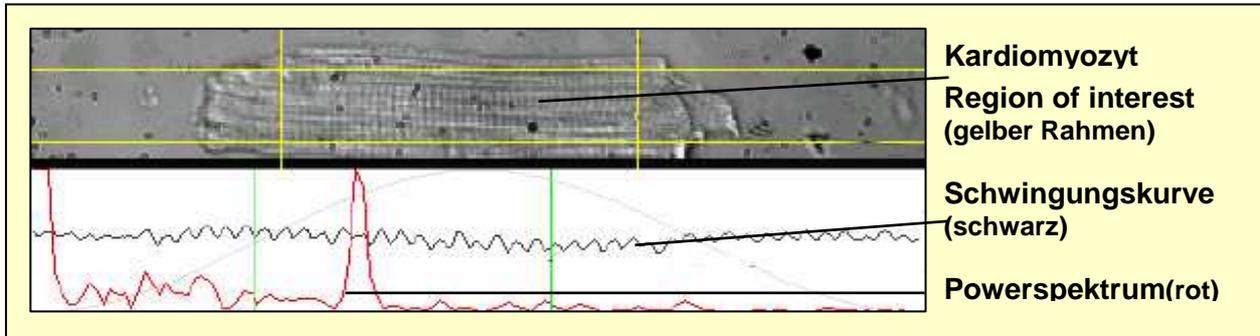
**Abbildung 6:** *Vitale Kardiomyozyte*

Mit Hilfe eines speziellen „video imaging“ Systems (IonOptix, Milton, MA, USA) wird die isolierte Herzmuskelzelle mit einer Bildfrequenz von 240 Hz dargestellt. Dazu ist eine Kamera am zweiten Strahlengang des Mikroskops installiert, durch das Verschieben des Gleittisches kann die Zelle im Bildausschnitt optimal positioniert werden, das heißt möglichst parallel zur Längsachse des Messfensters. Dabei werden Zellen ausgewählt, welche eine möglichst gleichmäßige Querstreifung aufweisen und die regelmäßigsten Areale in einer Ebene werden orthogonal zum Messfenster eingestellt. Bereiche, in denen andere Zellen die zu messende überlappen oder berühren sind ungeeignet. Allein durch die Nähe einer in einer anderen Richtung kontrahierenden Zelle wird eine flimmerfreie Nulllinie in der Aufzeichnung gestört.

Durch die oben genannte Querstreifung der Kardiomyozyten lassen sich regelmäßige Helligkeitsunterschiede darstellen. Diese Hell-Dunkel-Kontraste werden von der Aufzeichnungssoftware als Graustufen wahrgenommen und auf dem Bildschirm abgebildet.

Im Idealfall kann von der Software eine sinusoidale Schwingungskurve berechnet werden, wobei eine Periode der Länge eines Sarkomers entspricht. Da die lebenden Zellen aber nicht dem Idealfall entsprechen, sondern biologischen Schwankungen unterliegen, weist die extrapolierte Kurve mehr oder weniger Streuungen auf. Minimiert werden diese durch die Auswahl einer wirklich ebenmäßigen Zelle und der oben erwähnten parallelen Positionierung. Darüber hinaus errechnet die Software durch eine Fast-Fourier-Transformation ein „Powerspektrum“. Dieses Powerspektrum gibt für jede Sarkomerlänge die Häufigkeit im Messausschnitt an, die Lage des Maximums ist stellvertretend für die absolute Sarkomerlänge und die Form des Maximums Hinweis gebend auf die Ebenmäßigkeit der erfassten Sarkomere. Je schmaler das Maximum, desto isoformer die

erfassten Sarkomere. Die Analyse wird in Echtzeit vorgenommen, dargestellt und aufgezeichnet. Dadurch lässt sich die Qualität der Messung sofort beurteilen.



**Abbildung 7:** *IonOptix-Darstellung eines Myozyten mit berechnetem Powerspektrum*

Die Kardiomyozyte wird also parallel zur Achse des Messfensters eingestellt, ein gleichförmiger Bereich der Zelle ausgewählt (gelbe Markierung, siehe Abbildung 7), daraufhin wird automatisch und in Echtzeit die Schwingungskurve und das Powerspektrum berechnet.

Die Verkürzung der Zelle wird als Veränderung der absoluten Sarkomerlänge nach unten dargestellt, erkenntlich durch eine Verschiebung des Powerspektrums nach links. Aus der Regelmäßigkeit und Auslenkung der Kontraktion lassen sich bereits Schlüsse auf die Vitalität der Zelle ziehen. Abbildung 7 zeigt eine Zelle, die zur Messung eingestellt wurde. Lichtmikroskopisch bestimmbare Eigenschaften der Zelle wie aufgequollene, abgerundete oder ausgefranste Zellenden, unscharfe Querstreifung und atypische Verformungen lassen sich erkennen und so geschädigte Zellen ausschließen. Auch Zellen, die eine mikroskopisch regelhafte Physis bieten, zeigen unter Umständen spontane Kontraktionen oder eine verbreiterte Zacke im Powerspektrum. Diese Zellen erweisen sich oft während der Messreihe als unbrauchbar, zum Beispiel durch lange Phasen der Spontanaktivität oder Hyperkontraktionen während der Messreihe.

## **2.5 Durchführung der Messung**

### **2.5.1 Fixierung der Zellen in der Messkammer**

Sowohl das Einsetzen der Perfusion als auch der stete Durchfluss der Versuchskammer sowie die Verkürzung der Zellen selbst können Lageveränderungen und damit Veränderungen des orthogonal eingestellten Messbereichs verursachen. All dies macht eine Fixation des Myozyten während des Messvorgangs notwendig. Die Zellen selbst verfügen nicht über Bindungstellen in den Membranen, welche an dem Glasboden der Versuchskammer anheften würden.

Verwendet wird Laminin (Sigma-Aldrich, Steinheim), welches sich aus drei Polypeptidketten zusammensetzt (A, B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>), wobei die Aminosäureabfolge Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg in der B<sub>1</sub>-Kette eine hohe Affinität zum 67kDa-Rezeptor auf der Myozytenoberfläche besitzt (Lesot et al., 1983; Von der Mark und Kuhl, 1985). Der Rezeptor ist Teil eines Transmembranproteins, das intrazellulär mit dem Zytoskelett und Aktin in Verbindung steht (Kleinmann et al., 1987).

Das Laminin wurde in Messtyrode gelöst, von dieser Lösung in einer Konzentration von 8 µg/ml drei Tropfen in die Kammer eingebracht und über sechs Minuten inkubiert. Danach wird der Überstand mit Hilfe der Perfusion ausgewaschen und wenige Tropfen Zellsuspension in die Messkammer eingebracht. Diese können in den folgenden sechs Minuten ohne Perfusion zu Boden sinken und sich mit Hilfe des Laminins an den Glasboden anheften. Während der Anheftungsphase muss die Perfusion des Umlaufes bzw. das Wärmebad ausgeschaltet werden, da sonst bei mangelndem Durchfluss von frischer, kalter Messtyrode die Temperatur in der Kammer auf ein schädigendes Niveau ansteigen würde.

Bei einsetzender Perfusion geschieht eine weitere Selektierung, nur vitale Zellen heften sich an und erhalten ihre typische, längliche Form, bereits abgestorbene Zellen sinken langsamer ab und behalten eine rundliche Gestalt. Sie werden mit dem Durchstrom fortgespült.

## **2.5.2 Messprotokolle**

### **2.5.2.1 Zeitreihe mit CpG-ODN**

Um ein genaues Protokoll für die eigentliche Fragestellung, die Inkubation mit CpG und nachfolgende Gabe des iNOS-Inhibitor SMT zum Nachweis der Signalkette zu erstellen, war es notwendig, den Zeitpunkt des CpG-Effekts festzustellen, um die optimale Inkubationsdauer zu ermitteln. Auf die gleiche Weise wie die eigentlichen Messungen wurde eine Zeitreihe erstellt, während der die präparierten Kardiomyozyten über die gesamte Dauer von sechs Stunden mit Kulturmedium und CpG in einer Konzentration von 1  $\mu$ M inkubiert wurden. Zum Zeitpunkt Null und jede folgende Stunde wurden Zellen dem Nährmedium entnommen und auf die oben beschriebene Weise stimuliert. Die Kontraktilität wurde bestimmt und im Verhältnis zur Inkubationsdauer aufgetragen.

Eine signifikante Herabsetzung der Kontraktilität ließ sich zwischen der 0 h-Kontrollgruppe und den Gruppen 4 h und 5 h Inkubationszeit beobachten, so dass diese für die folgende Messreihe mit dem iNOS-Inhibitor als Inkubationsdauer verwendet wurden.

### **2.5.2.2 Kontrollgruppe**

Vorversuche unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass bei Lagerung in Kulturmedium ohne Zusätze die Kontraktilität der Kardiomyozyten auch nach über 6 Stunden nicht erniedrigt war (Baumgarten et al., 2006; Knuefermann et al., im Druck). Deswegen erfolgte für diese Arbeit keine weitere Messung ohne jegliche Zusätze über 6 Stunden. Als Kontrolle für den CpG-Effekt wurden die Messungen frisch präparierter Kardiomyozyten bei 0 h Inkubation verwendet (Gruppe Kon – 0 h).

### **2.5.2.3 Messung der Kontraktilität unter CpG-Inkubation mit iNOS-Inhibitor SMT**

Wie oben erwähnt zeigte sich die maximale Minderung der Kontraktilität unter Inkubation mit CpG nach vierstündiger Inkubationsdauer. Dementsprechend wurde bei dem Vergleich von mit

CpG inkubierten Kulturen (CpG – 5 h) und mit CpG und dem iNOS-Inhibitor S-Methylisothioharnstoff (SMT) inkubierten Kulturen (SMT – 5 h) von Beginn der vierten bis zum Ende der fünften Stunde nach Lagerung im Kulturmedium bei 37°C im Wärmeschrank gemessen. Daraus ergibt sich ein Mittel der Inkubationsdauer von fünf Stunden. SMT wurde 30 min vor Ende der jeweiligen Inkubationszeit in einer Konzentration von 100 nm/ml dem Kulturmedium zugegeben. Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass diese Konzentration ausreichte, um die iNOS in den Kardiomyozyten ausreichend zu hemmen.

Sowohl in Gruppe Kon – 0 h als auch in Gruppe CpG – 5 h wurden die Messungen der entsprechenden Inkubationsdauer aus den Messungen für die Zeitreihe mit aufgenommen und für die Auswertung verwendet.

## **2.6 Stimulantien**

### **2.6.1 Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Oligonukleotide (CpG-ODN)**

Um das Modell einer bakteriellen Sepsis zu simulieren, wurden die isolierten Kardiomyozyten wie bereits mehrfach erwähnt, mit 1 µM CpG-Oligonukleotid 1668 inkubiert.

Dabei ist das Oligonukleotid der Sequenz 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT-3' charakteristisch für Bakterien-DNA im Gegensatz zu DNA von Wirbeltieren. Bei Wirbeltieren liegt ein hoher Prozentsatz der CG-Nukleotide methyliert vor, dementsprechend wirkt das unmethylierte CG-Motiv als PAMP (siehe Einleitung). Bereits Sparwasser et al. beschrieben 1997, dass bakterielle DNA eine Antwort des angeborenen Immunsystems auslösen kann, welche zum septischen Schock führt. Latz et al. (2004) untersuchten die Bindung von CpG an den TLR9 im endoplasmatischen Retikulum.

CpG stellte also ein adäquates Agens dar, um vermittelt von TLR9 ein septisches Geschehen zu simulieren. Sowohl Hemmi et al. (2000), als auch Bauer et al. (2001) arbeiteten mit synthetischen CpG-Sequenzen und zeigten, dass diese genauso wie natürliche DNA das angeborene Immunsystem stimulieren.

Das verwendete CpG wurde von dem Syntheselabor TIB MOBIOL, Berlin in einer Konzentration von 500 nmol/ml bezogen. Es wurde in einer 1  $\mu$ M-Lösung in Aqua dest. angesetzt und tiefgefroren bis zum Beifügen zum Kulturmedium gelagert.

### **2.6.2 S-Methylisothioharnstoff**

Der hypothetisch angenommene und durch die Versuchsreihe zu beweisende Transduktionsschritt vom CpG-bindenden TLR9 zur sinkenden kardialen Leistung führt über die induzierte Stickstoffmonoxidsynthase. iNOS-induzierende Gene werden durch den vorangegangenen Signalweg vermehrt transkribiert und induzieren die Translation der iNOS. iNOS bildet Stickstoffmonoxid, der zur Kontraktilitätsminderung der Herzmuskelzelle führt.

S-Methylisothioharnstoff (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ist ein potenter, spezifischer Inhibitor der iNOS an der L-Arginin-Bindungsstelle des Enzyms und blockiert dosisabhängig die Aktivität (Southan et al., 1995). Der Inhibitor wurde in der Konzentration von 100  $\mu$ M dem Kulturmedium 30 min vor Ende der Inkubation zugegeben.

## **2.7 Auswertung**

Die Kontraktionen werden mit Hilfe des Programms IonWizard sarcomere length and PMT acquisition (IonOptix, Milton, MA, USA) aufgezeichnet und weiterverarbeitet.

### **2.7.1 Auswertung der Sarkomerverkürzungen**

Vorversuche anderer Mitarbeiter der Arbeitsgruppe (Tiemann et al., 2003, Baumgarten et al., 2006; Schumacher, 2006; Vervölgyi, 2007) ergaben, dass die ersten Stimulationen einer Serie zu einer stärkeren Auslenkung, d.h. zu einer größeren Verkürzung der Sarkomere führen und erst nach durchschnittlich zehn Verkürzungen das Niveau einer gleichmäßigen Verkürzung erreicht wird. Daher wurden für die Bestimmung der Verkürzung im Gleichgewicht die jeweils letzten fünf Verkürzungen einer Serie, also Reizantwort 16 bis 20 jeder Frequenz verwendet. Mithilfe

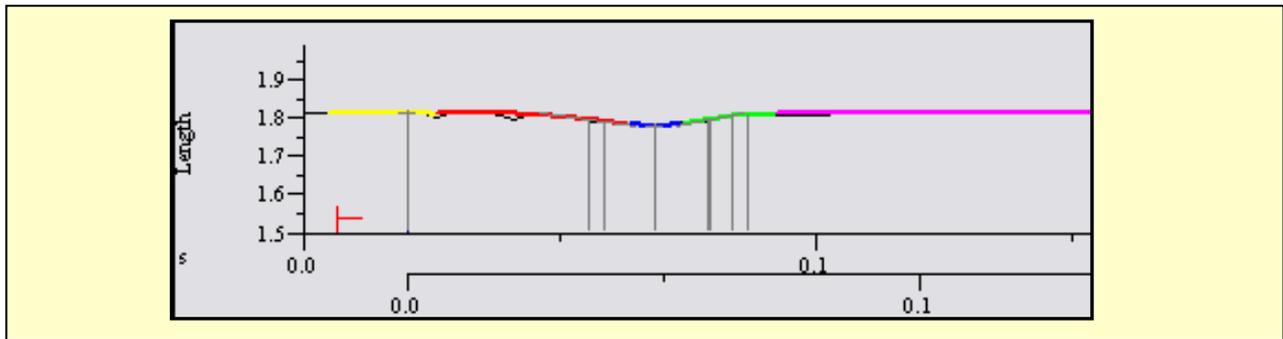
der im IonOptix-Programm enthaltenen Auswertungssoftware ist es möglich, einzelne Verkürzungen zur Auswertung zu selektieren bzw. auszuschließen. Bei jedem der von der Reizroutine des Steuerungs-PCs an das Reizgerät gesendeten Impulse zur Stimulation wird auch ein Trigger an das IonOptix-System abgegeben. Anhand dieses Signals werden nur die der Reizroutine entsprechenden Kontraktionen von der Auswertungssoftware als solche erkannt und können nun angewählt werden. Die letzten fünf Verkürzungen einer Serie können so gemittelt und an diese gemittelte Kontraktion kann mithilfe der Auswertungssoftware eine Funktion angelegt werden, die verschiedene Parameter berechnet.



**Abbildung 8:** Auswertung der Kontraktionen mit IonWizard (genaue Beschreibung im Text)

Im oberen Teil des Bildschirms (Abbildung 8) ist die Originalregistrierung der Veränderung der Sarkomerlänge dargestellt. Das durchgehende Niveau bei ca. 1,6 bis 1,8  $\mu\text{m}$  entspricht der basalen Sarkomerlänge (baseline) der gemessenen Sarkomeren, die Auslenkungen nach unten entsprechen den Verkürzungen bei Stimulation. Die blauen Striche auf der Linie unter den Kontraktionen entsprechen dem Triggersignal, gegeben von dem Steuerungs-PC, die Balken über den Kontraktionen indizieren die Auswählbarkeit der jeweiligen einzelnen Verkürzungen.

Im mittleren Abschnitt der Auswertung ist die Mittelung der oben ausgewählten Einzelkontraktionen angezeigt. Anhand dieser Kurve errechnet die Software die unten näher erläuterten Parameter, die die gemittelte Verkürzung charakterisieren und in numerische Werte überführt werden können.



**Abbildung 9:** Gemittelte Sarkomerverkürzung aus den letzten 5 Verkürzungen einer Serie. (Auf der x-Achse ist die Zeit in Sekunden, auf der y-Achse die Sarkomerlänge in Mikrometer aufgetragen.)

Die verwendeten Parameter sind:

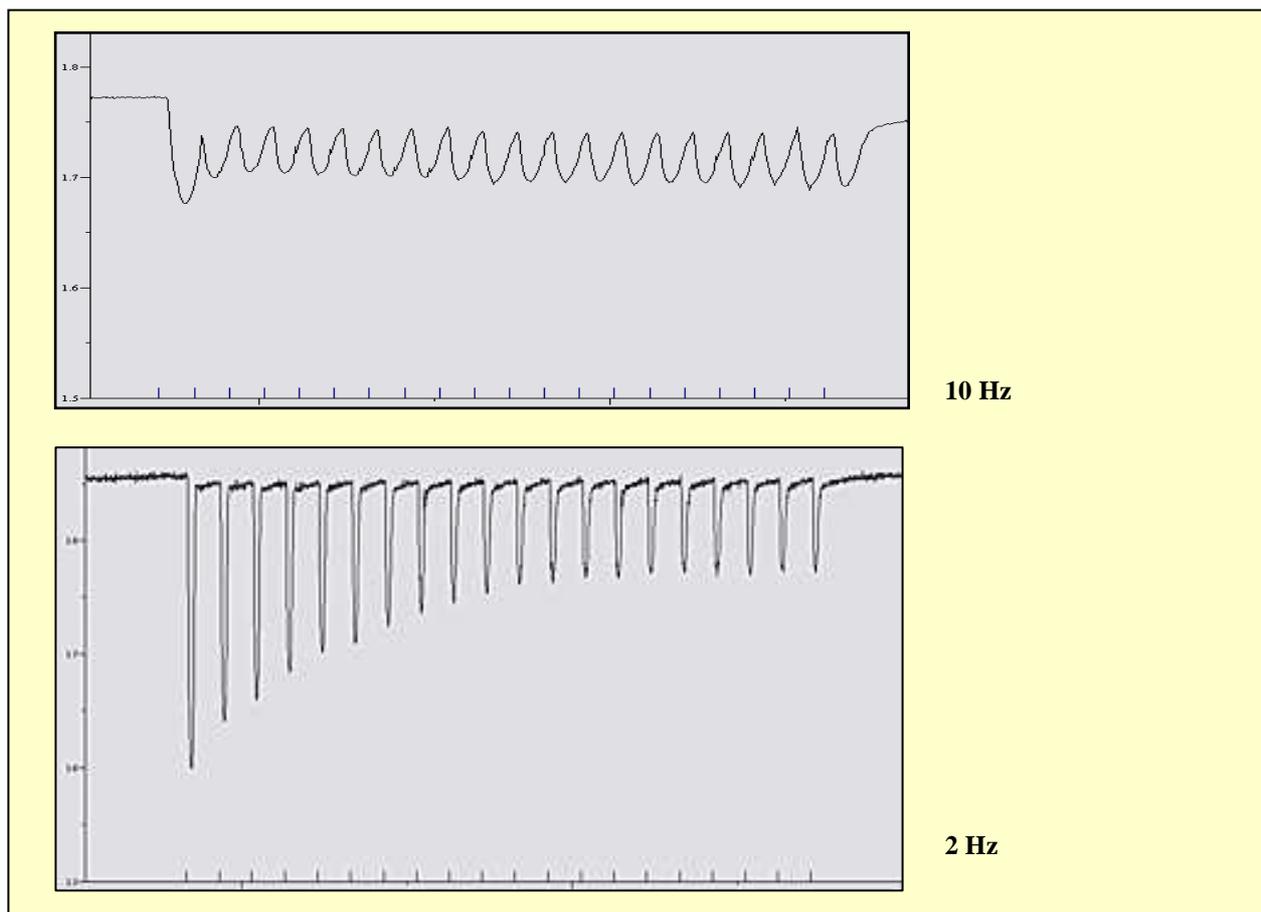
- peak height (peak h): Die Differenz der Sarkomerlänge in Ruhe zur Sarkomerlänge zum Zeitpunkt der maximalen Verkürzung (= Verkürzungsamplitude)
- Verkürzungsgeschwindigkeit (dep v): Die Verkürzungsgeschwindigkeit wird von IonOptix als die größte Steigung des absteigenden Schenkels der Verkürzungszacke errechnet (mit negativen Werten, da die Auftragung der Verkürzung nach unten erfolgt)
- Relaxationsgeschwindigkeit (ret v): Analog zur oben genannten Verkürzung des Sarkomers die maximale Geschwindigkeit der Entspannung des Sarkomers während der Relaxation (bei Auftragung der Relaxation von unten nach oben als positiver Wert)
- time to baseline 90% (t to bl 90.0%): Dauer der Verkürzung bis zur Wiederherstellung der Sarkomerlänge entsprechend 90% der Ruhelänge
- baseline (bl): Die Sarkomerlänge in Ruhe.

Die Werte einer jeweiligen Serie werden als \*.txt-Datei exportiert. Mittels einer Igor-Routine (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR, USA) und der Tabellenkalkulation MS Excel 2003 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) werden alle Auswertungen einer Frequenz aus

einer Messgruppe zusammengeführt und in einer Exceltabelle eingetragen. Die Werte eines Parameters unter den gleichen Rahmenbedingungen (Frequenz, Inkubationsdauer, Gruppe) werden gemittelt und mit Hilfe von Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) graphisch dargestellt.

### 2.7.2 Baseline-Korrektur

Beginnend bei 6 Hz zeigt sich folgendes Phänomen bei steigender Reizfrequenz: Während der zwanzig Kontraktionen tritt eine Senkung der Grundlinie auf, da der zeitliche Abstand zwischen zwei Reizen bei den hohen Frequenzen zu klein für eine vollständige Relaxation der Zelle wird. Die Sarkomerlänge kann in den Erholungsphasen nicht mehr den Ruhewert erreichen.



**Abbildung 10:** Gegenüberstellung 10 Hz und 2 Hz: Deutliche Absenkung der Baseline bei 10 Hz ab der zweiten Kontraktion (auf der x-Achse die Zeit in Sekunden, auf der y-Achse die Länge der

*Verkürzung in Mikrometern). Die Skalierung der x-Achse ist in beiden Teilbildern unterschiedlich. Bei 10 Hz entspricht ein Teilstrich 100 ms, bei 2 Hz entspricht ein Teilstrich 500 ms.*

Bei der automatischen Berechnung der Kurvenparameter kann die Auswertungssoftware diesem Umstand keine Rechnung tragen. Da die Verkürzungsamplitude zu klein bestimmt würde, muss die Baseline, mit der gerechnet wird, nachträglich korrigiert werden. Dazu werden die Verkürzungsamplituden auf die Ruhesarkomerlänge vor Beginn der Reizserie bezogen. Um die Baseline zu korrigieren, wird die Differenz zwischen der Ruhesarkomerlänge vor der Stimulation und der maximalen Sarkomerlänge während der Serie (welche die Auswertungssoftware ausgibt) bestimmt. Diese wird zur Verkürzungsamplitude addiert.

## **2.8. Statistische Auswertung**

Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) werden in der Auswertung durch das Microsoft-Programm Excel ermittelt, dann mit dem Programm GraphPad Prism 3.0. statistisch ausgewertet und graphisch aufgetragen. Die in Prism erstellten Graphen stellen die Amplitude der Sarkomerverkürzung in Abhängigkeit zur Frequenz dar. Für jede Gruppe wird ein Graph erstellt. Diese werden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (One-way-Anova) analysiert. Dabei werden folgende Signifikanzschranken festgelegt:

- $p > 0,05$  nicht signifikant
- $p \leq 0,05$  signifikant

### 3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Kontraktilitätsmessung dargestellt. Insgesamt wurden 39 Versuchstiere eingesetzt, davon wurden 30 zur Erstellung der Zeitreihe verwendet und 9 ausschließlich zur Erstellung der Vergleichsmessung von Inkubation mit CpG und CpG mit SMT. Wie bereits erwähnt (Kapitel 2.5.2.3) wurden auch Messungen aus der CpG-Zeitreihe in die SMT-Versuchsreihe mit einbezogen. Insgesamt wurden 170 Zellen bei jeweils 7 Frequenzen getestet.

Die graphischen Darstellungen in Prism zeigen jeweils die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler. Die Absolutwerte aller dargestellten Graphen finden sich in Tabellenform im Anhang dieser Arbeit (Kapitel 6).

#### 3.1 Wirkung von CpG auf das Verkürzungsverhalten von Kardiomyozyten

Zur Feststellung des Transduktionsweges der CpG-vermittelten Kontraktilitätsminderung wurden Herzmuskelzellen über den Zeitraum von sechs Stunden in Kulturmedium mit CpG inkubiert. Als Kontrolle dazu dienten frisch isolierte Zellen. Dies war ausreichend, da in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe mehrfach gezeigt wurde, dass die Verkürzungsamplitude sich während der sechsstündigen Kurzzeitkultur nicht verändert (Baumgarten et al., 2006; Knuefermann et al., im Druck; siehe Kapitel 2.5.2.2).

Dabei gehen Daten von 30 Tieren im Alter von 12 bis 20 Wochen in die Auswertung ein.

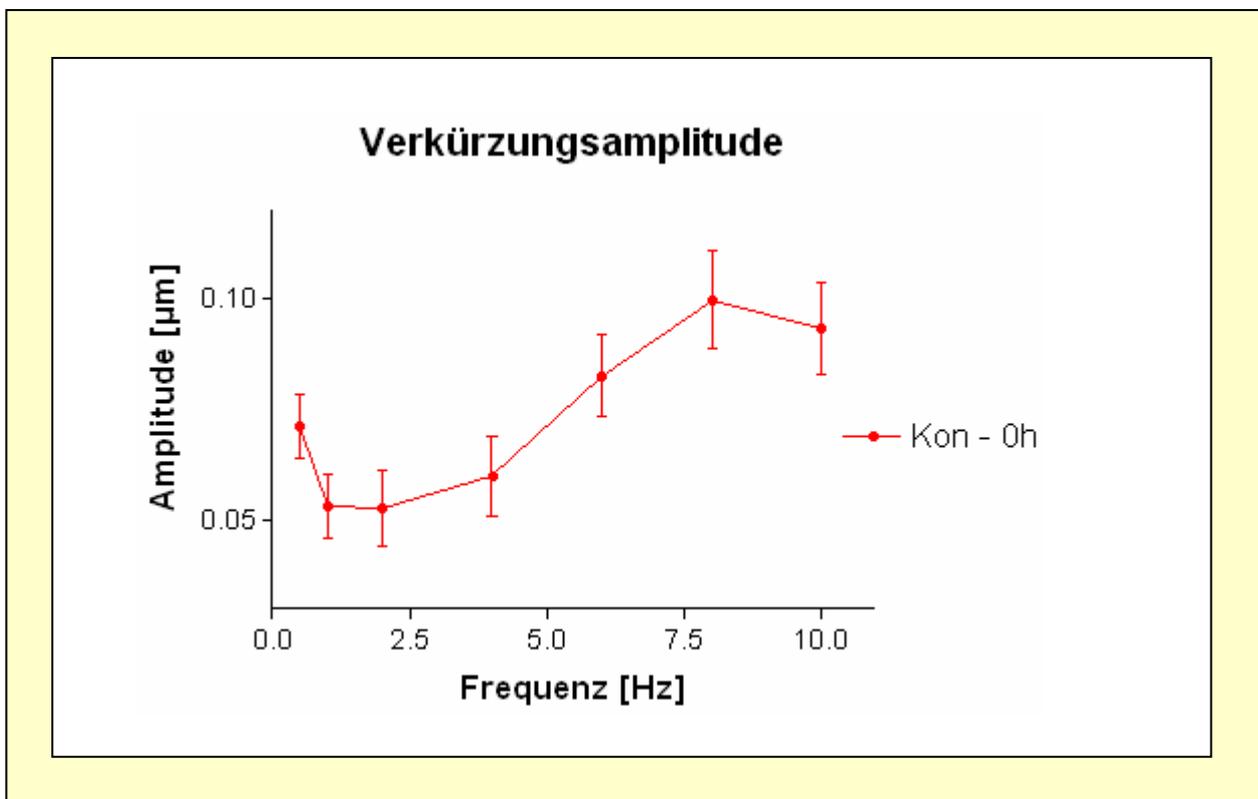
Die isolierten Kardiomyozyten werden zum Zeitpunkt Null nach der Präparation direkt in Messtyrode und dann nach 1, 2, 3, 4, 5 und 6 h Inkubation aus dem Kulturmedium in die Messtyrode überführt und ihr Kontraktilitätsverhalten nach der oben genannten Methode aufgezeichnet. Verglichen wird die Kontraktilität im Gleichgewicht.

Bereits an Hand der Originalregistrierungen während der Aufzeichnung ließ sich erkennen, dass die Ruhesarkomerlänge der mit CpG-inkubierten Zellen nach drei Stunden Inkubation deutlich unter der Kontrollgruppe lag.

### 3.1.1 Verkürzungsverhalten im Gleichgewicht

Im Folgenden wird das Verkürzungsverhalten der Myozyten im Gleichgewicht beschrieben. Als graphisches Beispiel dient jeweils der Verlauf der Kontrollgruppe direkt nach Präparation (Gruppe Kon – 0 h).

#### 3.1.1.1 Verkürzungsamplitude



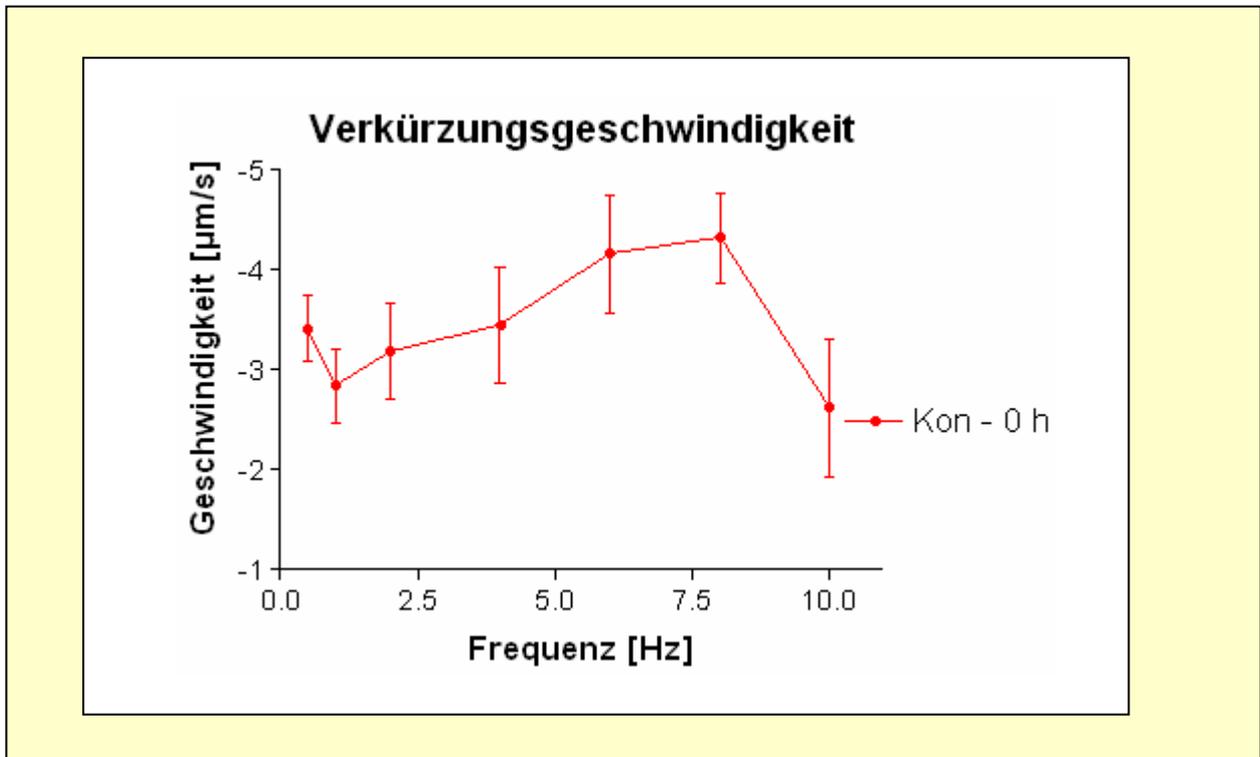
**Abbildung 11:** Frequenzabhängige Darstellung der Sarkomerverkürzungsamplitude isolierter Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen aus der Kontrollgruppe 0 Stunden nach Präparation, Angaben:  $MW \pm SEM$

Die Verkürzungsamplitude wird aus den jeweils letzten 5 Verkürzungen einer Reizserie berechnet. Sämtliche Ergebnisse sind graphisch dargestellt, die absoluten Zahlen finden sich im Anhang dieser Arbeit.

Abbildung 11 zeigt das typische Verhalten der Verkürzungsamplituden anhand der Kontraktionen aus der Zeitreihe bei 0 Stunden Inkubation, aufgetragen in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz. Die Kurven aller Gruppen zeigen ein vergleichbares Verhalten: ein biphasischer Verlauf mit einem lokalen Minimum bei 2 Hz und lokalen Maxima bei jeweils 0,5 Hz und 8 Hz.

### 3.1.1.2 Verkürzungsgeschwindigkeit

Ein weiterer wichtiger Parameter, der das kontraktile Verhalten einer Kardiomyozyte beschreibt, ist die Verkürzungsgeschwindigkeit.



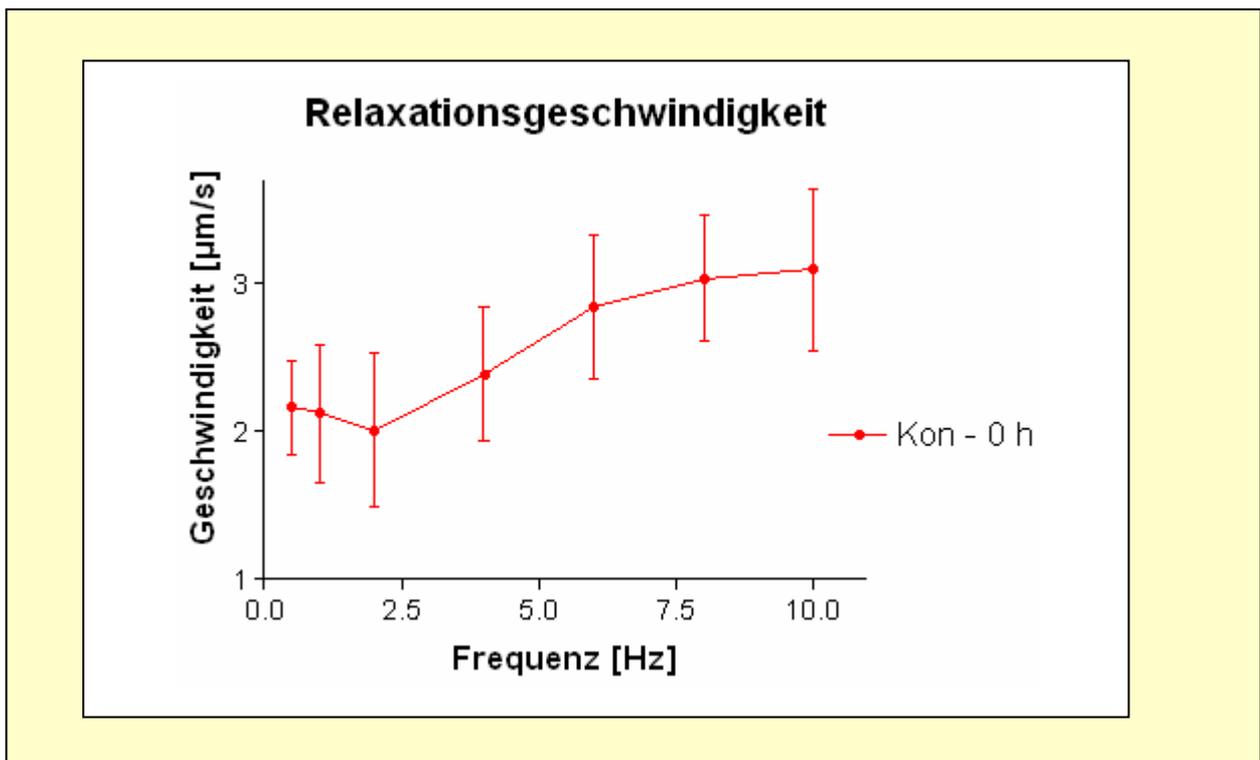
**Abbildung 12:** Frequenzabhängige Darstellung der Verkürzungsgeschwindigkeit isolierter Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen aus der Kontrollgruppe 0 Stunden nach Präparation, Angaben:  $MW \pm SEM$

Aufgrund der Darstellung der Verkürzung als negativer Ausschlag aus der Ruhesarkomerlänge ist die Verkürzungsgeschwindigkeit auch als negativer Wert angegeben.

Rechnerisch entspricht die Verkürzungsgeschwindigkeit der maximalen Steigung des abfallenden Schenkels der Verkürzungsamplitude.

Aus Gründen der Vergleichbarkeit wird in Abbildung 12 trotz des negativen Vorzeichens die Verkürzungsgeschwindigkeit auf der x-Achse nach oben dargestellt. Ähnlich der Verkürzungsamplitude zeigt sich ein biphasischer Verlauf. Die Abnahme der Verkürzungsgeschwindigkeit bei den hohen Frequenzen erklärt den oben genannten Effekt der unvollständigen Relaxation bei Frequenzen größer 6 Hz. In der Gruppe Kon – 0 h ist der Wert bei 2 Hz untypisch erhöht, d.h. die Verkürzungsgeschwindigkeit ist abweichend von dem bei den übrigen Gruppen gezeigten biphasischen Verlauf untypisch hoch.

### 3.1.1.3 Relaxationsgeschwindigkeit

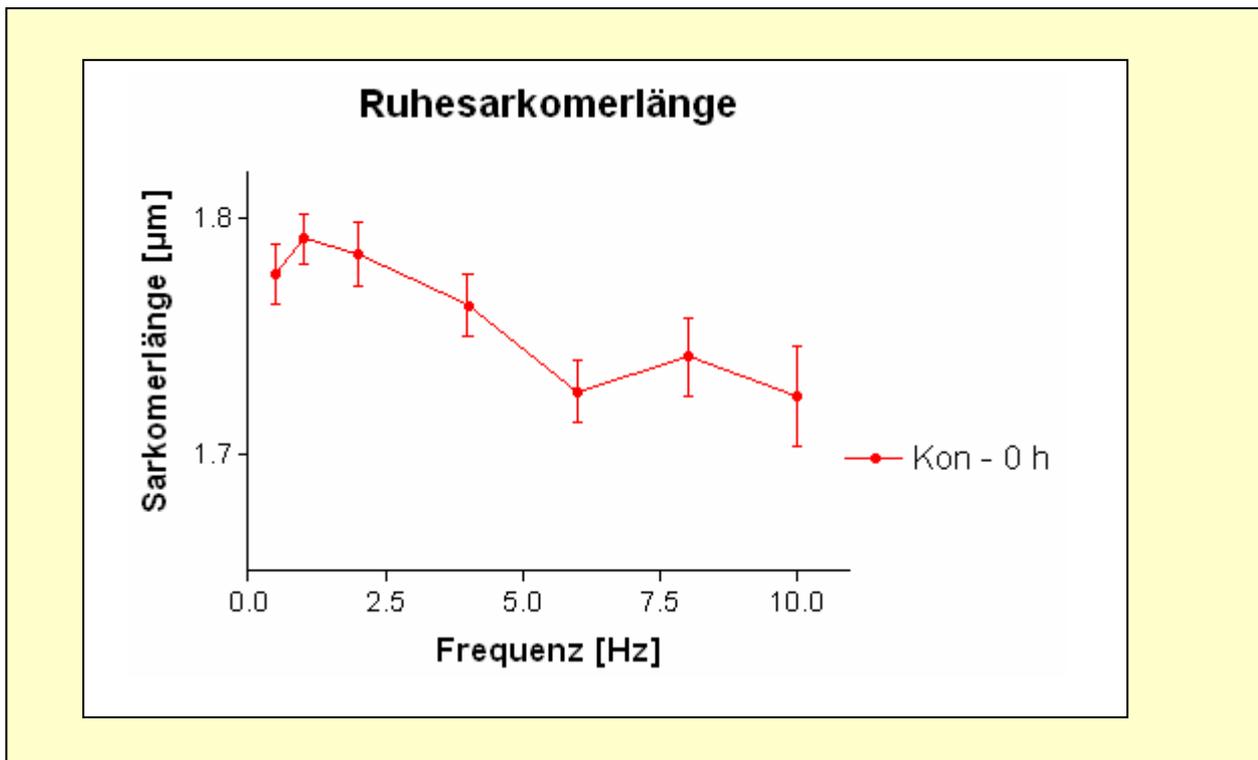


**Abbildung 13:** Frequenzabhängige Darstellung der Relaxationsgeschwindigkeit isolierter Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen aus der der Kontrollgruppe 0 Stunden nach Präparation, Angaben:  $MW \pm SEM$

Analog zur Verkürzungsgeschwindigkeit kann aus der maximalen Steigung des aufsteigenden Schenkels der Reizantwort die Relaxationsgeschwindigkeit errechnet werden. Auch hier ist ein biphasischer Verlauf mit einem Minimum bei Stimulationsfrequenzen um 2 Hz und einem Maximum bei 8 Hz zu beobachten (Abbildung 13.)

### 3.1.1.4 Ruhesarkomerlänge

Die Ruhesarkomerlänge wird von IonOptix in Ruhe vor Beginn der jeweiligen Reizfolge nach den 30 sekundigen Pausen bestimmt. In allen betrachteten Gruppen ließ sich keine Frequenzabhängigkeit der Ruhesarkomerlänge erkennen, dass heißt nach der jeweils 30 sekundigen Pause hat die stimulierte Zelle unabhängig von der vorhergegangenen Stimulationen wieder ihren Ausgangszustand erreicht (Abbildung 14).

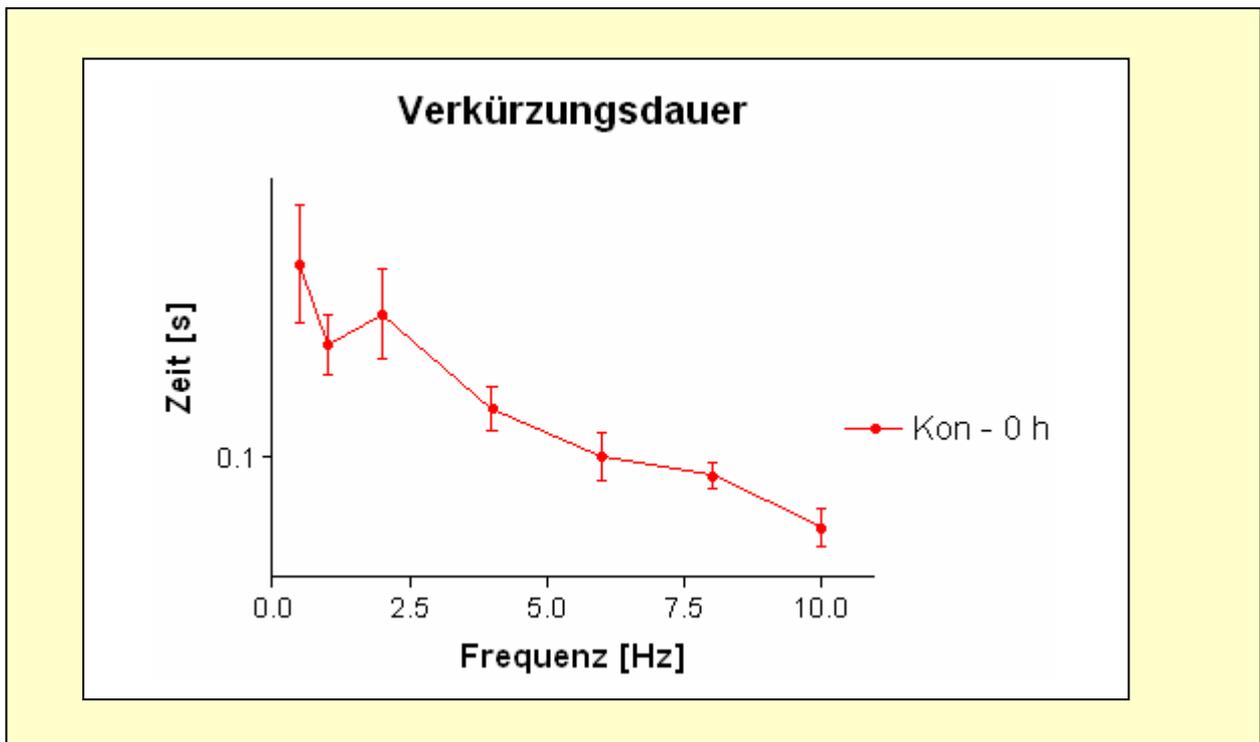


**Abbildung 14:** Frequenzabhängige Darstellung der Ruhesarkomerlänge isolierter Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen der Kontrollgruppe 0 Stunden nach Präparation, Angaben: MW  $\pm$  SEM

Diese Tatsache gewährleistet die Vergleichbarkeit der einzelnen Stimulationsreihen, da sie bezeugt, dass vor jeder Stimulation die gleichen Ausgangsvoraussetzungen gegeben sind.

### 3.1.1.5 Verkürzungsdauer

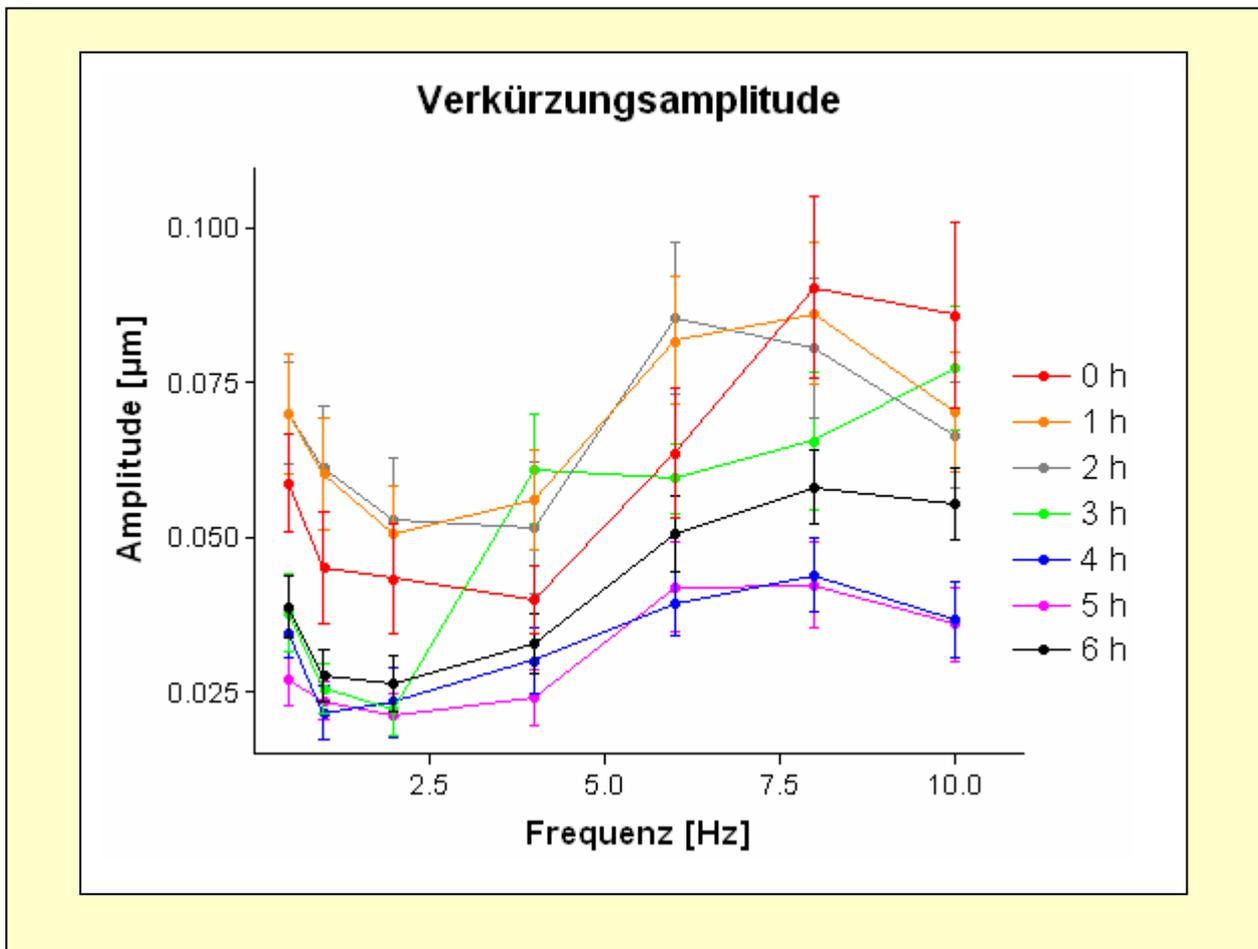
Die Dauer der Verkürzung ist definiert als die Zeitspanne zwischen Beginn der Verkürzung, also der Stimulation und der Rückkehr zu 90% der Ruhesarkomerlänge und beschreibt damit ungefähr die Zeitspanne, die die Zelle für eine komplette Kontraktion benötigt. Abbildung 15 zeigt die Verkürzungsdauer in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz exemplarisch an der 0 h-Kontrollgruppe, also Zellen ohne den Einfluss des Kulturmediums oder von CpG- oder SMT-Zusatz. Es zeigt sich, dass die Verkürzungsdauer von den niedrigen zu den hohen Frequenzen abfällt. Das Maximum liegt bei 0,139 s bei 0,5 Hz und das Minimum bei 0,087 s bei 10 Hz.



**Abbildung 15:** Frequenzabhängige Darstellung der Verkürzungsdauer isolierter Kardiomyozyten von Wildtyp-Mäusen der der Kontrollgruppe 0 Stunden nach Präparation, Angaben: MW  $\pm$  SEM

### 3.1.2 Zeitreihe der CpG-Inkubation

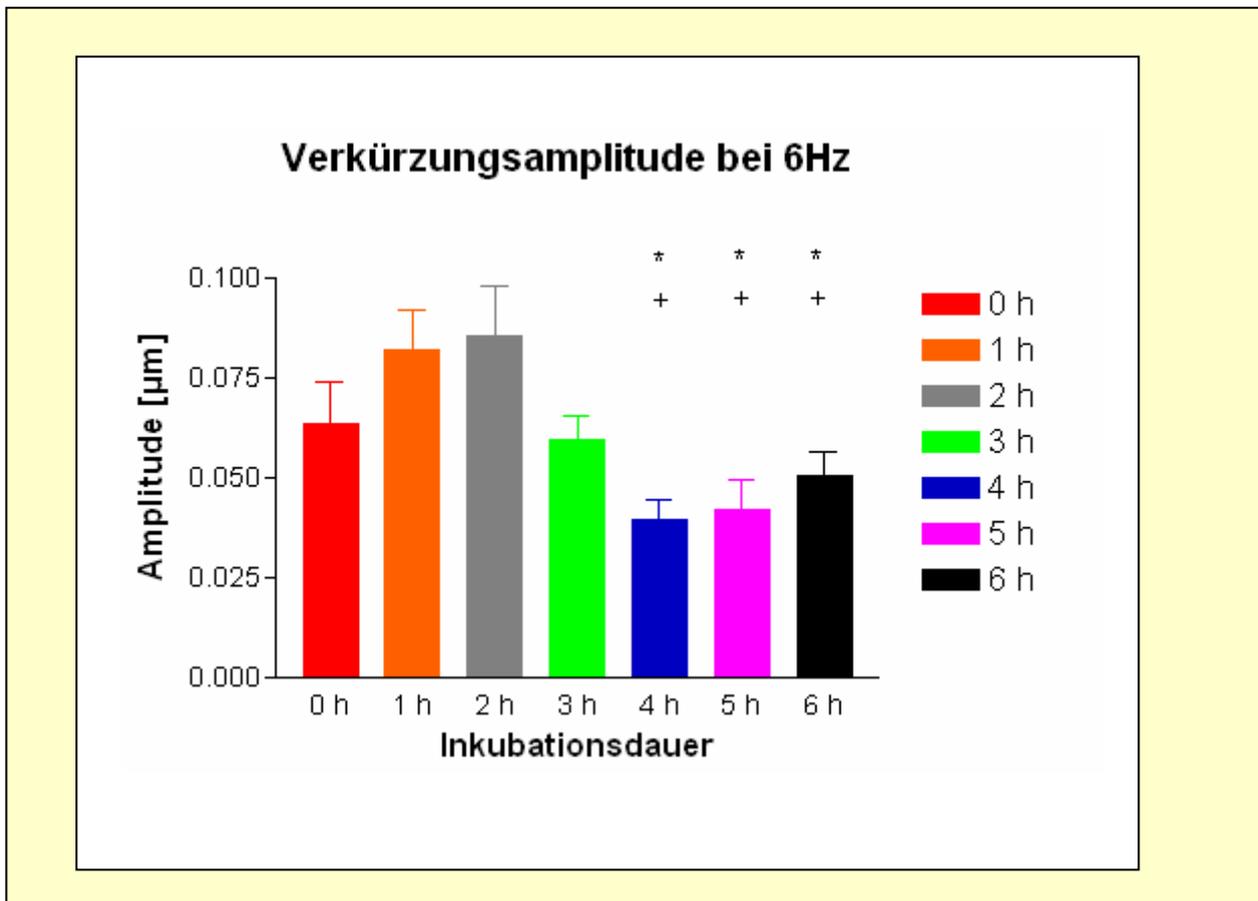
Wie bereits in Kapitel 2.5.2.1 erwähnt, wurde zuerst mit Hilfe einer Zeitreihe untersucht, wann der kardiodepressive Effekt der Bakterienbestandteile am stärksten ausgeprägt war. Dabei wurden Zellen von 30 Tieren verwendet und über die gesamte Dauer von sechs Stunden in Kulturmedium mit einem Zusatz von CpG in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  inkubiert. Die Messung zum Zeitpunkt 0 erfolgte als Kontrollgruppe ohne Kontakt der Zellen mit CpG sondern lediglich nach Aufbewahrung in Messtyrode. Bei den weiteren Messzeitpunkten von 1, 2, 3, 4, 5 und 6 h werden die Zellen dem Nährmedium entnommen und auf die in Kapitel 2 beschriebene Weise stimuliert.



**Abbildung 16:** Darstellung der kompletten CpG – Zeitlinie. Rot dargestellt die Kontrollgruppe bei Aufbewahrung in Messtyrode und Messung sofort nach Präparation.

Die Ergebnisse sind anhand der Verkürzungsamplitude, wie oben beschrieben als Funktion in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz dargestellt (siehe Abbildung 16).

Zur besseren Verdeutlichung ist in Abbildung 17 der Verlauf der Verkürzungsamplitude als Säulendiagramm anhand der Verkürzungen bei 6 Hz dargestellt.

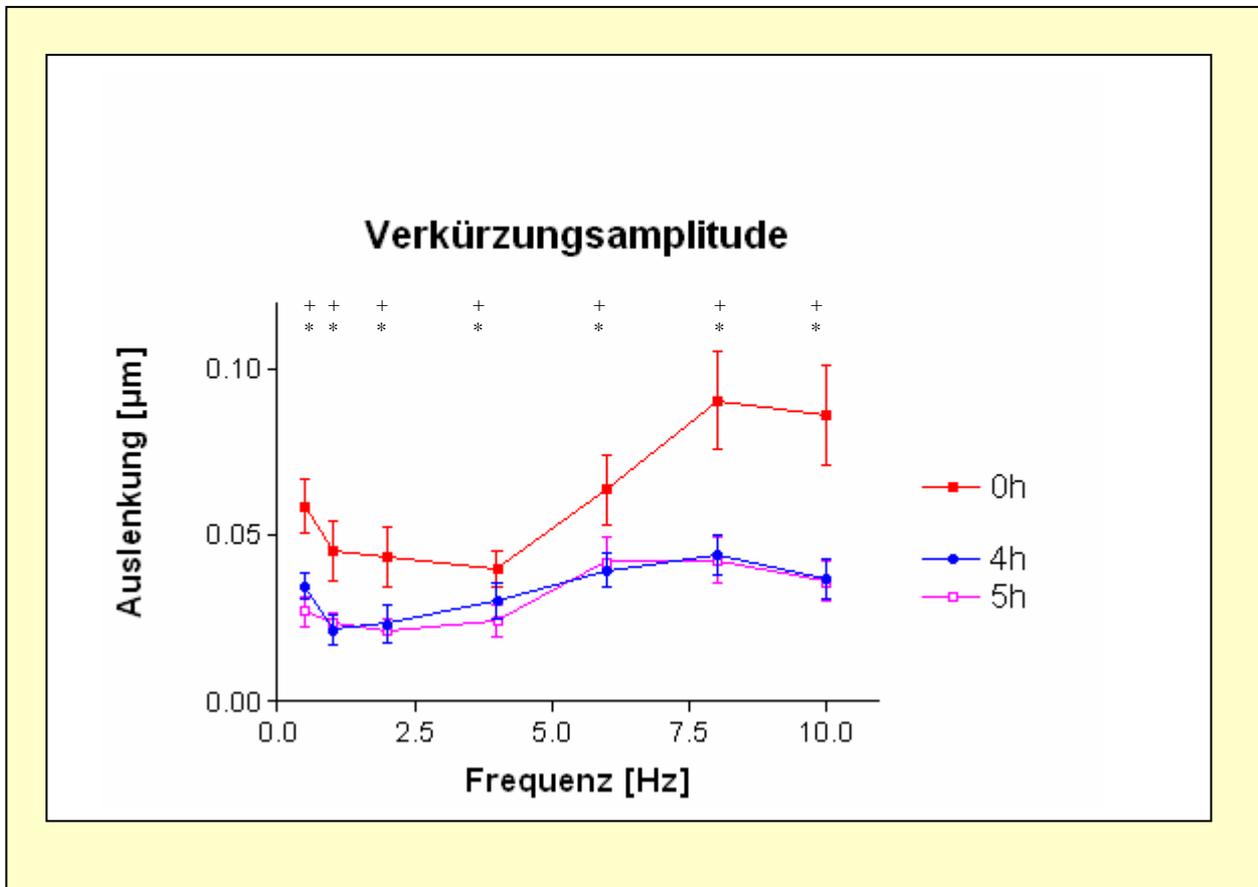


**Abbildung 17:** Darstellung der Verkürzungsamplitude bei einer Reizfrequenz von 6 Hz in Abhängigkeit zur Inkubationsdauer. Ab einer Inkubationsdauer von 3 h (grün) ist ein Effekt des hinzugefügten CpG auf die Kontraktilität zu erkennen, welcher bei 4 und 5 h Inkubation maximal ist. Signifikanter Unterschied zu 1 h gekennzeichnet mit +, Signifikanz zwischen 0 h und 5 h gekennzeichnet mit \*.

Der Verlauf der in Rot dargestellten Kurve bei 0 Stunden Inkubation zeigt eine geringere Verkürzungsamplitude als bei 1 h und 2 h Inkubation, welches am wahrscheinlichsten durch die fehlende Selektion der Kardiomyozyten zu Beginn der Messreihe gegeben ist. Der Unterschied zwischen den Werten für 0 h Inkubation und 1 h bzw. 2 h Inkubation ist jedoch nicht signifikant.

Während der Verlauf der Kurven bei 1 h und 2 h Inkubation noch nahezu identisch sind und keine Verminderung der Verkürzungsamplitude zu beobachten ist, ist diese bei 3 h Inkubation zumindest in den niedrigen Frequenzen von 0,5 Hz bis 2 Hz signifikant verringert. Die maximale Minderung der Myozytenkontraktilität zeigt sich ab einer Inkubation der Zellen mit CpG von 4 h bis 5 h. Aufgrund dessen wird für die folgende Versuchsreihe nach fünf Stunden Inkubationszeit die Kontraktilität der Kardiomyozyten bestimmt und der CpG-Effekt nach vier bis fünf Stunden Inkubation als maximal angenommen.

Im Vergleich zur 0 h-Kontrollgruppe ist die Verkürzungsamplitude nach 4 h und 5 h Inkubation signifikant verringert (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Vergleich 0 h-Kontrollgruppe (rot) mit 4 h (blau) und 5 h (rosa) Inkubation. Signifikanter Unterschied zwischen 0 h und 4 h gekennzeichnet mit +, Signifikanz zwischen 0 h und 5 h gekennzeichnet mit \*.

### 3.2 Aufhebung des CpG-Effekts auf die Kontraktilität der Herzmuskelzellen durch Inkubation mit dem iNOS-Inhibitors S-Methylisothioharnstoff

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Inkubation mit CpG und Zugabe des iNOS-Inhibitors SMT aufgeführt. Die präparierten Kardiomyozyten werden in drei Gruppen unterteilt:

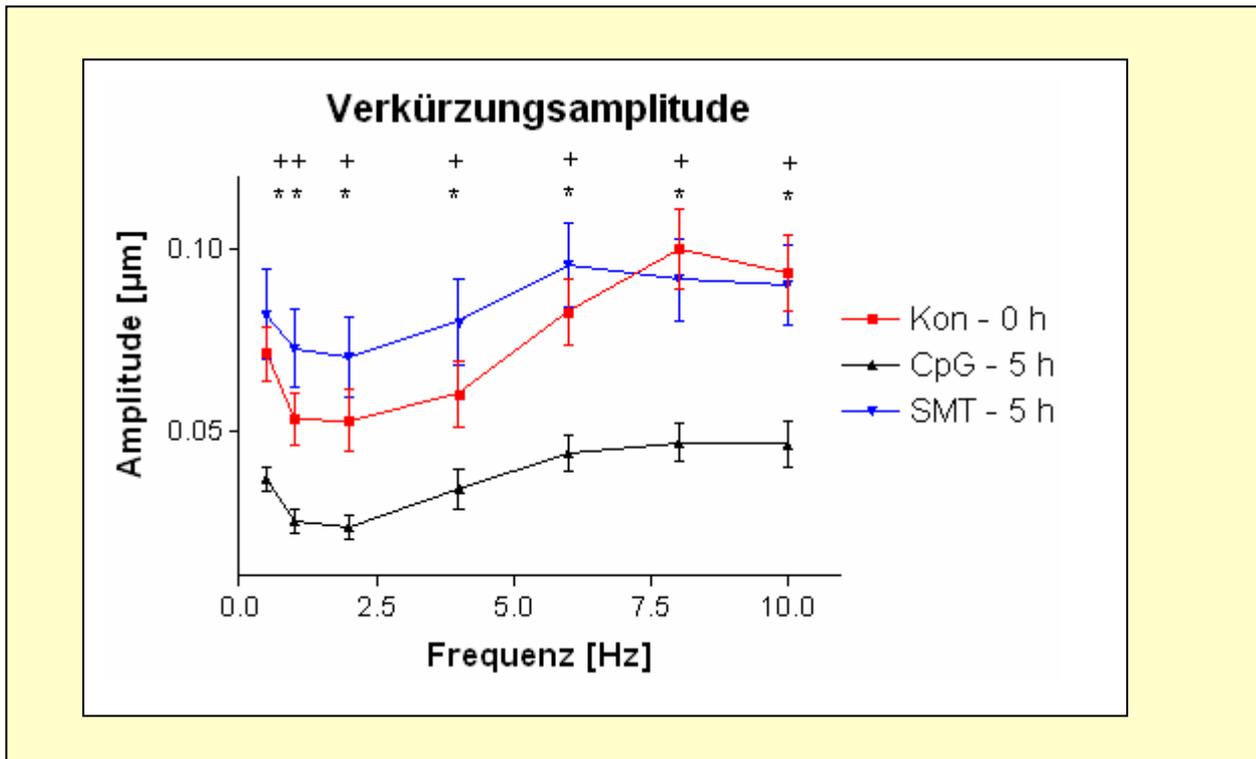
- **Gruppe Kon – 0 h** wird sofort nach Präparation in Messtyrode gelagert. Die Zellen werden innerhalb der ersten Stunde nach Präparation stimuliert. Sie dienen als Kontrollgruppe ohne jeglichen Zusatz. Ihr Kontraktilitätsverhalten entspricht somit dem einer vitalen Herzmuskelzelle.
- **Gruppe CpG – 5 h** enthält jene Kardiomyozyten, die mit CpG-Zusatz im Mittel fünf Stunden lang inkubiert wurden. Ihre Kontraktilität ist gegenüber den unbeeinflussten, vitalen Kardiomyozyten signifikant verringert.
- **Gruppe SMT – 5 h** enthält die Kardiomyozyten, welche wie Gruppe CpG – 5 h mit CpG inkubiert werden. 30 Minuten vor Messbeginn wird dem Kulturmedium S-Methylisothioharnstoff (SMT) hinzugefügt.

Der Gruppe Kon – 0 h sowie der Gruppe CpG – 5 h wurden die gewonnenen Daten aus der CpG-Zeitreihe der entsprechenden Inkubationsdauer hinzugefügt, so dass eine hohe Anzahl gemessener Zellen in diesen Gruppen ausgewertet werden konnte.

Folgend werden oben beschriebene Parameter unter dem Einfluss der einzelnen Gruppen diskutiert.

#### 3.2.1 Verkürzungsamplitude

Abbildung 19 zeigt den frequenzabhängigen Verlauf der Verkürzungsamplituden aller drei oben beschriebenen Gruppen. Die drei Gruppen zeigen alle ein lokales Minimum bei 2 Hz Stimulationsfrequenz und ein Maximum im Bereich der hohen Frequenzen. Dieses liegt bei der Gruppe Kon – 0 h bei 8 Hz, bei den Gruppen CpG – 5 h und SMT – 5 h bleibt die Verkürzungsamplitude zwischen 6 Hz und 10 Hz nahezu konstant. Allerdings ist das Niveau mit 0,46  $\mu\text{m}$  bei CpG – 5 h und 0,93  $\mu\text{m}$  bei SMT – 5 h signifikant verschieden.



**Abbildung 19:** Frequenzabhängige Darstellung der Sarkomerverkürzungsamplitude stimulierter Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (rot), nach 5 stündiger Inkubation mit CpG (schwarz), nach 5 stündiger Inkubation mit CpG und halbstündiger SMT-Einwirkung (blau).

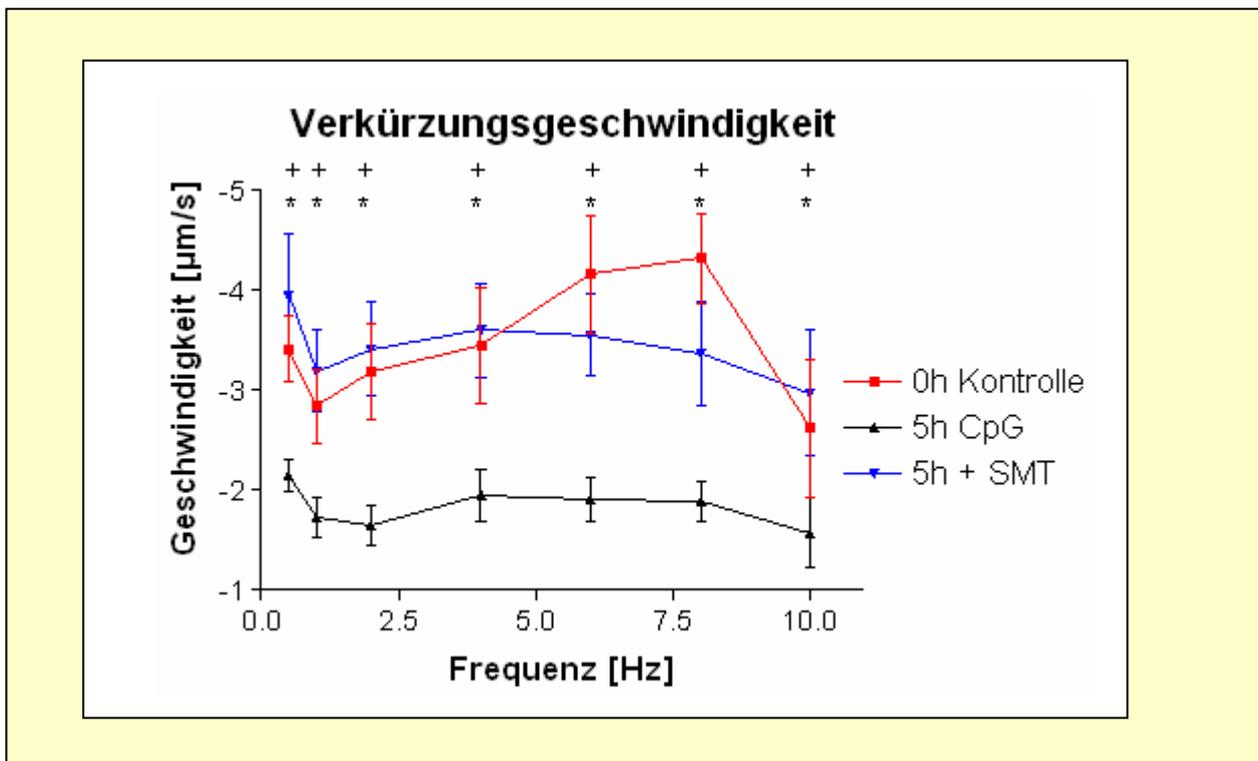
Der statistische Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) und einem Newman-Keuls post hoc Test durchgeführt. Kon – 0 h vs. CpG – 5 h:  $p < 0,001$  (mit + markiert); SMT – 5 h vs. CpG – 5 h:  $p < 0,001$  (mit \* markiert).

Der statistische Vergleich zwischen den drei Gruppen wurde mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (One-way-Anova) und Newman-Keuls post hoc-Test durchgeführt.

Dabei unterscheiden sich die Gruppe Kon – 0 h gegen die Gruppe CpG – 5 h signifikant mit  $p < 0,001$ . Im Vergleich zur Gruppe CpG – 5 h liegt die Kurve der Gruppe SMT – 5 h wieder im Bereich der Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen CpG – 5 h und SMT – 5 h ist ebenfalls mit  $p < 0,001$  signifikant, SMT – 5 h und Kon – 0 h unterscheiden sich nicht signifikant.

### 3.2.2 Verkürzungsgeschwindigkeit

In Abbildung 20 sind die Verläufe der Kurven der Verkürzungsgeschwindigkeit aller drei verglichenen Gruppen dargestellt. Aufgrund der oben bereits genannten geringeren Qualität der Zellen und damit verbundenen höheren Schwankung der aufgezeichneten Werte weist die Kurve der 0 h-Kontrollgruppe größere Standardabweichungen auf als die Kurven der beiden anderen Gruppen.



**Abbildung 20:** Frequenzabhängige Darstellung der Verkürzungsgeschwindigkeit stimulierter Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (rot), nach 5 stündiger Inkubation mit CpG (schwarz), nach 5 stündiger Inkubation mit CpG und halbstündiger SMT-Einwirkung (blau).

Der statistische Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) und einem Newman-Keuls post hoc Test durchgeführt. Kon – 0 h vs. CpG – 5 h:  $p < 0,001$  (mit + markiert); SMT – 5 h vs. CpG – 5 h:  $p < 0,001$  (mit \* markiert).

Ebenso ist – wie in Abbildung 19 schon beobachtet – der Verlauf der Kurven nach fünf Stunden Inkubation deutlich flacher, das lokale Maximum in den hohen Frequenzen ist deutlich weniger ausgeprägt.

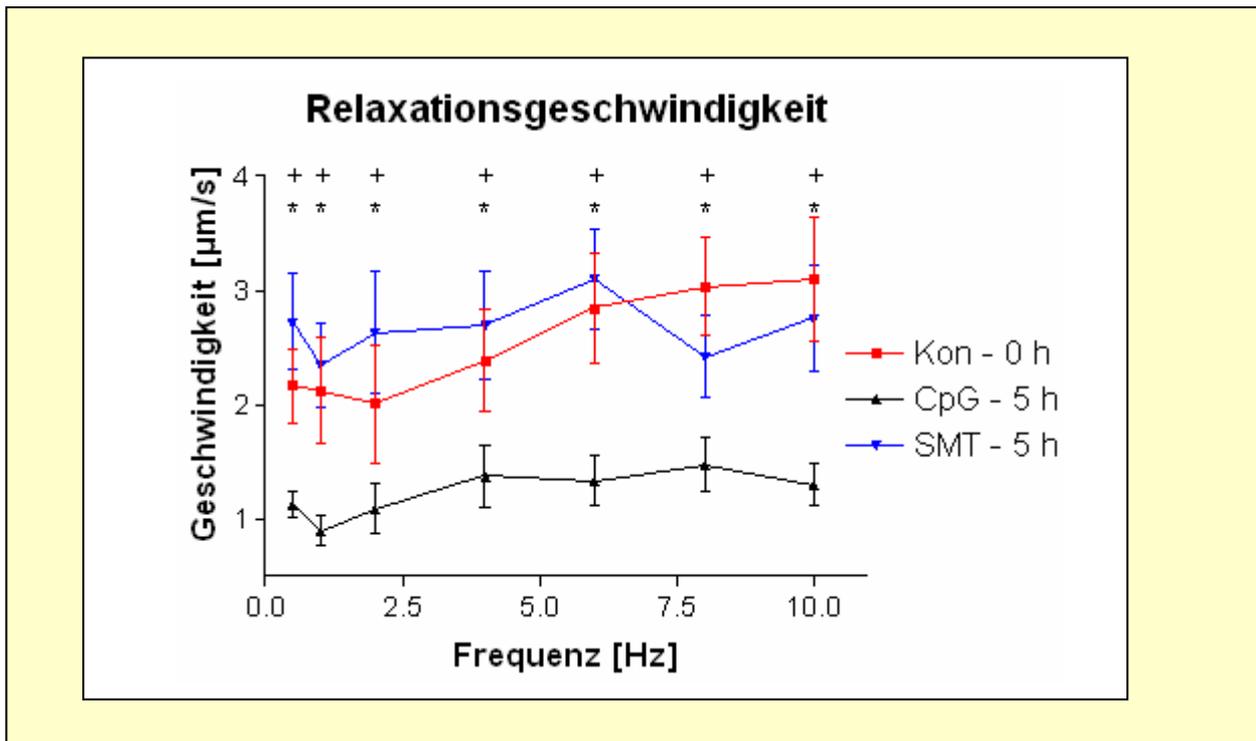
Auch bei der Verkürzungsgeschwindigkeit ist der Unterschied zwischen Gruppe Kon – 0 h und Gruppe CpG – 5 h signifikant, die durchschnittliche Differenz beträgt für beide Vergleiche ca. 1,6  $\mu\text{m/s}$ .

Die Werte der Gruppe SMT – 5 h sind dementsprechend wieder der Gruppe Kon – 0 h angenähert und weisen zu dieser keinen signifikanten Unterschied auf.

### **3.2.3 Relaxationsgeschwindigkeit**

Die Kurven der Relaxationsgeschwindigkeit weisen das gleiche Verhalten auf wie bei der Verkürzungsgeschwindigkeit (siehe Abbildung 21).

Die Anwendung von CpG-Oligonukleotiden führt zu einer signifikanten Reduktion der durchschnittlichen Relaxationsgeschwindigkeit um 1,29  $\mu\text{m/s}$  im Vergleich zu Kon – 0 h. Die Anwendung von SMT hebt den Einfluss der CpG-Behandlung wieder auf. Durchschnittlich ist die Relaxationsgeschwindigkeit der Gruppe CpG – 5 h um 1,43  $\mu\text{m/s}$  geringer als die Relaxationsgeschwindigkeit der Gruppe SMT – 5 h. Der Unterschied zwischen der Gruppe SMT – 5 h und der Kontrollgruppe Kon – 0 h ist nicht signifikant.



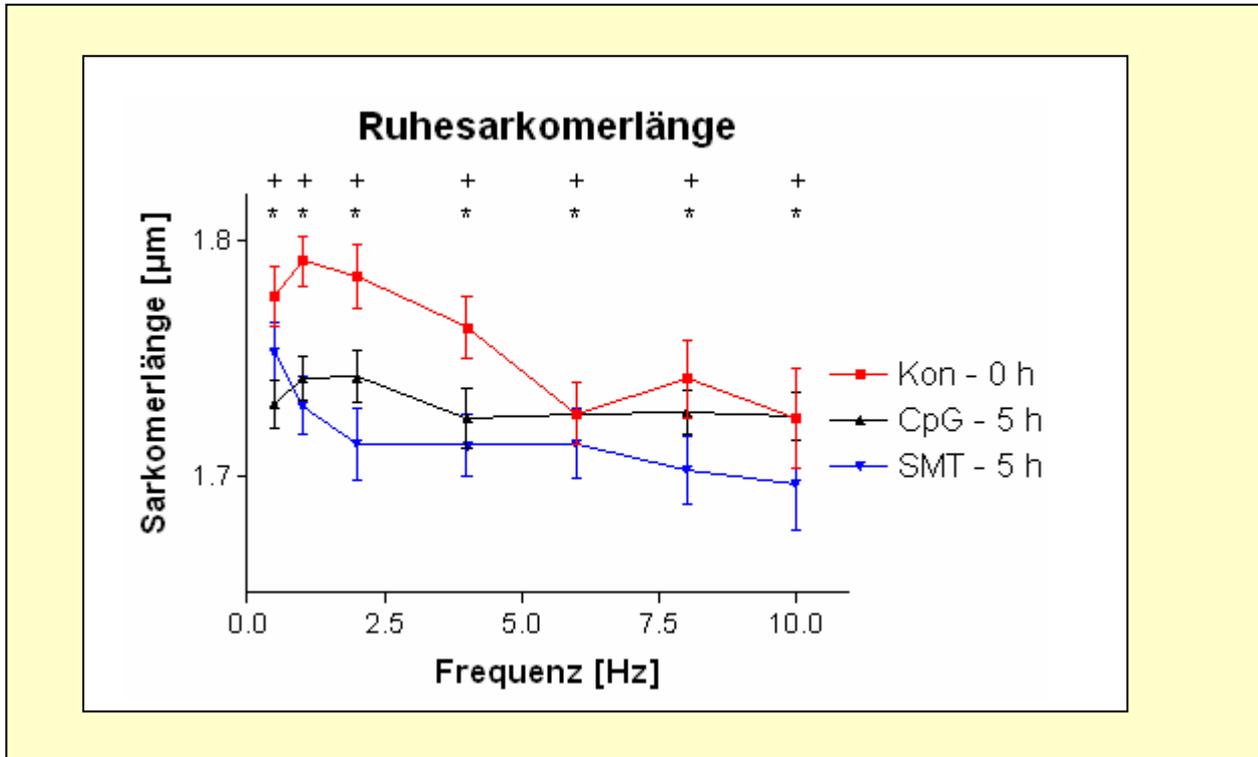
**Abbildung 21:** Frequenzabhängige Darstellung der Relaxationsgeschwindigkeit stimulierter Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (rot), nach 5 stündiger Inkubation mit CpG (schwarz), nach 5 stündiger Inkubation mit CpG und halbstündiger SMT-Einwirkung (blau).

Der statistische Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) und einem Newman-Keuls post hoc Test durchgeführt. Kon – 0 h vs. CpG – 5 h:  $p < 0,001$  (mit + markiert); SMT – 5 h vs. CpG – 5 h:  $p < 0,001$  (mit \* markiert).

### 3.2.4 Ruhesarkomerlänge

Abbildung 22 zeigt frequenzabhängig die Ruhesarkomerlänge aller drei Gruppen. Eine deutliche Frequenzabhängigkeit lässt sich bei keiner der drei Gruppen erkennen. Die Ruhesarkomerlänge beider Gruppen, in denen die präparierten Kardiomyozyten im Mittel fünf Stunden inkubiert wurden – CpG – 5 h und SMT – 5 h – liegt unter der Ruhesarkomerlänge der sofort gemessenen Herzmuskelzellen aus Gruppe Kon – 0 h.

Ein signifikanter Unterschied lässt sich nur in den niedrigen Frequenzen bis 4 Hz beobachten und zwar die oben erwähnte Verringerung der Ruhesarkomerlänge nach fünf Stunden Inkubation.



**Abbildung 22:** Frequenzabhängige Darstellung der Ruhesarkomerlänge stimulierter Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (rot), nach 5 stündiger Inkubation mit CpG (schwarz), nach 5 stündiger Inkubation mit CpG und halbstündiger SMT-Einwirkung (blau).

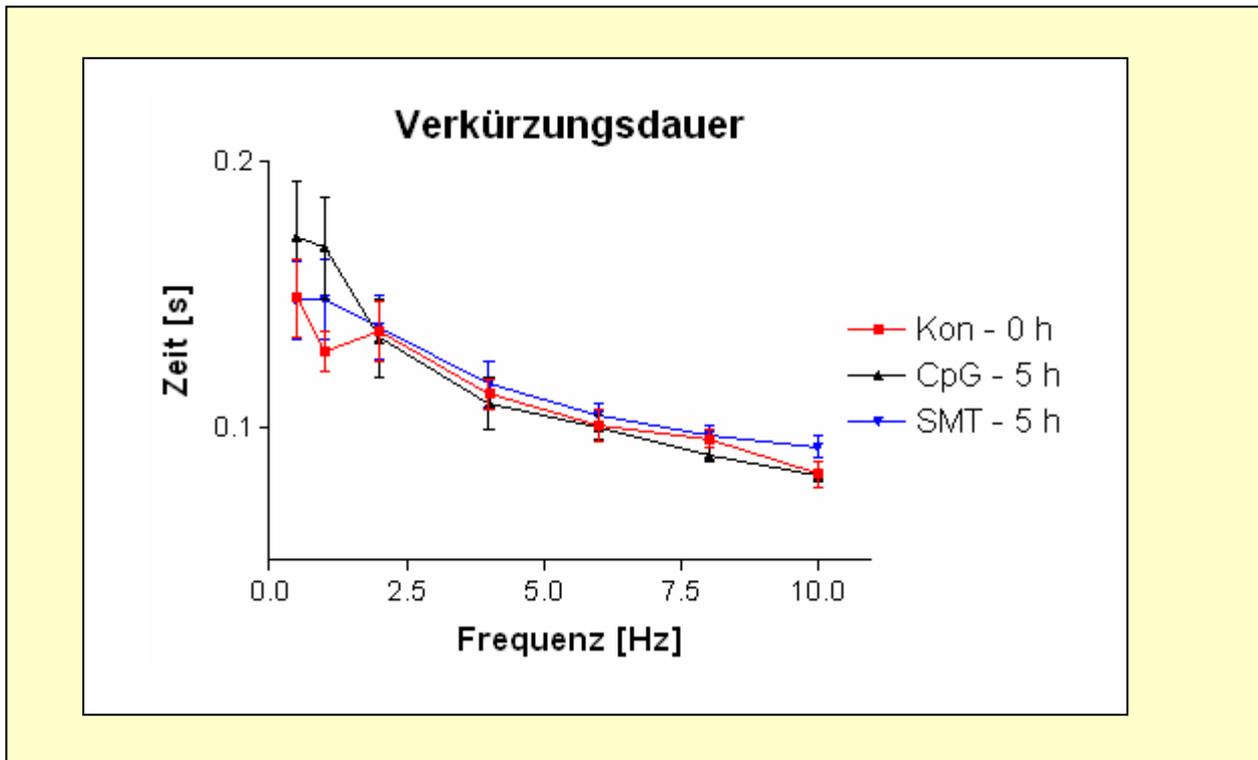
Der statistische Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) und einem Newman-Keuls post hoc Test durchgeführt. Kon – 0 h vs. CpG – 5 h:  $p < 0,001$  (mit + markiert); SMT – 5 h vs. CpG – 5 h:  $p < 0,001$  (mit \* markiert).

### 3.2.5 Verkürzungsdauer

Wie oben bereits beschrieben, wird mit der Verkürzungsdauer jene Zeitspanne berechnet, die die Herzmuskelzelle benötigt, um, bestimmt ab dem Stimulationsreiz, wieder 90% ihrer Ruhesarko-

merlänge zu erreichen. Bei allen drei Gruppen lässt sich beobachten, dass die Verkürzungsdauer zu den hohen Frequenzen hin konstant abfällt (Abbildung 23).

Sowohl der gesamte Kurvenverlauf als auch in den einzelnen Frequenzen betrachtet sind die drei Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Die Differenz zueinander ist im Mittel deutlich unter 0,01 s.



**Abbildung 23:** Frequenzabhängige Darstellung der Verkürzungsdauer stimulierter Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen (rot), nach 5 stündiger Inkubation mit CpG (schwarz), nach 5 stündiger Inkubation mit CpG und halbstündiger SMT-Einwirkung (blau).

Der statistische Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) und einem Newman-Keuls post hoc Test durchgeführt. Bei keiner Frequenz tritt ein signifikanter Unterschied auf.

## 4 Diskussion

Trotz der mannigfaltigen Möglichkeiten der Intensivmedizin stellt die septische Kardiomyopathie eine schwerwiegende Komplikation der Sepsis und eine lebensbedrohliche Diagnose dar. Bei beinahe der Hälfte aller Sepsis-Patienten (bei 44% der Patienten: Charpentier et al., 2004; Schuster und Müller-Werdan, 2000) kann eine akute septische Kardiomyopathie beobachtet werden, sowie damit verbundener ein Anstieg der Letalität bis auf 70%.

Die Pathogenese der kardialen Depression in der Sepsis ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe des am TLR9-Rezeptor bindenden CPG-Oligonukleotid und des iNOS-Inhibitors SMT einen Teil der hypothetischen zu belegen. Dazu wurde die Wirkung von CpG-Oligonukleotiden auf die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten der Maus getestet.

### 4.1 Validität der Methoden

Ein aussagekräftiges und reproduzierbares Ergebnis der Messung erfordert sowohl eine gleichbleibend gute Qualität der isolierten Kardiomyozyten und eine Vergleichbarkeit der Zellen zwischen den einzelnen Messtagen und gemessenen Gruppen als auch die Validität und Reliabilität der Messmethode.

Die hier verwendete Technik der Isolation der Kardiomyozyten mit Hilfe der Langendorff-Perfusionsanlage kam bereits in vielen Arbeiten zuerst bei größeren Nagern (Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten) (Meyer, 1989; Linz und Meyer, 2000) und zuletzt auch bei der Maus (Tiemann et al., 2003; Kempelmann, 2005; Baumgarten et al., 2006) erfolgreich zum Einsatz. Durch die erprobte Methode und überarbeitete Zusammensetzung der verwendeten Lösungen wurde eine hohe Quantität an vitalen Herzmuskelzellen erzielt (bis zu 70% Ausbeute vitaler Zellen). Zusätzlich besaßen die Kardiomyozyten eine gute Qualität, erkennbar an der länglichen Form, an intakten, nicht abgerundeten Zellenden, gleichmäßiger Sarkomer-Felderung, gleichförmiger Ruhesarkomerlänge). Außerdem ist unsere Arbeitsgruppe bisher weltweit die einzige, die Mauskardiomyozyten bis zu einer Frequenz von 10 Hz stimuliert.

Um die gleichbleibende Qualität der isolierten Kardiomyozyten zu gewährleisten, müssen die gewonnenen Zellen in einem geeigneten Medium aufbewahrt werden. In Vorversuchen unserer

Arbeitsgruppe erhielt zwar auch die Lagerung der Kardiomyozyten in Messtyrode (siehe Tabelle 4) die Zellen bis zu sechs Stunden vital genug, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Jedoch zeigte die Lagerung in einem Kulturmedium eine deutlich höhere qualitative und quantitative Ausbeute. Die Zusammensetzung des Kulturmediums wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erprobt (Schuhmacher, 2006; Vervölgyi, 2007) und orientiert sich an in der Literatur vorgeschlagenen Rezepten für Langzeitkulturen (Clark et al., 1998; He et al., 1996).

Das hier verwendete Reizmuster für die Sarkomerverkürzung aus sieben Stimulationsfrequenzen bis zu 10 Hz wurde bereits von Tiemann et al. (2003) und in anderen Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe verwendet (Schuhmacher, 2006; Vervölgyi, 2007). Die 30-sekündige Pause zwischen den einzelnen Frequenzen soll der untersuchten Zelle Zeit zur Erholung geben, so dass jede Frequenz registriert werden kann, als sei es die erste Stimulation der ruhenden Zelle. Des Weiteren soll die Abfolge 0,5 Hz, 10 Hz, 1 Hz, 6 Hz, 2 Hz, 4 Hz verhindern, dass es zu einer Gewöhnung der Zelle an eine in der Frequenz stetig zunehmende oder abfallende Reizserie kommt. So kann gewährleistet werden, dass weder die Abfolge noch die Frequenz einen Einfluss auf die jeweilige Kontraktionsserie ausübt.

Die verwendete maximale Stimulationsfrequenz von 10 Hz entspricht der ebenfalls von Tiemann unter Kontrollbedingungen gemessenen physiologischen Herzfrequenz einer adulten Maus von  $580 \pm 11$  Schlägen pro Minute (Frequenz ca. 9,5 Hz). Obwohl die maximale hier in vitro verwendete Frequenz also der physiologischen Herzfrequenz in vivo entspricht, ist während der Versuchsreihe besonders bei den hohen Frequenzen eine zunehmende Anfälligkeit der Zellen zu beobachten gewesen. Die Zellen können häufig den externen Reizen bei 10 Hz nicht folgen oder zeigen unkoordinierte Zwischenkontraktionen. In vielen bisher veröffentlichten Studien ist mit einer deutlich geringeren Frequenz stimuliert worden, das heißt es muss zwischen der Leistungsfähigkeit in vivo und in vitro unterschieden werden. Dass hier eine Stimulation bis zu 10 Hz erfolgreich gut reproduzierbare Messwerte erbrachte, kann wie schon erwähnt als Indiz für die gute Qualität der isolierten Kardiomyozyten angesehen werden.

Als Methode zur Bestimmung der Kontraktion kann die in der Literatur häufig erwähnte „Edge-detection“-Messung verwendet werden, bei der die Verschiebung der Zellränder nach innen bei der Kontraktion als Maß verwendet wird (z.B. Meyer, 1989; Linz und Meyer, 2000). Die Zellgröße von Mauskardiomyozyten ist altersabhängig (Nair und Nair, 2001), das heißt es muss bei jeder Messung mit Hilfe der „Edge-detection“-Methode die Verkürzung auf die Ruhezelllänge normiert werden.

Bei der hier verwendeten Methode wird mit Hilfe der charakteristischen Querstreifung der Sarkomere unabhängig von der Zellgröße jeder gemessenen Zelle das Sarkomer-Raster ausgewertet. Durch dieses Verfahren ist keine Normierung notwendig.

Die verwendeten Konzentrationen von CpG-Oligonukleotid und dem iNOS- Inhibitor SMT entsprechen in Vorversuchen der Arbeitsgruppe erprobten Standards. SMT wurde erst 30 Minuten vor Beendigung der Inkubation zur Zellkultur hin zugegeben, um so die Reversibilität des CpG-Effekts zu zeigen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass auch nach der Induktion der iNOS und nach dem Eintreten des kardiodepressiven Effekts von CpG dieser durch nachträgliche Applikation von SMT rückgängig gemacht werden konnte.

Das gewählte Zeitfenster der Kontraktilitätsmessung wurde mithilfe der oben beschriebenen Zeitreihe (Kapitel 2.5.2.1 und 3.1.2) validiert. Es zeigte sich, dass die Verkürzungsamplitude bei 0 h Inkubation, also direkt nach der Präparation geringer ist als bei 1 h und 2 h Inkubationsdauer. Dieser Unterschied ist zwar nicht signifikant, aber deutlich. Es ist anzunehmen, dass dieser Umstand an der fehlenden Selektion der Kardiomyozyten zum Zeitpunkt Null liegt. Während der Inkubation sterben die Zellen mit verminderter Vitalität ab, die gemessenen Kardiomyozyten sind also trotz des CpG-Effekts tatsächlich vitale Zellen. Im Gegensatz dazu beinhaltet die Portion, die sofort nach Präparation gewonnen und in Messtyrode in die Versuchskammer überführt wird, auch jene Zellen, die von schlechterer Qualität sind und unter Umständen während eines Messdurchlaufes absterben. Nach 6 h Inkubation scheinen die Zellen sich wieder zu erholen, wie oben bereits erwähnt lässt diese Beobachtung entweder auf eine Degradation des hinzugefügten CpGs schließen oder auf eine Selektion hinsichtlich Zellen, die bereits von Beginn an weniger unter dem CpG-Effekt gelitten haben (siehe Abbildung 16 und 17).

Der maximale Effekt von CpG trat bei einer Inkubation von 4 bis 5 Stunden auf.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass die Methoden der vorliegenden Arbeit dem heutigen Stand der Forschung einwandfrei entsprechen und die Anforderungen der Fragestellung erfüllen.

## **4.2 Hypothetischer Signalweg von TLR9 zur kardialen Depression**

Die Minderung der kardialen Kontraktilität ist eine ernste und häufige Komplikation der schweren Sepsis, der genaue Pathomechanismus ist aber weiterhin noch nicht detailliert aufgeschlüsselt. Unklar ist, ob bakterielle Endotoxine mittelbar über die Stimulation immunkompetenter Zel-

len und von deren Zytokine die kardiale Funktion beeinflussen oder direkt an der Kardiomyozyte selbst wirken.

Die Erkenntnisse der letzten Jahre führten zu einer Neubewertung des angeborenen Immunsystems und damit auch der Rolle der Toll-like-Rezeptoren in der Pathogenese der Sepsis und der septischen Kardiomyopathie. Es zeigte sich, dass nicht nur die von Monozyten gebildeten Entzündungsmediatoren wie IL 1- $\beta$  und TNF- $\alpha$  die Herzfunktion beeinträchtigen (Pagani et al., 1992; Sugishita et al., 1999), sondern Kardiomyozyten selbst nach Stimulation mit Endotoxinen TNF- $\alpha$  bilden (Giroir et al., 1992).

Vorangegangene Experimente unserer Arbeitsgruppe befassten sich mit der Wirkung von Lipopolysacchariden (LPS) auf den membranständigen TLR4-Rezeptor von Kardiomyozyten. LPS ist ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, der von TLR4 erkannt wird. Baumgarten et al. (2006) und Vervölgyi (2007) zeigten, dass TLR4-vermittelt über eine Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentration die Kontraktilität der Kardiomyozyten gemindert wurde. Bestandteil des Signalweges war ebenfalls die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase iNOS, welche eine Erhöhung der intrazellulären NO-Konzentration bewirkt. Ullrich et al. (2000) zeigten, dass iNOS-defiziente Mäuse nach Stimulation mit bakteriellen Endotoxinen keine myokardiale Dysfunktion entwickelten.

Das CpG-Motiv der bakteriellen DNA entspricht wie in der Einleitung bereits erläutert aufgrund der fehlenden Methylierung einem PAMP. Dieses hochkonservative Motiv wird vom angeborenen Immunsystem erkannt. Es ist bekannt, dass CpG-ODN eine Immunantwort im Sinne eines septischen Schockes über eine Aktivierung des TLR9 auslösen kann (Sparwasser et al., 1997). Der genaue Signalweg – soweit bisher erforscht – ist in der Einleitung beschrieben (siehe Kapitel 1.2 und Abbildung 1). Angenommen wurde für diese Arbeit, dass auf diesem Wege in einer von CpG-Oligonukleotiden stimulierten Zelle in erhöhtem Maße iNOS gebildet wird.

### **4.3 Auswirkungen von CpG-Oligonukleotiden auf die Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyozyten in Abhängigkeit von TLR 9**

Bisher war das Vorliegen des TLR9-Signalweges an Kardiomyozyten wenig untersucht. Neue Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass bei der Entwicklung einer Sepsis TLR9-abhängige Reaktionen auch im Herzen eine Rolle spielen (Knuefermann et al., im Druck).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kontraktilität von Wildtyp-Kardiomyozyten an Hand der Sarkomerverkürzung nach Stimulation mit Frequenzen zwischen 0,5 und 10 Hz bestimmt. Die Zellen wurden über den Verlauf von 6 Stunden mit CpG in einer Konzentration von 1  $\mu$ M inkubiert. Durch die Messung des Kontraktilitätsverhaltens zu jeder Stunde während der Inkubation konnte ein genauer Verlauf des CpG-Effektes auf die Kardiomyozyten beobachtet werden. Es zeigte sich, dass nach 3 Stunden Inkubation die Kontraktilität der Myozyten abnahm und sich ab 4 Stunden Inkubation signifikant von der unbeeinflussten Kontrollgruppe unterschied (siehe Abbildung 17.).

Maß für die Kontraktilität war dabei die Amplitude der Sarkomerverkürzung, welche in Abhängigkeit der Stimulationsfrequenz aufgetragen wurde. Bei allen Frequenzen außer bei 4 Hz war die Verringerung der Verkürzungsamplitude bei 4 beziehungsweise 5 h Inkubation mit CpG-ODN im Vergleich zur 0 h- Kontrolle signifikant (siehe Abbildung 18).

Da es sich um reine Kardiomyozytenkulturen handelte, muss davon ausgegangen werden, dass der Effekt von CpG tatsächlich unmittelbar direkt an der Kardiomyozyte ausgelöst und nicht von immunkompetenten Zellen vermittelt wird. Die analoge Untersuchung von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe an TLR9-defizienten Tieren zeigt, dass dieser unmittelbare Effekt über von den Kardiomyozyten exprimierten Toll-like-Rezeptoren 9 erfolgt:

Bei in vivo-Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde durch intraperitoneale Injektion von CpG-ODN (1 nmol/g Körpergewicht) sowohl in Wildtyp- als auch in TLR9-defiziente Mäuse ein künstlicher septischer Schock hervorgerufen. Circa 2 Stunden nach der Injektion entwickelten die Wildtypmäuse klinische Symptome wie Lethargie und Diarrhöen, die denen eines septischen Schocks entsprachen. Die TLR9-defizienten Tiere zeigten keine derartigen Symptome, ebenso wenig Tiere aus einer Kontrollgruppe, welche mit Kochsalzlösungen oder mit Oligonukleotiden ohne CPG- Motiv behandelt worden waren. Die Versuchstiere wurden nach unterschiedlichen Zeitintervallen getötet und es wurden Plasmaproben sowie Gewebeproben des Herzens entnommen und weiteren Untersuchungen zugeführt.

Nach der Applikation von CpG in vivo kam es nach 2-4 h zu einem Anstieg der kardialen TLR9-Expression. Dies passt gut zu dem hier beobachteten Zeitverlauf der CpG-Wirkung auf die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten.

Des Weiteren zeigte sich, dass 1 bis 2 Stunden nach intraperitonealer Injektion von CpG-ODN die Transkription von TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ - und IL-6-mRNA stark erhöht war. Ebenfalls erhöht waren die Plasmaspiegel der drei Mediatoren, welches auf eine induzierte inflammatorische Reaktion

des Gesamtorganismus hindeutet. Auch dieser Effekt trat bei den TLR9-defizienten Tieren nicht ein, ebenso wenig bei den Wildtyp-Kontrollen, denen Oligonukleotide ohne CpG-Motiv injiziert worden waren.

Durch ELISAs wurde zusätzlich noch die Zunahme der Expression der Genprodukte TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in den Wildtyp-Tieren nachgewiesen, ebenfalls ohne Korrelat bei der Gruppe der TLR9-defizienten Tiere (Knuefermann et al., im Druck).

Hiermit ist gezeigt, dass eine systemische Entzündungsreaktion im Sinne einer Sepsis durch CpG-Oligonukleotide ausgelöst wird. Die Gegenüberstellung von Wildtyp-Tieren und TLR9-defizienten Tieren bzw. Kontrollgruppen von Wildtyp-Tieren, welche mit Oligonukleotiden ohne CpG-Motiv bzw. mit Kochsalzlösung behandelt wurden, zeigt, dass diese Entzündungsreaktion tatsächlich von DNA mit dem CpG-Motiv über TLR9 ausgelöst wird.

In einer Studie von Boyd et al. (2007) wurden TLR2, 4 und 5 in HL-1-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass eine Stimulation mit CpG-ODN über 24 h zu keiner erhöhten Bildung von Zytokinen (IL-6) führte. Dieser Unterschied zu den bei Knuefermann et al. vorliegenden Ergebnissen kann zum einen durch die unterschiedlichen Zelllinien gegeben sein, zum anderen wurden die Zellen von Boyd et al. erst nach 24 h untersucht. Da die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die maximale Zytokinproduktion bereits innerhalb von 2 h nach Stimulation mit CpG eintrat, haben Boyd et al. möglicherweise den richtigen Zeitpunkt lange überschritten. Dafür spricht, dass in den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe die Tiere bereits zwei Stunden nach der CpG-Injektion erste klinische Symptome entwickeln (Knuefermann et al., im Druck). Die Mediatoren, die als am bedeutendsten in der Pathogenese der Sepsis gelten, nämlich TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Cain et al., 1999) wurden von Boyd et al. nicht untersucht.

Unklar ist immer noch, ob es durch die Vermittlung von immunkompetenten Zellen und Entzündungsmediatoren zur Sepsis und zur Minderung der kardialen Funktion kommt oder ob CpG direkt am Herzmuskelgewebe wirkt. Dafür ist eine Betrachtung des isolierten Gewebes notwendig.

Die Reaktion von Kardiomyozyten auf CpG *in vitro* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit an Wildtyp-Mäusen und von anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe an TLR9-defizienten Tieren untersucht. Kardiomyozyten von Wildtypmäusen zeigten eine signifikante Reduktion der Kontraktilität, während die isolierten Zellen von TLR9-defizienten Tieren nicht durch CpG beeinflusst wurden. Des Weiteren wurde die Aufnahme von CpG in frisch isolierte Herzmuskelzellen untersucht. Dazu wurden die Kardiomyozyten für 30 Minuten mit Fluoreszenz-markiertem CpG (1668-ODN-Cy5, Firma TIB MIBIOL) inkubiert und unter einem Fluoreszenzmikroskop

betrachtet. CpG-ODN konnte so sowohl in den Zellkernen als auch im Zellplasma beobachtet werden. Wie schon erwähnt sind alle Ergebnisse der oben genannten Experimente zusammenfassend publiziert in Knuefermann et al. (im Druck).

#### **4.4 Die Rolle von iNOS in der Vermittlung des kardiodepressiven Effektes von CpG**

Durch die in Kapitel 4.3 genannten Experimente konnte ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Stimulation durch CpG und der erhöhten Bildung von Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 gezeigt werden. Ebenso konnte die Vermittlung durch TLR9 nachgewiesen werden.

Neben der Beteiligung der oben genannten Mediatoren wird der im Verlauf der septischen kardialen Dysfunktion beschriebenen erhöhten Konzentration von NO-Radikalen eine Rolle in der Pathogenese zugewiesen (Khadour et al., 2002, Ullrich et al., 2000). Daher wurde die Rolle der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthetase im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit weiter untersucht.

Eine halbe Stunde vor der Messung wurden den mit CpG inkubierten Kardiomyozyten der selektive iNOS-Inhibitor S-Methylisothioharnstoff (SMT) hinzugefügt. Dies machte den CpG-Effekt auf die isolierten Kardiomyozyten komplett rückgängig: Die Verkürzungsamplitude und die Geschwindigkeit der Verkürzung als auch der Entspannung entsprachen wieder trotz vorhergegangener Inkubation mit CpG über 4 beziehungsweise 5 h den Parametern in der Kontrollgruppe.

Dies legt nahe, dass der Signalweg des CpG-Effekts an der Herzmuskelzelle über TLR9 über die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase und damit über einen erhöhten NO-Spiegel führt.

Eine Studie von Paladugu et al. (2004) zeigte, dass bakterielle DNA (von *Staphylococcus aureus* und *E.coli*) konzentrationsabhängig die Kontraktilität der Kardiomyozyten von neugeborenen Ratten bis zu 60% minderte. Nach Vorbehandlung mit DNase blieb die beobachtete Kardio-depression aus. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Minderung der Kontraktilität tatsächlich durch die DNA selbst und nicht durch mögliche mit eingeschleppte Proteine erfolgte. Einerseits zeigt diese Studie analog zu den Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, dass bakterielle DNA direkt eine Funktionsminderung des Myokards bewirken kann. Allerdings ist von Paladugu et al. nicht untersucht worden, ob dieser Effekt durch einen spezifischen Rezeptor vermittelt wurde. Des Weiteren ist fraglich, ob speziell TLR9 bei neugeborenen Kardiomyozyten in glei-

cher Menge exprimiert werden wie in adulten Zellen und in wie weit Experiment an neonatalen Zellen mit denen wie hier vorliegend an adulten Zellen verglichen werden können.

Baumgarten et al. (2006) untersuchten die Rolle von TLR4 in der von bakteriellen Lipopolysacchariden ausgelösten Kardiodepression an Mäusekardiomyozyten. Es zeigte sich mit Hilfe von mRNA-Isolation und PCR-Amplifikation, dass iNOS nach Inkubation mit LPS stark vermehrt von Wildtyp-Kardiomyozyten gebildet wurde. Dieser Effekt trat bei TLR4-defizienten Tieren signifikant vermindert ein. Ebenso wurde die Kontraktilität der einzelnen Herzmuskelzellen nach LPS-Inkubation untersucht. Die Kontraktilität war signifikant verringert bei Wildtypzellen, nicht jedoch bei TLR4-defizienten Zellen. Durch SMT ließ sich der LPS-Effekt umkehren. Dies zeigt, dass iNOS von Kardiomyozyten nach Stimulation exprimiert werden kann und eine kardiodepressive Funktion besitzt.

In bereits zitierten anderen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression von iNOS in Wildtyp- und TLR9-defizienten Tieren nach Stimulation mit CpG-ODN untersucht. Auch hier zeigte sich ein ausgeprägter Anstieg von iNOS-mRNA in stimulierten Kardiomyozyten des Wildtyps. Dieser trat in den TLR9-defizienten Tieren nicht ein.

#### **4.5 Ausblick**

Ein Bestandteil der Pathogenese der Sepsis ist der Kontrollverlust des Immunsystems. Unter gewöhnlichen Umständen herrscht bei einer Infektion ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Vorgängen. In der Sepsis jedoch kommt es zu einem Verlust dieser Regulation („host defense failure“). Die Stimulation des Immunsystems führt zu einer Überproduktion von Entzündungsmediatoren und damit zu den charakteristischen Veränderungen der Homöostase wie Veränderungen der Hämodynamik, der Gerinnung und der Temperaturregulation. Diese führen statt zur sinnvollen Vernichtung des pathogenen Keimes zur Schädigung des Körpers und letztlich zum Multiorganversagen und zum Tod. Während Antibiotika eine suffiziente Bekämpfung des zugrunde liegenden Erregers ermöglichen, müssen neue Wege gesucht werden, um diese überschießende Reaktion des Organismus in einer fulminanten Sepsis zu dämpfen. Nur so wird einer kausalen Therapie genug Zeit gegeben, um erfolgreich zu greifen.

Durch die vorliegende Arbeit wird nahe gelegt, dass über den TLR9-Rezeptor direkt ohne die Vermittlung von immunkompetenten Zellen eine Verminderung der Kontraktilität des Herzens in

der Sepsis ausgelöst wird. Des Weiteren konnte mit Hilfe des selektiven iNOS-Inhibitors SMT die Umkehrung dieses Effektes und damit der Signalweg über die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase gezeigt werden. Die weitere Signalkaskade nach einer erhöhten Bildung von NO durch iNOS wurde mit den durchgeführten Experimenten nicht gezeigt. Hier gibt es Ansätze für weitere Arbeiten.

Darüber eröffnet sich die Möglichkeit, sowohl am TLR 9 direkt mithilfe eines Antagonisten als auch über einen iNOS-Inhibitor ein Medikament zu entwickeln, welches die durch CpG vermittelte kardiale Dysfunktion beheben kann. Medikamente, die spezifisch die iNOS im Herzen inhibieren, gibt es bisher nicht. Der Einsatz unspezifischer iNOS-Inhibitoren birgt jedoch das Risiko erheblicher Nebenwirkungen, da die iNOS im Immunsystem eine wichtige und komplexe Rolle spielt. Von der sich langsam abzeichnenden Kenntnis der Abläufe während der Sepsis bis zur Entwicklung einer kausalen Therapie ist noch ein weiter Weg zurückzulegen.

## 5 Zusammenfassung

Die Sepsis ist eine schwere und trotz der Möglichkeiten der modernen Intensivmedizin lebensbedrohliche Komplikation einer bakteriellen Infektion. Nach wie vor tritt sie sehr häufig auf und ist mit einer hohen Mortalität und – zunehmend wichtig – mit einem hohen Kostenaufwand in der Therapie verbunden.

Die durch eine Infektion in der Sepsis hervorgerufene Imbalance in der Homöostase des Körpers kann durch Störung der Makro- wie Mikrozirkulation zu Organschädigung und in der schlimmsten Ausprägung zum Multiorganversagen und zum Tod des Patienten führen. Maßgeblich ist an diesem Prozess die kardiale Dysfunktion beteiligt. Es ist bekannt, dass Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  an der Pathogenese der kardialen Funktionsminderung beteiligt sind, sowie dass bakterielle DNA als Pathogen die kardiale Depression verursachen kann. Unklar ist jedoch, ob dieser Effekt durch die Mediation von immunkompetenten Zellen vermittelt wird oder direkt über Rezeptoren der Toll-like-Familie am Kardiomyozyten selbst ausgelöst wird. Des Weiteren sind zwar einzelne Schritte der Signalkaskade des TLR9 bekannt, jedoch nicht der gesamte Signalweg.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob zum einen bakterielle DNA mit CpG-Motiv (CpG-ODN) an frisch isolierten Kardiomyozyten der Maus eine Beeinflussung der Kontraktilität verursacht und zum anderen ob der postulierte Signalweg über die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) und somit eine Erhöhung der Stickstoffmonoxidkonzentration führt.

Isolierte Kardiomyozyten adulter weiblicher Mäuse wurden über 6 h mit CpG-Oligonukleotiden inkubiert. Zu jeder Stunde wurde die Kontraktilität der Kardiomyozyten mittels optischer Sarkomerlängenmessung bestimmt. Im zweiten Teil der Versuche wurde isolierten Kardiomyozyten nach vier Stunden Inkubation in CpG-ODN S-Methylisothioharnstoff hinzugefügt. Nach weiteren 30 min Inkubation erfolgte dann die Verkürzungsmessung.

Hierbei zeigte sich zum ersten, dass CpG auch in Abwesenheit von immunkompetenten einen kardiodepressiven Effekt auf Herzmuskelzellen hat, dieser also durch Rezeptoren auf der Herzmuskelzelle selbst vermittelt werden muss. Zum anderen zeigte sich, dass eben jener kardiodepressive Effekt umgekehrt durch die Zugabe eines iNOS-Inhibitors werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten also darauf hin, dass:

- a) der Effekt von CpG auf Kardiomyozyten durch den kardialen TLR9 und nicht durch zusätzliche Vermittlung immunkompetenter Zellen erfolgt und

b) iNOS und ihr Syntheseprodukt NO eine essentielle Rolle in der Signalkaskade der septischen kardialen Dysfunktion spielen, da diese vollkommen behoben werden kann, wenn iNOS suffizient inhibiert wird.

Diese Erkenntnisse bieten zum einen mögliche Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen der Signalkaskade, zum anderen könnten sie auch therapeutisch von Nutzen sein, wenn medikamentös eine Unterbrechung des Signalweges möglich ist.

## 6 Anhang

### 6.1 Zusammensetzung der Lösungen und Medien

**Tabelle 7:** *Zusammensetzung des Zellkulturmediums*

<b>Zusammensetzung des Zellkulturmediums</b>	
<b>Anteil</b>	<b>Inhaltstoffe</b>
10 %	Fetales Kälberserum
5 %	Minimal essential medium
50 µg/ml	Gentamicin
Ad 100 %	Dulbecco's mean eagle medium

**Tabelle 8:** Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Substanz	EGTA-Tyrode	Messtyrode	Hochkalium-Lösung	Trypsinlösung	Kollagenaselösung
KCl (Merck)	4 mM	4 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl (Merck)	135 mM	135 mM	4 mM	4 mM	4 mM
CaCl <sub>2</sub> (Merck)	-	1,8 mM	0,02 mM	0,02 mM	0,02 mM
MgCl <sub>2</sub> (Merck)	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
HEPES (Merck)	2 mM	2 mM	4 mM	4 mM	4 mM
BSA (Sigma)	-	1 mg/ml	-	-	-
Trypsinhibitor (Sigma)	-	0,017 mg/ml	-	-	-
Glucose (Merck)	-	9 mM	9 mM	9 mM	9 mM
EGTA (Serva)	2,6 mM	-	-	-	-
Kalium-Glutamat (Fluka)	-	-	130 mM	130 mM	130 mM
Trypsin (Roche)	-	-	-	0,4 mg/ml	-
Kollagenase Typ L (Sigma)	-	-	-	-	0,375 mg/ml
Alle Lösungen wurden mit NaOH auf pH 7,40 ± 0,01 titriert.					

## 6.2 Tabellarische Aufstellung der Meßwerte

Im Folgenden bedeuten:      Mittelwert                      MW  
    Standardabweichung              SD  
    Anzahl der Zellen                n

**Tabelle 9 zu Abbildung 11:** *Frequenzabhängige Darstellung der Sarkomerverkürzungsamplitude bei 0 Stunden*

Frequenz [Hz]	MW	SD	n
0,5	0,058800	0,0396085	25
1	0,04513636	0,04236721	22
2	0,043400	0,03450631	15
4	0,04007143	0,02045432	14
6	0,06371429	0,02780716	7
8	0,09046154	0,05298052	13
10	0,086000	0,04969708	11

*Diese Werte waren ebenfalls Grundlage des Graphen bei 0 h Inkubation in der Abbildung 16 sowie in der Abbildung 18.*

**Tabelle 10 zu Abbildung 12:** *Frequenzabhängige Darstellung der Verkürzungsgeschwindigkeit bei 0 Stunden*

Frequenz [Hz]	MW	SD	n
0,5	-3,326000	2,014768	26
1	-2,413956	1,978866	23
2	-3,030313	3,119092	16
4	-2,016000	0,9454222	14
6	-3,445714	2,084535	7
8	-4,066333	1,896704	15
10	-3,166900	1,700436	10

**Tabelle 11 zu Abbildung 13:** : *Frequenzabhängige Darstellung der Relaxationsgeschwindigkeit bei 0 Stunden*

<b>Frequenz [Hz]</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>n</b>
0,5	1,986462	1,854255	26
1	1,499391	1,551714	23
2	1,485438	1,461920	16
4	1,245786	0,6668323	14
6	2,406714	1,710746	7
8	2,552400	1,489974	15
10	2,195900	1,359254	10

**Tabelle 12 zu Abbildung 14:** : *Frequenzabhängige Darstellung der Ruhesarkomerlänge bei 0 Stunden*

<b>Frequenz [Hz]</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>n</b>
0,5	1,7900	0,07629384	25
1	1,803421	0,06978484	19
2	1,803667	0,06566437	15
4	1,767857	0,06114027	14
6	1,7870	0,05329478	7
8	1,758923	0,07529106	13
10	1,7412	0,1006422	10

**Tabelle 13 zu Abbildung 15:** : *Frequenzabhängige Darstellung der Verkürzungsdauer bei 0 Stunden*

<b>Frequenz [Hz]</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>n</b>
0,5	0,1388462	0,063911	26
1	0,1254348	0,04410713	23
2	0,1336875	0,04436172	16
4	0,1140714	0,02142416	14
6	0,09785714	0,03547501	7
8	0,09828571	0,01768715	14
10	0,086500	0,01753251	10

**Tabelle 14 zu Abbildung 16:** *Darstellung der kompletten CpG-Zeitlinie – Stunden 1 bis 3. Die Werte bei 0 h Inkubation sind in Tabelle 9 dargestellt.*

<b>Frequenz [Hz]</b>	<b>1 h</b>			<b>2 h</b>			<b>3 h</b>		
	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>n</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>n</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>n</b>
0,5	0,06989474	0,04226753	19	0,0701	0,03691655	20	0,03784211	0,02707041	19
1	0,06038889	0,03851377	18	0,06121429	0,03768734	14	0,025650	0,01788053	20
2	0,0506	0,03033339	15	0,053	0,03591425	13	0,022200	0,0163803	15
4	0,05616667	0,03393116	18	0,05175	0,03681681	12	0,061125	0,0428925	24
6	0,08182608	0,04972255	23	0,0854375	0,0494179	16	0,059600	0,02683899	22
8	0,08628571	0,04262976	14	0,080625	0,04460774	16	0,065675	0,05436683	24
10	0,07033333	0,03306834	12	0,06657895	0,03714135	19	0,077350	0,04499038	20

**Tabelle 15 zu Abbildung 16:** Darstellung der kompletten CpG- Zeitlinie – Stunden 4 bis 6. Die Werte von 4 h und 5 h bilden die Grundlage der Graphen der entsprechenden Inkubationszeiten in der Abbildung 18.

Frequenz [Hz]	4 h			5 h			6 h		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,03464286	0,0212031	28	0,02717647	0,0180805	17	0,03886364	0,02345268	22
1	0,02166667	0,02017259	21	0,02366667	0,01068843	12	0,02785714	0,01918928	21
2	0,02347619	0,0256683	21	0,02126667	0,01338158	15	0,02642857	0,02082204	21
4	0,03017647	0,0224812	17	0,02427273	0,01523871	11	0,032875	0,01928341	16
6	0,03942105	0,02263801	19	0,04208333	0,02547533	12	0,050600	0,02716112	20
8	0,044000	0,02922774	24	0,042375	0,0274539	16	0,058200	0,03014548	25
10	0,036750	0,02715041	20	0,03607143	0,02223118	14	0,05540741	0,03027599	27

**Tabelle 16 zu Abbildung 17:** Darstellung der Verkürzungsamplitude bei einer Reizfrequenz von 6 Hz in Abhängigkeit der Inkubationsdauer.

Inkubationsdauer [h]	MW	SD	N
0	0,06371429	0,02780716	7
1	0,08182608	0,04972255	23
2	0,0854375	0,0494179	16
3	0,059600	0,02683899	22
4	0,03942105	0,02263801	19
5	0,04208333	0,02547533	12
6	0,050600	0,02716112	20

**Tabelle 17 zu Abbildung 19 und 20:** Darstellung der Sarkomerverkürzungsamplitude bzw. der Verkürzungsgeschwindigkeit der Gruppen Kon – 0 h, CpG – 5 h, SMT – 5 h.

Frequenz [Hz]	Kon – 0 h			CpG – 5 h			SMT – 5 h		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,07116216	0,04500525	37	0,03664706	0,0250534	51	0,082000	0,05622633	20
1	0,05316667	0,04263366	36	0,02513514	0,02022534	37	0,07263158	0,04730893	19
2	0,05273333	0,04721479	30	0,023675	0,02134261	40	0,07006667	0,042321	15
4	0,06006667	0,0496574	30	0,03383871	0,03157435	31	0,07986667	0,04531929	15
6	0,08265	0,04066975	20	0,04374286	0,03040157	35	0,09561111	0,0485691	18
8	0,09975	0,05434371	24	0,04671111	0,03434029	45	0,09152631	0,04886304	19
10	0,09326087	0,05048241	23	0,046350	0,03940099	40	0,09011765	0,04566301	17

Frequenz [Hz]	Kon – 0 h			CpG – 5 h			SMT – 5 h		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	-3,414256	2,159333	43	-2,140723	1,115687	47	-3,958524	2,741263	21
1	-2,842053	2,268587	38	-1,731571	1,175378	35	-3,188579	1,780258	19
2	-3,187788	2,747385	33	-1,646000	1,243294	37	-3,409250	1,875959	16
4	-3,447515	3,382937	33	-1,944167	1,428448	30	-3,605200	1,821595	15
6	-4,164957	2,834599	23	-1,907371	1,338439	35	-3,552944	1,736593	18
8	-4,320207	2,422618	29	-1,892255	1,364312	47	-3,368684	2,259490	19
10	-2,622792	3,376734	24	-1,574537	2,202958	41	-2,975471	2,593065	17

**Tabelle 18 zu Abbildung 21 und 22:** Darstellung der Relaxationsgeschwindigkeit und der Ruhesarkomerlänge der Gruppen Kon – 0 h, CpG – 5 h, SMT – 5 h.

Frequenz [Hz]	Kon – 0 h			CpG – 5 h			SMT – 5 h		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	2,165791	2,089479	43	1,131646	0,8174171	48	2,725273	1,958233	22
1	2,123579	2,873897	38	0,9023143	0,7630735	35	2,342053	1,582106	19
2	2,012424	2,963098	33	1,094579	1,346327	38	2,63075	2,120684	16
4	2,386091	2,591087	33	1,375483	1,419384	29	2,691933	1,826077	15
6	2,845217	2,321438	23	1,338471	1,304234	34	3,097445	1,842739	18
8	3,036862	2,271497	29	1,478938	1,621599	48	2,423947	1,539687	19
10	3,098579	2,381285	19	1,300744	1,135274	39	2,758333	1,801915	15

Frequenz [Hz]	Kon – 0 h			CpG – 5 h			SMT – 5 h		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	1,776476	0,08356602	42	1,73046	0,07486024	51	1,752773	0,05890665	22
1	1,791324	0,06556255	37	1,741108	0,05745519	37	1,729789	0,05467742	19
2	1,784656	0,07853728	32	1,741925	0,0695931	40	1,713667	0,06509089	18
4	1,763061	0,07544159	33	1,724552	0,06999111	29	1,712944	0,05456725	18
6	1,726457	0,07774027	35	1,726457	0,07774027	35	1,713556	0,06222655	18
8	1,741148	0,0869552	27	1,726844	0,06390901	45	1,702211	0,06420157	19
10	1,724583	0,1042205	24	1,725025	0,06546539	40	1,696059	0,07974371	17

**Tabelle 19 Werte zu Abbildung 21:** Darstellung der Relaxationsgeschwindigkeit der Gruppen Kon – 0 h , CpG – 5 h, SMT – 5 h.

Frequenz [Hz]	Kon – 0 h			CpG – 5 h			SMT – 5 h		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,148375	0,09375902	40	0,1711064	0,1426557	47	0,1475909	0,06891241	22
1	0,1282368	0,04699479	38	0,1673429	0,1130156	35	0,148000	0,06468986	19
2	0,1359394	0,06361993	33	0,1333421	0,0895835	38	0,137375	0,04835959	16
4	0,1123939	0,03190213	33	0,1086333	0,05289057	30	0,1161333	0,03336779	15
6	0,1003913	0,02862253	23	0,09965714	0,02738821	35	0,1041667	0,02122498	18
8	0,09553571	0,01809539	28	0,08970213	0,01837166	47	0,097000	0,01450287	19
10	0,08252174	0,02301357	23	0,08189744	0,01619583	39	0,092625	0,01727764	16

## 7 Literaturverzeichnis

Achenbach C, Wiemer J, Preisler R. Isolation of adult ventricular myocytes for electrophysiological experiments. *Basic Res Cardiol* 1985; 80 (Suppl. 1): 162

ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992

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

Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N, Sivasubramanian N, Mann DL, Vallejo JG. 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 Rappard J, Dreiner U, Fink K, Djoufack C, Hoeft A, Grohé C, Knowlton AA, Meyer R. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 2006; 25: 43-49

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9237-9242

Boyd JH, Mathur S, Wang Y, Bateman RM, Walley KR. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF- $\kappa$ B dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res* 2006; 72: 384-393

Brunkhorst FM. Definition und Diagnose der Sepsis nach aktuellen Kriterien. *Klinikerarzt* 2004; 33: 167-172

Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A, Harken AH. Tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* 1999; 27: 1309-1318

Charpentier J, Luyt CE, Fulla Y, Vinsonneau C, Cariou A, Grabar S, Dhainaut JF, Mira JP, Chiche JD. Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32: 660-665

Clark WA, Decker ML, Behnke-Barklay M, Janes DM, Decker RS. Cell contact as an independent factor modulating cardiac myocyte hypertrophy and survival in long-term primary culture. *J Mol Cell cardiol* 1998; 30: 139-155

Debré P, Forster E. Louis Pasteur. Baltimore, Maryland: Johns Hopkins University Press, 1998

Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst H, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Ulrich J, John S, Mayer K, Opper M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Int Care Med* 2007; 33: 606-618

Giroir BP, Johnson JH, Brown T, Allen GL, Beutler B. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest* 1992; 90: 693-698

Gortvay G. Semmelweis, Retter der Mütter. Hirzel, Leipzig 1977

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

He Q, Spiro MJ. Suspension culture of differentiated rat heart myocytes on non-adhesive surfaces. *J Mol Cell cardiol* 1996; 28: 1177-1186

Kempelmann HJ. Der Einfluss von Gelsolin auf die Verkürzung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten der Maus. Diss Med Fak Universität Bonn, 2005

Khadour FH, Panas D, Ferdinandy P, Schulze C, Csont T, Lalu MM . Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol* 2002; 283: H1108-H1115.

Kleinmann HK, Luckenbill-Edds L, Cannon FW, Sephel GC. Use of extracellular matrix components for cell culture. *Anal Biochem* 1987; 166: 1-13

Knuefermann P, Nemoto S, Baumgarten G, Misra A, Sivasubramanian N, Carabello BA, Vallejo JG. Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? *Chest* 2002a; 121: 1329-1336

Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2002b; 106: 2608-2615

Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Stapel H, Rüdiger M, Boehm O, Fink K, Dreiner U, Grohé C, Hoeft A, Baumgarten G, Koch A, Zacharowski K, Meyer R. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: Role of Toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res* 2008 (im Druck)

Kopp EB, Medzhitov R. The toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 13-18.

Kreymann G, Wolf M. Geschichte und Definition der Sepsis - Brauchen wir eine neue Terminologie? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1996; 31: 9-14

Lakhani SA, Bogue CW. Toll-like-receptor signalling in sepsis. *Curr Opin Pediatr* 2003; 15: 278-282

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5: 190-198

Lesot H, Kuhl U, von der Mark K. Isolation of laminin-binding protein from muscel cell membranes. *EMBO j* 1983; 2: 861-865

Linz KW, Meyer R. Profile and kinetics of L-type calziium current during the cardiac ventricular action potential compares in guinea-pigs, rats and rabbits. *Pflügers Arch: European Journal of Physiology* 2000; 439: 588-599

Meyer R. Oberflächenstruktur, Membranströme und Kontratkrilität isolierter Herzmuskelzellen. Habilitationsschrift Med Fak Universität Bonn 1989.

Mukhodpadhyay S, Herre J, Brown GD, Gordon S. The potential for toll-like receptors collaborate with other innate immune receptors. *Immunology* 2004; 112: 521-530.

Nair RR, Nair P. Age-dependent variation in contractility of adult cardiac myocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 2001. 33: 11-125.

Pagani FD, Baker LS, His C, Knox M, Fink MP, Visner MS. Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor- $\alpha$  in conscious dogs. *J Clin Invest* 1992; 90: 389-398

Paladugu B, Kumar A, Parrillo JE, Der S, Osman J, Mensing J, Falvo L, Xu X, Kumar A. Bacterial DNA and RNA induce rat cardiac myocyte contraction depression in vitro. *Shock* 2004;21: 364-369

Pålsson-McDermont EM und O'Neill LAJ. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004; 113: 153-162

Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 227-242.

Rensing H. Endotoxin. Pathogenetische Bedeutung bei der Sepsis. *Anaesthesist* 2003; [Suppl.1] 52: 7-13

Rodriguez-Martinez S, Cancino-Diaz ME, Jimenez-Zamudio L, Garcia-Latorre E, Cancino-Diaz JC. TLRs and NODs mRNA expression pattern in healthy mouse eye. *Br J Ophthalmol* 2005; 89: 904-910.

Semmelweis IP. Die Ätiologie, der Begriff und die Prophylaxe des Kindbettfiebers. 1861

Schottmüller H. Wesen und Behandlung der Sepsis; Verhandl dt Kongress Inn Med. 1914, 31: 257-280

Schumacher G. TLR-4-Rezeptor-vermittelter Einfluy von Endotoxin auf die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten der Maus. Diss Med Fak Universität Bonn 2006

Schuster HP, Müller-Werdan U. Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen. Berlin Heidelberg New York; Springer, 2000

Siegmund-Schultze, N. Toll-like-Rezeptoren: Neue Zielstruktur für immunstimulierende Medikamente *Dtsch Arztebl* 2007; 104: A-1072 / B-954 / C-908 MEDIZINREPORT

Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Borschert K, Hacker H, Heeg K, Wagner H. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature*. 1997; 386: 336-337

Southan GJ, Szabo C, Thiemermann C. Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity. *British Journal of Pharmacology*. 1995; 114: 510-516

Sugishita K, Kinugawa K, Shimizu T, Harada K, Matsui H, Takahashi T, Serizawa T, Kohmoto O. Cellular basis for the acute inhibitory effects of IL-6 and TNF-  $\alpha$  on excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 1457-1467

Tiemann K, Weyer D, Djoufack PC, Ghanem A, Lewalter T, Dreiner U, Meyer R, Grohé C, Fink KB. Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early post-natal development. *Am J Physiol* 2003; 284: H464-H474.

Ullrich R., Scherrer-Crosbie M., Bloch KD, Ichinose F., Nakajima H., Picards MH. Congenital deficiency of nitric oxide synthase 2 protects against endotoxin-induced myocardial dysfunction in mice. *Circulation* 2000; 102: 1440-1446.

Vollmer J. TLR9 in health and disease. *Int Rev Immunol* 2006;25: 155-181.

Vervölgyi V. Die Wirkung der bakteriellen Sepsis auf die elektromechanische Kopplung und die Hypertrophieentwicklung des Herzens. Inaugural-Dissertation Vet.-Med Fak Universität Gießen, 2007

Von der Mark K, Kuhl U. Laminin and its receptors. *Biochim Biophys Acta* 1985; 823: 147-160.







**Veröffentlichungen:**

**Abstract:** Knuefermann P, Rüdiger M, Dreiner U, Vervölgyi V, Schwederski M, Grohé C, Baumgarten G, Meyer R. Bacterial DNA reduces shortening of cardiac myocytes via Toll-like receptor 9. *Acta Physiologica* 2006, Vol. 186, PM06A - 17

**Publikation:** Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Stapel H, Rüdiger M, Boehm O, Fink K, Dreiner U, Grohé C, Hoeft A, Baumgarten G, Koch A, Zacharowski K, Meyer R. Bacterial DNA induces inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: Role of Toll-like receptor 9. *Cardiovascular Research*, 2008 (im Druck)