

**Angeborene Immunität:
Bedeutung des Toll-Like Rezeptors 9
für die Entstehung der septischen Kardiomyopathie
durch bakterielle DNA**

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Markus Schwederski
aus Wittlich
Bonn, 2010

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

1. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Waldemar Kolanus
2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2011

Erscheinungsjahr: 2011

Meiner Familie und Freunden

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Definition der Sepsis	2
1.2 Epidemiologie der Sepsis	3
1.3 Septische Kardiomyopathie	4
1.4 Angeborenes Immunsystem und Toll-Like Rezeptoren	5
1.5 Toll-Like Rezeptor 9	9
1.6 Wirkung von bakterieller DNA als TLR9-Ligand	9
1.7 Toll/IL-1-Signaltransduktionsweges.....	11
1.8 Die Rolle von Toll-Like Rezeptoren im Myokard und deren klinische Relevanz	13
1.9 Arbeitshypothese	15
2. Materialien und Methoden	16
2.1 Angewandtes Tiermodell.....	16
2.2 Genotypisierung von transgenen Mäusen	17
2.3 Knochenmark-chimäre Mäuse	19
2.3.1 Isolation und Implantation von Knochenmarkszellen	20
2.3.2 Genotypisierung von Knochenmark-chimären Mäuse	21
2.4 Stimulationsprotokoll.....	23
2.5 Proteinbestimmung	24
2.6. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	24
2.6.1 Isolation nukleärer Proteinextrakte.....	24
2.6.2 Herstellung der Oligonukleotid-Sonde	26
2.6.3 Hybridisierung	27
2.6.4 Gelelektrophorese.....	27
2.7. Ribonuclease Protection Assay	29
2.7.1 Isolation von Gesamt-RNA	29
2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA	30
2.7.3 Synthese der Antisense-mRNA-Sonde	30
2.7.4 Hybridisierung	32
2.7.5 Gelelektrophorese.....	33
2.7.6 Auswertung	34
2.8 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	35
2.8.1 Synthese der komplementären DNA (cDNA)/Reverse Transkription	35
2.8.2 Analyse der Genexpression	36

2.8.3 Auswertung	37
2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	37
2.9.1 Proteinisolation aus Gewebe für die ELISA-Messung.....	38
2.9.2 Bestimmung der Zytokin-Konzentration im Gewebe	39
2.10. Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum mittels „Multiplex Cytokine Assay“	40
2.11 Western Blot.....	41
2.11.1 Proteinisolation für den Western Blot	41
2.11.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.11 Expression der induzierten Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS).....	47
2.11.1 Messung der mRNA-Expression von iNOS.....	47
2.13 Nachweis von CpG-ODN im kardialen Gewebe mittels Durchflusszytometrie	48
2.14 Immunohistochemie.....	50
2.14.1 Immunohistochemie von einzelnen Kardiomyozyten	50
2.14.1.1 Isolation linksventrikulärer Kardiomyozyten	50
2.14.1.2 <i>Ex vivo</i> Stimulation und Histologie von Kardiomyozyten.....	54
2.14.2 Histologischer Nachweis der CpG-ODN-Aufnahme im Herzen	54
2.15 Hämodynamik der linksventrikulären Funktion	56
3. Ergebnisse.....	58
3.1 Die Bedeutung von TLR9 für die Entstehung einer septischen Kardiomyopathie	58
3.2 Allgemeiner Gesundheitszustand der Mäuse nach Applikation von bakterieller DNA..	58
3.3 Expression von TLR9 im kardialen Gewebe	59
3.4 Aufnahme von CpG-Oligonukleotiden in isolierten Kardiomyozyten	60
3.5 Aufnahme von CpG-Oligonukleotiden im kardialen Gewebe	61
3.6 Hämodynamische Untersuchungen an WT-Mäusen nach Applikation von CpG-Oligonukleotiden	62
3.7 Aktivierung von Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAP-Kinasen).....	63
3.8 Aktivierung des Nukleären Faktors κ B	64
3.9 Expression pro-inflammatorischer Zytokine	66
3.10 Spezifität des Liganden im vorliegenden Sepsis-Modell.....	70
3.11 Nachweis pro-inflammatorischer Zytokine im Serum	71
3.12 Expression der induzierbaren Form der Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS)	73
3.13 Nachweis der Aufnahme von CpG-ODN im kardialen Gewebe mittels Durchflusszytometrie	74
3.14 Einfluss von CpG-ODN auf Knochenmark-chimäre Mäuse	78
4. Diskussion	81

4.1 Der Einfluss von CpG-ODN auf die kardiale TLR9-Expression.....	82
4.2 Initiation eines TLR9-vermittelten Signaltransduktionsweges mit CpG-ODN.....	84
4.3 Expression pro-inflammatorischer Zytokine im kardialen Gewebe nach Applikation von CpG-ODN	85
4.4 TLR9 und Herzfunktion	89
4.5 Beurteilung des vorliegenden Sepsis-Modells und Möglichkeiten für einen Therapie-Ansatz zur Inhibition von kardialem TLR9.....	92
5. Zusammenfassung	94
6. Literaturverzeichnis.....	95
7. Veröffentlichungen	111
8. Eidesstattliche Erklärung	114
9. Danksagung.....	115
10. Lebenslauf	116

Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
ATP	Adenosintriphosphat
AK	Antikörper
AP-1	Aktivatorprotein-1
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
BAL	bronchoalveolaren Lavage
bp	Basenpaare
BCA	Bichinonsäure
bio	Biotin bzw. biotinyliert
BMDDC	„bone marrow derived dendritic cells“
BSA	„bovine serum albumin“, Rinder-Serumalbumin
CC	„cold chase“
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CER	„cytosplasmic extraction reagent“
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
DAP	„diastolic aortic pressure“
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DC	dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-GalN	D-Galactosaminhydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleinsäuretriphosphate
dsRNA	„double-stranded RNA“ bzw. Doppelstrang-RNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDVI	enddiastolischer Volumen Index
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“

EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“
ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinasen 1 und 2
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
FCS	„fetal calf serum“, fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GTC	Guanidinthiocyanat
Gy	Gray (Energiedosis)
HRP	„horseradish peroxidase“, Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IKK	„inhibitory κ B kinase“
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase
i.p.	intraperitoneal
IRAK	„interleukin-1-receptor-associated kinase“
i.v.	intravenös
JNK	„c-Jun-N-terminal kinase“
L32	Ribosomales Protein L32
LINE-1	„long interspersed nuclear element 1“ Retrotransposons
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
LV	Linksventrikulär
MAP	„mean aortic pressure“
MAP-Kinase	Mitogen aktivierende Protein-Kinase
Mbq	Mega-Becquerel (Aktivität eines radioaktiven Stoffes)
MDS	„myocardial depressant substance“
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MKK6	Mitogen aktivierenden Protein-Kinase-Kinase-6
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule (Druckeinheit: 1 bar = 750 mmHg)
MODS	„multiple organ dysfunction syndrom“
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure

MRSA	„Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> “
μCi	Mikro-Curie (Aktivität eines radioaktiven Stoffes)
MyD88	„myloid differentiation marker 88“
NER	„nuclear extraction reagent“
NFκB	nukleärer Transkriptionsfaktor κB
NIK	NFκB „inducing kinase“
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NLS	„nucleus localisation signal“, Kernlokalisierungssignal
NO	Stickstoffmonoxid
NP-40	Nonidet P-40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
p38	Protein 38
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	„pathogen associated microbial pattern“
PBND	PCR Buffer with Nonionic Detergents
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	„pattern recognition receptor“
qRT-PCR	quantitative „Real Time“-Polymerasekettenreaktion
RNase	Ribonuklease
RPA	„ribonuclease protection assay“
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SA	Streptavidin
SAP	„systolic aortic pressure“
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRS	„systemic inflammatory response syndrom“
SMT	S-Methylthioharnstoff
ssRNA	„single-stranded RNA“ bzw. Einzelstrang-RNA
TAK1	TGFβ-aktivierte Kinase 1
TBE	Standardpuffer aus Triethylaminhydrochlorid, Borat und

	EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TGF β	„transforming growth factor β “
TIR-Domäne	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR9	Toll-Like Rezeptor 9
TLR9-D	TLR9-defizient, „knock-out“
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAF6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor-6
tRNA	Transfer-Ribonkleinsäure
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uraciltriphosphat
Vs	Versus
Vol-%	Volumenprozent
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Rolle der angeborenen Immunantwort („innate immunity“) bei der Entstehung einer septischen Kardiomyopathie, die durch bakterielle DNA bzw. synthetische Oligonukleotide induziert wird. Die Sepsis stellt trotz therapeutischer Fortschritte ein wichtiges Gesundheitsproblem der westlichen Welt dar. Sie ist Haupttodesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen mit einer Mortalitätsrate von 20 bis 80% bei schwer erkrankten Patienten (Rangel-Frausto et al., 1995; Wheeler und Bernard, 1999). In den Vereinigten Staaten ist die Anzahl der Patienten, die an einer Sepsis erkranken, von etwa 160.000 im Jahr 1979 auf 700.000 im Jahr 2000 angestiegen (Martin et al., 2003). Dies entspricht einem jährlichen Anstieg von 13,7%. Aktuelle Daten weisen daraufhin, dass in Deutschland jedes Jahr über 150.000 Patienten an einer Sepsis leiden (Brunkhorst, 2006). Die kardiovaskuläre Dysfunktion ist ein ernstzunehmendes Problem, die bei etwa 40% der Sepsis-Patienten auftritt (Parker et al., 1984), und die Mortalität auf 20 bis 80% erhöht (Parrillo et al., 1990).

In experimentellen Sepsis-Modellen konnte gezeigt werden, dass die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin (IL)-1 β in Herzen erhöht sind (Giroir et al., 1992; Kapadia et al., 1995). Es gibt Hinweise, dass diese Zytokine während einer humanen Sepsis an der Entstehung einer kardialen Dysfunktion beteiligt sind (Kumar et al., 1996; Cain et al., 1999). Ein weiteres Indiz ist die kardiale Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) (Ullrich et al., 2000), welches die Pumpfunktion des Herzens verringert. Die Mechanismen, die zur Entstehung des Krankheitsbildes der septischen Kardiomyopathie führen, sind noch nicht vollständig verstanden. Es ist bekannt, dass neben Bakterien bzw. Zellwandbestandteilen auch bakterielle DNA sowie synthetische Oligonukleotide in der Lage sind, die Produktion von Zytokinen zu induzieren und eine Entzündungsreaktion bis hin zum septischen Schock hervorzurufen (Kopp und Medzhitov, 1999).

In diesem Zusammenhang ist die Beschreibung der Toll-Like Rezeptoren (TLRs) von Bedeutung. Bisher wurden 13 TLRs beschrieben, von denen TLR2 und TLR4 am besten charakterisiert sind (Akira et al., 2006; Kawai und Akira, 2006). Bei der Entstehung einer linksventrikulären Dysfunktion, die durch Lipopolysaccharide (LPS) induziert wird, sind TNF- α , IL-1 β und NO im Herzen erhöht (Baumgarten et al., 2001; Knuefermann et al., 2002; Baumgarten et al., 2006). Mäuse, die eine Defizienz für TLR4 oder CD14 aufwiesen, waren gegen die Applikation von LPS geschützt (Knuefermann et al., 2002; Nemoto et al., 2002). TLR9 wird ebenfalls im Myokard exprimiert und erkennt bakterielle DNA sowie

synthetische CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) (Hemmi et al., 2000; Zarembler und Godowski, 2002, Rodriguez-Martinez et al., 2005). In dieser Arbeit wurde an Wildtyp- (WT) und TLR9-defizienten (TLR9-D) Mäusen nach Stimulation mit CpG-ODN die Rolle von myokardialem TLR9 an der Entstehung einer septischen Kardiomyopathie untersucht. Die Charakterisierung von TLR9 im Herzen als Rezeptor für bakterielle DNA soll zu einem besseren Verständnis der septischen Kardiomyopathie beitragen und die Entwicklung alternativer therapeutischer Ansätze ermöglichen.

1.1 Definition der Sepsis

Im Jahre 1991 wurde auf einer Konsensuskonferenz aus Vertretern der „American College of Chest Physicians“ (ACCP) und der „Society of Critical Care Medicine“ (SCCM) der Begriff „systemic inflammatory response syndrom“ (SIRS) eingeführt. Die Krankheitsbilder SIRS und Sepsis wurden in der Humanmedizin wie folgt definiert. Ein SIRS stellt eine allgemeine, entzündliche Abwehrreaktion auf unterschiedliche Aggressionen dar und manifestiert sich durch das Auftreten von zwei oder mehr der folgenden Reaktionen:

1. Temperatur über 38°C (oder unter 36°C)
2. Herzfrequenz über 90 Schläge/min
3. Atemfrequenz über 20 Atemzüge/min oder paCO_2 unter 32 mmHg,
4. Leukozytenzahl über 11.000/mm³ oder unter 4.000/mm³ oder mehr als 10% unreife Neutrophile.

Dagegen wurde die Sepsis definiert als das Auftreten dieser allgemein entzündlichen Antwort als Reaktion auf eine mikrobiologische Infektion. Der septische Patient ist demnach der Patient mit einem SIRS aus infektiöser Ursache. Des Weiteren wurden die Begriffe schwere Sepsis, septischer Schock und „multiple organ dysfunction syndrom“ (MODS) eingeführt und präzise definiert (Bone, 1992a, Bone, 1992b).

Unter einer akuten septischen Kardiomyopathie versteht man eine Myokardschädigung im Rahmen einer Sepsis mit der Folge einer im Verhältnis zum systemischen Gefäßwiderstand verminderten Pumpfunktion des Herzens. Eine andere Definition der Sepsis bei der weniger die Diagnosekriterien sondern die Pathophysiologie im Mittelpunkt steht lautet wie folgt: „Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle

Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“ (Schuster und Müller-Werdan, 2000).

1.2 Epidemiologie der Sepsis

Die Sepsis ist ein häufiges und schweres Krankheitsbild, das mit einer hohen Mortalität einhergeht und von hoher sozialökonomischer Relevanz ist. In Deutschland leiden 0,8 bis 2% der stationär aufgenommenen Patienten an einer Sepsis (Rychlik und Pfeil, 2002). In einer aktuellen Studie des Kompetenznetzwerks Sepsis geht man von 110.000 bis 154.000 Sepsis Patienten pro Jahr aus (Brunkhorst, 2006). Dies entspricht einer Inzidenz von 161 bis 226 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Häufigkeit von schwerer Sepsis und septischem Schock auf Intensivstationen wird auf 51.000 bis 75.000 Fälle pro Jahr geschätzt, was einer Inzidenz von 76 bis 110 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr entspricht (Brunkhorst, 2006). Damit ist die Häufigkeit von schwerer Sepsis und septischem Schock vergleichbar mit der Inzidenz des akuten Myokardinfarktes mit 143 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Rychlik und Pfeil, 2002; Brunkhorst, 2006). Die sozioökonomische Relevanz wurde in einer Studie in den USA beziffert. Im Jahr 2000 verursachten 751.000 Sepsis-Patienten, die im Durchschnitt 19,6 Tage im Krankenhaus verbrachten, Gesamtkosten in Höhe von 16,7 Milliarden Dollar pro Jahr (Angus und Wax, 2001; Angus et al., 2001).

Neben dem allgemeinen Krankheitsbild ist auch die Zahl der betroffenen Organsysteme prognostisch wichtig und entscheidend für die Therapie. Mit jedem zusätzlichen Organ mit Funktionsversagen steigt das Letalitätsrisiko um 15-20% (Hörner et al., 2004). In Deutschland liegt die Letalität durch septischen Schock während des Aufenthalts auf der Intensivstation bei 47%. Mit näherungsweise 40.000 Todesfällen ist die schwere Sepsis oder septische Schock nach koronarer Herzkrankheit und akutem Myokardinfarkt die dritthäufigste Todesursache auf deutschen Intensivstationen (Brunkhorst, 2006).

Auf Grund einer zunehmenden Anzahl immunsupprimierter Patienten, einer erhöhten Verbreitung multiresistenter Erreger (z.B. „Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*“ (MRSA)) sowie der weit verbreiteten Verwendung von Fremdmaterialien zur Implantation hat die Inzidenz der Sepsis zugenommen. Derzeit geht man von einer jährlichen Zunahme von 1,5% aus (Angus et al., 2001).

1.3 Septische Kardiomyopathie

1989 wurde für die Schädigung des Herzens während einer Sepsis von Schuster der Begriff der akuten septischen Kardiomyopathie eingeführt (Schuster, 1989). Sie ist durch eine potenziell reversible Pumpfunktionseinschränkung und erhöhte ventrikuläre Dehnbarkeit der Herzwand (Compliance) charakterisiert. Bei 44% der Sepsis-Patienten wurde eine septische Kardiomyopathie beobachtet (Schuster und Müller-Werdan, 2000; Charpentier et al., 2004). Häufig wird die Beteiligung des Herzens bei einer Sepsis unterschätzt, da scheinbar die Pumpleistung des septischen Patienten im Vergleich zu dem eines Gesunden nicht wesentlich eingeschränkt ist.

Das klinische Bild der akuten septischen Kardiomyopathie ist charakterisiert durch eine frühzeitig dokumentierte Abnahme der Ejektionsfraktion und einer Zunahme des enddiastolischen Volumen Index (EDVI) bei gleich bleibendem bzw. inadäquat gesteigertem oder sogar leicht erniedrigtem Schlagvolumenindex. Weitere Charakteristika der akuten septischen Kardiomyopathie umfassen eine regionale und globale Kontraktionsstörung, eine Dilatation des Herzens, einen hohen Koronarfluss, Rhythmusstörungen und autonome Dysfunktion.

Eine gut belegte negativ inotrope Mediatorokaskade beginnt mit der von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildeten „Myocardial depressant substance“ (MDS), die als eine Kombination von TNF- α und IL-1 β identifiziert wurde. Das Ausmaß der kardialen Dysfunktion konnte nach Immunpräzipitation dieser beiden Zytokine aus dem Serum von Patienten verbessert werden (Kumar et al., 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass beide Zytokine die Bildung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) steigern, die über eine vermehrte Freisetzung von NO und via einer cGMP-regulierten Hemmung des Calciumionen-Einstroms zur Kardiodepression führt (Kojda und Kottenberg, 1999). Für die weiteren Effekte von NO werden eine Desensibilisierung der Myofilamente gegenüber Calcium und die Abnahme des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP), welches über die cGMP-abhängige Phosphodiesterase reguliert wird, verantwortlich gemacht. NO gilt als Auslöser des „oxidative burst“ (Produktion reaktiver zytotoxischer Sauerstoffmetabolite) und schränkt die mitochondriale Funktion ein. In Tierexperimenten konnten für TNF- α und IL-1 β alternative Signaltransduktionswege nachgewiesen werden. Kardiomyozyten aus Ratten bildeten nach Inkubation mit TNF- α aus Sphingomyelin Sphingosin, das den Ryanodin-Rezeptor blockiert und so die Calcium-abhängige Calcium-Freisetzung aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum verhindert (Oral et al., 1997). Krown und Mitarbeiter konnten zudem zeigen, dass TNF- α den L-Typ Calcium-Strom

blockiert (Krown et al., 1995). IL-1 β aktiviert den Arachidonsäure-Stoffwechsel durch Induktion von Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Phospholipase A₁. Durch COX-2 Inhibitoren konnte die Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) und die hämodynamische Veränderungen durch IL-1 β verhindert werden (Okusawa et al., 1988; Dinarello, 1996). Es liegt daher sehr nahe, dass die Produktion dieser pro-inflammatorischen Mediatoren maßgeblich an der Ausbildung der kardialen Dysfunktion bei einer Sepsis beteiligt ist.

1.4 Angeborenes Immunsystem und Toll-Like Rezeptoren

Das Eindringen von pathogenen Liganden oder anderen Fremdmaterialien wird durch das Immunsystem erkannt, wobei man traditionell zwischen einer angeborenen, nicht-adaptiven und einer erworbenen, adaptiven Immunantwort unterscheidet. Lange Zeit konzentrierten sich die wissenschaftlichen Untersuchungen bezüglich der Immunantwort auf das erworbene, adaptive Immunsystem („adapted immunity“), welches durch B- und T-Lymphozyten repräsentiert wird, die sich durch klonale Proliferation, Spezifität und Gedächtnisfunktion auszeichnen. Die Erkennung der Fremdstoffe beruht auf der zufälligen Bildung einer mannigfaltigen Anzahl unterschiedlicher Antigenrezeptoren und anschließender Selektion relevanter Rezeptoren. Diese Mechanismen tragen zur Bildung eines „immunologischen Gedächtnisses“ bei. Nachteilig hieran ist die Zeitdauer von 4 bis 7 Tagen bis der spezifische Klon in eine Effektorzelle umgewandelt ist (Janeway und Medzhitov, 2002). In der Evolution hat sich diese Immunantwort zu einem späteren Zeitraum als das angeborene Immunsystem („innate immunity“) entwickelt und wurde nur in dem komplexen Abwehrsystem bei Wirbeltieren nachgewiesen.

Die Bedeutung der angeborenen Immunantwort, welche bereits 1902 in Ansätzen von Metchnikoff beschrieben wurde, erkannte man erst später (Metchnikoff, 1902). Zuvor ist man davon ausgegangen, dass das angeborene Immunsystem nur zur lokalen Erkennung und Eindämmung einer Entzündungsreaktion dienen würde bis die adaptive Immunantwort erfolgt. Mittlerweile ist bekannt, dass die Interaktionen zwischen beiden Immunsystemen wesentlich sind und die Aufgabe des angeborenen Systems in der Initiation der adaptiven Immunantwort liegt.

Es wird sogar davon ausgegangen, dass 99% aller Infektionen über das angeborene Immunsystem beherrscht werden (Hörner et al., 2004). Für diese Aufgaben stehen humorale und zelluläre Elemente zur Verfügung. Zu den humoralen Faktoren zählen vor allem das Komplementsystem, aber auch Lysozym und Akut-Phase-Proteine.

Granulozyten und Zellen des retikulo-endothelialen Systems (RES), d.h. Makrophagen, Monozyten, Langerhans-Zellen, dendritische Zellen (DC) und weitere Antigen-präsentierende Zellen (APC) repräsentieren die zelluläre angeborene Immunität.

Im Gegensatz zu den klonalen Rezeptoren der B- und T-Lymphozyten bedient sich das angeborene Immunsystem hierbei einer Gruppe nicht-klonaler Mustererkennungsrezeptoren, den sogenannten „pattern recognition receptors“ (PRRs). Diese Rezeptoren erkennen konservierte molekulare Strukturen, die als „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) bezeichnet werden. Es handelt sich dabei um phylogenetisch konservierte Strukturen, die nicht spezifisch für einen bestimmten Krankheitserreger sind. Sie erlauben die Unterscheidung zwischen pathogenen und körpereigenen Merkmalen, da es sich um Strukturen handelt, die im Wirtsorganismus nicht vorkommen. Hierzu gehören Zellwandbestandteile und Strukturen von Mikroorganismen wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen Bakterien, Lipoteichonsäure (LTA) von gram-positiven Bakterien oder auch bakterielle DNA (Messina et al., 1991; Krieg et al., 1995).

Die PRRs werden in zwei Gruppen unterteilt:

- a) „Scavenger“ Rezeptoren für die Phagozytose von Mikroorganismen (z.B. Mannose-Rezeptor, das Mannan-bindende Lektin, DEC 205 und das Serum Amyloid Protein)
- b) Toll-Like Rezeptoren zur Aktivierung von Abwehrzellen, die eine Entzündungsreaktion hervorrufen.

Aufgrund der hohen Homologie zum Protein „Toll“, welches erstmalig in *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde, wurde für die letztgenannte Gruppe der PRRs der Begriff „Toll-Like Rezeptor“ eingeführt (Gay, 1991). Im Embryonalstadium von *Drosophila* steuert dieses Protein die dorsoventrale Polarität und ist bei adulten Tieren Bestandteil eines primitiven Immunsystems, welches für die Erkennung fungaler Proteine verantwortlich ist (Anderson et al., 1985; Hashimoto et al., 1988). Für diese bahnbrechenden Forschungsarbeiten wurde Frau Christiane Nüsslein-Vollhard 1995 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Toll-Like Rezeptoren sind Transmembran-Proteine mit einer extrazellulären, Leucinreichen Domäne, die für das Erkennen der PAMPs (z.B. Lipopolysaccharid, Lipoteichonsäure, CpG-Oligonukleotide) verantwortlich ist. Gay und Keith erkannten erstmalig diese hohe Homologie zwischen der intrazellulären Domäne des *Drosophila* TLR und des Interleukin-1 Rezeptors der Säugetiere (Gay und Keith, 1991), die zur Bezeichnung Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne führte. Bisher wurden 13 TLRs beschrieben, wovon 10 im humanen und 12 im murinen Genom nachgewiesen werden konnten (Tabeta et al., 2004; Beutler et al., 2005;).

TLRs führen ebenso wie der IL-1 Rezeptor zur Aktivierung des Nukleären Faktors κ B (NF κ B) und nutzen hierfür ähnliche Signaltransduktionskaskaden (Medzhitov et al., 1997; Rock et al., 1998). Der am besten charakterisierte Rezeptor ist Toll-Like Rezeptor 4 (TLR4), ein membranständiger Rezeptor, der Lipopolysaccharide (LPS), einem Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, erkennt (Poltorak et al., 1998). TLR4 bildet mit dem interagierenden Rezeptor CD14 und dem assoziierten Protein MD-2 einen Rezeptorkomplex. Toll-Like Rezeptor 2 (TLR2) erkennt gram-positive Bakterien (z. B. *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*) und deren Zellwandbestandteile (Lien et al., 1999; Schwandner et al., 1999; Yoshimura et al., 1999, Knuefermann et al., 2004), sowie bakterielle Lipoproteine und Hefen (Aliprantis et al., 1999; Underhill et al., 1999). Erst kürzlich wurden Liganden auch für weitere TLRs identifiziert (Doppelstrang-RNA für TLR3, bakterielles Flagellin für TLR5, bakterielle DNA für TLR9) (Hemmi et al. 2000; Alexopoulou et al., 2001; Hayashi et al., 2001). Jedoch besteht weiterhin Forschungsbedarf hinsichtlich der Identifizierung von zusätzlichen, spezifischen Liganden und der Aufklärung der intrazellulären Signalkaskade, die zur Induktion von Entzündungsmediatoren führt. Die Einordnung der Funktion der verschiedenen TLRs in unterschiedlichen Organen könnte vor allem zum Verständnis bei der Abwehrreaktion einer Infektion, SIRS oder Sepsis führen.

Rezeptor	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR1	triacylierte Lipopetide Lösliche Faktoren	Bakterien und Mycobakterien Neisseria meningitidis
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptide Lipoteichonsäure Lipoarabinomannan Zymosan β -Defensin Sauerstoffradikale Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70	unterschiedliche Pathogene gram-positive Bakterien Mycobakterien Pilze Wirt Wirt Wirt Wirt
TLR3	Doppelstrang-RNA (dsRNA) messenger-RNA (mRNA)	Viren Wirt
TLR4	Lipopolysaccharide Taxol Heat-shock Protein 60 Heat-shock Protein 70 β -Defensin Fibrinogen	gram-negative Bakterien Pflanzen Wirt Wirt Wirt Wirt
TLR5	Flagellin	gram-negative Bakterien
TLR6	diacylierte Lipopeptide	Mycobakterien
TLR7	Einzelstrang-RNA (ssRNA) snRNPs	non-virale und virale ssRNA Wirt
TLR8	Doppelstrang-RNA (dsRNA)	non-virale und virale dsRNA
TLR9	bakterielle DNA mit CpG-Motiv	Bakterien
TLR10	noch nicht bekannt	
TLR11		uropathogene Escherichia coli
TLR12	noch nicht bekannt	
TLR13	noch nicht bekannt	

Tabelle 1: Ausgewählte TLR Liganden (Takeda et al., 2003; Akira und Takeda, 2004; Takeda und Akira, 2004, Takeda und Akira, 2005)

1.5 Toll-Like Rezeptor 9

Mit der Entdeckung des Toll-Like Rezeptors 9 (TLR9) begannen umfangreiche Forschungsarbeiten zur Aufklärung der Signaltransduktion und Wirkung dieses PRRs. Hemmi et al. sowie Bauer und Mitarbeiter konnten als erste Arbeitsgruppen zeigen, dass Toll-Like Rezeptor 9 (TLR9) der primäre Rezeptor für bakterielle DNA ist (Hemmi et al., 2000; Bauer et al., 2001). Unmethylierte DNA-Sequenzen sind in der Lage, Immunzellen der Wildtyp-Maus (WT) via TLR9 zu stimulieren, während bei TLR9-defizienten Mäusen (TLR9-D) keine Stimulation von Immunzellen zu erkennen war. Die Antwort von humanen TLR9 Immunzellen durch bakterielle DNA korreliert mit der Expression von humanem TLR9 in diesen Zellen. In Zellkulturexperimenten konnte des weiteren gezeigt werden, dass in Zellen, die normalerweise nicht auf die Inkubation mit bakterieller DNA reagieren, nach transienter Transfektion mit humanem TLR9 eine Reaktion beobachtet werden konnte (Bauer et al., 2001).

Im Gegensatz zu den meisten anderen TLRs ist TLR9 in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Durch Fusion mit der Plasmamembran oder auf direktem Weg mit dem endoplasmatischen Retikulum gelangt der Rezeptor in lysosomale Kompartimente (Latz et al., 2004).

1.6 Wirkung von bakterieller DNA als TLR9-Ligand

Die bakterielle DNA kann nur in Folge einer bakteriellen Infektion (z.B. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) in den Blutkreislauf gelangen. Durch Absterben von Bakterien oder in Folge einer Phagozytose durch Makrophagen kann auf natürliche Weise bakterielle DNA freigesetzt werden. Behandlungen mit Antibiotika während einer Therapiemaßnahme können jedoch ebenso zur Lyse der Bakterienzellen führen, die eine Freisetzung von bakterieller DNA bewirkt. Sie wirkt als PAMP, dessen spezifischer Rezeptor Toll-Like Rezeptor 9 (TLR9) ist.

Ihre Erkennung durch TLR9 beruht auf wesentlichen Strukturunterschieden zu eukaryontischer DNA des Wirtsorganismus. So enthält bakterielle DNA 20fach häufiger Cytosin-Guanosin-Dinukleotidsequenzen, sogenannte CpG-Motive, welche zu 98% unmethyliert sind (Schwartz et al., 1997). Nur sie haben eine immunstimulatorische Wirkung, da nur diese Strukturen durch Immunzellen erkannt werden, wodurch eine Immunantwort induziert wird. Im bakteriellen Genom treten diese Motive mit einer durchschnittlichen Wahrscheinlichkeit von 1:16 auf. Im Genom von Wirbeltieren liegt eine

CpG-Suppression vor, d.h. das Vorkommen von CpG-Motiven ist viermal seltener. Ein weiterer struktureller Unterschied besteht darin, dass die Mehrheit der CpG-Dinukleotidsequenzen in der eukaryonten DNA methyliert vorliegt. Hierdurch verlieren diese Motive ihre immunstimulatorische Wirkung. Allerdings haben im Laufe der Evolution Viren und intrazelluläre Parasiten diese CpG-Suppression ebenfalls entwickelt, um das Immunsystems des Wirtsorganismus zu umgehen (Karlin et al., 1994a; Karlin et al., 1994b; Shpaer und Mullins, 1990).

Ein weiterer, entscheidender Strukturunterschied liegt in den Telomeren des eukaryonten Genoms mit seinen repetitiven Sequenzen. Allgemein ist deren Wirkung im Zusammenhang mit Zellzyklus, Zellalterung und Transkriptionsregulation bekannt. Seit kurzem wurde deren antagonistische Wirkung für TLR9 entdeckt. Multimere des Hexanukleotids 5'-TTAGGG-3', die in den Telomeren mit einer großen Häufigkeit vorkommen, werden z.B. bei einer Gewebeschädigung freigesetzt. Eine Aktivierung des Immunsystems über TLR9 wird somit verhindert (Gursel et al., 2003).

Bemerkenswert ist auch, dass die Sensitivität gegenüber CpG-Sequenzen speziesspezifische Unterschiede aufweist. Nicht jede Sequenz mit einem unmethyliertem CpG-Motiv kann im Wirtsorganismus eine Immunreaktion induzieren. So ist bei Menschen das Vorliegen des Hexamer-Motives 5'-GTCGTT-3' für das Auftreten einer Immunreaktion verantwortlich. Für die Maus wurde das optimale Motiv 5'-GACGTT-3' beschrieben (Krieg et al., 1995).

Bei der Entwicklung von synthetischen, immunstimulatorischen Oligonukleotidsequenzen (CpG-ODN) greift man auf diese wesentlichen Strukturunterschiede zurück. Des Weiteren verwendet man bei der Synthese dieser Oligonukleotide ein Phosphor-Thioat-Rückgrat, so dass der Abbau durch Nukleasen inhibiert wird. Auf diese Weise erhalten die verwendeten CpG-ODN einen längeren, stimulierenden Effekt auf das Immunsystem (Krieg et al., 1995). Der Mechanismus, durch welchen bakterielle DNA zu einer erhöhten Expression von Mediatoren führt, wurde erst vor etwa 10 Jahren aufgeklärt (Sparwasser et al., 1997; Vollmer et al., 2004).

1.7 Toll/IL-1-Signaltransduktionsweges

Trotz der Gemeinsamkeiten in ihrer Struktur unterscheiden sich die Signaltransduktionswege der Toll-Like Rezeptoren. Dies liegt u.a. an der Vielzahl der Adapterproteine und der intrazellulären Lokalisation (Plasmamembran vs. intrazellulär (endosomal)). Der Toll/IL-1-Signaltransduktionsweg soll an dieser Stelle nach der derzeitigen pathophysiologischen Vorstellung am Beispiel der Erkennung von bakterieller DNA beschrieben werden. In den ruhenden Zellen ist TLR9 auf den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Durch Fusion mit der Plasmamembran und anschließender Endozytose oder alternativ durch Fusion mit Endosomen gelangt der Rezeptor in lysosomale Zellkompartimente (Latz et al., 2004). Zur Internalisierung von bakterieller DNA in dieses Kompartiment gibt es bisher verschiedene Ansätze. Es wird vermutet, dass die bakterielle DNA über eine Klathrin-abhängige Endozytose oder einen bisher nicht beschriebenen Co-Rezeptor in die Lysosomen gelangt. Der Kontakt des Liganden mit TLR9 wurde in diesem Kompartiment beschrieben (Ahmad-Nejad et al., 2002). Das Anbinden der bakteriellen DNA über die CpG-Motive bewirkt eine Dimerisierung von zwei Rezeptormolekülen, die zu einer Konformationsveränderung führt (Abbildung 1). Hierdurch wird auf der intrazellulären TIR-Domäne das Adapterprotein „myeloid differentiation marker 88“ (MyD88) rekrutiert. An dieses Molekül lagert sich die „Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase“ (IRAK) an, welche durch Auto-phosphorylierung aktiviert wird.

Über die Aktivierung weiterer Moleküle wie dem Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten-Faktor-6 (TRAF6), der „transforming growth factor-activating-kinase-1“ (TAK1), dem „transforming growth factor-activating kinase-1 binding protein“ sowie der „NFκB-inducing-kinase“ (NIK) und der „inhibitory-κB-kinase“ (IKK) wird die Freisetzung und nukleäre Translokation des Nukleären Faktors κB (NFκB) initiiert (Irie et al., 2000). Im Nukleus reguliert NFκB sowohl die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF-α als auch des Effektormoleküls iNOS (Baeuerle und Baltimore, 1996; Baldwin, Jr., 1996).

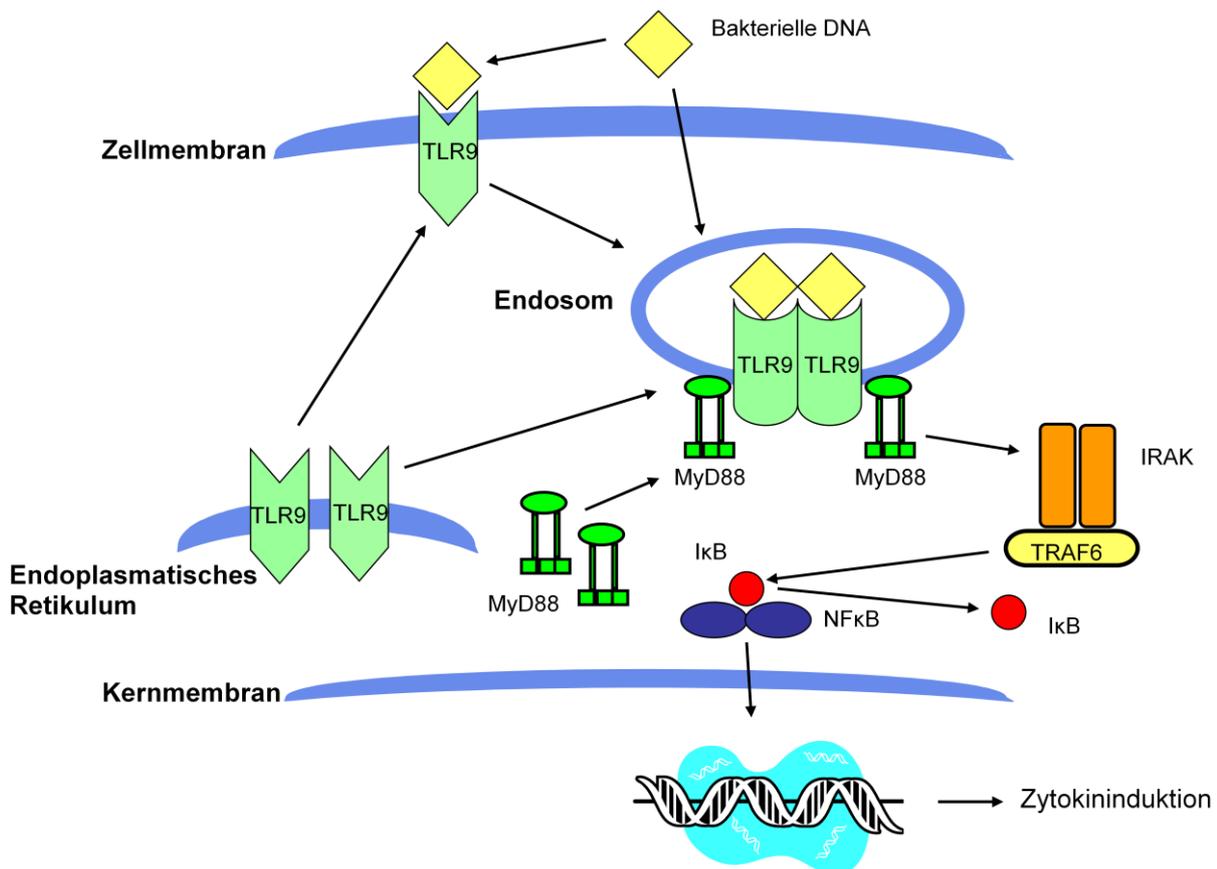


Abbildung 1: Schematische Darstellung des TLR9-Signaltransduktionsweges.

Die bakterielle DNA oder CpG-Oligonukleotide gelangen durch Endozytose in den intrazellulären Raum und werden in den Endosomen von TLR9 erkannt. Hierdurch wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zur Aktivierung von MyD88, IRAK, TRAF6 und IκB führt. In Folge dieser Reaktionen erfolgt eine Translokation von NFκB in den Nucleus, wodurch die Expression pro-inflammatorischer Zytokine induziert wird.

Alternativ zum beschriebenen Weg über NFκB kann TRAF6 die „Mitogen aktivierenden Protein-Kinase-Kinase-6“ (MKK6) phosphorylieren. Dies führt zur Aktivierung zweier „Mitogen aktivierender Protein-Kinasen“ (MAP-Kinase), der „c-Jun-N-terminalen Kinase“ (c-JNK) und dem „Protein 38“ (p38), die wiederum das „Aktivatorprotein-1“ (AP-1), einen weiteren Transkriptionsfaktor, aktivieren (Yi und Krieg, 1998). Über AP-1 wird die Synthese und Regulation von Effektormolekülen gesteuert, die sich nach Zelltyp unterscheidet.

So produzieren dendritische Zellen (DCs), die TLR9 exprimieren, nach Inkubation mit bakterieller DNA die pro-inflammatorischen Zytokine IL-12, TNF-α und Interferon-α (IFN-α). Mittels CpG-ODN wird in dendritischen Zellen aber auch die Apoptose über den „Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase-Weg“ inhibiert (Park et al., 2002). Die aus dem Knochenmark abstammenden dendritischen Zellen („bone marrow derived dendritic cells“,

kurz: BMDDC) bilden bei Applikation von CpG-ODN eine erhöhte Expression von Haupthistokompatibilitätskomplex II ("major histocompatibility complex II" (MHC II) aus, wodurch die Anzahl der Antigen-präsentierenden Zellen (APC) erhöht wird (Sparwasser et al., 1998). Des Weiteren besitzen sie die Eigenschaft, in Lymphknoten zu migrieren, wodurch die Verbundenheit zwischen angeborener und adaptiver Immunität verdeutlicht wird.

In murinen Makrophagen und Monozyten führt die Verabreichung von CpG-ODN zur Aktivierung von NF κ B (Stacey et al., 1996), das wiederum eine erhöhte Produktion von TNF- α bewirkt (Sparwasser et al., 1998). Bei humanen Monozyten ist man zur Erkenntnis gekommen, dass nur die Anwesenheit von dendritischen Zellen eine Aktivierung initiiert (Hartmann und Krieg, 1999; Kadowaki et al., 2001; Hornung et al., 2002).

Neutrophile Granulozyten exprimieren kein TLR9 (Hornung et al., 2002), wandern aber in betroffene Gewebe, in denen mittels CpG-ODN eine Entzündungsreaktion hervorgerufen wurde. Somit wird das Immunsystem zur Bekämpfung einer bakteriellen Infektion verstärkt (Weighardt et al., 2000).

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und T-Lymphozyten verfügen zwar über TLR9 auf den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, eine direkte Aktivierung über CpG-ODN ist allerdings nicht möglich. Die Anwesenheit von Monozyten ist notwendig, um in NK-Zellen Interferon- γ (IFN- γ) zu produzieren, welches die Antikörper Produktion in B-Lymphozyten reguliert.

1.8 Die Rolle von Toll-Like Rezeptoren im Myokard und deren klinische Relevanz

Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass sogenannte „Pattern Recognition Rezeptoren“ auf humanen und murinen Kardiomyozyten exprimiert werden. Zarembek und Godowski konnten die meisten Toll-Like Rezeptoren sowie die entsprechenden Adapterproteine auf mRNA-Ebene in humanen Herzen nachweisen (Zarembek und Godowski, 2002). In murinen Herzen konnten ihre Expression ebenfalls nachgewiesen werden (Rodriguez-Martinez et al., 2005). Dabei unterscheiden sich die Expressionen von TLR2, TLR4 und TLR9 nur unwesentlich. Hinsichtlich der Bedeutung ihrer Rezeptoren im Myokard liegen erste Studien zur Zytokininduktion und Myokardfunktion vor.

Vorhergegangene Arbeiten zeigten, dass CD14/TLR4 als auch TLR2 Bestandteil des myokardialen Signaltransduktionsweges zur Induktion von Zytokinen durch LPS bzw. gram-positive Bakterien darstellen. Im weiteren Krankheitsbild wird die Produktion von

Stickstoffmonoxid (NO) induziert, das zur Verminderung der linksventrikulären Pumpfunktion (Baumgarten et al., 2001; Knuefermann et al., 2002; Knuefermann et al., 2004) sowie der Kontraktilität von einzelnen, isolierten Kardiomyozyten führt (Baumgarten et al., 2006). Die Rolle von bakterieller DNA für die Ausbildung einer septischen Kardiomyopathie sowie die funktionelle Bedeutung von TLR9 im Myokard war bisher nicht bekannt.

In der klassischen Vorstellung der TLRs als Teil des angeborenen Immunsystems bewirkt die Aktivierung des Immunsystems durch bakterielle DNA die Bekämpfung einer Infektion. Dadurch eröffnen sich vielfältige – zurzeit noch experimentelle – therapeutische Möglichkeiten vor allem als Adjuvanz in Impfstoffen (Roman et al., 1997) oder als immunstimulatorische Substanz zur Überwindung der Immunparalyse im Rahmen der Sepsis (Weighardt et al., 2000).

Trotz therapeutischer Fortschritte stellt die septische Kardiomyopathie ein lebensbedrohliches Krankheitsbild dar. Im Rahmen der Intensivmedizin ist die kardiale Funktion des septischen Patienten prognosebestimmend, das aufgrund der heutigen Möglichkeiten die meisten anderen Organfunktionen (Lunge, Niere) durch differenzierte Techniken ersetzt werden können. Die Behandlung des septischen Herz-Kreislaufversagens steht im Vordergrund einer Sepsis-Therapie. Die weiterhin hohe Mortalität trotz antimikrobieller Pharmaka und einer immer differenzierteren Intensivtherapie ist unbefriedigend. Die Untersuchung einer systemischen Infektion mittels synthetischer, immunstimulierender Oligonukleotide (CpG-ODN) kann einen Einblick in die molekularen Mechanismen der am Myokard ausgelösten Veränderungen erzielt werden. Hieraus können sich neue Therapieansätze für die Behandlung des septischen Herz-Kreislaufversagens ergeben.

1.9 Arbeitshypothese

Die vorliegende Arbeit sollte belegen, dass die Expression von TLR9 im Herzen im Rahmen der Angeborenen Immunabwehr („innate immunity“) und die damit verbundene Erkennung von bakterieller DNA die Entstehung und Ausprägung einer septischen Kardiomyopathie mitbestimmt. Dies war sehr naheliegend, da bei verschiedenen, bakteriellen TLR-Liganden (z.B. Lipopolysaccharide, Peptidoglykan) vergleichbare Mechanismen beschrieben wurden.

Die Untersuchungen wurden an WT- und TLR9-D Mäusen durchgeführt, die mit synthetischen, immunstimulatorischen Oligonukleotiden (CpG-ODN) behandelt wurden, um die Freisetzung von bakterieller DNA während einer Sepsis zu simulieren. Unterschiede in der Expression verschiedener Mediatoren des Toll-/IL-1 Signaltransduktionsweges sollten belegen, dass diese Mechanismen über TLR9 vermittelt werden. Bei TLR9-D Mäusen sollte eine Reaktion auf den TLR9-Liganden ausbleiben oder vermindert erfolgen. Untersuchungen zur Herzfunktion sollten belegen, dass bei WT-Mäusen die bakterielle DNA zu einer Verminderung der linksventrikulären Dysfunktion führt, was auf das Vorliegen einer septischen Kardiomyopathie hinweisen würde.

Des Weiteren wurde angenommen, dass die Reaktionen auf die Applikation von CpG-ODN organspezifisch erfolgten. Deshalb wurde die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine im Herzen und in der Lunge miteinander verglichen. Im Rahmen der angeborenen Immunantwort wurde weiterhin angenommen, dass die parenchymatischen Zellen, in diesem Fall kardiale Zellen, der Ursprung der Zytokinproduktion sind. Die Migration von Immunzellen ins kardiale Gewebe sollte daher nicht ausschlaggebend für die Produktion von TNF- α , IL-1 β und IL-6 sein. Knochenmark-chimäre Mäuse, deren zirkulierende Immunzellen durch eine TLR9-defizienz charakterisiert sind, sollten in der Lage sein, im kardialen Gewebe pro-inflammatorische Zytokine zu produzieren.

2. Materialien und Methoden

2.1 Angewandtes Tiermodell

Für diese Untersuchungen wurden Wildtyp- (WT; C57BL/6, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) sowie transgene TLR9-defiziente (TLR9-D) Mäuse, welche freundlicherweise von Herrn Professor Shizuo Akira (Osaka University, Japan) zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Das Alter der Versuchstiere lag zwischen 8 und 14 Wochen.

Die Erzeugung der transgenen Mauslinie erfolgte durch homologe Rekombination an embryonalen Stammzellen von C57BL/6 (WT-) Mäusen (Hemmi et al., 2000). Die TLR9-D Mäuse zeichnen sich durch das Fehlen eines intakten TLR9-Gens in parenchymatischen Gewebezellen und zirkulierenden Immunzellen aus. Die Genotypisierung der TLR9-D Mäuse basiert auf dem Nachweis einer Neomycin-Resistenz-Kassette, die nach homologer Rekombination in das Genom eingebracht wurde. Hiermit können sie von WT-Mäusen unterschieden werden. Zur Unterbringung der Mäuse standen separate, vollklimatisierte Räume im Tierstall des Hauses für Experimentelle Therapie (HET) des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung.

Die Versuchstierhaltung im HET erfolgt in den der Aufsichtsbehörde benannten Tierräumen (gemäß und vorbehaltlich einer erteilten Erlaubnis nach § 11 TschG) mit Genehmigung der Bezirksregierung Köln (Aktenzeichen 50.203.2 – BN 43, 28/01). Nach Unterbringung der Versuchstiere in neue Räumlichkeiten des HETs erfolgte die Haltung bei konstanter Luftfeuchtigkeit (etwa 70%) und Temperatur ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) mit einem 12-stündigen Licht-Nachtwechsel. Der Käfigwechsel erfolgte regelmäßig in einem einwöchigen Abstand. Für den Käfigwechsel wurden ausschließlich sterilisierte Käfige verwendet, deren Einstreu in den Käfigen autoklaviert wurde. Das Futter- und Wasserangebot an Versuchstieren erfolgt ad libitum einmal wöchentlich. Das Futter wurde ebenfalls autoklaviert.

Bei der Haltung Knochenmark-chimärer Mäuse wurden die Käfige, das Einstreu und das Trinkwasser separat autoklaviert. Das Umsetzen der Tiere erfolgte unter einer Sterilbank. Das Trinkwasser wurde mit 1% Neomycinsulfat (Gibco®, Invitrogen, Karlsruhe) versetzt, um möglichen Infektionen vorzubeugen.

2.2 Genotypisierung von transgenen Mäusen

Zur Durchführung dieser Studie wurden ausschließlich homozygote, transgene Tiere verwendet. Die Genotypisierung erfolgte aus isolierter DNA mittels Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR). Für die Isolation genomischer DNA wurden die Spitzen von Mäuseschwänzen verwendet und nach Anleitung eines DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden) verarbeitet. Die Typisierung der Tiere erfolgte nach einem Protokoll der Mitarbeiter von Herrn Professor Shizuro Akira (persönliche Mitteilung).

Folgenden Primersequenzen wurden hierbei verwendet:

1. „wild-type“: 5'-GAA GGT TCT GGG CTC AAT GGT CAT GTG-3'

- spezifisch für das unveränderte TLR9-Gen

1. „neo1500“: 5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3'

- spezifisch für die Neomycin-Resistenz-Kassette im veränderten TLR9-Gen

3. „extra“: 5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3'

- Bereich außerhalb des veränderten Bereiches in entgegengesetzter Richtung zu „wild-type“ und „extra“

Die Firma MWG Biotech (Ebersbach) wurde mit der Synthese dieser Sequenzen beauftragt.

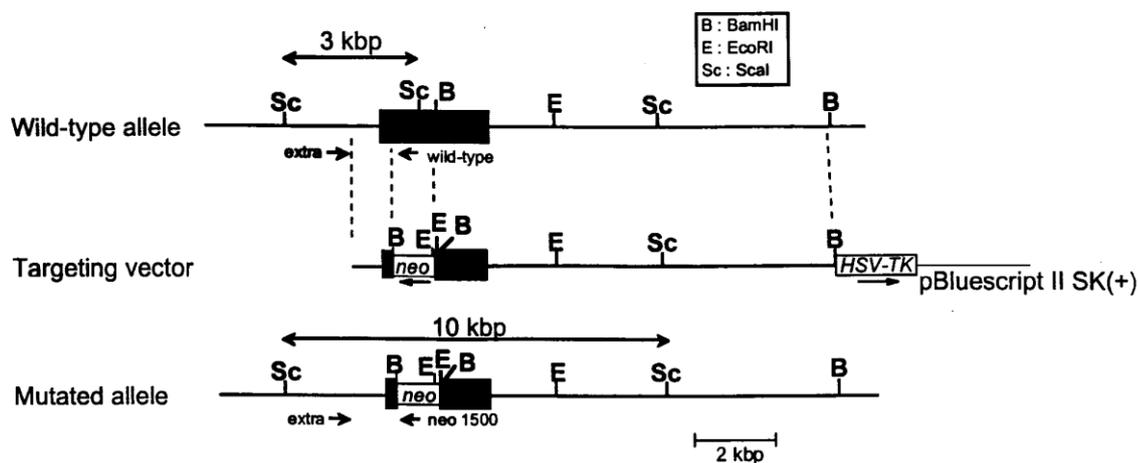


Abbildung 2: Genkarte der TLR9-defizienten Mäuse. Die Erzeugung der TLR9-D Mäuse erfolgte durch homologe Rekombination des oben dargestellten Genbereiches innerhalb des TLR9-Gens von Wildtyp-Mäusen (C57BL/6).

Folgende PCR-Ansätze wurden für die Genotypisierungen angesetzt (Tabelle 2).

PCR-Ansatz	Volumen [μ l] pro Ansatz
10 x PCR Puffer	3
50 mM MgCl ₂	2,5
5 M Betaine	10
Primer 1	0,5
Primer 2	0,5
ddH ₂ O	5,9
2,5 mM dNTP-Mix	2,4
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,2
DNA aus Isolation	5
Gesamtvolumen pro Ansatz	30

Tabelle 2: Zusammensetzung der Komponenten für die Genotypisierung.

Als Primer 1 wurden die Primer „wild-type“ oder „neo1500“ in Kombination mit Primer 2 „extra“ verwendet. Die Lösungen, der dNTP-Mix sowie die Taq-Polymerase wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Zur Detektion der mutierten Allele wurden die Primerkombination „neo1500“ und „extra“ verwendet. Der Nachweis der Wildtyp-Allele erfolgte mit dem Primerpaar „wild-type“ und „extra“. Die Amplifikation des zu untersuchenden Genproduktes erfolgte mit Hilfe des Thermocyclers Whatman Biometra T-Gradient 96 (Biometra, Göttingen). Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte in 35 Zyklen mit 94°C für 30 Sekunden, 67°C für 60 Sekunden und 74°C für 60 Sekunden. Beim letzten Zyklus wurden die Proben für 10 Minuten bei 74°C inkubiert, bevor sie zur Aufbewahrung bei 4°C gekühlt wurden. Nach Zugabe des Ladebuffers wurden die amplifizierten Genprodukte, die eine Länge von etwa 1200 bp aufwiesen, in einem 1%igem Agarose-Gel bei 100 V für 45 Minuten aufgetrennt. Homozygote, TLR9-D Mäuse wurden durch ein amplifiziertes Genprodukt der Primerkombination „neo1500“ und „extra“ nachgewiesen. Die Auswertung der Agarose-Gele erfolgte in einer „Bio-Rad Gel Doc 1000“ Apparatur (Bio-Rad, München) mit der Software „Bio-Rad Molecular Analyst“ (Bio-Rad).

2.3 Knochenmark-chimäre Mäuse

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Knochenmark-chimäre (KM-) Mäuse erzeugt, deren vom Knochenmark abstammenden, zirkulierenden Immunzellen im Gegensatz zu den parenchymatischen Zellen (u.a. Kardiomyozyten, Lungenepithelzellen) nicht in der Lage sind, funktionales TLR9 zu exprimieren. Mit diesem Experiment sollte die Bedeutung von TLR9 im Rahmen der angeborenen Immunität („innate immunity“) genauer untersucht werden. Das Prinzip dieser Untersuchungen beruhte auf der Zerstörung von körpereigenem Knochenmark durch eine subletale Bestrahlung. Hierbei wurde das isolierte Knochenmark von männlichen TLR9-D Mäusen in weibliche, bestrahlte WT-Mäusen implantiert. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Herrn PD Dr. Sebastian Stier (ehemals Universitäts-Poliklinik II, Universitätsklinikum Bonn) und Herrn Dr. Stephan Garbe (Klinik für Radiologie, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt.

Zur Erzeugung von KM-chimären Mäusen wurden weibliche WT-Mäuse zweimal subletal mit einer Dosis 9,5 Gy für 2,5 Minuten in einem Therapiebeschleuniger SIEMENS MEVATRON MD2 bzw. SIEMENS MEVATRON KD (Siemens, München) bestrahlt. Nach der Bestrahlung sollten die Tiere mindestens sechs Stunden ruhen, bevor die Implantation mit dem Knochenmark von männlichen TLR9-D Mäusen erfolgte. Eine vorzeitige Transplantation der Knochenmarkszellen aus den Spendertieren hätte eine erhöhte Kreuzreaktion mit den vorliegenden Immunzellen des Empfängertieres ergeben. Die Implantation war ab dem Zeitpunkt der Bestrahlung bis zu maximal 20 Stunden danach möglich. Eine grundlegende Voraussetzung für die erfolgreiche Durchführung ist jedoch ein möglichst übereinstimmender genetischer Hintergrund, der durch die Verwendung von C57BL/6-Mäusen als WT-Mäuse und TLR9-D Mäusen, deren genetischer Hintergrund auf C57BL/6-Mäusen basiert, gegeben erschien.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass eine Implantation von Knochenmarkszellen aus weiblichen Spendertieren in männlichen Empfängertieren aufgrund einer erhöhten Sterberate als einzige Kombination nicht möglich gewesen wäre (mündliche Mitteilung von Herrn PD Dr. Sebastian Stier). Die Implantation von Knochenmarkszellen aus männlichen Tieren in weibliche Tiere wird auch in der Literatur als gängige Methoden beschrieben (mündliche Mitteilung). Unterschiedliche Geschlechter zwischen den Empfänger- und Spendertieren waren im Hinblick auf die Analyse der Blutzellen gewollt.

2.3.1 Isolation und Implantation von Knochenmarkszellen

Für die Isolation der Knochenmarkszellen wurden männliche TLR9-D Mäuse als Spendertiere verwendet, wobei mit einem Versuchstier drei bis fünf Empfängermäuse behandelt werden konnten.

Die Knochenmarkszellen wurden aus Femur und Tibia durch Ausspritzen mit einer 1 ml Insulinspritze und Kanülen der Größe 45 x 12 mm (16 G; Becton Dickinson, Heidelberg) isoliert. Die Aufnahme der Zellen erfolgte in Phosphat-gepufferter Lösung (PBS; Gibco®, Invitrogen) mit 1% Gentamicin (Gibco®, Invitrogen), welches bei 37°C vortemperiert wurde. Die Zellen von zwei Spendertieren wurden vereint und in 40 ml PBS-Lösung mit 1% Gentamicin resuspendiert. Nach anschließender Zentrifugation mit 1.500 U/min (450x g) (Heraeus, Thermo Scientific, Braunschweig) für 10 Minuten bei 15°C wurde der Überstand abgesaugt. Die Sedimente mit den Zellen wurden in 30 ml PBS resuspendiert, vereint und in einem BD Cellstrainer (70 µM Nylon, Becton Dickinson) filtriert. Anschließend wurde die Zellzahl mit einem Zell-Zähler MDC 400 (Medicine Devices AL Systeme, Karlsruhe) bestimmt. Für die Implantation sollte eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen pro Maus (in 250 µl PBS) erzielt werden.

Berechnung:

$$\frac{\text{Anzahl der Empfängertiere} \times (5 \times 10^6 \text{ Zellen})}{\text{durchschnittliche Zellzahl [Zellen/}\mu\text{l]}} = \text{zu entnehmendes Volumen der Zellsuspension [}\mu\text{l]}$$

Nachdem das entsprechende Volumen aus der Zellsuspension entnommen wurde, erfolgte eine weitere Zentrifugation der Zellen bei 1.500 U/min (450x g) (Heraeus) für 10 Minuten bei 15°C. Der Überstand wurde wiederum verworfen, und die Zellen wurden in PBS resuspendiert (Volumen [µl] = Anzahl der Tiere x 250 µl), filtriert und bis zur Implantation auf Eis gelagert.

Die Implantation der Knochenmarkszellen erfolgte mindestens sechs bis maximal 20 Stunden nach der Bestrahlung. Die Zellen wurden durch intravenöse Injektion über die Schwanzvene in einem Volumen von 250 µl pro Tier implantiert. In den folgenden 14 Tagen wurde darauf geachtet, dass die Tiere unter möglichst sterilen Bedingungen versorgt wurden, da in diesem Zeitraum die größte Gefahr von Infektionen bestand, die den Erfolg der Implantation verringert hätte.

2.3.2 Genotypisierung von Knochenmark-chimären Mäuse

Um zu kontrollieren, ob die Mäuse tatsächlich Knochenmark-chimäre Mäuse darstellen, musste ihr Blut auf das Vorkommen des TLR9-Gens analysiert werden. Ursprünglich war geplant, einen Nachweis des y-Chromosoms mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) durchzuführen, weshalb Knochenmarkszellen von männlichen Spendertieren in weibliche Tiere implantiert wurden. Jedoch wurde eine schnellere Methode gewählt, um eine möglichst große Anzahl von Tieren bezüglich des Genotyps ihrer Blutzellen analysieren zu können. Die Entnahme des Blutes erfolgte durch einen Einschnitt am Schwanz und der Aufnahme des peripheren Blutes in BD Microtainer™ K2E (Becton Dickinson) in einem Volumen von 300 bis 500 µl.

Zur schnellen Durchführung hätten sich zwei Methoden angeboten:

1. eine Durchflusszytometrie zum Nachweis von TLR9
2. eine Isolation von DNA aus Blut mit anschließender PCR zum Nachweis der TLR9-Defizienz.

Die erste Methode erwies sich beim Austesten an Wildtyp-Mäusen unter Verwendung des Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten Anti-Maus Toll-Like Rezeptor 9 Antikörpers (eBioscience, San Diego, USA) als ungeeignet. Nach Permeabilisierung der Zellen mittels einer Intraprep™ Permeabilization Reagent (Beckman Coulter, Fullerton, USA) war eine intrazelluläre Färbung von Blutzellen aus Wildtyp-Mäusen nicht möglich. Deshalb wurde die Variante der Isolation von DNA aus dem Blut der Mäuse verfolgt.

Die Isolation wurde mit 150 µl peripherem Blut nach Higuchi (Higuchi et al., 1989) durchgeführt. Nach Zugabe von 200 µl Lysis-Puffer wurde der Ansatz sofort gemischt (Vortex Genie®; Thermo Scientific). Das Gemisch wurde in einer Heraeus biofuge pico (Heraeus, Thermo Scientific) für 30 Sekunden bei 13.200 U/min (16.110x g) und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abpipettiert, mit 200 µl Lysis-Puffer vermischt und wiederum für 30 Sekunden bei 13.200 U/min (16.110x g) und Raumtemperatur abzentrifugiert. Diese Schritte wurden wiederholt, bis keine rötliche Verfärbung, die durch Hämoglobin-Reste verursacht wird, mehr sichtbar war. Anschließend wurde das nukleäre Sediment mit 100 µl „PCR Buffer with Nonionic Detergents“ (PBNB) und 20 µl Proteinase K (aus Qiagen DNeasy Tissue Kit, Qiagen) resuspendiert und für 60 Minuten bei 55°C im Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch 10-minütiges Erhitzen bei 97°C. Aus der DNA-Isolierung wurden 5 µl für einen

PCR-Ansatz, wie unter „2.2 Genotypisierung von transgenen Mäusen“ beschrieben, verwendet.

Lysis-Puffer für die DNA-Isolation aus Blut:

0,32 M Saccharose (Merck)
10 mM Tris-HCl, pH 7,5 (Serva)
5 mM Magnesiumchlorid (Merck)
1% Triton X-100 (v/v; Sigma-Aldrich)

PCR Buffer with Nonionic Detergents (PBND):

50 mM Kaliumchlorid* (Merck)
10 mM Tris-HCl, pH 8,3* (Serva)
2,5 mM Magnesiumchlorid* (Merck)
0,1 mg/ml Gelatine* (Sigma-Aldrich)
0,45% Nonidet P40 (v/v; Roche)
0,45% Tween 20 (v/v; Merck)

* autoklaviert

Der Puffer wurde nach dem Ansetzen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Für jede Isolation wurde ein neues Aliquot verwendet.

2.4 Stimulationsprotokoll

Den Mäusen wurde 30 Minuten vor der eigentlichen Stimulation mit 20 mg D-Galactosaminhydrochlorid (D-GalN; Roth, Karlsruhe) pro Maus intraperitoneal (i.p.) verabreicht. D-GalN schwächt die Leberfunktion und verhindert den Abbau der Oligonukleotide. Anschließend wurde den Mäusen die Thioat-stabilisierten CpG-Oligonukleotidsequenz (CpG-ODN, ODN 1668), welches in Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen) resuspendiert wurde, in einer Konzentration von 20 nmol pro Maus i.p. injiziert. Die Thioat-Stabilisierung der Oligonukleotide hatte keinen virulenten Effekt und sollte lediglich die Stabilität der Substanz garantieren, da der schnelle Abbau durch Nukleasen verhindert wird. Folgende Oligonukleotidsequenzen (TibMolbiol, Berlin) wurden in dieser Arbeit verwendet:

CpG-ODN bzw. ODN 1668 oder 1668-Thioat (stimulatorische Sequenz):

5'-TCC-ATG-**ACG**-TTC-CTG-CTG-ATG-CT-3'

ODN H154 oder H154-Thioat (inhibitorische Sequenz):

5'-CCT-CAA-**GCT**-TGA-GGG-G-3'

ODN 1612 oder 1612-Thioat (neutrale Sequenz):

5'-GCT-AGA-**GCT**-TAG-GCT-3'

Die unterschiedlichen Hexamer-Motive, die letztendlich die Virulenz der verschiedenen Oligonukleotid-Sequenzen bestimmen, wurden durch Fettdruck hervorgehoben. Die Sequenzen für ODN H154 und ODN 1612 weisen kein CpG-Motiv innerhalb dieser Hexamere auf, weshalb eine Erkennung über TLR9 ausbleiben sollte.

Zu festgelegten Zeitpunkten, in der Regel 0, 1, 2, 4 und 6 Stunden nach Verabreichung der Oligonukleotide, wurden die Mäuse nach Anästhesie in Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden) durch Genickstreckung (Cervicale Dislokation) getötet. Funktionelle Organe wie Herz, Lunge, Leber und Milz wurden entnommen, in eisgekühltem PBS gewaschen und anschließend in Flüssigstickstoff eingefroren (Schockgefrierung). Das Blut wurde mittels Herzpunktion mit heparinisierten Einwegspritzen entnommen. Die Sera wurden durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4.000 U/min (3.220x g) und 4°C isoliert (Eppendorf 5415 R, Eppendorf) und ebenfalls schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Gewebe- und Blutproben bei -80°C gelagert.

2.5 Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung beim „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA), Western Blot und „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) wurde das „PIERCE® BCA Protein Assay Reagent Kit“ (Thermo Scientific) verwendet, dessen Nachweis von Proteinen auf einer kalorimetrischen Bestimmung mit Bichinonsäure (BCA) bei 562 nm beruht.

Die Reagenzien A und B wurden nach Angaben des Herstellers im Verhältnis 50:1 vermischt. Für die Nachweisreaktion wurden 998 µl des Nachweisreagenz mit 2 µl Proteinisolat gemischt (Verdünnung 1:500). Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm gegen einen Leerwert mit einem Eppendorf BioPhotometer 6131 (Eppendorf) gemessen. Die Angabe der Proteinkonzentration erfolgte automatisch nach BCA-Standarddeichkurve, die im Gerät gespeichert wurde. Der für diese Messung eingesetzte Verdünnungsfaktor musste jedoch berücksichtigt werden.

2.6. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Zur Analyse der Aktivierung der beiden NFκB-Untereinheiten p55 und p65 wurde aus isolierten, nukleären Proteinextrakten ein „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Markierung von Oligonukleotid-Bindungssequenzen mit radioaktivem γ -P³²-ATP am 3'-Ende. Die Oligonukleotid-Bindungssequenzen sind so gestaltet, dass sie spezifisch mit p50 und p65 Untereinheiten in den nukleären Extrakten hybridisieren können.

2.6.1 Isolation nukleärer Proteinextrakte

Die Isolation von nukleären Proteinextrakten erfolgte nach Anleitung des NE-PER Nuclear and Cytoplasmatic Extraction Kit (PIERCE®, Thermo Scientific). Zur Gewährleistung der sequenzspezifischen DNA-Bindung, musste die Quartärstruktur der Proteine während der Isolation erhalten bleiben. Dies wurde durch Aufrechthaltung der Kühlkette durch Lagerung der Proben auf Trockeneis (-80°C) und Zentrifugation der Proben bei 4°C gewährleistet.

Zur Vorbereitung der Isolation wurden Mörser und Pistill auf -80°C und eine Kühlzentrifuge (Eppendorf 5415 R, Eppendorf) auf 4°C vorgekühlt. Während des gesamten Versuches

erfolgte die Lagerung von Mörser und Pistill auf Trockeneis. Die Gewebeproben wurden unter Zugabe von kleinen Mengen Flüssigstickstoff zermörsert. Das feine, trockene Pulver wurde mit einem Spatel in ein vorbereitetes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und abgewogen, da sich die Volumina der Zugabe von Reagenzien aus dem Isolations-Kit nach der Masse der Proben richtete.

Alternativ konnten die Proben mit einem Dispergiergerät T 10 basic Ultra-Turrax® (IKA GmbH & Co. KG, Staufen) homogenisiert werden. Für die Isolation wurden die notwendigen Volumina an „cytoplasmatic extraction reagent“ (CER) I dem auf Eis gelagertem Herzgewebe hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zerkleinerung des Organs, und die Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Auf 100 mg Gewebe wurden 500 µl CER I (1:5), 27,5 µl CER II (3,63:1) und 250 µl „nuclear extraction reagent“ (NER; 1:2,5) benötigt. Um den Abbau von Protein durch Proteasen zu verhindern, wurden den Lösungen CER I und NER Proteaseinhibitoren (alle Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugesetzt (Tabelle 3).

Proteaseinhibitor	CER I	NER
Benzamidin	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
Aprotinin	2 µl/ml	2 µl/ml
Leupeptin	2 µl/ml	2 µl/ml
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,75 mM	2 mM

Tabelle 3: Konzentration der Proteaseinhibitoren in den Lösungen CER I und NER des PIERCE® NE-PER Kits (Thermo Scientific).

Den Proben wurden ihrem Gewicht entsprechend die Volumina an CER I-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben mit einem Vortex-Genie® 2 (Thermo Scientific) gemischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Volumina an CER II-Lösung wurden hinzupipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde wiederum gemischt. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute und wiederholtem Vermischen wurden die Proben für 5 Minuten bei 13.000 U/min (15.700x g) und 4°C zentrifugiert (Eppendorf 5415 R, Eppendorf). Der Überstand entsprach der cytoplasmatischen Proteinfraction und wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Zellpellet enthielt u.a. die Zellkerne. Durch die Zugabe der errechneten Volumina an NER wurden diese lysiert, so dass die nukleären Proteine in Lösung gingen. Die Proben wurden gemischt und für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden die Proben in

Abständen von etwa 10 Minuten wiederholt gemischt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des Reaktionsgemisches für 15 Minuten bei 13.000 U/min (15.700x g) und 4°C (Eppendorf 5415 R, Eppendorf). Der Überstand entsprach den nukleären Proteinextrakten und wurde in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Konzentration der isolierten Proteine wurde mit einem „PIERCE® BCA Protein Assay Reagent Kit“ (Thermo Scientific) überprüft (Siehe 2.5).

2.6.2 Herstellung der Oligonukleotid-Sonde

Zur Durchführung des „electrophoretic mobility shift assays“ wurde das für NFκB komplementäre Oligonukleotid mit radioaktivem $\gamma\text{P}^{32}\text{-ATP}$, die so genannte „hot probe“, hergestellt. Folgendes Gemisch wurde angesetzt:

12,75 μl ddH₂O

5,00 μl 2,5-fach „Forward Reaction Buffer“ (Gibco®, Invitrogen)

3,75 μl (= 5 pmol) NFκB consensus sequence oligonukleotid (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

2,50 μl $\gamma\text{-P}^{32}\text{-ATP}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 3.000 Ci/mmol, GE Healthcare, Freiburg)

1,00 μl T4 Polynukleotidkinase (Gibco®, Invitrogen)

Das Reaktionsgemisch wurde für 20 Minuten bei 37°C in einem Heizblock Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur für 15 Minuten auf 65°C erhöht, um die weitere Reaktion zu inhibieren. Parallel zu dieser Inkubation wurden zwei Bio-Rad Micro Bio-Spin® 6 Chromatography Columns (Bio-Rad) für zwei Minuten bei 3.400 U/min (1.100x g) (Heraeus Biofuge Pico, Thermo Scientific) abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Chromatographie-Säulen wurden auf neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde auf diese Säulen überführt und für zwei Minuten bei 3.400 U/min (1.100x g) zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt das radioaktiv markierte Oligonukleotid, die „hot probe“. Zur Bestimmung der Aktivität wurden 1 μl „hot probe“ mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold™, PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim) vermischt und in einem Szintillationszähler (Beckman Coulter) gemessen. Die durchschnittliche Aktivität lag bei 80.000 Cherenkov counts pro μl bei einem akzeptablen Minimum von 50.000 Cherenkov counts pro μl . Die „hot probe“ konnte nach Ansetzung bei ausreichender Aktivität in einem Plexiglasbehälter bei -20°C für weitere Versuche bis zu 14 Tage gelagert werden.

2.6.3 Hybridisierung

Nach der Herstellung der „hot probe“ erfolgte die Hybridisierung der nukleären Proteinextrakte mit den radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden. Die Protein-Proben wurden auf Eis aufgetaut, die Konzentration wurde mittels eines „PIERCE® BCA Protein Assay Reagent Kit“ (Thermo Scientific) bestimmt. Für die Hybridisierung wurden 20 µg nukleäre Proteine mit ddH₂O in einem Gesamtvolumen von 17 µl eingesetzt. Folgende Reaktionsansätze wurden pro Probe verwendet:

17,00 µl nukleärer Proteinextrakt (20 µg) in ddH₂O

7,00 µl Gemisch aus 1 µg/µl Poly(dI-dC) (GE Healthcare) und 5-fach „Binding Buffer“ (Bio-Rad; 60 mM Hepes, 20 mM Tris, 300 mM KCl, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 50% Glycerol, pH 7,9) im Verhältnis 2:5

1,00 µl „hot probe“

Die Ansätze für die Hybridisierung (25 µl Gesamtvolumen) wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.6.4 Gelelektrophorese

Die Ansätze aus der Hybridisierung wurden in frisch angesetzten Acrylamid-Gelen aufgetrennt. Hierzu wurden die kleineren Glasplatten der Bio-Rad Protean IIx Gelelektrophorese-Einrichtung (Bio-Rad) mit 500 µl Sigmacote® (Sigma-Aldrich) silikonisiert. Die Gelkammern wurden mit dem dazugehörigen Abstandshaltern in einer Gießvorrichtung zusammengesetzt. Die Geltaschen, die nach Einsatz eines Gelkammes entstehen, wurden mit einem wasserfesten Stift vorgezeichnet und nummeriert. Das Acrylamid-Gel wurde mit folgenden Lösungen angesetzt:

6,75 ml 30%iges Acrylamid (National Diagnostics, Atlanta, USA)

2,50 ml 50%iges Glycerol (Serva, Heidelberg)

5,00 ml 5-fach TBE-Puffer (8,9 M Tris, 8,9 M Borsäure, 200 mM EDTA, pH 8,3; Invitrogen)

ad 50 ml ddH₂O

150 µl 30% Ammoniumpersulfat (APS; Bio-Rad)

75 µl TEMED (Bio-Rad)

Die Acrylamidgele wurden in Frischhaltefolie gepackt und konnten für vier bis 24 Stunden bei 4°C gelagert werden. Die Elektrophorese der Proben erfolgte mit 0,5-fach TBE (1,78 M Tris, 1,78 M Borsäure, 40 mM EDTA, pH 8,3; Invitrogen). Zunächst wurde das Gel für 30 Minuten bei 90 Volt vorgewärmt (Bio-Rad Power Supply 3000 Xi, Bio-Rad). Anschließend wurden die Gelkammern mit den Hybridisierungsansätzen beladen und zunächst für 30 Minuten bei 100 Volt, anschließend für 150 Minuten bei 160 Volt aufgetrennt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel auf ein „Whatman® Cellulose Chromatography Paper Grade 3MM Chr“ (Whatman, Maidstone, England) aufgenommen und mit Frischhaltefolie (Polyvinylchlorid) bedeckt. Die Trocknung des Gels erfolgte zwischen zwei weiteren, größeren Whatman-Chromatographiefilter-Papieren mit einem Bio-Rad Vacuum Gel Dryer Model 583 (Bio-Rad) bei 70°C für etwa 45 Minuten. Aus den fixierten Gelen wurde eine Autoradiographie auf Röntgenfilm angefertigt. Die Belichtungsdauer der Filme betrug 48 bis 72 Stunden.

2.7. Ribonuclease Protection Assay

Der „Ribonuclease Protection Assay“ (RPA) ist eine sensitive und schnelle Methode, um spezifische mRNA-Transkripte zu identifizieren und zu quantifizieren. Bei dieser Methode wurden mit α -P³²-UTP radioaktiv markierte RNA-Sonden unter Einsatz von Einzelstrang-spezifischen Ribonukleasen (RNase) verwendet, die es ermöglichten, mehrere Proben und Transkripte gleichzeitig zu untersuchen. Das Prinzip dieses Versuches beruhte auf einer Hybridisierung der isolierten mRNA in den Proben mit einer im Überschuss zugegebenen einzelsträngigen „Antisense“-mRNA-Sonde. Überschüssige, nicht gebundene oder nicht zu den Zielsequenzen homologe mRNA wurde nach Hybridisierung durch eine Einzelstrang-spezifische RNase verdaut. Die RNase wurde daraufhin inaktiviert und extrahiert. Die Sonden-Target-Hybride wurden in einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Autoradiographie durch Exposition auf einem Röntgenfilm.

2.7.1 Isolation von Gesamt-RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA aus Gewebe wurde mit der Guanidiniumthiocyanat-Methode durchgeführt (Chomczynski und Sacchi, 1987). Hierzu wurde das gesamte Gewebe in einem Dispergiergerät T 10 basic Ultra-Turrax® (IKA GmbH & Co. KG) in TRIzol® Reagent (Invitrogen) homogenisiert. Für die Isolation wurden in der Regel 3 ml TRIzol® Reagent pro Lungenhälfte oder ganzem Herzen eingesetzt. Bei der Aufarbeitung eines halben Herzens hingegen nur 2 ml des Reagenz. Die Reagenzien wurden in ein 14 ml Falcon®-Reaktionsgefäß (Becton Dickinson) pipettiert, welches sich für die Zerkleinerung der Organe mit dem Dispergierwerkzeug am besten eignet. Zwischen den Homogenisationsschritten wurde das Dispergiergerät einmal in 4 molarer Guanidinthiocyanat (GTC) und zweimal in vorgekühltem, 0,1%igem Diethylpyrocarbonat (DEPC) gereinigt. Das Homogenisat wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert, bevor Chloroform (Merck, Darmstadt; 200 µl pro ml TRIzol® Reagent) hinzupipettiert wurde. Der Ansatz wurde mit einem Vortex Genie® (Thermo Scientific) vorsichtig gemischt und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. In einer auf -9°C vorgekühlten Eppendorf Centrifuge 5810R (Eppendorf) wurden die Isolationsansätze für 30 Minuten bei 4.000 U/min (3.220x g) abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation kommt es zu einer Auftrennung in drei Phasen. Die untere Phase besteht aus TRIzol®, die Interphase aus denaturierten Proteinen, und die obere, klare bis gelbliche Phase enthält die gelöste Gesamt-RNA.

Diese wurde vorsichtig herauspipettiert und in ein neues 15 ml Falcon®-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Lösung der oberen Phase mit 500 µl Isopropanol (Merck) pro ml eingesetztem TRIzol® Reagent vermischt (Vortex Genie®, Thermo Scientific) und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Mit diesem Schritt wurde die Gesamt-RNA präzipitiert. Der Ansatz wurde dann für 20 Minuten bei 4.000 U/min (3.220x g) in der weiterhin vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und verworfen. Das Sediment wurde anschließend in 75%igem Ethanol (Merck), welches mit 0,1% DEPC angesetzt wurde, gewaschen (Entsalzung). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 4.000 U/min (3.220x g) erhielt man ein sichtbares Sediment, das die Gesamt-RNA enthielt. Nach Abnahme des Überstandes wurde dieses Sediment für 10 bis 15 Minuten unter dem Abzug getrocknet, bevor es in 50 oder 100 µl 0,1%igem DEPC resuspendiert wurde. Die isolierte RNA wurde bis zur Untersuchung bei -80°C gelagert.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA

Die Konzentration an Gesamt-RNA in den isolierten Proben wurde mit einem Eppendorf BioPhotometer 6131 (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Hierzu wurden 2 µl des Isolates in 98 µl 0,1%igem DEPC gelöst (Verdünnung 1:50). Nach Bestimmung der Absorption konnte die Konzentration an mRNA nach folgender Formel bestimmt werden:

$$\text{Messwert } \lambda_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$$

Für den RPA wurden 20 µg Gesamt-RNA pro Probe verwendet. Das entsprechende Volumen wurde aus den Isolaten entnommen und lyophilisiert (Siehe „2.7.4 Hybridisierung“).

2.7.3 Synthese der Antisense-mRNA-Sonde

Zur Synthese der „Antisense“-mRNA-Sonde wurde ein speziell angefertigtes „custom template template set“ von GE Healthcare verwendet, welches die komplementäre DNA (cDNA) folgender Zielgene („target genes“) enthielt: TLR2, TLR4, iNOS, TNF- α , IL-1 β und IL-6. Des Weiteren enthielt das Template die cDNA der konstitutiv exprimierten Gene („house-keeping gene“) L32 und Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Zur Synthese der Sonde wurde folgender Ansatz pipettiert:

- 1 µl RNasin (BD Biosciences)
- 1 µl Ribonukleotid -Mix GACU (BD Biosciences)
- 2 µl Dithiothreitol (DTT; BD Biosciences)
- 4 µl 5-fach Transkriptionspuffer (In Vitro Transkription Kit, BD Biosciences)
- 10 µl α -P³² UTP (9,25 Mbq / 250 µCi; GE Healthcare)
- 1 µl „custom template set“ (BD Biosciences)
- 1 µl T7-RNA-Polymerase (BD Biosciences)

Das Reaktionsgemisch zur Synthese der radioaktiv-markierten Antisense-mRNA-Sonde wurde für 90 Minuten bei 37°C mit einem Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf) inkubiert. Die Transkription wurde durch eine 30-minütige Inkubation mit 2 µl DNase (BD Biosciences) gestoppt. Danach wurden zur Enzymreaktion folgende Lösungen pipettiert:

- 25 µl 20 mM EDTA (BD Biosciences)
- 25 µl Citrat-gepuffertes Phenol (Applichem, Darmstadt)
- 25 µl Chloroform-Isoamylalkohol 50:1 (Merck)
- 2 µl Hefe-tRNA (BD Biosciences).

Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 13.000 U/min (16.040x g) mit einer Heraeus Biofuge pico (Thermo Scientific) wurde der RNA-haltige klare Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 50 µl Chloroform-Isoamylalkohol gewaschen. Nach einer weiteren Überführung in ein drittes Reaktionsgefäß wurde der Sonde eine Mischung aus 50 µl 4 M Ammoniumacetat (BD Bioscience) und 250 µl Ethanol absolut (Merck) zugesetzt. In dieser Lösung wurde die Antisense-mRNA bei -80°C für mindestens 30 Minuten präzipitiert und zu einem Pellet bei 13.000 U/min (16.040x g) für 15 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet wurde in 90%igem Ethanol (Merck) gewaschen und für 10 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurde die Antisense-mRNA in 30 µl Hybridisierungspuffer (BD Biosciences) gelöst. Zur Messung der Aktivität wurde 1 µl der RNA-Lösung in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold™, PerkinElmer LAS GmbH) gelöst und mit einem Szintillationszähler Beckman LS 6000 IC (Beckman Coulter) gemessen. Die durchschnittliche Aktivität lag bei 3.000.000 Cherenkov counts pro µl bei einem akzeptablen Minimum von 300.000 Cherenkov counts pro µl.

2.7.4 Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden aus jeder zu untersuchenden Probe 20 µg mRNA eingesetzt. Das Volumen, in dem 20 µg isolierte mRNA enthalten waren, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Lyophilisierung in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Savant Instruments Inc., USA) abzentrifugiert, bis nur noch ein Sediment sichtbar war. Die Sedimente wurden in je 8 µl Hybridisierungspuffer (BD Biosciences) gelöst. Von der radioaktiv-markierten Antisense mRNA wurden 2 µl zu jeder Probe gegeben. Die Reaktionsgemische wurden mit einem Tropfen inertem Mineralöl (Sigma-Aldrich) verschlossen. Anschließend wurden die Proben in einem Eppendorf Thermomixer comfort (Eppendorf) für 5 Minuten auf 90°C erhitzt.

Der Heizblock wurde langsam um 1°C pro Minute auf 56°C abgekühlt, und die Proben wurden über Nacht bei dieser Temperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben auf eine Temperatur von 30°C gebracht und mit 100 µl RNase-Cocktail, bestehend aus RNase-Puffer:RNase A und Template-Mix (RPA-Kit, BD Biosciences) im Verhältnis 417:1 (2,5 ml RNase Puffer und 6 µl RNase A + Template-Mix für 20 Proben) für 30 Minuten bei dieser Temperatur inkubiert. Vor Abschluss des Verdau wurde ein Proteinase-Cocktail aus Proteinase-Puffer, Proteinase K und Hefe-tRNA (BD Biosciences) im Verhältnis 13:1:1 (390 µl Proteinase-Puffer, 30 µl Proteinase K und 30 µl Hefe-tRNA für 20 Proben) vorbereitet. Von diesem Gemisch wurden jeweils 18 µl pro Probe in neue Reaktionsgefäße aliquotiert. Der RNase-Verdau wurde unterhalb der Ölphase herauspipettiert und mit Proteinase K bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Die RNase sowie die Proteinase K wurden durch die Zugabe von 65 µl Citrat-gepuffertes Phenol (Applichem) und 65 µl Chloroform:Isoamylalkohol (Merck; im Verhältnis 50:1) extrahiert. Die Reaktionsansätze wurden für 5 Minuten bei 13.000 U/min (16.040x g) abzentrifugiert, die klaren Überstände wurden in Ansätze mit 120 µl Ammoniumacetat (Merck) und 650 µl Ethanol absolut (Merck) überführt und für 30 Minuten bei -80°C präzipitiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 U/min (16.040x g) wurde das Pellet in 90%igem Ethanol gewaschen und für 10 Minuten luftgetrocknet. Die getrockneten und Ethanol-freien mRNA-Doppelstrang-Proben wurden nun in 5 µl RNA-Gelelektrophorese-Ladepuffer (BD Biosciences) gelöst und für 5 Minuten bei 90°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt. Ein Standard wurde aus einer 1:100-Mischung von nicht-hybridisierter „Antisense“-mRNA-Sonde und Hybridisierungspuffer hergestellt. 2 µl dieses Gemisches wurden mit 3 µl RNA-Ladepuffer gemischt und parallel zu den zu untersuchenden mRNA-Proben denaturiert und abgekühlt.

2.7.5 Gelelektrophorese

Vor dem Zusammenbau der Gelelektrophorese-Kammer Bio-Rad Sequi-Gene® GT Sequencing Cell (Bio-Rad) wurden die Glasplatten gründlich mit Ethanol (Merck) und ddH₂O gereinigt. Die obere, abnehmbare Glasplatte wurde mit 1 ml Sigmacote® (Sigma-Aldrich) eingerieben, um eine spätere Adhäsion des Gels an dieser Platte zu vermeiden. Anschließend wurde die Apparatur zusammengesetzt und ein 0,4 mm dickes Gel aus folgenden Komponenten gegossen:

- 30,0 ml ultra pure SequaGel® 6 (National Diagnostics)
- 7,5 ml ultra pure SequaGel® Complete (National Diagnostics)
- 0,3 ml 10% APS-Lösung (Bio-Rad)

Das Gemisch wurde horizontal mit einer 50 ml Perfusionspritze (Becton Dickinson) in die Gelkammer gefüllt. Der Gelkamm zum Beladen der RNA-Proben wurde am oberen Rand des Gels eingebracht. Das Gel war nach etwa zwei Stunden fertig polymerisiert. Nach Entnahme des Kammes wurde das Gel vertikal in die Elektrophorese-Apparatur Sequi-Gen GT Sequencing Cell (Bio-Rad) gestellt. Die Elektrophorese-Apparatur wurde mit 0,5-fachem TBE-Laufpuffer (0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,3 (Merck)) gefüllt. Vor dem Beladen mit den Proben wurde das Gel bei mit einer Leistung von 50 Watt für 30 Minuten vorgewärmt (Bio-Rad Power Supply 3000 Xi, Bio-Rad). Die Proben wurden anschließend aufgetragen und bei einer Spannung von 190 Volt für 120 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach Ablauf der Elektrophorese wurde die obere Glasplatte abgenommen, und das Gel mit „Whatman® Cellulose Chromatography Paper 3MM Grade“ (Whatman) in der gleichen Größe aus der Kammer entnommen. Das Polyacrylamid-Gel wurde mit einer Frischhaltefolie aus Polyvinylchlorid bedeckt und für 60 Minuten bei 70°C in einem Vacuum Gel Dryer Model 583 (Bio-Rad) getrocknet. Aus den fixierten Gelen wurde eine Autoradiographie auf Röntgenfilm angefertigt. Nach einer Belichtungsdauer von 48 bis 72 Stunden wurden die Filme entwickelt.

2.7.6 Auswertung

Neben der Autoradiographie wurde eine digitale Auswertung des „RNase Protection Assays“ durchgeführt. Hierzu wurde eine „Phosphoimager-Screen“ Kasette (Fuji-Film, Düsseldorf) nach Auflage des Gels für 30 bis 60 Minuten belichtet. Die Filme wurden zur quantitativen Auswertung mit einem Laserscanner FLA 300 (Fuji-Film) eingescannt. Die Intensität der durch die Hybridisierung entstandenen Banden wurde mit der Software AIDA Image Analyzer Version 3.45 (Raytest GmbH, Sprockhövel) ausgewertet. Die Expression der Banden wurde auf die Expression des ribosomalen Proteins L32, einem konstitutiv exprimierten Gen, normalisiert (Chomczynski und Sacchi, 1987; Müller et al., 2001). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software). In einer multifaktoriellen Varianzanalyse (2-Wege-Anova) mit einer Bonferoni post-hoc-Analyse wurde die statistische Signifikanz, die bei einem Niveau von $p < 0,05$ lag, bestimmt.

2.8 Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Im späteren Zeitverlauf dieser Arbeit wurde die quantitative „Real-Time“-PCR (qRT-PCR) zur Analyse der mRNA-Expression angewandt. Diese Methodik erlaubte es, eine größere Anzahl von Proben in einem direkten Vergleich analysieren zu können. Die Isolation der mRNA wurde weiterhin mit TRIzol® (Vergleiche 2.7.1) durchgeführt. Vor der Analyse der Proben wurde eine reverse Transkription durchgeführt, so dass letztendlich die komplementäre DNA (cDNA) für die Messung eingesetzt wurde. Zur Durchführung der quantitativen „Real Time“-PCR wurden kommerziell erhältliche Primer-Sonden der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) verwendet.

2.8.1 Synthese der komplementären DNA (cDNA)/Reverse Transkription

Die Isolation der mRNA erfolgte mit TRIzol®, wie in 2.7.1 beschrieben. Der RNA-Gehalt der Proben wurde photometrisch quantifiziert (Vergleiche 2.7.2). Für die Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurde eine RNA-Menge von 1 µg pro Ansatz verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung eines „Omniscript® RT Kit“ (Qiagen). Ein Master-Mix aus folgenden Komponenten wurde angesetzt (Tabelle 4).

Komponente	Master-Mix einfach [µl]
10 x RT-PCR Buffer	2
dNTP-Mix (5 nmol each)	2
Oligo-dT-Primer	2
Omniscript® reverse Transcriptase	1
mRNA	variabel, mit RNase-free H ₂ O auf 13 µl aufgefüllt

Tabelle 4: Ansatz für die reverse Transkription nach Anleitung des Qiagen „Omniscript® RT Kits“ für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Auf die Zugabe eines RNase-Inhibitors wurde verzichtet, da die Proben relativ zügig verarbeitet wurden und die Kühlkette während des Ansetzens aufrecht erhalten wurde. Die reverse Transkription wurde mit einem Thermocycler (Whatman Biometra T-Gradient 96; Biometra) durchgeführt. Hierzu wurden die Proben für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlung der Proben auf 4°C gestoppt. Bis zur Durchführung der quantitativen „Real Time“-PCR wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

2.8.2 Analyse der Genexpression

Die qRT-PCR erfolgte mit dem TaqMan 7900HT (Applied Biosystems) unter Verwendung von 384-Well-Platten. Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Primer-Sonden verwendet (Tabelle 5).

Primer-Sonde	Produkt-Nummer
mouse GAPDH (endogene Kontrolle)	Mm99999915_g1
mouse TLR9	Mm00446193_m1

Tabelle 5: Verwendete Sonden für die qRT-PCR (Applied Biosystems, Darmstadt)

Für die Vorbereitung der Sonden wurde ein „2 x PCR Universal Master Mix“ (Applied Biosystems) verwendet. Die Analyse einzelner Proben pro Zielgen erfolgte in einer Dreifachbestimmung (Triplett). Für die Analyse von 16 Proben in einem Triplett wurde ein Ansatz für 48 Wells (3 x 16) vorbereitet. Hierzu wurde folgender „Master-Mix“ pro Versuch gewählt (Tabelle 6).

Komponente	Master-Mix einfach [µl]	Master-Mix pro Zielgen bei der Belegung von 48 Wells [µl]
PCR Master-Mix (2 x)	5,0	280
RNase-free H ₂ O	3,5	196
Primer Sonde	0,5	28

Tabelle 6: Ansatz eines „Master-Mixes“ für die qRT-PCR bei der Belegung von 3 x 16 Wells (48 Wells)

Jedes Well wurde zunächst mit einer 8-Well Multiwellpipette mit 9 µl „Master-Mix“ beladen. Anschließend wurden die gleichen Vertiefungen mit 1 µl Ansatz aus der cDNA-Synthese beladen, so dass für die Analyse eine cDNA-Menge von 50 ng (1 µl aus der reversen Transkription mit 1 µg Gesamt-mRNA in 20 µl) eingesetzt wurde. Die qRT-PCR erfolgte in einer relativen $\Delta\Delta C_T$ Studie. Die Messung wurde mit 50°C für 2 Minuten und 95°C für 10 Minuten gestartet. In 40 Zyklen erfolgte ein Wechsel von 95°C für 15 Sekunden und 60°C für 60 Sekunden. Als endogene Kontrolle wurde das mausspezifische, konstitutiv exprimierte Gen („house-keeping gene“) Glycerinaldehyd-phosphat-Dehydrogenase („mouse GAPDH“) verwendet. Alle weiteren Gene dienten als Zielgene („target genes“), deren relative Expression analysiert werden sollte. Die mRNA-Probe einer unstimulierten WT-Maus diente als interne Kontrolle zur Bestimmung des Relativen Quotienten (RQ).

2.8.3 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte in einer sogenannten „quantitativen $\Delta\Delta C_T$ study“, in der die Ergebnisse aus der qRT-PCR mit der Software SDS 2.2 (Applied Biosystems) analysiert wurden. Die Software ermöglicht bei einer relativen Quantifizierung die automatische Bestimmung der C_T -Werte und der resultierenden relativen Quotienten (RQ). Für diese Untersuchungen dienten „Maus GAPDH“ als endogene Kontrolle der Genexpression. Die mRNA einer unstimulierten WT-Maus diente als Referenz für die relative Expression in der Darstellung als relativer Quotient (RQ). Diese Werte wurden mit einander verglichen, um beurteilen zu können, um das wievielfache die Genexpression der Zielgene sich erhöht oder erniedrigt hat. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software). In einer multifaktoriellen Varianzanalyse (2-Wege-Anova) mit einer Bonferoni post-hoc-Analyse wurde die statistische Signifikanz, die bei einem Niveau von $p < 0,05$ lag, bestimmt.

2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Neben der Analyse der mRNA-Expression wurde die Konzentration (in pg Zytokin pro mg Protein) der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α in einer Zellsuspension bestimmt, die aus Herzen und Lungen gewonnen wurde. Das Prinzip dieser Messung beruhte auf einer quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay-Technik. Ein spezifischer Antikörper (AK) für die jeweiligen Zytokine (TNF- α und IL-1 β – polyklonaler AK, IL-6 – monoklonal AK) wurde auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte beschichtet. Die Standards, Kontrollen und Proben wurden in wässriger Lösung in die jeweiligen Wells pipettiert. Die Zytokine in diesen Lösungen wurden anschließend durch die immobilisierten Antikörper gebunden. Nachdem die ungebundenen Substanzen in einem Waschschrift entfernt wurden, wurde ein Enzym-gebundener polyklonaler Antikörper, der spezifisch für das jeweilige Zytokin war, hinzugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die ungebundenen Antikörper-Enzym Reagenzien entfernt, und die Substrat-Lösung hinzugegeben. Das Produkt der Enzymreaktion war eine blaue Lösung, die sich durch Ansäuerung mittels Stopp-Lösung („Stop Solution“) gelb verfärbte. Dieser Farbumschlag war notwendig, um die photometrische Messung bei 450 nm durchzuführen. Die Intensität der gemessenen Farbreaktion stand in einem proportionalen Verhältnis zum vorhandenen, gebundenen Zytokin. Mittels einer Standardkurve wurde die Konzentration des jeweiligen Zytokins bestimmt.

2.9.1 Proteinisolation aus Gewebe für die ELISA-Messung

Für die Isolation von Proteinen aus Herzen und Lungen wurde folgender Lysis-Puffer verwendet (Tabelle 7).

Lösung	Volumen [ml]
PBS (autoklaviert)	9,60
Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim, Deutschland)	0,40
Triton X-100 (Sigma-Aldrich)	0,01
250 mM PMSF in Isopropanol gelöst	0,01

Tabelle 7: Zusammensetzung des Lysis-Puffers für die Isolation von Proteinen für die ELISA-Messung

Zur Herstellung einer Lösung des Protease-Inhibitors wurde eine Tablette der Roche complete mini tab (Roche, Mannheim) vollständig in 2 ml PBS aufgelöst. Der Puffer wurde während der Aufbereitung der Proben auf Eis gekühlt. Die gefrorenen Herzen wurden in 1 ml ELISA-Puffer mit einem Dispergiergerät T 10 basic Ultra-Turrax® (IKA GmbH & Co. KG) mazeriert. Die Zellsuspensionen wurden 15 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend wurden die Zelltrümmer bei 13.000 U/min (15.700x g) für 15 Minuten bei 4°C (Eppendorf 5415 R, Eppendorf) abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und aliquotiert. Die aufbereiteten Proben wurden bis zur Messung bei -80°C gelagert.

2.9.2 Bestimmung der Zytokin-Konzentration im Gewebe

Für die Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen wurden kommerziell erhältliche Quantikine® ELISA-Kits der Firma R&D Systems GmbH (Wiesbaden) verwendet (Tabelle 8).

ELISA-Kit bzw. Zytokin	Produkt-Nummer
Quantikine® mouse IL-1 β	M6000B
Quantikine® mouse IL-6	MLB00B
Quantikine® mouse TNF- α	MTA00

Tabelle 8: Verwendete Quantikine® ELISA-Kits der Firma R&D Systems GmbH

Die Herstellung der Standards und die Einhaltung der Inkubationszeiten erfolgten nach Anleitung der Herstellerfirma. Die Waschschriffe der 96-Well-Platten wurde in 5 Zyklen mit einem Atlantis Microplate Washer V1.3 (Asys Hitech, Eugendorf, Österreich) durchgeführt. Nach Zugabe der „stop solution“ (Stopp-Lösung) wurde die Reaktion in den Wells beendet.

Parallel zur ELISA-Messung wurde die Proteinkonzentration in den zu untersuchenden Proben mit einem „PIERCE BCA™ Protein Assay Reagent Kit“ bestimmt (Vergleiche „2.5 Proteinbestimmung“). Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die Proteinkonzentration der Proben [mg/ml] bestimmt.

Mit dem ELISA-Reader Asys EXPERT 96 (Asys Hitech) wurden die optischen Dichten der Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Kontrollwellenlänge von 540 nm gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software MIKROWIN 2000 V 1.0 (Mikrotek, Overath). Mit Hilfe dieses Programms wurde eine Standardkurve in einer 4-Punkt-Auftragung erstellt. Die minimal detektierbare Konzentration betrug entsprechend der Angabe des Herstellers 1,6 pg pro Mililiter. Signifikante Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen konnten vom Hersteller ausgeschlossen werden. Aus den gemessenen, optischen Dichten der Proben im Zusammenhang mit ihren Proteinkonzentrationen wurde automatisch die Zytokin-Konzentration [pg pro mg Protein] bestimmt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software). In einer multifaktoriellen Varianzanalyse (2-Wege-Anova) mit einer Bonferoni post-hoc-Analyse wurde die statistische Signifikanz, die bei einem Niveau von $p < 0,05$ lag, bestimmt.

2.10. Bestimmung der Zytokinkonzentration im Serum mittels „Multiplex Cytokine Assay“

Für die Bestimmung der Zytokinkonzentration in den Sera wurde ein „Multiplex cytokine assay“ durchgeführt. Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Kai Zacharowski (ehemals Universitätsklinikum Düsseldorf, jetzt Anästhesiologie, Universitätsklinikum Frankfurt) durchgeführt. Diese Methodik hatte gegenüber herkömmlichen ELISA-Kits den Vorteil, dass mit dem geringen Volumen an Sera, die den Versuchstieren entnommen werden konnte (bis zu 200 µl pro Tier), mehrere Zytokine gleichzeitig gemessen werden konnten.

Das Blut wurde durch arterielle Punktion des abdominalen Aortenbogens entnommen. Zwei 1-Mililiter-Infusionsspritzen wurden mit 1 ml Heparin (5000 IU/ml) aufgezogen und wieder entleert. Die Benetzung der Spritze reichte aus, um die Blutgerinnung zu hemmen (Antikoagulation). Das Blut wurde entnommen und bei 4.000 U/min (3.400x g) für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Überstände (Sera) wurden bei -20°C gelagert.

Unmittelbar nach dem Auftauen wurden die Proben bei 37°C analysiert, um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Die Konzentration an TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Mouse Cytokine 10-Plex für den Luminex™ Laser; BioSource Europe, Nivelles, Belgien) wurde nach der „microsphere array technique“ (Luminex 100 system, Luminex Corporation, Austin, USA) gemessen. Die Messung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software). In einer multifaktoriellen Varianzanalyse (2-Wege-Anova) mit einer Bonferoni post-hoc-Analyse wurde die statistische Signifikanz, die bei einem Niveau von $p < 0,05$ lag, bestimmt.

2.11 Western Blot

Mittels Western Blot-Technik wurde die Proteinexpression von TLR9, sowie der „Mitogen-aktivierenden Protein Kinasen“ (MAP-Kinasen) ERK1/2 („extrazellulär regulierte Kinasen 1 und 2“) und „Protein 38“ (p38) untersucht. Für diese Versuche wurden äquivalente Mengen an Protein (40 µg) in einer reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Molekülmasse [Kilodalton (kD)] aufgetrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (GE Healthcare), die als Blot bezeichnet wird, erfolgte die Behandlung mit entsprechenden primären und sekundären, „horseradish peroxidase“- (HRP)-konjugierten Antikörpern. Die Chemilumineszenz, die nach Zugabe der Elektrochemolumineszenz (ECL)-Lösung (Perkin Elmer, Waltham, USA) gestartet wurde, konnte durch Auflegen eines Röntgenfilm (Fuji-Film) bis zu 30 Minuten nach Inkubation mit dem Substrat nachgewiesen werden.

2.11.1 Proteinisolation für den Western Blot

Für die Verwendung von Proben für den Western Blot wurden verschiedene Methoden der Proteinisolation durchgeführt. Für den Nachweis der TLR9-Proteinexpression wurde ein Lysis-Puffer mit folgender Zusammensetzung verwendet (Tabelle 9).

50 mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochloride (Tris-HCl), pH 7,4 (Serva)
150 mM	Natriumchlorid (NaCl) (Merck)
1 mM	Ethylendiamintriessigsäure (EDTA) (Merck)
1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Merck)
0,1%	Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva)
1,0%	Natriumdeoxycholat (Merck)
5 µg/ml	Leupeptin (Sigma-Aldrich)
5 µg/ml	Aprotinin (Sigma-Aldrich)

Tabelle 9:: Zusammensetzung des Lysis-Puffers zur Analyse TLR9-Proteinexpression

Für die Isolation der Proben zum Nachweis der MAP-Kinasen wurde ein Lysis-Puffer (RIPA-Puffer) mit folgenden Komponenten verwendet (Tabelle 10).

20 mM	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochloride (Tris-HCl), pH 7,4 (Serva)
50 mM	Natriumchlorid (NaCl) (Merck)
10 mM	Ethylendiamintriessigsäure (EDTA; Merck)
50 mM	Natriumfluorid (Merck)
20 mM	Natriumpyrophosphat (Merck)
1 mM	Natriumorthovanadat (Merck)
1 %	Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
1 mM	PMSF(Merck)
5 µg/ml	Benzamidin (Sigma-Aldrich)
5 µg/ml	Leupeptin (Sigma-Aldrich)
5 µg/ml	Aprotinin (Sigma-Aldrich)

Tabelle 10: Zusammensetzung des Lysis-Puffers für die Analyse der Expression der MAP-Kinasen

Die gefrorenen Herzen wurden in 1 ml Lysis-Puffer mit einem Dispergiergerät T 10 basic Ultra-Turrax® (IKA GmbH & Co. KG) mazeriert. Die Proben wurden für 15 Minuten im Puffer auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation bei 13.000 U/min (15.700x g) und 4°C für 15 Minuten (Eppendorf 5415 R, Eppendorf) abgenommen und aliquotiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde, wie in „2.5 Proteinbestimmung“ beschrieben, durchgeführt.

2.11.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die isolierten Proteine wurden mit je 20 µl Ladepuffer („loading buffer“) in äquivalenten Mengen zu 80 µg mit ddH₂O auf ein Volumen von 70 µl verdünnt und anschließend für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Für die SDS-PAGE wurden je 35 µl Protein-Ladepuffer-Gemisch eingesetzt.

Ladepuffer (4-fach):

100 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Serva)

8,0% Glycerol (Serva)

3,2% SDS (Serva)

8,0% 2,6-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

0,001% Bromphenolblau (w/v; Sigma-Aldrich)

Für die Elektrophorese wurde eine „Bio-Rad Mini-Protean II“-Kammer (Bio-Rad) verwendet. Die Glasplatten der Apparatur wurden vor dem Zusammensetzen mit 70% Ethanol (Merck) und ddH₂O gereinigt. In der Regel wurden 1 mm „Spacer“ und „10 Well“-Kämme verwendet. Die Trenngele setzten sich entsprechend der gewählten Acrylamid-Konzentration aus folgenden Komponenten zusammen (Tabelle 11).

Acrylamidkonzentration	7,5%	10%	12%
ddH ₂ O	12 ml	10,0 ml	8,4 ml
Trenngel-Puffer	6 ml	6 ml	6 ml
Acrylamid 19:1 (Bio-Rad)	6 ml	8 ml	9,6 ml
10% APS (Bio-Rad)	80 µl	80 µl	80 µl
TEMED (Bio-Rad)	12 µl	12 µl	12 µl

Tabelle 11: Komponenten der Trenngele für die SDS-PAGE

Zusammensetzung des Trenngel-Puffers:

750 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 8,8 (Serva)

0,4 % SDS (Serva)

Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel aus folgenden Lösungen gegossen (Tabelle 12).

ddH ₂ O	7,2 ml
Sammelgel-Puffer	3 ml
Acrylamid (Bio-Rad)	1,8 ml
10% APS (Bio-Rad)	61,2 µl
TEMED (Bio-Rad)	18 µl

Tabelle 12: Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-PAGE

Zusammensetzung des Sammelgel-Puffers:

- 250 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 6,8 (Serva)
- 0,4 % SDS (Serva)

Die Kämme wurden dem Sammelgel aufgesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurden je 35 µl vorbereitete Probe in eine Lauftasche aufgetragen. Als Marker für die Größe der aufgetrennten Proben wurde ein „Bio-Rad Precision Plus Protein Standard“ (Bio-Rad) verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 90 Volt für 30 Minuten gestartet, anschließend wurde die Spannung bis zum Ende der Auftrennung auf 130 Volt erhöht. Der Laufpuffer setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base), pH 8,3 (Serva)
- 192 mM Glycin (Merck)
- 0,5 % SDS (Serva)

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Trenngel aus der Apparatur entnommen. Eine „Bio-Rad Mini-Protean II“-Kammer (Bio-Rad) wurde für den Transfer vorbereitet und aufgebaut. Eine Nitrocellulosemembran (GE Healthcare) wurde auf das Trenngel aufgelegt. Nach Zugabe des Transfer-Puffers wurde der Blot gestartet. Der hier verwendete Transfer-Puffer hatte folgende Zusammensetzung:

- 112,5 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 8,3 (Serva)
- 865,0 mM Glycin (Merck)
- 20 % Methanol (Merck)

Für die Durchführung des Transfers wurden zwei Methoden etabliert:

1. Transfer mit 500 mA für 90 Minuten bei 4°C
2. Transfer mit 100 mA für mindestens 16 Stunden bei Raumtemperatur.

Nach Beendigung des Transfers wurden die Banden des Markers, die bei erfolgreichem Blot auf der Nitrocellulosemembran erkennbar sind, mit einem Kugelschreiber nachgezeichnet. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Membran für 1 Minute mit Ponceau-Lösung angefärbt, die sich aus 0,5 g Ponceau S (Sigma-Aldrich) und 250 ml einer 3%igen Trichloressigsäure (TCA) zubereitet wurde. Anschließend wurden die Blockierungs- und Waschschrte durchgeführt. Grundlage für die dabei verwendeten Lösungen war eine 10-fach konzentrierte TBS-Lösung, die sich folgendermaßen zusammensetzte:

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	108,9 g
NaCl	360,0 g
<hr/>	
ddH ₂ O	4,5 l

pH - Wert 7,6 mit HCl

Die Nitrocellulosemembran wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit einer Blockierlösung behandelt, die sich aus 1-fach TBS (aus 10-fach Lösung verdünnt) mit 5% Rinderserumalbumin (BSA; PAA Laboratories, Pasching, Österreich) und 0,1% Tween 20 (Merck) zusammensetzte. Bei der anschließenden Inkubation mit dem primären Antikörper haben sich zwei Möglichkeiten angeboten:

1. Inkubation über Nacht bei 4°C
2. Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Folgende primären Antikörper und Verdünnungen wurden in dieser Arbeit verwendet (Tabelle 13).

Primärer Antikörper	Größe [kDa]	Verdünnung
Anti-TLR9 (IMG-431, Imgenex, Sorrento Valley, USA), polyclonal rabbit	113	1:1.000
Anti-GAPDH (IMG-5019A, Imgenex)	36 – 40	1:1.000
Phospho-p38 (# 9211, cell signalling, Danvers, USA), polyclonal rabbit	38	1:1.000
p38 (C-20) (sc-535 Santa Cruz Biotechnology), polyclonal rabbit	38	1:500
Phospho-ERK1/2 (# 9106, New England Biolabs, Ipswich, USA), monoclonal mouse	42 / 44	1:1.000
ERK1/2 (# 9102, cell signalling), polyclonal rabbit	42 / 44	1:500

Tabelle 13: Primäre Antikörper für den Western Blot

Nach Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Membranen für dreimal 10 Minuten mit „Waschlösung I“ behandelt, die aus 1-fach TBS mit 1% BSA (PAA) und 0,1% Tween 20 (Merck) bestand. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweils passenden, sekundären Antikörper (Tabelle 14).

Sekundärer Antikörper	Verdünnung
Rabbit IgG, HRP-linked (NA9340, GE-Healthcare)	1:3.000
Mouse IgG, HRP-linked (NA931V, GE-Healthcare)	1:3.000

Tabelle 14: Sekundäre Antikörper für den Western Blot

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Membranen für 5 und 10 Minuten mit „Waschlösung II“ behandelt, die aus 1-fach TBS mit 1% BSA (PAA) und 0,3% Tween 20 (Merck) bestand. Anschließend folgten zwei weitere Waschschriffe für 5 und 10 Minuten mit „Waschlösung I“. Vor Inkubation der Nitrocellulosemembran mit der Chemilumineszenz-Lösung wurden die Reste der „Waschlösung I“ mit „Whatman®

Cellulose Chromatography Paper Grade 3MM Chr“ (Whatman). Daraufhin erfolgte die Inkubation für 2 Minuten in einem „WESTERN LIGHTNING™ Chemiluminescence Reagent Plus“- Kit der Firma Perkin Elmer (Boston, USA), wobei beide Reagenzien in einem Verhältnis von 1:1 miteinander verdünnt wurden. Überschüssige Substrat-Lösung wurde mit wiederum „Whatman® Cellulose Chromatography Paper Grade 3MM Chr“ (Whatman) entfernt. Die Membran wurde anschließend in eine Röntgenfilm-Kassette (Fuji-Film) gelegt. Durch Auflegen eines Röntgenfilmes und anschließender Entwicklung des Filmes wurden die Banden sichtbar gemacht.

2.11 Expression der induzierten Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS)

2.11.1 Messung der mRNA-Expression von iNOS

Die mRNA-Expression des Effektormoleküls, die induzierte Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) wurde in einem Kooperationsprojekt mit Herrn Prof. Klaus Fink (Pharmakologisches Institut, Universität Bonn) untersucht. Für diese Untersuchung wurden Herzen aus WT- und TLR9-D Mäusen verwendet, die vier Stunden mit CpG-Oligonukleotiden (CpG-ODN, 1668-Thioat) stimuliert wurden. Die RNA wurde aus dem Herzgewebe nach Homogenisierung mit einem „Eppendorf Perfect RNA Eukaryotic Mini Kit“ (Eppendorf) isoliert. Eine reverse Transkription wurde mit Hilfe des „Omniscript® RT Kits“ (Qiagen) durchgeführt. Die synthetisierte cDNA wurde als Matrize („template“) für eine PCR eingesetzt, in der die Expression von iNOS nachgewiesen werden sollte. Folgende Primersequenzen für iNOS wurden verwendet:

5'-ACA ACG TGA AGA AAA CCC CTT GTG- 3' (sense)

5'-ACA GTT CCG AGC GTC AAA GAC C-3' (antisense).

Die PCR erfolgte in 35 Zyklen mit folgenden Bedingungen: 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 57°C und 60 Sekunden bei 72°C. Die Größe des amplifizierten Produktes betrug 557 bp (Nogawa et al., 1998).

Die iNOS-Expression wurde gegen das konstitutiv exprimierte Gen für β -Aktin normalisiert. Für diese semiquantitative Untersuchung wurden folgende Primer-Sequenzen verwendet:

5'-ATG GAT GAC GAT ATC GCT-3' (sense)

5'-ATG AGG TAG TCT GTC AGG T-3' (antisense).

Die PCR erfolgte in 25 Zyklen mit folgendem Programm: 45 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 56°C und 60 Sekunden bei 72°C. Das amplifizierte Produkt wies eine Größe von 570 bp auf (Zhang et al., 2002).

Für die semi-quantitative Analyse wurden PCR Zyklen innerhalb der exponentiellen Phase der cDNA-Amplifizierung gewählt. Gleiche Mengen an PCR-Produkten wurden in einem 2%igem Agarose-Gel aufgetrennt. Die optische Dichte der mit Ethidiumbromid angefärbten Banden wurden quantifiziert und als Quotient iNOS/ β -Aktin angegeben.

2.13 Nachweis von CpG-ODN im kardialen Gewebe mittels Durchflusszytometrie

In einem Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Andreas Limmer (Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Universitätsklinikum Bonn), insbesondere mit Frau Dr. Beatrix Schumak, wurde die Aufnahme verschiedener TLR-Liganden in Organen der Maus nach intravenöser Injektion zu verschiedenen Zeitpunkten (3 und 24 Stunden) untersucht. In dieser Arbeit wird auf die Ergebnisse aus der Untersuchung von Herz, Lunge und Blut nach einer Schwanzveneninjektion von 5 nmol ODN 1668 (TibMolbiol) eingegangen. Der Ligand war mit dem Cyanin-Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (ODN 1668-Cy5) gekoppelt, dessen Signale in einer Durchflusszytometrie oder „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) nachgewiesen werden konnte. Auf die vorherige Gabe von D-Galaktosaminhydrochlorid wurde in diesem Versuchsaufbau verzichtet.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Versuchstiere mittels Kohlendioxid-Begasung (CO₂-Begasung) getötet. Die Organe (Herz, Lunge, Milz) wurden entnommen, das Blut wurde mit einer heparinisierten Spritze abgenommen. In ein mit 2 ml ACK-Lyse-Puffer vorgelegtem 15 ml Falcon®-Reaktionsgefäß (Becton Dickinson) wurden etwa 500 μ l Vollblut gegeben und mit einem Vortex Genie® (Thermo Scientific) gut geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Erythrozyten lysiert. Anschließend wurde der Ansatz mit sterilem PBS aufgefüllt, und die Zellen wurden für 10 Minuten bei 1.500 U/min (450x g) (Heraeus, Thermo Scientific) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in FACS-Puffer (PBS, 2% FCS, 0,1% Natriumazid) aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Die Organe wurden nach der Entnahme in „Grey's Balanced Salt Solution“ (Sigma-Aldrich; GBSS-Puffer: 136,9 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,28 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 1 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 1,5 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 0,22 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 2,7 mM NaHCO₃,

5 mM D-Glucose; pH 7,5) gelegt und mit einer Operationsschere grob zerkleinert. Um eine Auflösung des Bindegewebes zu erzielen, wurden die Proben in 15 ml Falcon®-Reaktionsgefäßen (Becton Dickinson) in einem Mix von 3 ml GBSS-Puffer mit Collagenase (Sigma-Aldrich) für 20 Minuten bei 37°C inkubiert („Collagenase-Verdau-Ansatz“). Anschließend wurden die Verdau-Ansätze auf ein Metallsieb gegeben, um die Zellen mit einem 10 ml Spritzenstempel durch das Raster des Siebes zu drücken. Die aus dem Gewebe gelösten Zellen wurden mit PBS gespült. Die Zellsuspension wurde in ein neues 15 ml Falcon®-Reaktionsgefäß (Becton Dickinson) überführt und mit PBS aufgefüllt und bei 1.500 U/min (450x g) für 10 Minuten (Heraeus, Thermo Scientific, Braunschweig) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellsediment wurde vorsichtig in 4 ml 40% Percoll-Lösung (Merck) resuspendiert. Mit Hilfe einer langen Kanüle wurde die Resuspension vorsichtig mit 3 ml 80% Percoll-Lösung (Merck) unterschichtet. Die austarierten Suspensionen wurden im Gradienten bei 1.000 U/min (200x g) und unter 16°C für 20 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Die weiße Interphase wurde mit einer 5 ml Glaspipette, welche vorher kurz in PBS getaucht wurde, abgenommen und in einem 50 ml Falcon®-Reaktionsgefäß (Becton Dickinson) überführt. Die Lösung mit Zellen wurde mit PBS aufgefüllt und bei 1.500 U/min (450x g) für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde eine Färbung der Zellen mit folgenden Antikörpern durchgeführt (Tabelle 15).

Zelltyp	Primärer Antikörper	Verdünnung
Dendritische Zellen	CD11c-FITC (BD Pharmingen, Heidelberg)	1:1.000
Makrophagen	CD11b-PE (BD Pharmingen)	1:1.000
Endothelzellen	ME-9F1-bio (BD Pharmingen)	1:200

Tabelle 15: Verwendete Antikörper und Verdünnungen für die Durchflusszytometrie.

FITC = Fluoresceinisothiocyanat, PE = Phycoerythrin, bio = Biotin bzw. biotinyliert

Beim Nachweis von Endothelzellen wurde zur Markierung der Sekundäre Antikörper Streptavidin(SA)-Cy5.5 (BD Bioscience) in der Verdünnung 1:200 eingesetzt. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit dem BD FACS Callibur (Becton Dickinson) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, USA).

2.14 Immunohistochemie

Die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten, stimulierenden CpG-Oligonukleotidsequenzen (ODN1668-Cy5) wurde in einzelnen, linksventrikulären Kardiomyozyten und dem Herzgewebe untersucht. Der Nachweis der Aufnahme in kardialen Muskelzellen als Teil der angeborenen Immunantwort sollte zeigen, dass die Voraussetzung für eine lokale Entzündungsreaktion gegeben war.

2.14.1 Immunohistochemie von einzelnen Kardiomyozyten

Die Aufnahme von Cy5-markierter CpG-ODN (ODN1668-Cy5) wurde in frisch-isolierten Kardiomyozyten aus den Herzen der beiden Mauslinien (WT- und TLR9-D Mäuse) dokumentiert. Die Zellen wurden mittels retrograder Perfusion nach Langendorff isoliert und *ex vivo* mit 1 μ M ODN1668-Cy5 bei 37°C stimuliert.

2.14.1.1 Isolation linksventrikulärer Kardiomyozyten

Durch enzymatische Lösung aus dem Zellverband und einer retrograden Perfusion nach Langendorff wurden die Kardiomyozyten aus den Herzen von WT- und TLR9-D Mäusen isoliert. Die Mäuse wurden zunächst mit Isofluran narkotisiert und mittels Genickbruch getötet. Die Herzen wurden vorsichtig isoliert und präpariert, wobei ein langer Stamm der Aorta ascendens übrig gelassen wurde. Fett- und Bindegewebe wurden entfernt, und das Herz wurde in EGTA-Tyrode-Lösung (Tabelle 16) überführt. Mit einem Binokular wurden weitere Lungen-, Perikard- und Bindegewebereste entfernt. Eine mit EGTA-Tyrode-Lösung gefüllte Langendorff-Kanüle wurde durch die Aorta in den linken Ventrikel geschoben und mit einem Seidenfaden am Schaft fixiert. Über einen flexiblen Gummischlauch wurde die Kanüle mit dem Perfusionssystem verbunden. Für die Arbeitsschritte vom Töten der Versuchstiere bis zu diesem Punkt sollten nicht mehr als acht bis zehn Minuten vergangen sein, da eine Hypoxie im Herzen zum Absterben des Gewebes führt und somit die Ausbeute vitaler Zellen verringert. Die für die Perfusion verwendeten Lösungen wurden auf 36°C temperiert und oxygeniert.

Substanz	Perfusionslösung	Präparationslösung
KCl (Merck)	4 mM	4 mM
NaCl (Merck)	135 mM	135 mM
MgCl ₂ (Merck)	1 mM	1 mM
HEPES (Merck)	2 mM	2 mM
EGTA (Serva)	2,6 mM	-
CaCl ₂ (Merck)	-	1,8 mM
Trypsininhibitor (Sigma-Aldrich)	-	0,017 mg/ml
Rinderserumalbumin (BSA; Sigma-Aldrich)	-	1 mg/ml
Glucose (Merck)	-	9 mM
	pH 7,4	pH 7,4

Tabelle 16: Zusammensetzung der Präparations- und Perfusionslösung EGTA-Tyrode

Die Langendorff-Perfusionsanlage verfügte über einen Einfülltrichter, in dem mit Hilfe einer Beatmungsrüte die Lösungen zusätzlich mit Sauerstoff gesättigt wurden. Auf diese Weise sollte die Ausbeute an vitalen Zellen verbessert werden. Die Anlage wurde über ein Schlauchsystem, welches mit einem Wasserbad verbunden war, auf 36°C vortemperierte. Mit Hilfe von zwei Schreibtischlampen wurde die Temperatur des perfundierten Herzens auf Temperaturen zwischen 34 und 36°C gehalten. Diese wurde mit einem digitalen Fieberthermometer kontrolliert.

Der Perfusionsdruck wurde über einen Druckbehälter reguliert, wobei Werte um 500 mm Wassersäule tolerabel waren. Zu hohe Drücke würden das Gewebe zerstören, während zu niedrige Drücke für eine Perfusion nicht ausreichen würden. Zu Beginn der Isolation wurde mit einem hohen Druck perfundiert, um Reste von Blut aus den Koronarien und der Herzkammer zu entfernen. Nach einigen Sekunden wurde der Druck wieder gesenkt, um das Gewebe zu schonen. Anhand der Tropfgeschwindigkeit der Lösungen, die für die Perfusion eingesetzt wurden, konnten die Durchflussgeschwindigkeit kontrolliert werden. Bei einer zu hohen Durchflussgeschwindigkeit sinkt die Temperatur des Herzens, wogegen sie bei einer zu langsamen Geschwindigkeit wieder ansteigt.

Spontankontraktionen des Herzens waren während der Perfusion möglich, und sind ein Maß für die Vitalität des Organs. Die Reihenfolge und Dauer der einzelnen Lösungen

beruhte auf den Arbeiten von Achenbach und Mitarbeiter (1985) und Meyer (1989). Die Perfusion wurde mit 5 Minuten EGTA-Tyrode-Lösung zur Senkung der Calcium-Konzentration – EGTA wirkt als Chelator – in den Kardiomyozyten begonnen. Der Calcium-Gehalt wurde auf weniger als 10^{-4} M gesenkt, die Koronarien und die Herzkammer wurden perfundiert. Die Lösung wurde wieder klar, das Herz weitete sich prallelastisch. Dunkle Schatten in der Herzkammer waren Anzeichen für Thromben, die sich im ersten Perfusionsschritt auflösen und keinen Einfluss auf die Isolation hatten.

Beim Wechsel der Lösungen wurde das Druckgefäß entlastet und die erste Lösung abgelassen. Die neue Lösung wurde nach kurzzeitiger Begasung mit Sauerstoff im Einfülltrichter in den Druckbehälter gelassen. Im zweiten Schritt der Perfusion wurden die Herzen für 5 Minuten mit einer Hochkalium-Lösung (Tabelle 17) perfundiert, deren Kalium-Konzentration der intrazellulären von Kardiomyozyten entsprach. Durch eine Erhöhung des extrazellulären Kalium-Gehaltes wurde die Leitfähigkeit bezüglich von Kalium-Ionen erhöht, wodurch eine Verminderung des Ruhepotentials hervorgerufen wurde. Durch diese Depolarisation wurde die Muskelaktivität vermindert, da Natrium- und Calcium-Kanäle inaktiviert wurden. Die hervorgerufene, verminderte Kontraktilität trug zur Schonung der Myozyten während der Präparation bei. Der Stoffwechsel und der Sauerstoffbedarf der Zellen wurden auf diese Weise gesenkt.

Im nächsten Schritt begann die enzymatische Auflösung der Zellverbände, um einzelne Zellen zu erhalten. So wurde zunächst für 10 Minuten mit Trypsin-Lösung (Tabelle 17) perfundiert, die aus der Hochkalium-Lösung mit einem Zusatz von 0,4 mg/ml Trypsin (Roche, Mannheim) bestand. Nach 5 bis 10 Minuten bildete das lysierte Gewebe eine viskose, schleimige Konsistenz, die sich in kurze Fäden ziehen ließ. Nach diesem Arbeitsschritt folgte eine zwei- bis dreiminütige Perfusion mit der Hochkalium-Lösung. Daraufhin wurde das perfundierte Herz für 10 bis 15 Minuten mit einer Kollagenase-Lösung (Kollagenase (Sigma-Aldrich) in der Hochkalium-Lösung; Tabelle 17) behandelt. Hierdurch stieg die Tropfgeschwindigkeit stark an, da sich die Zellverbände auflösten. Somit wurde auch der Präparationserfolg angezeigt.

Substanz	Hochkalium-Lösung	Trypsin-Lösung	Kollagenase-Lösung
KCl (Merck)	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl (Merck)	4 mM	4 mM	4 mM
CaCl ₂ (Merck)	0,02 mM	0,02 mM	0,02 mM
MgCl ₂ (Merck)	1 mM	1 mM	1 mM
HEPES (Merck)	4 mM	4 mM	4 mM
Glucose (Merck)	9 mM	9 mM	9 mM
Kaliumglutamat (Fluka)	130 mM	130 mM	130 mM
Trypsin (Roche)	-	0,4 mg/ml	-
Kollagenase Typ L aus <i>Clostridium histolyticum</i> (Sigma-Aldrich)	-	-	0,375 mg/ml
	pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4

Tabelle 17: Zusammensetzung der Hochkalium-, der Trypsin- und der Kollagenase-Lösung

Das enzymatisch, verdaute Herz wurde zum Abschluss an der Langendorff-Kanüle zerschnitten. Die Stücke fielen in vortemperierte Präparationstyrode-Lösung, wo sie weiter zerkleinert wurden. Um das Herauslösen einzelner Zellen aus dem Gewebeverband zu erleichtern, wurden die Herzfragmente mit Pasteur-Pipetten umgerührt. Die Präparations-Tyrode-Lösung enthielt zusätzlich zur Stabilisierung der vitalen Myozyten Rinderserumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich) und einen Trypsininhibitor (Sigma-Aldrich). Die Zellen wurden durch Nylongaze mit einer Maschenweite von 125 µm filtriert, und anschließend bei niedriger Drehzahl abzentrifugiert. Vitale, längliche Zellen sinken zu Boden und bilden einen bräunlichen Bodensatz. Abgestorbene Zellen bleiben im Überstand und können abpipettiert werden. Die frisch-isolierten Kardiomyozyten wurden in Tyrode-Lösung resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 37°C gelagert (bis zu einer Stunde für die Histologie).

2.14.1.2 *Ex vivo* Stimulation und Histologie von Kardiomyozyten

Vor Beginn der eigentlichen, histologischen Analyse wurden HistoBond® Deckgläser (Marienfeld, Lauda-Königshofen) für 30 Minuten mit Laminin-Lösung (10 µg/ml in PBS, Sigma-Aldrich) bei Raumtemperatur vorbehandelt. Anschließend wurden die frisch, isolierten Kardiomyozyten zur Adhäsion mit einer Pasteur-Pipette auf diese Deckgläser pipettiert und erhielten für 30 Minuten bei 37°C Gelegenheit sich anzuheften. In der Zwischenzeit wurde „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM; Gibco®, Invitrogen) mit 5% „minimal essential medium“, 10%igem fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin), 50 µg/ml Gentamicin (Gibco®, Invitrogen) und 1 µM ODN 1668-Cy5 (TibMolbiol) vorbereitet.

Der Überstand der Adhäsion wurde nach Ablauf der Inkubationszeit abgesaugt. Die Kardiomyozyten wurden für 30 Minuten bei 37°C mit den Oligonukleotiden stimuliert. Nach Ende der Stimulationszeit wurde das Medium wiederum abgesaugt. Die anschließende Fixierung der Zellen mit frisch-angesetztem 4%igem Paraformaldehyd (PFA) wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur – wie auch alle weiteren Prozesse - durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS für 5 Minuten.

Nach zweimaligem Waschen in PBS mit 0,2% Tween (Merck) wurden die Zellkerne für 30 Minuten mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; 0,2 µg/ml in PBS; Roth) angefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellpräparate mit Mowiol 4-88 (Roth) - angesetzt nach Anleitung des Herstellers - eingedeckelt. Die histologische Analyse der Kardiomyozyten wurde mit einem inversen Mikroskop Olympus IX71 (Olympus, Hamburg) durchgeführt.

2.14.2 Histologischer Nachweis der CpG-ODN-Aufnahme im Herzen

Der histologische Nachweis der Aufnahme von fluoreszenzmarkierter CpG-ODN wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Beatrix Schumak (Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt. WT-Mäuse erhielten mittels Schwanzveneninjektion 5 nmol Cy5-gekoppeltes CpG-ODN (ODN1668-Cy5). Nach drei Stunden wurden Herz und Lunge entnommen, in „Tissue-Tek® O.C.T™ compound“ (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und bei -78°C auf Trockeneis eingefroren. Bis zur Anfertigung der Schnitte am Kryostaten wurden die eingebetteten Organe bei -80°C gelagert.

Von den Herzen und den Lungen wurden je 5 μM Schnitte auf einen Superfrost® plus Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig) überführt. Die Schnitte wurden abgedunkelt über Nacht zum Trocken eingelagert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit Aceton fixiert. Die Objektträger wurden für 10 Minuten in einer mit Aceton gefüllten Küvette bei -20°C inkubiert und anschließend zum Trocknen ausgelegt, wobei die Gewebe nicht vollständig austrocknen sollten.

Die Zellkerne wurde entweder mit einer Hämalaun-Kernfärbung oder mit 4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Die Hämalaun-Lösung wurde direkt auf die Schnitte gegeben und für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurde das Hämalaun abgekippt. Die Präparate wurden für 10 Minuten in Leitungswasser gespült. Die DAPI-Lösung wurde mit PBS in einer 1:200 Verdünnung PBS angesetzt. Pro Schnitt wurden etwa 70 μl dieser Lösung eingesetzt, die direkt auf diese pipettiert wurden. Die Schnitte wurden anschließend für 10 Minuten in einer Feuchtkammer im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die DAPI-Lösung abgekippt, die Schnitte wurden für 5 Minuten in PBS gespült. Das Eindeckeln der Schnitte wurde mit Mowiol 4-88 (Roth) durchgeführt, welches direkt auf die Gewebeschnitte gegeben wurde. Die Deckgläser wurden vorsichtig aufgelegt. Die Schnitte wurden mit dem inversen Olympus IX71 Mikroskop mit angeschlossenem Kamerasystem dokumentiert.

2.15 Hämodynamik der linksventrikulären Funktion

Die linksventrikuläre Funktion wurde mit einer PowerLab® ADInstruments Data Acquisition System (ADInstruments, Heidelberg) und einem Mikro-Tip® Pressure Transducer Catheter SPR-360 (Millar Instruments Inc., Houston, USA) gemessen. Folgende Parameter wurden mit Hilfe dieses Katheters gemessen: Herzfrequenz, Blutdruck, systolic aortic pressure (SAP), diastolic aortic pressure (DAP) sowie die maximale positive und negative Anstiegssteilheit des linksventrikulären Druckes dP/dt_{\max} und dP/dt_{\min} als Maß für die Kontraktilität der Herzen.

Für diese Untersuchung wurden Wildtyp-Mäuse verwendet, die in zwei Gruppen unterteilt wurden. Eine Gruppe erhielt eine intraperitoneale Injektion mit 200 μ l PBS und wurde vier Stunden nach Applikation für die Messung der Hämodynamik vorbereitet. Eine zweite Gruppe wurde mit D-GalN vorbehandelt und erhielt eine Gabe von 40 nmol CpG-ODN (ODN 1668). Nach vier Stunden wurde auch bei ihnen die linksventrikuläre Funktion gemessen. Vor Beginn jeder Messung wurde der Katheter mit einer Quecksilbersäule bei 100 mmHg kalibriert. In die Software „Chart for Windows“ (ADInstruments) wurden die Werte, die sich aus dieser Eichung ergaben in die „units conversion“ eingegeben.

Die eigentliche Messung ist mit einer aufwendigen Prozedur verbunden, da hierbei die Arteria communis freigelegt werden musste, wobei eine Messung an einem Tier nur einmal durchgeführt werden konnte. Um den Stress für die Tiere bei dieser Versuchsdurchführung zu minimieren, wurden sie mit Isofluran (Forene®, Abbott) narkotisiert. Hierzu wurde die Maus in eine Narkosekammer gesetzt, die an einen Forene® Vapor (Dräger, Lübeck) angeschlossen war. Für die Anästhesie wurde ein Zustrom mit 2 Volumenprozent (Vol.-%) Isofluran (Abbott) bei einem Luftstrom von einem Liter pro Minute gewählt. Nach der Betäubung wurde das Versuchstier aus dieser Kammer entnommen und auf einem temperierten Operationstisch mit Leukosilk® (Beiersdorf AG, Hamburg) fixiert. Zur Kontrolle der Körpertemperatur wurde eine Temperatur-Sonde in den Anus des Versuchstieres eingeführt, welche über einen Regler mit einer Infrarot-Lampe verbunden war, die die Körpertemperatur bei einem physiologischen Wert von 37°C halten sollte. Nach Entfernung der Körperbehaarung im Bereich oberhalb des Larynx bis zum Sternum wurde ein Einschnitt vorgenommen, um anschließend die Arteria communis unter einem Binokular (Nikon, Düsseldorf) freizulegen und für die Kanülierung mit 5-0 Fäden vorzubereiten. Nach Unterbrechung des Blutstromes wurde ein kleiner Mikroeingriff vorgenommen, um anschließend den Mikro-Tip® Pressure Transducer Catheter SPR-360 (Millar Instruments) einzuführen. Nach Einführen des Katheters wurden die Mäuse durch

Runterregulation des Forene®-Zustroms auf 0,5 Volumenprozent (Vol.-%) in einen Zustand versetzt, der den physiologischen Normalzustand entsprechen sollte. Der periphere Blutdruck, gemessen in der Arteria communis, wurde für 10 Minuten dokumentiert. Durch weiteres Einschieben des Katheters gelangte die Sonde in den linken Ventrikel des Herzens, was durch ein Absinken des diastolischen, arteriellen Druckes auf einen Wert von 10 mmHg sichtbar wurde. Die Messung erfolgte auch hier für 10 Minuten. Da dieser Eingriff irreversibel war, wurden die Tiere nach Beendigung der Messung getötet. Die genaue Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Software „Chart for Windows“ (ADInstruments). Die Daten wurden statistisch mit der Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad) ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Die Bedeutung von TLR9 für die Entstehung einer septischen Kardiomyopathie

Im humanen, kardialen Gewebe konnte bereits im Vorfeld dieser Untersuchungen die Expression von TLR9 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Über die Funktion und die Bedeutung dieses Rezeptors im Herzen im Rahmen der angeborenen Immunantwort („innate immunity“) war hingegen wenig bekannt. Bakterielle DNA ist der Ligand für TLR9. Eine TLR9-vermittelte Reaktion kann jedoch auch über eine Stimulation mit synthetischen, immunstimulatorischen Oligonukleotidsequenzen (CpG-ODN) eingeleitet werden.

Mit der Generierung von TLR9-defizienten (TLR9-D) Mäusen hat sich jedoch die Möglichkeit ergeben, die Funktion dieses Rezeptors im Rahmen der angeborenen Immunantwort, insbesondere der Gewebe des Herz-Kreislauf-Systems, zu dokumentieren. Die folgenden Untersuchungen wurden an Wildtyp (WT-) und TLR9-D Mäusen durchgeführt. Mittels intraperitonealer Applikation von CpG-ODNs sollte bei ihnen eine systemische Infektion hervorgerufen werden, die einer Sepsis gleichkam.

3.2 Allgemeiner Gesundheitszustand der Mäuse nach Applikation von bakterieller DNA

Die WT-Mäuse zeigten nach Vorbehandlung mit D-Galactosaminhydrochlorid (D-GalN) und Stimulation mit CpG-ODN (oder ODN 1668) die Anzeichen eines Schockes und septischer Symptome. Nach einer Stimulationszeit von zwei Stunden wiesen sie ein ungepflegtes Fell und tränende Augen auf, wogegen TLR9-D Mäuse einen unveränderten Zustand aufwiesen. Des Weiteren konnte bei den WT-Mäusen ein weicher Stuhlgang beobachtet werden, der Anzeichen für eine vorliegende Diarrhö war. Zudem wirkten die Mäuse sehr lethargisch. Bei der Entnahme der Herzen war bereits nach einem Mindestzeitraum von zwei Stunden eine dunklere Verfärbung des Perikards zu beobachten. Die Milz, ein wichtiges Organ im Rahmen der adaptiven Immunantwort, wies eine ähnliche Verfärbung auf und wirkte in ihrer Größe verringert. Vergleichbare Symptome konnten bei TLR9-D Mäusen nicht beobachtet werden. Die Applikation von D-GalN allein induzierte keine inflammatorische Antwort, so dass bewiesen wurde, dass das Vorliegen des Krankheitsbildes auf die Verabreichung der CpG-ODN zurückzuführen ist. Mäuse, die mit Oligonukleotidsequenzen ohne CpG-Motiv (ODN 1612, ODN H154) behandelt wurden, zeigten keine schock-ähnlichen Symptome.

3.3 Expression von TLR9 im kardialen Gewebe

Die Grundvoraussetzung für diese Arbeit stellte der Nachweis des Toll-Like Rezeptors 9 im kardialen Gewebe dar. Es sollte hiermit eindeutig belegt werden, dass dieser Rezeptor im Herzgewebe vorliegt, so dass die weiteren Reaktionen auf die Zugabe des spezifischen Liganden bakterielle DNA bzw. CpG-ODN zurückgeführt wurden. Innerhalb des Beobachtungszeitraums wurde die Expression des Rezeptors im kardialen Gewebe reguliert. Mittels quantitativer „Real Time“-PCR wurde nach Stimulation mit CpG-ODN eine Zunahme der Expression von TLR9 nachgewiesen. Die maximale Expression wurde nach zwei Stunden mit einem relativen Quotienten von $2,851 \pm 0,733$ nachgewiesen ($n=3$; Abbildung 3 A). Diese Beobachtung wurde mittels Western Blot Analysen bestätigt (Abbildung 3 B).

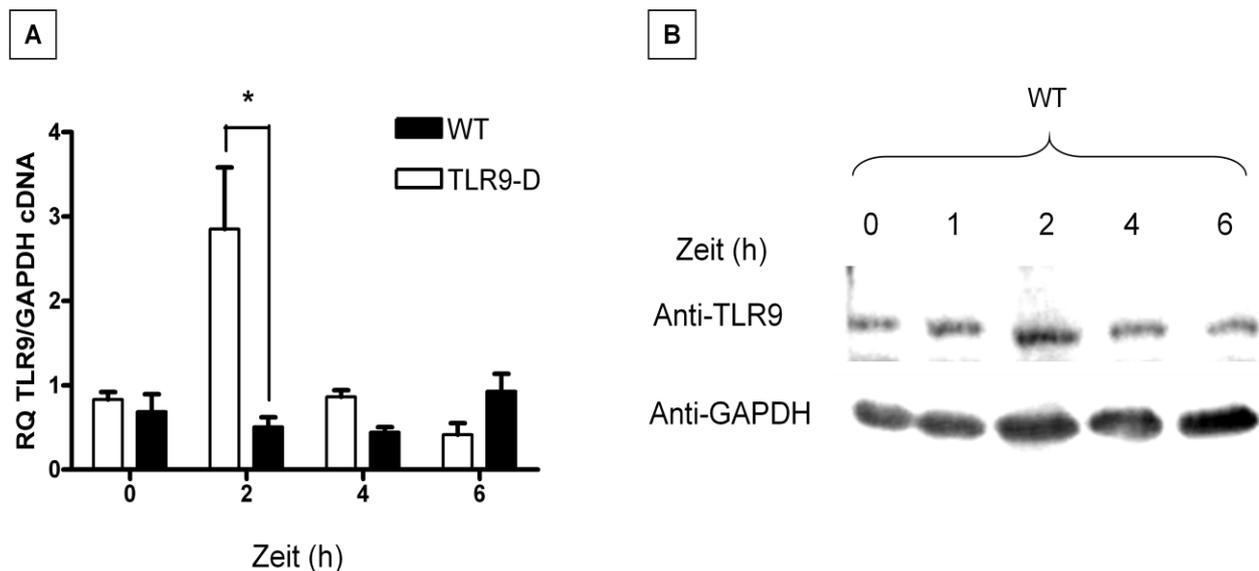


Abbildung 3: Expression von TLR9 im kardialen Gewebe. A) Die Applikation von CpG-ODN induziert eine Erhöhung der TLR9-Expression nach zwei Stunden. TLR9-D Mäuse zeigten keine Veränderung in der Expression des TLR9-Fragmentes. B) Mittels Western Blot wurde die Expression von TLR9 nachgewiesen. In der vorliegenden repräsentativen Abbildung wird das Maximum der Expression nach zwei Stunden erzielt.

RQ = relativer Quotient

3.4 Aufnahme von CpG-Oligonukleotiden in isolierten Kardiomyozyten

Histologische Analysen wurden durchgeführt, um die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden (ODN 1668-Cy5) zu demonstrieren. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde nachgewiesen, dass die Aufnahme von CpG-ODN in frisch isolierten Kardiomyozyten aus beiden Genotypen erfolgt (Abbildung 4). Innerhalb von 30 Minuten nach Stimulation wurden intrazellulär lokalisierte Fluoreszenzsignale beobachtet (Abbildung 4 B). In Zellen aus TLR9-D Mäusen zeigte sich die Fluoreszenz erst nach längerer Einwirkzeit (Abbildung 4 D). Die Fluoreszenz der markierten Oligonukleotide wurde zuerst im Zytoplasma und dann im Nukleus nachgewiesen. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Aufnahme von Oligonukleotiden über einen Mechanismus verläuft, der nicht an die Expression von TLR9 gebunden ist.

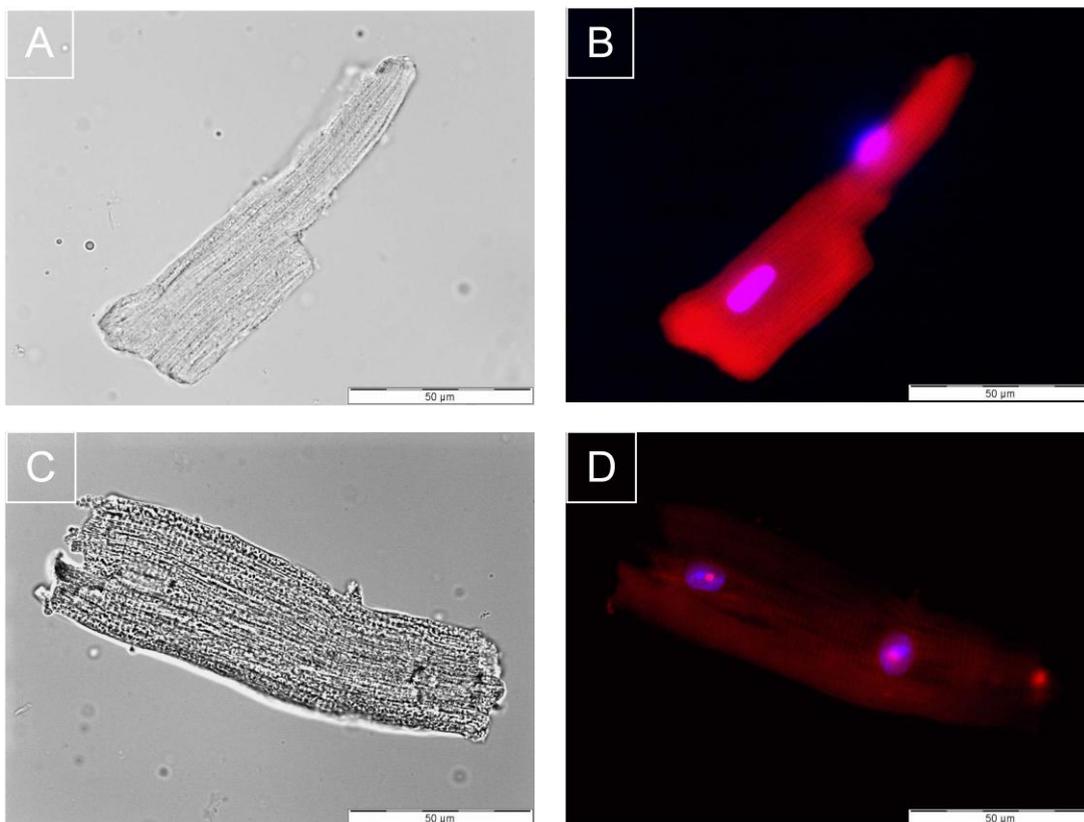


Abbildung 4: Dokumentation der Aufnahme von CpG-ODN in frisch isolierten, linksventrikulären Kardiomyozyten. A) WT-Zelle in der Phasenkontrast-Ansicht; B) Die Aufnahme von CpG-ODN (ODN 1668-Cy5) wurde nach 30 Minuten sowohl im Zytoplasma als auch in Zellkernen, welche mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt wurden, nachgewiesen. Diese repräsentative Beobachtung wurde wiederholt in mehreren Versuchen nachgewiesen. C) TLR9-D Zelle in der Phasenkontrast-Ansicht. D) Die Aufnahme des fluoreszenzgekoppelten Liganden wurde auch hier nach 30 Minuten sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen.

3.5 Aufnahme von CpG-Oligonukleotiden im kardialen Gewebe

Die Aufnahme von CpG-Oligonukleotiden wurde im gesamten Herzen untersucht. WT-Mäuse erhielten mittels Schwanzvenen-Injektion intravenös 5 nmol fluoreszenzmarkierte CpG-ODN (ODN 1668-Cy5). Drei Stunden nach Applikation wurden die Herzen entnommen. Nach Kryofixierung wurde die Aufnahme des TLR9-Liganden im kardialen Gewebe histologisch analysiert. Die Aufnahme von markierter CpG-ODN wurde im Herzgewebe nachgewiesen (Abbildung 5 B und C). Besonders die Gewebeabschnitte im angrenzenden Bereich zum ventrikulären Raum zeigten eine Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden (Abbildung 5 C). Innerhalb des myokardialen Gewebes im angrenzenden Bereich von Gefäßen wurde die Fluoreszenz ebenfalls nachgewiesen (Abbildung 5 B).

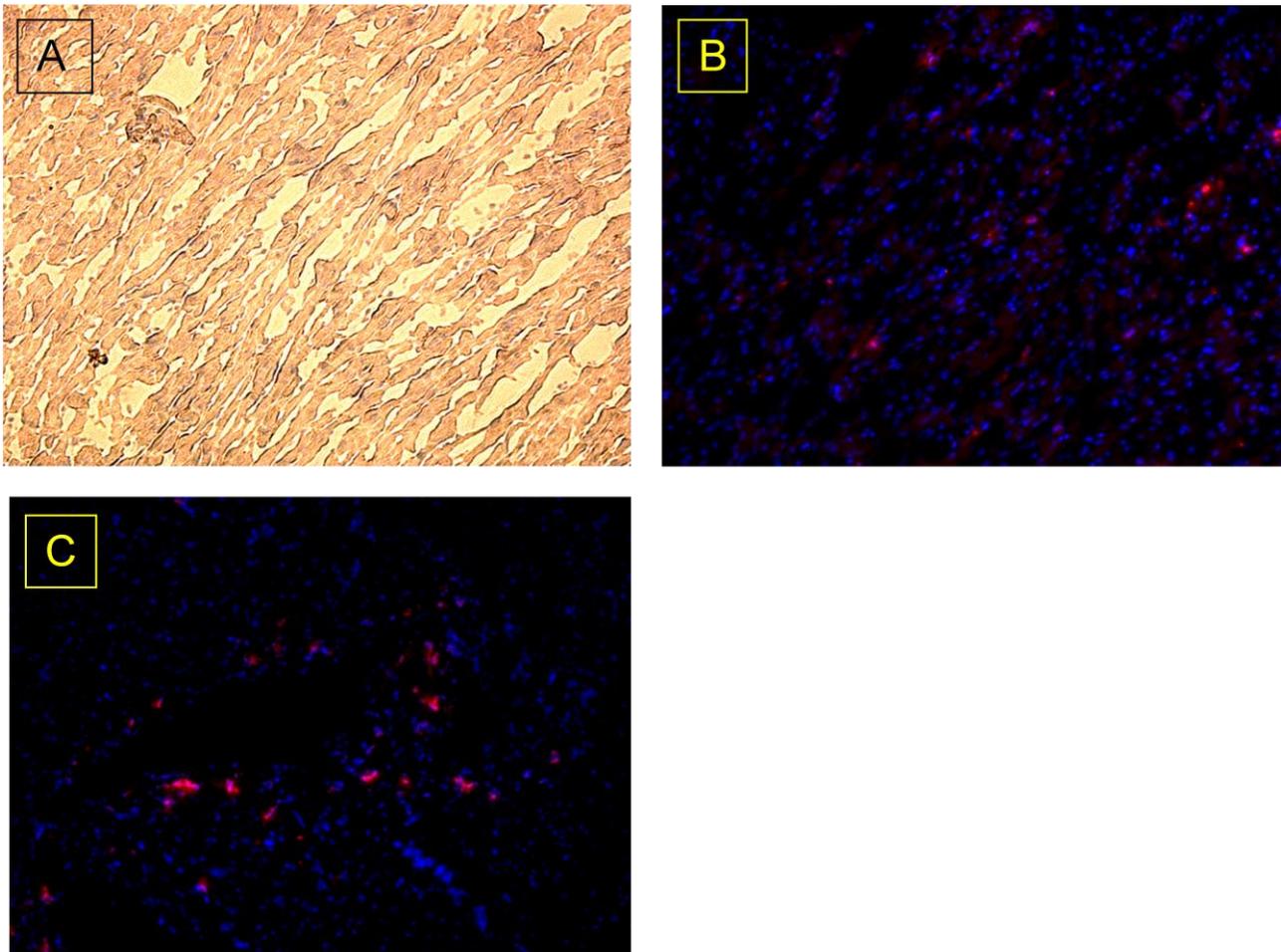


Abbildung 5: Beispiele für die Aufnahme von CpG-ODN im kardialen Gewebe.

A) Phasenkontrast-Aufnahme des Myokards nach Hämalaun-Färbung B) Aufnahme eines vergleichbaren, myokardialen Bereiches Zellkern-Färbung mit DAPI und Detektion der CpG-Oligonukleotide C) Beispiel für die Aufnahme von CpG-ODN im angrenzenden Bereich zu ventrikulären Räumen.

3.6 Hämodynamische Untersuchungen an WT-Mäusen nach Applikation von CpG-Oligonukleotiden

Die Effekte bezüglich der kardialen Funktion wurden in WT-Mäusen erhoben, denen PBS oder 40 nmol CpG-ODN in einem Volumen von 200 µl intraperitoneal appliziert wurden. Trotz gleicher Behandlung der Tiere war in den beiden Gruppen eine hohe Varianz bezüglich der erhaltenen Messdaten erkennbar. Bei der Messung der Herzfrequenz zwischen der Arteria carotis communis und Aorta ascendens (periphere Messung) wurde in den CpG-ODN-behandelten Tiere eine leicht erniedrigte Herzfrequenz gemessen, wobei keine Signifikanz vorhanden waren (Tabelle 18). Zu einem ähnlichen Ergebnis kam die Erfassung der Blutdrücke sowohl peripher als auch linksventrikulär. Tiere, die mit CpG-ODN stimuliert wurden, zeigten eine leichte Abnahme. Die periphere Messung der systolischen und diastolischen Blutdrücke (SAP (systolic aortic pressure); DAP (diastolic aortic pressure)) lieferte vergleichbare Messdaten. Die Messung von dP/dt_{max} und dP/dt_{min} , die ein Maß für die Kontraktilität der Herzen darstellen, zeigten bei WT-Mäusen, die mit CpG-ODN behandelt wurden, erstaunlich hohe Werte. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Parameter	WT + PBS	WT + 40 nmol CpG-ODN
Herzfrequenz (bpm)	676,3 ± 111,4	604,8 ± 104,1
MAP (mmHg)	90,1 ± 15,6	78,9 ± 16,4
SAP (mmHg)	106,8 ± 18,49	94,49 ± 17,0
DAP (mmHg)	81,2 ± 12,9	70,3 ± 15,7
dP/dt_{max} (mmHg/s)	6401 ± 2112	6918 ± 1928
dP/dt_{min} (mmHg/s)	-7670 ± 2036	-9000 ± 1938

Tabelle 18: Hämodynamische Messung von WT-Mäusen nach Behandlung mit PBS und 40 nmol CpG-ODN. Die Messungen wurden vier Stunden nach Applikation der Substanzen durchgeführt. WT-Mäuse, die mit CpG-ODN behandelt wurden, zeigten eine leichte Abnahme der gemessenen Blutdrücke. Nach Bestimmung der Werte für dP/dt_{max} und dP/dt_{min} zeigten diese Tiere jedoch im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren eine scheinbar bessere Kontraktilität. **MAP = mean aortic pressure, SAP = systolic aortic pressure, DAP = diastolic aortic pressure.**

3.7 Aktivierung von Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAP-Kinasen)

Innerhalb des postulierten TLR9-vermittelten Signaltransduktionsweges war eine Aktivierung der Mitogen aktivierenden Protein-Kinasen (MAP-Kinasen), insbesondere Protein 38 (p38) und extrazellulär regulierte Kinase 1 und 2 (ERK1/2), zu erwarten. Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass deren Aktivierung in Form des Nachweises ihrer phosphorylierten Formen phospho-p38 und phospho-ERK1/2 relativ früh vorlag. Ein Maximum der Phosphorylierung (Aktivierung) wurde mittels Western Blot im Herzgewebe nach 15 bis 30 Minuten post-infectem detektiert (Abbildung 6).

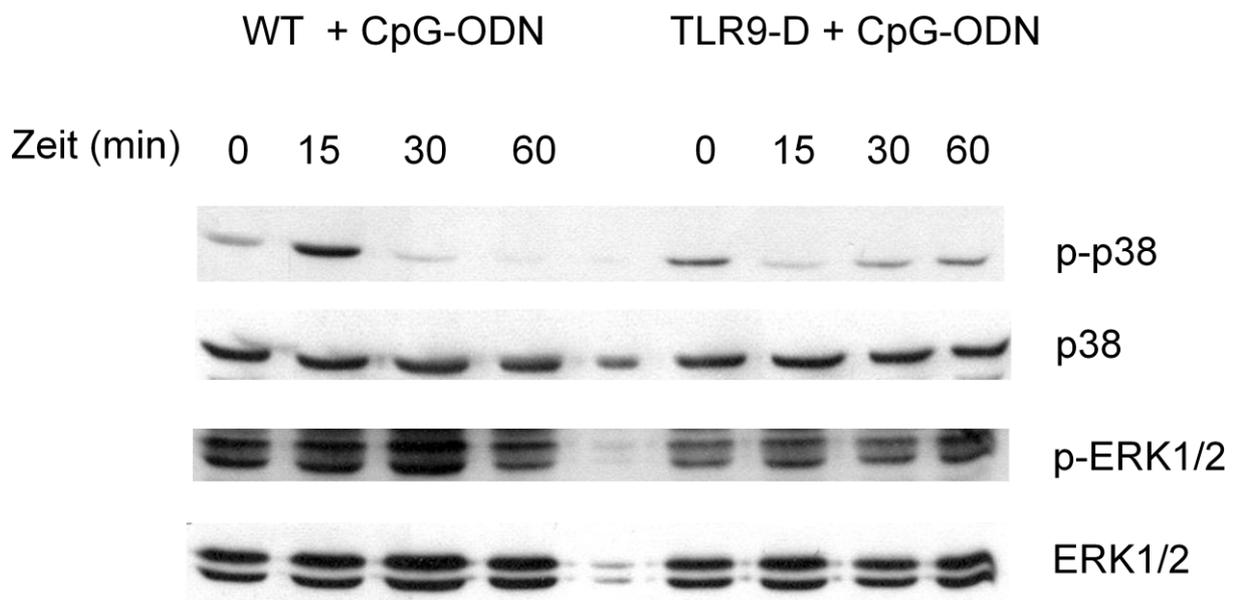


Abbildung 6: Aktivierung von Mitogen-aktivierenden Proteinkinasen (MAP-Kinasen) im kardialen Gewebe nach Applikation von CpG-ODN. Repräsentativer Western Blot: Die intraperitoneale Applikation von CpG-ODN induziert in WT-Mäusen die Aktivierung der MAP-Kinasen p-p38 (38 kDa) und p-ERK1/2 (42 bzw. 44 kDa) innerhalb eines Zeitraumes von 15 Minuten. Diese Aktivierung blieb in TLR9-D Mäusen aus.

3.8 Aktivierung des Nukleären Faktors κ B

Die Translokation bzw. Aktivierung des Nukleären Faktors κ B (NF κ B), einem wichtigen Transkriptionsfaktor zur Induktion der Zytokinexpression, stellt eine zentrale Position innerhalb des postulierten Signaltransduktionsweges dar. In seiner inaktivierten Form liegt dieses Protein im Zytoplasma als Komplex mit dem inhibitorischen Faktor κ B (I κ B) vor. Durch einen geeigneten Stimulus, dem z.B. die Aktivierung (Phosphorylierung) der MAP-Kinasen vorausgeht, wird I κ B phosphoryliert, wodurch ein Kernlokalisierungssignal („nucleus localisation signal“; NLS) freigesetzt wird. NF κ B kann somit in den Zellkern einwandern. In verschiedensten Zelltypen wird durch die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors die Expression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Chemokinen, Immunrezeptoren, Leukozyten und immunregulierenden Proteinen gesteuert (Messer und Rupec, 2001).

Mittels „electrophoretic mobility shift assay“ von nukleären Proteinextrakten aus Herzgewebe sollte analysiert werden, ob durch die Applikation von CpG-ODN eine Translokation von NF κ B, insbesondere der beiden Untereinheiten p65 und p50, in den Nukleus induziert wurde. Im Normalzustand ist dieser Transkriptionsfaktor in nukleären Extrakten aus kardialen Gewebe nicht detektierbar. Bereits 60 Minuten nach Injektion (i.p.) von CpG-ODN wurden diese beiden genannten NF κ B-Untereinheiten in Zellkernen von WT-Mäusen nachgewiesen (Abbildung 7). Das Maximum der Aktivierung bzw. des Nachweises wurde nach 120 Minuten erreicht. Die Aktivierung hielt bis zu vier Stunden nach Gabe von CpG-ODN im Myokard an. Bei TLR9-D Mäusen blieb diese Reaktion aus. In den nukleären Extrakten, die aus den Herzen von TLR9-D Mäusen isoliert worden sind, wurden die beiden Untereinheiten p50 und p65 nicht nachgewiesen.

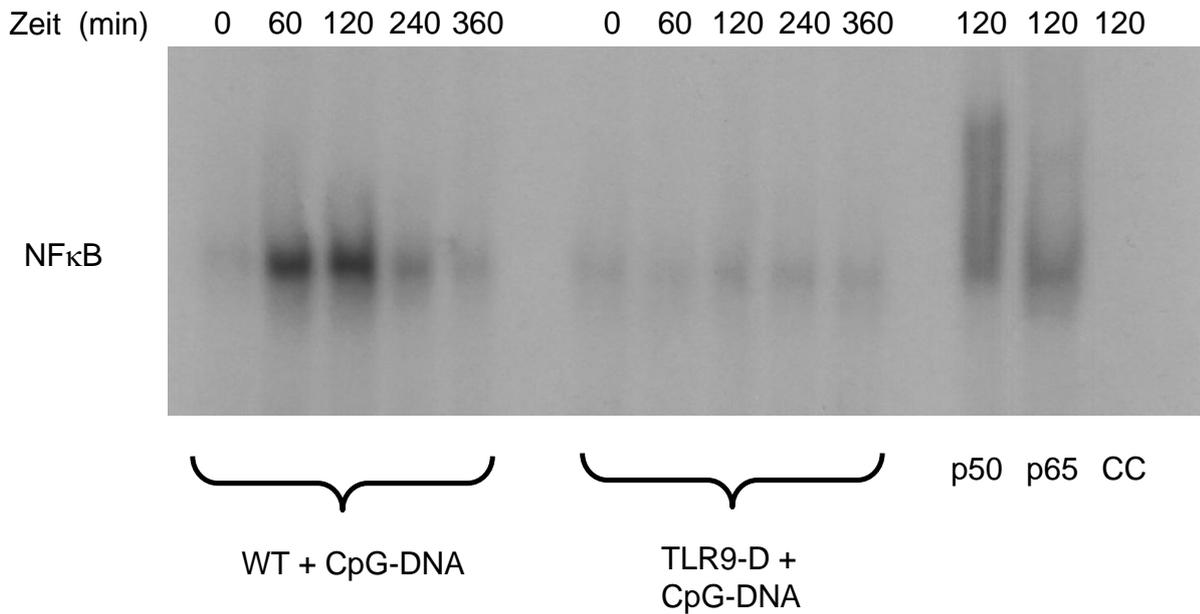


Abbildung 7: Aktivierung des nukleären Faktors κB (NFκB) nach Applikation von CpG-ODN. Mittels „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) wurde die Aktivierung von NFκB in den Herzen von WT-Mäusen 60 Minuten nach i.p. Injektion von CpG-ODN nachgewiesen. Diese Reaktion blieb bei den TLR9-D Mäusen aus. Der Supershift zum Zeitpunkt von 120 Minuten (Maximum der Aktivierung) zeigte, dass es sich vornehmlich um die beiden NFκB-Untereinheiten p50 und p65 handelt, die an dieser Aktivierung beteiligt sind. Ein „cold chase“ (CC) diente als Kontrolle.

3.9 Expression pro-inflammatorischer Zytokine

Die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung einer Sepsis. Um die Wirkung des vorliegenden Sepsis-Modells anhand dieser Faktoren beurteilen zu können, wurde im kardialen Gewebe die mRNA-Expression dieser Zytokine mittels „RNase Protection Assay“ untersucht. In einem parallelen Projekt zur Entstehung einer Entzündungsreaktion in der Lunge wurden diese Messungen auf gleiche Art und Weise an den gleichen Tieren durchgeführt. Daher war ein Vergleich dieser beiden Organe möglich. Die weitere Untersuchung mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) sollte die induzierte Zytokinexpression auf Proteinebene bestätigen. Diese Methodik erschien besonders sinnvoll, da vergleichbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Auf diese Weise ergab sich die Möglichkeit, eine erweiterte Aussage zum Einfluss des TLR9-Liganden auf die Herz-Lungen-Funktion zu treffen.

Die Analyse mittels „RNase Protection Assay“ (RPA) zeigte, dass in den Herzen bereits eine Stunde nach Applikation von CpG-ODN die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α (WT AU: $5,984 \pm 1,320$ vs. TLR9-D AU: $0,226 \pm 0,059$) und IL-1 β (WT AU: $12,028 \pm 3,225$ vs. TLR9-D AU: $0,500 \pm 0,113$) ihre Expressionsmaxima erreichten und signifikant ($P < 0,05$) erhöht waren (Abbildung 8; $n=5$ pro Zeitpunkt). Die Wirkung hielt im kardialen Gewebe von WT-Mäusen bis zu sechs Stunden nach Verabreichung des TLR9-Liganden an, wobei nach einer Stunde eine kontinuierliche Abnahme der Konzentration beobachtet wurde.

Die Anzahl der IL-6-mRNA-Transkripte war in den WT-Mäusen nach einer Stunde ebenfalls signifikant erhöht. Das Maximum wurde jedoch erst nach zwei Stunden (WT AU: $2,794 \pm 0,265$ vs. TLR9-D AU: $0,470 \pm 0,176$) erreicht. Mit fortlaufender Stimulationszeit war auch für IL-6 die Expression rückläufig. In Herzen von TLR9-D Mäusen blieb diese Induktion von Zytokinen aus.

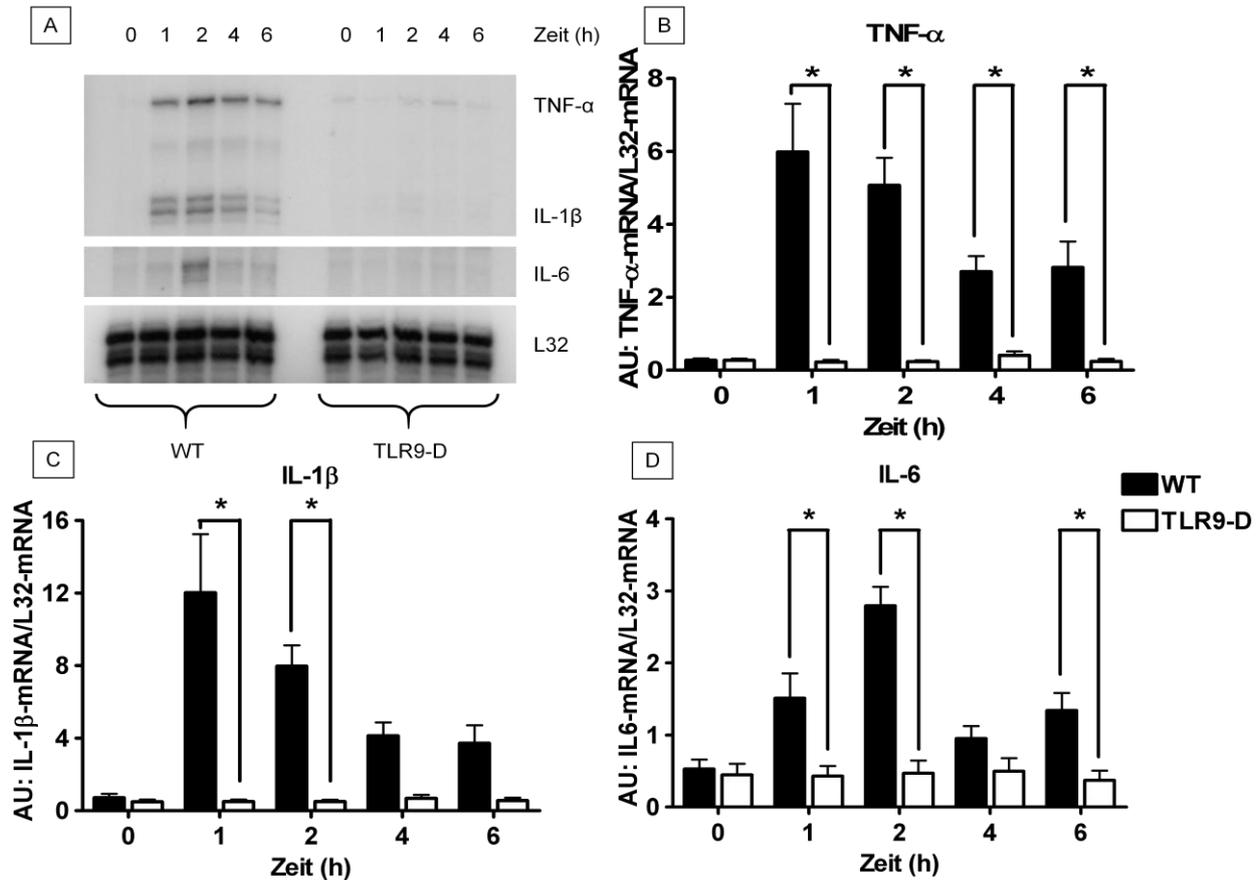


Abbildung 8: Analyse der mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine im Herzen. A) Repräsentative Radiographie eines „RNase Protection Assays“; B-D) Die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 war in WT-Mäusen bereits eine Stunde nach Injektion (i.p.) von CpG-ODN signifikant erhöht. Diese Induktion blieb bei TLR9-Mäusen aus. n = 5 pro Zeitpunkt; * P < 0,05 im Vergleich zur Stimulation

Die Analyse mittels ELISA gaben weitgehend diese Sachverhalte für die aus kardialem Gewebe isolierten Proteine wieder (Abbildung 9). In WT-Mäusen wurde die maximale Konzentration für TNF- α bereits nach einer Stunde gemessen (WT: $2,7 \pm 1,0$ pg/mg Protein vs. TLR9-D: $0,6 \pm 0,4$ pg/mg Protein; Abbildung 9 A). Die Konzentration für IL-1 β ist ebenfalls eine Stunde nach Applikation von CpG-ODN erhöht, erreicht jedoch bei dieser Analyse ihr Maximum nach zwei Stunden (WT: $21,7 \pm 4,0$ pg/mg Protein vs. TLR9-D: $4,0 \pm 1,2$ pg/mg Protein; Abbildung 9 B). Für die Messung von IL-6 wurde eine maximale Konzentration nach zwei Stunden detektiert (WT: $9,3 \pm 2,7$ pg/mg Protein vs. TLR9-D: $1,4 \pm 0,3$ pg/mg Protein; Abbildung 9 C). Mittels ELISA wurde auch in TLR9-D Mäusen keine Regulation der Zytokinexpression nachgewiesen. Die Messung der Zytokinkonzentrationen in den Lungen dieser ergab ein vergleichbares

Ergebnis. Allerdings waren die Höhe der Expression und die Zeitpunkte der erzielten Maxima in den WT-Mäusen unterschiedlich. Die TNF- α -Konzentration stieg in den WT-Mäusen bereits nach einer Stunde signifikant um das 10-fache gegenüber dem Ausgangswert an und erreichte ihr Maximum nach zwei Stunden (WT: $11,3 \pm 2,9$ pg/mg Protein vs. TLR9-D: $2,4 \pm 1,1$ pg/mg Protein; Abbildung 9 D). Die Unterschiede zu den WT-Mäusen waren in der Lunge deutlicher als in den Herzen. Im Lungengewebe wurde eine 4-fach höhere TNF- α -Expression als im Herzgewebe detektiert. Diese Beobachtung konnte sowohl bei den WT- als auch den TLR9-D Mäusen festgestellt werden.

Die Messungen zu IL-1 β zeigten einen vergleichbaren Verlauf mit einem Maximum nach zwei Stunden (WT: $265,1 \pm 27,4$ pg/mg Protein vs. TLR9-D: $53,1 \pm 16,0$ pg/mg Protein; Abbildung 9 E). Für WT-Mäuse war diese Zunahme signifikant. Im Bezug zum Ausgangszeitpunkt erhöhte sich die Konzentration von IL-1 β um das 12-fache. Insgesamt erschien in beiden Mauslinien jeweils die Konzentration von IL-1 β um das 10- bis 12-fach höher zu sein als in vergleichbaren Messungen aus den Herzen. Im Gegensatz zum kardialen Gewebe war in der Lunge kein Einfluss von CpG-ODN auf die IL-6 Produktion nachweisbar, weder bei WT- noch bei TLR9-D Tieren (Abbildung 9 F).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass in beiden Organen von WT-Mäusen TNF- α und IL-1 β durch die Applikation von CpG-ODN deutlich erhöht wurden. Sie scheinen daher für die Beurteilung der Herz-Lungen-Funktion sinnvolle Parameter zu sein.

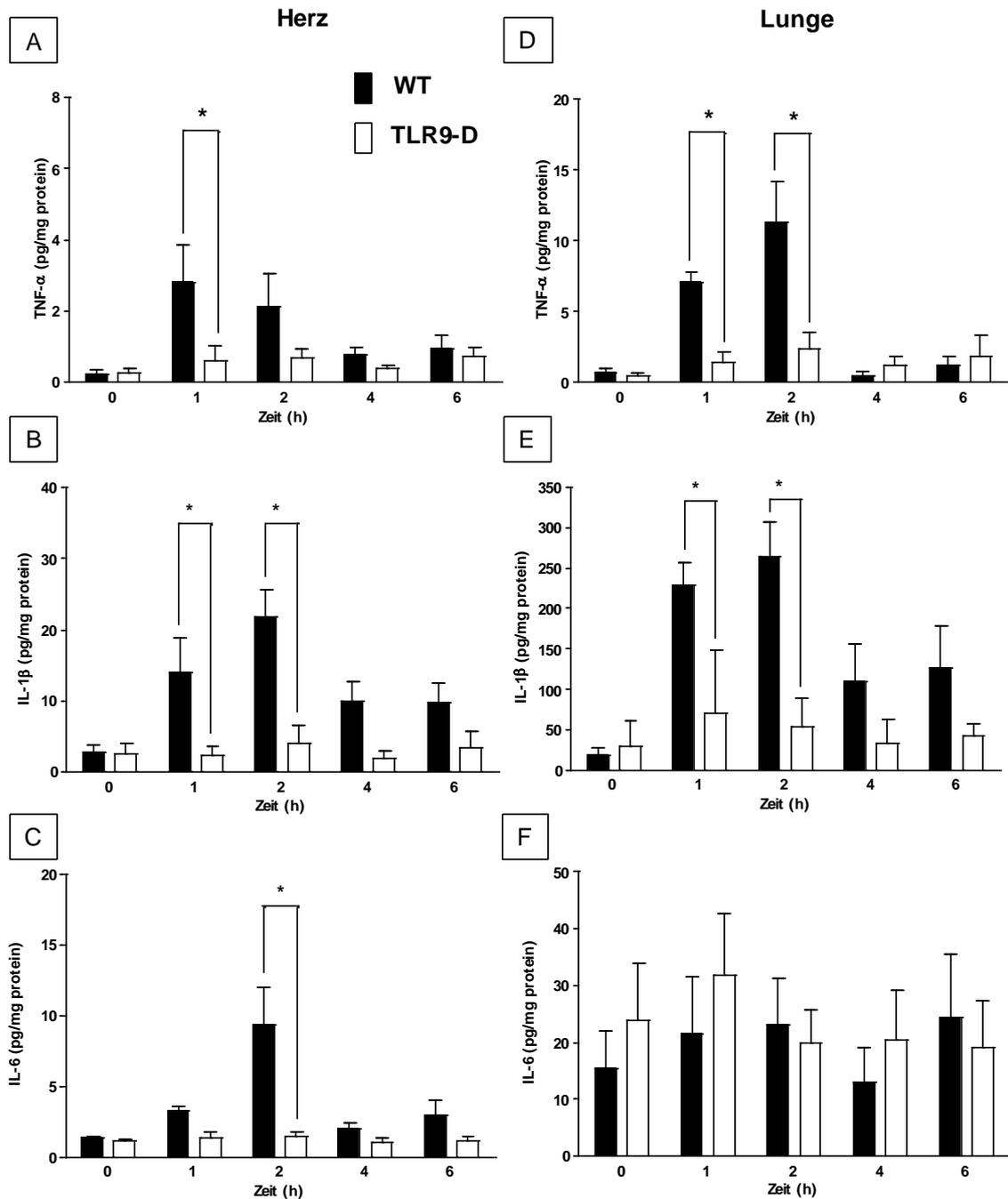


Abbildung 9: Messung der Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine in Herzen und Lungen nach Gabe von CpG-ODN. A-C) Mittels ELISA wurde im kardialen Gewebe nachgewiesen, dass die untersuchten Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 in WT-Mäusen innerhalb von ein bis zwei Stunden nach Applikation von CpG-ODN signifikant erhöht waren. Dies zeigte sich in TLR9-D Mäusen nicht. D-F) Eine ähnliche Ausprägung der Zytokinproduktion ergab sich auch für die Lungen, wobei die Konzentrationen an TNF- α und IL-1 β 4- bzw. 12-mal so hoch waren. Unterschiede in der Produktion von IL-6 wurden bei beiden Mauslinien nicht beobachtet. n = 5 pro Zeitpunkt; * P < 0.05 im Vergleich zur Stimulation

3.10 Spezifität des Liganden im vorliegenden Sepsis-Modell

Um die Spezifität des eingesetzten Liganden zu überprüfen, wurden verschiedene Oligonukleotidsequenzen mit und ohne CpG-Motiv eingesetzt. Nach den Untersuchungen von Krieg und Mitarbeitern ist bei Mäusen das Vorliegen des Hexamer-Motives 5'-**GACGTT**-3' für die Immunreaktion verantwortlich (Krieg et al. 1995). Um auch in diesem Sepsis-Modell die antigene Wirkung der eingesetzten Substanzen auszuschließen, wurden drei Sequenzen im Bezug auf die Zytokinproduktion im kardialen Gewebe untersucht. Folgende Oligonukleotidsequenzen mit unterschiedlichem Hexamer-Motiv (mit „Fettdruck“ hervorgehoben) wurden für diese Untersuchung eingesetzt:

CpG-ODN (ODN 1668): 5'-TCC-AT**G-ACG**-TTC-CTG-ATG-CT-3' (stimulierende Sequenz)

ODN H154: 5'-CCT-CAA-**GCT**-TGA-GGG-G-3' (suppressive Sequenz)

ODN 1612: 5'-GCT-AGA-**GCT**-TAG-GCT-3' (neutrale Sequenz).

Die mRNA-Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β wurde mittels „RNase Protection Assay“ gemessen (n= 3 bis 5 pro Zeitpunkt). Die Resultate dieser Untersuchung wurden in Tabelle 19 zusammengefasst.

Oligonukleotid	Zeit (h)	TNF- α	IL-6	IL-1 β
Kontrolle	0	0,27 \pm 0,05	0,53 \pm 0,13	0,72 \pm 0,21
ODN 1668	2	5,07 \pm 0,76*	2,79 \pm 0,27*	7,97 \pm 1,15*
ODN 1668	4	2,70 \pm 0,43*	0,95 \pm 0,17*	4,13 \pm 0,74*
ODN 1668	6	2,82 \pm 0,71*	1,34 \pm 0,24	3,73 \pm 0,99
ODN H154	2	0,30 \pm 0,07	0,11 \pm 0,05	0,32 \pm 0,13
ODN H154	4	0,14 \pm 0,07	0,003 \pm 0,003	0,10 \pm 0,04
ODN H154	6	0,21 \pm 0,02	0,06 \pm 0,03	0,28 \pm 0,06
ODN 1612	2	0,37 \pm 0,05	0,02 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02
ODN 1612	4	0,11 \pm 0,05	0,01 \pm 0,003	0,33 \pm 0,10
ODN 1612	6	0,26 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01

Tabelle 19: Einfluss von drei verschiedenen Oligonukleotidsequenzen (CpG-ODN bzw. ODN 1668, ODN H154, ODN 1612) auf die kardiale mRNA-Expression von TNF- α , IL-6 und IL-1 β , detektiert nach 2, 4 und 6 h post-infectem in WT Mäusen.

Die Sequenz von CpG-ODN verursachte einen Anstieg der mRNA-Expression der drei untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine, wogegen die beiden anderen Sequenzen ohne CpG-Motiv keinen signifikanten Anstieg induzierten. n = 3 bis 5 pro Zeitpunkt;

* P < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle

3.11 Nachweis pro-inflammatorischer Zytokine im Serum

Die erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine im Serum war ein weiterer Hinweis für das Vorliegen einer systemischen Reaktion. Die Erhöhung der Zytokinkonzentration nach Stimulation mit CpG-ODN wurde in Versuchen mit isolierten Immunzellen beobachtet (Hemmi et al. 2000; Sparwasser et al. 1997a; Sparwasser et al. 1997b; Sparwasser et al. 1998).

Die Messung der Sera zeigte, dass bei WT-Mäusen die Serumspiegel für TNF- α und IL-6 nach zwei Stunden deutlich erhöht waren und im Vergleich zu TLR9-D Mäusen eine Signifikanz erreichten (Abbildung 10). Die nachgewiesene Konzentration von IL-1 β erhöhte sich nach zwei Stunden relativ gering. Ein signifikanter Unterschied von WT- zu TLR9-D-Mäusen wurde daher nicht beobachtet. Die Messergebnisse für den Zeitpunkt nach zwei Stunden, die für diese Betrachtung von Relevanz waren, wurden nochmals tabellarisch zusammengefasst (Siehe Tabelle 20). Nach sechs Stunden waren die Zytokinkonzentrationen in WT-Mäusen wieder erniedrigt. Im Vergleich zu den Werten von TLR9-D-Mäusen waren sie noch leicht erhöht, jedoch nicht signifikant.

Zytokin	WT-Mäuse	TLR9-D-Mäuse
TNF- α (pg/mg Protein)	393,4 \pm 54,9	13,4 \pm 1,7
IL-6 (pg/mg Protein)	7344,6 \pm 2871,0	50,4 \pm 10,4
IL-1 β (pg/mg Protein)	43,4 \pm 18,5	22,5 \pm 8,7

Tabelle 20: Tabellarische Zusammenstellung der Messergebnisse der Zytokine im Serum. Die Sera von WT- und TLR9-D-Mäusen wurden zwei Stunden nach Applikation von CpG-ODN entnommen und mittels „Cytokine Multiplex Assay“ gemessen. n = 5 pro Zeitpunkt

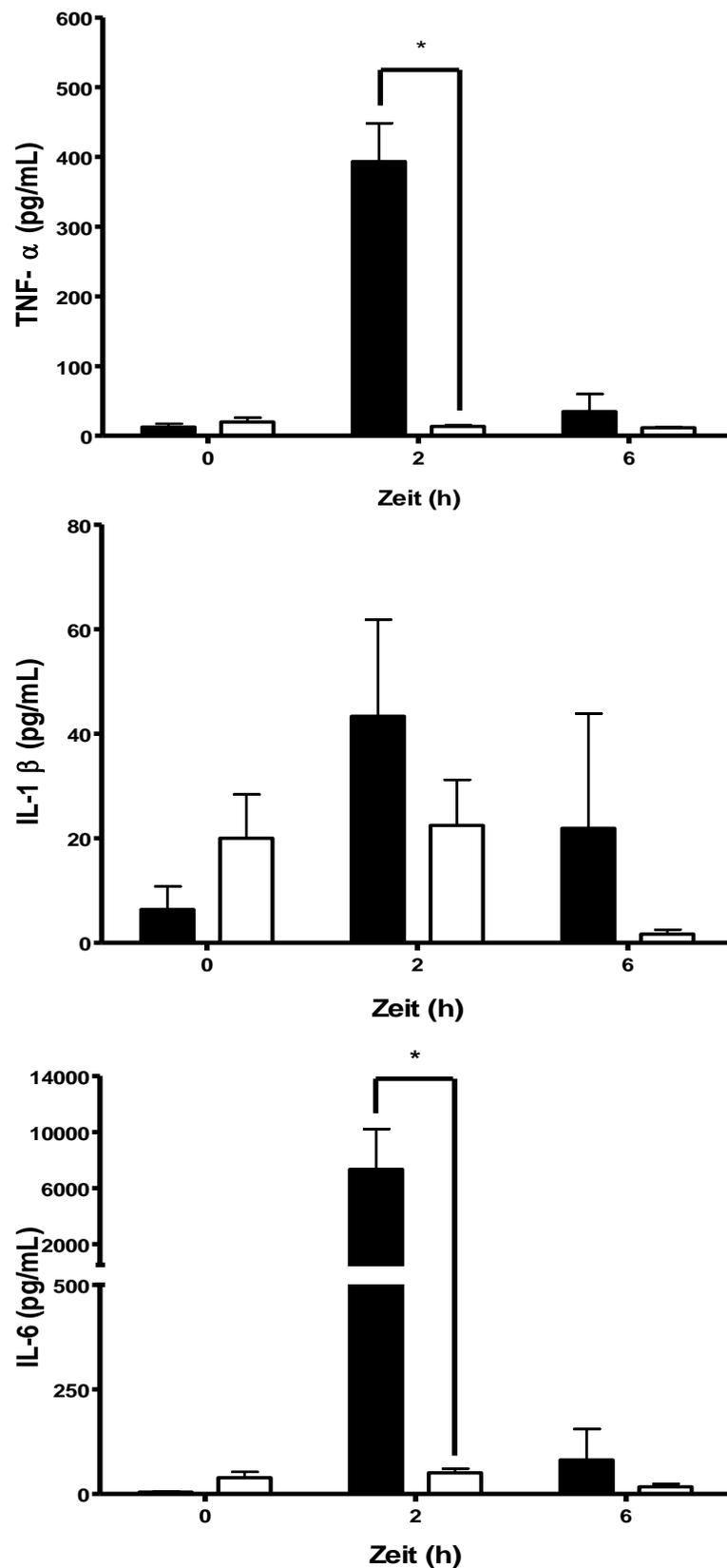


Abbildung 10: Induktion der Zytokinproduktion im Serum. Mittels „Cytokine Multiplex Assay“ wurden die Sera von WT- und TLR9-D Mäusen analysiert. Eine signifikante Zunahme wurde für TNF- α und IL-6 beobachtet. Die Konzentration von IL-1 β in Sera von WT-Mäusen erreichte keine Signikanz gegenüber den Sera von TLR9-D Mäusen. n = 5 pro Zeitpunkt; P < 0,05 im Vergleich zur Stimulation

3.12 Expression der induzierbaren Form der Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS)

Das Erscheinungsbild einer Sepsis ist häufig mit einem Anstieg der Expression der induzierbaren Form der Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) verbunden. Die Induktion dieser Synthetase ist zudem ein Hinweis auf das Vorliegen einer Stresssituation, die sich in einer Hypoxie des Herzens zeigt, in deren Folge Stickstoffmonoxid gebildet wird. In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Klaus Fink (Pharmakologie, Universität Bonn) wurde die Expression von iNOS in einer semiquantitativer Reverser Transkription-PCR nachgewiesen. Die Expression wurde zum Zeitpunkt vier Stunden nach Applikation von CpG-ODN gemessen. Bei WT-Mäusen war nach Applikation von CpG-ODN eine deutlich erhöhte Expression von iNOS nachweisbar (Abbildung 11).

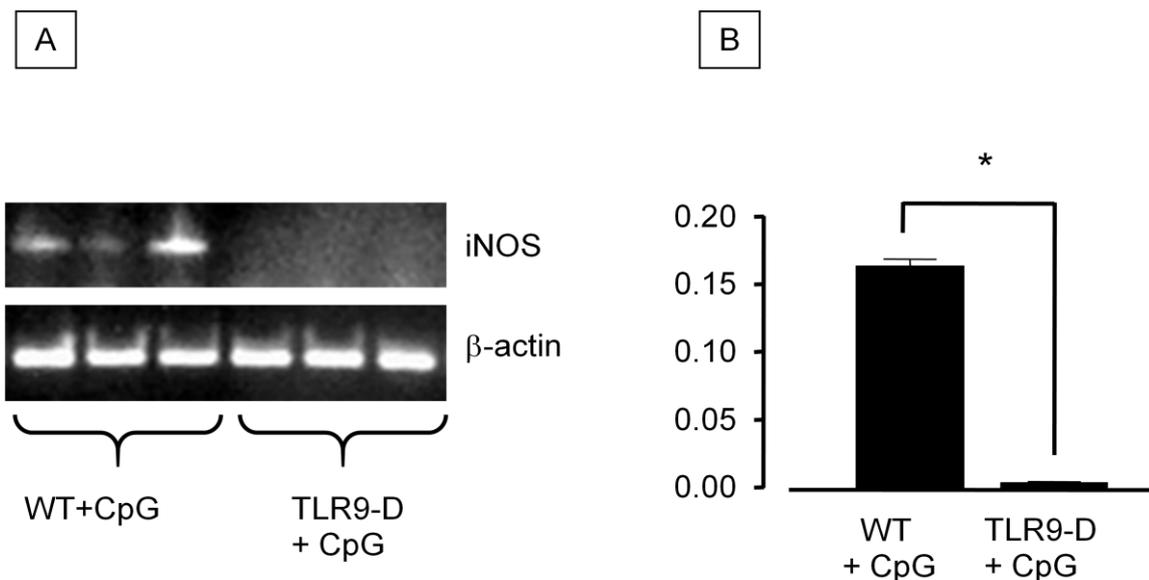


Abbildung 11: Induktion der induzierbaren Form der Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS). A) Mittels Reverser Transkriptions-PCR konnte die Induktion von iNOS in WT-Mäusen vier Stunden nach Applikation von CpG-ODN nachgewiesen werden. In TLR9-D Mäusen konnte die Expression von iNOS zu diesem Zeitpunkt nicht gezeigt werden. B) Die densitometrische Analyse nach Normalisierung gegen β -Aktin ergab eine signifikante Erhöhung dieser Expression. n = 4; P < 0,05

3.13 Nachweis der Aufnahme von CpG-ODN im kardialen Gewebe mittels Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie bzw. „fluorescence activating cell sorting“ (FACS) wurde die Aufnahme von fluoreszenzmarkierter CpG-ODN in Herzen, Lunge und Milz analysiert. Die Arbeiten wurden in Kooperation mit Frau Dr. Beatrix Schumak (Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt. Den Mäusen wurden intravenös 5 nmol ODN 1668-Cy5 ohne Vorbehandlung mit D-GalN verabreicht. Nach einem Zeitraum von drei und 24 Stunden wurden die Herzen, Lungen und Milzen entnommen. Die Zellverbände dieser Organe wurden aufgelöst. Die vereinzelt Zellen wurden bezüglich der Aufnahme von CpG-ODN untersucht. Mit Hilfe von verschiedenen Oberflächenmarkern wurde die Beteiligung von Makrophagen und dendritischen Zellen analysiert.

Diese Analysen zeigten, dass nach drei Stunden in 14,3% der aus dem Herzen isolierten Zellen ein Fluoreszenzsignal detektiert wurde (Abbildung 12; Tabelle 21). Da zum Zeitpunkt ein Grundsignal von 0,6% Cy5-positive Zellen detektiert werden konnte, wären es exakter Weise 13,7% der isolierten Zellen. Nach 24 Stunden wiesen noch 7,6% (bzw. 7,0% korrigiert) der kardialen Zellen die Aufnahme von CpG-DNA auf. In den Lungen und Milzen der gleichen Versuchstiere wurde ebenfalls eine Aufnahme des fluoreszenz-markierten Konstrukts nachgewiesen. In Zellen aus pulmonalem Gewebe wurde nach drei Stunden in 39,0% der Zellen diese Fluoreszenz nachgewiesen (Grundsignal: 0,4%). Nach 24 Stunden wurde noch in 14,5% der Zellen die Aufnahme von CpG-ODN detektiert. In der Milz, die nach drei Stunden isoliert wurde, zeigten 23,1% der isolierten Zellen (Grundsignal: 0,4% der isolierten Zellen der Milz) dieses spezifische Signal. Auch hier nahm die Anzahl der nachgewiesenen Zellen nach 24 Stunden ab, so dass nur noch 8,4% der Zellen eine Aufnahme von CpG-ODN zeigten.

In erweiterten Analysen wurde die Migration von Immunzellen in Herz, Lunge und Milz untersucht, wobei sich die Arbeiten auf den Nachweis von CD11b- und CD11c-positiven Zellen beschränkte, die als Makrophagen bzw. dendritische Zellen eingeordnet wurden. Im Isolat aus kardialem Gewebe wurde festgestellt, dass nach drei Stunden der prozentuale Anteil dieser beiden Zelltypen nicht zunimmt. Stattdessen wurde eine Abnahme der CD11c-positiven Zellen von vormals 31,7% auf 10,8% detektiert (Tabelle 21). In 37,0% der CD11c-positiven Zellen wurde die Aufnahme von CpG-ODN zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen. Die Anzahl der CD11b-positiven Zellen nahm ebenfalls ab (38,7% zum Zeitpunkt 0 Stunden auf 26,2% nach drei Stunden). Zu diesem Zeitpunkt

wiesen 41,2% der CD11b-positiven Zellen eine Fluoreszenz auf. 24 Stunden nach i.v.-Applikation von ODN 1668-Cy5 hatte der prozentuale Anteil der nachgewiesenen CD11b-positiven Zellen deutlich zugenommen und sich fast annähernd verdoppelt (vom Ausgangswert 38,7% (0 h) auf 59,7% (24 h)). Der prozentuale Anteil der dendritischen Zellen lag mit 39,5% in einem Bereich des Ausgangswertes von 31,7%. Allgemein wurde festgestellt, dass 24 Stunden nach Injektion die Anzahl der Zellen, die eine Detektion des Oligonukleotids aufwiesen, abgenommen hatte. So wiesen nur 8,9% der CD11b-positiven und 8,0% der CD11c-positiven Zellen die Aufnahme von ODN 1668-Cy5 auf.

Beim Vergleich mit den Ergebnissen, die aus den Isolaten der Lunge und der Milz erzielt wurden, konnte eine andere Reaktion festgestellt werden. Die Applikation von CpG-ODN führte in beiden Organen bereits nach drei Stunden zu einer Erhöhung der CD11b-positiven Zellen. Ihre Anzahl stieg um das 1,5- bis 2-fache des Ausgangswertes an. In der Lunge wurde in 56,9% der CD11b-positiven Zellen die Aufnahme von fluoreszenz-markierter CpG-ODN detektiert. In der Milz wiesen zum gleichen Zeitpunkt 75,4% der CD11b-positiven Zellen ein Signal für ODN 1668-Cy5 auf. Nach 24 Stunden nahm in beiden Organen die Anzahl der Makrophagen ab. In der Milz normalisierte sich ihre Anzahl in einem Bereich des Ausgangswertes. 23,1% der CD11b-positiven Zellen in der Lunge und 67,0% des gleichen Zelltyps in der Milz wurden mit einem Cy5-Signal detektiert.

Die Anzahl der dendritischen Zellen stieg nach drei Stunden in der Lunge ebenfalls um das 1,5-fache des Ausgangswertes an, wogegen in der Milz sowohl nach drei als auch nach 24 Stunden eine relativ konstante Anzahl beobachtet wurde. Zum Zeitpunkt von drei Stunden wurde in 33,6% der CD11c-positiven Zellen in der Lunge und 57,3% der Zellen in der Milz die Aufnahme von CpG-ODN detektiert. Nach 24 Stunden halbierte sich die Anzahl der Zellen, die ein Cy5-Signal aufwiesen (Lunge: 14,8%, Milz: 28,3%).

Zusammenfassend lässt sich aus dieser Analyse schließen, dass in allen untersuchten Organen, die Aufnahme von CpG-ODN nachgewiesen wurde. Im Gegensatz zur Lunge und der Milz, war der Nachweis von CpG-ODN im Isolat aus Herzgewebe nicht an die Lokalisation von Makrophagen und dendritischen Zellen gebunden. In der Lunge und der Milz wurde mittels CpG-ODN die Migration von Makrophagen in diese Gewebe induziert. Die Zunahme des Nachweises von dendritischen Zellen war nur in der Lunge erkennbar.

In einem weiteren Versuchsvorhaben wurde getestet, die Aufnahme von CpG-ODN *ex vivo* in isolierten, linksventrikulären Kardiomyozyten nachzuweisen. Dieses Vorhaben scheiterte jedoch daran, da diese Zellen nach Isolation keine einheitliche Morphologie aufwiesen. In der Auswertung der Daten erwies es sich als sehr schwierig. Es konnte keine einheitliche, spezifische Zellpopulation, die man als Kardiomyozyten bezeichnen hätte können, definiert werden.

Organ	Zeit (h)	0	3	24
Herz	Anteil Cy5-positiver Zellen im Gewebe	0,6%	14,3%	7,6%
	CD11b-positiv Zellen	38,7%	26,2% (41,2%)	59,7% (8,9%)
	CD11c-positiv Zellen	31,7%	10,8% (37,0%)	39,5% (8,0%)
Lunge	Anteil Cy5-positiver Zellen im Gewebe	0,4%	32,0%	8,4%
	CD11b-positiv Zellen	35,4%	58,2% (56,9%)	52,2% (23,1%)
	CD11c-positiv Zellen	13,1%	18,1% (33,6%)	16,5% (14,8%)
Milz	Anteil Cy5-positiver Zellen im Gewebe	0,4%	23,1%	8,4%
	CD11b-positiv Zellen	14,1%	20,9% (75,4%)	12,6% (67,0%)
	CD11c-positiv Zellen	3,5%	4,0% (57,3%)	3,9% (28,3%)

Tabelle 21: Tabellarische Zusammenfassung der Daten aus der Durchflusszytometrie. Den Mäusen wurden jeweils 5 nmol ODN 1668-Cy5 (i.v.) verabreicht. Nach drei bzw. 24 Stunden wurden die Zellen aus den Organen isoliert, auf den Nachweis von CD11b- und CD11c-positiven Zellen analysiert. In Klammern ist die Anzahl der Cy5-positiven Zellen innerhalb dieser Zellpopulationen angegeben.

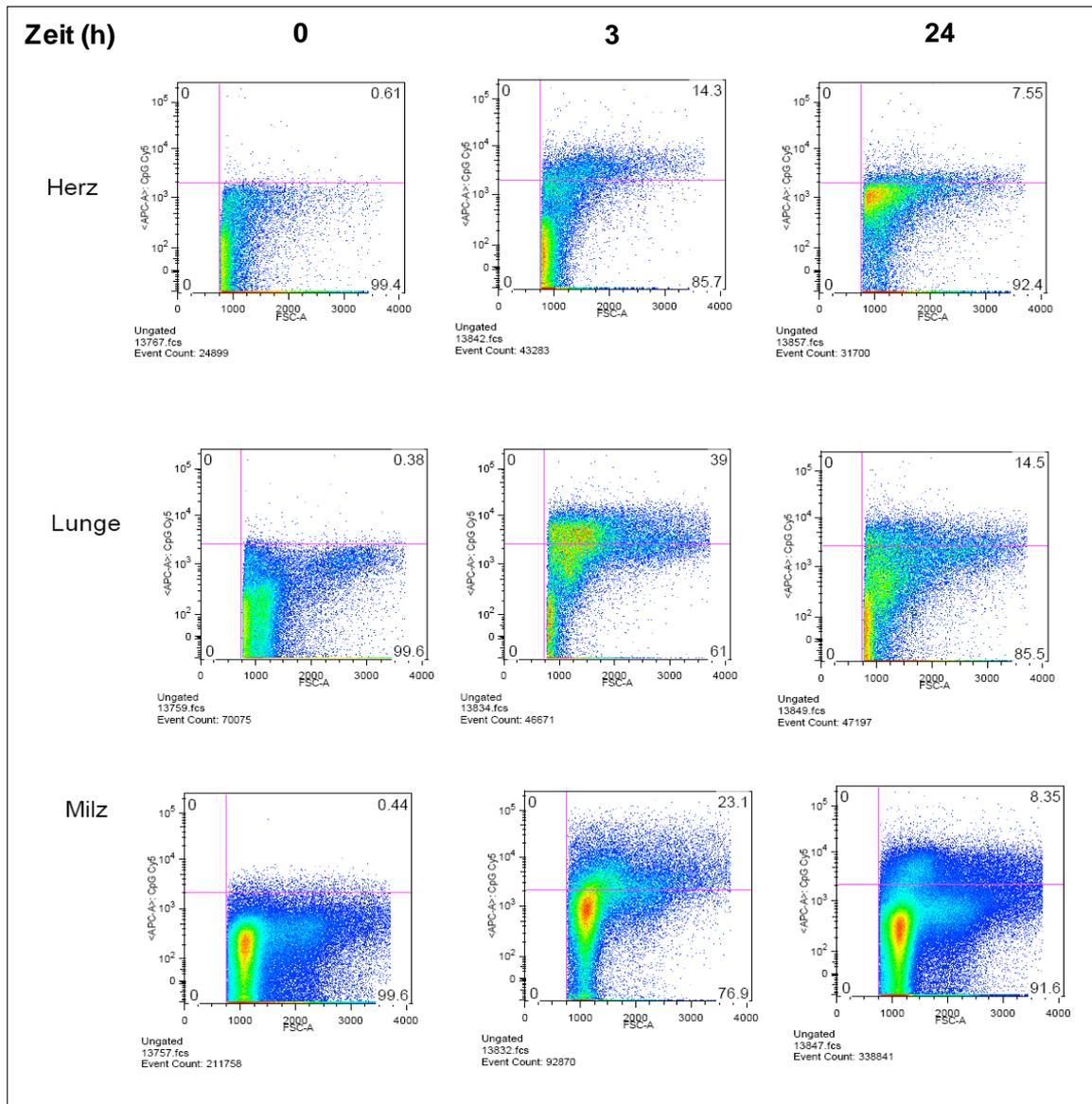


Abbildung 12: Durchflusszytometrie zur Aufnahme von fluoreszenzmarkierter CpG-ODN (ODN 1668-Cy5) in Herz, Lunge und Milz. Der rechte, obere Quadrant gibt die Population der Zellen wieder, die ein Cy5-positives Signal aufweisen und somit die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten CpG-ODN wiedergeben. Deren Aufnahme in den vereinzelt Zellen, die aus den verschiedenen Geweben isoliert wurden, wurde allgemein nach drei Stunden beobachtet. Nach intravenöser Applikation war die Aufnahme in Zellen aus Lungengewebe am höchsten. Nach 24 Stunden nahm der prozentuale Anteil dieser Signale wieder ab. Die Aufnahme von CpG-ODN war in allen drei untersuchten Geweben weiterhin detektierbar.

3.14 Einfluss von CpG-ODN auf Knochenmark-chimäre Mäuse

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Knochenmark-chimäre Mäuse generiert. Das Knochenmark von weiblichen TLR9-D Mäusen wurde isoliert und in männliche WT-Mäuse implantiert. An dieser Stelle wird noch einmal darauf hingewiesen, dass für die Versuchstiere die Folgen dieser Behandlung mit einem hohen, gesundheitlichen Risiko verbunden waren. Nicht alle behandelten Tiere überlebten die ersten, beiden Wochen nach Implantation trotz intensivster Bemühungen wie einer sterilen Unterbringung und Versorgung. Den überlebenden Tieren war der Eingriff anzumerken, da sie im Verhältnis zu gleichaltrigen WT-Mäusen eine gekrümmte Körperhaltung aufwiesen, sich aber im sonstigen Verhalten kaum unterschieden.

Nach einem Zeitraum von 8 bis 10 Wochen nach Implantation der Knochenmarkszellen wurden die Stimulationsversuche mit CpG-ODN wiederholt. Die Tiere zeigten keine wesentliche Verschlechterung ihres Gesundheitszustandes. Manche Tiere waren trotz der Applikation von CpG-ODN recht aktiv. Der Zustand des Stuhls war allerdings von leicht zähflüssiger Konsistenz. Die Tiere zeigten beim Einspannen in einem Restrainer zur Entnahme von peripherem Blut noch relativ viel Widerstand. Zur effektiven Ausnutzung dieser generierten Mauslinie wurden neben den Herzen u.a. auch die Lungen entnommen und analysiert. Die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 wurde mittels ELISA gemessen.

Hierbei wurde festgestellt, dass die Produktion von TNF- α im kardialen Gewebe der KM-chimären Mäuse im Vergleich zu den Analysen der WT-Mäuse sehr gering war (Siehe Abbildung 13). Die Regulation der TNF- α -Produktion ähnelte der von TLR9-D Mäusen. Die Produktion von IL-1 β nahm innerhalb des Versuchsintervalls von sechs Stunden stetig zu, und erreichte ihr Maximum nach Beendigung der Versuche. Die Lungen der KM-chimären Mäuse zeigten im Bezug auf diese beiden Zytokine ein ähnliches Regulationsmuster wie die TLR9-D Mäuse. Eine Induktion wie bei WT-Mäusen wurde nicht beobachtet. Die interessanteste Beobachtung wurde bei der Messung von IL-6 gemacht. Generell war die Konzentration von IL-6 im Herzen der KM-chimären Mäuse im Vergleich zu WT- und TLR9-D Mäusen deutlich erhöht. Die Applikation von CpG-ODN zeigte zwar eine leichte Zunahme der IL-6-Produktion, die sich allerdings aufgrund der hohen Ausgangswerte als nicht signifikant erwies. Nach vier Stunden näherte sich die Konzentration dem erhöhten Ausgangspunkt an, wogegen WT-Mäuse im gleichen Zeitraum eine rapide Abnahme von IL-6 zeigten. Die Lungen der KM-chimären Mäuse

zeigten hingegen eine Regulation, die sich von WT- und TLR9-D Mäusen nicht wesentlich unterschied.

Mit dem vorliegenden Versuchsmodell der KM-chimären Maus wurde eine Modulation der Immunreaktion erzeugt. Die chimären Mäuse wiesen nach Applikation von CpG-ODN keine erhöhten Konzentrationen von TNF- α im kardialen Gewebe auf. Die Expression dieses pro-inflammatorischen Zytokins ähnelt der von TLR9-D Mäusen. Ein ähnliches Muster der Zytokinproduktion wurde auch in den Lungen beobachtet. Die nachgewiesenen Konzentrationen von IL-1 β nahmen innerhalb des Untersuchungszeitraums stetig zu. Hierbei wurde wiederum ein entscheidender Unterschied zu WT- und TLR9-D Mäusen beobachtet. Nach diesen Parametern lag in den Tieren keine Sepsis vor (Giroir et al. 1992; Kapadia et al. 1995). Die detektierten, erhöhten IL-6-Konzentrationen zeigten allerdings, dass durch die Implantation von TLR9-defizienten Knochenmarkszellen eine Veränderung in den Mäusen stattgefunden hat. Die IL-6-Produktion in den Lungen wurde durch diesen Eingriff nicht beeinflusst. Allein mit diesem Modell ließ sich diese Änderung nicht erklären. Durch die Bestrahlung wurde in den Mäusen zwar eine Immunsuppression hervorgerufen, jedoch waren Artefakte durch die Wechselwirkung von körperfremden Materialien mit dem Organsystem nicht auszuschließen.

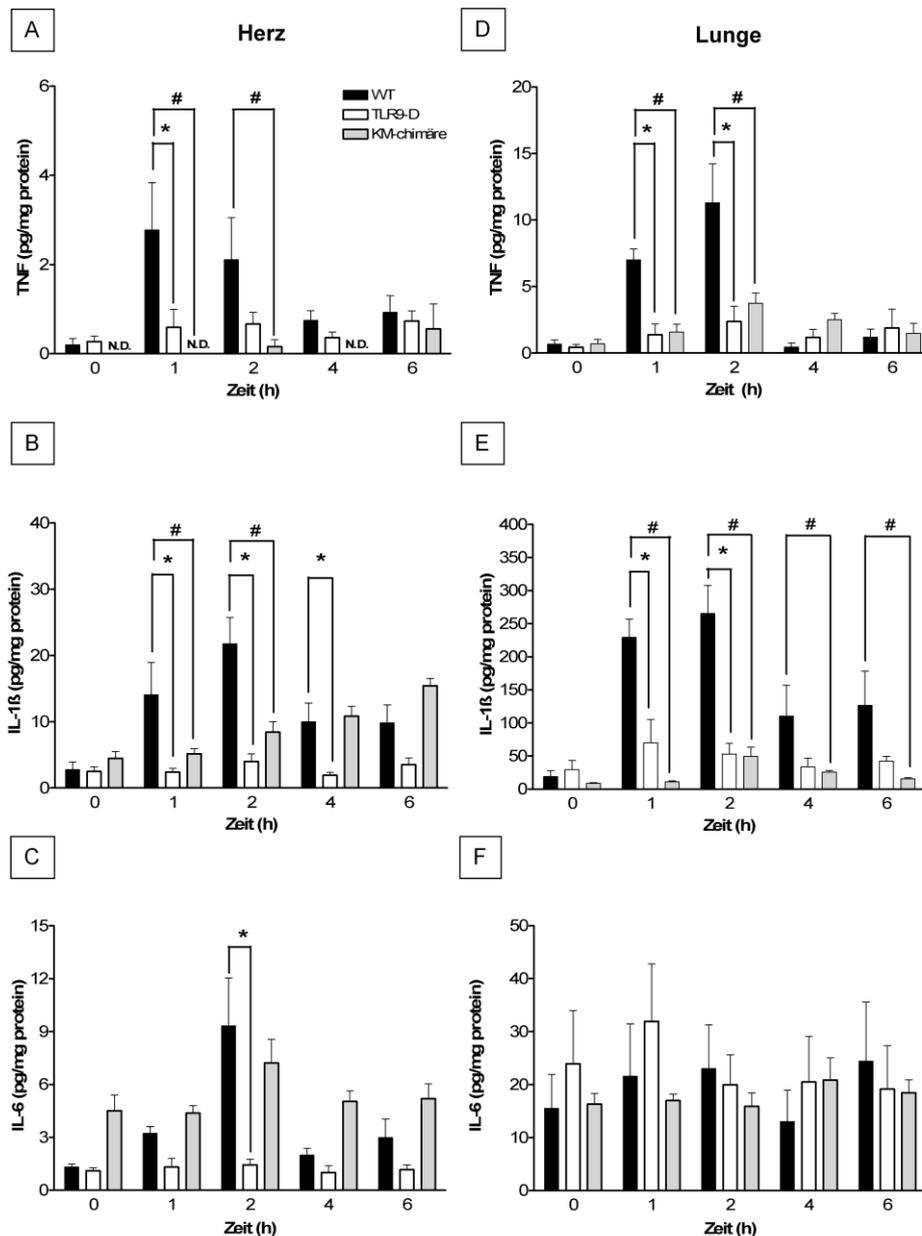


Abbildung 13: Regulation pro-inflammatorischer Zytokine in Knochenmarkchimären Mäusen nach Applikation von CpG-ODN. A-C) Mittels ELISA wurden die Konzentrationen der Zytokine im kardialen Gewebe gemessen. Die Expression von TNF- α wurde kaum induziert (A). Die Konzentration von IL-1 β stieg innerhalb des Beobachtungszeitraumes stetig an (B). Auffällig bei diesen Untersuchungen war die hohe Konzentration von IL-6 im kardialen Gewebe von KM-chimären Mäusen (C). Die Messungen der Zytokinproduktion in den Lungen (D-F) der gleichen Tiere zeigten, dass die Expression von TNF- α kaum induziert wurde (D). Die Konzentration von IL-1 β im pulmonalen Gewebe war signifikant reduziert und vergleichbar mit der Reaktion von Lungen aus TLR9-D Mäusen (E). Für IL-6 wurde im pulmonalen Gewebe kein signifikanter Unterschied nachgewiesen (F). n = 5 pro Zeitpunkt; * P < 0,05 WT vs TLR9-D; # P < 0,05 WT vs KM-Maus.

4. Diskussion

Die Sepsis stellt ein Krankheitsbild dar, deren Auftreten insbesondere auf nicht-kardiologischen Intensivstationen ein ernst zunehmendes Problem bildet. Die Mechanismen, die zur Entstehung einer Sepsis führen, waren lange Zeit unbekannt. Die Entdeckung verschiedener Antibiotika und deren Einsatz als präventive, therapeutische Maßnahme können dies nicht verhindern. Es ist wahrscheinlich, dass aufgrund der Zunahme Antibiotika-resistenter Mikroorganismen wie dem „Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*“ (MRSA) und der zunehmenden Implantation körperfremder Materialien die Inzidenz der Sepsis in Zukunft ansteigen wird (Kim et al., 2001).

Die Entdeckung der Toll-Like Rezeptoren hat dazu beigetragen, die Mechanismen der Sepsis besser zu verstehen. Man hat erkannt, dass nicht das Wachstum und die Vermehrung von Mikroorganismen zu diesem Krankheitsbild führen. Es sind vielmehr ihre Oberflächenstrukturen oder die beim Zerfall freigesetzten Bestandteile, die zu einer Immunreaktion im Wirtsorganismus führen können. Sie wirken allgemein als PAMPs („pathogen associated molecular pattern“), deren Strukturen ausschließlich auf Krankheitserreger zurückgeführt werden können. Bakterielle DNA ist eine solche Struktur, deren Wirkung im Rahmen eines bakteriellen Infektes oder bei der Entstehung einer Sepsis keine große Bedeutung beigemessen wurde. Sie wird durch Lyse von Bakterien freigesetzt, wobei das Immunsystem oder eine Behandlung mit Antibiotika die Zerstörung der Bakterien bewirkt. Die Bedeutung der bakteriellen DNA im Rahmen der Sepsis ist weiterhin unklar, da bei der Diagnose die Bestimmung des bakteriellen Erregers im Vordergrund steht. Die hier dargestellten Untersuchungen sollten die Relevanz und die Bedeutung der bakteriellen DNA bzw. synthetischer, immunstimulatorischer CpG-Oligonukleotide (CpG-ODN) bei der Entstehung einer septischen Kardiomyopathie belegen. Die vorliegende Diskussion orientiert sich an der Darstellung der vorliegenden Ergebnisse und verläuft entlang der TLR9-vermittelten Signalkaskade von der Detektion durch den Rezeptor bis zur Expression von Effektormolekülen sowie der Messung physiologischer, kardialer Parameter.

4.1 Der Einfluss von CpG-ODN auf die kardiale TLR9-Expression

Im Rahmen dieses Projektes erschien es von grundlegender Bedeutung, die Expression von TLR9, dem spezifischen Rezeptor von bakterieller DNA, im Myokard nachzuweisen. In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Expression von TLR9-mRNA mittels quantitativer „Real Time“-PCR eindeutig belegt. Dies ist im Einklang mit anderen Arbeiten, die belegen, dass TLR9 kontinuierlich im Herzmuskel exprimiert wird (Zarembek und Godowski, 2002; Rodriguez-Martinez et al., 2005; Barton et al., 2006; Ewaschuk et al., 2007). Rodriguez-Martinez und Mitarbeiter zeigten zudem, dass sich im Myokard die Expression von TLR9 nur unwesentlich von der Expression von TLR4, dem Rezeptor für Lipopolysaccharide, unterscheidet (Rodriguez-Martinez et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem erstmalig in einer Zeitverlaufsanalyse die Regulation des Rezeptors nach Applikation von CpG-ODN nachgewiesen. Diese Beobachtung wurde in Western Blot-Analysen auf Proteinebene bestätigt. Analoge Arbeiten zur Expression von TLR9 in Lungen zeigten keine vergleichbare Regulation (Knuefermann et al., 2007). Im pulmonalen Gewebe wurde keine signifikante Zunahme der Rezeptorexpression nach Gabe von CpG-ODN gemessen. Die hier beschriebenen Beobachtungen zur Expression von TLR9 im Herzen zeigten demnach ein Beispiel für eine organspezifische Regulation des Rezeptors.

Zur zellulären Lokalisation von TLR9 gilt allgemein als bewiesen, dass dieser Rezeptor primär intrazellulär im Endoplasmatischen Retikulum vorliegt (Takeshita et al., 2001; Ahmad-Nejad et al., 2002; Latz et al., 2004; Leifer et al., 2004). In Liganden-Bindungsstudien mit stabil transfizierten, humanen Zellen wurde dies mehrfach belegt. Es gibt aber auch Hinweise, dass TLR9 zusätzlich auf Zelloberflächen von humanen Monozyten und B-Lymphozyten exprimiert wird (Saikh et al., 2004; Eaton-Bassiri et al., 2004; Baiyee et al., 2006). In intestinalen Epithelzellen wurde mittlerweile die Expression von TLR9 auf der Zelloberfläche ebenfalls bewiesen (Lee et al., 2006a; Lee et al., 2006b; Ewaschuk et al., 2007). Es besteht die Hypothese, dass die extrazelluläre Expression zur Erkennung von eigener DNA dient, um die Lyse körpereigener Zellen zu detektieren.

In histologischen Untersuchungen sollte an frisch isolierten, linksventrikulären Kardiomyozyten eine projektbezogene Liganden-Bindungsstudie vorgenommen werden. Allerdings war es aufgrund der hohen Hintergrundfluoreszenz der Kardiomyozyten nicht möglich, die Expression von TLR9 mit einem FITC-konjugiertem Anti-TLR9-Antikörper (ebioscience, San Diego, USA) histologisch nachzuweisen. Die Aufnahme des Liganden

wurde daher ohne den direkten Nachweis des Rezeptors dargestellt. Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markierte CpG-ODN wurde im Zytoplasma und dem Nukleus 30 Minuten nach der Applikation detektiert. Eine weitere, erstaunliche Beobachtung war, dass auch in Kardiomyozyten aus TLR9-D Mäusen die verhältnismäßig langsamere Aufnahme von CpG-ODN in diese Kompartimente beobachtet wurde. Die intrazelluläre Aufnahme von Oligonukleotiden wurde bereits mehrfach dokumentiert (Noonberg et al., 1992; Noonberg et al., 1993; Zhang et al., 2005). Die Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden in den Nukleus von Zellen wurde bereits in verschiedenen Arbeiten beschrieben (Kim et al., 2001; Lucchinetti et al., 2006). So wurde im Herzgewebe von Ratten die Aufnahme von FITC-konjugierten Oligonukleotiden in die Nuklei von kardialen Zellen beschrieben (Lucchinetti et al., 2006). Diese Beobachtung wurde beiläufig bei der Einbringung einer Antisense Oligonukleotidsequenz gegen „long interspersed nuclear element 1“ (LINE-1) Retrotransposons dokumentiert. Diese etablierte Methodik wurde bisher nicht unter dem Aspekt der Erkennung über TLR9 betrachtet (Pichon et al., 1997; Dias und Stein, 2002). In den Kardiomyozyten von WT- und TLR9-D Mäusen wurde hingegen die Aufnahme der fluoreszenzmarkierten CpG-ODN ohne die Zugabe eines Detergenz oder einer speziellen Modifikation des Nukleotidkonstruktes erfasst. Ein Hinweis, der diesen Mechanismus zur Aufnahme in den Nukleus erklären könnte, war aus anderen Literaturhinweisen nicht zu entnehmen.

Die verlangsamte Aufnahme der CpG-ODN in TLR9-D Mäusen in den gleichen Zellkompartimenten ist ein weiterer Beleg für die Annahme, dass bakterielle DNA mittels Endozytose in die Zelle gelangt. Diese Beobachtung ist im Einklang mit vielen Arbeiten, in denen die Aufnahme von CpG-ODN in Endosomen dokumentiert wurde (Takeshita et al., 2001; Ishiwata et al., 2004; Latz et al., 2004; Leifer et al., 2004). Die Inhibition der Reifung der Endosomen hatte zudem Auswirkungen auf die TLR9-Rekrutierung aus dem Endoplasmatischen Retikulum (Ahmad-Nejad et al., 2002; Yasuda et al., 2008).

Zu den histologischen Analysen an Einzelzellen wurden vergleichbare Untersuchungen am ganzen Herzen nach Kryofixierung durchgeführt. Auch hier konnte die Aufnahme von fluoreszenz-markierter CpG-ODN im Myokard beobachtet, jedoch waren diese Ergebnisse nicht so eindrucksvoll, wie in den einzelnen Zellen. Bei den Gefrierschnitten war zudem die Möglichkeit von Artefakten gegeben.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Expression von TLR9 durch CpG-ODN reguliert wird. Dieser Rezeptor ist für die Erkennung von bakterieller DNA notwendig. Die Aufnahme des Liganden in isolierten Kardiomyozyten erfolgt unabhängig von der TLR9-Expression. Allerdings wird die Aufnahme ins Zytosol und dem Nukleus durch die Expression von TLR9 beschleunigt.

4.2 Initiation eines TLR9-vermittelten Signaltransduktionsweges mit CpG-ODN

Nachdem die Aktivierung des Rezeptorkomplexes durch die Regulation der TLR9-Expression dokumentiert und die Aufnahme des Liganden in kardialen Zellen bewiesen war, erfolgten molekularbiologische Untersuchungen des Signaltransduktionsweges. Hierbei wurde die Aktivierung verschiedener Aktivatoren als Nachweis ihrer phosphorylierten Formen analysiert. Die Interleukin-Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK) ist einer dieser Mediatoren, die zytosolisch unmittelbar nach dem Rezeptorkomplex aktiviert wird. Die Phosphorylierung dieser Kinase konnte in mehreren Versuchen weder mittels Immunopräzipitation noch mit radioaktiv-markiertem Kinase-Assay eindeutig nachgewiesen werden. Die Aktivierung der Mitogen-assoziierten Protein-Kinasen p38 und ERK1/2 wurde hingegen im kardialen Gewebe bestätigt. In murinen Lungen-epithelzellen wurde bereits die Aktivierung von p38 nach Gabe von immunstimulatorischen CpG-Oligonukleotiden beschrieben (Li et al., 2004). In Arbeiten an murinen Immunzellen wurde ebenfalls die Aktivierung dieser MAP-Kinase nach Inkubation mit immunstimulatorischen CpG-Oligonukleotiden nachgewiesen (Yi und Krieg, 1998; Yi et al., 2001; Li et al., 2004; Yi et al., 2006). Li und Mitarbeiter beobachteten keine Aktivierung von ERK1/2 in murinen Lungene epithelzellen. Die Inkubation eines ERK1/2-Inhibitors (PD98059) hatte keine Auswirkungen auf die Expression von IL-8 in diesem Zelltyp (Li et al., 2004).

Die Aktivierung von NFκB steht in Übereinstimmung mit der Literatur. In Arbeit zur Wirkung von immunstimulatorischen CpG-Oligonukleotiden in Immunzellen wurde deren Aktivierung mehrmals beschrieben (Yi et al., 1999; Yi et al., 2001; Li et al., 2004; Yi et al., 2006). Das Ausbleiben der NFκB-Induktion in TLR9-D Mäusen zeigte, dass es sich hierbei um eine TLR9-vermittelte Reaktion nach Applikation des Liganden handelte. Die Daten sind zudem ein weiterer Beleg, dass die Aktivierung des NFκB-Signalweges über TLR9 nicht nur auf Immunzellen beschränkt ist. Die Aktivierung von NFκB nach Gabe von

CpG-ODN wurde bereits im Lungengewebe und -zellen nachgewiesen (Li et al., 2004; Knuefermann et al., 2007).

Einen Überblick über die Involvierung verschiedener TLRs am NFκB-Signalweg zeigt eine kürzlich erschienene Publikation von Kawai und Akira (Kawai und Akira, 2007). Für das Herz wurde bereits gezeigt, dass auch Liganden anderer Toll-Like Rezeptoren NFκB aktivieren können. Dies zeigte sich in vergleichbaren Arbeiten zu TLR2 und dem TLR4/CD14-Rezeptorkomplex, in denen in *in vivo* Untersuchungen Mäuse mit abgetöteten Zellen von *Staphylococcus aureus* und LPS stimuliert wurden (Baumgarten et al., 2001; Knuefermann et al., 2002; Knuefermann et al., 2004; Baumgarten et al., 2006). Die Aktivierung von NFκB ist insofern wichtig für die vorliegende Studie, da die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1β und IL-6 über diesen Transkriptionsfaktor induziert wird.

Zusammenfassend demonstrieren die vorliegenden Ergebnisse, dass mittels CpG-ODN eine Signaltransduktionskaskade im Herzen initiiert wird, an der die beschriebenen Mediatoren des Toll/IL-1-Signaltransduktionsweges beteiligt sind. Die Aktivierung von NFκB bildet die Grundvoraussetzung für die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine.

4.3 Expression pro-inflammatorischer Zytokine im kardialen Gewebe nach Applikation von CpG-ODN

Die Applikation von CpG-ODN induzierte die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-1β und IL-6 im kardialen Gewebe von WT-Mäusen. In WT-Mäusen stiegen die Zytokinspiegel über das Niveau unbehandelter Tiere sowie von behandelten TLR9-D Mäusen. Das Vorliegen einer systemischen Infektion manifestierte sich in signifikant erhöhten Zytokinspiegeln im Serum der WT-Mäuse, die bei TLR9-D Mäusen ausblieben. Dass diese Reaktionen als organspezifisch angesehen werden können, zeigte der Vergleich mit der Zytokinproduktion in den Lungen. Im pulmonalen Gewebe stiegen die TNF-α- und IL-1β-Konzentrationen signifikant an. Die Produktion von IL-6 schien keiner Regulation durch CpG-ODN zu unterliegen.

Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass die pro-inflammatorischen Zytokine die linksventrikuläre Pumpfunktion beeinflussen (Baumgarten et al., 2004). Die erhöhte Expression von TNF-α und IL-1β werden für die kardiale Depression im Rahmen einer Sepsis verantwortlich gemacht (Giroir et al., 1992; Kapadia et al., 1995; Cain et al., 1999). Patienten, die an einer Sepsis oder einem septischen Schock litten,

wiesen hohe IL-6-Plasmakonzentrationen auf, die mit einer Veränderung der Herzfrequenz und des Blutdrucks korrelierte (Hack et al., 1989). In vorangegangenen Arbeiten wurde demonstriert, dass nach Applikation von LPS die Produktion TNF- α und IL-1 β im Herzen induziert wird (Baumgarten et al., 2001; Knuefermann et al., 2002). Im kardialen Gewebe von TLR4- und CD14-defizienten Mäusen war die Induktion dieser Zytokine signifikant vermindert. Bei Untersuchungen zur Rolle von TLR2 im Herzen wurde nach Gabe von abgetöteten Zellen von *S. aureus* ebenfalls eine signifikant, erhöhte Expression von TNF- α und IL-1 β in WT-Mäusen (C57BL/6) nachgewiesen (Knuefermann et al., 2004). Auf die Funktion von IL-6 wurde in diesen Sepsis-Modellen nicht eingegangen. Alle WT-Mäuse zeigten sechs Stunden nach Applikation des jeweiligen Liganden die Anzeichen eines septischen Schocks, wogegen die jeweiligen TLR-defizienten Mauslinien gesund erschienen.

Knochenmarks-chimäre Mäuse, deren zirkulierende Immunzellen kein TLR9 exprimierten, zeigten nach Stimulation mit CpG-DNA eine Veränderung in der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, welche mittels ELISA nachgewiesen wurden. Die Tiere waren durch eine verhältnismäßig hohe, basale IL-6-Produktion im Herzen gekennzeichnet. Die Expression von TNF- α war in diesem Gewebe kaum nachweisbar. Die Produktion von IL-1 β im kardialen Gewebe dieser KM-chimären Mäuse zeigte zur Beginn der Stimulation keine wesentlichen Unterschiede zu unstimulierten WT-Mäusen und TLR9-defizienten Mäusen. Ein Maximum der Expression war nach zwei Stunden post-infectem in diesen generierten Tieren nicht nachweisbar. Jedoch nahm die IL-1 β -Konzentration im Untersuchungszeitraum von bis zu sechs Stunden stetig zu. Wenn man nur die Parameter der nachgewiesenen Konzentrationen an TNF- α und IL-1 β zur Beurteilung des Krankheitsbildes berücksichtigen würde, so erfüllten die KM-chimären Mäuse nicht die Kriterien für das Vorliegen eines septischen Schocks. Die hohen, nachgewiesenen IL-6-Konzentrationen in diesen Mäusen sprechen jedoch dagegen.

Der Vergleich von IL-6 und TNF- α gibt Anlass für viele Interpretationsmöglichkeiten. Es ist denkbar, dass zwischen diesen beiden pro-inflammatorischen Zytokinen eine Korrelation vorliegt. So wurde kürzlich beschrieben, dass hypertensive und diabetische Ratten, die in einer Langzeitstudie einen TNF-Antagonisten (Etanercept) erhielten, eine kardiale Hochregulation von IL-6 aufwiesen (Haugen et al., 2008; Isic et al., 2008). Der Ursprung für die hohe, kardiale IL-6-Produktion könnte auch auf die Aktivität der Kardiomyozyten zurückgeführt werden. Boyd und Mitarbeiter zeigten, dass Kardiomyozyten, die insbesondere mit LPS stimuliert wurden, eine hohe IL-6 Expression aufwiesen (Boyd et al., 2006). Zur Messung der Effekte von immunstimulatorischen

CpG-Oligonukleotidsequenzen wurde in dieser Arbeit eine immortalisierte Kardiomyozyten-Zelllinie „HL-1“ verwendet, in der nach 24-stündiger Inkubation kein IL-6 nachgewiesen wurde. Die vorliegenden Untersuchungen an Mäusen zeigten hingegen, dass das Maximum der IL-6-Produktion bereits nach zwei Stunden post-infectem erzielt wurde. Die hohe IL-6-Expression ist zumindest eine sehr interessante Beobachtung, wenn man bedenkt, dass dieses Zytokin eine Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellt (Jones, 2005).

Um den Ursprung der Zytokinproduktion im Herzen zu erörtern, sollte man die Konzentrationen im Serum und im kardialen Gewebe vergleichen. Die Angaben der Konzentrationen im Gewebe (in pg/mg Gewebe) und im Serum (in pg/ml Serum) geben nicht die realen Verhältnisse in den Versuchstieren wieder. Dabei sollte man das Gewicht der Herzen (ca. 100 bis 110 mg pro Maus mit 25 g Körpergewicht im Alter von ca. 10-12 Wochen) dem Volumen des Serums (ca. 1 bis 1,5 ml Serum bei 2 bis 3 ml Gesamtblut pro Maus mit 25 g Körpergewicht) gegenüberstellen. Unter Berücksichtigung des Volumens, das sich pro Herzschlag im Herzen befindet, ergibt sich eine interessante Betrachtung. Joho und Mitarbeiter gaben bei ihren Messungen mit einem Herz-Volumen-Katheter, welcher permanent im linken Ventrikel von Mäusen implantiert wurde, ein Enddiastolisches Volumen von $48 \pm 2 \mu\text{l}$ und ein Endsystolisches Volumen von $13 \pm 2 \mu\text{l}$ an (Joho et al., 2007). Unter Berücksichtigung dieses Wertes wird man feststellen, dass die absolute Zytokinmenge (in pg) im kardialen Gewebe wesentlich größer als im Blutvolumen ist, welches sich pro Herzschlag im Organ befindet.

In dem vorliegenden, beschriebenen Fall wird nach Stimulation mit CpG-ODN im gesamten Herzen von WT-Mäusen die Produktion von 200 bis 220 pg TNF- α , 2000 bis 2100 pg IL-1 β und 300 bis 350 pg IL-6 induziert. Zum gleichen Zeitpunkt liegt die Konzentration der Zytokine im Serum, welches gerade durch dieses Herz zirkuliert (bei Annahme eines niedrigeren Blutvolumens von 40 μl), bei 25 pg TNF- α , 2,5 pg IL-1 β und 350 pg IL-6. Die Erzeugung pro-inflammatorischer Zytokine geht demnach vom Herzen aus. Gleichzeitig wird hierdurch verdeutlicht, dass trotz einer nachgewiesenen systemischen Infektion das Herz an sich einen lokalen Entzündungsort darstellt.

Eine erhöhte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, die auf die Einwanderung und Akkumulation von zirkulierenden Immunzellen im Herzen zurückgeführt werden könnte, kann ausgeschlossen werden. Durchflusszytometrische Untersuchungen haben gezeigt, dass keine erhöhte Migration von CD11c-positiven dendritischen Zellen und CD11b-positiven Makrophagen ins kardiale Gewebe erfolgt ist. Hierbei war anzumerken, dass die Applikation der fluoreszenzmarkierten CpG-ODN intravenös über die

Schwanzvene appliziert wurde, wodurch die Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem sich besser nachweisen ließen. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Methodik zur Isolation von Zellen aus Gewebe für Immunzellen optimiert wurde. Der Anteil von gewebespezifischen Zellen wie Kardiomyozyten und kardialen Endothelzellen wurde in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt. Vergleichende Untersuchungen an frisch isolierten, linksventrikulären Kardiomyozyten führten zu keinem vergleichbaren Ergebnis. Diese Messungen zeigten jedoch, dass in WT-Mäusen zum Zeitpunkt drei Stunden post-infectem die Population von dendritischen Zellen und Makrophagen im kardialen Gewebe abnahm, während sie im Lungengewebe deutlich zunahm. Die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine geht demnach im Wesentlichen von parenchymatischen Zellen des kardialen Gewebes aus. Angaben anderer Gruppen zu den Populationsverhältnissen der hier untersuchten Immunzellen im murinen, kardialen Gewebe fehlen ganz, um die hier erzielten Ergebnisse ausführlich diskutieren zu können. In Folge der erhöhten Expression pro-inflammatorischer Zytokine wurde die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS oder NOS2) induziert. In ventrikulären Kardiomyozyten von Ratten induzierte IL-1 β die iNOS-Expression (Singh et al., 1996; Tatsumi et al., 2000). Ihr Nachweis weist auf die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) im kardialen Gewebe hin (Kinugawa et al., 1997), welches in Kardiomyozyten eine Calcium-Desensibilisierung bewirkt, die wiederum zu einer Verminderung der Kontraktilität führt (Hare und Colucci, 1995; Tatsumi et al., 2000). In ventrikulären Kardiomyozyten wurde die Expression von iNOS nach Applikation von LPS mehrfach nachgewiesen (Shindo et al., 1994; Kinugawa et al., 1997; Flesch et al., 1999). Baumgarten und Mitarbeiter beschrieben die Induktion von iNOS im kardialen Gewebe von LPS-behandelten WT-Mäusen (Baumgarten et al., 2006). In ventrikulären Kardiomyozyten aus WT-Mäusen bewirkt die Gabe von CpG-ODN ebenfalls eine Abnahme der Kontraktilität; Zellen aus TLR9-D Mäusen zeigten dagegen keine Reaktion (Knuefermann et al., 2008). Diese Effekte wurden in Kardiomyozyten aus WT-Tieren durch die Gabe des selektiven iNOS-Inhibitors S-Methylthioharnstoff (SMT) in der letzten Stunde der Inkubation mit CpG-ODN aufgehoben (Abbildung 14). Dieses Ergebnis weist auf eine Beteiligung von iNOS an der Unterdrückung der Kontraktilität durch CpG-ODN hin. Die Reaktionen wurden demnach über TLR9 vermittelt.

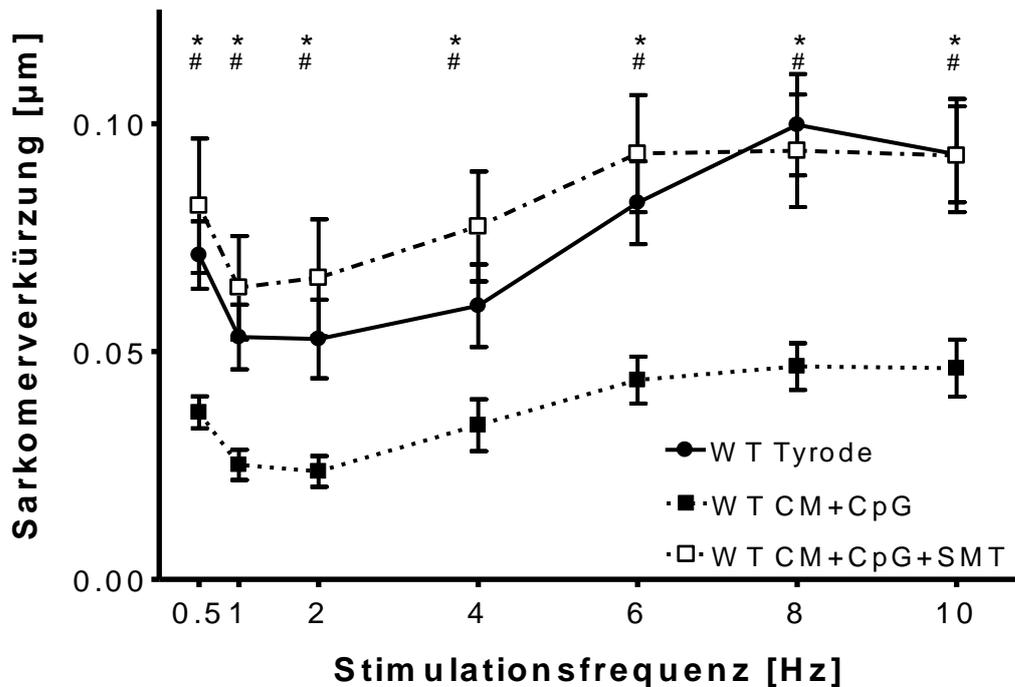


Abbildung 14: Die Inhibition von iNOS hebt die Effekte der CpG-ODN-Stimulation auf. Die Präsenz des iNOS Inhibitors SMT (100 µM) verhinderte den Effekt, der durch 1 µg/ml CpG-ODN hervorgerufen wurde. CM = Kulturmedium, SMT = S-Methylisothioharnstoff (aus Knüfermann et al., 2008). n = 15 bis 21; * P < 0,05 WT-Tyrode vs. WT CM+CpG; # P < 0,05 WT CM+CpG vs. WT CM+CpG+SMT

4.4 TLR9 und Herzfunktion

Bei den Messungen des Blutdruckes wurden keine wesentlichen Unterschiede zwischen Mäusen, die mit CpG-ODN behandelt wurden, und Tieren, denen steriles PBS injiziert wurde, festgestellt. Um einen möglichen Effekt zu demonstrieren, wurde den WT-Mäusen nach Vorbehandlung mit D-Galactosaminhydrochlorid CpG-ODN in einer Konzentration von 40 nmol CpG-ODN injiziert. Dies entsprach einer doppelt so hohen Konzentration wie in den vorangegangenen Stimulationsversuchen (20 nmol). Ein Abfall des Blutdruckes wurde dennoch nicht beobachtet. Die Herzfrequenz blieb in beiden Tiergruppen auf einem vergleichbaren Niveau. Den Ergebnissen zufolge hatte es den Anschein, dass sich die Kontraktilität der Herzen durch die Gabe von CpG-ODN verbesserte. Da die Messungen bereits vier Stunden nach Applikation des Liganden durchgeführt wurden, ist anzunehmen, dass zu diesem Zeitpunkt ein Effekt nicht nachweisbar ist. Ein späterer Zeitpunkt zur

Messung des Blutdruckes wurde nicht gewählt, da die WT-Mäuse sechs Stunden nach Applikation von CpG-ODN einen sehr geschwächten Eindruck zeigten. Den Eingriff für diese hämodynamischen Untersuchungen hätten die Tiere wahrscheinlich nicht überlebt. Nach Angaben von Hemmi und Mitarbeitern starben alle WT-Mäuse, die mit D-GalN (20 mg) und CpG-ODN (20 nmol) vorbehandelt wurden, innerhalb von 12 Stunden, wogegen alle TLR9-D Tiere überlebten (Hemmi et al., 2000).

Die Grundvoraussetzung für einen messbaren Blutdruckabfall schien gegeben, da sich in WT-Mäusen die pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β signifikant erhöhten. Die Messungen des Blutdruckes wurden wie in vergleichenden Arbeiten zwei Stunden nach dem Maximum der Zytokinexpression durchgeführt. Bei einer Studie zur CD14-Expression im Herzen wurden hämodynamische Untersuchungen sechs Stunden nach Applikation von LPS durchgeführt, wobei in WT-Mäusen ein signifikanter Abfall des linksventrikulären Blutdruckes und der kardialen Kontraktilität, gemessen als dP/dt_{max} (in mmHg), vorlag (Knuefermann et al., 2002). In diesen Experimenten lag das Maximum der IL-1 β -Proteinkonzentration vier Stunden nach der Stimulation. Das Maximum der Induktion von TNF- α wurde bereits nach einer Stunde erreicht. In einer weiteren Arbeit wurde demonstriert, dass die Gabe von LPS (20 mg pro kg Körpergewicht) bei WT-Mäusen nach sechs Stunden eine signifikante Abnahme des mittleren, arteriellen Drucks und des linksventrikulären Blutdruckes sowie der kardialen Kontraktilität verursacht (Nemoto et al., 2002; Ehrentraut et al., 2007).

Der Blutdruck wurde wie auch in den Untersuchungen zur Wirkung von CpG-ODN zwei Stunden nach der maximalen IL-1 β -Expression bestimmt. Der Zeitpunkt der Blutdruckmessung scheint also richtig gewählt zu sein. Da der Blutdruck durch das Herzzeitvolumen einerseits und den total peripheren Widerstand andererseits bestimmt wird, ist eine Kompensation dieser Effekte nicht auszuschließen.

Untersuchungen an frisch isolierten, linksventrikulären Kardiomyozyten lassen jedoch den Schluss zu, dass CpG-ODN einen Effekt im Herzen hervorruft. Die Zellen aus WT-Mäusen zeigten eine deutliche Abnahme in ihrer Kontraktilität nach fünfstündiger Inkubation mit CpG-ODN (Knuefermann et al., 2008). Generell waren die Amplituden der Sarkomerverkürzung gekennzeichnet durch eine negative Frequenzabhängigkeit bei niedrigen Frequenzen (< 2 Hz) und eine positive Frequenzabhängigkeit bei hohen Frequenzen (> 2 Hz). Die Wirkung von CpG-ODN (1 μ g/ml) in Kardiomyozyten entfaltete sich relativ langsam. Erst vier Stunden nach Einwirkungszeit ergab sich eine signifikante Reduktion der Sarkomerverkürzungsamplitude (Abbildung 15 A). LPS dagegen wirkt deutlich schneller, schon nach einer Stunde Einwirkungszeit kommt es zu einer

signifikanten Verringerung der Sarkomerverkürzungsamplitude (Baumgarten et al., 2006). Durch die Zugabe von CpG-ODN wurde die Kontraktilität von Kardiomyozyten aus WT-Mäusen signifikant vermindert (Abbildung 15 B). Zellen aus TLR9-D Mäusen zeigten bei Präsenz von CpG-ODN im Medium keine Beeinflussung der Kontraktilität (Abbildung 15 C). Die verminderte Kontraktilität wurde in Zellen aus WT-Tieren durch die Gabe des iNOS-Inhibitors SMT (Abbildung 14) aufgehoben.

Aufgrund dieser Ergebnisse an einzelnen Zellen kann davon ausgegangen werden, dass CpG-ODN zu einem späteren Zeitpunkt als LPS eine Veränderung des linksventrikulären Blutdrucks hervorruft, die mit einer verminderten Kontraktilität verbunden ist. Mittels einer Langzeit-Blutdruckmessung ließe sich dies eventuell nachweisen.

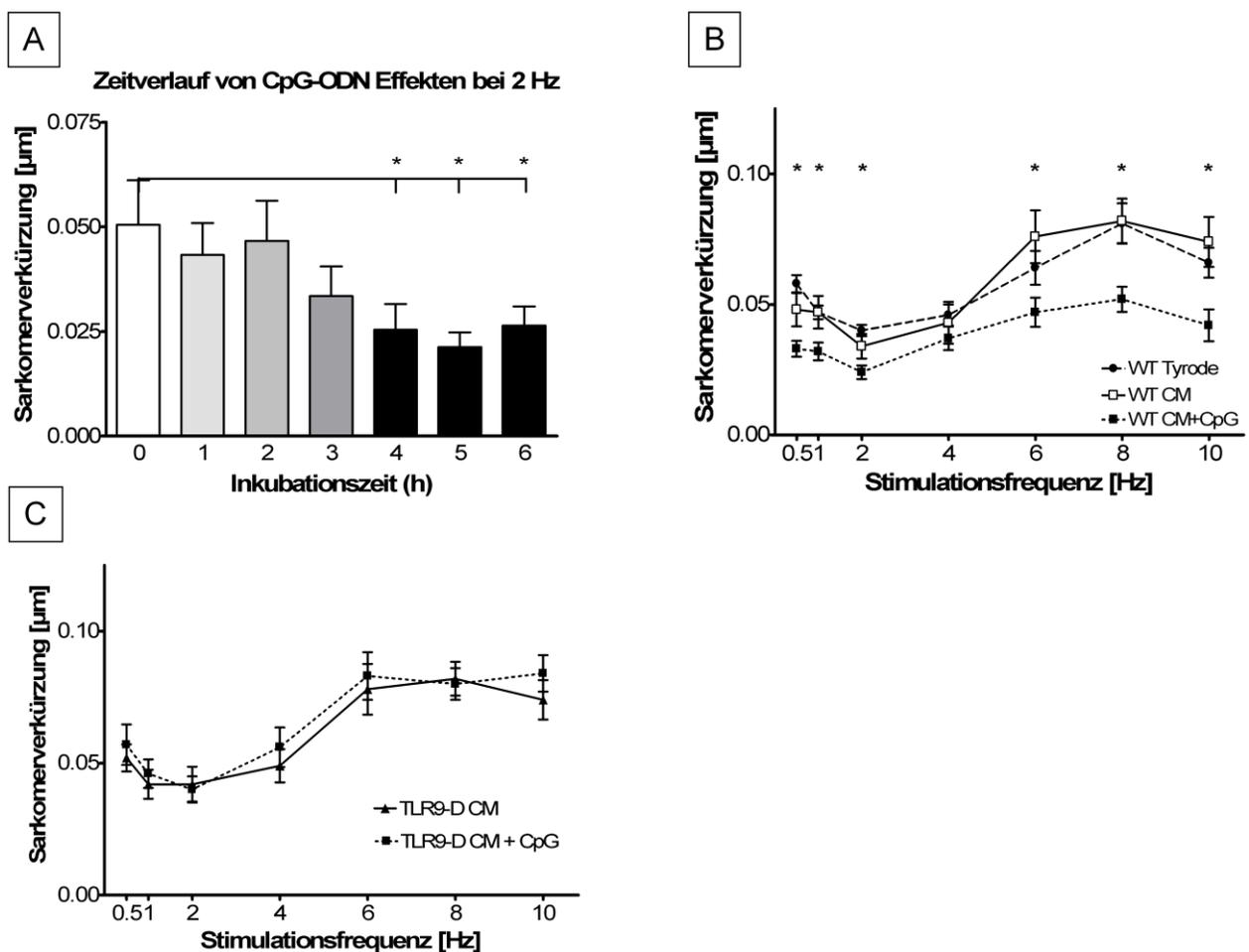


Abbildung 15: Einfluss von CpG-ODN auf die Amplitude der Sarkomerverkürzung.

Der Effekt von CpG-ODN wurde in einem Zeitverlauf bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz aufgezeichnet (A). Im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt nahm nach vier Stunden die Sarkomerverkürzung ab. Kardiomyozyten aus WT-Mäusen zeigten bei Inkubation mit CpG-ODN eine verminderte Sarkomerverkürzung (B). In Zellen aus TLR9-D-Mäusen blieb dieser Effekt aus (C; aus Knüfermann et al., 2008). n = 15 bis 21; P < 0,05

4.5 Beurteilung des vorliegenden Sepsis-Modells und Möglichkeiten für einen Therapie-Ansatz zur Inhibition von kardialem TLR9

Die Applikation von CpG-ODN induzierte in den WT-Mäusen die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren, die für eine kardiovaskuläre Dysfunktion im Rahmen der Sepsis verantwortlich sind. Die Konzentrationen an produzierten Zytokinen in diesen Mäusen waren vergleichbar mit den Ergebnissen zu einem Sepsis-Modell, das über TLR2 vermittelt wird (Knuefermann et al., 2004). TLR9-D Mäuse zeigten nach Gabe des Liganden eine verminderte Zytokinexpression. Das äußere Erscheinungsbild dieser Mauslinie ließ zudem den Rückschluss zu, dass diese Tiere gegenüber der Exposition von CpG-ODN bzw. bakterieller DNA geschützt waren. Zudem blieb die Migration von zirkulierenden Immunzellen ins Herz nach Applikation von CpG-ODN aus. Sie scheinen bei der TLR9-vermittelten Immunreaktion keine wesentliche Rolle zu spielen. Die Erhöhung der TLR9-Expression im kardialen Gewebe ist demnach auf parenchymatische Zellen zurückzuführen. Der Vergleich mit Experimenten an der Lunge demonstrierte zudem, dass eine organspezifische Reaktion vorlag. Demnach bestimmt das angeborene Immunsystem der kardialen Zellen im Wesentlichen das Ausmaß der vorliegenden Entzündungsreaktion, die über TLR9 vermittelt wird. Dies kann zu einem kardiovaskulären Ausfall des Herzens im Rahmen der Sepsis führen.

Die hämodynamischen Untersuchungen zeigten hingegen keinen Blutdruckabfall und keine Verminderung der Herzkontraktilität. In Einzel-Zellversuchen an isolierten, linksventrikulären Kardiomyozyten wurde *in vitro* der Effekt von CpG-ODN auf die Kontraktilität nachgewiesen (Knuefermann et al., 2008). Die Induktion von iNOS in den Herzen von WT-Mäusen sprach für eine später zu erwartende Verminderung der Herzkontraktilität, wie es bei Experimenten mit LPS der Fall war.

Die vorliegenden Ergebnisse sind von Relevanz, da bakterielle DNA im Gegensatz zu spezifischen Oberflächenmolekülen ubiquitär in allen Prokaryoten vorhanden ist und durch Lyse freigesetzt werden kann. Es sollte an dieser Stelle auch darauf hingewiesen werden, dass virale DNA ebenfalls in der Lage ist, eine Immunreaktion über TLR9 zu vermitteln. Die bekanntesten Viren, deren Genom aus DNA besteht, sind z.B. das Herpes simplex-Virus und das Hepatitis B-Virus.

Die Inhibition von TLR9 könnte der Ansatzpunkt für eine adjuvante Behandlungsmöglichkeit zur Prävention einer Sepsis sein. Zellkulturexperimente haben gezeigt, dass Chloroquin, der Wirkstoff eines Malariamittels, die Reifung der Endosomen inhibiert, so dass eine Rekrutierung von TLR9 aus dem Endoplasmatischen Retikulum ausbleibt

(Latz et al., 2004; Rutz et al., 2004; Leifer et al., 2004; Leifer et al., 2006; Yasuda et al., 2008). Die Wirkung von S-Methylthioharnstoff (SMT) und L-Lysin zur Inhibition der Stickstoffmonoxid-Produktion über iNOS wurde bereits an Ratten in einem LPS-induzierten, endotoxischen Schock-Modell untersucht (Liaudet et al., 1997; Rosselet et al., 1998). Beide Substanzen zeigten eine Verbesserung des Herzauswurfvolumens. Bei Versuchen zum myokardialen Infarkt in Ratten wurde bei einer Vorbehandlung mit SMT vor der Ligation eine Verbesserung der Infarktgröße erzielt (Saito et al., 2002). Dieser Effekt wurde auf die Inhibition von iNOS zurückgeführt, da die nachgewiesenen Plasmakonzentrationen an Nitrat und Nitrit vermindert waren.

Ein weiterer Ansatz könnte die Inhibition von TLR9 über Oligonukleotide mit immunsuppressiver Wirkung sein. Ihre Wirkung wurde im Mausmodell an Lungen untersucht. Die Co-Stimulation von immunsuppressiven Oligonukleotiden mit einer immunstimulatorischen Oligonukleotidsequenz, welche in die Lunge appliziert wurden, verminderte in den Mäusen die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6, gemessen in den bronchoalveolaren Lavagen (BAL) (Yamada et al., 2004). Die Migration von Neutrophilen in den bronchoalveolaren Raum wurde inhibiert. Die Anwendung von Oligonukleotiden zur Verbesserung der Herzfunktion bei Vorliegen einer Sepsis wurde bisher nicht untersucht. Eine intravenöse Applikation von immunsuppressiven Oligonukleotiden über die Schwanzvene bei Nagetieren könnte die TLR9-vermittelte Immunreaktion inhibieren. Auf diese Weise könnte ein erster Test bezüglich des therapeutischen Potentials von immunsuppressiven Oligonukleotiden durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

Die Rolle des Angeborenen Immunsystems („innate immunity“) wurde lange Zeit nicht beachtet. Die Entdeckung der Toll-Like Rezeptoren (TLRs) hat dazu beigetragen, ihre Funktion besser zu verstehen, da sie sowohl in parenchymatischen Zellen der Gewebe als auch den zirkulierenden Immunzellen nachweisen lassen. Die Expression verschiedener TLRs wurde mehrfach im Myokard nachgewiesen. An Wildtyp- (WT) und TLR9-defizienten (TLR9-D) Mäusen sollte nach Stimulation mit synthetischen, immunstimulatorischen Oligonukleotiden (CpG-ODN) die Rolle von myokardialem TLR9 für die Entstehung einer septischen Kardiomyopathie untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass die Expression von TLR9 durch CpG-ODN reguliert wird. In Kardiomyozyten erfolgte die Aufnahme von CpG-ODN ins Zytosol und den Nukleus unabhängig von der TLR9-Expression. Jedoch wurde die Aufnahme durch TLR9 beschleunigt. Mit CpG-ODN wird in WT-Mäusen die Induktion von Mediatoren des Toll/IL-1-Signaltransduktionsweges eingeleitet, die bei TLR9-D Mäusen vermindert ausgeprägt ist oder ausbleibt. So wurde nach einer Aktivierung von NF κ B die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine im kardialen Gewebe nachgewiesen.

In WT-Mäusen war die Produktion im Vergleich zu TLR9-D Mäusen signifikant erhöht. Die Migration von Immunzellen in Herzen blieb aus. Dieses Ergebnis weist darauf hinweisen, dass der Ursprung der erhöhten Zytokinkonzentration von kardial-lokalisierten Zellen ausging. Knochenmarks(KM)-chimäre Mäusen, deren zirkulierende Immunzellen kein TLR9 exprimierten, zeigten eine Veränderung in ihrer Zytokinproduktion. Die Expression von IL-6 wurde verstärkt, wogegen die von TNF- α stark vermindert war. Der Vergleich zwischen Herz und Lunge hat zudem gezeigt, dass diese Prozesse organspezifisch reguliert wurden.

Die Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS), die nur in WT-Mäusen nachgewiesen wurde, lieferte einen Hinweis auf das Vorliegen einer linksventrikulären Dysfunktion, die im Rahmen einer septischen Kardiomyopathie auftritt. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes konnte jedoch *in vivo* keine Abnahme der Kontraktilität des Herzens erfasst werden. Kontraktilitätsmessungen an einzelnen, linksventrikulären Kardiomyozyten belegten jedoch, dass CpG-ODN einen Einfluss hatte. In Zellen von TLR9-D Mäusen blieben diese Effekte aus. Zudem wurde in WT-Zellen die Kontraktilität durch den iNOS-Inhibitor S-Methylthioharnstoff (SMT) verbessert.

6. Literaturverzeichnis

- ACHENBACH; C.; WIEMER,J.J, PREISLER, R. (1985) Isolation of adult ventricular myocytes for electrophysiological experiments. *Basic Res Cardiol*, 80, 161.
- AHMAD-NEJAD,P., HACKER,H., RUTZ,M., BAUER,S., VABULAS,R.M. & WAGNER,H. (2002) Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol*, 32, 1958-1968.
- AKIRA,S. und TAKEDA,K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4, 499-511.
- AKIRA,S., UEMATSU,S. & TAKEUCHI,O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- ALEXOPOULOU,L., HOLT,A.C., MEDZHITOV,R. & FLAVELL,R.A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732-738.
- ALIPRANTIS,A.O., YANG,R.B., MARK,M.R., SUGGETT,S., DEVAUX,B., RADOLF,J.D., KLIMPEL,G.R., GODOWSKI,P. & ZYCHLINSKY,A. (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-1: *Science*, 285, 736-739.
- ANDERSON,K.V., BOKLA,L. & NUSSLEIN-VOLHARD,C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, 42, 791-798.
- ANGUS,D.C., LINDE-ZWIRBLE,W.T., LIDICKER,J., CLERMONT,G., CARCILLO,J. & PINSKY,M.R. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29, 1303-1310.
- ANGUS,D.C. und WAX,R.S. (2001) Epidemiology of sepsis: an update 1: *Crit Care Med*, 29, 109-116.
- BAEUERLE,P.A. und BALTIMORE,D. (1996) NF- κ B: ten years after. *Cell*, 87, 13-20.

- BAIYEE,E.E., FLOHE,S., LENDEMANS,S., BAUER,S., MUELLER,N., KREUZFELDER,E. & GROSSE-WILDE,H. (2006) Expression and function of Toll-like receptor 9 in severely injured patients prone to sepsis. *Clin Exp Immunol*, 145, 456-461.
- BALDWIN,A.S., JR. (1996) The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 14, 649-683.
- BARTON,G.M., KAGAN,J.C. & MEDZHITOV,R. (2006) Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*, 7, 49-56.
- BAUER,S., KIRSCHNING,C.J., HACKER,H., REDECKE,V., HAUSMANN,S., AKIRA,S., WAGNER,H. & LIPFORD,G.B. (2001) Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 98, 9237-9241.
- BAUMGARTEN,G., KNUEFERMANN,P., NOZAKI,N., SIVASUBRAMANIAN,N., MANN,D.L. & VALLEJO,J.G. (2001) In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. *J Infect Dis*, 183, 1617-1624.
- BAUMGARTEN,G., GROHE,C., HOEFT,A. & KNUEFERMANN,P. (2004) Die Bedeutung von Zytokinen bei der Entstehung einer Herzinsuffizienz. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 39, 197-203.
- BAUMGARTEN,G., KIM,S.C., STAPEL,H., VERVOLGYI,V., BITTIG,A., HOEFT,A., MEYER,R., GROHE,C. & KNUEFERMANN,P. (2006a) Myocardial injury modulates the innate immune system and changes myocardial sensitivity. *Basic Res Cardiol*, 101, 427-435.
- BAUMGARTEN,G., KNUEFERMANN,P., SCHUHMACHER,G., VERVOLGYI,V., VON,R.J., DREINER,U., FINK,K., DJOUFACK,C., HOEFT,A., GROHE,C., KNOWLTON,A.A. & MEYER,R. (2006b) Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock*, 25, 43-49.

-
- BEUTLER,B., HOEBE,K., GEORGEL,P., TABETA,K. & DU,X. (2005) - Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. - *Adv Exp Med Biol*, 560, 29-39.
- BONE,R.C., BALK,R.A., CERRA,F.B., DELLINGER,R.P., FEIN,A.M., KNAUS,W.A., SCHEIN,R.M. & SIBBALD,W.J. (1992a) Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101, 1644-1655.
- BONE,R.C., SPRUNG,C.L. & SIBBALD,W.J. (1992b) Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med*, 20, 724-726.
- BOYD,J.H., MATHUR,S., WANG,Y., BATEMAN,R.M. & WALLEY,K.R. (2006) Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF- κ B dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res*, 72, 384-93.
- BRUNKHORST,F.M. (2006) Epidemiologie, Ökonomie und Praxis - Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 41, 43-44.
- CAIN,B.S., MELDRUM,D.R., DINARELLO,C.A., MENG,X., JOO,K.S., BANERJEE,A. & HARKEN,A.H. (1999) Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med*, 27, 1309-1318.
- CHARPENTIER,J., LUYT,C.E., FULLA,Y., VINSONNEAU,C., CARIOU,A., GRABAR,S., DHAINAUT,J.F., MIRA,J.P. & CHICHE,J.D. (2004) Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis. *Crit Care Med*, 32, 660-665.
- CHOMCZYNSKI,P. und SACCHI,N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.
- DIAS,N. und STEIN,C.A. (2002) Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther*, 1, 347-355.

-
- DINARELLO,C.A. (1996) Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87, 2095-2147.
- EATON-BASSIRI,A., DILLON,S.B., CUNNINGHAM,M., RYCYZYN,M.A., MILLS,J., SARISKY,R.T. & MBOW,M.L. (2004) Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*, 72, 7202-7211.
- EHRENTAUT,S., FREDE,S., STAPEL,H., MENGDEN,T., GROHE,C., FANDREY,J., MEYER,R. & BAUMGARTEN,G. (2007) Antagonism of lipopolysaccharide-induced blood pressure attenuation and vascular contractility. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 2170-2176.
- EWASCHUK,J.B., BACKER,J.L., CHURCHILL,T.A., OBERMEIER,F., KRAUSE,D.O. & MADSEN,K.L. (2007) Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infection and Immunity*, 75, 2572-2579.
- FLESCH,M., KILTER,H., CREMERS,B., LAUFS,U., SUDKAMP,M., ORTMANN,M., MULLER,F.U. & BOHM,M. (1999) Effects of endotoxin on human myocardial contractility involvement of nitric oxide and peroxynitrite. *J Am Coll Cardiol*, 33, 1062-1070.
- GAY,N.J. und KEITH,F.J. (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature.*, 351, 355-356.
- GIROIR,B.P., JOHNSON,J.H., BROWN,T., ALLEN,G.L. & BEUTLER,B. (1992) The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest*, 90, 693-698.
- GURSEL,I., GURSEL,M., YAMADA,H., ISHII,K.J., TAKESHITA,F. & KLINMAN,D.M. (2003) Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *J Immunol*, 171, 1393-1400.
- HACK,C.E., DE GROOT,E.R., FELT-BERSMA,R.J., NUIJENS,J.H., STRACK VAN SCHIJNDEL,R.J., EERENBERG-BELMER,A.J., THIJS,L.G. & AARDEN,L.A. (1989) Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*, 74, 1704-1710.

-
- HARE, J.M. und COLUCCI, W.S. (1995) Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. *Prog Cardiovasc Dis*, 38, 155-166.
- HARTMANN, G. und KRIEG, A.M. (1999) CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther*, 6, 893-903.
- HASHIMOTO, C., HUDSON, K.L. & ANDERSON, K.V. (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52, 269-279.
- HAUGEN, E., TANG, M.S., ISIC, A., ANDERSSON, B. & FU, M. (2008) TNF α antagonist upregulates interleukin-6 in rats with hypertensive heart failure. *Int J Cardiol*, 130, 64-68.
- HAYASHI, F., SMITH, K.D., OZINSKY, A., HAWN, T.R., YI, E.C., GOODLETT, D.R., ENG, J.K., AKIRA, S., UNDERHILL, D.M. & ADEREM, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 1099-1103.
- HEMMI, H., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., KAISHO, T., SATO, S., SANJO, H., MATSUMOTO, M., HOSHINO, K., WAGNER, H., TAKEDA, K. & AKIRA, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408, 740-745.
- HIGUCHI, R. (1989) Rapid, efficient DNA extraction for PCR from cells or blood. *Amplifications*, 2, 1-3.
- HÖRNER, C., BOUCHON, A., BIERHAUS, A., NAWROTH, P.P., MARTIN, E., BARDENHEUER, H.J. & WEIGAND, M.A. (2004) Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Der Anaesthetist*, 53, 10-28.
- HORNUNG, V., ROTHENFUSSER, S., BRITSCH, S., KRUG, A., JAHRSDORFER, B., GIESE, T., ENDRES, S. & HARTMANN, G. (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 168, 4531-4537.

-
- ISHIWATA,T., FUJII,T., ISHIWATA,S., IKEGAWA,S. & NAITO,Z. (2004) Effect of morpholino antisense oligonucleotide against lumican mRNA in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. *Pathol Int*, 54, 77-81.
- ISIC,A., SCHARIN,T.M., HAUGEN,E. & FU,M. (2008) TNF α -antagonist neither improve cardiac remodelling or cardiac function at early stage of heart failure in diabetic rats. *Autoimmunity*, 41, 473-477.
- JANEWAY,C.A., JR. & MEDZHITOV,R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- JOHO,S., ISHIZAKA,S., SIEVERS,R., FOSTER,E., SIMPSON,P.C. & GROSSMAN,W. (2007) Left ventricular pressure-volume relationship in conscious mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, H369-H377.
- JONES,S.A. (2005) Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*, 175, 3463-3468.
- KADOWAKI,N., HO,S., ANTONENKO,S., MALEFYT,R.W., KASTELEIN,R.A., BAZAN,F. & LIU,Y.J. (2001) Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J.Exp.Med*, 194, 863-869.
- KAPADIA,S., LEE,J., TORRE-AMIONE,G., BIRDSALL,H.H., MA,T.S. & MANN,D.L. (1995) Tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*, 96, 1042-51.
- KARLIN,S., DOERFLER,W. & CARDON,L.R. (1994a) Why is CpG suppressed in the genomes of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses? *J.Virol.*, 68, 2889-2897.
- KARLIN,S., LADUNGA,I. & BLAISDELL,B.E. (1994b) Heterogeneity of genomes: measures and values. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 91, 12837-12841.
- KAWAI,T. und AKIRA,S. (2007) Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol.Med.*, 13, 460-469.

-
- KAWAI,T. und AKIRA,S. (2006) TLR signaling. *Cell Death.Differ.*, 13, 816-25.
- KIM,T., OH,P.I. & SIMOR,A.E. (2001) The economic impact of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian hospitals. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.*, 22, 99-104.
- KINUGAWA,K.I., KOHMOTO,O., YAO,A., SERIZAWA,T. & TAKAHASHI,T. (1997) Cardiac inducible nitric oxide synthase negatively modulates myocardial function in cultured rat myocytes. *Am.J.Physiol*, 272, H35-H47.
- KNUEFERMANN,P., NEMOTO,S., MISRA,A., NOZAKI,N., DEFREITAS,G., GOYERT,S.M., CARABELLO,B.A., MANN,D.L. & VALLEJO,J.G. (2002) CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation*, 106, 2608-2615.
- KNUEFERMANN,P., SAKATA,Y., BAKER,J.S., HUANG,C.H., SEKIGUCHI,K., HARDARSON,H.S., TAKEUCHI,O., AKIRA,S. & VALLEJO,J.G. (2004) Toll-like receptor 2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation*, 110, 3693-3698.
- KNUEFERMANN,P., BAUMGARTEN,G., KOCH,A., SCHWEDERSKI,M., VELTEN,M., EHRENTAUT,H., MERSMANN,J., MEYER,R., HOEFT,A., ZACHAROWSKI,K. & GROHE,C. (2007) CpG oligonucleotide activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation in vivo. *Respir.Res.*, 8, 71:
- KNUEFERMANN,P., SCHWEDERSKI,M., VELTEN,M., KRINGS,P., EHRENTAUT,H., RUDIGER,M., BOEHM,O., FINK,K., DREINER,U., GROHE,C., HOEFT,A., BAUMGARTEN,G., KOCH,A., ZACHAROWSKI,K. & MEYER,R. (2008) Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc.Res.*, 78, 26-35.
- KOJDA,G. und KOTTENBERG,K. (1999) Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc.Res.*, 41, 514-523.
- KOPP,E.B. und MEDZHITOV,R. (1999) The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr.Opin.Immunol*, 11, 13-18.

- KRIEG,A.M., YI,A.K., MATSON,S., WALDSCHMIDT,T.J., BISHOP,G.A., TEASDALE,R., KORETZKY,G.A. & KLINMAN,D.M. (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374, 546-549.
- KROWN,K.A., YASUI,K., BROOKER,M.J., DUBIN,A.E., NGUYEN,C., HARRIS,G.L., MCDONOUGH,P.M., GLEMBOTSKI,C.C., PALADE,P.T. & SABBADINI,R.A. (1995) TNF α receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF α inhibition of L-type Ca^{2+} current and Ca^{2+} transients. *FEBS Lett*, 376, 24-30.
- KUMAR,A., THOTA,V., DEE,L., OLSON,J., URETZ,E. & PARRILLO,J.E. (1996) Tumor necrosis factor α and interleukin 1β are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med*, 183, 949-958.
- LATZ,E., SCHOENEMEYER,A., VISINTIN,A., FITZGERALD,K.A., MONKS,B.G., KNETTER,C.F., LIEN,E., NILSEN,N.J., ESPEVIK,T. & GOLENBOCK,D.T. (2004) TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome 15. *Nat Immunol*, 5, 190-198.
- LEE,J., MO,J.H., KATAKURA,K., ALKALAY,I., RUCKER,A.N., LIU,Y.T., LEE,H.K., SHEN,C., COJOCARU,G., SHENOUDA,S., KAGNOFF,M., ECKMANN,L., BENNERIAH,Y. & RAZ,E. (2006a) Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol*, 8, 1327-1336.
- LEE,J., RACHMILEWITZ,D. & RAZ,E. (2006b) Homeostatic effects of TLR9 signaling in experimental colitis. *Ann N.Y. Acad Sci*, 1072, 351-355.
- LEIFER,C.A., KENNEDY,M.N., MAZZONI,A., LEE,C., KRUHLAK,M.J. & SEGAL,D.M. (2004) TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation 31: *J Immunol*, 173, 1179-1183.
- LEIFER,C.A., BROOKS,J.C., HOELZER,K., LOPEZ,J., KENNEDY,M.N., MAZZONI,A. & SEGAL,D.M. (2006) Cytoplasmic targeting motifs control localization of toll-like receptor 9. *J Biol Chem*, 281, 35585-35591.

-
- LI,J., MA,Z., TANG,Z.L., STEVENS,T., PITT,B. & LI,S. (2004) CpG DNA-mediated immune response in pulmonary endothelial cells 8. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287, L552-L558.
- LIAUDET,L., GNAEGI,A., ROSSELET,A., MARKERT,M., BOULAT,O., PERRET,C. & FEIHL,F. (1997) Effect of L-lysine on nitric oxide overproduction in endotoxic shock. *Br J Pharmacol*, 122, 742-748.
- LIEN,E., SELLATI,T.J., YOSHIMURA,A., FLO,T.H., RAWADI,G., FINBERG,R.W., CARROLL,J.D., ESPEVIK,T., INGALLS,R.R., RADOLF,J.D. & GOLENBOCK,D.T. (1999) Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem*, 274, 33419-33425.
- LUCCHINETTI,E., FENG,J., SILVA,R.D., TOLSTONOG,G.V., SCHAUB,M.C., SCHUMANN,G.G. & ZAUGG,M. (2006) Inhibition of LINE-1 expression in the heart decreases ischemic damage by activation of Akt/PKB signaling. *Physiol Genomics*, 25, 314-324.
- MARTIN,G.S., MANNINO,D.M., EATON,S. & MOSS,M. (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348, 1546-1554.
- MEDZHITOV,R., PRESTON-HURLBURT,P. & JANEWAY,C.A., JR. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 394-397.
- MESSER,G. & RUPEC,R.A. (2001) Nuklearfaktor-kappa-B (NF-κB). Teil 2: Pathophysiologische Bedeutung. *Hautarzt*, 52, 746-752.
- MESSINA,J.P., GILKESON,G.S. & PISETSKY,D.S. (1991) Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J Immunol*, 147, 1759-1764.
- METCHNIKOFF,E. (1902) Immunität bei Infektionskrankheiten. *Jena, Fischer Verlag*.
- MEYER R. (1989) Oberflächenstruktur, Membranströme und Kontraktilität isolierter Herzmuskelzellen. Habilitationsschrift, Med Fak Universität Bonn.

- MÜLLER,K., EHLERS,S., SOLBACH,W. & LASKAY,T. (2001) Novel multi-probe RNase protection assay (RPA) sets for the detection of murine chemokine gene expression. *J Immunol Methods*, 249, 155-165.
- NEMOTO,S., VALLEJO,J.G., KNUEFERMANN,P., MISRA,A., DEFREITAS,G., CARABELLO,B.A. & MANN,D.L. (2002) Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. *Am J Physiol Heart*, 282, H2316-H2323.
- NOGAWA,S., FORSTER,C., ZHANG,F., NAGAYAMA,M., ROSS,M.E. & IADECOLA,C. (1998) Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 95, 10966-10971.
- NOONBERG,S.B., WEISS,T.L., GAROVOY,M.R. & HUNT,C.A. (1992) Characterization and minimization of cellular autofluorescence in the study of oligonucleotide uptake using confocal microscopy. *Antisense Res Dev*, 2, 303-313.
- NOONBERG,S.B., GAROVOY,M.R. & HUNT,C.A. (1993) Characteristics of oligonucleotide uptake in human keratinocyte cultures. *J Invest Dermatol*, 101, 727-731.
- OKUSAWA,S., GELFAND,J.A., IKEJIMA,T., CONNOLLY,R.J. & DINARELLO,C.A. (1988) Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest*, 81, 1162-1171.
- ORAL,H., DORN, G.W., & MANN, D.L. (1997), Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem*, 272, 4836-4842.
- PARK,Y., LEE,S.W. & SUNG,Y.C. (2002) Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway. *J Immunol*, 168, 5-8.
- PARKER,M.M., SHELHAMER,J.H., BACHARACH,S.L., GREEN,M.V., NATANSON,C., FREDERICK,T.M., DAMSKE,B.A. & PARRILLO,J.E. (1984) Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med*, 100, 483-490.

-
- PARRILLO,J.E., PARKER,M.M., NATANSON,C., SUFFREDINI,A.F., DANNER,R.L., CUNNION,R.E. & OGNIBENE,F.P. (1990) Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med*, 113, 227-41.
- PICHON,C., FREULON,I., MIDOUX,P., MAYER,R., MONSIGNY,M. & ROCHE,A.C. (1997) Cytosolic and nuclear delivery of oligonucleotides mediated by an amphiphilic anionic peptide. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 7, 335-343.
- POLTORAK,A., HE,X., SMIRNOVA,I., LIU,M.Y., HUFFEL,C.V., DU,X., BIRDWELL,D., ALEJOS,E., SILVA,M., GALANOS,C., FREUDENBERG,M., RICCIARDI-CASTAGNOLI,P., LAYTON,B. & BEUTLER,B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-2088.
- RANGEL-FRAUSTO,M.S., PITTET,D., COSTIGAN,M., HWANG,T., DAVIS,C.S. & WENZEL,R.P. (1995) The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *Jama*, 273, 117-123.
- ROCK,F.L., HARDIMAN,G., TIMANS,J.C., KASTELEIN,R.A. & BAZAN,J.F. (1998) A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 95, 588-593.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ,S., CANCINO-DIAZ,M.E., JIMENEZ-ZAMUDIO,L., GARCIA-LATORRE,E. & CANCINO-DIAZ,J.C. (2005) TLRs and NODs mRNA expression pattern in healthy mouse eye. *Br J Ophthalmol*, 89, 904-910.
- ROMAN,M., MARTIN-OROZCO,E., GOODMAN,J.S., NGUYEN,M.D., SATO,Y., RONAGHY,A., KORNBLUTH,R.S., RICHMAN,D.D., CARSON,D.A. & RAZ,E. (1997) Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med*, 3, 849-854.
- ROSSELET,A., FEIHL,F., MARKERT,M., GNAEGI,A., PERRET,C. & LIAUDET,L. (1998) Selective iNOS inhibition is superior to norepinephrine in the treatment of rat endotoxic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 157, 162-170.

-
- RUTZ,M., METZGER,J., GELLERT,T., LUPPA,P., LIPFORD,G.B., WAGNER,H. & BAUER,S. (2004) Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol*, 34, 2541-2550.
- RYCHLIK,R. und PFEIL,B. (2002) Sozioökonomische Relevanz der Sepsis in Deutschland. *Gesundh okon Qual manag*, 5, 67-71:
- SAIKH,K.U., KISSNER,T.L., SULTANA,A., RUTHEL,G. & ULRICH,R.G. (2004) Human monocytes infected with *Yersinia pestis* express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells. *J Immunol*, 173, 7426-7434.
- SAITO,T., HU,F., TAYARA,L., FAHAS,L., SHENNIB,H. & GIAID,A. (2002) Inhibition of NOS II prevents cardiac dysfunction in myocardial infarction and congestive heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, H339-H345.
- SCHUSTER, HP. (1989) Sepsis: Toxinwirkung, Herzschädigung, Quantifizierung, supportive Therapie mit Immunglobulinen. Ed. by K. Werdan and Schuster HP. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* ; 26, 152-153.
- SCHUSTER, HP. und MÜLLER-WERDAN, U. (2000) Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen. Berlin Heidelberg New York, Springer. 3. Auflage. 2000.
- SCHWANDNER,R., DZIARSKI,R., WESCHE,H., ROTHE,M. & KIRSCHNING,C.J. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 1: *J Biol Chem*, 274, 17406-17409.
- SCHWARTZ,D.A., QUINN,T.J., THORNE,P.S., SAYEED,S., YI,A.K. & KRIEG,A.M. (1997) CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J Clin Invest*, 100, 68-73.
- SHINDO,T., IKEDA,U., OHKAWA,F., TAKAHASHI,M., FUNAYAMA,H., NISHINAGA,M., KAWAHARA,Y., YOKOYAMA,M., KASAHARA,T. & SHIMADA,K. (1994) Nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes and fibroblasts. *Life Sci*, 55, 1101-1108.

-
- SHPAER,E.G. und MULLINS,J.I. (1990) Selection against CpG dinucleotides in lentiviral genes: a possible role of methylation in regulation of viral expression. *Nucleic Acids Res*, 18, 5793-5797.
- SINGH,K., BALLIGAND,J.L., FISCHER,T.A., SMITH,T.W. & KELLY,R.A. (1996) Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/ERK2) and STAT1 α . *J Biol Chem*, 271, 1111-1117.
- SPARWASSER,T., MIETHKE,T., LIPFORD,G., BORSCHERT,K., HACKER,H., HEEG,K. & WAGNER,H. (1997a) Bacterial DNA causes septic shock. *Nature*, 386, 336-337.
- SPARWASSER,T., MIETHKE,T., LIPFORD,G., ERDMANN,A., HACKER,H., HEEG,K. & WAGNER,H. (1997b) Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *Eur J Immunol*, 27, 1671-1679.
- SPARWASSER,T., KOCH,E.S., VABULAS,R.M., HEEG,K., LIPFORD,G.B., ELLWART,J.W. & WAGNER,H. (1998) Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol*, 28, 2045-2054.
- STACEY,K.J., SWEET,M.J. & HUME,D.A. (1996) Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol*, 157, 2116-2121.
- TABETA,K., GEORGEL,P., JANSSEN,E., DU,X., HOEBE,K., CROZAT,K., MUDD,S., SHAMEL,L., SOVATH,S., GOODE,J., ALEXOPOULOU,L., FLAVELL,R.A. & BEUTLER,B. (2004) - Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 101(10), 3516-3521.
- TAKEDA,K., KAISHO,T. & AKIRA,S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, 21, 335-376.
- TAKEDA,K. und AKIRA,S. (2004) Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci*, 34, 73-81.

- TAKEDA,K. und AKIRA,S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17, 1-14
- TAKESHITA,F., LEIFER,C.A., GURSEL,I., ISHII,K.J., TAKESHITA,S., GURSEL,M. & KLINMAN,D.M. (2001) Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol*, 167, 3555-3558.
- TATSUMI,T., MATOBA,S., KAWAHARA,A., KEIRA,N., SHIRAISHI,J., AKASHI,K., KOBARA,M., TANAKA,T., KATAMURA,M., NAKAGAWA,C., OHTA,B., SHIRAYAMA,T., TAKEDA,K., ASAYAMA,J., FLISS,H. & NAKAGAWA,M. (2000) Cytokine-induced nitric oxide production inhibits mitochondrial energy production and impairs contractile function in rat cardiac myocytes. *J Am Coll Cardiol*, 35, 1338-1346.
- ULLRICH,R., SCHERRER-CROSBIE,M., BLOCH,K.D., ICHINOSE,F., NAKAJIMA,H., PICARD,M.H., ZAPOL,W.M. & QUEZADO,Z.M. (2000) Congenital deficiency of nitric oxide synthase 2 protects against endotoxin-induced myocardial dysfunction in mice. *Circulation*, 102, 1440-1446.
- UNDERHILL,D.M., OZINSKY,A., HAJJAR,A.M., STEVENS,A., WILSON,C.B., BASSETTI,M. & ADEREM,A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 401, 811-815.
- VOLLMER,J., WEERATNA,R., PAYETTE,P., JURK,M., SCHETTER,C., LAUCHT,M., WADER,T., TLUK,S., LIU,M., DAVIS,H.L. & KRIEG,A.M. (2004) Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol*, 34, 251-261.
- WEIGHARDT,H., FETEROWSKI,C., VEIT,M., RUMP,M., WAGNER,H. & HOLZMANN,B. (2000) Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J Immunol*, 165, 4537-4543.
- WHEELER,A.P. und BERNARD,G.R. (1999) Treating Patients with Severe Sepsis. *NEJM*, 340, 207-215.

-
- YAMADA,H., ISHII,K.J. & KLINMAN,D.M. (2004) Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit CpG-induced inflammation of the mouse lung. *Crit Care Med*, 32, 2045-2049.
- YASUDA,H., LEELAHAVANICHKUL,A., TSUNODA,S., DEAR,J.W., TAKAHASHI,Y., ITO,S., HU,X., ZHOU,H., DOI,K., CHILDS,R., KLINMAN,D.M., YUEN,P.S. & STAR,R.A. (2008) Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol*, 294, F1050-F1058.
- YI,A.K. und KRIEG,A.M. (1998) Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. *J Immunol*, 161, 4493-4497.
- YI,A.K., PECKHAM,D.W., ASHMAN,R.F. & KRIEG,A.M. (1999) CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NF κ B and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine-sensitive pathway. *Int Immunol*, 11, 2015-2024.
- YI,A.K., YOON,J.G., HONG,S.C., REDFORD,T.W. & KRIEG,A.M. (2001) Lipopolysaccharide and CpG DNA synergize for tumor necrosis factor- α production through activation of NF κ B. *Int Immunol*, 13, 1391-1404.
- YI,A.K., YOON,H., PARK,J.E., KIM,B.S., KIM,H.J. & MARTINEZ-HERNANDEZ,A. (2006) CpG DNA-mediated induction of acute liver injury in D-galactosamine-sensitized mice: The mitochondrial apoptotic pathway-dependent death of hepatocytes. *J Biol Chem*, 281, 15001-15011.
- YOSHIMURA,A., LIEN,E., INGALLS,R.R., TUOMANEN,E., DZIARSKI,R. & GOLENBOCK,D. (1999) Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 1. *J Immunol*, 163, 1-5.
- ZAREMBER,K.A. und GODOWSKI,P.J. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol*, 168, 554-561.

-
- ZHANG,J., SHI,F., BADOOR,K., DENG,Y., MCGAVIN,M.K. & SIMINOVITCH,K.A. (2002) WASp verprolin homology, cofilin homology, and acidic region domain-mediated actin polymerization is required for T cell development. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 99, 2240-2245.
- ZHANG,Z., WEINSCHENK,T. & SCHLUESENER,H.J. (2005) Uptake, cellular distribution and novel cellular binding proteins of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides in glioblastoma cells. *Mol Cell Biochem*, 272, 35-46.

7. Veröffentlichungen

Gedruckte Vorträge

KNUEFERMANN,P., SCHWEDERSKI,M., GROHÉ,C., MEYER,R., HOEFT,A., & BAUMGARTEN, G. (2004) Bakterielle DNA induzierte ein akutes Lungenversagen über einen Toll-Like-Rezeptor-9-abhängigen Signaltransduktionsweg. *Intensivmed u Notfallmed*, 41, I/4.

SCHWEDERSKI,M., KRINGS,P., VELTEN,M., GROHÉ,C, MEYER,R., HOEFT,A., BAUMGARTEN,G. & KNUEFERMANN;P. (2004) Schlüsselfunktion von Toll-Like Rezeptor 9 für die Pathogenese der septischen Kardiomyopathie durch CpG-DNA. *Intensivmed u Notfallmed*, 41, I/18.

SCHWEDERSKI,M. KRINGS, P., VELTEN,M., GROHÉ,C., MEYER,R., BAUMGARTEN,G. & KNÜFERMANN,P. (2005) The role of Toll-like receptor 9 in the pathogenesis of septic cardiomyopathy. *Eur J Physiol*, 449, 137.

KNUEFERMANN;P.; SCHWEDERSKI;M.; BAUMGARTEN,G.; MEYER,R.; VETTER,H., HOEFT,A. & GROHÉ,C. (2005) Angeborene Immunität und bakterielle DNA: Bedeutung von Toll-Like Rezeptor 9. *Z Kardiol*, 94, P741.

VELTEN,M., BAUMGARTEN,G., SCHWEDERSKI,M., GROHÉ,C., HOEFT,A. & KNUEFERMANN,P. (2005) The role of Toll-like receptor 9 for the pathogenesis of acute lung injury. *Infection*, 33, 33.

KNUEFERMANN,P., RÜDIGER,M., DREINER,U., VERVÖLGYI,V., SCHWEDERSKI,M. GROHÉ,C., BAUMGARTEN,G. & MEYER,R. (2006) Bacterial DNA reduces shortening of cardiac myocytes via Toll-like receptor 9. *Acta Physiologica*, 186, 137.

SCHWEDERSKI,M., RÜDIGER,M., DREINER,U., VERVÖLGYI,V., VELTEN,M., BAUMGARTEN,G: MEYER,R., KNUEFERMANN,P. (2006) Bakterielle DNA (CpG-DNA) vermindert die Sarkomerverkürzung ventrikulärer Kardiomyozyten: Bedeutung von Toll-Like Rezeptor 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Leipzig

VELTEN,M., SCHWEDERSKI,M., HOEFT,A., ZACHAROWSKI,K., KNUEFERMANN,P. (2007) CpG-DNA activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation. *Inflammation Research*, 56, S69-S338.

BODE,C., STAPEL,H., KNÜFERMANN,P., VELTEN,M., EFFERTZ,P., SCHWEDERSKI,M., ROMMELSHEIM,K., BAUMGARTEN,G. (2007) Antibiotics and the innate immunity, ESICM Annual Congress 2007.

EHRENTRAUT,H., MEYER,R., SCHWEDERSKI,M, VELTEN,M., HOEFT,A., KNUEFERMANN,P., BAUMGARTEN, G. (2008) TLR ligands differentially regulate pulmonary sepsis mediators. International Shock Congress Cologne 2008.

ROHNER,M., HUSE,D., SCHWEDERSKI,M., MEYER,R., GROHÉ,C., KNUEFERMANN,P., BAUMGARTEN,G. (2009) Bedeutung unterschiedlicher Toll-like Rezeptor-Liganden für den beatmungsassoziierten Lungenschaden im murinen „second hit“-Modell. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie Berlin 2009.

MARKOWSKI,P., GOELZ,L., HAKENBERG,A.-K., SCHWEDERSKI,M., HOEFT,A., GROHÉ,C., BAUMGARTEN,G., MEYER,R., KNUEFERMANN,P. (2009) Toll-like-Rezeptor-9-Stimulation verringert den kardialen Ischämie/Reperfusions-Schaden. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie Berlin 2009.

LOHNER,R., BOEHM,O., SCHWEDERSKI,M., MEYER,R., HOEFT,A., BAUMGARTEN,G., KNUEFERMANN,P. (2009) Differentielle Rolle der Toll-like Rezeptoren für die kardiale Inflammation und Funktion während polymikrobieller Sepsis. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie Berlin 2009.

FRINTRUP,A., AWLAKPUI,E., SCHWEDERSKI,M. HOEFT,A., BAUMGARTEN,G., SCHWEPERS,U., KNUEFERMANN,P. (2009) Organpräferentielle Beeinflussung der CD14-Expression im Herzen. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie Berlin 2009.

GIELEN,V., LOHNER,R., BOEHM,O., SCHWEDERSKI,M., FRINTRUP,A., BAUMGARTEN,G., KNUEFERMANN,P. (2009) Eine Inhibition des Toll-like Rezeptors 9 reduziert die inflammatorische Zytokininduktion in vitro im Modell einer polymikrobiellen Sepsis. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie Berlin 2009.

BOEHM,O., EHRENTRAUT,H., WEBER,C., EHRENTRAUT,S., SCHWEDERSKI,M., MEYER,R., KNUEFERMANN,P., BAUMGARTEN,G. (2009) Der TLR4-Antagonist E5564 reduziert eine kardiale Hypertrophie im Mausmodell. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie Berlin 2009.

BOEHM,O., EHRENTRAUT,H., SCHWEDERSKI,M., VELTEN,M., GROHÉ, C., MEYER,R., BAUMGARTEN,G., KNUEFERMANN,P. (2009) Differentielle Regulation der inflammatorischen Antwort in der Lunge nach Stimulation mit unterschiedlichen Virulenzfaktoren. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie Berlin 2009.

Originalarbeiten

KNUEFERMANN,P., BAUMGARTEN,G., KOCH,A., SCHWEDERSKI,M., VELTEN,M., EHRENTRAUT,H., MERSMANN,J., MEYER,R., HOEFT,A., ZACHAROWSKI,K. & GROHE,C. (2007) CpG oligonucleotide activates Toll-like receptor 9 and causes lung inflammation in vivo. *Respir Res*, 8, 71.

*KNUEFERMANN,P., *SCHWEDERSKI,M., VELTEN,M., KRINGS,P., EHRENTRAUT,H., RUDIGER,M., BOEHM,O., FINK,K., DREINER,U., GROHE,C., HOEFT,A., BAUMGARTEN,G., KOCH,A., ZACHAROWSKI,K. & MEYER,R. (2008) Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res*, 78, 26-35. * geteilte Erstautorenschaft

8. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit nur an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen-Westfälischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn vorgelegt habe.

Bonn, den 30.08.2010

Markus Schwederski

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Pascal Knüfermann (Anästhesiologie, Universitätsklinikum Bonn) und Herrn Professor Dr. rer. nat. Rainer Meyer (Institut für Physiologie II, Universität Bonn) für die Überlassung der Fragestellung und die Unterstützung bei der Realisierung der Dissertation. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Herrn PD Dr. med. Georg Baumgarten (Anästhesiologie, Universitätsklinikum Bonn) und Herrn Prof. Dr. med. Christian Grohé (Evangelische Lungenklinik Berlin) für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Waldemar Kolanus vom Institut für Zelluläre Biochemie der Universität Bonn möchte ich für die freundliche Übernahme des Referates bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus B. Fink vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Bonn möchte ich für die methodische Unterstützung beim Nachweis der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase bedanken.

Ich danke den Herrn Prof. Dr. med. Kai Zacharowski und Herrn Dr. med. Jan Mersmann von der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf für die methodische Unterstützung beim „Multiplex Cytokine Assay“.

Mein besten Dank für die methodische Ratschläge zur Erzeugung Knochenmarks-chimärer Mäuse gilt Herrn PD Dr. med. Sebastian Stier und Herrn Dr. rer. nat. Stephan Garbe vom Universitätsklinikum Bonn.

Herrn Dr. rer. nat. Andreas Limmer und Frau Dr. rer. nat. Beatrix Schumak vom Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie des Universitätsklinikums Bonn möchte ich für die Hilfe bei der Durchflusszytometrie und Histologie, sowie dem regen Informationsaustausch bedanken.

Herrn Dr. med. Se-Chan Kim, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, danke ich für die Einarbeitung in die Bronchoalveolare Lavage und die hämodynamischen Untersuchungen.

Meinen besonderen Dank gilt den Mitarbeitern der Labore der Anästhesiologie bzw des Instituts für Physiologie II: Patrik Efferz, Dirk Böker, Hanne Bock, Susanne Schulz, Eli Awlakpui, Angela Frintrup, Dipl.-Biol. Pia Langhoff, Dr. med. Peter Krings, Dr. med. Markus Velten, Dr. med. Lina Gölz und Dr. rer. nat. Heidi Ehrentraut.

10. Lebenslauf**Markus Schwederski**

Geburtsdatum: 04. Juni 1977

Geburtsort: Wittlich

STUDIUM

- seit 01/2004 Promotionsstudium an der Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin des
Universitätsklinikums Bonn
- 1997–2003 Studium der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms
Universität Bonn

WEHRDIENST

- 1996–1997 40. Fernmeldeaufklärungsregiment 940 in Daun

SCHULAUUSBILDUNG

- 1993–1996 Cusanus-Gymnasium Wittlich
- 1987–1993 Kurfürst-Balduin-Realschule Wittlich