

Die Bedeutung von TLR9 für die inflammatorische Reaktion im Herz nach CASP induzierter Sepsis

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Florian Pieper

aus Siegen

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Stilla Frede
2. Gutachter: Prof. Dr. Frank A. Schildberg

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.01.2025

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin

Meiner lieben Frau Andrea.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	11
1.1	Sepsis, Definition und Epidemiologie	11
1.2	Angeborene Immunität und Pathophysiologie der Sepsis	13
1.3	Septische Kardiomyopathie	14
1.4	Toll-like Rezeptoren und TLR-9	16
1.5	Tumornekrose Faktor- α (TNF- α)	19
1.6	Interleukin-1 β (IL-1 β)	19
1.7	Interleukin-6 (IL-6)	20
1.8	Interleukin-10 (IL-10)	21
1.9	High mobility group box-1 (HMGB-1)	22
1.10	Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)	23
1.11	Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthetase (iNOS)	23
1.12	Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)	25
1.13	Ziele und klinische Relevanz	26
2.	Material und Methoden	27
2.1.	<i>In-vivo Versuchsteil</i>	27
2.1.1	Genehmigung der Tierversuche	27
2.1.2	Versuchstiere und Tierhaltung	27
2.1.3	TLR-9 Knockout Tiere	28
2.1.4	Genotypisierung der KO-Tiere	29
2.1.5	Versuchsaufbau der Tierversuche	29
2.1.6	Das murine CASP Modell und die Sham Operation	31
2.1.7	OP Vorbereitung	31
2.1.8	Anästhesie und Analgesie	32
2.1.9	CASP Operation	33
2.1.10	Sham Operation	35
2.1.11	Krankheitsscoring	35
2.1.12	Peritoneallavage und Organentnahme	36

2.2.	<i>ex-vivo Versuchsteil</i>	38
2.2.1	Herstellung des MacConkey Agar	38
2.2.2	Bakterienlast der Peritoneallavage	38
2.2.3	PCR Kontrolle der KO-Mäuse	39
2.2.4	Genexpressionsanalyse des Herzgewebes	42
2.2.5	RNA Extraktion und Konzentrationsbestimmung	42
2.2.6	cDNA-Synthese	43
2.2.7	Quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion	44
2.2.8	Statistische Auswertung	47
2.3	<i>Materialien</i>	48
2.3.1	Materialien für die Tierhaltung	48
2.3.2	Verbrauchsmaterialien	49
2.3.3	Geräte und Zubehör	50
2.3.4	Reagenzien und Lösungen	51
2.3.5	Softwareprogramme	53
3.	Ergebnisse	53
3.1	Bewertung des Krankheitsgrades nach CASP-OP	53
3.2	Peritoneallavage und Analyse der Bakterienlast	59
3.3	Genexpression inflammatorischer Marker im Herzgewebe	61
4.	Diskussion	70
4.1	Validierung des Sepsis-Modells	70
4.2	Charakterisierung der kardialen inflammatorischen Antwort in der polymikrobiellen Sepsis	72
4.3	Schlussfolgerung	78
5.	Zusammenfassung	78
6.	Abbildungsverzeichnis	80
7.	Tabellenverzeichnis	84
8.	Literaturverzeichnis	85
9.	Danksagung	98

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BSF	B-Zell stimulierender Faktor
CARS	Compensatory antiinflammatory response syndrom
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CLP	Cecal Ligation and Puncture
CLR	C-type Lectin Receptor
CR	Complement Receptor
CRP	C-reaktives Protein
CSIF	Cytokine synthesis inhibitory factor
DAMP	Damage-associated Molekular Pattern; Alarmin
DC	Dendritischen Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	Diagnosis Related Groups
ER	Endoplasmatischen Reticulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FFR	Cardiac force-frequency response
G	Gauge
HMGB	High Mobility Group Box

HS	Heparansulfate
HSP	Heat Shock Protein
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IKK	Inhibitor der NF- κ B-Kinase
IL	Interleukin
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assozierte Kinase
IRF	Interferon Regulatory Factor
KbE	Kolonie bildende Einheiten
kDa	kilo Dalton
LFA	Lymphocyte Function-associated Antigen
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin rich repeats
LTA	Lipoteichonsäure
LV	Linker Ventrikel
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MD	Myeloid differentiation Factor
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
mRNA	Messenger RNA
MyD	Myeloid Differentiation Primary Response Gene
MW	Mittelwert

n	Anzahl
NF-κB	Nuclear Factor-κB
NK-Zellen	Natürlichen Killerzellen
NLR	Nucleotide Oligomerization Domain-like Receptors
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
NOS	Stickstoffmonoxid Synthetase
OP	Operation
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PICS	Persistent Inflammation-Immunsuppression and Catabolism Syndrome
PRR	Pattern Recognition Receptor
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase PCR
qSOFA	Quick Sequential Organ Failure Assessment Score
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RIG	Retinoic Acid-inducible Gene
RLR	Retinoic Acid-inducible Gene-like Receptors
RNA	Ribonukleinsäure
RV	Rechter Ventrikel
s.c.	Sub cutan

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Sham-OP	Kontrolloperation
SIC	Sepsis-induced Cardiomyopathy
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SR	Sarkoplasmatische Ritikulum
TAQ Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
TH-Zellen	T-Helferzellen
TIRAP	Toll/Interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein
TIR Domäne	Toll/IL-1 Rezeptor ähnliche Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN
WT	Wildtiervariante

1. Einleitung

1.1 Sepsis, Definition und Epidemiologie

Unser Verständnis für das hochkomplexe Krankheitsbild der Sepsis ist auch heute noch einem ständigen Wandel unterzogen. So zeigte sich, dass die Definition des Systemic inflammatory response syndrom (SIRS) zu unspezifisch für die Anwendung war, da beispielsweise auf einer Intensivstation zu viele Patienten auch mit nichtinfektiösen Erkrankungen dieser Definition entsprachen (Vincent et al., 2013). Alleine die Probleme eine klinisch brauchbare Definition zu finden, wie man im Rahmen der dritten Sepsis-Neudefinition durch die Surviving Sepsis Campaign im Jahre 2016 wahrnehmen konnte, veranschaulichen uns die Komplexität des Krankheitsbildes beziehungsweise des immunologischen Syndroms der Sepsis (Brunkhorst et al., 2020).

Während des septischen Krankheitsverlaufes kommt es zu einer Dysbalance zwischen dem komplizierten Gleichgewicht verschiedenster proinflammatorischer und antiinflammatorischer Prozesse. Sowohl die initial auftretende Hyperinflammation als auch die kompensatorischen, antiinflammatorischen Prozesse (compensatory antiinflammatory response syndrom, CARS) und katabole Syndrome (persistent inflammation-immunsuppression and catabolism syndrome, PICS) können den Patienten hierbei schwer schädigen (Patricio et al., 2019).

Zahlreichen neuen Erkenntnissen aus der Grundlagenforschung ist es zu verdanken, dass das Wissen über die zugrundeliegenden Mechanismen dieser zum Teil tödlich verlaufenden Inflammationsabläufe zugenommen hat. In der Konsensuskonferenz der Sepsis Campaign 2016 kam es zu einer Änderung der Sichtweise der Sepsis von einer Infektion mit Immunreaktion hin zu einem größeren Fokus auf die fehlregulierte Immunantwort des Patienten als Kern der Erkrankung, die zu einer lebensbedrohlichen Organdysfunktion führt (Rhodes et al., 2017; Singer et al., 2016, Kumar, 2018). Auch jüngst nach der vierten und aktuellsten Konsensuskonferenz Ende 2021 hat sich an dieser neuen Sichtweise wenig geändert und auch die Therapiemaßnahmen und Detektionssysteme wurden - bis auf das Zurücknehmen des quick Sequential Organ Failure Assessment Score (qSOFA) und den Stellenwert der Rekapillarierungszeit gerade auch für die Flüssigkeitstherapie - nur in Nuancen geändert (Schmoch et al.,

2022). Neue revolutionierende Erkenntnisse oder deutlich mortalitätssenkende Therapieansätze sind auch in den neuen Sepsis Leitlinien nicht gegeben. Trotz gewonnener Erkenntnisse über die wichtige Rolle verschiedener Entzündungsmediatoren, wie z. B. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und IL-6 und vieler beteiligter Rezeptoren konnte hierdurch bisher noch kein bahnbrechendes, therapeutisches Konzept etabliert werden. Ein vielversprechender Therapieansatz über eine einseitige Blockade eines der verschiedenen zentralen Signalkaskade-Wegen, zum Beispiel über TLR-4, hatte leider auch keinen klinischen Durchbruch in der Sepsistherapie gebracht wie die ACCESS-Studie von Opal SM et al. (2013) mit Eritoran, einem TLR-4 Antagonisten gezeigt hat.

Die Sepsis spielt daher auch weiterhin im klinischen Alltag eine große Rolle. Alleine in Deutschland erkranken jedes Jahr rund 280.000 Menschen an einer Sepsis, weltweit betrachtet sogar bis zu 30 Millionen Menschen jährlich. Die Sepsis ist nach dem Herzinfarkt und den Tumorerkrankungen nach wie vor mit ca. 60.000 Todesfällen pro Jahr an dritter Stelle der häufigsten Todesursachen in Deutschland (Adamzik und Rahmel, 2019; Brunkhorst et al., 2006). Gerade im Hinblick auf eine alternde Gesellschaft mit entsprechend älteren, multimorbiden Patienten und deren Einschränkungen des Immunsystems und einem daraus resultierenden schlechten Outcome, zeigt sich die Bedeutung der Sepsis auch für die Zukunft (Carbajal-Guerrero et al., 2014). Nicht zuletzt ist ebenso die steigende Zahl antibiotikaresistenter Keime und der im Vergleich hierzu nur schleichende Anstieg neuer uns zur Verfügung stehender Antibiotika ein kritischer Punkt, der der Sepsis in Zukunft noch mehr Gewicht verleihen wird (Angus et al., 2001; Opal und Cohen, 1999). Dies zeigen auch Zahlen der deutschen Diagnosis Related Groups (DRG)-Statistik, welche einen Anstieg der Sepsisfälle in Deutschland im Zeitraum von 2007 bis 2013 von 200.535 auf 279.530 Fälle pro Jahr und damit einen jährlichen Anstieg um ca. 5,7 % zeigen (Fleischmann et al., 2016). Auch Daten aus den USA im Zeitraum von 2003 bis 2007 zeigen einen Anstieg der Inzidenz der Fälle mit einer schweren Sepsis um ca. 50 % (Lagu et al., 2012). Dombrovskiy et al. (2007) konnten eine Verdopplung der Hospitalisierungsrates im Falle einer schweren Sepsis zeigen. Durch eine kontinuierliche Steigerung der Therapiekosten bei immer aufwendigeren, therapeutischen Maßnahmen und einer langen Aufenthaltsdauer septisch erkrankter Patienten auf der Intensivstation bei gleichzeitig steigender Inzidenz entfällt auf die Therapie der Sepsis in Deutschland

etwa 30 % des intensivmedizinischen Jahresbudgets von ca. 1,77 Milliarden Euro (Graf et al., 2007). Auch nach der intensivmedizinischen Behandlung zeigen Studien, dass das Mortalitätsrisiko der betroffenen Patienten abhängig von der Krankheitsschwere, der Lokalisation des Sepsisfokus, dem Alter, den Nebenerkrankungen und anderen Faktoren bei gleichzeitig verminderter Lebensqualität noch für Jahre erhöht ist (Heyland et al., 2000; Winters et al., 2010).

1.2 Angeborene Immunität und Pathophysiologie der Sepsis

Die angeborene Immunabwehr besteht aus mehreren Komponenten. Körperepithelien stellen eine erste Barriere dar und besitzen eine Vielzahl von Zellen und Molekülen, die eingedrungene Krankheitserreger markieren, eindämmen oder zerstören. Eingedrungene Pathogene werden über bestimmte konservierte mikrobielle Strukturen, den sogenannten Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs) wie beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS), von Mustererkennungsrezeptoren den Pattern Recognition Receptors (PRRs) und Inflammasomen erkannt (Janeway und Medzhitov, 2002; Janeway et al., 2002). Zu den PRRs gehören verschiedene Familien von Rezeptoren. Es sind Transmembranproteine wie C-type lectin receptors (CLRs) und die Toll-like receptors (TLRs), aber auch zytoplasmatische Proteine wie die Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors (RLRs) und Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) (Patricio et al., 2019). Diese Rezeptoren befinden sich nicht nur auf Zellen der angeborenen Immunabwehr wie z.B. Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) oder dendritischen Zellen (DC), sondern auch auf Epithel- und Endothelzellen sowie Fibroblasten und anderen nichtprofessionellen Immunzellen. Sie vermitteln über intrazelluläre Signalkaskaden beispielsweise über den myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) Signalweg mit Aktivierung des Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) die vermehrte Transkription, und damit die Expression von proinflammatorischen Zytokinen. Weitere Zyto- und Chemokine werden gebildet, Immunzellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems angezogen und aktiviert, das Komplementsystem wird aktiviert und Akute-Phase Proteine gebildet, ebenso wird die Gerinnungskaskade in Gang gesetzt und das Endothel aktiviert (Agier et al., 2018; Takeda et al., 2003). Der menschliche Körper reagiert so initial unspezifisch mit einer Entzündung im betroffenen Gebiet. Hierbei kommt es zur Vasodilatation, einer erhöhten Gefäßpermeabilität und zur

Bildung verschiedener Adhäsionsmoleküle. Dies ermöglicht den Austritt verschiedener Proteine in das umliegende Gewebe und die Diapedese (Extravasation) der Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, später auch eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten) durch die Gefäßwände in das betroffene Gewebe (Janeway et al., 2002). Das angeborene Immunsystem kann jedoch nicht spezifisch auf Pathogene reagieren und stellt nur einen unspezifischen Schutz dar. Auch kann mit Hilfe des angeborenen Immunsystems kein immunologisches Gedächtnis ausgebildet werden.

Sind die Pathogene rasch zu beseitigen klingt die Entzündungsreaktion schnell wieder ab. Bei einer anhaltenden Infektion oder bei einer besonders fulminanten Infektion mit einer Flut von Pathogenen kann es zu einer überschießenden Immunantwort mit einem sogenannten „Zytokinsturm“ mit nachfolgender Organdysfunktion kommen. Es konnte gezeigt werden, dass 17 Zytokine in Patienten mit septischem Schock erhöht waren. Hierzu gehören unter anderem Interleukin-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, Interferon- γ , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und Tumor-Nekrose-Faktor- α . Spezifische Zytokinmuster und Proteine mit zum Teil noch unbekanntem Wirkmechanismen sind für die Sepsis und im Verlauf für ein Multiorganversagen (multi organ dysfunction syndrome/MODS) verantwortlich. (Kumar, 2018; Landesberg et al., 2015; Patricio et al., 2019; Takeuchi und Akira, 2010). Auch nicht-infektiöse Prozesse können das angeborene Immunsystem aktivieren, beispielsweise durch körpereigene Damage-associated molecular Patterns (DAMPs), auch als Alarmine bezeichnet. Dies sind unter anderem Fragmente körpereigener, geschädigter Zellen wie z.B. Histone, HMGB-1 oder lösliche Heparansulfate (HS), die von Zelloberflächen abgespalten werden und ebenfalls in der Lage sind PRRs zu aktivieren und das Immunsystem ihrerseits anzuregen und zur Zytokinproduktion zu stimulieren (Chan et al., 2012; Hagiwara et al., 2008; Martin et al., 2017).

1.3 Septische Kardiomyopathie

Die Herzfunktion kann im Rahmen einer Sepsis eingeschränkt sein und wird in diesem Zusammenhang unter dem Oberbegriff der „septischen Kardiomyopathie“ oder auch der Sepsis-induced cardiomyopathy (SIC) als eine reversible Organdysfunktion zusammengefasst (Mirtschink und Stehr, 2017; Zaky et al., 2014).

Auf Kardiomyozyten selbst konnten Toll-like Rezeptoren und Oberflächenmoleküle wie CD-14 nachgewiesen werden. Auch für kardiale Fibroblasten konnte eine entscheidende immunologische Rolle und die Sekretion verschiedener inflammatorischer Zytokine belegt und ihre Beteiligung bei der septischen Kardiomyopathie gezeigt werden. Insbesondere Toll-like Rezeptor-2, TLR-4 und TLR-9 wurden auf Kardiomyozyten nachgewiesen und untersucht. Es konnte ihre zentrale Bedeutung für die septische Kardiomyopathie *in vivo* und *in vitro* bewiesen werden (Baumgarten et al., 2006; Boyd et al., 2006b; Knüfermann et al., 2002; Knüfermann et al., 2004; Lohner et al., 2013; Martin et al., 2017; Tomita et al., 2015; Zaky et al., 2014). Die TLRs auf Kardiomyozyten können im Rahmen der generalisierten Zytokinaktivität aktiviert werden und die Herzmuskelzellen ihrerseits Zytokine und andere Stoffe wie beispielsweise Stickoxid (NO) in das Blut abgeben. Herzgewebe kann so selbst eine septische Kardiomyopathie induzieren und unterhalten (Kumar et al., 1999; Martin et al., 2017; Walley, 2018).

Die septische Kardiomyopathie ist charakterisiert durch eine Verminderung der systolischen Kontraktilität des Herzens mit abnehmendem Schlagvolumen. Eine Abnahme der kardialen Nachlast durch die Gefäßdilatation und der Vorlast durch Hypovolämie bei erhöhter Gefäßpermeabilität mit Austreten intravasaler Flüssigkeit führt zu einer geringeren Ventrikel Füllung und damit im Weiteren zu einer erniedrigten Herzleistung. Eine diastolische Dysfunktion im Rahmen der septischen Kardiomyopathie mit erniedrigter Ventrikelcompliance verschärft die reduzierte Ventrikelfüllung weiter. Auswirkungen der Sepsis auf die Herzfunktion konnten sowohl für den linken Ventrikel (LV), als auch für den rechten Ventrikel (RV) gezeigt werden (Clancy et al., 2017; Ebel et al., 2011; Pulido et al., 2012; Walley, 2018). Eine abgeschwächte adrenerge Antwort der Kardiomyozyten scheint ein globaler Mechanismus der septischen Kardiomyopathie zu sein. Ursächlich ist eine Abnahme von β_1 -Rezeptoren und eine Abnahme der stimulierenden G-Proteine bei gleichzeitiger Zunahme hemmender G-Proteine in den Herzmuskelzellen (Martin et al., 2017) sowie ein gestörter Kalziumhaushalt (Hobai et al., 2015). Auch konnte in zahlreichen Arbeiten bereits belegt werden, dass Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 die Kontraktionskraft von Herzmuskelzellen vermindern (Kumar et al., 1996; Kumar et al., 1999; Martin et al., 2017; Natanson et al., 1989), aber auch DAMPs wie HMGB-1 eine wichtige Rolle bei der septischen Kardiomyopathie spielen (Hagiwara et al., 2008; Zhang et al., 2014). In Myokardbiopsien von Patienten mit septischer

Kardiomyopathie zeigte sich, dass die Inflammation zu einer verminderten Expression von Genen für mitochondriale und sarkomerische Proteine führt und es im Rahmen der Sepsis zu Schäden an den Mitochondrien kommt (Cimolai et al., 2015; Matkovich et al., 2017).

1.4 Toll-like Rezeptoren und TLR-9

Toll-like Rezeptoren sind hochkonservierte Mustererkennungsrezeptoren der angeborenen Immunität, die von einer Vielzahl mehrzelliger Organismen exprimiert werden. TLRs sind Transmembranrezeptoren und kommen beim Menschen in der äußeren Zellmembran (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6) und in intrazellulären Membranen (TLR-3, TLR-7, TLR-8, TLR-9) z.B. von Hepatozyten, Kardiomyozyten, Monozyten/Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, epithelialen und endothelialen Zellen, Neutrophilen Zellen, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und Dendritischen Zellen (DCs) vor (Agier et al., 2018; Boyd et al., 2006a; Janeway et al., 2002; Patricio et al., 2019). Nukleinsäure erkennende TLRs liegen im Inneren der Zelle. Bei allen TLRs liegt die N-terminale Domäne der Rezeptoren extrazellulär bzw. dem Lumen des Endosoms zugewandt, welche die Ligandenbindungsstelle darstellt und aus leucinreichen Wiederholungen besteht (Leucin rich repeats, LRR) (Lim und Staudt, 2013). Die intrazellulär gelegenen C-terminale Domäne weist Ähnlichkeiten zum IL-1-Rezeptor auf und wurde deshalb Toll/IL-1 Rezeptor ähnliche Domäne (TIR Domäne) genannt. Sie ist verantwortlich für die Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskaden (Kumar et al., 2009).

PAMP-Liganden der TLR sind unter anderem Lipoteichonsäure (LTA), Lipopolysaccharide (LPS), Mannose auf der Bakterienzellwand, doppelsträngige RNA oder bakterielle DNA (Akira, 2001; Agier et al., 2018; Patricio et al., 2019). Aber auch DAMPs wie HMGB-1 können Liganden der Rezeptoren sein (Hagiwara et al., 2008). Aktuell sind 13 verschiedene Toll-like-Rezeptoren beschrieben, hiervon lassen sich 10 im humanen und 12 im Genom von Mäusen finden (Patricio et al., 2019). TLR-2 bildet Heterodimere mit TLR-1 und TLR-3. TLR-4 bildet Komplexe mit CD14 und MD-2 (Celes et al., 2013).

Alle TLRs, mit der Ausnahme von TLR-3, vermitteln die Aktivierung von NF- κ B über MyD88. Die Aktivierung weiterer Signalwege in unterschiedlicher Ausprägung, je nach

Rezeptor und Ligand, ist möglich. Zum Beispiel kann via TLR-3, TLR-4 und TLR-9 auch ein interferon regulatory factor (IRF)-3 oder IRF-7 abhängiger Signalweg aktiviert werden, wodurch Typ-I Interferone gebildet werden. TLR-1, TLR-2, TLR-4 und TLR-6 verwenden das Adaptermolekül TIRAP um MyD88 zu aktivieren, TLR-4 zusätzlich noch TRAM und sowohl TLR-3 als auch TLR-4 gehen weiter über TRIF für die Signaltransduktion. (Agier et al., 2018; Beutler et al., 2005; Boyd et al., 2006a; Iwasaki und Medzhitov, 2004; Medzhitov et al., 1998; Tabeta et al., 2004; Takeda et al., 2003; Takeuchi und Akira, 2010).

Nach Aktivierung der TLR werden unter anderem Zytokine wie z.B. IL-1 β , IL-6 und TNF- α , Chemokine und Interferone zur Eindämmung und Elimination der Pathogene synthetisiert, aber auch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10. Häufig sind diese Stoffe in der Lage hierfür sowohl das angeborene wie auch das erworbene Immunsystem zu stimulieren (Patricio et al., 2019).

TLR-3, TLR-7, TLR-8 und TLR-9 binden Nucleinsäuren von Bakterien und Viren wie auch endogene Nucleinsäuren (Akira et al., 2006). Der TLR-9 ist in der Membran des ER/Endolysosomen-komplexes lokalisiert. Typische Liganden von TLR-9 sind Cytosin-Guanin-Dinukleotidpaaren (CpG)-reiche, unmethylierte bakterielle und virale DNA-Abschnitte die in Säugetier DNA deutlich seltener (ca. 20 %) vorkommen. Nach Ligandenbindung im Endoplasmatischen Retikulum (ER) transloziert der TLR-9 aus dem ER UNC93B1-vermittelt (Clathrin-vermittelte Endozytose) in die Membran des Endolysosoms. Ein Komplex aus MyD88, IRAK-4, TRAF6, TRAF3, IRAK-1, IKK- α , und IRF7 wird nun durch den aktivierten TLR-9 rekrutiert. NF- κ B wird aktiviert und wandert in den Nucleus aber auch IRF-7 wird phosphoryliert und wandert seinerseits in den Zellkern, wo es die Hochregulation von Typ-I IFN bewirkt (Takeuchi und Akira, 2010).

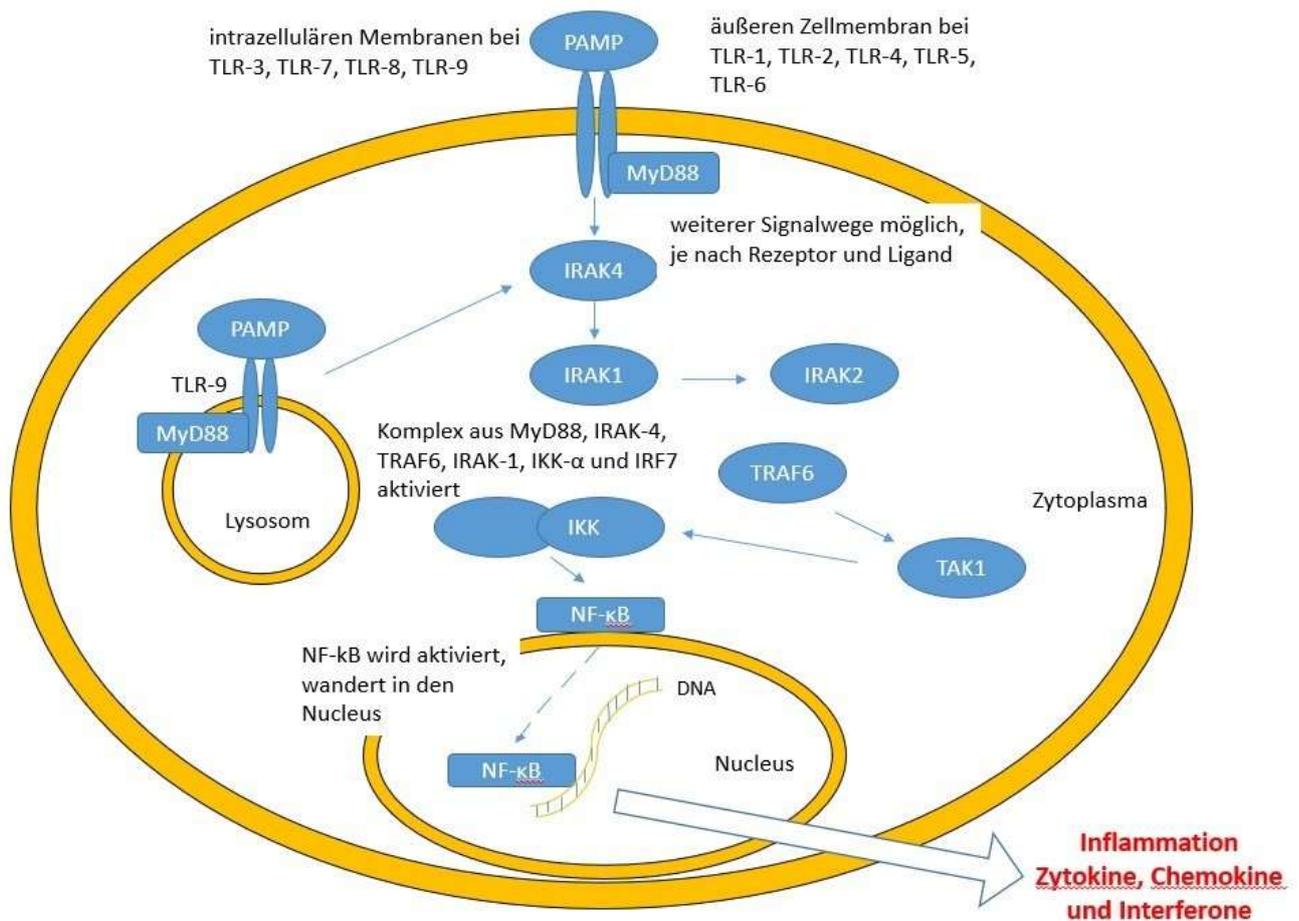


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des TLR Signalwegs über die Aktivierung intracellulärer Rezeptoren, hier am Beispiel des beschriebenen TLR-9 oder membranständiger TLR mit extracellulärer Bindungsdomäne. Signaltransduktion über MyD88 bis hin zum Transkriptionsfaktor NF-κB und der Transkription inflammatorischer Zytokine und Interferone.

Vorarbeiten von Baumgarten und Knüfermann konnten zeigen, dass die Zytokinlevel nach Stimulation mit Sepsis induzierenden Liganden bei TLR-2, TLR-4 und TLR-9 knockout Tieren signifikant niedriger sind, die Herzfunktion weniger beeinträchtigt und die Mortalität gegenüber rezeptorkompetenten Tieren gesunken ist. Dies konnte auch explizit für TLR-9 auf Kardiomyozyten nach Stimulation unter anderem mit bakterieller DNA gezeigt werden (Baumgarten et al., 2006b; Boehm et al., 2013; Knüfermann et al., 2002b; Knüfermann et al., 2004a; Knüfermann, et al., 2004b; Knüfermann et al., 2008).

1.5 Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Tumornekrosefaktor- α ist ein multifunktionales Zytokin, das an fast allen Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Es wird z.B. von aktivierten Makrophagen gebildet und ist ein starker Aktivator von Endothelzellen. TNF- α bewirkt eine Degranulation von Weibel-Palade-Körperchen, eine Gefäßdilatation, eine erhöhte Permeabilität des Endothels und die vermehrte Expression von Selektinen und Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). Selektin sowie ICAM-1 sind für die Anheftung und Diapedese der Leukozyten durch die Gefäßwand essentiell. Zusätzlich kann TNF- α die Gerinnung aktivieren.

In Leukozyten bewirkt TNF- α eine Konformationsänderung von Integrinen, beispielsweise von LFA-1 auf Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten, wodurch ICAM-1 auf den Endothelzellen als Ligand erkannt werden kann und eine feste Adhäsion als Voraussetzung für die Extravasation der Leukozyten ermöglicht wird.

TNF- α veranlasst Neutrophile zur Sezernierung ihrer Granula und Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Stickoxiden. TNF- α bewirkt außerdem seinerseits die Freisetzung von weiteren Zytokinen durch Zellen der angeborenen Immunabwehr.

TNF- α ist, wie auch IL-1 und IL-6, ein endogenes Pyrogen, welches Fieber auslösen kann und zur Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion mit Bildung von C-reaktiven Protein (CRP) oder dem Mannose-bindende Lektin (MBL), welche ihrerseits das Komplementsystem aktivieren können, beiträgt.

TNF- α hat zudem eine Brückenfunktion zum adaptiven Immunsystem, denn es bewirkt auch eine Wanderung der DC in peripheren Geweben zu den Lymphknoten und hier deren Differenzierung zu costimulierenden, antigenpräsentierenden Zellen (Janeway et al., 2002; Tracey, 2002).

1.6 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Interleukin-1 β ist Teil der IL-1-Familie, welche nach bisherigem Kenntnisstand 11 Mitglieder umfasst. IL-1 β wird zunächst als biologisch inaktive Vorstufe Pro-IL-1 β

exprimiert. Pro-IL-1 β wird durch die Caspase-1 zu dem eigentlichen proinflammatorischen Zytokin IL-1 β gespalten, nachdem Caspase-1 über einen Inflammasomenkomplex aktiviert wurde (Bent et al., 2018; Takeuchi und Akira, 2010).

IL-1 β unterstützt das Überleben der T-Zellen, induziert die Hochregulation von IL-2 Rezeptoren auf Lymphozyten, steigert die Antikörperproduktion von B-Zellen und ist an der Differenzierung von CD4 positiven T-Zellen zu TH1 und TH17-Zellen beteiligt (Bent et al., 2018; Lamkanfi et al., 2011). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es auch die Kontraktilität von Kardiomyozyten hemmt und so neben anderen Zytokinen an der Entstehung der septischen Kardiomyopathie beteiligt ist (Kumar et al., 1996). Umgekehrt konnte auch gezeigt werden, dass verschiedene PAMPs und Zytokine durch Bindung an TLRs zur kardialen Expression von IL-1 β führen (Baumgarten et al., 2002; Bent et al., 2018; Knüfermann et al., 2008; Müller-Werdan et al., 1998). IL-1 β ist ebenfalls ein potenter Aktivator der Akute-Phase-Reaktion und spielt bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Tumoren eine entscheidende Rolle.

1.7 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 wird wie TNF- α oder IL-1 β von aktivierten Makrophagen sezerniert und kann ebenfalls eine starke Akute-Phase-Reaktion auslösen. Des Weiteren wird es von B-Zellen und T-Zellen sezerniert und wurde zunächst als B-Zell stimulierender Faktor-2 (BSF-2) beschrieben. Es wurde daher initial dem erworbenen Immunsystem zugesprochen, da anfangs nur die B-Zell aktivierende Komponente entdeckt wurde, die eine Steigerung der Antikörperproduktion auslöst. Außerdem fördert es die Ausdifferenzierung von CD4 positiven T-Zellen unter anderem auch zu zytotoxischen T-Zellen (Janeway et al., 2002; Tanaka et al., 2018; Morad et al., 2020; Zobel et al., 2012). Heutzutage ist die Rolle von IL-6 im Rahmen der angeborenen Immunität gut untersucht. IL-6 wird neben Makrophagen auch von endothelialen und mesenchymalen Zellen bereits in einem frühen Stadium der Inflammationsreaktion freigesetzt. IL-6 Plasmaspiegel steigen während einer akuten Infektion stark an, weswegen IL-6 als Frühmarker generalisierter Entzündungsreaktionen genutzt werden kann. Der Anstieg von IL-6 auf einen inflammatorischen Reiz, ausgelöst durch Viren, bakterielle Bestandteile wie LPS oder Gewebetraumata, erfolgt bereits bis zu 24 Stunden vor dem Auftreten erster klinischer Symptome wie zum Beispiel Fieber. Die Plasmahalbwertszeit beträgt etwa 20 – 60 min.

Auch nichtinfektiöse Ursachen wie schwere Traumata, Verbrennungen oder Transfusionsreaktionen können zu einer IL-6 Erhöhung führen. IL-6 ist eines der frühesten inflammatorischen Zytokine und hat aufgrund des potentiellen Zeitgewinns in der Sepsisdiagnostik und Therapieeinleitung weiterhin seinen Stellenwert (Holtkamp und Rahmel; 2021).

IL-6 bewirkt rezeptorvermittelt unter anderem die Zunahme von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 oder den Komplement 5a-Rezeptor auf Endothelzellen. Der IL-6-Rezeptor konnte sowohl membranständig als auch als löslicher Rezeptor nachgewiesen werden, wodurch Zellen, welche keinen IL-6-Rezeptor besitzen, mit Hilfe des löslichen IL-6-Rezeptors in Anwesenheit von IL-6 trotzdem aktiviert werden können und so das Spektrum der IL-6 Zielzellen deutlich erweitert werden kann (Rose-John, 2018). An isolierten Papillarmuskelzellen konnte durch IL-6 eine Kontraktionsabnahme nachgewiesen werden, womit eine Rolle bei der Sepsis bedingten Einschränkung der Herzfunktion wahrscheinlich ist (Pathan et al., 2004).

1.8 Interleukin-10 (IL-10)

Bei Interleukin-10 handelt es sich um ein antiinflammatorisches Zytokin, das eine entscheidende Komponente in der Immunreaktion darstellt. Die Funktion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 besteht in der generellen Eindämmung der Immunreaktion. Auch bei lokalen Infektionen, welche durch verschiedene Botenstoffe und Zellen in den gesamten Körper getragen werden können, würde ohne eine hemmende Regulation immer eine generalisierte Sepsis mit Überreaktion des Immunsystems und entsprechend negativen Folgen drohen. Antiinflammatorische Zytokine dienen der Herunterregulation des Immunsystems und der Wiederherstellung einer immunologischen Homöostase.

In der späten Phase einer Sepsis beobachtet man oft eine gravierende Immunsuppression durch verschiedene antiinflammatorische Prozesse (compensatory antiinflammatory response syndrom, CARS), welche ebenfalls in einer fehlregulierten Immunreaktion begründet sind. Hieran ist unter anderem die Überexpression und erhöhte Spiegel von IL-10 während des späten septischen Geschehens entscheidend beteiligt. Dies begünstigt das Auftreten von Folgeinfektionen auf Grund einer Immunparalyse (Patricio et al., 2019).

Spezielle regulatorische B-Zellen und T-Zellen spielen eine wichtige Rolle für die Homöostase des Immunsystems. Als erste IL-10 sezernierende Zellen wurden TH2-Zellen entdeckt und IL-10 zunächst als cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) beschrieben. B-Zellen und T-Zellen handeln synergistisch und haben immunsuppressive Fähigkeiten, wobei IL-10 hierbei der wichtigste regulatorische Faktor ist, der von ihnen exprimiert und sezerniert wird. Weitere Beispiele dieser regulatorischen Zellen sind TH1, TH2, TH17, T-regulatorische Zellen und CD8 positive T-Zellen. Im Bereich des angeborenen Immunsystems können verschiedene Zellen wie Makrophagen, Mastzellen, natürliche Killerzellen, Granulozyten und dendritische Zellen IL-10 sezernieren. IL-10 hemmt die Synthese proinflammatorischer Zytokine und unterdrückt die Antigenpräsentation. Seine Plasmahalbwertszeit beträgt wenige Stunden. Ein Funktionsverlust vor allem der regulatorischen Zellen des erworbenen Immunsystems ist immer auch vergesellschaftet mit einer Exazerbation der Immunreaktion bzw. dem Auftreten einer chronischen Entzündungsreaktion, bei der eine adäquate Immunregulation fehlgeschlagen ist (Fiorentino et al., 1989; Patricio et al., 2019; Saraiva und O'Garra, 2010; Zobel et al., 2012).

1.9 High mobility group box-1 (HMGB-1)

High mobility group box-1, ebenfalls bekannt als Amphoterin oder HMG1, wurde zunächst nur als nukleärer Faktor und DNA-bindendes Protein wahrgenommen. Es geht eine lockere Bindung an Chromatin ein, wirkt ähnlich wie Histone DNA-stabilisierend und reguliert ähnlich einem Transkriptionsfaktor die Genexpression. Es gehört einer größeren Proteinfamilie an, welche wichtig bei der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen und neuronaler Zellen ist. HMGB-1 ist ca. 30 kDa groß und konnte in fast allen Zellen nachgewiesen werden.

HMGB-1 wird von aktivierten Makrophagen, DCs und NKs als Antwort auf Verletzungen oder Infektionen und andere inflammatorische Stimuli sezerniert. Es gehört zu den DAMPs und zeigt Gewebeverletzungen durch Freisetzung aus dem Nukleus von beschädigten Zellen an. Es initiiert die Immunreaktion, aktiviert endotheliale Zellen und Leukozyten, stimuliert die Angiogenese und die Aktivität hämatopoetischer Zellen. HMGB-1 wird als später Mediator beschrieben, da seine maximalen Serumkonzentrationen bei einer Infektion deutlich später als die von klassischen, frühen

Zytokinen wie TNF- α oder IL-1 β messbar sind. In einem standardisierten LPS-Mausmodell stiegen die Serumkonzentrationen hier 12 – 18 Stunden nach Injektion an, die von TNF- α bereits nach 2 Stunden und die von IL-1 4 – 6 Stunden nach Stimulus. Auch konnte gezeigt werden, dass die Gabe von neutralisierenden Antikörper gegen HMGB-1 oder anderer selektiver HMGB-1 Antagonisten zu geringeren Organschäden und geringerer Letalität der Sepsis in verschiedenen Modellen führten (Guo et al., 2021; Lotze und Tracey, 2005; Park et al., 2004; Takeuchi und Akira, 2010; Yang und Tracey, 2010).

Der erste identifizierte Rezeptor für HMGB-1 war der Receptor for advanced glycation end products (RAGE), der Gene für verschiedene Komplementfaktoren, Tumornekrose Faktoren, Lymphotoxin und Heat-shock Proteine (HSP) reguliert. RAGE fungiert sowohl als Transmembranrezeptor, wobei die Signaltransduktion dann über NF- κ B und ERK läuft, als auch als löslicher Rezeptor, wobei RAGE-Liganden wie HMGB-1 gebunden und so neutralisiert werden. Andere immunologische Rezeptoren für die HMGB-1 als Ligand fungiert und die bisher identifiziert werden konnten sind z.B. TLR-2, TLR-4 und TLR-9. Eine Bindung von HMGB-1 an diese Rezeptoren führt u.a. zur Expression proinflammatorischer Zytokine (Park et al., 2004; Tian et al., 2007; Yang und Tracey, 2010; Yang et al., 2010).

1.10 Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)

Intercellular Adhesion Molecule-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen Endothel und Immunzellen während der Diapedese. Nach Induktion durch inflammatorische Zytokine findet sich ICAM-1 auf aktiviertem Endothel und dient als Ligand für Integrine z.B. LFA-1 auf Leukozyten. Es geht mit LFA-1 eine feste Adhäsion ein, nachdem es zuvor durch Aktivierung z.B. durch Chemokine zu einer Konformitätsänderung gekommen ist (Janeway et al., 2002).

1.11 Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthetase (iNOS)

Verschiedene Isoformen der Stickstoffmonoxid Synthasen werden in verschiedenen Zellen teils konstitutiv exprimiert. Man unterscheidet zwischen konstitutiv exprimierten und NO-freisetzenden Synthasen, wie z.B. der mitochondrialen (mtNOS), der neuronalen (nNOS/ NOS-1) oder der endothelialen (eNOS/NOS-3) NOS, und auf der anderen Seite

den induzierbaren NO-Synthasen (iNOS). Letztere werden durch verschiedene inflammatorische Stimuli hochreguliert und können große Mengen an NO freisetzen (Alderton et al., 2001; Kawaguchi und Okada; 2021). iNOS wird von verschiedenen Zellen des Körpers exprimiert (z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, verschiedene parenchymatöse Zellen aber auch Endokard- und Myokardzellen) sowie von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten.

Stickstoffmonoxid (NO) wird im Rahmen einer generalisierten Entzündungsreaktion, wie einer Sepsis, nach Stimulation des angeborenen Immunsystems durch ein vermehrtes Exprimieren der iNOS produziert. Auch aktiviertes, koronares Endothel und Kardiomyozyten können die iNOS im Rahmen eines Entzündungsgeschehens hochregulieren, wodurch das Herzgewebe selbst auch eine septische Kardiomyopathie induzieren und unterhalten kann. In Kardiomyozyten kann NO die Signaltransduktion, das Calcium-cycling der Muskelzellen, und die mitochondriale Atmungskette beeinflussen. Außerdem werden endotheliale und pulmonale Dysfunktion in septischen Patienten teilweise einer erhöhten Produktion von NO zugeschrieben (Kawaguchi und Okada, 2021; Khan et al., 2003; Kirkebøen und Strand, 1999).

Die iNOS kann durch Stimulation mit LPS oder mittels verschiedener Zytokine, wie TNF- α , IL-1 oder IFN- γ , induziert werden. Nach Aktivierung der Zellen führt die weitere Signaltransduktion über den Transkriptionsfaktors NF- κ B zu einer vermehrten Expression der iNOS (Feihl et al., 2001). Unter Verwendung von L-Arginin katalysiert die iNOS die Reaktion zu L-Citrullin und NO, welches dann freigesetzt wird. Physiologisch ist NO an der Regulation des Blutdrucks und des Blutflusses beteiligt. Die pathologische Überproduktion von NO im Rahmen der Sepsis wird unter anderem für die Hypotension, die septische Kardiomyopathie oder das schlechte vaskuläre Reaktionsvermögen im septischen Schock mitverantwortlich gemacht (Kirkebøen und Strand, 1999).

Abhängig von der subzellulären Lokalisation erzielen NO-Synthasen durch die Sezernierung von NO teils konträre Effekte. So führt die NOS-1, welche im sarkoplasmatischen Retikulum von Herzmuskelzellen lokalisiert ist, dort nach β -adrenergen Stimulation zu einer Verbesserung der Kontraktilität durch eine Erhöhung der Kalziumfreisetzung und der Wiederaufnahme aus dem SR, wodurch die cardiac force-

frequency response (FFR) potenziert wird. Die NOS-3 hingegen, welche im Sarkolemm lokalisiert ist, inhibiert β -adrenerge, inotrope Antworten über eine Beeinflussung von L-Typ-Kalziumkanälen (Barouch et al., 2002; Khan et al., 2003).

1.12 Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)

Um die komplexen Zell-Zell-Interaktionen in der Sepsis abbilden zu können, muss die Forschung häufig auf *in vivo*-Modelle zurückgreifen, da einfache *in vitro* Ansätze diese Abhängigkeiten nur unzureichend und unvollständig darstellen können. Auch Modelle mit Injektion isolierter PAMPS, wie beispielsweise LPS, können oft die multiplen Aktivatoren des Immunsystems nur einzeln und singulär abbilden. Für einen generellen Überblick näher an der Realität helfen Modelle, die die verschiedenen bakteriellen Erreger mit all ihren Bestandteilen verwenden, wie das CLP (Colon Ligature and Puncture) Modell oder das CASP (Colon ascendens stent peritonitis) Modell. Beide Modelle induzieren eine Peritonitis und nachfolgend eine polymikrobielle Sepsis.

Die Besonderheit der Peritonitis mit Induktion einer polymikrobiellen Sepsis ist das Verursachen einer vielseitigen Wirt-Immunantwort durch die gleichzeitige Stimulation verschiedener Signaltransduktionswege des angeborenen Immunsystems (Luzzaro et al., 2011).

Die CASP-Operation wurde von Niko Zantl 1998 erstmals publiziert. Es handelt sich dabei um ein murines Tiermodell für die postoperative, abdominale Sepsis in dem die immunologischen Prozesse während einer Sepsis charakterisiert werden können. Entsprechend einer Anastomosen Insuffizienz, wie sie bei abdominal-chirurgischen Eingriffen auftreten kann, tritt auch nach einer CASP Operation Darminhalt kontinuierlich nach intraperitoneal aus. Die Menge des austretenden Stuhles lässt sich hierbei über die Größe des gewählten Stents grob steuern und damit in Grenzen auch der Verlauf und die Schwere der Sepsis. Es kommt postoperativ analog einer viszeralchirurgischen Komplikation über den ausgetretenen Stuhl zu einer polymikrobiellen Sepsis mit systemischer Immunantwort (Zantl et al., 1998; Traeger et al., 2010). Maier et al. (2004) fanden nach CASP-Operation in einem Zeitraum von 6 h bis über 24 h hinaus eine stetig steigende Bakterienzahl in der Peritoneallavage, in der Leber, in der Lunge und im Serum. Im Gegensatz dazu kam es beispielsweise in dem Modell des Colon Ligature and Puncture (CLP) nur zu einer kurzzeitigen und geringer ausgeprägten Freisetzung von

Darminhalt, da die Perforation häufig von adhäsiven Darmschlingen verlegt und abgedichtet wurde, weshalb es daher eher als ein Abszess Modell eingestuft wird (Maier et al., 2004; Wichterman et al., 1980). Aufgrund dieser vorliegenden Beobachtungen scheint das CASP-Modell dem klinischen Verlauf einer Sepsis, gefolgt von einer frühen und anhaltenden systemischen Inflammation mit all ihren Komponenten, am ehesten zu entsprechen.

1.13 Ziele und klinische Relevanz

Eine frühe Diagnose der Sepsis mit Abgrenzung einer bakteriellen zu einer viralen Infektion und zu nicht-infektiösen Inflammationssyndromen, z.B. nach Herz-Lungen-Maschine, Verbrennungen, großen Operationen und Traumata, ist von großer Wichtigkeit für ein frühes Einleiten zielführender, therapeutischer Schritte um eine Sepsis oder deren fulminanten Verlauf verhindern zu können. Die große Hoffnung ist daher zukünftig Biomarker zu entdecken, die unter anderem zeigen, ob ein Patient eine Infektion oder nicht-infektiöse Inflammation hat, wie die Prognose des Patienten ist, ob eine eingeleitete antiinfektiöse Therapie wirksam ist und wann sie beendet werden kann (Riek et al., 2019).

Eine deutliche Verbesserung in der Sepsistherapie wäre die Möglichkeit, Patienten anhand verschiedener Parameter, wie z.B. den Zytokinen und deren Serumspiegeln, stratifizieren zu können und so den Verlauf einer Sepsis besser vorhersagen zu können.

Ein weiteres wichtiges Ziel der Sepsisforschung ist mit Hilfe neuer Therapieansätze die hohe Mortalität und Morbidität der Sepsis senken zu können. Hierbei wäre ein vorstellbarer Therapieansatz das Blockieren verschiedener Signaltransduktionswege, von Zytokinen oder deren Rezeptoren, um eine überschießende Immunreaktion zu verhindern.

Teilerfolge auf diesem Gebiet konnten schon erzielt werden. So können bei der Verlaufsbeurteilung verschiedene Biomarker zu Rate gezogen werden, die unter Berücksichtigung des klinischen Zustandes die Therapieentscheidungen unterstützen. Sie helfen beispielsweise die Entscheidung über das Beenden einer Antibiotikatherapie zu objektivieren (Holtkamp und Rahmel; 2021).

Ziel muss daher sein eine Sepsis zu verhindern, daneben aber auch eine beginnende Sepsis schnellstmöglich zu erkennen und zu therapieren, da ein fulminanter Verlauf keine Seltenheit darstellt und neben hohen Kosten rasch zum Tode führen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Faktoren charakterisiert werden, die die Entstehung einer septischen Kardiomyopathie begünstigen. Die Untersuchungen werden an einem murinen Modell der polymikrobiellen Sepsis durchgeführt. Nach klinischer und mikrobiologischer Charakterisierung des Sepsis Modells soll der zeitlich-dynamische Verlauf der myokardialen Inflammation anhand der Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-10 im Herzgewebe untersucht werden. Anschließend soll die Regulation des endogenen DAMP HMGB-1 sowie die Expression von Faktoren, die im Rahmen der Verstärkung der Immunantwort durch Adhäsion von Immunzellen am Endothel (ICAM-1) oder durch direkte Veränderungen in den Kardiomyozyten (iNOS) Einfluss auf die kardiale Funktion nehmen, charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 In-vivo Versuchsteil

2.1.1 Genehmigung der Tierversuche

Alle Tierversuche fanden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 unter Beratung durch den damaligen Tierschutzbeauftragten des Universitätsklinikums Bonn, Herrn Dr. med. vet. Eichelkraut, nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen statt (Aktenzeichen: 8.87-51.0420.09.392).

2.1.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Experimente wurden 12 bis 15 Wochen alte, männliche C57BL/6N Mäuse des Versuchstierzüchters „Charles River“ und „Janvier“ mit einem Gewicht von 25 bis 30 g verwendet. Die Tiere wurden im versuchstierkundlichen Haupthaus (HET 1, Haus für experimentelle Therapien) des Universitätsklinikums Bonn (Venusberg-Campus 1, 53127

Bonn), eingestallt. Gehalten wurden die Tiere zu maximal 6 Individuen in Raumluft belüfteten Filtertop-Käfigen, artgerecht mit Einstreu und Wasser ad libitum. Ernährt wurden die Tiere ebenfalls ad libitum mit speziellen Pressfutter Pellets. Die Käfige wurden durch das dortige Fachpersonal regelmäßig kontrolliert, gereinigt und autoklaviert. Ebenso wurde das Einstreu, das Wasser und die Futterpellets vor der Verwendung autoklaviert. Die Beleuchtung erfolgte in den Tierhaltungsräumen standardisiert mit Hell/Dunkelphasen von 7:00 – 19:00 Uhr (Hell) und 19:00 – 07:00 Uhr (Dunkel) in Annäherung an den Tag-Nacht-Rhythmus bei 200 Lux auf 1 Meter Höhe. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug etwa 50%, die Luftwechselrate betrug 15-mal pro Stunde und die Raumtemperatur wurde bei ca. 22°C (+/- 2°C) konstant gehalten.

2.1.3 TLR-9 Knockout Tiere

Die homozygot TLR-9 defizienten Tiere waren unserer Arbeitsgruppe ursprünglich von Prof. Shisuo Akira, Osaka Universität, Osaka, Japan, freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Die Tiere sind über 15 Generationen auf einen C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt.

Die Knockout-Linien unserer Arbeitsgruppe wurden im HET in der Barriere „Grün Intern“ vom angestellten Fachpersonal des HET versorgt und von speziell eingeteilten und geschulten medizinisch-technischen Assistenten unserer Laborgruppe gezüchtet. Hierfür wurden reine homozygote TLR-9 defiziente Geschwistertiere miteinander inzucht-verpaart um so erneut homozygote KO Tiere als Nachwuchs zu erhalten. Zur Überprüfung des homozygoten Knockout-Genotyps wurde den Tieren ein kleines Stück Schwanzspitze oder Ohrmuschel entfernt und mittels PCR und anschließender Gelelektrophorese das Fehlen des Exons 1 des TLR-9-Gens kontrolliert. Für das Screening wurden die folgenden Primer von Invitrogen verwendet:

Primer A: TLR-9 A forward primer 5`-GAA GGT TCT GGG CTC AAT GGT CAT GTG-3`

Primer B: TLR-9 B reverse primer 5`-GCA ATG GAA AGG ACT GTC CAC TTT GTG-3`

Primer C: TLR-9 KO C forward primer 5`-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3`

Die veränderten Gensequenzen der Knockout-Tiere wurden durch die Primer „B“ und „C“ detektiert, die WT-Allele durch die Kombination der Primer „A“ und „B“. Nach Durchlaufen der PCR erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese und durch Anfärben mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) unter UV-Licht (Wellenlänge 260 nm) wurden die Genprodukte sichtbar gemacht. Die Banden für die TLR-9 KO-Tiere liegen bei 1200 bp, die WT-Tiere zeigen hier keine Bande (siehe Abb. 10 S. 38).

2.1.4 Genotypisierung der KO-Tiere

Mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese können zuvor mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente von 0,1-25 kb Länge voneinander getrennt und identifiziert werden. Dieses Verfahren verwenden wir, um die mit spezifischen Primern mittels PCR angefertigten Genkopien aus genomischer DNA von Schwanzspitze bzw. Ohrmuschel der TLR-9 KO-Mäuse zu verifizieren.

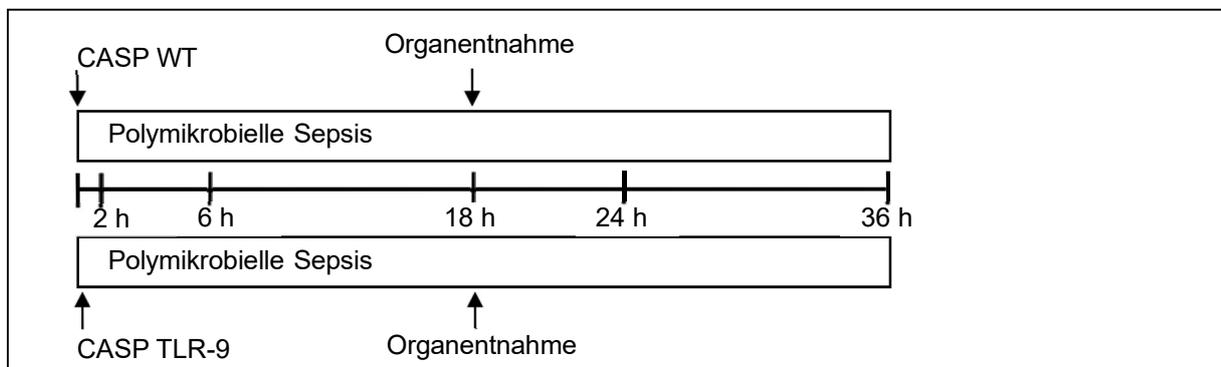
2.1.5 Versuchsaufbau der Tierversuche

Ziel dieser Arbeit war, eine bessere Vorstellung des zeitlich-dynamischen Verlaufs der Zytokinexpression im Herzmuskel während einer polymikrobiellen Sepsis zu erhalten. Im Detail sollte die Rolle des TLR-9 in der Entstehung der septischen Kardiomyopathie untersucht werden. Außerdem war mein Ziel Erkenntnisse darüber zu erhalten, welche Rezeptoren einen Einfluss auf die Signalkaskade während einer Sepsis haben könnten. In der vorliegenden Arbeit versuchte ich die Rolle des TLR-9-Rezeptors anhand von speziell gezüchteten homozygoten KO-Tieren genauer zu untersuchen. Bei dem Versuchsaufbau wurde mit Hilfe der CASP-Operation eine polymikrobielle Sepsis hervorgerufen und die operierten Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit scheinoperierten Sham-Tieren sowie einer gänzlich unbehandelten Kontrollgruppe verglichen.

Bei den operierten Tieren wurden zu den definierten Zeitpunkten 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach erfolgter OP in tiefer Narkose eine Peritoneallavage durchgeführt und final Blut und das Herz entnommen. Die Lavage wurde verdünnt und auf MacConkey Agar ausplattiert und für 48 h in einen Brutschrank bei 37 °C bebrütet. Die explantierten Herzen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zwecks späterer molekularbiologischer Untersuchungen bei -80 °C gelagert.

Tab. 1: notwendige zu operierende Tiere

n = 90 gesamt	2 h	6 h	18 h	24 h	36 h
Sham	6	6	6	6	6
WT CASP	6	6	6	6	6
TLR-9 CASP	6	6	6	6	6

**Abb. 2:** Darstellung des Zeitverlaufes von WT und TLR-9 KO-Tieren nach OP bis zur Organentnahme am Beispiel des 18 h Zeitpunktes zur Organentnahme und Peritoneallavage post operationem. Untersuchte Zeitpunkte sind 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h.

Als Kontrollgruppe wurden einmalig sechs nicht operierte Tiere verwendet, denen ohne vorherige Operation das Herz und Blut entnommen wurde, nachdem sie durch zervikale Dislokation getötet wurden. Die Organentnahme erfolgte nach dem gleichen Schema wie bei den operierten Tieren, eine Peritoneallavage erfolgte nicht.

Tab. 2: nicht operierte Kontrolltiere

	n
WT Kontrolle	6

2.1.6 Das murine CASP Modell und die Sham Operation

In dieser Arbeit wurde das Modell der Colon ascendens stent Peritonitis (CASP) zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis verwendet. Bei diesem Modell wird in das Colon ascendens ein kleiner Stent (Spitze einer 18 G Venenverweilkanüle) implantiert und so eine ständige Verbindung zwischen Colon und Bauchhöhle geschaffen. Durch diesen Stent wird ein kontinuierlicher Übertritt von Stuhl in die Bauchhöhle erreicht und so eine peritoneale Inflammation konstant aufrechterhalten.

Zur Kontrolle dienen neben nicht operierten Kontrolltieren scheinoperierte „Sham-Tiere“. Diese Tiere erhalten sowohl eine Narkose als auch die Eröffnung der Bauchhöhle, aber keine Stent-Implantation. Der Vergleich mit der Sham-Kontrolle soll ausschließlich operationsbedingte Einflussfaktoren auf die Zytokinlevel identifizieren.

2.1.7 OP Vorbereitung

Vor Beginn der Operation wurde der OP-Platz desinfiziert und vorbereitet. Hierfür wurden die sterilisierten Instrumente (Pinzetten, Schere, Materialschere, Nadelhalter) der Aufbewahrungsbox entnommen und auf dem OP-Tisch bereitgelegt. Der OP-Tisch wurde gereinigt, desinfiziert und auf 37 Grad Celsius vorgeheizt. Wattestäbchen, Enthaarungscreme, Zellstofftücher, Pflaster und ein schwarzer Permanentmarker wurden ebenfalls bereitgelegt. Der ausführende Gasschlauch der Anästhesiebox wurde nun auf dem OP Tisch mit einem breiten Pflasterstreifen festgeklebt. Buprenorphin-Lösung wurde in einer Verdünnung von 3µg/ml hergestellt und in einer 2 ml Spritze mit einer 26 G s.c. Nadel vorbereitet. Die 18 G Venenverweilkanüle wurde steril bereitgelegt. Zusätzlich wurde ein „Aufwach-Käfig“ mit einer Rotlicht-Wärmelampe vorbereitet, in den nach der Operation immer nur das frisch operierte Tier gesetzt wurde.

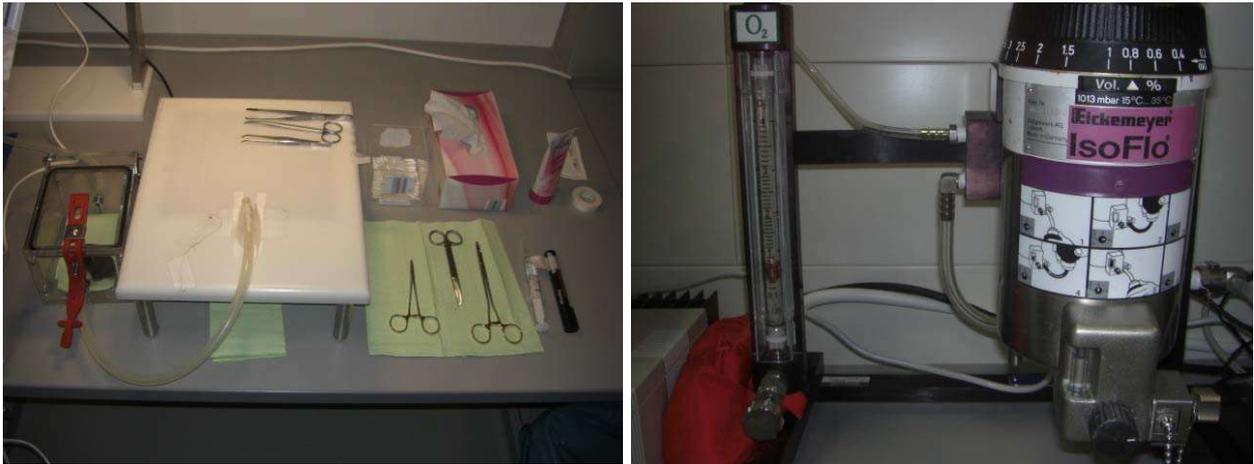


Abb. 3 links: Vorbereiteter OP-Platz mit Anästhesiebox, OP-Tisch und Instrumenten;
Abb. 4 rechts: Vapor und Volumeter

2.1.8 Anästhesie und Analgesie

Vor Beginn der OP wurde den Mäusen zur Analgesie 1 ml Buprenorphin-Lösung (=3 µg Buprenorphin; entspricht ca. 0,1 mg/kg) mit Hilfe einer 26 G Kanüle s.c. im Nackenbereich verabreicht.

Die Narkose war bei der Sham-Operation und der CASP-Operation identisch. Das zu operierende Tier wurde dem Käfig entnommen und in eine spezielle Anästhesiebox aus Plexiglas gelegt. Die Box ist speziell für die Einleitung einer Inhalationsanästhesie bei Mäusen konzipiert, hat ein Volumen von etwa 300 ml, eine Zuleitung über die das Anästhesiegas eingeleitet wird und eine weitere Leitung, aus der das Atemluft-Gas-Gemisch ausgeleitet wird. Als Inhalationsanästhetikum wurde Isofluran verwendet und mit ca 4 Vol.-% in Sauerstoff bei 1,5 l/min Flow über einen Standardvapor zur Narkoseinduktion verabreicht. Zur Beurteilung einer ausreichenden Narkosetiefe wurde die Atmung beobachtet und darauf gewartet, dass die Atemfrequenz deutlich langsamer, die Atemzüge aber tiefer wurden. Vor Beginn der OP wurde die narkotisierte Maus gewogen und anschließend so auf dem beheizten Kleintier OP-Tisch gelagert, dass die Maus spontan atmend mit der Schnauze unmittelbar vor dem Anästhesiegasschlauch lag. Für die Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde die Isoflurankonzentration auf ca. 1,5 Vol.-% abgesenkt. Anschließend wurden die Extremitäten und der Schwanz mit einigen kurzen Pflasterstreifen auf dem OP Tisch fixiert, so dass die Maus in Rückenlage mit der

Schnauze zum Operateur hin zum Liegen kam. Eine Temperatursonde zur Überwachung der Körpertemperatur von 36 – 37 °C wurde rektal eingeführt. Der Schlauch für das Anästhesiegas wurde fixiert und die Schnauze selbst unmittelbar vor dem anästhesiegasführendem Schlauchende mit einem Faden um die Schneidezähne gehalten. Vor Beginn der Operation wurde ein kurzer Schmerzreiz (Zwischenzehenreflex) gesetzt um durch Ausbleiben einer Abwehrreaktion die ausreichende Narkosetiefe sicherzustellen.

2.1.9 CASP Operation



Abb. 5: Für die CASP-/Sham-OP fixierte Maus; die Temperatursonde muss noch eingelegt, das Fell im Operationsbereich entfernt und die Haut desinfiziert werden.

Nach Fellentfernung mittels Enthaarungscreme und Wattestäbchen sowie anschließender Hautdesinfektion mit Betaisodona-Lösung erfolgte nun eine mediane Längslaparotomie von ca. 1,5 cm. Hierfür wurde zunächst die Haut mit einer Pinzette angehoben und mit einer Schere eröffnet. Anschließend wurde auf ähnliche Weise mit der zuvor stumpf abpräparierten Bauchmuskulatur im Bereich der Linea alba verfahren ohne darunterliegende Strukturen zu verletzen. Die Bauchdecke wurde nun mit Hilfe einer Pinzette angehoben und nach Identifikation des Ileozökalpols wurden das Zökum und das Colon ascendens vorsichtig aus der Bauchhöhle luxiert. Die Manipulation der Darmanteile sollte sich insgesamt auf ein Minimum beschränken. Circa 1 cm aboral der Mündung des

Ileums in das Coecum wurde das Colon ascendens antimesenterial mit einem Ethilon 7/0 Faden mit Nadel tangential durchstochen. Der Faden wurde nun doppelt geknotet, aber noch nicht abgeschnitten. Im Bereich des Fadens wurde das Colon ascendens mit einer 18 G Venenverweilkanüle punktiert. Nach Punktion des Colons wurde der Metallmandrain aus der Venenverweilkanüle entfernt. Der verbliebene Plastikanteil der Venenverweilkanüle wurde nun etwa 3 – 4 mm in den Dickdarm vorgeschoben und auf eine Gesamtlänge von 7 – 8 mm gekürzt (Abb. 8, S. 33). Auf diese Weise wurde ein ca. 7 – 8 mm langer 18 G Stent in das Colon eingelegt, welcher anschließend mit dem in den Darm vorgelegten 7/0 Faden durchstochen und fixiert wurde. Durch vorsichtigen Druck auf das Zökum wurde der Stent mit Dickdarmsstuhl gefüllt, ehe sämtliche ausgeschwenkten Darmanteile wieder in die Bauchhöhle reponiert wurden. Dann erfolgt der mehrschichtige Bauchwandverschluss mit Ethilon 5/0 Faden mittels Einzelknopfnähten (Abb. 9, S. 33).



Abb. 6 und 7: CASP OP-Schritte: links mediane Längslaparotomie, rechts Stentplatzierung ca. 1,5 cm aboral der Mündung des Ileums



Abb. 8 und 9: CASP OP-Schritte: links dargestellt der eingebrachte und fixierte Colonestent, rechts mehrschichtiger Bauchdeckenverschluss mit Einzelknopfnähten

Nach Wundverschluss wurde das Isofluran ausgestellt. Die Narkose wurde beendet und die Maus in den vorgewärmten Aufwach-Käfig unter die eingeschaltete Rotlicht-Wärmelampe gelegt. Nach ca. 30 Minuten konnte das frisch operierte, wache Tier in den Haltungskäfig zurückgesetzt werden.

2.1.10 Sham Operation

Bei den Sham-operierten Tieren wurde der Bauchraum analog zu den CASP operierten Tieren eröffnet und der Darm in gleicher Weise mobilisiert. Es erfolgte ebenfalls das Einbringen eines 7/0 Ethilon-Fadens antimesenterial im Colon ascendens ca. 1,5 cm aboral des Coecum, hier allerdings ohne einen Stent für eine kontinuierlich unterhaltene Peritonitis einzulegen. Auch die Narkose sowie die Analgesie erfolgten äquivalent zu den CASP-operierten Tieren.

2.1.11 Krankheitsscoring

Zunächst erfolgt die klinische Bewertung der Krankheitsschwere der septischen Tiere. Für eine Objektivierung des Krankheitszustandes der operierten Mäuse entwickelten wir einen klinischen Krankheits-Score in Anlehnung an Morton und Griffiths (1985). Der Punktwert geht von „1“ = nicht erkennbar krank bis „6“ = unter Sepsis gestorben. Beurteilungskriterien waren a) die Körperhaltung: haben die Mäuse ein aufgezoogenes Abdomen oder einen krummen Rücken; b) die Körperpflege: ist das Fell struppig oder

stumpf, sind die Augen trübe oder verklebt; c) Bewegungen und Verhalten: wie und wieviel bewegt sich das Tier, interagiert es mit Artgenossen. Je mehr das untersuchte Tier von seinem normalen Verhalten abweicht, desto höher liegt der Punktwert des Krankheitsgrades. Die Skala reichte von 1 bis maximal 6 Punkte.

Tab. 3: Krankheitsscoring der operierten Mäuse

Krankheits-grad	1	2	3	4	5	6
Definition	Keine erkennbaren Krankheitszeichen	Geringe Krankheitszeichen	Mäßige Krankheitszeichen	Tier ist deutlich erkrankt	Tier ist sehr stark erkrankt	Tier ist an der Sepsis verstorben

Tiere, die vor Erreichen des definierten Zeitpunktes an der Sepsis verstorbenen sind (Krankheitsgrad 6) wurden nicht weiter molekularbiologisch untersucht.

2.1.12 Peritoneallavage und Organentnahme

Im Anschluss an die Erhebung des Krankheits-Scores wurde der Operationsplatz für die Peritoneallavage und Organentnahme vorbereitet. Für die Lavage wurde sterile PBS Lösung sowie für die Konservierung der entnommenen Herzen flüssiger Stickstoff bereitgestellt, zusätzlich beschriftete 10 ml Falcontubes, beschriftete 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße, 2 und 5 ml Spritzen, rosa und graue Venenverweilkanülen ohne Stahlmandrain (20 G und 16 G), rosa 20 G Punktionskanüle, sterile Pipetten 100 µl, 1000 µl und 10 ml sowie zwei zuvor vorbereitete McConkey Agarplatten pro Versuchstier bereitgelegt.

Zunächst wurden für das spätere Beimpfen der Agarplatten die Falcontubes mit je 9 ml PBS zur Verdünnung der Lavageflüssigkeit vorbereitet und der Abzug für ein steriles Beimpfen der Agarplatten desinfiziert und vorbereitet. Die 2 ml Spritze mit der rosa Punktionskanüle wurde mit Heparin benetzt, damit das Mäuseblut nach der Entnahme nicht sofort in der Kanüle gerinnt.

Nach Ablauf der vordefinierten Zeitpunkte wurden die entsprechenden Tiere wie in Kapitel 2.1.8 beschrieben narkotisiert und auf dem OP Tisch gelagert. Die Laparotomie naht der vorausgegangenen CASP-OP wurde wiedereröffnet. Nach Entfernung der Pflasterstreifen von Hinterläufen und Schwanz wurden 5 ml warme PBS-Lösung in einer Spritze mit aufgesteckter 20 G Venenverweilkanüle in das eröffnete Abdomen gespült. Der Situs wurde vorsichtig geschüttelt und anschließend so viel Peritoneallavage wie möglich, meist ca. 3 bis 4 ml, aspiriert, in ein steriles 10 ml Falcontube gefüllt und im Kühlschrank bei 4 °C kurzzeitig zwischengelagert. Die mikrobiologische Weiterbearbeitung erfolgte etwa 20 Minuten später direkt am Ende der Präparation. Anschließend wurde die Laparotomie naht bis zum Sternum und zur Symphyse erweitert und der Sitz des Stents kontrolliert.

Nach Eröffnung des Thorax wurde mit Hilfe einer der heparinisierten Punktionskanüle und einer heparinisierten 2 ml Spritze via apikaler Punktion des linken Ventrikel Vollblut zur Weiterverarbeitung entnommen. Das entnommene Blut wurde in ein vorbereitetes 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und zur Gewinnung des Blutplasmas zentrifugiert (10 min, 4000 rpm, 4 °C.) Das gewonnene Plasma wurde in einem Eppendorf Reaktionsgefäß in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Das Herz wurde chirurgisch aus dem Thorax entnommen und in gekühlte, kaliumhaltige Kardioplegielösung gelegt. Nach diesem letzten Schritt wurde das Tier entsprechend den Hygienerichtlinien des HET entsorgt. Nach Sistieren der physiologischen Pumpbewegungen wurde das Herz mit einer Schere entlang der Längsachse in zwei etwa gleichgroße Hälften geteilt, in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Nach Ende der OP wurde die nach dem entsprechenden OP-Zeitpunkt festgelegte Verdünnung der Peritoneallavage angefertigt und umgehend der bereitgestellte Agar beimpft (siehe Kapitel 2.2.1).

2.2 ex-vivo Versuchsteil

2.2.1 Herstellung des MacConkey Agar

Die MacConkey-Agarplatten wurden im Labor der Anästhesie selbst hergestellt. Hierfür wurden 25 g MacConkey-Agar unter Rühren in 500 ml aqua bidest gelöst und anschließend autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde der noch flüssige Agar mit einem Magnetrührer erneut gut durchmischt und unter der Sterilbank in Petrischalen (Durchmesser 10 cm) gegossen. Nach dem Aushärten des Agars wurden die Petrischalen unter sterilen Bedingungen bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.2 Bakterienlast der Peritoneallavage

Neben dem Krankheitsgrad wurden für die Erfolgskontrolle der Sepsisinduktion aus der gewonnenen Peritoneallavage Bakterienkulturen auf MacConkey Agar, einen Selektionsagar für gramnegative Bakterien, angelegt. Hierfür wurde je nach Dauer der induzierten septischen Periode aufgrund der erwarteten unterschiedlichen Bakterienlast verschiedene Verdünnungen der Peritoneallavage mit autoklaviertem PBS hergestellt, um eine bessere Quantifizierung der gewachsenen Bakterienkulturen zu ermöglichen. Es wurden zur Fehlerkorrektur pro Versuchstier zwei Agarplatten mit verschiedenen Verdünnungen benutzt. Konnten beide Platten ausgezählt werden, so wurde der Mittelwert der gezählten Kolonien gebildet. Für jedes Tier wurde die Anzahl der colony-forming-units (CFU) auf einen Milliliter Lavageflüssigkeit berechnet. Dies wurde bei Sham-Tieren, CASP-WT und CASP-TLR-9 KO-Tieren analog durchgeführt.

Tab. 4: Die Peritoneallavage von 2 h Tieren wurde unverdünnt und 1:10 verdünnt ausplattiert, die von 6 h Tieren 1:10 und 1:100 verdünnt ausplattiert, die von 18 h- und 24 h Tieren wurde als 1:1.000 und 1:10.000 verdünnt ausplattiert und die von 36 h Tieren als 1:10.000 und 1:100.000 verdünnt ausplattiert.

	Verdünnung 1	Verdünnung 2
2 h Tiere	unverdünnt	1:10
6 h Tiere	1:10	1:100
18 h Tiere	1:1.000	1:10.000
24 h Tiere	1:1.000	1:10.000
36 h Tiere	1:10.000	1:100.000

Unter dem sterilen Abzug wurden die McConkey Agarplatten mit 50 µl der jeweiligen Verdünnung beimpft und im Anschluss daran für 48 h bei 37 ° C im Brutschrank bebrütet. Nach Ablauf der 48 h wurden die CFU der gewachsenen gramnegativen, aeroben Bakterien ausgezählt.

2.2.3 PCR Kontrolle der KO-Mäuse

Die Genotypisierung der TLR-9 defizienten Mäuse erfolgte aus genomischer DNA, die aus den Schwanzspitzen oder Ohrmuschelbiopsien der Mäuse isoliert wurde. Hierfür wurde zunächst die genomische DNA aus dem Gewebe extrahiert.

Für die Extraktion der DNA wurden die Ohr- oder Schwanzspitzenbiopsien in 500 µl Tail Lysis Puffer (100 mM Tris HCL, 0,5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl) mit 10 µl Proteinase K gegeben und über Nacht bei 55°C, 600 rpm in einem Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurden nicht gelöste Gewebefragmente abzentrifugiert (12.000 rpm, 10 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem Überstand wurden 500 µl Isopropanol zur DNA-Fällung gegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (12.000 rpm, 4°C, 35 min) wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, nochmals kurz zentrifugiert, der Überstand verworfen, das DNA-Pellet getrocknet und final in 20 µl aqua dest. resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei 4°C gelagert.

Die Genotypisierung der TLR-9 knockout Mäuse wurde mittels qualitativer PCR nach dem vorgegebenen Protokoll aus dem Labor von Prof. Akira durchgeführt. Für das Screening wurden die folgenden Primer von Invitrogen mit den aufgelisteten Sequenzen verwendet:

Primer A: TLR-9 A forward primer 5`-GAA GGT TCT GGG CTC AAT GGT CAT GTG-3`

Primer B: TLR-9 B reverse primer 5`-GCA ATG GAA AGG ACT GTC CAC TTT GTG-3`

Primer C: TLR-9 KO C forward primer 5`-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3`

Die veränderten Gensequenzen der Knockout-Tiere wurden durch die Primer „B“ und „C“ detektiert, die WT-Allele durch die Kombination der Primer „A“ und „B“. Pro Genotypisierungsansatz wurden 14,25 µl aqua dest., 2,5 µl 10x Puffer, 1 µl MgCl [50 mM], 2,5µl dNTP [2,5 mM], je 1,25 µ forward Primer [A oder C] und 1,25 µl reverse Primer [B] angesetzt.

Nach Durchlaufen der PCR erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese und durch Anfärben mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) (Wellenlänge 260 nm) wurden die Genprodukte unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Banden für die TLR-9 KO-Tiere liegen bei 1200 bp. Die WT-Tiere zeigten bei der Verwendung von Primer B und C keine Bande.

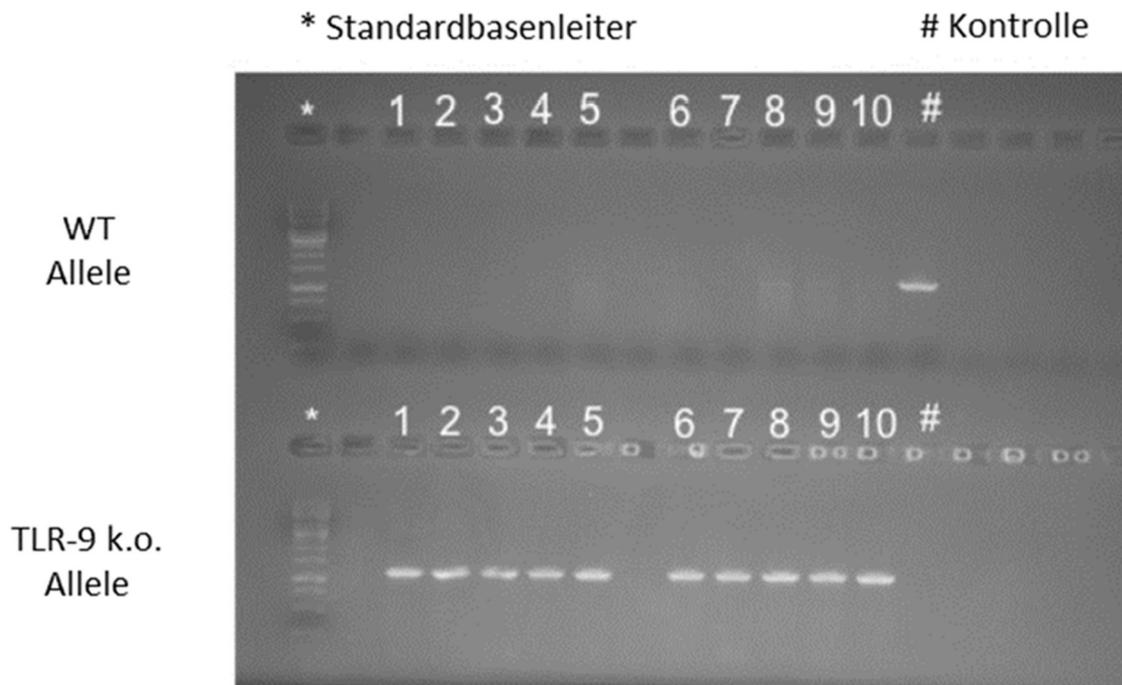


Abb.10: Agarose Gelelektrophorese von WT und homozygoten TLR-9 defizienten Mäusen. Mit * sind die Taschen der Standardbasenleiter gekennzeichnet, mit # die Taschen der Kontrollen. Die Zahlen 1 bis 10 an den restlichen Taschen enthalten Proben von verschiedenen Mäusen. Bei WT entsteht keine Bande bei 1200bp. Bei TLR-9 KO-Tieren ist dort eine Bande.

2.2.4 Genexpressionsanalyse des Herzgewebes

Aus den explantierten Herzen wurde zunächst die Gesamt-RNA extrahiert. Nach Umschreibung der mRNA in cDNA wurde die Genexpression der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, iNOS, HMGB-1 und iCAM-1 im Herzmuskelgewebe von WT-Mäuse und von TLR-9 defizienten Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach CASP gemessen und mit der Expression in den Sham-Tieren verglichen.

2.2.5 RNA Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Isolation der RNA aus Herzgewebe der Mäuse wurde mit dem RNeasy mini Kit der Firma Qiagen entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Zum Schutz der zu extrahierenden RNA wurden für alle Schritte RNase-freien Lösungen und Reaktionsgefäßen verwendet.

30 mg Herzgewebe wurden in 600 µl RLT-Puffer und 6 µl Mercaptoethanol in einem 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß im Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurde das Gewebehomogenat mit 590 µl DEPC-Wasser und 10 µl Proteinase K gemischt und für 10 Minuten bei 55 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Um nicht homogenisierte Gewebestücke zu eliminieren, wurden die Proben 3 Minuten bei 10.000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, 450 µl 96-100 % Ethanol hinzugegeben und durchmischt. Unter einem Abzug wurden 700 µl des Gemisches auf die Silika Säule aus dem RNeasy Mini Kit gegeben, die Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und anschließend für 30 Sekunden bei 8000 g (10.000 rpm) zentrifugiert. Der Durchfluss im Reaktionsgefäß wurde verworfen. Für einen ersten Waschschrift wurden 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und die Proben kurz für 30 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Nach Zugabe von 70 µl RDD Puffer, versetzt mit 10 µl Proteinase K, wurde die Säule 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden erneut 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben, die Säule wurde wieder für 30 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zur Präzipitation der RNA wurden 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben, die Säule wie oben beschrieben zentrifugiert und der Durchfluss erneut verworfen. Nach erneuter Zugabe von 500 µl RPE Puffer wurde die Säule für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml RNase-freies Reaktionsgefäß überführt, 40 µl Rnase freies Wasser zur Elution der RNA direkt auf die Säule geben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt (1,5 Min. bei 8000 g) wurde dem Eluat 0,5 µl RNase Inhibitor zugesetzt. Das Eluat mit der aufgereinigten RNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -80 °C gelagert.

Nach der Extraktion wurden die Konzentration und die Reinheit der gewonnenen RNA photometrisch bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge mit dem NanoDrop Mikrovolumen Spektralphotometer bestimmt. Für die Messung wurden 2 µl der RNA-Lösung gegen 2 µl einer Lösungsflüssigkeit, in unserem Fall DEPC-Wasser, gemessen. Reine Nukleinsäuren haben typischerweise eine 260/280 nm Ratio von 1,8 bis ~2,0 zu Proteinen.

2.2.6 cDNA-Synthese

Alle Arbeiten für die cDNA-Synthese wurden zur Stabilisierung der RNA auf Eis oder auf gekühlten Platten durchgeführt. In 200 μL Reaktionsgefäßen wurde von jeder Probe jeweils 2000 ng RNA mit DEPC Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14,2 μL verdünnt. Die Berechnung der Verdünnung wurde mittels Excel vorgenommen. Anschließend wurde zu jeder Probe 5,8 μL eines Mastermix bestehend aus Startermolekülen (10x random Primers), Desoxyribonucleosidtriphosphate (25x dNTPs, 100 nM Konzentration), Reverse Transkriptase Puffer (10x) und MultiScribe Reverse Transkriptase (Konzentration 50 U/ μL) pipettiert.

Abschließend wurden die Reaktionsgefäße gevortext und in einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert. Die cDNA wurde bei folgendem Temperaturprofil in einem Thermocycler synthetisiert: 25 °C für 10 min, 37 °C für zwei Stunden und abschließend 85 °C für fünf Sekunden. Bei 25 °C lagerten sich die Random Hexamer Primer an der RNA an. In den folgenden zwei Stunden bei 37 °C erfolgt die Elongation durch die Reverse Transkriptase. Beendet wurde die Reaktion durch eine fünf Sekunden dauernde 85 °C Phase. Bis zur Entnahme der Proben wurde der Thermocycler auf 4 °C herunter gekühlt.

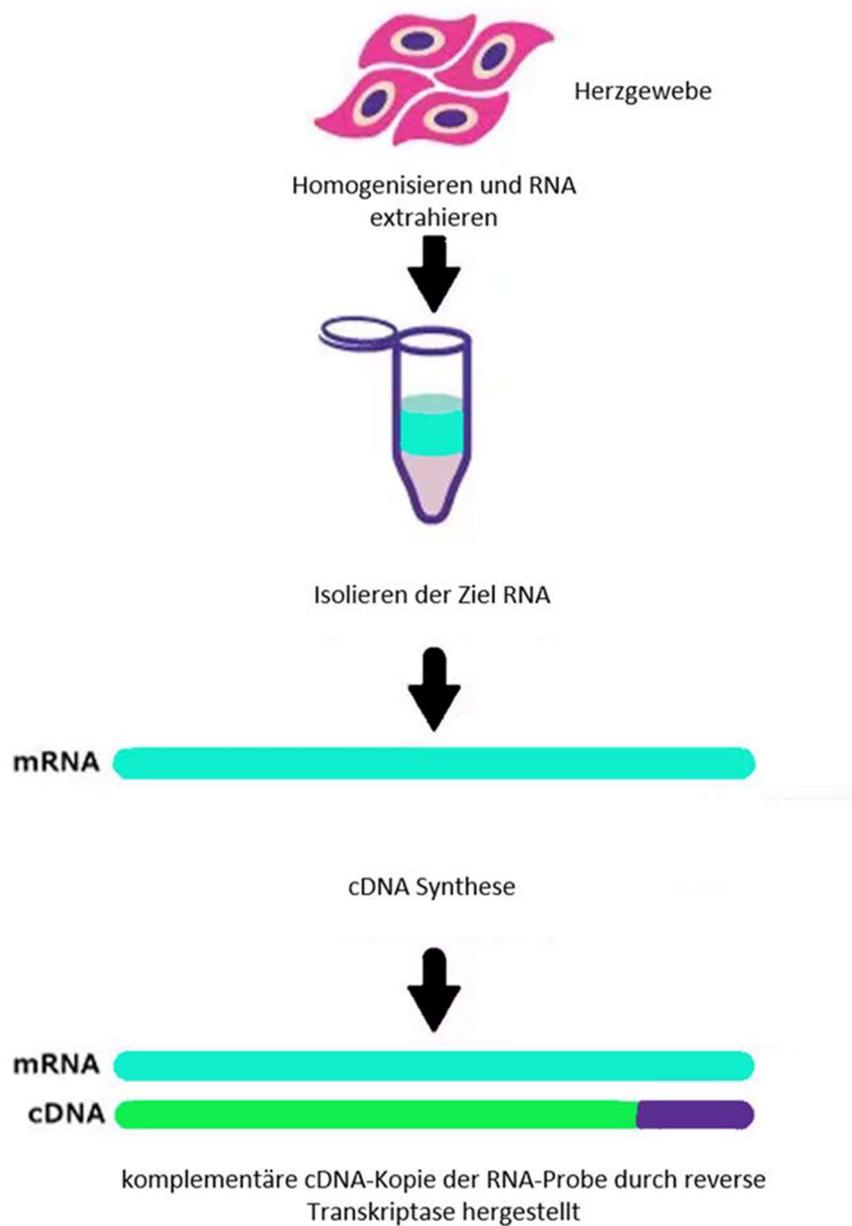


Abb.11: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte von der Gewebekomogenisierung der extrahierten Herzen bis zur cDNA Synthese der Zielgene.

2.2.7 Quantitative Echtzeit Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (Realtime qRT-PCR)

Die Realtime PCR (qRT-PCR) erlaubt die direkte Quantifizierung der Expression bestimmter Zielgene anhand der Intensität eines Fluoreszenzsignals.

Die im Mastermix enthaltenen Taq-Man™ Assays enthalten für die gewünschte Zielsequenz spezifische Primer sowie eine ebenfalls spezifische, Fluoreszenz markierte Sonde.

Tab.5: Liste der verwendeten qRT-PCR Primer zur Detektion der jeweiligen Zielgene

Primer Sonde	Produktnummer
mouse 18S (endogene Kontrolle)	Mm02601777_g1
mouse TNF- α	Mm00443258_m1
mouse IL-1 β	Mm01336189_m1
mouse IL-6	Mm00446190_m1
mouse IL-10	Mm00439616_m1
mouse iNOS	Mm00440485_m1
Mouse HMGB-1	Mm04205650_gH
iCAM-1	Mm00516023_m1

In der initialen Denaturierungsphase wird die doppelsträngige cDNA in zwei Einzelstränge aufgespalten.

In der folgenden Annealingphase binden zum einen die spezifischen Primer zum anderen die Sonden an die gewünschten Zielsequenzen. Die Taq-Man-Sonde besteht aus einem Reporter am 5'-OH-Ende und einem Quencher am 3'-OH-Ende. Solange beide verbunden sind verhindert der Quencher, dass ein Signal gemessen werden kann, da er die Fluoreszenzemission des Reporters blockiert. Das ebenfalls im Assay enthaltene Enzym Taq-DNA-Polymerase katalysiert den Vorgang der Zweitstrang Synthese und trennt gleichzeitig durch hydrolytische Spaltung Reporter und Quencher voneinander. Die nun vom Reporter ausgehende Fluoreszenzintensität kann gemessen werden. Je mehr Ausgangs-DNA in der Probe enthalten ist, desto mehr DNA-Stränge werden neu synthetisiert und desto höher ist die Fluoreszenzintensität. Es liegt also ein proportionales Verhältnis von Fluoreszenzintensität zur Menge der Ausgangs-DNA vor. Die qRT-PCR durchlief 40 Zyklen und die Daten wurden anschließend mit der Software Viia™ 7 Version 1.2 analysiert.

Der Grenzwert Crossing-Threshold (Ct) stellt die Anzahl an PCR-Zyklen dar, die für das Erreichen eines definierten Fluoreszenzniveaus benötigt wurden. Je mehr Ausgangs DNA vorhanden war, desto niedriger der Ct (Pfaffl, 2001).

Um Varianzen im cDNA Gehalt, bedingt durch eventuelle Fehler in der vorangegangenen Aufarbeitung oder durch Schwankungen in der cDNA Synthese innerhalb der Proben auszugleichen, wird der Ct-Wert des Zielgens ins Verhältnis zum Ct-Wert eines nicht regulierten Referenzgens der gleichen Probe gesetzt (Pfaffl, 2001). Wir nutzten für alle Proben 18S als Housekeeping Gene und werteten die Daten mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode nach folgender Formel aus:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Behandlung} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

$$\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Der RQ Wert stellt somit den relativen Unterschied zwischen der Genexpression des Zielgens in der behandelten Probe zu der Genexpression des Zielgens in der Kontrollprobe dar (Pfaffl, 2001).

2.2.8 Statistische Auswertung

Für die Statistische Analyse der Daten und zur Erstellung der Graphen wurde das Programm GraphPad Prism 6® für Windows verwendet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) mit dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) nach dem Schema „MW \pm SEM“ dargestellt. Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen für ein Signifikanzniveau $P < 0,05$ und sind in den Graphiken mit einem „*“ markiert (** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; **** = $P < 0,0001$). Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des unpaired T-Tests und mittels one-way Anova. Um Ausreißer zu detektieren und aus den Berechnungen zu nehmen verwendete ich den online frei zugängliche Outlier Calculator mittels Grubbs Test der Firma Graphpad online auf der Homepage frei zugänglich unter „<https://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/>“ (Stand 09.03.2023).

2.3 Materialien

2.3.1 Materialien für die Tierhaltung

Einstreu:	Espen Einstreu classic, Ssniff Spezialdiäten GmbH
Futter:	Standard Halteungsdiät Maus, hybridpallets, Altromin Wasser, autoklaviert
Käfige:	Makrolon, Typ II L, Filtertop, Tecniplast
Zuchttiere:	C57/Bl6-N Mäuse, Charles River Deutschland GmbH

2.3.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 6: Verbrauchsmaterialien

Betaisodona	Betaisodona Lösung	Mundipharma GmbH
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf Cups Safe-Lock 0.2, 0.5, 1.5 und 2 ml, steril, teils RNase frei	Eppendorf AG
Hypnotikum (Anästhesie)	Isofluran, 250 ml, zur Inhalationsnarkose	Piramal Critical Care Deutschland GmbH
Fäden für Haut- und Muskelnäht	Prolene blau monofil 7/0, 5/0 mit atraumatischer Nadel	Johnson und Johnson
Kanülen	Sterican 27 G und 18 G	B. Braun Melsungen AG
Medikamente:	<ul style="list-style-type: none"> - Buprenorphin-Lösung, Temgesic; - Heparin, Heparin-Natrium 5.000 iE/ml; - Kardioplegielösung Custodiol nach Bretschneider 	<p>Essex Pharma GmbH</p> <p>B. Braun Melsungen AG</p> <p>Dr. Franz Köhler Chemie GmbH</p>
MacConkey Agar	MacCONKEY (MAC) Agar	Merck KgaA
NaCl	NaCl 0,9%	B. Braun Melsungen AG
PCR Tubes	PCR-02-C thin wall, clear	Axygen
Petrischalen	Petrischalen aus Polystyrol	Greiner Bio-One
Spritzen	Injekt Solo 2, 5 und 10 ml	B. Braun Melsungen AG
Venenverweilkanüle	Vasofix Safety 18 G	B. Braun Melsungen AG
Zellkulturschalen	Cellstar Cellculture Dishes	Greiner bio-one
Zentrifugenröhrchen	Falcon Zentrifugenröhrchen, 15 ml	Fisher Scientific
384 Well PCR Platte	384 Well Platte, Artikelnr. 781347	Brand

2.3.3 Geräte und Zubehör

Operationszubehör:

Operationsbesteck	Verschiedene Scheren, Pinzetten, Nadelhalter (Allgaier Instrumente, Frittlingen sowie Everhards GmbH, Meckenheim)
OP-Tisch	Eigenanfertigung der feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Instituts mit angeschlossenem Wärmebad (42 °C); Rhema-Labortechnik, Hofheim
Standardvapor Temperaturregler	Standardvapor Eickemeyer Isoflo, Drägerwerk AG, Lübeck RAPID-Regler, Fa. Hengstler, Aldingen
Thermometer	Greisinger electronic GmbH, Regenstauf,

Geräte für die molekularbiologischen Arbeiten:

Tab 7: Geräte

Gerätename	Typ	Hersteller
Autoclav	Varioklav Dampfsterilisator	HP Labortechnik
Eis Maschine	Flockeneisbereiter AF 80	Scotsman
Elektrophoresekammer	Wide Mini-sub Cell GT Power Pac 3000	Bio-Rad Laboratories Inc.
Feinwaage	CP 225D-0CE	Sartorius Werke GmbH
Gewebehomogenisator	Polytron PT MR 2100	Kinematica AG
Multipipette Matrix	Multipipette Matrix	Thermo Scientific
Real time PCR Gerät	Via7 Softwareversion 1.2	Applied Biosystems
Sterilbank	Sterilbank Herasafe	Hera Instruments
Thermocycler	T-Gradient	Biometra
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG
UV Transilluminator	UVP BioDoc-IT Imaging System Benchtop	Fisher Scientific
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific industries Inc.
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Group
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Eppendorf AG

2.3.4 Reagenzien und Lösungen

Tab. 8: Reagenzien

Substanz	Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Agarose	Sigma Aldrich
DEPC Wasser	DEPC Wasser Nuclease-Free	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid 0.5 M, pH8.0, RNase frei, AM9261	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific

Ethanol	Ethanol 96 %, EMPROVE EXPERT	Sigma Aldrich
Ethidiumbromid	Ethidiumbromid Tablette 10 mg/tablet	Sigma Aldrich
GIT	GIT Guanidine thiocyanate $\geq 97\%$	Sigma
Mercaptoethanol	2-Mercaptoethanol 98 %	Sigma-Aldrich
Nucleotide für PCR	dNTP 2,5 mM Mix Lot1257684	Invitrogen
PCR-Mastermix	TaqMan Gene Expression MasterMix	Applied Biosystems
PCR Puffer	PCR Puffer 10 x Rxn Buffer (MgCl ₂) 1,25 ml	Invitrogen
PBS Lösung:	PBS-Pufferlösung aus NaCl, KCl, Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O, KH ₂ PO ₄ und Aqua dest, pH Wert 7,4	Thermo Fisher Scientific
Primer	Siehe Tab 5 S.43	Invitrogen
Proteinase K	Proteinase K, 10 ml	Qiagen
Reverse Transkriptase Kit	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, reverse Transkriptase Puffer, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Random Primer, Multi Scribe reverse Transkriptase	Applied Biosystems
Rnase Inhibitor	Rnase Inhibitor 2000units	Qiagen
Rneasy mini Kit	mit RLT-Puffer, RW1-Puffer, RDD Puffer, RPE-Puffer, Rnase freies Wasser	Qiagen
SDS	Natrium dodecylsulfat, 10 g	Serva Electrophoresis GmbH
Molekulargewichtsmarker	Standard-DNA-leiter 1kB	Sigma Aldrich
Taq Polymerase	Taq DNA Polymerase recombinant 5 U/ μ l Lot1262145	Invitrogen
TBE Puffer	TBE 10-fach (Borsäure und EDTA Mischung)	Bio-Rad

2.3.5 Softwareprogramme

Prism 6 for Windows Version 6.02, GraphPad Software, Inc., San Diego, USA.

Software Viia™ 7 Version 1.2, Applied Biosystems.

Outlier Calculator mittels Grubbs Test der Firma Graphpad online auf der Homepage frei zugänglich unter „ <https://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1/> “ (Stand 09.03.2023).

3. Ergebnisse

3.1 Bewertung des Krankheitsgrades nach CASP-OP

Der Krankheitsgrad von WT- und TLR-9 defizienten Mäuse nach CASP- oder Sham-Operation wurde zu verschiedenen postoperativen Zeitpunkten anhand des unter Kapitel 2.1.11 beschriebenen Krankheitsscores ermittelt. Die Bewertung erfolgte basierend auf den Kriterien Körperhaltung, Körperpflege sowie Bewegung und Sozialverhalten. Der verwendete Score reicht von 1 Punkt - nicht erkennbar krank - bis hin zu maximal 6 Punkten, was dem postoperativen Versterben im gesamten Beobachtungszeitraum von bis zu 36 h entsprach. Die Kriterien Körperhaltung und Körperpflege und Sozialverhalten wurden optisch beurteilt. Die Bewegung wurde unter anderem anhand des Fluchtverhaltens beim Ergreifen der Maus bewertet. Die Zunahme des Krankheitsgrades wurde durch eine höhere Punktzahl im Score abgebildet. Jedes einzelne Tier wurde entsprechend bewertet. In der Auswertung sind die prozentualen Anteile der unterschiedlichen Krankheitsscores bezogen auf die Gesamtheit der Mäuse in der jeweiligen Behandlungsgruppe dargestellt.

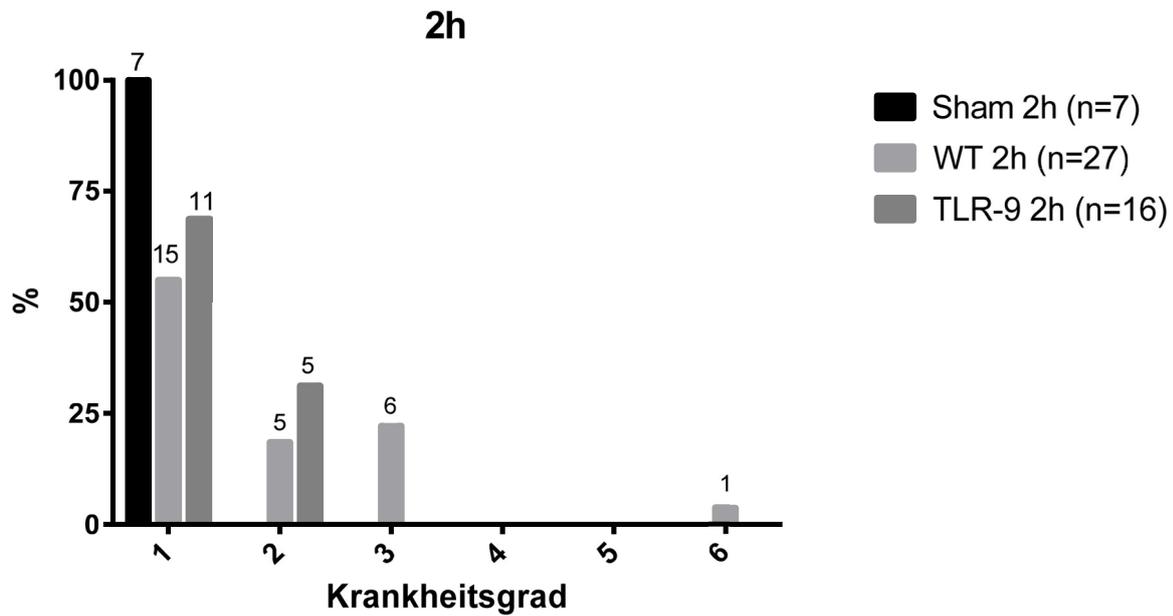


Abb. 13: Krankheitsgrad von 1 – 6 nach modifiziertem, eigenem Schema der WT- und TLR-9 defizienten Mäuse 2 h nach CASP oder Sham-OP. Dargestellt ist der Anteil der WT- oder TLR-9 defizienten Mäuse mit einem entsprechenden Krankheitsgrad 2 h nach OP in Prozent der Gesamtzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe. Über den prozentualen Säulen steht die absolute n-Zahl der Tiere der jeweiligen Gruppe. Zum Vergleich wurde der Krankheitsgrad der Sham-operierten Tiere erfasst.

2 h nach CASP-OP zeigten sich kleine Unterschiede zwischen den CASP operierten WT-Mäusen und den CASP operierten TLR-9 defizienten Mäusen. Die Sham-operierten Tiere zeigten keinerlei Krankheitszeichen. In der Gruppe der WT-Mäuse konnten darüber hinaus geringe (Grad 2) und mäßige (Grad 3) Krankheitszeichen beobachtet werden. In der Gruppe der TLR-9 defizienten Tiere wurden neben Tieren ohne Krankheitssymptomatik (Grad 1) nur noch geringe (Grad 2) Krankheitszeichen beobachtet. Darüber hinaus ist eine WT-Maus innerhalb des 2 h Untersuchungszeitraumes verstorben.

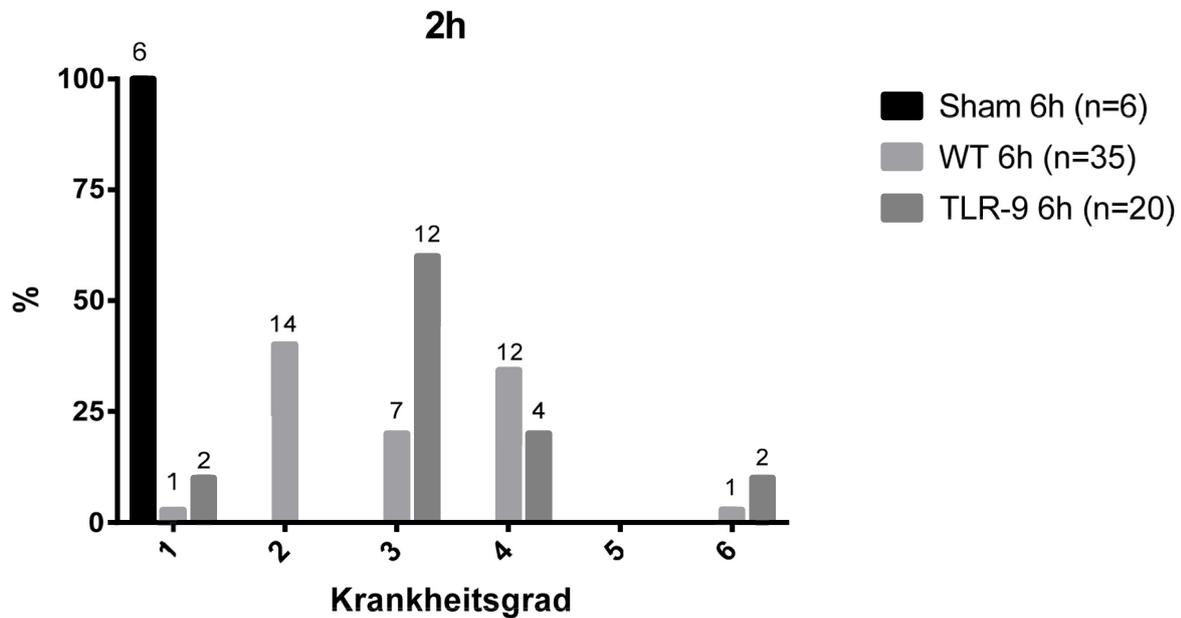


Abb. 14: Krankheitsgrad von 1 – 6 nach modifiziertem, eigenem Schema der WT- und TLR-9 defizienten Mäusen 6 h nach CASP oder Sham-OP. Dargestellt ist der Anteil der WT- oder TLR-9 defizienten Mäuse mit einem entsprechenden Krankheitsgrad 6 h nach OP in Prozent der Gesamtzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe. Über den prozentualen Säulen steht die absolute n-Zahl der Tiere der jeweiligen Gruppe. Zum Vergleich wurde der Krankheitsgrad der Sham-operierten Tiere erfasst.

6 h nach CASP-OP zeigten Sham-operierte Tiere weiter keine Krankheitszeichen. Bei den WT-Mäusen waren bei 12 Tieren (34 %) deutliche (Grad 4), bei 7 Tieren (20 %) mäßige (Grad 3) und bei 14 Tieren (40 %) geringe (Grad 2) Krankheitszeichen erkennbar, wobei ein Tier zwischen der 3. und der 6. Stunde nach CASP-OP verstorben war. Bei den TLR-9 defizienten Mäusen zeigte sich eine andere Verteilung der Krankheitsgrade nach CASP-OP. Bei 12 Tieren (60 %) konnten mäßige (Grad 3) Krankheitszeichen nachgewiesen werden, 4 Tiere (20 %) zeigten deutliche (Grad 4) Krankheitszeichen, 2 der Tiere (10 %) zeigten keine Anzeichen von Krankheit. 2 weitere Tiere (10%) waren in dem Intervall zwischen der 3. und 6. Stunde nach CASP-OP verstorben. WT-Mäuse scheinen auch hier etwas kränker zu sein, wobei bei den TLR-9 defizienten Mäusen eine etwas höhere Mortalität zu beobachten war.

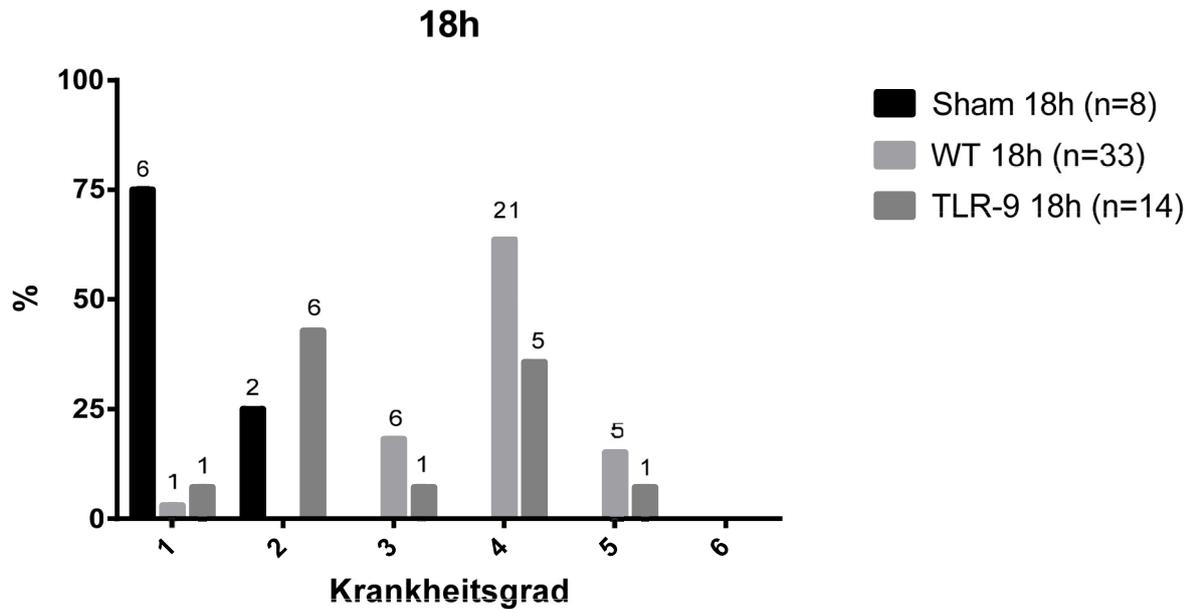


Abb. 15: Krankheitsgrad von 1 – 6 nach modifiziertem, eigenem Schema der WT- und TLR-9 defizienten Mäuse 18 h nach CASP oder Sham-OP. Dargestellt ist der Anteil der WT- oder TLR-9 defizienten Mäuse mit einem entsprechenden Krankheitsgrad 18 h nach OP in Prozent der Gesamtzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe. Über den prozentualen Säulen steht die absolute n-Zahl der Tiere der jeweiligen Gruppe. Zum Vergleich wurde der Krankheitsgrad der Sham-operierten Tiere erfasst.

Nach 18 h zeigten sich auch bei 25 % (2 Tieren) der Sham-operierten Tiere geringe (Grad 2) Krankheitszeichen. Bei dem Rest der Sham-Gruppe (75 %) zeigten sich sonst weiterhin keinerlei Krankheitszeichen. Bei 15 % (5 Tiere) der CASP-operierten WT-Mäuse zeigten sich schwere (Grad 5) Krankheitszeichen, bei mehr als 60 % (21 Tiere) waren nun sehr deutliche (Grad 4) Krankheitszeichen zu beobachten und 18 % (6 Tiere) entwickelten mäßige (Grad 3) Krankheitssymptome. Bei den TLR-9 defizienten Mäusen konnten zwei größere Gruppen von Tieren charakterisiert werden: eine große Gruppe (42 %; 6 Tiere), die nur geringe (Grad 2) Krankheitszeichen zeigte und eine weitere große Gruppe (35 %; 5 Tiere), die deutliche (Grad 4) Krankheitszeichen entwickelt hatten. Schwere (Grad 5), mäßige (Grad 3) bzw. keine erkennbaren (Grad 1) Krankheitszeichen traten nur bei je 7% (1 Tier) der TLR-9 KO-Tiere auf. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt überlebten alle Mäuse unabhängig vom Genotyp. Insgesamt erscheinen die TLR-9 defizienten Tiere auch zu diesem Zeitpunkt etwas weniger stark erkrankt zu sein.

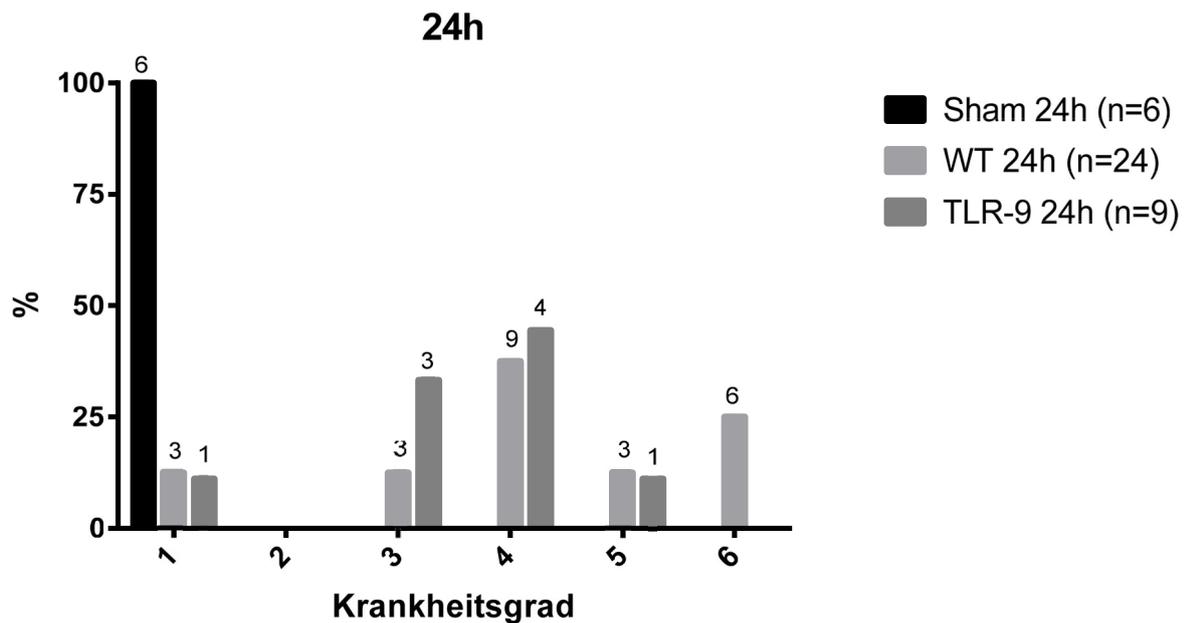


Abb. 16: Krankheitsgrad von 1 – 6 nach modifiziertem, eigenem Schema der WT- und TLR-9 defizienten Mäuse 24 h nach CASP oder Sham-OP. Dargestellt ist der Anteil der WT- oder TLR-9 defizienten Mäuse mit einem entsprechenden Krankheitsgrad 24 h nach OP in Prozent der Gesamtzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe. Über den prozentualen Säulen steht die absolute n-Zahl der Tiere der jeweiligen Gruppe. Zum Vergleich wurde der Krankheitsgrad der Sham-operierten Tiere erfasst.

Nach 24 h zeigte keines der Sham-operierten Mäuse Krankheitszeichen. Auch bei 10 % (3 Tieren) der WT- und 10 % (1 Tier) der TLR-9 defizienten Tiere wurden 24 h nach CASP-OP keine Krankheitszeichen beobachtet. Ein großer Teil der WT-Mäuse (37,5 %; 9 Tiere) zeigte 24 h nach CASP-OP aber deutliche (Grad 4) Krankheitszeichen, schwere (Grad 5) Krankheitszeichen wurden bei 12,5 % der Tiere beobachtet, 25 % (6 Tiere) der WT-Mäuse haben die CASP-OP keine 24 h überlebt. In der Gruppe der TLR-9 defizienten Tiere überlebten dagegen alle Mäuse mit hauptsächlich mäßigen (Grad 3; 33 %; 3 Tiere) oder deutlichen (Grad 4; 44 %; 4 Tiere) Krankheitszeichen. Je 11 % (1 Tier) zeigten bei den TLR-9 KO-Tieren keine erkennbaren (Grad 1) oder aber schwere (Grad 5) Symptome. Global betrachtet erscheinen zu diesem Zeitpunkt die TLR-9 KO-Mäuse weniger stark betroffen zu sein, da in dieser Gruppe kein Tier verstorben ist. Demgegenüber verstarb ein Viertel der Mäuse in der WT-Gruppe.

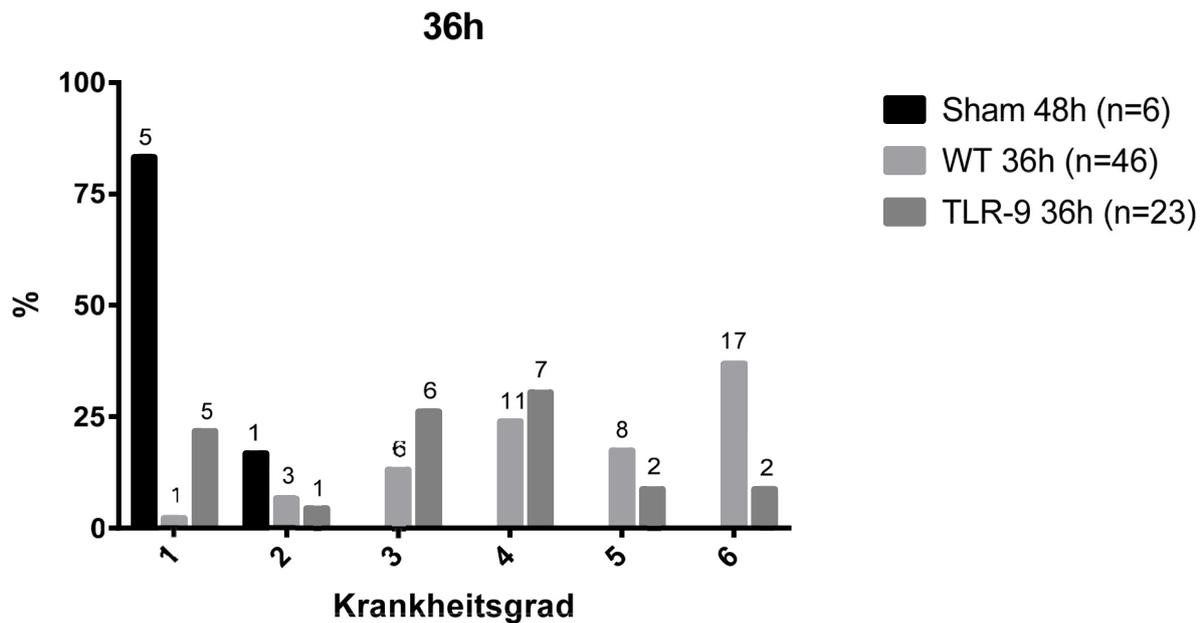


Abb. 17: Krankheitsgrad von 1 – 6 nach modifiziertem, eigenem Schema der WT- und TLR-9 defizienten Mäuse 36 h nach CASP oder Sham-OP. Dargestellt ist der Anteil der WT- oder TLR-9 defizienten Mäuse mit einem entsprechenden Krankheitsgrad 36 h nach OP in Prozent der Gesamtzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe. Über den prozentualen Säulen steht die absolute n-Zahl der Tiere der jeweiligen Gruppe. Zum Vergleich wurde der Krankheitsgrad der Sham-operierten Tiere erfasst.

Die Sham operierten Tiere zeigten sich auch nach 36 h im Bereich nicht erkennbarer (Grad 1) oder nur leichter (Grad 2) Krankheitssymptome. 36 h nach CASP-OP war eine deutlich größere Anzahl an Tieren sowohl bei den WT Mäusen als auch in der Gruppe der TLR-9 defizienten Mäuse verstorben. Der Anteil der toten Tiere (Grad 6) war bei den WT-Mäusen mit 37 % (17 Tiere) deutlich höher als bei den TLR-9 KO-Mäusen, in deren Gruppe hier 9 % (2 Tiere) verstorben sind. Bei den TLR-9 defizienten Tieren zeigte sich zudem eine geringere Anzahl (9 %; 2 Tiere) von Tieren mit schweren (Grad 5) Krankheitssymptomen gegenüber 17 % (8 Tieren) bei den WT-Mäusen. Sowohl bei WT-Mäusen als auch bei TLR-9 defizienten Tieren lag der Anteil der Tiere mit deutlichen (Grad 4) Krankheitssymptomen etwas näher beieinander (24 % gegenüber 30 %). Bei den TLR-9 defizienten Tieren wurden auch mehr Mäuse ohne erkennbare (Grad 1) Krankheitssymptomatik beobachtet (22 %; 5 Tiere) gegenüber 2 % (1 Tier) bei der WT-Gruppe. Durch den geringeren Anteil schwer erkrankter und toter Tiere scheinen die TLR-

9 KO-Tiere auch nach 36 h eine deutlich geringere Morbidität und Mortalität aufzuweisen als die verglichene WT-Gruppe.

3.2 Peritoneallavage und Analyse der Bakterienlast

Die CASP-OP stellt ein tierexperimentelles Modell für eine Peritonitis mit nachfolgender polymikrobieller Sepsis dar. Die Analyse der peritonealen Bakterienlast zeigt die erfolgreiche Stent-Implantation und die Kinetik des Bakterienübertritts aus dem Darm in die Peritonealhöhle. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob die Höhe der Bakterienlast mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert.

Wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben wurde 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach CASP- oder Sham-OP eine Peritoneallavage durchgeführt. Die Lavageflüssigkeit wurde entsprechend dem angegebenen Schema (Tab. 4, S. 36) verdünnt und 50 µl der jeweiligen Verdünnung auf MacConkey Agarplatten ausplattiert. Für jede Maus wurden 2 Platten mit jeweils unterschiedlichen Vorverdünnungen angelegt. Nach 48 h Bebrütung wurden die einzelnen Kolonien (CFU) auf den Platten ausgezählt.

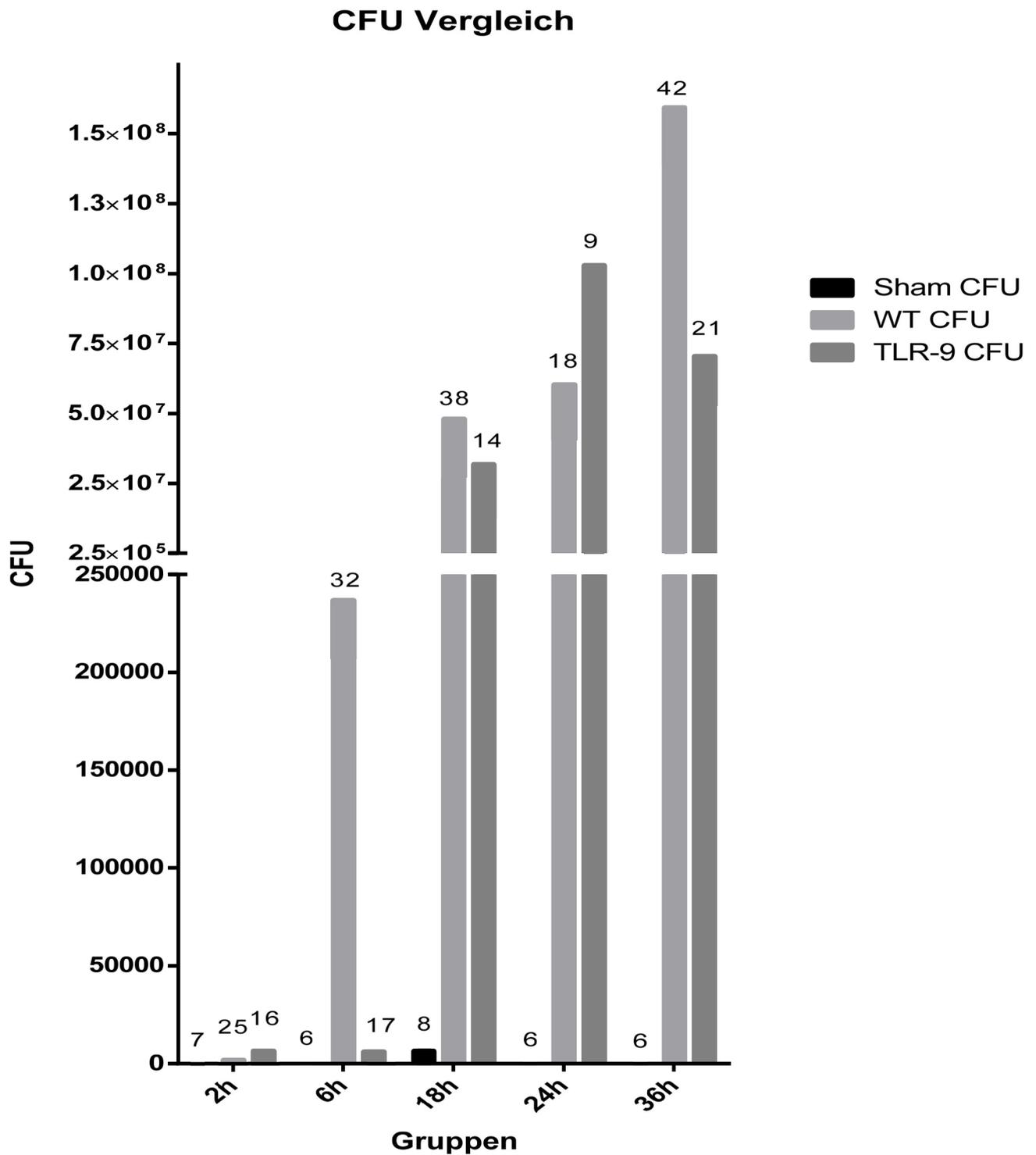


Abb. 18: Bakterienlast in der Peritoneallavage von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. Dargestellt sind die ausgezählten CFUs aus der Peritoneallavage von Sham-operierten (n=33) sowie CASP-operierten WT- (n=155) und TLR-9 defizienten (n=77) Mäusen. Über den jeweiligen Graphen stehen die absoluten n-Zahlen der jeweiligen Gruppe. *P< 0,05 (unpaired t-test).

In der Peritoneallavage von Sham-operierten Mäusen konnten kaum Bakterien nachgewiesen werden. Bereits nach 2 h konnte in der Peritoneallavage von CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen ein Anstieg der Bakterienlast festgestellt werden. Nach 6 h stieg die Bakterienlast bei den WT-Mäusen gegenüber der Lavage aus TLR-9 defizienten Mäusen deutlich an. Im weiteren Zeitverlauf zeigte sich bei beiden Mauslinien ein Anstieg der peritonealen Bakterienlast, der nach 18 h und 36 h in der Peritoneallavage von WT-Mäusen höher war als in der von TLR-9 defizienten Mäusen. Während bei WT-Mäusen die Bakterienlast im Versuchsverlauf kontinuierlich zunahm, erreichte die Bakterienlast in der Peritoneallavage von TLR-9 defizienten Mäusen nach 24 h ein Maximum und fiel danach zum Zeitpunkt 36 h aber wieder ab, wohingegen die Bakterienlast bei den WT-Mäusen kontinuierlich und auch weiter deutlich anstieg.

3.3 Genexpression inflammatorischer Marker im Herzgewebe

Die Entzündung des Herzmuskelgewebes stellt eine erhebliche Komplikation einer polymikrobiellen Sepsis dar. Durch die Analyse der Expression inflammatorischer Zytokine sollte versucht werden Faktoren zu identifizieren, die an der Entwicklung und Persistenz der septischen Kardiomyopathie beteiligt sind. Aus der Charakterisierung der Kinetik der frühen inflammatorischen Reaktion des Herzmuskelgewebes während der polymikrobiellen Sepsis können möglicherweise Zeitpunkte für therapeutische Interventionen wie Hemmung oder Neutralisierung von bestimmten Zytokinen abgeleitet werden. Da die Aktivierung des TLR-9 über bakterielle DNA erfolgt, ist die Rolle dieses Rezeptors im Rahmen der polymikrobiellen Sepsis von besonderer Bedeutung. In dieser Arbeit wurde die Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, des endogenen DAMP HMGB-1, des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und der induzierbaren NO-Synthase iNOS im Herzgewebe von CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen mittels realtime PCR untersucht. Die Expression nach CASP-OP wurde zum einen auf die konstitutive Expression der untersuchten Gene in naiven Kontrolltieren, zum anderen auf die Expression in Sham-operierten Tieren bezogen, um operationstechnische Einflüsse zu erfassen.

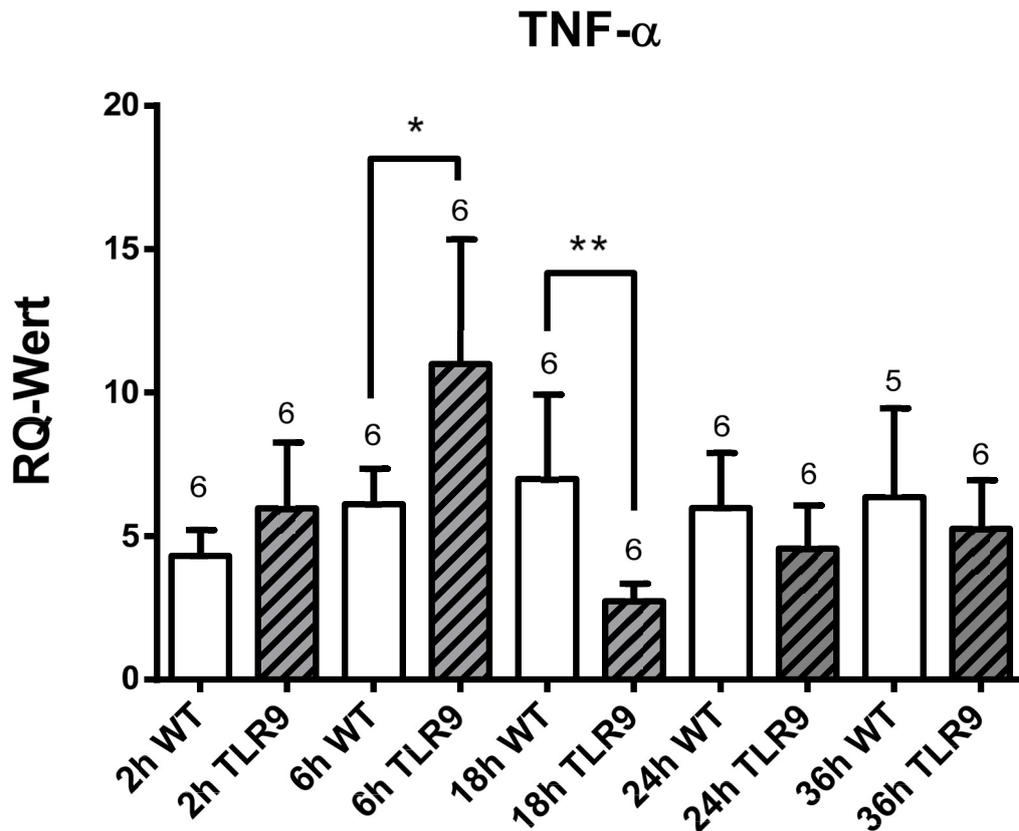


Abb. 19: TNF- α Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test.

Über den gesamten Beobachtungszeitraum zeigten sowohl WT- als auch TLR-9 defiziente Mäuse nach CASP-OP eine erhöhte Expression von TNF- α . Der TNF- α Level der TLR-9 KO-Tiere war zu den frühen Zeitpunkten 2 h und 6 h höher als das Level der WT-Gruppe, sank nach 18 h aber früher deutlich ab als bei den WT. Zu den späteren Zeitpunkten 18 h, 24 h und 36 h war das TNF- α Level der TLR-9 defizienten Tiere unter dem Niveau der WT-Gruppe. Signifikante Unterschiede ergaben sich zum Zeitpunkt 6 h, hier war die TNF- α Expression der TLR-9 defizienten Mäusen signifikant höher, dagegen war zum Zeitpunkt 18 h die TNF- α Expression der WT-Mäuse signifikant höher. Das Expressionsmaximum der TLR-9 defizienten Tiere findet sich im Falle von TNF- α bei 6 h und ist deutlich höher als zu den anderen Untersuchungszeitpunkten. Bei den WT-

Mäusen findet sich das Expressionsmaximum bei 18 h und ist gegenüber den anderen Untersuchungszeitpunkten verhältnismäßig leicht erhöht.

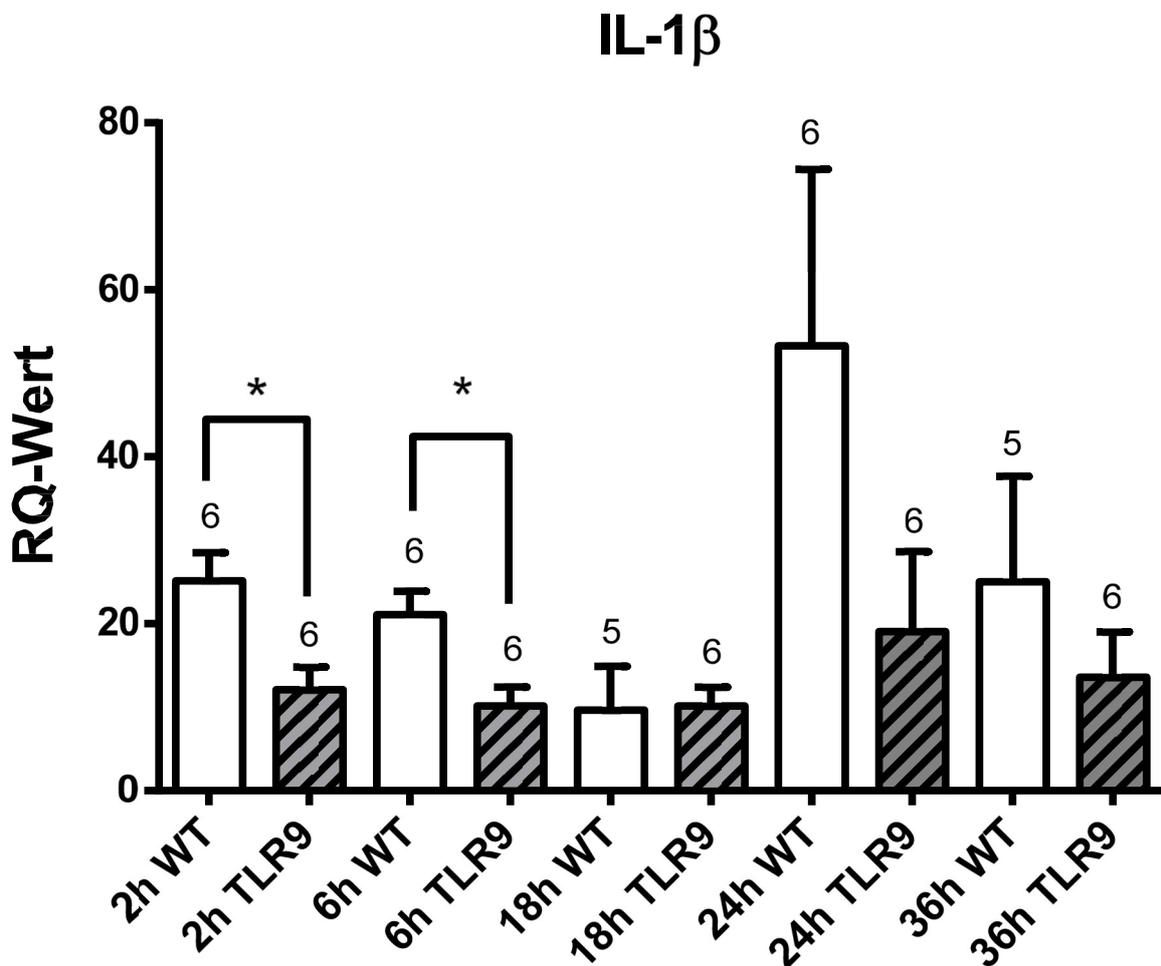


Abb. 20: IL-1 β Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM, unpaired t-Test, * $P < 0,05$.

Über fast den gesamten Beobachtungszeitraum zeigten WT-Mäuse gegenüber TLR-9 defizienten Mäusen nach CASP-OP eine teils signifikant erhöhte Expression von IL-1 β . Sowohl bei den WT- als auch bei den TLR-9 defizienten Tieren zeigte sich ein leicht

biphasischer Verlauf der IL-1 β Expression. Nach einer initial höheren Expression zu den frühen Zeitpunkten kam es zu dem mittleren Zeitpunkt 18 h zu einem Abfall der IL-1 β Expression und anschließend stiegen die Expressionslevel während der späteren Zeitpunkte wieder an. In beiden Gruppen findet sich das Expressionsmaximum von IL-1 β bei 24 h.

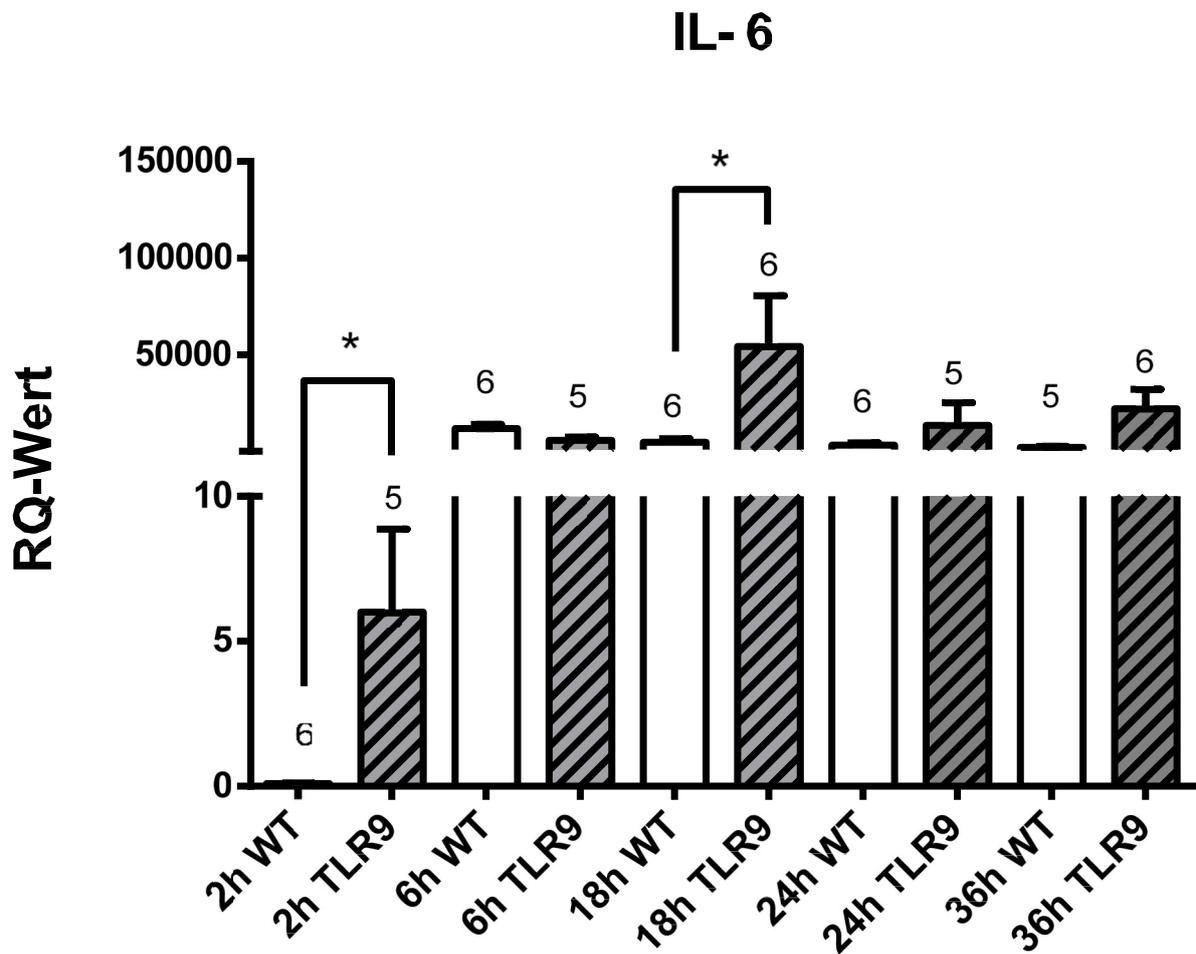


Abb. 21: IL-6 Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test, * P<0,05.

Die Analyse der IL-6 Genexpression zeigte eine relativ ähnliche Expression bei den WT- verglichen mit den TLR-9 KO-Tieren. Deutliche Abweichungen voneinander gab es allerdings in den 2 h- und der 18 h Gruppen. Hier war die Expression von IL-6 bei den WT jeweils signifikant niedriger als bei den TLR-9 KO-Tieren. Es zeigen sich bei der Expression von IL-6 zwei unterschiedliche Maxima: bei der WT-Gruppe ist dies der frühe Zeitpunkt 6 h mit einer leicht höheren Expression gegenüber den anderen Zeitpunkten, bei der TLR-9 KO-Gruppe hingegen war der mittlere Zeitpunkt 18 h das Expressionsmaximum und dies deutlich gegenüber den anderen Beobachtungszeitpunkten ausgeprägt.

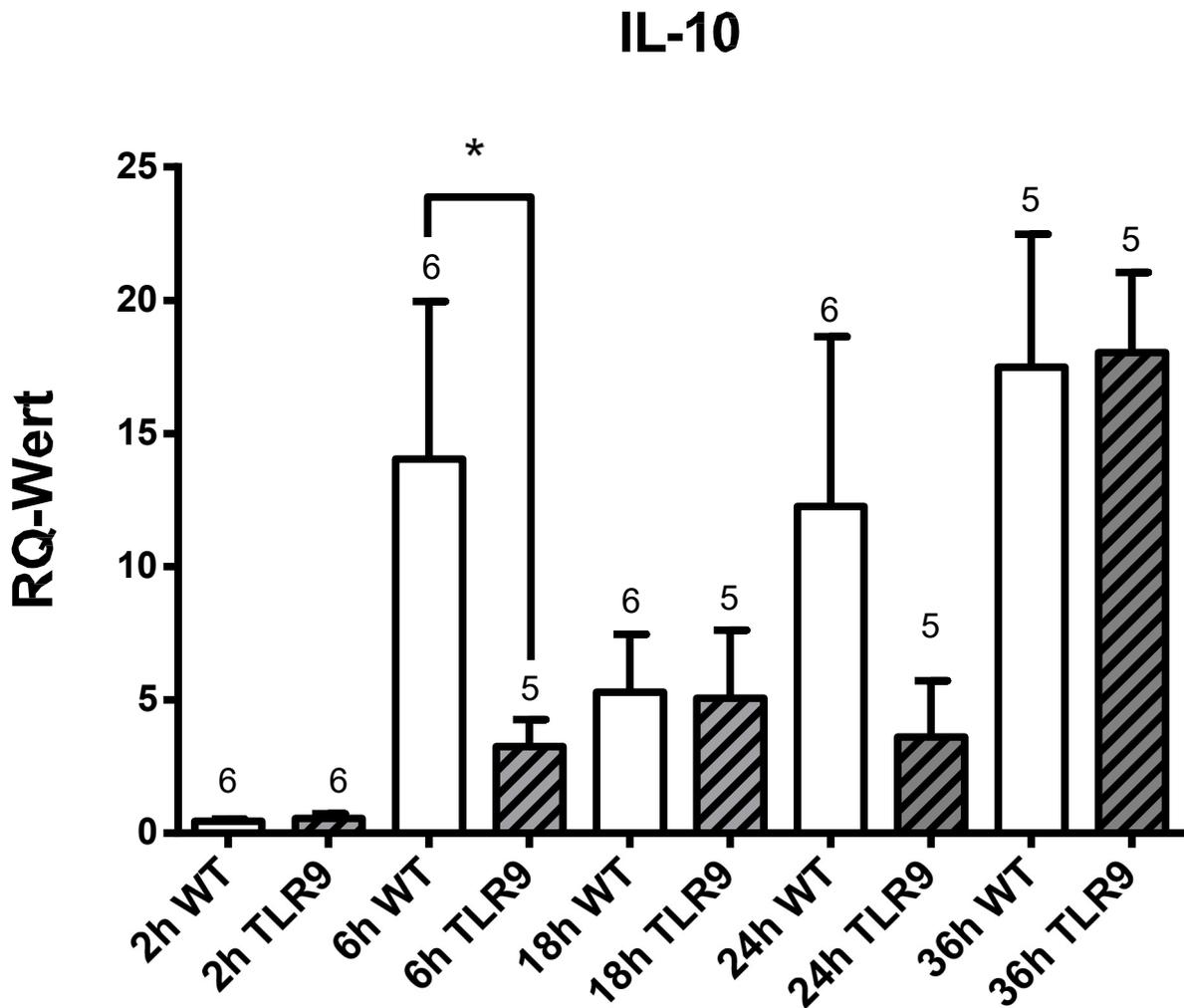


Abb. 22: IL-10 Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test, * $P < 0,05$.

Bei dem Zytokin IL-10 fallen zunächst bei den WT-Mäusen höhere Expressionslevel gegenüber den TLR-9 defizienten Mäusen bei 6 h und 24 h ins Auge. Deutlich höher, aber statistisch nicht signifikant, ist die Expression bei den WT-Tieren zum Zeitpunkt 6 h. Zu dem späteren Zeitpunkten 18h und 24 h liegt immer noch ein deutlich höheres Expressionsniveau gegenüber den TLR-9 defizienten Tieren vor. Sonst liegen die Expressionslevel bei den übrigen Zeitpunkten in beiden Gruppen dicht beieinander und unterscheiden sich kaum. In beiden Gruppen findet sich die höchste Expression von IL-10 bei 36 h auf einem ähnlichen Niveau.

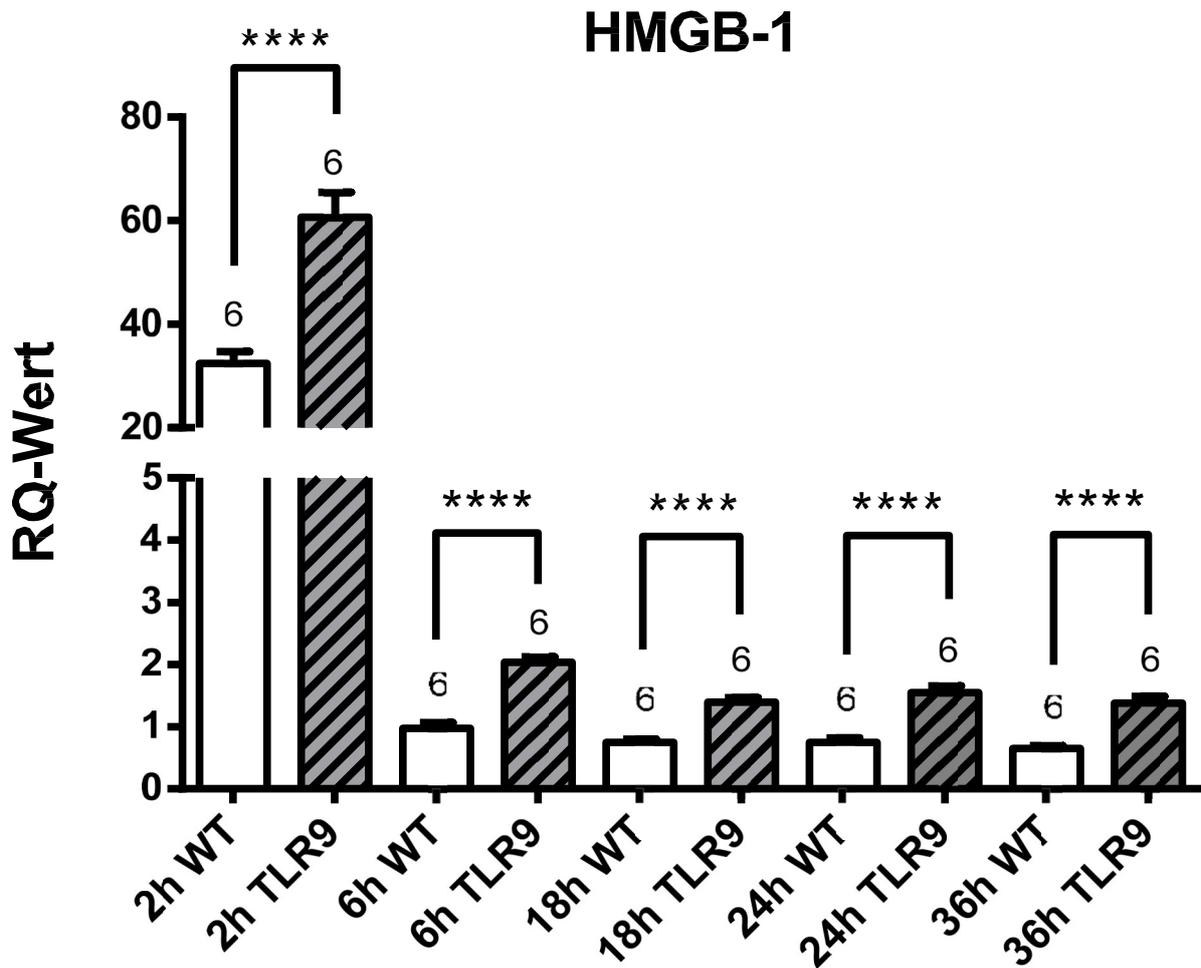


Abb. 23: HMGB-1 Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test, **** P<0,0001 und * P<0,05.

Die HMGB-1 Expression ist in TLR-9 KO-Tieren zu jedem Zeitpunkt hochsignifikant höher als die von HMGB-1 in der Gruppe der WT-Tiere. Zum Zeitpunkt 2 h ist die Mehrexpression von HMGB1 in den TLR-9 defizienten Mäusen am deutlichsten. In beiden Gruppen findet sich das Expressionsmaximum von HMGB-1 bei 2 h.

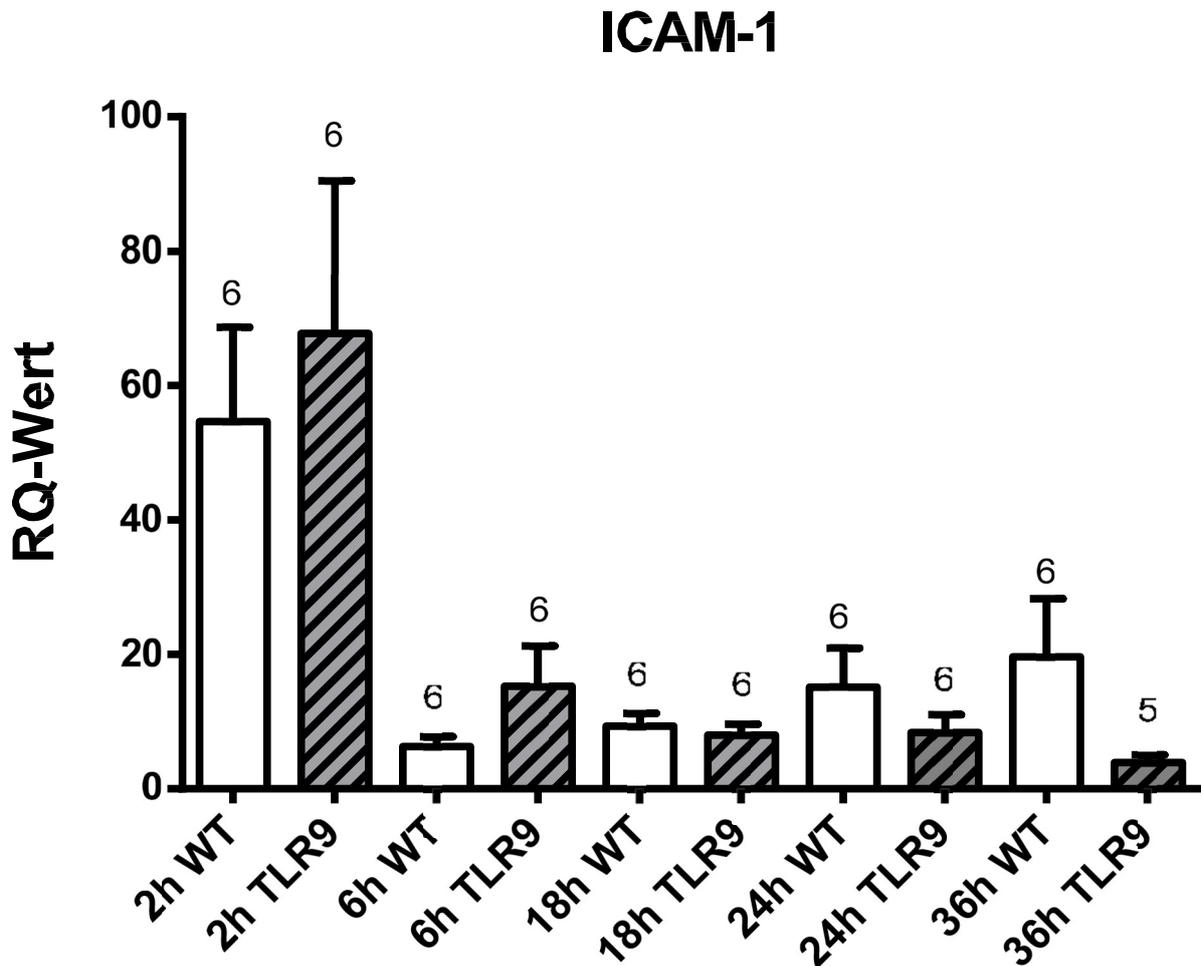


Abb. 24: ICAM-1 Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM, unpaired t-Test.

Bei der Untersuchung der Expressionslevel von ICAM-1 zeigte sich zu den frühen Zeitpunkten 2 h und 6 h die Expression bei der TLR-9 KO-Gruppe erhöht. Zu den späten Zeitpunkten 24 h und 36 h drehte sich dieses Verhältnis um und die WT-Mäuse zeigten eine höhere ICAM-1 Expression, wohingegen zum Zeitpunkt 18 h die Expression annähernd gleich war. In beiden Gruppen findet sich das Expressionsmaximum von ICAM-1 deutlich bei 2 h. Bei keinem der untersuchten Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied im Expressionslevel von ICAM-1 zwischen den beiden untersuchten Mausstämmen festgestellt werden.

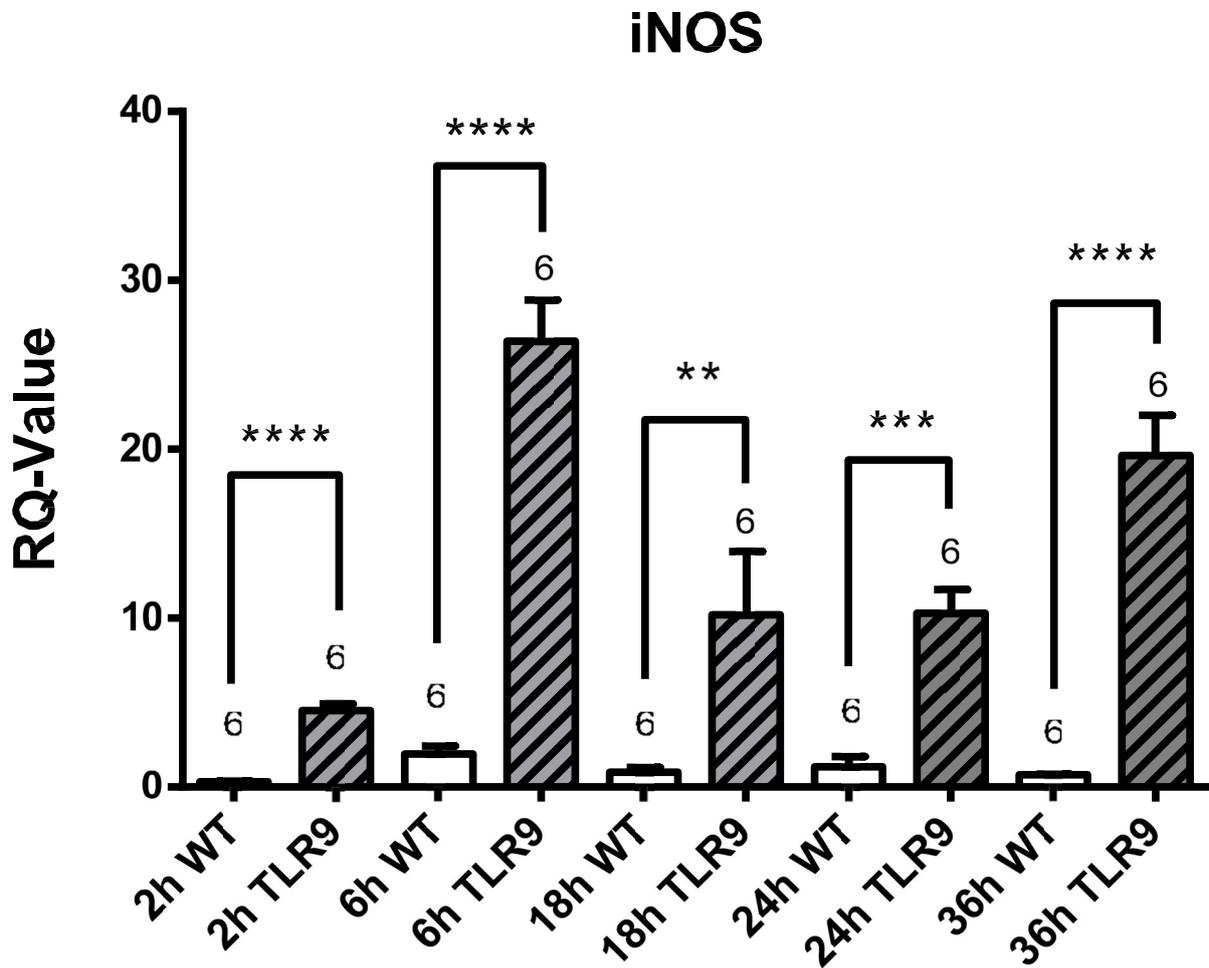


Abb. 25: iNOS Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test, **** P<0,0001, *** P<0,001, ** P<0,01 und * P<0,05.

Die TLR-9 defizienten Mäuse exprimieren zu jedem Zeitpunkt signifikant stärker iNOS als die WT-Tiere. Zu den Zeitpunkten 2 h, 6 h und 36 h ist der Unterschied der Expression hochsignifikant. In beiden Gruppen findet sich das Expressionsmaximum von iNOS bei 6 h.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte an einem murinen Modell der polymikrobiellen Sepsis die Rolle des TLR-9 bei der Entstehung einer septischen Kardiomyopathie untersucht werden. Nach Validierung des Sepsis Modells wurde der zeitlich-dynamische Verlauf der myokardialen Inflammation anhand der Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine sowie der Regulation endogener DAMPs im Myokard von WT- und TLR-9 KO-Mäusen charakterisiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine Verstärkung der Immunantwort durch Adhäsion von Immunzellen am Endothel über ICAM-1 oder durch Freisetzung von NO aus den Kardiomyozyten nach Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase Einfluss auf die kardiale Funktion nehmen könnte. Die Expression verschiedener Toll-like-Rezeptoren, insbesondere TLR-2, TLR-4 und TLR-9, konnte auf Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Auch eine Bedeutung für die Pathogenese der septischen Kardiomyopathie wurde teilweise bereits gezeigt. (Baumgarten et al., 2006 ; Boyd et al., 2006b ; Knüfermann et al., 2002 ; Knüfermann et al., 2004 ; Lohner et al., 2013 ; Martin et al., 2017 ; Tomita et al., 2015 ; Zaky et al., 2014). TLRs auf Kardiomyozyten können im Rahmen der generellen Induktion des Immunsystems, wie sie bei einer Sepsis auftritt, aktiviert werden und die Herzmuskelzellen ihrerseits Zytokine und andere Stoffe wie beispielsweise Stickoxid (NO) in das Blut abgeben. Herzgewebe kann so selbst eine septische Kardiomyopathie induzieren und unterhalten (Kumar a et al., 1999; Martin et al., 2017; Walley, 2018).

4.1 Validierung des Sepsis-Modells

Wie bereits in der Einleitung dargestellt gibt es verschiedene Methoden, um bei Mäusen eine polymikrobielle Sepsis zu erzeugen: das CLP-Modell, das CASP-Modell und das IPSI-Modell (Intraperitoneal Stool Injection). Jede der Methoden bietet sowohl Vorteile als auch Nachteile. Das CLP-Modell und das CASP-Modell sind invasive Methoden, bei denen nach Eröffnung des Bauchraums durch gezielte Perforation (CLP) oder Stent-Implantation (CASP) Darminhalt in die Bauchhöhle übertritt und es nachfolgend zu einer Peritonitis und polymikrobiellen Sepsis kommt. Der Schweregrad der induzierten Sepsis ist in beiden Modellen nur bedingt steuerbar, da es zur Verlegung sowohl der Perforationen im Appendix, als auch zu einem Stentverschluss bei den operierten Tieren kommen kann. Bei beiden Methoden muss die zusätzliche Aktivierung des Immunsystems

in Folge des OP-Traumas bei den nachfolgenden Analysen berücksichtigt werden. Eine weitere minimal invasive Methode, eine polymikrobielle Sepsis in der Maus zu erzeugen stellt das IPSI-Modell dar. Bei diesem Modell wird zuvor gewonnener und aufgearbeiteter Stuhl den Mäusen intraperitoneal wieder injiziert. Bei diesem Modell ist der Schweregrad der Sepsis sehr gut über die gewählten Verdünnungen des aufgearbeiteten Stuhls steuerbar. Es eignet sich besonders für die Induktion einer länger andauernden, subletalen Sepsis (Hilbert et al., 2017). Nachteil dieser Methode ist, dass obligat anaerobe Bakterien die Aufarbeitung nicht überleben und so die Zusammensetzung des injizierten Stuhls nicht genau der des ursprünglichen Darminhaltes entspricht.

Das in dieser Arbeit verwendete CASP-Modell wurde mit Hilfe eines vereinfachten, selbst entwickelten Krankheits-Scores sowie der quantitativen Bestimmung der Bakterienlast in der Bauchhöhle validiert. Der Score umfasst die Parameter Körperhaltung, Körperpflege, Bewegung und Sozialverhalten. Diese Parameter wurden beobachtet und mit Punkten von 1 bis 6 bewertet: von nicht erkennbar krank (1) bis postoperatives Versterben (6). Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von maximal 36h nach CASP-OP beobachtet. Erste deutliche Krankheitszeichen traten sowohl bei den WT- als auch bei den TLR-9 KO-Mäusen 6 Stunden postoperativ auf. Im weiteren Beobachtungszeitraum verstärkten sich die Krankheitszeichen. Ein deutlicher Unterschied zwischen WT- und TLR-9 KO-Mäusen war bis 6 Stunden nach CASP-OP nicht detektierbar. Nach 18, 24 Stunden und 36 Stunden waren sowohl die schwersten Krankheitszeichen als auch die Mortalitätsrate bei den WT-Mäusen deutlich ausgeprägter. Im Gegensatz zu anderen gebräuchlichen Krankheits-Scores (Morton und Griffiths, 1985), teils auf eine murine Sepsis zugeschnitten wie der während dieser Promotionsarbeit von einer anderen Arbeitsgruppe entwickelte „M-CLASS“ (mouse clinical assessment score for sepsis) von Huet et al. (2013) wurde in diesem selbst entwickelten Score weder das Körpergewicht noch die Körpertemperatur der Mäuse gemessen, weswegen zwei bei Mäusen objektiv messbare Krankheitszeichen nicht erfasst wurden. Unter Einbeziehung dieser Parameter wäre eine differenziertere Beurteilung des Krankheitsgrades möglich gewesen. Die Auswertung des Krankheits-Scores gab erste Hinweise darauf, dass die TLR-9 KO-Mäuse geringere Krankheitszeichen entwickeln und ein besseres Überleben zeigen als die WT-Mäuse. In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin untersucht, ob das verbesserte Überleben der TLR-9 defizienten Tiere mit einer Reduktion der Bakterienlast in der Peritoneallavage

korreliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Bakterienlast mit dem Krankheitsgrad der Tiere korreliert. Die WT-Mäuse zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum, mit Ausnahme des 24 Stunden Zeitpunktes, eine deutlich höhere Bakterienlast als die TLR-9 KO-Mäuse. Eine verbesserte Clearance der Bakterien in der Peritonealhöhle wäre ein denkbarer Grund für diese Beobachtung. In einer 2021 publizierten Studie wurden die Immunzellpopulationen in der Peritoneallavage nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis in Mäusen genauer charakterisiert. Der Anteil der Makrophagen war nach Induktion der Sepsis deutlich erhöht (Tilstam et al., 2021). Godshall und Kollegen (Godshall et al., 2003) konnten in einem CLP-Modell nachweisen, dass NK-Zellen in Kooperation mit Makrophagen eine wichtige Rolle für die bakterielle Clearance spielen, da in Mäusen, die NK-Zell depletiert waren, die Bakterienlast im Blut, in der Leber und in der Peritoneallavage signifikant erhöht war. Über die Verteilung der Immunzellpopulationen in der Peritoneallavage von TLR-9 KO-Mäusen nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis liegen keine detaillierten Informationen vor. Ob es in TLR-9 KO-Mäusen zu einer Veränderung der Immunzellpopulationen kommt, die zu einer verbesserten Bakterien-clearance und damit zu einer geringer ausgeprägten Sepsis führt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und bedarf weiterführender Untersuchungen beispielsweise mittels Durchflusszytometrie.

4.2. Charakterisierung der kardialen inflammatorischen Antwort in der polymikrobiellen Sepsis

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde untersucht, ob das Fehlen des TLR-9 einen Einfluss auf die inflammatorische Antwort des Myokards in der polymikrobiellen Sepsis hat. Aus dem Herzgewebe von WT- und TLR-9 KO-Mäusen wurde 2, 6, 18, 24 und 36 Stunden nach Induktion der polymikrobiellen Sepsis die mRNA extrahiert und mittels qRT-PCR die Expression der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-10, des endogenen DAMP HMGB-1, der iNOS als mit ihren Produkten direkt auf das kardiovaskuläre System Einfluss nehmenden Enzyms sowie des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 quantifiziert.

Eine deutliche Hochregulation der Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α gegenüber der Sham-Kontrolle war über den gesamten Beobachtungszeitraum sowohl bei den WT- als auch bei den TLR-9 KO-Mäusen nachweisbar. Während sich in der TNF- α Expression kein signifikanter Unterschied

zwischen den Genotypen nachweisen ließ, war die IL-1 β Expression bei den TLR-9 KO-Mäusen durchgehend niedriger als bei den WT-Mäusen. In der frühen Sepsis Phase war dieser Unterschied signifikant, was darauf hindeutet, dass es bei den TLR-9 KO-Mäusen zu einer verminderten inflammatorischen Antwort nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis kommt. Daten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die gezielte Stimulation von TLR-9 zu einer kardialen Entzündung führt und dass die Hemmung von TLR-9 die kardiale Dysfunktion verhindern kann (Lohner et al., 2013; Boehm, et al., 2013). Diese Beobachtung decken sich mit publizierten Daten von Fattahi und Mitarbeitern (Fattahi et al., 2018), die zeigen konnten, dass sowohl eine TLR-9 als auch eine TLR-3 Defizienz die Entstehung einer kardialen Dysfunktion in Folge einer Sepsis reduziert. Von Busch und Mitarbeitern konnte nachgewiesen werden, dass die Hemmung von IL-1 β einen Schutz vor der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie darstellt (Busch et al., 2021). Unveröffentlichte Daten von Mitarbeitern der eigenen Arbeitsgruppe (Mohsen und Eichhorn) zeigen ebenfalls die Bedeutung von IL-1 β für die Entstehung einer kardialen Dysfunktion. IL-1 β KO-Mäuse zeigten nach einem experimentellen Myokardinfarkt im Vergleich zu WT-Mäusen eine signifikant bessere Kontraktilität und eine signifikant höhere Ejektionsfraktion. Die Reduktion der IL-1 β Expression und Freisetzung in den TLR-9 KO-Mäusen könnte somit die Entwicklung einer septischen Kardiomyopathie verhindern. Aus den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten kann die verminderte IL-1 β Expression positiv mit der reduzierten Mortalität der TLR-9 KO-Mäuse korreliert werden.

Ein besonders auffälliger Unterschied zwischen WT- und TLR-9 KO-Mäusen war bei der Analyse von IL-6 detektierbar. Während bei den WT-Mäusen ein deutlicher Anstieg der IL-6 mRNA erst nach 6 Stunden zu erkennen war, zeigte sich bei den TLR-9 KO-Mäusen bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt nach 2 Stunden ein Anstieg der Expression gegenüber den Sham Tieren. Insgesamt zeigte sich eine teils signifikant höhere Expression bei 2 Stunden und bei 18 Stunden von IL-6 bei den TLR-9 KO-Tieren gegenüber der WT-Gruppe. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Funktionen haben kann. IL-6 kann sowohl an einen löslichen als auch an einen membranständigen Rezeptor binden. Letzterer findet sich auf Lymphozyten oder Hepatozyten. Nach Bindung an den Rezeptor kann es zu einer Rekrutierung und weiteren Aktivierung und Differenzierung von

Immunzellen kommen sowie zu einer Hochregulation von Akut-Phase-Proteinen (Heinrich et al., 2003). In verschiedenen klinischen Studien wurde IL-6 als negativ prognostischer Faktor für die Entwicklung einer kardialen Dysfunktion identifiziert (Danesh et al., 2008). Hanna und Frangogiannis beschreiben in einem 2020 publizierten Übersichtsartikel sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte von IL-6 im Zusammenhang mit der Entstehung einer kardialen Dysfunktion. Die Autoren unterscheiden zwischen einem klassischen Signaling von IL-6, das auch anti-inflammatorische Signalwege induzieren kann und einem „Trans-Signaling“, dass eine Verstärkung der Inflammation sowie die Proliferation von Fibroblasten und Synthese von extrazellulärer Matrix aktiviert (Hanna und Frangogiannis, 2020). Ob die höhere IL-6 Expression, die im Myokard von TLR-9 KO-Mäusen gemessen wurde, einen hemmenden Effekt auf die Entwicklung der septischen Kardiomyopathie hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht final beantwortet werden. Weiterführende funktionale Untersuchungen der Kontraktilität der Kardiomyozyten oder der Ejektionsfraktion des Herzens im Hinblick auf dieses Zytokin könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

IL-10 wird allgemein als pleiotropes, immunmodulatorisches und anti-inflammatorisches Zytokin gewertet (Ng et al., 2013). Die IL-10 Expression war sowohl bei den WT- als auch bei den TLR-9 KO-Mäusen nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis hochreguliert. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen zeigte sich zu dem frühen Zeitpunkt 6 h, wo die WT-Gruppe eine signifikant erhöhte Expression gegenüber der TLR-9 KO-Gruppe aufweist. Das Expressionsmaximum in beiden Gruppen unterscheidet sich aber wiederum kaum und liegt bei beiden Gruppen im späten Bereich von 36h. Die Bedeutung von IL-10 im Rahmen einer kardialen Inflammation ist durch Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt. Nach Präkonditionierung mittels synthetischer CpG-Oligonukleotide, die zu einer Stimulation des TLR-9 führten, konnte durch die Hochregulation von IL-10 die „*ischemia/reperfusion injury*“ und die daraus resultierende kardiale Dysfunktion reduziert werden (Markowski et al., 2013). Hauptligand des TLR-9 ist bakterielle DNA, die bei einer polymikrobiellen Sepsis primär zu einer Stimulation des TLR-9 und sekundär zu einer verminderten Aktivierbarkeit des TLR-9 führt, was mit einem funktionalen KO gleichzusetzen ist. Die molekularen Mechanismen, die für diese reduzierte Aktivierbarkeit des TLR-9 verantwortlich sind, sind noch nicht gut verstanden, werden kontrovers diskutiert (Saber et al., 2022) und bedürfen weitere Untersuchungen.

Ob die reduzierte TLR-9 Stimulierbarkeit direkt oder indirekt zu einer Erniedrigung der IL-10 Expression beiträgt, muss ebenfalls in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

Die Freisetzung endogener DAMPs ist ein charakteristisches Merkmal von Gewebeuntergang und Zelltod in der Sepsis (Zhou et al., 2021). HMGB-1 ist das am besten untersuchte Mitglied der Familie der High Mobility Group Proteine (Liang und He, 2022) und kann nach Freisetzung an TLR-2, TLR-4 oder TLR-5 binden. Die nach Bindung an die TLRs induzierte Aktivierung von MyD88 führt zur Aktivierung von NF- κ B und der Expression inflammatorischer Zielgene. In dem in dieser Arbeit verwendeten Sepsismodell konnte eine signifikant erhöhte Expression des endogenen DAMPs HMGB-1 in TLR-9 KO-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Möglicherweise haben TLR-9 KO-Mäuse eine konstitutiv höhere Expression von HMGB-1. Für die Induktion des inflammatorischen Geschehens ist aber die Freisetzung des Proteins entscheidend, das im Rahmen dieser Arbeit aber nicht gemessen werden konnte. Es ist deshalb fraglich, ob die gezeigte, teils fast doppelt so hohe Expression der Genexpression von HMGB-1 eine biologische Relevanz im Rahmen der septischen Kardiomyopathie hat, da die in dieser Arbeit nachgewiesene erniedrigte Mortalität der TLR-9 KO-Tiere diesem Ergebnis zunächst nicht zu entsprechen scheint.

Für die Induktion und die Persistenz eines lokalen inflammatorischen Geschehens ist die Interaktion zwischen Endothel und Immunzellen von besonderer Bedeutung (Ait-Oufella et al., 2010). Die Rekrutierung von Immunzellen wird durch chemotaktische Zytokine initiiert, die von Immunzellen, Endothelzellen aber auch Kardiomyozyten sezerniert werden können. Zu diesen chemotaktischen Faktoren gehören auch IL-6 und HMGB-1 (Pittman und Kubes, 2013). Die Adhäsion der rekrutierten Zellen wird dann durch Adhäsionsmoleküle, die auf den Endothelzellen exprimiert werden, vermittelt. Diese Adhäsion der Immunzellen trägt wesentlich zu einer Verstärkung der lokalen Immunantwort bei (Joffre et al., 2020). Die Induktion einer polymikrobiellen Sepsis führte sowohl bei den WT- als auch bei den TLR-9 KO-Mäusen zu einer Erhöhung der Expression von ICAM-1. Unterschiede zwischen den Genotypen waren zu dem frühen Zeitpunkt 2 Stunden nachweisbar, wo sich eine höhere Expression bei den TLR-9 KO-Mäusen zeigte. Allerdings drehte sich dieses Verhältnis zu den späteren Zeitpunkten 18, 24 und 36 Stunden nach Induktion der Sepsis um und es zeigte sich eine konstant

zunehmende, bei 36 Stunden dann sogar eine mehr als 50 % reduzierte Expression von ICAM-1 der TLR-9 KO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen. Diese verminderte Expression von ICAM-1 zu den späteren Zeitpunkten könnte eine reduzierte Adhäsion von inflammations-fördernden Immunzellen zur Folge haben und damit zu einer Reduktion der septischen Kardiomyopathie in TLR-9 KO-Mäusen beitragen. Aus den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten kann die verminderte ICAM-1 Expression zu den späteren Zeitpunkten positiv mit der reduzierten Mortalität der TLR-9 KO-Mäuse korreliert werden.

Als ein weiterer für die Entstehung und Persistenz einer septischen Kardiomyopathie wesentlicher Faktor wurde molekulares NO identifiziert (Martin et al., 2019). Während niedrige NO-Konzentrationen, die von der endothelialen NO-Synthase kontinuierlich freigesetzt werden, eine wichtige Rolle bei der Regulation des physiologischen Gefäßtonus spielen, kann eine überschießenden NO-Freisetzung zu einer massiven Vasodilation und zu einer endothelialen Dysfunktion führen, die wiederum die kardiale Dysfunktion verstärkt. In Kardiomyozyten kann NO die Signaltransduktion, das sog. Calcium-cycling der Muskelzellen, und die mitochondriale Atmungskette beeinflussen. (Khan et al., 2003; Shawary und Lehmann, 2020). Für die Freisetzung großer NO-Mengen im Rahmen einer Sepsis ist die induzierbare NO-Synthase verantwortlich. Die Expression der induzierbaren NO-Synthase kann als Antwort auf verschiedene inflammatorische Mediatoren und TLR-Stimulation hochreguliert werden (Spiller et al., 2019). Nach Induktion der polymikrobiellen Sepsis konnte in der vorliegenden Arbeit in den TLR-9 KO-Mäusen eine größtenteils signifikant höhere Expression der iNOS nachgewiesen werden als in den septischen WT-Mäusen. Die WT-Mäuse zeigten auch gegenüber den Sham-Tieren nur eine geringe Induktion der iNOS Expression. Kumar und Kollegen konnten an Skelettmuskelzellen zeigen, dass eine pharmakologisch induzierte Erhöhung der NO-Spiegel die kontraktile Funktion der Zellen negativ beeinflusst (Kumar, et al., 2022). Vergleichbare Effekte konnten auch bei Kardiomyozyten beobachtet werden (L'Heureux, et al., 2020). Im Gegensatz zu diesen publizierten Ergebnissen, die NO eher eine schädliche Rolle zuschreiben, ist eine protektive Wirkung von NO bei den TLR-9 KO-Mäusen, die eine geringere Morbidität und Mortalität nach Induktion der polymikrobiellen Sepsis zeigten, denkbar. Beschrieben wurde in den oben zitierten Arbeiten aber auch eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit bezüglich protektiver bzw. schädlicher Effekte von

NO. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen könnte eine erhöhte NO-Freisetzung sich einerseits negativ auf die Adhäsion von Immunzellen am Endothel auswirken und so indirekt zu einer Verminderung der lokalen Inflammation beitragen. Andererseits könnte durch die NO-induzierte Vasodilatation die Nachlast des Herzens gesenkt werden und die Coronarien erweitert werden und so direkt wie indirekt die Sauerstoffversorgung des Myokards und nachfolgend die kardiale Funktion verbessert werden. Um diese Hypothese zu untermauern müssten immunhistologische Untersuchungen zur Präsenz von Immunzellen im Myokard und funktionale Untersuchungen zur Kontraktilität der Kardiomyozyten und der Coronardurchblutung im Hinblick auf unterschiedliche NO-Konzentrationen durchgeführt werden. Auch sonographische Flussmessungen im Bereich des linksventrikulären Ausflusstraktes wären vorstellbar.

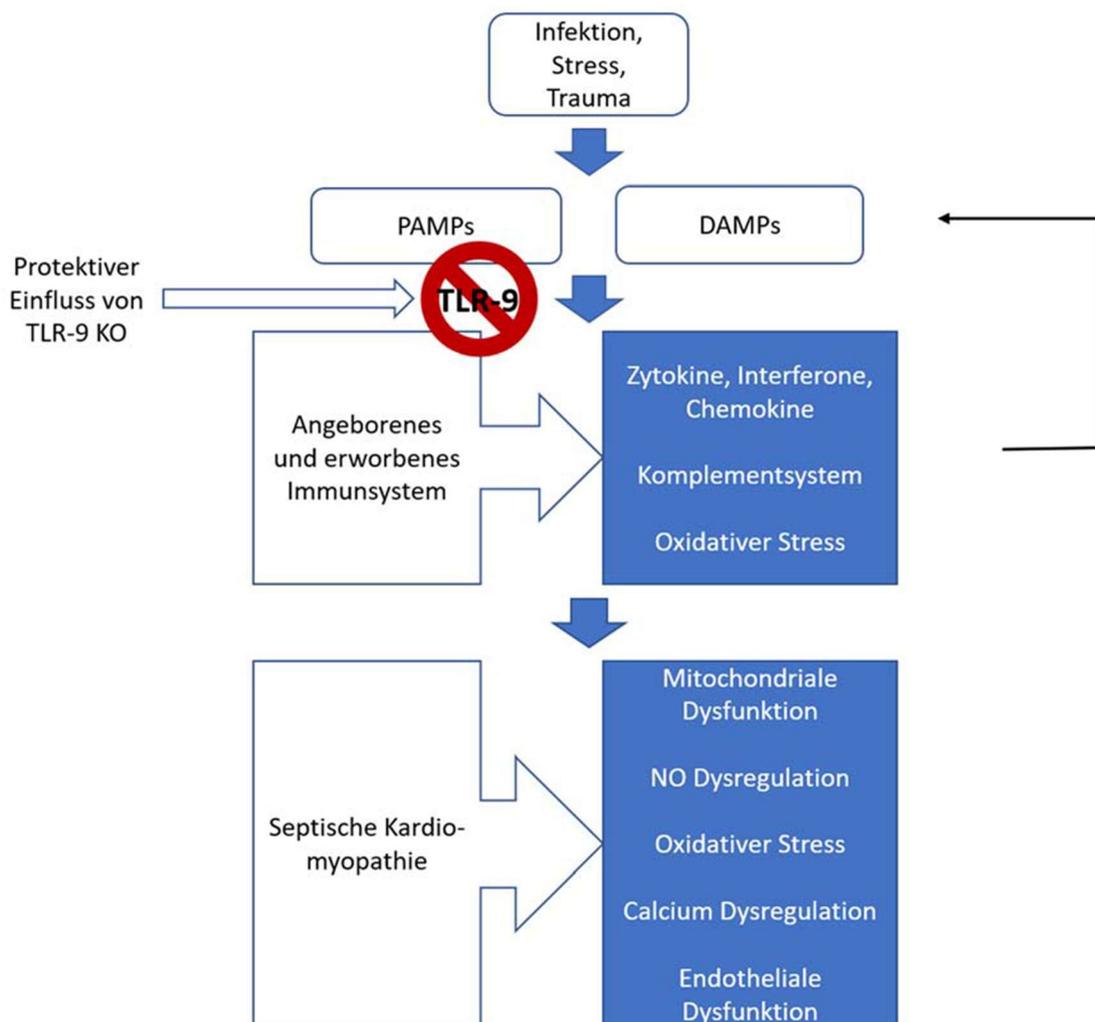


Abb. 26: Pathophysiologische Faktoren, die zur Entstehung der septischen Kardiomyopathie beitragen können. Schematisch dargestellt ist, an welcher Stelle sich die TLR-9 Defizienz protektiv auswirken könnte.

4.3 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des TLR-9 die inflammatorische Reaktion des Myokards in der polymikrobiellen Sepsis reduziert und dadurch zu einer Verminderung der septischen Kardiomyopathie beitragen kann. Versuche in der eigenen Arbeitsgruppe den TLR-9 pharmakologisch zu inhibieren führten zu einer Reduktion der kardialen Dysfunktion in einem murinen Herzinfarktmodell (Kim et al., 2014). Die Hemmung des TLR-9 könnte damit einen weiteren Baustein in der Prophylaxe und Therapie der septischen Kardiomyopathie darstellen.

5. Zusammenfassung

Die Sepsis ist nach dem Herzinfarkt und Tumorerkrankungen an dritter Stelle der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Bedingt durch unsere alternde Gesellschaft, der steigenden Zahl antibiotikaresistenter Keime und dem im Vergleich hierzu nur schleichenden Anstieg neuer Antibiotika wird die große Bedeutung der Sepsis auch für die Zukunft deutlich.

Bei einer anhaltenden oder fulminanten Infektion wie es bei einer Sepsis der Fall ist, kommt es zu einer Flut von Pathogenen im Organismus und zu einer überschießenden Immunantwort mit sogenanntem „Zytokinsturm“ und nachfolgender Organdysfunktion. Teile der Pathophysiologie hiervon sind gut untersucht und bekannt, aufgrund der Komplexität und der Vielzahl beteiligter Proteine, Zytokine und Rezeptoren aber zum Teil mit noch unbekanntem Wirkmechanismen. Neben Krankheitserregern und ihren Bestandteilen, als sogenannte PAMPs bezeichnet, können auch nicht-infektiöse Prozesse das angeborene Immunsystem durch sogenannte DAMPs über verschiedene PRRs aktivieren.

Auch die Herzfunktion kann im Rahmen einer Sepsis eingeschränkt sein, was als „septische Kardiomyopathie“ bezeichnet wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass

verschiedene Zytokine die Kontraktionskraft von Herzmuskelzellen vermindern. Adaptermoleküle wie beispielsweise ICAM-1 sind wiederum maßgeblich an der Migration von Immunzellen in entzündliche Gewebe beteiligt.

Mögliche Wege der Signaltransduktion laufen hierbei über die große Familie der TLRs. Nach deren Aktivierung werden Zytokine, Chemokine und Interferone zur Eindämmung und Elimination der Pathogene synthetisiert, welche ihrerseits auch wieder über verschiedene Rezeptoren, unter anderem die TLRs, Einfluss auf die Immunantwort haben. Ein TLR, welcher auch auf Herzmuskelzellen zu finden ist und nachweislichen Einfluss auf die Herzfunktion hat, ist der TLR-9.

Durch die Analyse der Expression inflammatorischer Zytokine von Herzmuskelzellen sollte versucht werden Faktoren zu identifizieren, die an der Entwicklung und Persistenz der septischen Kardiomyopathie beteiligt sind. Aus der Charakterisierung der Kinetik der inflammatorischen Reaktion des Herzmuskelgewebes während der polymikrobiellen Sepsis können möglicherweise Zeitpunkte für therapeutische Interventionen wie Hemmung oder Neutralisierung von bestimmten Zytokinen abgeleitet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass TLR-9 defiziente Mäuse einen Mortalitäts- und Morbiditätsvorteil gegenüber den WT-Mäusen bei einer CASP-induzierten polymikrobiellen Sepsis zu haben scheinen und zu den unterschiedlichen Zeitpunkten teils signifikant unterschiedliche Zytokinlevel gegenüber den nicht-genveränderten Mäusen aufwiesen. Dies könnte Ansatzpunkt weiterer Forschungen sein, in denen der TLR-9 weitergehend als therapeutischer Ansatz zur Bekämpfung der septischen Kardiomyopathie dient.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des TLR Signalwegs über die Aktivierung intracellulärer Rezeptoren, hier am Beispiel des beschriebenen TLR-9 oder membranständiger TLR mit extracellulärer Bindungsdomäne. Signaltransduktion über MyD88 bis hin zum Transkriptionsfaktor NF- κ B und der Transkription inflammatorischer Zytokine und Interferone. Seite 18

Abbildung 2: Darstellung des Zeitverlaufes von WT und TLR-9 KO-Tieren nach OP bis zur Organentnahme am Beispiel des 18 h Zeitpunktes zur Organentnahme und Peritoneallavage post operationem. Untersuchte Zeitpunkte sind 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h. Seite 30

Abbildung 3: links: Vorbereiteter OP-Platz mit Anästhesiebox, OP-Tisch und Instrumenten Seite 32

Abbildung 4: rechts: Vapor und Volumeter. Seite 32

Abbildung 5: Für die CASP-/Sham-OP fixierte Maus; die Temperatursonde muss noch eingelegt, das Fell im Operationsbereich entfernt und die Haut desinfiziert werden. Seite 33

Abbildung 6: CASP OP-Schritte: links mediane Längslaparotomie. Seite 34

Abbildung 7: CASP OP-Schritte: rechts Stentplatzierung ca. 1,5 cm aboral der Mündung des Ileums. Seite 34

Abbildung 8: CASP OP-Schritte: links dargestellt der eingebrachte und fixierte Colonestent. Seite 35

Abbildung 9: CASP OP-Schritte: rechts mehrschichtiger Bauchdeckenverschluss mit Einzelknopfnähten. Seite 35

Abbildung 10: Agarose Gelelektrophorese von WT und homozygoten TLR-9 defizienten Mäusen. Mit * sind die Taschen der Standardbasenleiter gekennzeichnet, mit # die Taschen der Kontrollen. Die Zahlen 1 bis 10 an den restlichen Taschen enthalten Proben

von verschiedenen Mäusen. Bei WT entsteht keine Bande bei 1200 bp, bei TLR-9 KO-Tieren ist dort eine Bande. Seite 41

Abbildung 11: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte von der Gewebehomogenisierung der extrahierten Herzen bis zur cDNA Synthese der Zielgene. Seite 44

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte der RT-PCR. Seite 45

Abbildung 13: Krankheitsgrad von 1 – 6 nach modifiziertem, eigenem Schema der WT- und TLR-9 defizienten Mäuse 2 h nach CASP oder Sham-OP. Dargestellt ist der Anteil der WT- oder TLR-9 defizienten Mäuse mit einem entsprechenden Krankheitsgrad 2 h nach OP in Prozent der Gesamtzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe. Über den prozentualen Säulen steht die absolute n-Zahl der Tiere der jeweiligen Gruppe. Zum Vergleich wurde der Krankheitsgrad der Sham-operierten Tiere erfasst. Seite 54

Abbildung 14: Krankheitsgrad von 1 – 6 nach modifiziertem, eigenem Schema der WT- und TLR-9 defizienten Mäusen 6 h nach CASP oder Sham-OP. Dargestellt ist der Anteil der WT- oder TLR-9 defizienten Mäuse mit einem entsprechenden Krankheitsgrad 6 h nach OP in Prozent der Gesamtzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe. Über den prozentualen Säulen steht die absolute n-Zahl der Tiere der jeweiligen Gruppe. Zum Vergleich wurde der Krankheitsgrad der Sham-operierten Tiere erfasst. Seite 55

Abbildung 15: Krankheitsgrad von 1 – 6 nach modifiziertem, eigenem Schema der WT- und TLR-9 defizienten Mäuse 18 h nach CASP oder Sham-OP. Dargestellt ist der Anteil der WT- oder TLR-9 defizienten Mäuse mit einem entsprechenden Krankheitsgrad 18 h nach OP in Prozent der Gesamtzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe. Über den prozentualen Säulen steht die absolute n-Zahl der Tiere der jeweiligen Gruppe. Zum Vergleich wurde der Krankheitsgrad der Sham-operierten Tiere erfasst. Seite 56

Abbildung 16: Krankheitsgrad von 1 – 6 nach modifiziertem, eigenem Schema der WT- und TLR-9 defizienten Mäuse 24 h nach CASP oder Sham-OP. Dargestellt ist der Anteil der WT- oder TLR-9 defizienten Mäuse mit einem entsprechenden Krankheitsgrad 24 h nach OP in Prozent der Gesamtzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe. Über den

prozentualen Säulen steht die absolute n-Zahl der Tiere der jeweiligen Gruppe. Zum Vergleich wurde der Krankheitsgrad der Sham-operierten Tiere erfasst. Seite 57

Abbildung 17: Krankheitsgrad von 1 – 6 nach modifiziertem, eigenem Schema der WT- und TLR-9 defizienten Mäuse 36 h nach CASP oder Sham-OP. Dargestellt ist der Anteil der WT- oder TLR-9 defizienten Mäuse mit einem entsprechenden Krankheitsgrad 36 h nach OP in Prozent der Gesamtzahl der Tiere in der jeweiligen Gruppe. Über den prozentualen Säulen steht die absolute n-Zahl der Tiere der jeweiligen Gruppe. Zum Vergleich wurde der Krankheitsgrad der Sham-operierten Tiere erfasst. Seite 58

Abbildung 18: Bakterienlast in der Peritoneallavage von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. Dargestellt sind die ausgezählten CFUs aus der Peritoneallavage von Sham-operierten (n=33) sowie CASP-operierten WT- (n=155) und TLR-9 defizienten (n=77) Mäusen. Über den jeweiligen Graphen stehen die absoluten n-Zahlen der jeweiligen Gruppe Seite 60

Abbildung 19: TNF- α Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test. Seite 62

Abbildung 20: IL-1 β Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test. Seite 63

Abbildung 21: IL-6 Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen

Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test, * $P < 0,05$. Seite 64

Abbildung 22: IL-10 Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test, * $P < 0,05$. Seite 65

Abbildung 23: HMGB-1 Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test, **** $P < 0,0001$ und * $P < 0,05$. Seite 67

Abbildung 24: ICAM-1 Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test. Seite 68

Abbildung 25: iNOS Expression im Herzgewebe von Sham- und CASP-operierten WT- und TLR-9 defizienten Mäusen. 2 h, 6 h, 18 h, 24 h und 36 h nach OP wurden die Herzen entnommen und die Gesamt-RNA aus dem Herzmuskelgewebe isoliert, die Quantifizierung der Expression wurde mittels qPCR durchgeführt. Über den jeweiligen Balken der Gruppen stehen die absoluten n-Zahlen der Tiere. Dargestellt sind Mittelwert +/- SEM, unpaired t-Test, **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ und * $P < 0,05$. Seite 69

Abbildung 26: Pathophysiologische Faktoren, die zur Entstehung der septischen Kardiomyopathie beitragen können. Schematisch dargestellt ist, an welcher Stelle sich die TLR-9 Defizienz protektiv auswirken könnte. Seite 77

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: notwendige zu operierende Tiere	Seite 30
Tabelle 2: nicht operierte Kontrolltiere	Seite 30
Tabelle 3: Krankheitsscoring der operierten Mäuse	Seite 36
Tabelle 4: Die Peritoneallavage von 2 h Tieren wurde unverdünnt und 1:10 verdünnt ausplattiert, die von 6 h Tieren 1:10 und 1:100 verdünnt ausplattiert, die von 18 h- und 24 h Tieren wurde als 1:1.000 und 1:10.000 verdünnt ausplattiert und die von 36 h Tieren als 1:10.000 und 1:100.000 verdünnt ausplattiert.	Seite 39
Tabelle 5: Liste der verwendeten qRT-PCR Primer zur Detektion der jeweiligen Zielgene.	Seite 46
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.	Seite 49
Tabelle 7: Geräte	Seite 51
Tabelle 8: Reagenzien	Seite 51

8. Literaturverzeichnis

Adamzik M, Rahmel T. Sepsis 2018 - die aktuelle Leitlinie. Refresher Course Aktuelles Wissen für Anästhesisten, Deutsche Akademie für Anästhesiologische Fortbildung 2019; 45: 1-6

Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med* 2010; 36: 1286-1298

Agier J, Pastwińska J, Brzezińska-Blaszczyk E. An overview of mast cell pattern recognition receptors. *Inflamm Res* 2018; 67: 737-746

Akira S. Bacterial infections and toll-like receptors. *Kekkaku*. 2001 Aug; 76: 593-600

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1313

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

Baumgarten G, Knüfermann P, Kalra D, Gao F, Taffet GE, Michael L, Blackshear PJ, Carballo E, Sivasubramanian N, Mann DL. Load-dependent and -independent regulation of proinflammatory cytokine and cytokine receptor gene expression in the adult mammalian heart. *Circulation* 2002; 105: 2192-2197

Baumgarten G, Knüfermann P, Schuhmacher G, Vervolgyi V, von Rappard J, Dreiner U, Fink K, Djoufack C, Hoeft A, Grohe C, Knowlton AA, Meyer R. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 2006b; 25: 43-49

Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez RE, Huang PL, Lima JAC, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 2002; 416: 337–340

Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? *Int J Mol Sci* 2018; 19: 2155. doi: 10.3390/ijms19082155. PMID: 30042333; PMCID: PMC6121377

Beutler B, Hoebe K, Georgel P, Tabeta K, Du X. Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. *Adv Exp Med Biol.* 2005; 560: 29-39

Boehm O, Markowski P, van der Giet M, Gielen V, Kokalova A, Brill C, Hoeft A, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. In vivo TLR9 inhibition attenuates CpG-induced myocardial dysfunction. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 217297. doi: 10.1155/2013/217297. Epub 2013 Apr 10. PMID: 23690658; PMCID: PMC3649709.

Boyd JH, Divangahi M, Yahiaoui L, Gvozdic D, Qureshi S, Petrof BJ. Toll-like receptors differentially regulate CC and CXC chemokines in skeletal muscle via NF-kappaB and calcineurin. *Infect Immun.* 2006a; 74: 6829-6838

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

Brunkhorst FM. Epidemiology, economy and practice - results of the German study on prevalence by the competence network sepsis. *AINS* 2006; 41: 43-44

Brunkhorst FM, Weigand MA, Pletz M, Gastmeier P, Lemmen SW, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weyland A, Marx G, Bucher M, Gerlach H, Salzberger B, Grabein B, Welte T, Werdan K, Kluge S, Bone HG, Putensen C, Rossaint R, Quintel M, Spies C, Weiß B, John S, Oppert M, Jörres A, Brenner T, Elke G, Gründling M, Mayer K, Weimann A, Felbinger TW, Axer H & Deutsche Sepsis Gesellschaft e. V. . S3-Leitlinie Sepsis 2018: Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge – Zusammenfassung starker Empfehlungen. *Anästh Intensivmed* 2020; 61: 178–188

Busch K, Kny M, Huang N, Klassert TE, Stock M, Hahn A, Graeger S, Todiras M, Schmidt S, Chamling B, Willenbrock M, Groß S, Biedenweg D, Heuser A, Scheidereit C, Butter C, Felix SB, Otto O, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Inhibition of the NLRP3/IL-1 β axis protects against sepsis-induced cardiomyopathy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2021; 12: 1653-1668

Carbajal-Guerrero J, Cayuela-Dominguez A, Fernandez-Garcia E, Aldabo-Pallas T, Marquez-Vacaro JA, Ortiz-Leyba C, Garnacho-Montero J. Epidemiology and longterm outcome of sepsis in elderly patients. *Med Intensiva* 2014; 38: 21-32

Celes MR, Prado CM, Rossi MA. Sepsis: going to the heart of the matter. *Pathobiology* 2013; 80: 70-86

Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, Horwood N, Nanchahal J. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest.* 2012 Aug; 122: 2711-2719

Cimolai MC, Alvarez S, Bode C und Bugger H. Mitochondrial Mechanisms in Septic Cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Sci* 2015; 16: 17763-17778

Clancy DJ, Slama M, Huang S, Scully T, McLean AS und Orde SR. Detecting impaired myocardial relaxation in sepsis with a novel tissue Doppler parameter (septal e'/s'). *Crit Care* 2017; 21: 175-184

Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, Yamamoto M, Takeuchi O, Itagaki S, Kumar N, Horii T, Akira S. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med.* 2005 Jan 3; 201: 19-25

Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, Wensley F, Higgins JP, Lennon L, Eiriksdottir G, Rumley A, Whincup PH, Lowe GD, Gudnason V. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Med* 2008; 5: e78. doi: 10.1371/journal.pmed.0050078. PMID: 18399716; PMCID: PMC2288623.

Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 2007; 35: 1244-1250

Ebelt H, Müller-Werdan U, Werdan K. Septische Kardiomyopathie. *Intensivmedizin* up2date 2011; 7: 121-133

Fattahi F, Russell MW, Malan EA, Parlett M, Abe E, Zetoune FS, Ward PA. Harmful Roles of TLR3 and TLR9 in Cardiac Dysfunction Developing during Polymicrobial Sepsis. *Biomed Res Int* 2018; 2018: 4302726. doi: 10.1155/2018/4302726. PMID: 30364002; PMCID: PMC6186377

Feihl F, Waeber B, Liaudet L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacol Therapeut* 2001; 91: 179-213

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-2095

Fleischmann C, Thomas–Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, Dennler U, Reinhart K. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis: An Analysis of Hospital Episode (DRG) Statistics in Germany from 2007 to 2013. *Deutsches Arzteblatt International* 2016; 113: 159–166

Godshall CJ, Scott MJ, Burch PT, Peyton JC, Cheadle WG. Natural Killer Cells Participate in Bacterial Clearance During Septic Peritonitis Through Interactions with Macrophages. *Shock* 2003; 19: 144-149

Graf J, Brunkhorst FM, Reinhart K. Sepsis – Langzeitfolgen und sozioökonomische Bedeutung. *Ärzteblatt Thüringen* 2007; 18: 423-426

Guo Q, Qu H, Zhang H, Zhong X. *Prunella vulgaris* L. Attenuates Experimental Autoimmune Thyroiditis by Inhibiting HMGB1/TLR9 Signaling. *Drug Des Devel Ther* 2021; 15: 4559–4574

Hagiwara S, Iwasaka H, Uchino T, und Noguchi T. High mobility group box 1 induces a negative inotropic effect on the left ventricle in an isolated rat heart model of septic shock: a pilot study. *Circ J* 2008; 72: 1012-1017

Hanna A und Frangogiannis NG. Inflammatory Cytokines and Chemokines as Therapeutic Targets in Heart Failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 2020; 34: 849-863

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374: 1-20

Heyland DK, Hopman W, Coe H, Tranmer J, Mccoll MA. Long-term health-related quality of life in survivors of sepsis Short Form 36: a valid and reliable measure of health-related quality of life. *Crit Care Med* 2000; 28: 3599-3605

Hilbert T, Steinhagen F, Senzig S, Cramer N, Bekeredjian-Ding I, Parcina M, Baumgarten G, Hoefft A, Stilla F, Boehm O, Klaschik S. Vendor effects on murine gut microbiota influence experimental abdominal sepsis. *Shock/Sepsis/Trauma/Critical Care* 2017; 211: 126-136

Hobai IA, Edgecomp J, LaBarge K, Colucci WS. Dysregulation of intracellular calcium transporters in animal models of sepsis induced cardiomyopathy. *Shock* 2015; 43: 3–15

Holtkamp C, Rahmel T. Laborchemische Parameter zur infektiologischen Diagnostik und Therapiesteuerung auf der Intensivstation. *A&I* 2021; 61: 501-512

Huet O, Ramsey D, Miljavec S, Jenney A, Aubron C, Aprico A, Stefanovic N, Balkau B, Head GA, de Haan JB, Chin-Dusting JP. Ensuring animal welfare while meeting scientific aims using a murine pneumonia model of septic shock. *Shock* 2013; 39: 488-494

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216

Janeway CA , Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. In: *Immunologie, Heidelberg - Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002; 5. Auflage: 36-45 und 70-93*

Joffre J, Hellman J, Ince C, Ait-Oufella H. Endothelial Responses in Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020; 202: 361-370

Kawaguchi S, Okada M. Cardiac Metabolism in Sepsis. *Metabolites* 2021; 11: 846. doi: 10.3390/metabo11120846. PMID: 34940604; PMCID: PMC8707959.

Khan SA, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, Fradley M, Shoukas AA, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ Res* 2003; 92: 1322-1329

Kim SC, Wu S, Fang X, Neumann J, Eichhorn L, Schleifer G, Boehm O, Meyer R, Frede S, Hoefft A, Baumgarten G, Knuefermann P. Postconditioning with a CpG containing oligodeoxynucleotide ameliorates myocardial infarction in a murine closed-chest model. *Life Sci.* 2014 Dec 5; 119: 1-8

Kirkeboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis-an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43: 275-288

Knüfermann 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

Knüfermann 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

Knüfermann P, Sakata Y, Baker JS, Huang CH, Sekiguchi K, Hardarson HS, Takeuchi O, Akira S, Vallejo JG. Toll-like receptor 2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation* 2004a; 110: 3693-3698

Knüfermann P, Vallejo J, Mann DL. The role of innate immune responses in the heart in health and disease. *Trends Cardiovasc Med* 2004b; 14: 1-7

Knüfermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Ehrentraut H, Rudiger M, Boehm O, Fink K, Dreiner U, Grohe C, Hoefft 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; 78: 26-35

Kumar V. Inflammasomes: Pandora`s box for Sepsis. *Journal of Inflammation Research* 2018; 11: 477-502

Kumar A, Brar R, Wang P, Dee L, Skorupa G, Khadour F, Schulz R, Parrillo JE. Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J Physiol* 1999; 276: 265-276

Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183: 949–958

Kumar R, Coggan AR, Ferreira LF. Nitric oxide and skeletal muscle contractile function. *Nitric Oxide* 2022; 122-123: 54-61

Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Critical Care Medicine* 2012; 40: 754–761

Lamkanfi M, Walle LV, Kanneganti TD. Deregulated inflammasome signaling in disease. *Immunol Rev* 2011; 243: 163-173

Landesberg G, Levin PD, Gilon D, Goodman S, Georgieva M, Weissman C, Jaffe AS, Sprung CL, Barak V. Myocardial dysfunction in severe sepsis and septic shock – no correlation with inflammatory cytokines in real-life clinical setting. *Crit Care Med* 2015; 43: 93–102

L`Heureux M, Sternberg M, Brath L, Turlington J, Kashiouris MG. Sepsis-Induced Cardiomyopathy: a Comprehensive Review. *Curr Cardiol Rep* 2020; 22: 35. doi: 10.1007/s11886-020-01277-2. PMID: 32377972; PMCID: PMC7222131

Lim KH, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5: a011247. doi: 10.1101/cshperspect.a011247. PMID: 23284045; PMCID: PMC3579400

Liang G, He Z. High Mobility Group Proteins in Sepsis. *Front Immunol* 2022; 13: 911152. doi: 10.3389/fimmu.2022.911152. PMID: 35720285; PMCID: PMC9202578

Lohner R, Schwederski M, Narath C, Klein J, Duerr GD, Torno A, Knüfermann P, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Boehm O. Toll-like receptor 9 promotes cardiac inflammation and heart failure during polymicrobial sepsis. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 261049–261013

Lotze TM und Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 331-342

Luzzaro F, Ortisi G, Larosa M, Drago M, Brigante G, Gesu G. Prevalence and epidemiology of microbial pathogens causing bloodstream infections: results of the OASIS multicenter study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69: 363-369

Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Hüser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, Heidecke CD. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock*. 2004; 21(6): 505-511

Markowski P, Boehm O, Goelz L, Haesner AL, Ehrentraut H, Bauerfeld K, Tran N, Zacharowski K, Weisheit C, Langhoff P, Schwederski M, Hilbert T, Klaschik S, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Knüfermann P. Pre-conditioning with synthetic CpG-oligonucleotides attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via IL-10 up-regulation. *Basic Res Cardiol*. 2013; 108(5): 376. doi: 10.1007/s00395-013-0376-7. Epub 2013 Aug 9. PMID: 23929312; PMCID: PMC3778842

Martin L, Derwall M, Al Zoubi S, Zechendorf E, Reuter DA, Thiemermann C, Schuerholz T. The Septic Heart: Current Understanding of Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Chest* 2019; 155: 427-437

Martin L, Derwall M, Thiemermann C, Schürholz T. Herz in der Sepsis Molekulare Mechanismen, Diagnose und Therapie der septischen Kardiomyopathie. *Anaesthesist* 2017; 66: 479–490

Matkovich SJ, Al Khiami B, Efimov IR, Evans S. Widespread down-regulation of cardiac mitochondrial and sarcomeric genes in patients with sepsis. *Crit Care Med* 2017; 45: 407–414

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA Jr. MyD88 is an adaptor protein in the Toll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; 2: 253-258

Mirtschink P, Stehr SN. Klassische Betrachtung der septischen Kardiomyopathie schärfen. *Anaesthesist* 2017; 66: 477–478

Morad EA, Rabie RA, Almalky MA, Gebriel MG. Evaluation of Procalcitonin, C-Reactive Protein, and Interleukin-6 as Early Markers for Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Int J Microbiol* 2020; 2020: 8889086. doi: 10.1155/2020/8889086. PMID: 33061986; PMCID: PMC7547329

Morton DB, Griffiths PH. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 1985; 116: 431-436

Müller-Werdan U, Schumann H, Loppnow H, Fuchs R, Darmer D, Stadler J, Holtz J, Werdan K. Endotoxin and tumor necrosis factor α exert a similar proinflammatory effect in neonatal rat cardiomyocytes, but have different cardiodepressant profiles. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1027-1036

Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol* 2013; 4: 129. doi: 10.3389/fimmu.2013.00129. PMID: 23755052; PMCID: PMC3668291

Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker PQ, Hoffman WD, Kuo GC, Banks SM, MacVittie TJ, Parrillo JE. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med*. 1989 Mar 1; 169: 823-832

Opal SM, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 1999; 27: 1608-1616

Opal SM, Laterre P-F, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira J, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M, Jauregui L, Krell K, Pachel J, Takahashi T, et al. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 2013; 309: 1154–1162

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001; 29: 2002-2007

Patricio P, Paiva JA und Borrego LM. Immune Response in Bacterial and Candida Sepsis. *European Journal of Microbiology and Immunology* 2019; 9: 105–113

Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of Toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 7370–7377

Pathan N, Hemingway CA, Alizadeh AA, Stephens AC, Boldrick JC, Oragui EE, McCabe C, Welch SB, Whitney A, O’Gara P, Nadel S, Relman DA, Harding SE, und Levin M. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet* 2004; 363: 203–209

Pittman K und Kubes P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J Innate Immun* 2013; 5: 315-323

Pulido JN, Afessa B, Masaki M, Yuasa T, Gillespie S, Herasevich V, Brown DR, Oh JK. Clinical Spectrum, Frequency, and Significance of Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic Shock. *Mayo Clin Proc* 2012; 87: 620-628

Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med* 2017; 45: 486-552

Riek M, Ginski A, Braune S. Biomarker der Inflammation. *Divi Jahrbuch 2018/2019*, Hrsg. Kluge S. Heringlake M, Schwab S, Muhle E, 2019; 33-43

Rolli J, Rosenblatt-Velin N, Li J, Loukili N, Levrant S, Pacher P, Waeber B, Feihl F, Ruchat P und Liaudet L. Bacterial Flagellin triggers cardiac innate immune responses and acute contractile dysfunction. *PLoS One* 2010; 5(9): e12687. doi: 10.1371/journal.pone.0012687. PMID: 20856884; PMCID: PMC2938352

Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; 10(2): a028415. doi: 10.1101/cshperspect.a028415. PMID: 28620096; PMCID: PMC5793756

Saber MM, Monir N, Awad AS, Elsherbiny ME, Zaki HF. TLR9: A friend or a foe. *Life Sci* 2022; 307: 120874. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120874. Epub 2022 Aug 10. PMID: 35963302

Saraiva M und O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 170-181

Schmoch T, Brenner T, Weigand MA: Neue internationale Sepsis-Leitlinien 2021 – Was ist neu – was bleibt gleich? *Anästh Intensivmed* 2022; 63: 123–128

Shawary N und Lehmann C. Molecular mechanisms by which iNOS uncoupling can induce cardiovascular dysfunction during sepsis: Role of posttranslational modifications (PTMs). *Life Sci* 2020; 255: 117821. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117821. Epub 2020 May 20. PMID: 32445759

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23; 315: 801-810

Spiller F, Formiga RO, Fernandes da Silva Coimbra J, Alves-Filho JC, Cunha TM, Cunha FQ. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. *Nitric Oxide*, 2019, 89: 32-40

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3516-3521

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology* 2003; 21: 335-376

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805–820

Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10(8): a028456. doi: 10.1101/cshperspect.a028456. PMID: 28778870; PMCID: PMC6071487

Tian J, Avalos A, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, Parroche P, Drabic S, Golenbock D, Sirois C, Hua J, An LL, Audoly L, La Rosa G, Bierhaus A, Naworth P, Marshak-Rothstein A, Crow MK, Fitzgerald KA, Latz E, Kiener PA, Coyle AJ. Toll-like receptor 9–dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 2007; 8: 487–496

Tilstam PV, Schulte W, Holowka T, Kim BS, Nouws J, Sauler S, Piecychna M, Pantouris G, Lolis E, Leng L, Bernhagen J, Fingerle-Rowson G, Bucala R. MIF but not MIF-2 recruits inflammatory macrophages in an experimental polymicrobial sepsis model. *J Clin Invest* 2021; 131(23): e127171. doi: 10.3390/ijms23094908. PMID: 35563296; PMCID: PMC9102975

Tomita K, Takashina M, Mizuno N, Sakata K, Hattori K, Imura J, Ohashi W, Hattori Y. Cardiac fibroblasts: contributory role in septic cardiac dysfunction. *J Surg Res* 2015; 193: 874–887

Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature* 2002; 420: 853-859

Traeger T, Koerner P, Kessler W, Cziupka K, Diedrich S, Busemann A, Heidecke CD, Maier S. Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp.* 2010 Dec 18; (46):2299. doi: 10.3791/2299. PMID: 21206468; PMCID: PMC3159662.

Vincent JL, Opal SM, MarshallJC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 2013; 381: 774-775

Walley KR. Sepsis-induced myocardial dysfunction. *Curr Opin Crit Care* 2018; 24: 292–299

Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock -- a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29: 189-201

- Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med* 2010; 38: 1276-1283
- Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J, Lu B, Chavan, S, Rosas-Ballina M, Al-Abed Y, Akira S, Bierhaus A, Erlandsson-Harris H, Andersson U and Tracey KJ. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 11942–11947
- Yang H, Tracey KJ. Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799: 149–156
- Zaky A, Deem S, Bendjelid K, Treggiari MM. Characterization of cardiac dysfunction in sepsis: an ongoing challenge. *Shock* 2014; 41: 12–24
- Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B, Heidecke CD, Pfeffer K. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun* 1998; 66: 2300- 2309
- Zhang C, Mo M, Ding W, Liu W, Yan D, Deng J, Luo X und Liu J. High-mobility group box 1 (HMGB1) impaired cardiac excitation-contraction coupling by enhancing the sarcoplasmic reticulum (SR) Ca (2+) leak through TLR4-ROS signaling in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2014; 74: 260–273
- Zhou M, Aziz M, Wang P. Damage-Associated Molecular Patterns As Double-Edged Swords in Sepsis. *Antioxid Redox Signal* 2021; 35: 1308-1323
- Zobel K, Martus P, Pletz MW, Ewig S, Prediger M, Welte T, Bühling F. Interleukin 6, lipopolysaccharide-binding protein and interleukin 10 in the prediction of risk and etiologic patterns in patients with community-acquired pneumonia: results from the German competence network CAPNETZ. *BMC Pulm Med* 2012; 12: 6. doi: 10.1186/1471-2466-12-6. PMID: 22348735; PMCID: PMC3311562

9. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Stilla Frede für die viele Unterstützung, ihre guten Ratschläge, aber vor allem auch für ihren Zuspruch und die Motivation, wo ich schon keine mehr hatte. Nicht nur ihre fachliche Hilfe bei Fragen und Problemen, vor allem der Glaube an mich und an diese Arbeit und ihre nie enden wollende Geduld bei meinen vielen Anläufen haben mir den Abschluss dieser Arbeit erst möglich gemacht.

Bei Herrn Prof. Dr. Pascal Knüfermann möchte ich mich für die Überlassung des Themas, seinem kompetenten Rat und konstruktive Kritik bei diesem Projekt bedanken.

Bei meinem Betreuer, Herrn Priv.-Doz. Dr. Olaf Boehm, möchte ich mich ebenfalls ganz besonders bedanken: sowohl für sein Vertrauen in meine Fähigkeiten, für die Unterstützung gerade auch bei dem Stipendiaten-Antrag für BONFOR als auch für die Freiheit, die er mir während des gesamten Forschungsprojektes gewährt hat.

Bei dem BONFOR Forschungsförderprogramm möchte ich mich herzlich für das mir gewährte SciMed-Promotionsstipendium und damit verbunden die Möglichkeit zur „Vollzeit-Forschung“ bedanken.

Dem gesamten Laborteam danke ich für seine freundliche Unterstützung und geduldiges Einarbeiten in die vielen, kleinen Schritte molekularbiologischen Arbeitens.

Dem Team und der Leitung des „Haus für Experimentelle Therapien“ danke ich für die Möglichkeit und Einarbeitung in Tierexperimentelles Arbeiten, konstruktive Kritik an meiner Arbeit und natürlich die gute Pflege der Labortiere.

Den Kollegen der Mikrobiologie danke ich für das freundliche zur Verfügung stellen Ihrer Brutschränke und für das entgegengebrachte Vertrauen.

Vor allen anderen aber danke ich meiner Frau Andrea für Ihre treue Unterstützung und Geduld mit mir, während Sie unsere drei tollen, kleinen Plagegeister so wundervoll umsorgt und mir den Rücken freigehalten hat!