

**Präkonditionierende TLR9-Stimulation
beeinflusst die Inflammation während der
kardialen postischämischen Reperfusion im
Mausmodell**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Anna Lena Katharina Haesner geborene Hakenberg
aus Dormagen

2012

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat Rainer Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Grohé

Tag der Mündlichen Prüfung: 09.10.2012

Aus dem Physiologischen Institut II der Universität Bonn, Wilhelmstr. 31, 53111 Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Swandulla

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 9 |
| 1 Einleitung | 12 |
| 1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen | 12 |
| 1.2 Pathophysiologie des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden und des Remodellings | 13 |
| 1.3 Myokardiale Präkonditionierung | 15 |
| 1.4 Kongenitale Immunität und Toll-like Rezeptoren | 16 |
| 1.5 Bakterielle DNA, TLR9-Aktivierung und -Signaltransduktion | 19 |
| 1.6 Relevante pro- und antiinflammatorische Mediatoren | 22 |
| 1.8 Ziele der Arbeit | 24 |
| 2 Material und Methoden | 27 |
| 2.1 Versuchstiere und ihre Haltung | 27 |
| 2.2 Versuchsprotokoll | 27 |
| 2.3 <i>In-vivo</i> -Eingriffe | 28 |
| 2.3.1 Instrumentierung Ischämie / Reperfusion | 28 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.3.2 | Präkonditionierung und Gruppeneinteilung | 32 |
| 2.3.3 | Okklusion / Ischämie | 32 |
| 2.3.4 | Planimetrie zum Nachweis der Reproduktivität | 34 |
| 2.3.5 | Organentnahme zur Bestimmung der Mediatorantwort | 36 |
| 2.4 | Molekularbiologische Untersuchungen | 37 |
| 2.4.1 | RNA - Isolation, die Guanidinthiocyanat - Phenol - Chloroform – Extraktionsmethode | 37 |
| 2.4.2 | Quantitative „Real-Time“ Polymerasekettenreaktion (PCR) | 38 |
| 2.5 | Statistik | 39 |
| 2.6 | Geräte und Materialien | 39 |
| 2.6.1 | Materialien für die Tierhaltung | 39 |
| 2.6.2 | Geräte und Materialien für die <i>in-vivo</i> Eingriffe | 39 |
| 2.6.3 | Geräte und Materialien für die molekularbiologischen Untersuchungen | 41 |
| 2.6.4 | Software | 42 |
| 3 | Ergebnisse | 43 |
| 3.1 | Tierzahlen | 43 |
| 3.1.1 | Mortalitätsraten | 43 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2 | Ergebniskonstanz | 44 |
| 3.3 | Ergebnisse der quantitativen „Real-time“ - PCR bei Wildtyp-Mäusen | 45 |
| 3.3.1 | TNF- α -mRNA-Expression | 46 |
| 3.3.2 | IL-1 β -mRNA-Expression | 47 |
| 3.3.3 | IL-6-mRNA-Expression | 48 |
| 3.3.4 | IL-10-mRNA-Expression | 49 |
| 3.3.5 | TLR2-mRNA-Expression | 51 |
| 3.3.6 | TLR4-mRNA-Expression | 52 |
| 3.3.7 | TLR9-mRNA-Expression | 53 |
| 3.3.8 | iNOS-mRNA-Expression | 54 |
| 3.4 | Ergebnisse der „Real-time“-PCR bei TLR9-D-Mäusen | 55 |
| 3.4.1 | Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine | 55 |
| 3.4.2 | Expression der TLR2-, TLR4- und TLR9-mRNA | 59 |
| 3.4.3 | Expression der iNOS-mRNA | 63 |
| 4 | Diskussion | 64 |
| 4.1 | Mausmodell und I/R-Protokoll | 64 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.2 | Mortalitätsraten | 66 |
| 4.3 | Analyse der differentiellen Zytokin- und iNOS-Antwort | 67 |
| 4.4 | Analyse der TLR2-, 4- und der TLR9-Antwort | 69 |
| 4.5 | Analyse der Ergebnisse TLR9-defizienter Mäuse | 70 |
| 4.6 | Übergreifende Schlussfolgerung | 70 |
| 4.7 | Ausblick | 72 |
| 5 | Zusammenfassung | 74 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 75 |
| 7 | Danksagung | 85 |
| 8 | Lebenslauf | 86 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| AAR | “area at risk” |
| Abb. | Abbildung |
| AMPs | antimikrobielle Peptide |
| AP-1 | Aktivatorprotein-1 |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| B-Lymphozyt | “bone-marrow” Lymphozyt |
| b/min | “beats per minute” |
| °C | Grad Celsius |
| CD | „cluster of differentiation“ |
| C3H/HeN | Labormaus-Inzuchtlinie |
| C3H/HeJ | Labormaus-Inzuchtlinie |
| C57BL/6 | Labormaus-Inzuchtlinie |
| cDNA | komplementäre DNA |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat |
| CpG | Cystidin-Phosphorsäure-Guanosin-Motiv |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| dsRNA | doppelsträngige RNA |
| EKG | Elektroardiogramm |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| et al. | et alii |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-Dehydrogenase |
| GIT | Guanidinthiocyanat |
| h | Stunde |
| IA | Infarktareal |
| ICAM-1 | “Inter-Cellular Adhesion Molecule 1” |
| IκB | “inhibitor of κB” |
| IKK | IκB-Kinase |

| | |
|---------|---|
| IL | Interleukin |
| IL-1RII | Interleukin-1 Rezeptor II |
| iNOS | induzierbare NO-Synthase |
| i.p. | intraperitoneal |
| IP | Ischämische Präkonditionierung |
| I/R | Ischämie/Reperfusion |
| IRAK | “IL-1 receptor associated kinase” |
| IRF | Interferon Regulationsfaktor |
| Kap. | Kapitel |
| l | Liter |
| LAD | linke anteriore deszendierende Koronararterie |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LRR | Leucin-reiche Rezeptor |
| LTA | Lipoteichonsäure |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| min | Minute |
| μl | Mikroliter |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mRNA | “messenger RNA” |
| mV | Millivolt |
| MW | Mittelwert |
| MyD88 | Myeloider Differenzierungsfaktor 88 |
| n | Anzahl |
| NAAR | “non-area-at-risk” |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NFκB | “nuclear transcription factor κB” |
| NK | Natürliche Killerzellen |
| nmol | Nanomol |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOD | “nucleotide-binding oligomerization domain” |
| ODN | Oligodesoxynukleotid |

| | |
|-------------|---|
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| PAMP | “pathogen associated molecular patterns” |
| PCR | “polymerase chain reaction” (Polymerasekettenreaktion) |
| PBS | “phosphate buffer saline” |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3 Kinase |
| PRR | “pattern recognition receptor” |
| RAGE | Rezeptor “advanced Glycation endproducts” |
| RCA | rechte Koronararterie |
| RCX | Ramus circumflexus |
| RLR | RIG-1-like Rezeptor |
| RNA | ribonucleic acid |
| ROS | reactive oxygen species |
| RQ | relativer Quotient |
| RZB | relative Zentrifugalbeschleunigung |
| s | Sekunde |
| SEM | Standardfehler des Mittelwerts |
| ssRNA | “single-stranded RNA” |
| STEMI | “ST-elevation myocardial infarction” |
| Tab. | Tabelle |
| TAK | “transforming growth factor- β associated kinase” |
| TIR | “Toll/IL-1 receptor domain” |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TLR9-D | TLR9-defizient |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TNFAIP | Tumor Nekrose Faktor α induzierender Faktor |
| TOLLIP | Toll-interacting Protein |
| TRAF | TNF-receptor associated factor |
| TRIM | T-cell receptor interacting molecule |
| T-Lymphozyt | Thymus |
| TTC | Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid |
| WT | Wildtyp (C57.BL/6) |

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Physiologie kardiovaskulärer Erkrankungen

Krankhafte Veränderungen des Herzkreislaufsystems stehen in den westlichen Industrienationen an erster Stelle der Todesursachenstatistik, 41,1 % der Verstorbenen erlagen im Jahr 2010 einer solchen Erkrankung. Die chronisch ischämische Herzerkrankung und der Myokardinfarkt sind am stärksten vertreten (Statistisches Bundesamt, 2011). Die Kosten für die Behandlung dieser kardiovaskulären Erkrankungen sind sehr hoch, sie belaufen sich auf ungefähr 11 % aller direkten Kosten im Gesundheitswesen. In Anbetracht des hohen Leidensdrucks der Patienten und der sozio-ökonomischen Bedeutung ist ein verbessertes Verständnis der Pathogenese zur Steigerung der Prävention und zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze unerlässlich.

Ursächlich für die ischämische Herzerkrankung ist eine schleichend voranschreitende Atherosklerose, welche zu einer progredienten Lumenreduktion der Koronargefäße und so zu einer Minderversorgung des Myokards mit Sauerstoff führt. Das klinische Erscheinungsbild mit thorakalem Engegefühl und Luftnot bis hin zu massiven Brustschmerzen wird als koronare Herzerkrankung bezeichnet. Diverse Risikofaktoren, wie die arterielle Hypertonie, Störungen des Fettstoffwechsels und des Zuckerstoffwechsels, Übergewicht, Nikotinabusus und Bewegungsmangel sowie nicht zu beeinflussende Faktoren wie Alter, Geschlecht und die genetische Prädisposition sind an der Entwicklung der ursächlichen Atherosklerose, der „Verkalkung“ der Gefäße beteiligt (Yusuf et al., 2004). Einige andere Studien untersuchen zudem den Einfluss des Immunsystems auf diese Entwicklung (Vink et al., 2004). Beim Myokardinfarkt führt meist der plötzliche Abriss eines atherosklerotischen Plaques zu einer hochgradigen Gefäßstenose beziehungsweise zu einem vollständigen, embolischen Verschluss. Die folglich unterbrochene Durchblutung des Myokards, die Ischämie, resultiert in einer Störung der Homöostase, die sowohl auf einem Mangel an essenziellen Metaboliten (z. B. Glukose und Sauerstoff), als auch auf dem verminderten Abtransport von Stoffwechselendprodukten basiert. Die frühzeitige Wiederherstellung der Perfusion wird

therapeutisch angestrebt und ist entscheidend für die Erhaltung des noch vitalen Gewebes (Michael et al., 1999). Ein begleitender Effekt dieser notwendigen Reperfusion ist die anschließende Einwanderung von Entzündungszellen in das vorgeschädigte Areal, welche den bereits bestehenden Schaden paradoxerweise vergrößern können. Dieses Phänomen wird als Ischämie-Reperfusionsschaden bezeichnet (Baumgarten et al., 2000; Frangogiannis et al., 2002).

1.2 Pathophysiologie des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden und des Remodelling

Die Bezeichnung „Ischämie-Reperfusionsschaden“ (I/R-Schaden) beschreibt den zeitlichen Ablauf zweier unterschiedlicher Schädigungsmechanismen. Die initiale Schädigung des Myokards durch eine Unterversorgung mit Sauerstoff und die anschließende, additive Schädigung durch eine Reperfusion. Es treten strukturelle und funktionelle Schäden in Abhängigkeit der Schädigungsdauer auf. Eine kurze Ischämiedauer führt zu reversiblen Veränderungen, die v. a. die Myokardfunktion betreffen. Länger währende Ischämien hingegen verursachen strukturelle Myokardschäden, die durch Nekrose- und Apoptosevorgänge sowie durch kardiales Remodelling bedingt sind. Die entstehenden strukturellen Schäden führen zu einer irreversiblen Funktionsminderung. Die initiale Minderperfusion des distal der Embolie gelegenen Myokards hat eine ischämisch bedingte, gestörte Mikrozirkulation zur Folge. Die Sauerstoffversorgung wird kritisch eingeschränkt, wodurch die Synthese des Energieträgers ATP abnimmt und schädigende Metabolite des anaeroben Stoffwechsels entstehen (Klinke et al., 2005). Die energetischen Prozesse innerhalb der Zelle werden beeinträchtigt, was einen Verlust der zellulären Homöostase verursacht. Es kommt zu einem Ausstrom von Kalium- und Magnesium-Ionen sowie zu einem Einstrom von Natrium- und Calcium-Ionen (Piper et al., 2003). Die intrazellulär erhöhte Calcium-Ionenkonzentration schädigt insbesondere die Mitochondrien irreversibel. Zudem aktiviert sie zahlreiche Enzyme, welche die destrukturierenden Prozesse innerhalb der Zelle fortführen. Diese führen u. a. zu einer Lysierung der Phospholipidmembranen, wodurch es zu einem Verlust der Zellintegrität kommt. Die veränderte

Elektrolytverteilung bedingt ein osmotisches Ungleichgewicht, das zu einem intrazellulären Ödem führt und so die mangelhafte Zellintegrität noch verstärkt. Unter physiologischen Bedingungen intrazellulär gelegene Moleküle (z. B. Zellmatrix, DNA) gelangen nun in das Interstitium und induzieren eine inflammatorische Reaktion, die Aktivierung des Komplementsystems und die Freisetzung von „reactive oxygen species“ (ROS). Diese Immunreaktion ist in der sich anschließenden Phase der Reperfusion entscheidend für die fortschreitende Nekrose und Apoptose der Myozyten und somit für das Ausmaß des strukturellen Schadens (Nian et al., 2004). Das Endothel der betroffenen Blutgefäße wird im Zuge der inflammatorischen Reaktion zunehmend permeabel, wodurch ein interstitielles Ödem im Rahmen der Reperfusion entsteht. Zudem produzieren die aktivierten Endothelzellen Adhäsionsproteine, sezernieren Zytokine und reduzieren die Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion. Durch den wiedereinsetzenden Blutstrom rekrutieren, aktivieren und akkumulieren diese proinflammatorische Zytokine (z. B. TNF- α , IL-1 β , IL-6) Entzündungszellen v. a. neutrophile Granulozyten und Monozyten und ermöglichen ihnen die Emigration in das vorgeschädigte Gewebe (Li und Jackson, 2002). Die Entzündung und besonders die Freisetzung von ROS während der Reperfusion ist an der Entstehung der linksventrikulären Dysfunktion beteiligt und verursacht direkte strukturelle Schäden an den Myozyten und Endothelzellen und bedingt so eine linksventrikuläre Dysfunktion (Dewald et al., 2003; Kloner et al., 1998).

Obwohl die Reperfusion im Rahmen der inflammatorischen Reaktion das Myokard potentiell additiv schädigt, stellt sie eine notwendige Maßnahme für die Erholung des Herzmuskels und die dafür notwendigen Reparaturprozesse dar. Die Dauer der Ischämie determiniert die Intensität des resultierenden funktionellen Schadens, was die klinischen Bemühungen widerspiegelt möglichst rasche therapeutische Maßnahmen zu gewährleisten (Deutsche Gesellschaft für Kardiologie, 2010). Die erste Entzündungsreaktion während der frühen Reperfusionsphase ist von entscheidender Rolle für die Initiation von Reparaturprozessen, dem sogenannten Remodelling. Hier spielen neben den inflammatorischen Zytokinen (Baumgarten et al., 2000) verschiedene Fibroblasten und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Sie sollen in Reparaturprozessen ein funktionelles Gewebe entwickeln, welches weder zu schwach noch zu derb würde. Eine

zu elastische Narbe bedingte eine übermäßige ventrikuläre Dilatation mit möglicher Aneurysma-Bildung und der Gefahr einer Ruptur. Ein zu kollagenreiches Ersatzgewebe zöge eine ventrikuläre, diastolische Malfunktion mit konsekutivem Pumpversagen nach sich. Ein Gleichgewicht im kardialen Remodelling ist daher von höchster Wichtigkeit zum Erhalt der regulären ventrikulären Funktion.

1.3 Myokardiale Präkonditionierung

In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass subletale Reize zum Schutz vor den Folgen einer späteren myokardialen Schädigung führen und das kardiale Remodelling positiv beeinflussen können. Dieser Prozess wird als myokardiale Präkonditionierung bezeichnet und kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Reize induziert werden. Die Toleranzentwicklung gliedert sich grundsätzlich in zwei verschiedenen Phasen (Guo et al., 1998; Ziegler-Heitbrock, 1995). In der frühen Phase induziert der auslösende Reiz nach wenigen Minuten eine ischämische Toleranz, sie wird erzielt durch eine Beeinträchtigung der zellulären Lipidmembran und eine Inhibition der TLR- und Zytokin-Signaltransduktion. In der späten Phase entwickelt sich der protektive Mechanismus durch de-novo-Proteinsynthese innerhalb mehrerer Stunden. Zu diesen neu synthetisierten Proteinen gehören intrazelluläre Signalinhibitoren (Tollip, IRAK-M, PI3K, MyD88), Köderrezeptoren wie IL-1RII, sIL-1RII, sTNF α , R55 und R57, welche inflammatorische Zytokine binden ohne an der Signaltransduktion beteiligt zu sein, Köderliganden (IL-1-Rezeptorantagonist) und antiinflammatorische Proteine (IL-4, IL-10, IL-13) (Kariko et al., 2004). Es folgt eine Inhibition der Nf κ B Translokation in den Nukleus und eine verminderte kardiale Zytokin-synthese sowie -Plasmakonzentration (Hiasa et al., 2001; Ziegler-Heitbrock, 1995). Zu den protektiven Reizen, die eine rasche Toleranzentwicklung induzieren gehören die volatilen Anästhetika (Halothan, Isofluran, Desfluran), Lösungsmittel (Ethanol, DMSO) und bestimmte mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Zu jenen Vorgängen, die einen verzögerten Schutz bedingen zählen die klassische lokale ischämische Präkonditionierung (IP) (Vanoverschelde et al., 1993), systemische Stimuli, wie eine Hypoxie, Hyperoxie sowie eine Hyper- oder Hypothermie, Virulenzfaktoren wie LPS sowie I/R-

Episoden anderer Organe (Darm, Gehirn, Extremitäten) (Maulik et Das, 2002; Przyklenk et al., 2003; Tahep et al., 2001; Zacharowski et al., 2000; Zhao et al., 2003). Die schützende Wirkung einer Vorbehandlung mit einer synthetischen CpG-Sequenz, ein sogenanntes CpG-Oligonukleotid (CpG-ODN), über einen Toll-like Rezeptor wird von unserer Arbeitsgruppe aktuell gezeigt und in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben. Durch einen Induktor des Immunsystems kommt es also zu einem hyporesponsiven immunologischen Status, der eine Kardioprotektion, eine ischämische Toleranz hervorruft.

1.4 Kongenitale Immunität und Toll-like-Rezeptoren

Unser Immunsystem zum Schutz vor Pathogenen besteht aus zwei verschiedenen Teilen, der kongenitalen und der akquirierten Immunität. Diese sind in ihrem Aufbau zwar stark verschieden, jedoch bilden sie funktionell eine Einheit und ermöglichen eine äußerst effiziente Verteidigung gegen unterschiedlichste Krankheitserreger. Erstere stellt mit den mechanischen Barrieren der Haut und der Schleimhaut, unspezifischen Immunzellen (Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten) und antimikrobiell wirksamen Proteinen (AMPs) die erste Reihe der Abwehr dar. Sie ist genetisch festgelegt und so bereits vor der Geburt aktiv. Die erworbene Immunantwort hingegen ist phylogenetisch später entstanden, zudem beginnt sie erst im Säuglingsalter zu reifen und adaptiert das komplette Leben an die sich verändernden und neuen schädlichen Einflüsse. Basierend auf der zellulären Immunantwort (B- und T-Lymphozyten) mit polyklonalen Gedächtniszellen vermittelt sie durch hoch-spezifische Antikörper eine sehr anpassungsfähige und effektive Reaktion. Die kongenitale Immunabwehr besitzt zur Diskriminierung von Virulenzfaktoren verschiedene phylogenetisch streng konservierte Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), die der Identifikation von unterschiedlichen, potentiell schädlichen Liganden dienen („pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) (Medzhitov und Janeway, 2000). Die hier wichtigste und in dieser Studie behandelte Rezeptorfamilie ist die der Toll-like Rezeptoren (TLRs). Weitere bekannte PRRs sind der CD14, die „Nucleotide-binding Oligomerization Domain (NOD)“-Rezeptoren sowie die „NOD-like“-Rezeptoren der „Advanced Glycation Endproducts“

(RAGE) und „RIG-1-like“-Rezeptor (RLR) (Bierhaus et al. 2005; Ferrero et al., 1993; Inohara et al., 1999; Ireton und Gale, 2011). Inzwischen wurden 13 TLRs identifiziert, jedoch noch nicht alle im Detail beschrieben (Akira et al., 2006, Kawai et al., 2006), wobei TLR2 und TLR4 sicherlich die am besten charakterisierten Rezeptoren sind. Sie dienen der Erkennung mikrobieller Strukturen und aktivieren eine Entzündungsreaktion, die mittels gezielter Synthese von inflammatorischen Zytokinen weitere Zellen des Immunsystems in die Abwehrreaktion einbezieht. TLRs binden also spezifische Liganden (Tabelle 1), transduzieren das Bindungssignal in den Zellkern und initiieren dort über eine veränderte Aktivität von Transkriptionsfaktoren die Synthese von inflammatorischen Mediatoren. Diese TLR-getriggerten Vorgänge wurden nun auch speziell auf Kardiomyozyten nachgewiesen, was ihre Relevanz während der I/R-Phase deutlich macht (Baumgarten et al., 2001; Frantz et al., 2001; Knuefermann et al., 2008; Tavener et al., 2004). Im speziellen reagiert TLR4 auf einen Kontakt mit Lipopolysacchariden (LPS), TLR2 dagegen auf Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien (Lipoteichon-säure, LTA) (Kirschning et al., 1998; Knuefermann et al., 2004; Lien et al., 2000; Schwandner et al., 1999). Neben diesen exogenen Virulenzfaktoren wurden in letzter Zeit endoge, körpereigene Liganden beschrieben, die ebenfalls an Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr binden und die nachgeschaltete Signalkaskade einleiten. Sie entstehen im Rahmen von Organschäden oder in Folge von oxidativem Stress, es handelt sich dabei um antimikrobielle Peptide (β -Defensive) (Biragyn et al., 2002), ROS (Frantz et al., 2001), „High-Mobility Group Box 1“-Proteine (Park et al., 2004), Surfactant Protein-A (Guillot et al., 2002), Fibrinogen (Smiley et al., 2001), Fibronectin (Okamura et al., 2001) und Hyaluronsäure (Termeer et al., 2002). Für TLR3, -7, -8, -9 konnte gezeigt werden, dass sie des Weiteren neben bakteriellen und viralen auch wirtseigene, eukaryotische Nukleinsäuren erkennen (Heil et al., 2004; Kariko et al., 2004; Vollmer et al., 2005). Kommt es im Rahmen eines Myokardinfarktes zu einer Gewebeverletzung mit Nekrose oder einem gestörten Ablauf der Apoptose, so resultiert eine Freisetzung der intrazellulären Moleküle, die dann als endogene TLR-Liganden fungieren können.

| Rezeptor | Ligand | Ursprung des Liganden |
|----------|-----------------------------------|-----------------------------|
| TLR1 | Triacylierte Lipopeptide | Bakterien u. Mycobakterien |
| | Lösliche Faktoren | Neisseria meningitidis |
| TLR2 | Lipoprotein / Lipopeptide | Unterschiedliche Pathogene |
| | Peptidoglykan | Gram-positive Bakterien |
| | Lipoteichonsäure | Gram-positive Bakterien |
| | Lipoarabinomannan | Mycobakterien |
| | Phenol-lösliches Modulin | Staphylococcus epidermis |
| | Glycolipide | Treponema maltophilum |
| | Porine | Neisseria |
| | Atypisches Lipopolysaccharid | Leptospira interrogans |
| | Zyosan | Pilze |
| | Sauerstoffradikale | Wirt |
| | β -Defensin | Wirt |
| | High Mobility Group Protein Box 1 | Wirt |
| | Heat-shock Protein 60 | Wirt |
| | Heat-shock Protein 70 | Wirt |
| | Heat-shock Protein gp96 | Wirt |
| | Fibronectin | Wirt |
| TLR3 | dsRNA | |
| | mRNA | Viren, Wirt |
| TLR4 | Lipopolysaccharid | Gram-negative Bakterien |
| | Taxol | Pflanzen |
| | Fusionsprotein | Syncytialer Atemwegsvirus |
| | Hüllprotein | Murines Mammakarzinomvirus |
| | Heat-shock Protein 22 | Wirt |
| | Heat-shock Protein 60 | Wirt |
| | Heat-shock Protein 70 | Wirt |
| | Heat-shock Protein gp96 | Wirt |
| | Type 3 Repeat Domain A des | Wirt |
| | Fibronektins | Wirt |
| | β -Defensin | Wirt |
| | High Mobility Group Box 1-Protein | Wirt |
| | Surfactant Protein A | Wirt |
| | Heparansulfat | Wirt |
| | Hyualuronsäure | Wirt |
| | Fibrinogen | Wirt |
| TLR5 | Flagellin | Gram-negative Bakterien |
| TLR6 | TLR2-Corezeptor | Diacylierte Lipopeptide |
| | | Mycobakterien |
| TLR7 | ssRNA | Non-virale und virale ssRNA |
| | ssRNA | Wirt |
| | snRNPs | Wirt |
| TLR8 | ssRNA | Non-virale und virale ssRNA |
| | ssRNA | Wirt |
| TLR9 | CpG enthaltende DNA | Bakterien |
| TLR10 | Co-Rezeptor? | N.N. |
| TLR11 | | Uropathogene E. coli |
| TLR12 | | N.N. |
| TLR13 | | N.N. |

Tab. 1: Natürlich vorkommende exo- und endogene Liganden (Stapel, 2006)

1.5 Bakterielle DNA, TLR9-Aktivierung und -Signaltransduktion

Bakterielle DNA von gram-negativen und gram-positiven Bakterien ist fähig eine Entzündungsreaktion bis hin zur Sepsis auszulösen (Cornelie et al., 2002; Krieg et al., 1995; Schwartz et al., 1997; Sparwasser et al., 1997a). Der in dieser Studie untersuchte TLR9 ist der primäre Mustererkennungsrezeptor für bakterielle DNA und initiiert die nachfolgend beschriebene Signaltransduktion des angeborenen Immunsystems (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000). TLR9 reagiert auf die Cytosin-Guanosin (CpG)-Motive, die in prokaryoter DNA 20-mal häufiger als in eukaryoter DNA und zu 98% in unmethylierter Form vorliegen (Krieg, 2000). Diese strukturellen Unterschiede ermöglichen dem eukaryoten Organismus die Erkennung fremder, pathogener DNA. Unmethylierte DNA-Sequenzen sind in der Lage, Immunzellen der Maus via TLR9 zu stimulieren, während bei TLR9-defizienten (TLR9-D) Mäusen keine Stimulation von Immunzellen durch bakterielle DNA zu beobachten war (Hemmi et al., 2000). Inzwischen sind auch synthetische Oligonukleotide bekannt, die mit entsprechender CpG-Sequenz eine lokale Inflammation und ebenfalls eine manifeste Sepsis hervorrufen können (Bauer et al., 2001; Cornelie et al., 2002; Hemmi et al., 2000; Wagner et al., 2000). Eines dieser synthetischen Oligonukleotide ist das in dieser Studie verwendete 1668-Thioat. Die Antwort von humanen Immunzellen auf einen Reiz mit CpG-DNA ist abhängig von der Expression des humanen TLR9.

Der TLR9 befindet sich in der Membran intrazellulärer Vesikel, während die bekannten TLR2 und TLR4 an der äußeren Zellmembran von verschiedenen Zellen lokalisiert sind. Der derzeitigen pathophysiologischen Vorstellung nach, gelangen die Bestandteile bakterieller DNA oder synthetischer Oligonukleotide über einen bislang nicht identifizierten Rezeptor, via Endozytosemechanismus in die Zelle, binden an den TLR9 und induzieren die folgende Kaskade (Latz et al., 2004; Vollmer, 2006) (Abb. 1). Der TLR9 besitzt eine Leucin-reiche (LRR) und eine Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne. Die TIR ähnelt stark der IL-1 Rezeptor-Familie. Die Anbindung prokaryoter DNA führt zur Aktivierung des TLR9 und zur Rekrutierung des Myeloid-Differenzierungsfaktors 88 (MyD88)-Adapterprotein aus dem Zytoplasma (Medzhitov et al., 1998). Die MyD88-Adapterproteine besitzen ebenfalls eine TIR-Domäne, welche mit der des TLR9 interagiert (Martin und Wesche, 2002; O'Neill und Bowie, 2007). Anschließend kommt es

zur Liberation der IRAK-4 (IL-1 „receptor associated kinase“), die dann IRAK-1 phosphoryliert (Kawagoe et al., 2007; Wesche et al., 1997). Durch diese Phosphorylierung wird IRAK-1 in seiner Kinaseaktivität deutlich gesteigert und ist in der Lage, TRAF-6 (TNF-„receptor associated factor“) zu rekrutieren. Gemeinsam stimulieren sie die TAK-1 („transforming growth factor- β associated kinase“), die wiederum die Aktivierung des IKK ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Kinase-Komplex) einleitet, welcher die $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Moleküle phosphoryliert. Diese werden dadurch in ihrer inhibitorischen Funktion auf den Transkriptionsfaktor NF κ B (Nukleärer Faktor κ B) gehindert. Der NF κ B kann nun in den Zellkern translozieren (Wang et al., 2001). Für dendritische Zellen, Immunzellen die sich aus Monozyten oder T-Zell-Vorläuferzellen entwickeln und eine wichtige Position im humanen Immunsystem einnehmen, zeigte sich ferner, dass der IRF-8 (Interferon-Regulationsfaktor 8) eine wichtige modulierende Rolle spielt. Er kontrolliert die MAP-Kinase („Mitogen-activated protein kinase) p38, die die Aktivität des NF κ B positiv beeinflusst (Tsuji-mura et al., 2004). Die TAK-1 bedingt nicht nur die Liberation des NF κ B, sie regt ebenso andere MAP-Kinasen an, welche zur Phosphorylierung des zweiten wichtigen Transkriptionsfaktors AP-1 führen. Dieser bewegt sich gleichermaßen in den Nukleus.

AP-1 und NF κ B beeinflussen die Expression inflammatorischer, Zellzyklus-regulierender Gene und unterstützen auf diese Weise immunologische Vorgänge. Insbesondere der wichtige NF κ B aktiviert über spezifische Bindungsstellen an den Promotorregionen von Zyto- und Chemokinen deren Expression nach Aktivierung der immunkompetenten Zelle durch ein Pathogen, in unserem Fall durch eine prokaryote oder synthetische CpG-Sequenz (Baldassare et al., 1999; Burns et al., 1998; Cario et al., 2000; O'Neill und Greene, 1998; Wesche et al., 1997). Einen Überblick über die Signalkaskade liefert Abbildung 1.

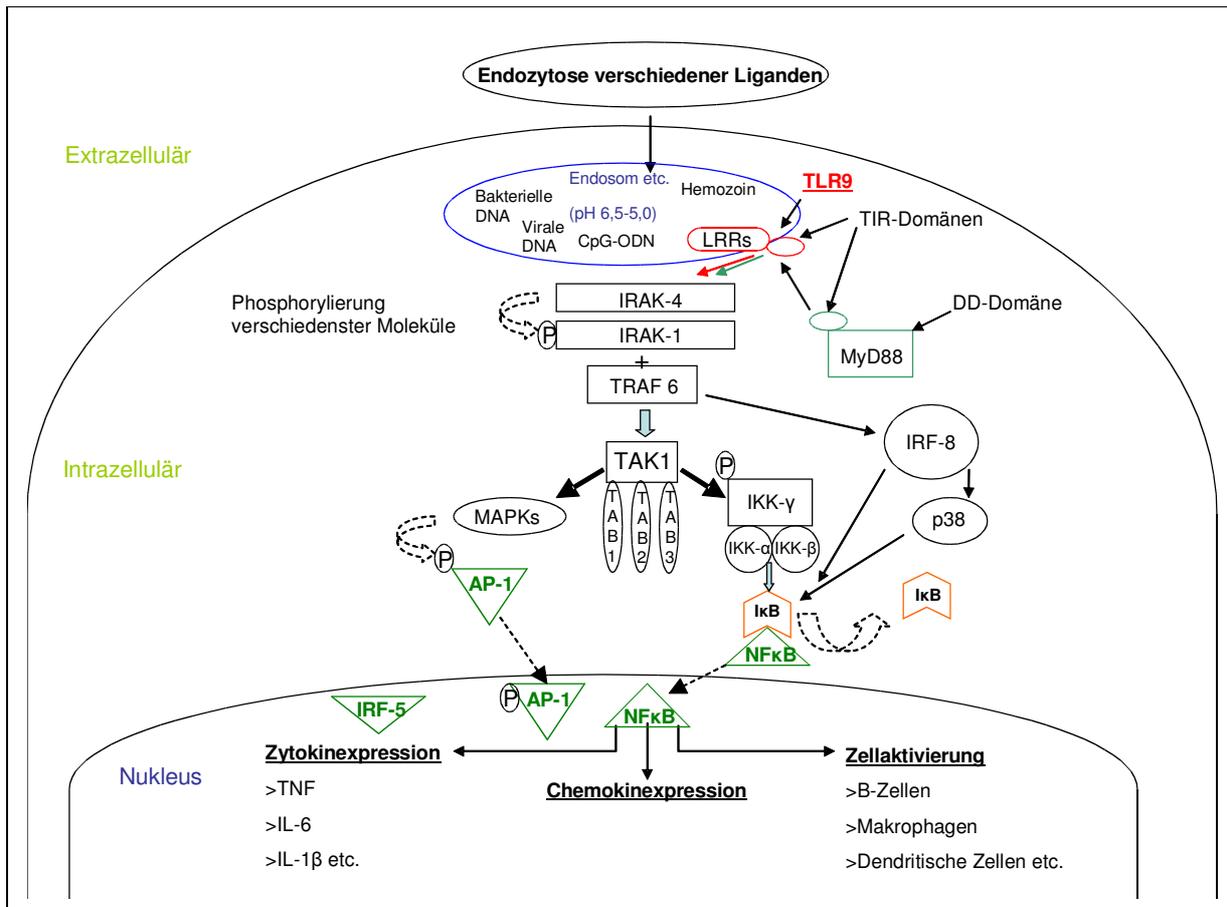


Abb. 1: TLR9-Signaltransduktionweg basierend auf der Studie von Kumagai et al. (2008); Erklärung der Abkürzungen im Text und im Abkürzungsverzeichnis

Der TLR9 ist also ein essenzieller Bestandteil der kongenitalen Immunantwort, er reguliert nach Stimulation durch potentiell-pathogene Liganden die Aktivität des NFκB, der über proinflammatorische Mediatoren eine Abwehrreaktion triggert. Eine Demonstration dieser Mechanismen und ihrer Rückkopplungsprinzipien liefert die Abbildung 2.

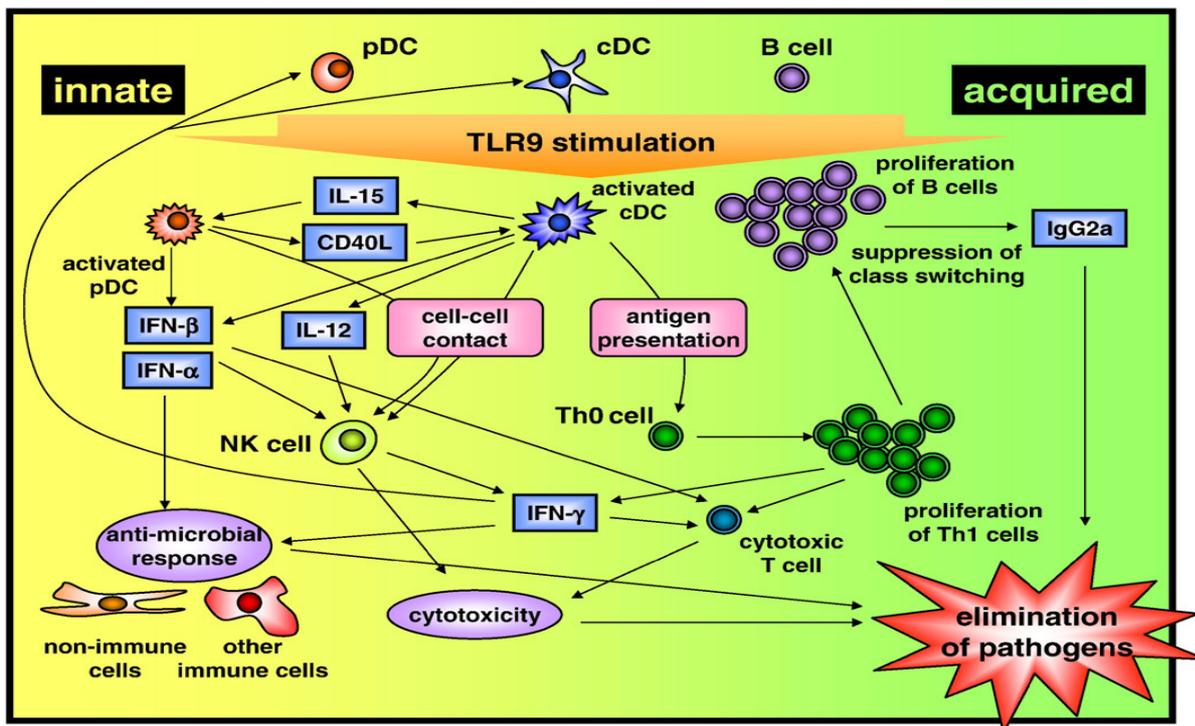


Abb. 2: Überblick über die TLR9-abhängigen Zellaktivierungen und Interaktionen (Kumagai et al., 2008)

1.6 Relevante pro- und antiinflammatorische Mediatoren

Im vorherigen Kapitel wurde die Signalkaskade zur Steigerung der inflammatorischen Proteinexpression durch NF κ B und AP-1 bei Pathogenkontakt dargelegt. Einen besonderen Stellenwert nimmt hier die Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6 sowie IL-10 ein (Baumgarten et al., 2001; Baumgarten et al., 2002; Bazzoni et al., 2010; Dibbs et al., 1999; Knuefermann et al., 2008; Werdan und Müller-Werdan, 1996).

Der pleiotrope Mediator der humoralen Immunantwort TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) wird als eines der ersten Zytokine bei einer lokalen entzündlichen Reaktion freigesetzt. Er wird in Monozyten sowie in NK-Zellen gebildet und ist ein wichtiger Induktor einer Entzündung bis hin zum septischen Schock, so aktiviert er andere Zellen wie T- und B-Lymphozyten, Granulozyten, aber auch Endothelzellen und Fibroblasten sowie autokin seine eigenen Herkunftszellen. Dadurch wird die Synthese von IL-1 β und IL-6 verstärkt und die iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid Synthetase) angeregt. Das gebildete Stickstoffmonoxid regt wiederum über einen cGMP-abhängigen Pfad die Synthese von

TNF- α in Kardiomyozyten an (Kalra et al., 2000). Über die Modulation anderer Zytokine und der damit einhergehenden Wirkung auf das kardiale Remodelling ist TNF- α ein wichtiger Faktor bei der Entstehung des I/R induzierten, strukturellen und funktionellen myokardialen Schadens (Cain et al., 1999; Nian et al., 2004; Schulz et al., 2004).

IL-1 β ist als Interleukin ein Vermittler zwischen Leukozyten und anderen Immunzellen, z. B. Makrophagen. IL-1 β wird nach Stimulation von Monozyten in diesen exprimiert, weitere Bildungsorte sind dendritische Zellen, B-Lymphozyten und NK-Zellen. Es induziert die B- und T-Zell-Proliferation, sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen. Als chemotaktischer Faktor für Makrophagen und Granulozyten sowie Trigger für die IL-6-Freisetzung führt es wiederum zu einer Steigerung der inflammatorischen Reaktion, zu einer Synthesesteigerung von Akute-Phase-Proteinen, der Produktion von Prostaglandinen und nachfolgend zu den klinischen Zeichen einer systemischen Entzündung. Zusätzlich verstärkt IL-1 β die Aktivierung von NK-Zellen und damit seine eigene Bildung. Auch IL-1 β kann durch I/R und Endotoxine aktiviert werden (Baumgarten et al., 2001; Nian et al., 2004), es induziert eine proinflammatorische Signaltransduktion und kann als Stimulanz der Inflammation wie TNF- α eine myokardiale Dysfunktion bedingen (Cain et al., 1999; Werdan und Müller-Werdan, 1996). Abgesehen von diesen proinflammatorischen Prozessen rufen TNF- α und IL-1 β adaptive Prozesse hervor, die den Funktionserhalt der Zellen verbessern können (Baumgarten et al., 2000). Eine kardiale Präkonditionierung mit diesen Zytokinen zeigte protektive Effekte (Belosjorow et al., 1999; Hiasa et al., 2001; Shames et al., 1998). Für TNF- α konnte zudem eine Protektion gegenüber ischämischen Einflüssen bei Kardiomyozyten belegt werden (Eddy et al., 1992; Kurrelmeyer et al., 2000; Nakano et al., 1998).

Die Produktion von IL-6 erfolgt in Monozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen und außerdem in CD4-positiven T-Lymphozyten. Dieses Zytokin ist wie TNF- α und IL-1 β ein proinflammatorischer Mediator. Er induziert auf Myozyten die Bildung von ICAM-1 („intercellular adhesion molecule“), welches neutrophilen Granulozyten ermöglicht in das Interstitium zu emigrieren, um dort die Entzündung und Gewebeschädigung voranzutreiben (Gwechenberger et al., 1999).

Diesen gegenüber ist Interleukin-10 neben IL-4 und IL-13 einer der wichtigsten Inhibitoren der Entzündungsreaktion (Bazzoni et al., 2010). Es wird als Rückkopplungs-

mechanismus aus Makrophagen sowie B- und T-Lymphozyten sezerniert und hemmt die Bildung aller inflammatorischen Zytokine inklusive TNF- α und IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass zumindest die Expression des TLR4 reduziert wird und IL-10 eine wichtige Komponente der Endotoxin-Toleranz ist (Ogata et al., 2000).

Die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) wird in geringen Mengen konstitutiv, insbesondere aber nach Aktivierung exprimiert. Diese Aktivierung erfolgt durch Endotoxine und proinflammatorische Mediatoren wie IL-1 β und TNF- α . Die Synthese von iNOS und folglich von Stickstoffmonoxid hat einen bekannten zytoprotektiven Effekt durch Vasodilatation, das Molekül wirkt in hohen Dosen jedoch zytotoxisch und führt zu einer gestörten Kontraktilität im Myokard (Knuefermann et al., 2008). So bedingt eine kongenitale iNOS-Defizienz eine Protektion vor einer Endotoxin-induzierten myokardialen Dysfunktion (Ullrich et al., 2000).

1.7 Ziele der Arbeit

Meine Arbeit ist ein Teil eines großen Forschungsprojektes. Zugrunde liegend ist die Erkenntnis, dass nicht nur mehr die klassischen Abwehrzellen zu den immunkompetenten Zellen gehören. Mehrere Untersuchungen konnten eine konstitutive Expression der TLR2, TLR4 und TLR9 auf humanen und murinen Kardiomyozyten nachweisen (Boyd et al., 2006; Cowan et al., 2000; Frantz et al., 1999; Frantz et al., 2001; Knuefermann et al., 2004). In Anlehnung an die bekannte präkonditionierende Wirkung des LPS via TLR4 (Frantz et al., 1999; Stapel, 2006) wurde in unserer Arbeitsgruppe in unterschiedlichen Ansätzen die Wirkung verschiedener synthetischer ODNs auf des Myokard untersucht. Einige Daten sind in Abbildung 3 dargestellt. Initial konnte demonstriert werden, dass ein TLR9-abhängiger Mechanismus der kardialen Inflammation existiert, und dass die CpG-ODN (verwendet wurde das Thioat 1668) in diese Zellen aufgenommen wird, um dort mit dem TLR9 zu reagieren. Eine Stimulation mit CpG-ODN führt temporär zu einer gesteigerten Expression der TLR9-mRNA und zu einer vermehrten Aktivität des kardialen Transkriptionsfaktor Nf κ B. Zudem bedingt das 1668-Thioat eine Herabsetzung der kardialen Kontraktilität via myokardialem TLR9

(Knuefermann et al., 2008). Es konnte dann gezeigt werden, dass die Applikation von 1668-Thioat zu einer Erhöhung der TNF- α -, IL-1 β - und IL-6-mRNA sowie der entsprechenden Proteinexpression führt. Als Negativkontrollen kamen die Nicht-CpG-ODNs H154 und 1612 zum Einsatz (Yamada et al., 2004). Diese Thioate resultieren nicht in einem signifikanten Anstieg der inflammatorischen Zytokine. In einer Präkonditionierungsstudie konnte eine signifikante Reduktion des Infarktareals in Bezug auf die AAR durch eine Vorbehandlung mit 1668-Thioat und I/R nach 24 Stunden Reperfusion gezeigt werden (Gözl, 2009, Markowski, 2007). H154- und 1612-ODNs bewirkten keine Reduktion des Quotienten aus Infarktareal und AAR. Frau Gözl demonstrierte 2009 weiterhin eine deutlich geringere Troponin T-Konzentration im Serum nach I/R und vorangegangener 1668-Thioat-Stimulation. Die Troponin T-Konzentration korreliert direkt mit der Größe des geschädigten Myokards (Dörner, 2006). Wir wissen also, dass eine Stimulation mit 1668-Thioat zu einer Inflammation führt und dass eine Präkonditionierung zu einer Reduktion des Infarktareals führt.

Die zugrundeliegenden, molekularen Mechanismen dieser signifikanten Infarktreduktion werden aktuell in einer parallel angefertigten Arbeit durch Herrn Markowski sowie in dem hier vorgestellten Projekt analysiert. Herr Markowski untersucht die Phase nach Stimulation und prä-Infarkt. Meine Arbeit analysiert die präkonditionierende Wirkung unterschiedlicher CpG-Oligonukleotide in Bezug auf die molekularen Mechanismen, die sich in der postischämischen Reperusionsphase abspielen. Im Speziellen wird die differentielle Mediatorantwort, die pro- und antiinflammatorische Zytokinexpression im murinen Myokard und im Serum untersucht. Es soll weiterhin geprüft werden, ob diese Vorgänge in Abhängigkeit der TLR9-Signaltransduktion stehen.

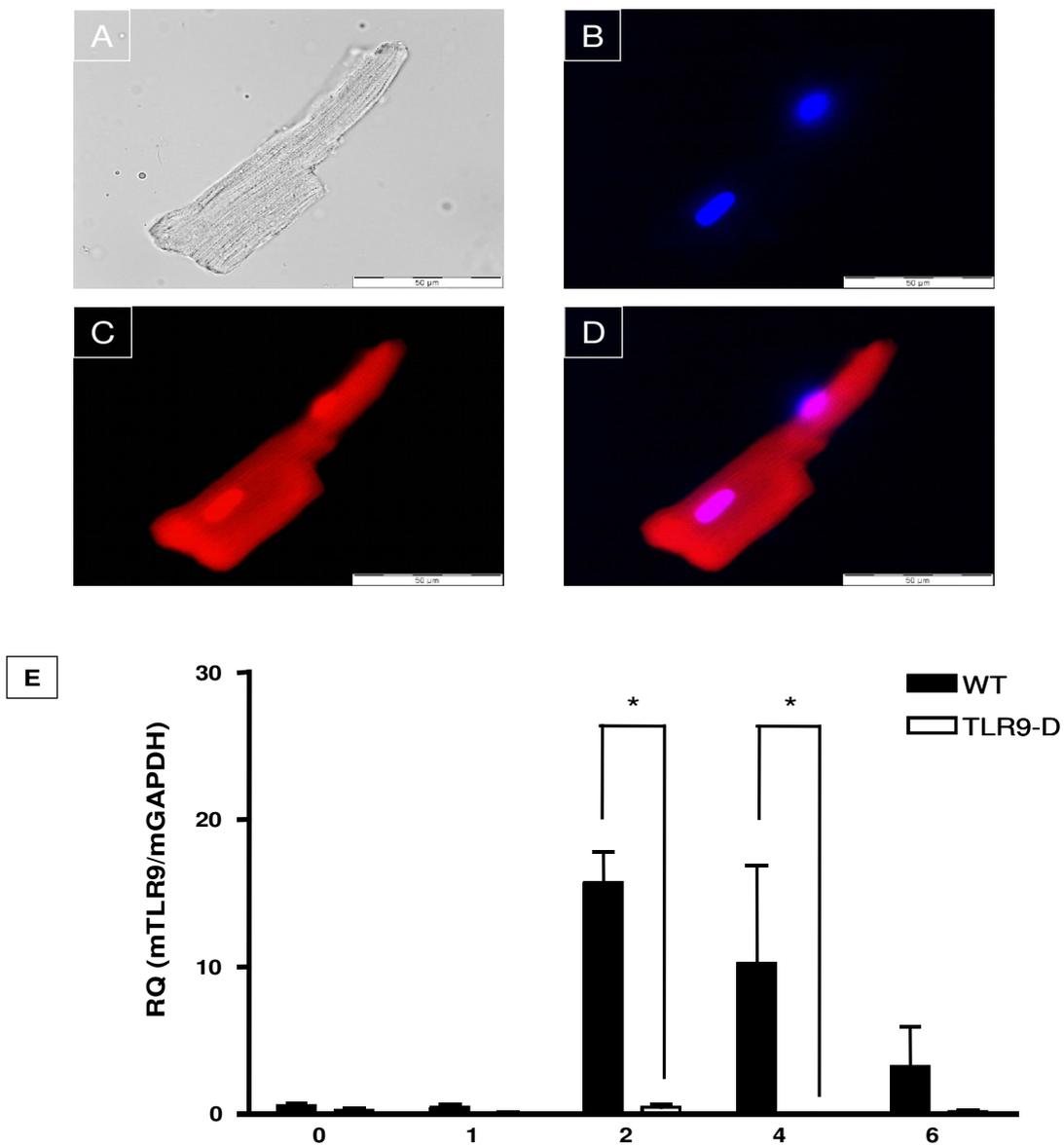


Abb. 3: Fluoreszenzfarbstoff-markierte CpG-ODN lässt sich 30 Minuten nach Applikation in isolierten murinen adulten Kardiomyozyten nachweisen (A-D). Die mRNA Expression von TLR9 im Herzen wurde mittels Real-time PCR analysiert (E). Es zeigte sich eine Hochregulation des Rezeptors zu den Zeitpunkten 2 und 4 h in den Herzen der WT-Mäuse. In TLR9-defizienten Tiere wurde keine Rezeptorexpression nachgewiesen (Knuefermann et al., 2008).

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Als Versuchstiere wurden 8-12 Wochen alte männliche Mäuse der Inzuchtlinie C57BL/6 (Wildtyp) aus der institutseigenen Zucht eingesetzt. Des Weiteren fanden, von Herrn Prof. Akira dankenswerter Weise zur Verfügung gestellte, TLR9-Rezeptor-defiziente Männchen Verwendung. Die Haltung und Aufzucht der Tiere fand artgerecht in Gruppen von drei bis fünf Tieren in transparenten Käfigen statt, die eine Größe von 36,5 cm * 20,7 cm * 14 cm aufwiesen. Die Umgebungsbedingungen lagen bei einer Raumtemperatur von 20 bis 22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus. Als Käfigeinstreu benutzten wir Altromin-Tiereinstreu, sowohl Wasser als auch Futter (Altromin Standarddiät Maus und Ratte) standen allzeit zur freien Verfügung. Eine Genehmigung der Tierversuche lag durch die Bezirksregierung Köln vor, das Aktenzeichen lautet 8.87-51.04.20.09.392.

2.2 Versuchsprotokoll

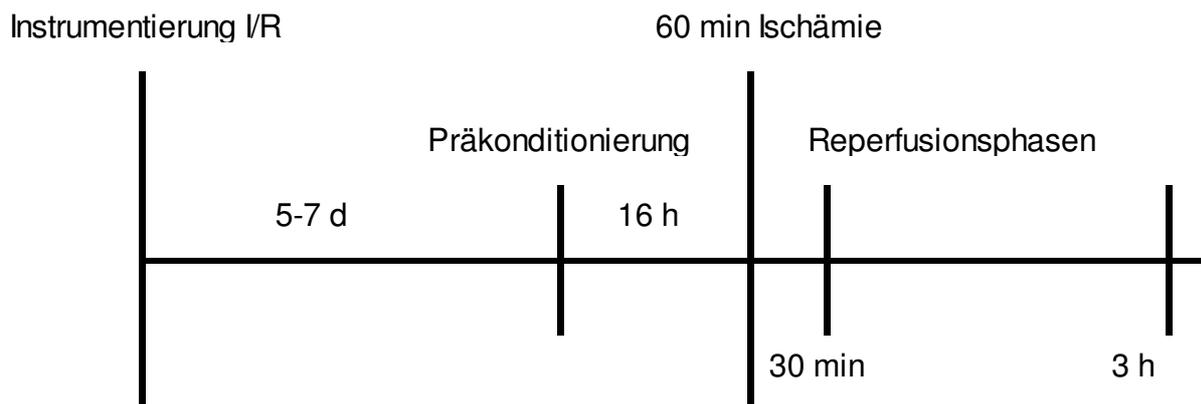


Abb. 4: Versuchsprotokoll im Überblick

Die Mäuse wurden primär alle einem operativen Eingriff (Instrumentierung) unterzogen, um eine lockere Ligatur der linken anterior-deszendierenden Koronararterie (LAD), vornehmen zu können (dezidiert erläutert in 2.3.1). Im weiteren Verlauf kam das „closed chest“-Modell zu Anwendung, welches im Jahre 2000 etabliert wurde (Nossuli et al., 2000) und entsprechend dem die Tiere postoperativ 5-7 Tage ruhen, bevor die temporäre Infarzierung am verschlossenen Thorax vorgenommen werden kann. Dies mindert ganz entscheidend den Einfluss inflammatorischer Mediatoren auf den Myokardinfarkt, die durch jeden operativen Eingriff freigesetzt werden. 16 Stunden vor geplanter Okklusion der LAD erhielten die Tiere jeweils ihre präkonditionierende Stimulation oder Placebo (Gruppeneinteilung siehe 2.3.2). Die Okklusions- beziehungsweise die Ischämiezeit betrug 60 Minuten, gefolgt von 30 Minuten oder 3 Stunden Reperfusionzeit. Anschließend wurden die Organe (Herz, Lunge) sowie Serum entnommen und nach RNA-Isolation und mittels „Real-time“ PCR auf die differentielle Mediatorantwort, während der postischämischen Reperusionsphase weiter untersucht. Die Expression myokardial relevanter Mediatoren (u.a. TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) wurde demnach in Abhängigkeit verschiedener ODNs und zu zwei Zeitpunkten 30 Minuten oder 3 Stunden post Infarkt bestimmt. Der zeitliche Verlauf war hier ganz entscheidend, da Vorarbeiten bereits mittels ELISA die Zytokinexpression als hoch zeitabhängig darstellen konnten (Knüfermann et al., 2008).

Die Genotypisierung der TLR9-defizienten Mäuse, beziehungsweise der Beweis des Genverlustes wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Frau Schulz regelmäßig durchgeführt.

2.3 *In-vivo*-Eingriffe

2.3.1 Instrumentierung Ischämie / Reperfusion

In einer Inhalationsbox erfolgte die Narkoseeinleitung mit 2 Volumenprozent Isofluran und einem Sauerstoff-Frischgasfluss von 1 l/min. Daraufhin wurde das Tier auf einem vortemperierten Operationstisch (37°C) in Rücklage fixiert (Abb. 5) und mittels Nasenkonus weiter anästhesiert.

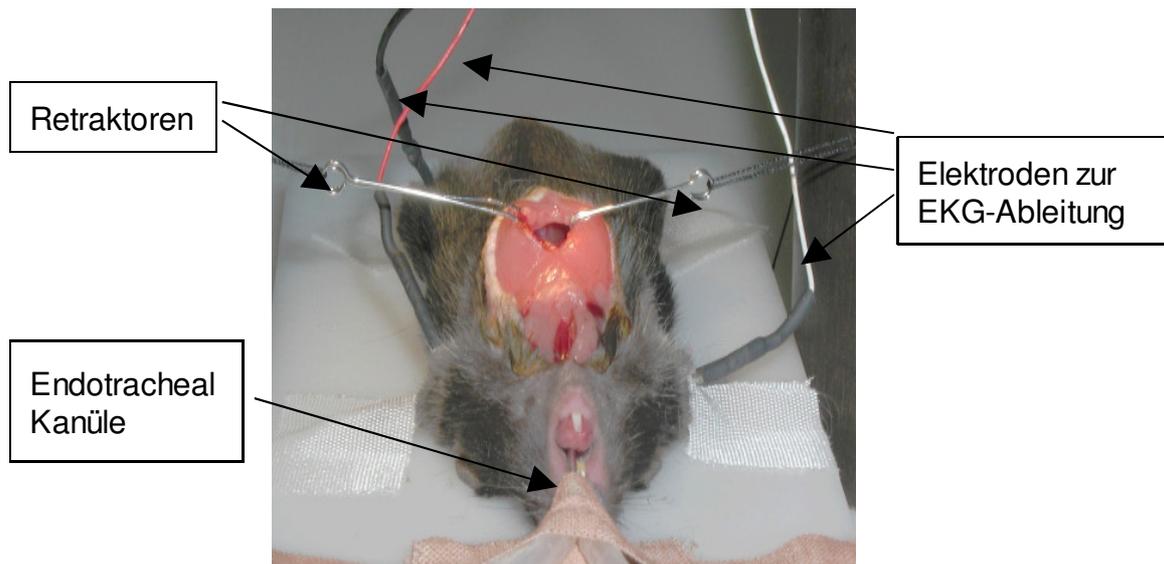


Abb. 5: Fixierung des Tieres auf dem Operationstisch, EKG-Elektroden sind appliziert und der Thorax durch Retraktoren gespreizt (Stapel, 2006).

Nach Enthaarung und Desinfektion des Operationsgebiets mit Betaisodona erfolgte ein medianer Hautschnitt von submandibulär bis zum Xiphoid unter stereomikroskopischer Sicht bei 6-facher Vergrößerung (ZEISS Mikroskop). Dann folgte die stumpfe Trennung der subkutan liegenden Speicheldrüsenlappen und die Separation der prätrachealen Muskulatur. Unter Sicht wurde nun eine endotracheale Intubation vorgenommen (Abb. 6), mittels eines speziellen Beatmungsgeräts (MiniVent) wurde die Maus, mit Volumina von 200 μ l bei einer Atemfrequenz von 110 /Minute, entsprechend ihren physiologischen Parametern beatmet.

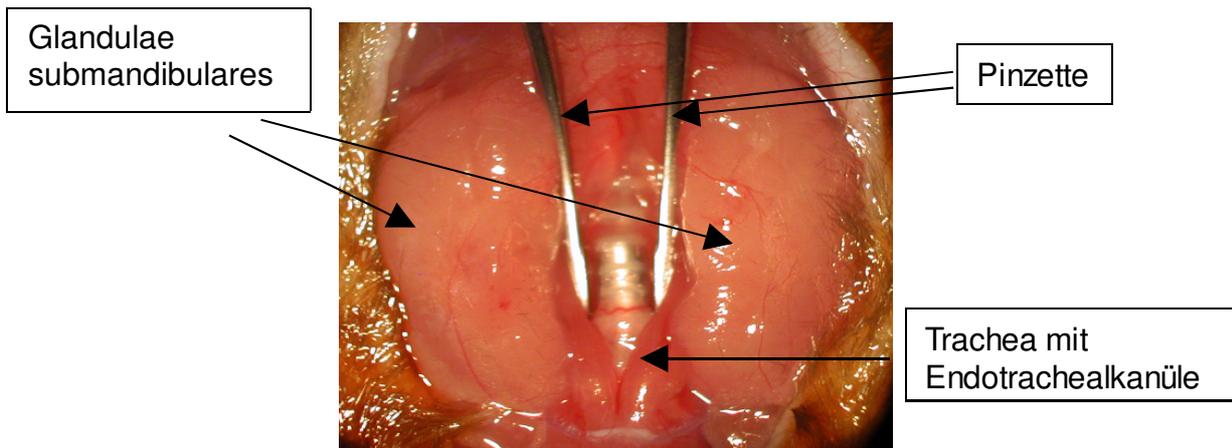


Abb. 6: Intubation, Halsbereich der Maus, Ventralansicht nach Hautschnitt und Präparation der Trachea (6-fache Vergrößerung) (Stapel, 2006).

Zur Eröffnung des Thorax wurden links parasternal die Rippen 2 und 3 mit anliegenden Interkostalräumen bis in den Pleuraraum durchtrennt und mit zwei Retraktoren zur Fixation eingespannt. Der zum Teil noch recht kräftig ausgeprägte retrosternale Thymus wurde nach rechts-lateral verschoben. Das Perikard konnte dann stumpf eröffnet werden, um eine optimale Sicht auf das Myokard zu gewährleisten. Unter Einsatz einer U-förmig gebogenen Nadel und eines monofilen Fadens der Stärke 8.0 wurde anschließend unter 16-facher Vergrößerung die Ligatur der LAD ca. 1-3 mm distal des linken Aurikels gesetzt (Abb. 7).

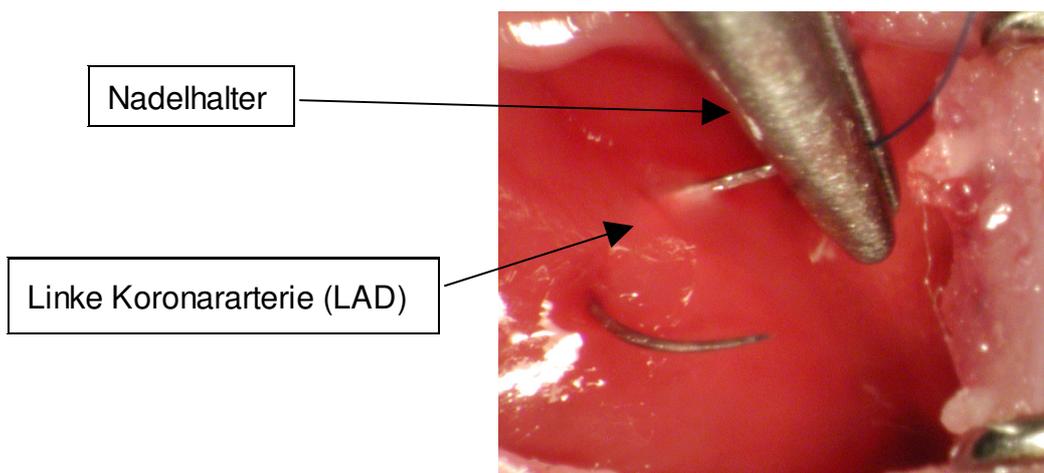


Abb. 7: Umstechung der linken Koronararterie unter 16-facher Vergrößerung (Stapel, 2006).

Die Nadel wurde dann vom Faden abgetrennt und die Fadenenden durch ein 0,5 mm langes Stück eines Polyethylen-Schlauches, der als Okkluder diente, geführt. Die korrekte Lage der Ligatur wurde per kurzer Okklusion validiert, die eine sichtbare Blässe des Myokard des linken Ventrikels nach sich zog (Abb. 8). Dieser Okkluder lässt später eine Kompression der LAD zu, ohne die Koronararterie zu verletzen oder das Herz übermäßig zu deplatieren.

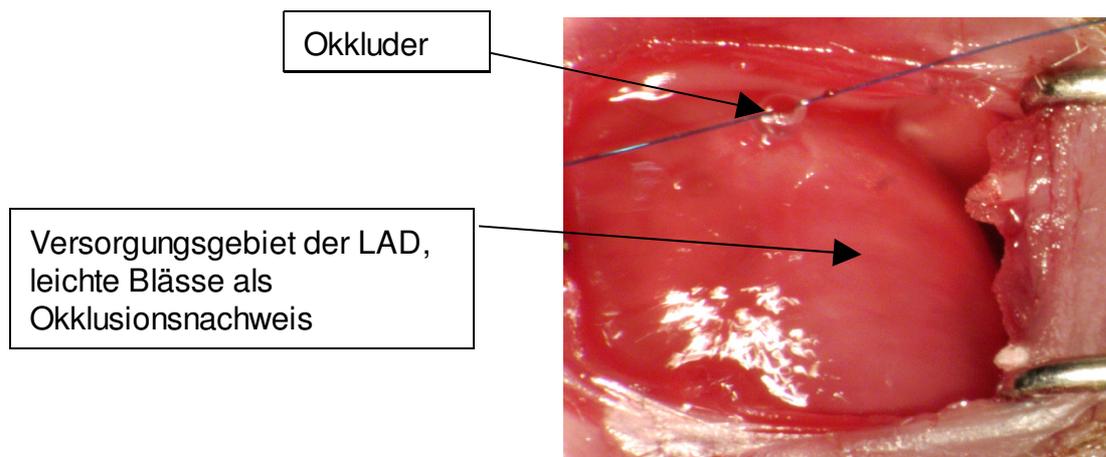


Abb. 8: Okklusion der linken Koronararterie mittels Okkluder unter 16-facher Vergrößerung (Stapel, 2006).

Anschließend wurde je ein Fadenende mit einer Kalt-Nadel, Größe 3, durch den 1. und 4. Interkostalraum ausgeführt, in einer lockeren Schlaufe miteinander verknotet und schließlich links thorakal in eine subdermale Tasche gelegt. Die Thoraxnaht erfolgte einreihig, allschichtig in Einzelknopfnähten, die Hautnaht einreihig fortlaufend mit je einem monofilen Faden der Stärke 6.0. Bereits während der letzten Naht wurde die Isoflurandosis auf 1-0,5 Volumenprozent reduziert, was die Extubation zeitnah, nach Einsetzen der Spontanatmung und der Schutzreflexe, ermöglichte. Bis zum völligen Erwachen aus der Narkose wurde die Maus in Bauchlage unter einer Wärmelampe überwacht. Als postoperative Analgesie erhielt jede Maus vor Ausleiten der Isoflurannarkose einen intraperitonealen Bolus von 0,1 ml Temgesic-NaCl (0,0015 mg/Tier; Temgesic, Ampullen, Injektionslösung 0,3 mg/ml Buprenorphinhydrochlorid, Essex Pharma, München).

2.3.2 Präkonditionierung und Gruppeneinteilung

Die Präkonditionierung der Versuchstiere begann 16 Stunden vor der Infarzierung. Sie erfolgte als intraperitoneale Injektion mit 100 µl CpG-ODN in einer Konzentration von 5 nmol (Gruppen 3 und 4). Hierbei handelt es sich um ein immunstimulativ-wirkendes unmethyliertes Cytosinphosphat-Guanosin-Oligonukleotid (1668-Thioat) mit folgender Sequenz: 5'-TCC-ATG-ACG-TTC-CTG-ATG-CT-3'. Um den direkten hepatischen Abbau über den portalvenösen Kreislauf zu verhindern, erhielten alle stimulierten Mäuse eine halbe Stunde zuvor 50 µl D-Galaktosamin (= 20 mg) ebenfalls intraperitoneal (Hemmi et al., 2000).

Den Kontrollgruppen 1 und 2 applizierten wir dagegen je 100 µl PBS, den Versuchsgruppen 5 und 6 je 100 µl eines immun-neutralen ODNs à 5 nmol (1612-Thioat, 5'-GCT-AGA-TGT-TAG-CGT-3') und den Versuchsgruppen 7 und 8 je 100 µl eines immunsuppressiv-wirksamen H154-Thioats à 5 nmol (5'-CCT-CAA-GCT-TGA-GGG-G-3'). Die Oligonukleotide waren nach Herstellerangaben frei von Endotoxinen. Die entsprechenden Dosierungen wurden durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe als optimal ausgearbeitet. Die Gruppeneinteilung stellt sich zusammengefasst wie folgt dar:

- Gruppe 1: Kontrollgruppe mit 100 µl PBS-Gabe, 30 min Reperfusion
- Gruppe 2: Kontrollgruppe mit 100 µl PBS-Gabe, 3 h Reperfusion
- Gruppe 3: Versuchsgruppe mit 100 µl 1668-Thioat-Gabe, 30 min Reperfusion
- Gruppe 4: Versuchsgruppe mit 100 µl 1668-Thioat-Gabe, 3 h Reperfusion
- Gruppe 5: Versuchsgruppe mit 100 µl 1612-Thioat-Gabe, 30 min Reperfusion
- Gruppe 6: Versuchsgruppe mit 100 µl 1612-Thioat-Gabe, 3 h Reperfusion
- Gruppe 7: Versuchsgruppe mit 100 µl H154-Thioat-Gabe, 30 min Reperfusion
- Gruppe 8: Versuchsgruppe mit 100 µl H154-Thioat-Gabe, 3 h Reperfusion

2.3.3 Okklusion / Ischämie

Zur Okklusion der LAD und damit Initiierung eines 60 minütigen ST-Strecken-Hebungsinfarkt („ST-elevation myocardial infarction“, STEMI) erhielten die Mäuse eine Propofolnarkose. Diese wurde eingeleitet mit 0,2 ml von 1%-igem Propofol (2 mg),

intraperitoneal appliziert. Sofern notwendig folgten weitere Injektionen à 0,05 ml Propofol. Die Spontanatmung der Versuchstiere bleibt unter diesen Dosen erhalten, so dass eine Intubation und Insufflation mit Sauerstoff-angereicherter Luft nicht geboten waren. Eine Inhalationsnarkose mit Isofluran eignet sich einerseits aufgrund seines präkonditionierenden Effektes nicht (Cason et al., 1997; Ludwig et al., 2004), andererseits würde der Frischgasfluss mit Sauerstoff die Größe des resultierenden Infarktareals im Sinne einer Größenreduktion beeinflussen. Der präkonditionierende Effekt von Isofluran währt maximal 72 Stunden, so dass die Verwendung bei der Initialoperation unbedenklich ist; die schnellere Anschlagszeit durch Inhalation sowie kürzere Aufwachphase sind hier von großem Vorteil. Hingegen zeigte Propofol bisher keine eindeutigen Belege auf eine präkonditionierende Wirkung und hat den Vorteil bei anhaltend guter Verträglichkeit mehrmals appliziert werden zu können (Kato und Foex, 2002; Ko et al., 1997; Kokita et al., 1998).

Zum Nachweis des STEMI wurden entsprechend der bipolaren Extremitätenableitung II nach Einthoven drei Elektroden subkutan in die Vorderextremitäten sowie die linke Hinterpfote positioniert (Abb. 5). Die Ableitung II folgt dem Hauptvektor der elektrischen Herzachse des jugendlichen Tieres und zeigt daher am zuverlässigsten eine Veränderung der Reizweiterleitung und damit des erregbaren Myokard am linken Ventrikel. Um eine konstante Körpertemperatur von 37°C aufrechtzuerhalten, wurde eine Temperatursonde rektal eingeführt und diese an einen Temperaturregler angeschlossen, welcher bei Unterschreiten der Soll-Temperatur eine Wärmelampe aktivierte. Dies hatte zwei Gründe, zum einen zieht eine perioperative Auskühlung einen deutlich gesteigerten Stoffwechsel mit erhöhtem Energie- und Sauerstoffbedarf mit sich. Zum anderen hat eine Körpertemperatursenkung einen protektiven Effekt auf das ischämische Myokard, resultierend in verminderter Infarktgröße (Chien et al., 1994; Duncker et al., 1996; Hale et al., 1997; Hale und Kloner, 1997; Khaliulin et al., 2007). Über die angeschlossenen Elektroden an ein Power Lab Data Aquisition System (ADInstruments, Spechbach) und der dazugehörigen Software (Chart for Windows 4.2) konnten die elektrokardiographischen Daten aufgezeichnet und überwacht werden. Die Hautnaht wurde nun über dem Sternum eröffnet, so dass der subdermal befindliche Ligaturknoten mobilisiert und mittels eines Retraktors nach links lateral für 60 Minuten gespannt werden konnte (Abb. 9). Dies führt zur erwünschten Okklusion der LAD und

konsekutiv zur absoluten Ischämie des poststenotischen Myokards, nachweisbar im EKG als ST-Strecken-Hebung (Abb. 10). Nach 60 Minuten wurde die Spannung gelöst und die Maus zur 30-minütigen oder 3-stündigen Reperfusion wieder in ihren Käfig gelegt.

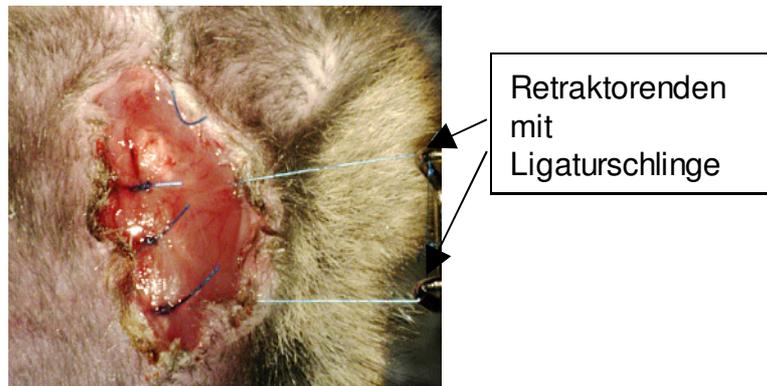


Abb. 9: *Ventralansicht nach Wiedereröffnung des Hautschnitts, Zug der Ligatur zur Okklusion der LAD mittels eines Retraktors (Stapel, 2006).*

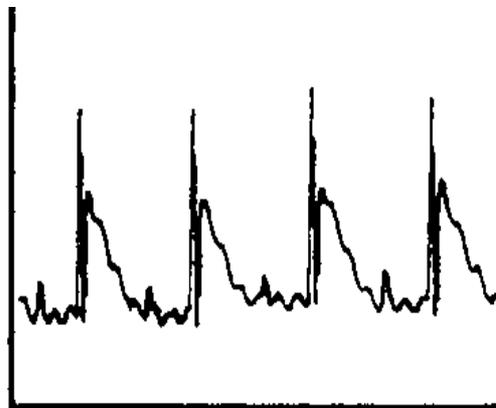


Abb. 10: *Elektrokardiographie: ST-Hebung als Indiz einer Ischämie; Abszisse: Zeit (s), Ordinate: Spannung (mV) (Nossuli et al., 2000).*

2.3.4 Planimetrie zum Nachweis der Reproduzierbarkeit

Zum Nachweis einer vergleichbaren Ergebniskonstanz wurde vor Beginn der eigentlichen Studie bezüglich der Mediatorantwort eine planimetrische Auswertung des

Quotienten aus Infarktareal (IA) und AAR vorgenommen.

Die Anästhesie erfolgte wie unter Kapitel 2.3.1 beschrieben. Der Ligaturknoten wurde freigelegt und durchtrennt. Im Anschluss wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt, das Zwerchfells ventral entlang des Rippenbogen eröffnet und mittels kranialer Fixation des Xiphoids eine ausreichende Sicht auf das Herz ermöglicht. Die nun intrathorakal liegende LAD-Ligatur wurde fest geschlossen, um eine weitere Perfusion des Stromgebiets zu verhindern. Zur Markierung der Non-AAR erfolgte nun die Injektion von 0,5 ml einer 5%igen Phthaloblau-Lösung (Heubach Dispersionsfarbe) in den rechten Ventrikel. Nach sichtbarer Färbung der Lungenflügel strömte das Blau über den linken Ventrikel und die noch offenen Koronarien, die rechte Koronararterie (RCA) und den den Ramus circumflexus der linken Koronarie (RCX) und färbte das perfundierte Myokard. Anschließend wurde das Herz entnommen, in PBS gespült und unter 10-facher Vergrößerung die Vorhöfe und der rechte Ventrikel entfernt. Nach Schockgefrierung bei -160°C in 2-Methylbutan (Sigma) konnte der linke Ventrikel in ca. 5-7 je 1 mm starke Schnitte geteilt werden. Diese werden dann für 20 Minuten bei 37°C in 1,5% Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) inkubiert. Die Dehydrogenasen der noch vitalen Zellen reduzierten das farblose TTC zur roten Verbindung Triphenyl-Formazan, es resultierte eine Rotfärbung des vitalen Gewebes im Gebiet der AAR, die Blaufärbung der NAAR blieb weiterhin deutlich abgrenzbar zu erkennen. Durch 4%-ige Formalin-lösung wurden die Schnitte in 30 Minuten fixiert und dann auf einen Objektträger gelegt. Durch einen Mikroskop-Kameraaufsatz wurden die Schnitte einzeln und von beiden Seiten digital photographiert (Abb. 11). Mit der Software Image J (Version 1.29, NIH, USA) erfolgte die planimetrische Vermessung (NAAR, AAR, IA) der Schnitte und die folgende Auswertung. Die Daten der Vorder- und Rückseite der Bilder flossen unter Aussparung des Ventrikellumen als Mittelwerte ein. Durch Addition der Werte konnten Volumenangaben der einzelnen Zonen in Bezug auf die gesamte Muskelmasse des linken Ventrikels gemacht werden. Speziell standen die Quotienten vom IA zur AAR bzw. zum linken Ventrikel sowie von der AAR zum linken Ventrikel im Vordergrund.

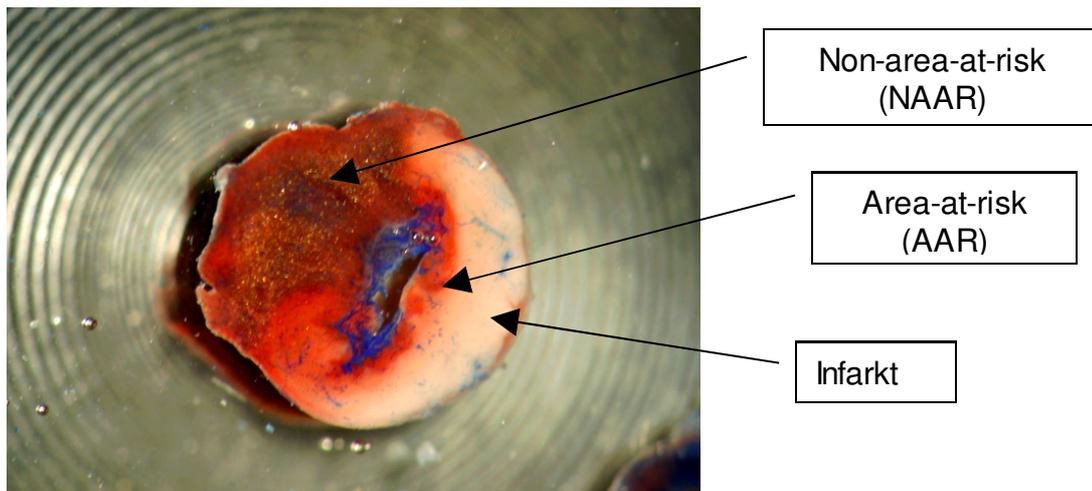


Abb. 11: Herzschnitt nach Phthaloblau- und TTC-Färbung, der weißliche Abschnitt kennzeichnet den Infarkt, die rote die AAR und die blaue die NAAR.

2.3.5 Organentnahme zur Bestimmung der Mediatorantwort

Der Tod des Versuchstieres erfolgte nach Abschluss der Reperfusionphase bei einem Durchstrom von über 3 Volumenprozent Isofluran durch zervikale Dislokation. Anschließend wurden für die molekularbiologischen Untersuchungen das gesamte Herz und die Lunge zur Analyse entnommen und in kaltem PBS gewaschen. Vor dem Überführen der Organe in Eppendorf-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) wurde die überschüssige Flüssigkeit mit Fließpapier entfernt. Ungefähr 0,5 - 1 ml Blut wurde aus dem offenen Thorax aspiriert und für 10 min bei 4°C und bei einer RZB von 5984 g zentrifugiert (Zentrifuge, #5415R, Eppendorf AG, Hamburg). Das Serum im Überstand konnte dann abpipettiert und in neue vorbereitete Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt werden. Die Herzen, Lungen und Sera wurden in separaten und zuvor beschrifteten Eppendorf-Gefäßen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur Aufbereitung bei -80°C gelagert.

2.4 Molekularbiologische Untersuchungen

2.4.1 RNA - Isolation, die Guanidinthiocyanat - Phenol - Chloroform - Extraktionsmethode

Zur Erfassung der pro- und antiinflammatorischen Genexpression myokardial relevanter Mediatoren nach unterschiedlich langer Reperfusionphase im Herzen wurde eine quantitative „Real-time“- Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Zur Vorbereitung dieser Analyse wurde die mRNA (messenger Ribonukleinsäure) aus dem gesamten Organ nach der Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode (Chomczynski und Sacchi, 1987) isoliert. Vor der eigentlichen Isolation wurde das Dispergierwerkzeug des Dispergiergerätes Ultra-Turrax TP 18/10 (IKA Werke, Staufen) mit 4 M Guanidinthiocyanat (GIT) und 0,1%-igem Diethylpyrocarbonat (DEPC) gereinigt, um anschließend mit der Zerkleinerung des Herzens beginnen zu können.

Die Herzen wurden noch gefroren in TRI Reagent Solution (1 ml TRI Reagent Solution pro 100 mg Gewebe; Ambion Applied Biosystems, Wiesbaden) gegeben, homogenisiert und dann auf Eis für 10 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden 200 µl Chloroform pro Milliliter TRI Reagent Solution hinzugegeben. Das Gemisch wurde mit einem Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA) gemischt und für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation in einer Eppendorf Zentrifuge #5810R (Eppendorf, Hamburg) bei 4000 U/min (740×g) für 30 Minuten wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die oberste, mRNA-haltige Phase wurde abgenommen, mit 0,5 ml Isopropanol je ml TRI Reagent Solution vermischt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend bei 4000 U/min (740×g) für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das verbleibende Sediment mit 6 ml 75%-igem Ethanol gereinigt, zentrifugiert (4000 U/min (740×g)) und der Überstand verworfen. Das nun sichtbare „Pellet“ wurde für 15 - 30 Minuten unter dem Abzug getrocknet, um dann in 200 µl DEPC resuspendiert zu werden. Die mRNA wurde folgend nach Anleitung des Herstellers in einem PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Karlsruhe) aufgereinigt. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte dann mit einem NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Langenselbold) durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm.

2.4.2 Quantitative „Real-Time“ - Polymerasekettenreaktion, (PCR)

Die Expression von pro- und inflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10), verschiedener Rezeptoren (TLR2, TLR4, TLR9) sowie der Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) wurde mittels quantitativer „Real-time“ PCR untersucht.

Die primäre reverse Transkription der mRNA erfolgte mit einem High Capacity cDNA Reverse-Transkription-Kit (Applied Biosystems, Fosters City, USA). 25 μ l mRNA wurde mit 25 μ l Reverse-Transkriptase Master Mix zu cDNA umgeschrieben.

Folgende murine TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) wurden im Verlauf verwendet:

- TLR2 Mm01213946_g1
- TLR4 Mm00434204_m1
- TLR9 Mm00446193_m1
- TNF- α Mm00443258_m1
- IL-1 β Mm99999061_mH
- IL-6 Mm01210732_g1
- IL-10 Mm00439616_m1
- iNOS Mm99999915_g1

Die „Real-time“ PCR wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. 6,65 μ l cDNA (16,5 ng cDNA) wurden mit 27 μ l Masters Mix (Gemisch aus 2-fach TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Fosters City, USA) TaqMan® Gene Expression Assay und DNA- sowie RNA-freiem Wasser) versetzt. Je 10 μ l aus diesem Ansatz wurden auf eine 384-well-Mikrotiterplatte (Brand, Wertheim) pipettiert (5,5 ng cDNA pro well).

Die Messung der Proben erfolgte mit einem ABI Prism® 7900HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Fosters City, USA). Das Programm wurde mit einer dreiminütigen Temperierung bei 50°C und anschließender Aufheizung bei 95°C für 10 Minuten gestartet. In 40 Amplifikationszyklen erfolgte ein Wechsel zwischen 95°C für 15 Sekunden und 50°C für 1 Minute. Die Analyse der Ct-Werte zur späteren Bestimmung des relativen Quotienten (RQ) erfolgte mit der Software SDS2.2 (Applied Biosystems,

Foster City, USA). Nach Export der Daten in Microsoft Excel (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim) erfolgte die Ermittlung der RQ-Werte nach der ΔC_t -Methode. Die Expression der aufgeführten Zielgene wurde auf das Gen der konstitutiv exprimierten, murinen Glyzerinaldehyd-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Die Analyse der RQ Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 4.05 (GraphPad Software, San Diego, USA).

2.5 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Daten aller Gruppen als Mittelwert (MW) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet. Das Computerprogramm GraphPad Prism 4.05 (GraphPad Software, San Diego, USA) ermöglichte die Bestimmung der Signifikanzen durch ein- oder zweifaktoriellen ANOVA und folgendem Posthoc-Test nach Newman-Keuls bzw. mittels unpaired t-Test. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als signifikant angenommen. Um den arithmetischen Mittelwert \pm Standardfehler graphisch zu präsentieren wurden Balkendiagramme angelegt.

2.6 Geräte und Materialien

2.6.1 Materialien für die Tierhaltung

- Zuchttiere (Charles River, Sulzfeld)
- Käfige (Makrolon, Typ II L, Charles River, Sulzfeld)
- Tiereinstreu (Altromin-Tiereinstreu, Altromin, Lage-Lippe)
- Futter (Altromin-Standarddiätfutter Maus und Ratte, Altromin, Lage-Lippe)

2.6.2 Geräte und Materialien für die *In-vivo*-Eingriffe

- Endotrachealkanüle (Durchmesser 1,0 mm und 1,2 mm; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten)

- Minivent (Typ 845; Hugo Sachs Elektronik – Havard Aparatus, March-Hugstetten)
- Operationsbesteck (Augenschere, verschiedene Pinzetten, Castroviejo-Nadelhalter, Klemmen, Wund-Retraktoren, Fine Science Tools, Inc., San Francisco, USA bzw. Allgaier Instrumente, Frittlingen)
- Operationsmikroskop (OpMi-191294, Carl Zeiss, Oberkochen)
- OP-Tisch (Eigenanfertigung der Feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Instituts Bonn mit angeschlossenem Wärmebad (42 °C); Rhema-Labortechnik, Hofheim)
- EKG-Ableitung nach Einthoven
Elektroden: Kalt-Nadeln, Größe 3, Fine Science Tools, USA
Datenverarbeitung durch Power Lab Data Acquisition System;
ADInstruments, Spechbach; dazugehörige Software: Chart4windows
- Cardiac Reader (Roche Diagnostics, Mannheim)
- Zentrifuge (# 5415R; Eppendorf, Hamburg)
- Kardiotom (Eigenfertigung der Werkstatt des Physiologischen Institutes Bonn)
- Objektträger (Super Flos Frost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland)
- Digitalkamera (Nikon CoolPix 990)
- Verbrauchsmaterialien
- Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm (Ratiopharm, Ulm)
- Betaisodona Lösung (Mundipharma, Limburg)
- Isofluran: Forene® (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Disoprivan, 1 % Propofol (Astra Zeneca, Wedel)
- Temgesic-Lösung (Ampullen, Injektionslösung 0,3 mg/ml Buprenorphinhydrochlorid; Essex Pharma GmbH, München)
- Nahtmaterial
- Monofile Prolene-Fäden mit atraumatischer Nadel (Johnson&Johnson, Brüssel, Belgien)
- 6-0 Prolene Fäden BV-1 (Polypropylen; Ethicon GmbH, D-Norderstedt) für die Hautnähte
- 8-0 Prolene Fäden, BV-1 für den Ligaturfaden (Ethicon GmbH)
- Stimulantien
- D-Galaktosaminhydrochlorid, 1 g/10 ml, D-GalN (Roth, Karlsruhe)

- Oligonukleotidsequenzen (TibMolBiol, Berlin):
 - 1668 Thioat; 5'-TCCATGACGTTCCCTGATGCT-3' (stimulativ)
 - 1612 Thioat: 5'-GCTAGATGTTAGCGT-3' (neutral) (Yamada et al, 2004)
 - H154 Thioat: 5'-CCTCAAGCTTGAGGGG-3' (suppressiv) (Yamada et al, 2004)
- PBS

Pufferlösung aus 135 mM NaCl, 1,3 mM KCl, 3,2 mM Na₂HPO₄xH₂O, 0,5 mM KH₂PO₄ und Aqua bidest., pH-Wert 7,4 (Gibco; Invitrogen, Darmstadt)

- 2-Methylbutan, #277258, Sigma-Aldrich
- Phthaloblau-Lösung 5 %, mit PBS angesetzt, Heubach Dispersionsfarbe
- TTC-Lösung 1,5 %, 2,3,5-Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) mit Phosphatpuffer (pH-Wert 7,41)
- Formalin 4 %, verdünnt mit PBS, Merck

2.6.3 Geräte und Materialien für die molekularbiologischen Untersuchungen

- Feinwaage (Model Voyager; Ohaus, Gießen)
- Gene Amp 7500HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Fosters City, USA)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)
- PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Karlsruhe)
- NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Langenselbold)
- High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems, Fosters City, USA)
- TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Fosters City, USA)
- 2-fach TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, Fosters City, USA)
- PCR-Platte: 384-well optical reaction plate (Brand, Wertheim)
- Chemikalien
 - PBS, Pufferlösung aus 135 mM NaCl, 1,3 mM KCl, 3,2 mM Na₂HPO₄xH₂O, 0,5 mM KH₂PO₄ und Aqua bidest., pH-Wert 7,4 (Gibco, Invitrogen, Darmstadt)
 - Diethylpyrocarbonat (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
 - Guanidinthiocyanat (GIT, #G6639; Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)

- TRI Reagent Solution (Applied Biosystems, Fosters City, USA / Ambion)
- Chloroform (Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen)
- Ethanol (Merck, Darmstadt)
- Propanol (Merck, Darmstadt)

- Analysegerät

ABI PRISM 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Fosters City, USA)

2.6.4 Software

- Chart for Windows (ADInstruments, Spechbach)
- Power Lab Data Acquisition System (AD Instruments, Spechbach)
- Image J Version 1.29 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)
- Prism 4.05 (GraphPad Software, San Diego, USA)
- SDS 2.2 (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Microsoft Excel (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim)

3 Ergebnisse

3.1 Tierzahlen

In Summe fließen die Daten von 202 Mäusen in diese Arbeit ein. Davon waren 162 Wildtyp- (WT, C57BL/6) Mäuse und 40 TLR9-defiziente (TLR9-D) Mäuse. Für die in Kapitel 2.3.2. definierten Versuchsgruppen mit 30-minütiger Reperfusionphase erfolgten je 10-12 Organentnahmen. Für die Versuchsgruppen mit 3-stündiger Reperfusionphase je 15-16 Organentnahmen. Zur Auswertung kommen je vier bis sechs zufällig ausgewählte Organe.

3.1.1 Mortalitätsraten

Die Letalitätsraten während des initialen operativen Eingriffes waren äußerst gering und bei zwei von drei Fällen auf primär bestehende strukturelle Veränderungen am murinen Herzen zurückzuführen. Es zeigten sich nach Thorakotomie zwei massiv dilatierte Herzen, also ein in Kontraktilität und Perfusion reduziertes Myokard. Diese Mäuse verstarben unter den Bedingungen der Operation. Die dritte Maus verstarb an einer Massenblutung beim Versuch, die LAD zu umschlingen. Zwei Mäuse verstarben direkt nach intraperitonealer Applikation von D-Galaktosamin, wahrscheinlich infolge der Verletzung intrabdomineller Strukturen. 23 Mäuse verstarben kurz nach oder im Verlauf der 16 Stunden post Stimulation, dies entspricht einem Anteil von 37 % der Gesamtmortalität. Diese Letalität ist stark abhängig von dem verwendeten Stimulans und zu 82 % der Gabe von 1668-Thioat zuzuschreiben. Die Letalität während der Infarzierung lag bei 24 Mäusen, entsprechend 38,7 %. Sie ist einerseits dem Auftreten von tachy- oder bradyarrhythmischen Herzrhythmusstörungen auf Grund der divergenten ventrikulären Erregungsausbreitung zuzuordnen, hinzu kommt die durch Propofol induzierte Atem- und Kreislaufdepression. Postischämisch, in der Phase der Reperfusion starben 9 Mäuse. Hier liegen die verschiedenen Gruppen der Vorbehandlung in ähnlichen Bereichen. Die nachfolgende Tabelle 2 führt diese Zahlen gruppiert auf.

| | |
|--|------------|
| Gesamtzahl der Mäuse | 202 |
| Wildtyp | 162 |
| TLR9-D Mäuse | 40 |
| Organentnahme für die Molekularbiologie | 140 |
| Todesfälle | 62 |
| Bei Operationen | 3 |
| Nach DeGal-Applikation | 2 |
| Nach Stimulation | 23 |
| - mit PBS | 1 |
| - mit 1668-Thioat | 19 |
| - mit 1612-Thioat | 1 |
| - mit H154-Thioat | 2 |
| Während der Infarzierung | 24 |
| Während der Reperfusion | 9 |

Tab. 2: Tierzahlen und Todesraten gesamt

3.2. Ergebniskonstanz

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit wurde vor Beginn der eigentlichen Mediatoruntersuchungen eine Vergleichsstudie bezüglich der Größe des Infarktareals pro AAR durchgeführt. Hier sollte gezeigt werden, ob erstens die Operationstechnik, also das Anbringen der LAD-Ligatur, eine vergleichbare AAR hervorruft und zweitens, ob die ODN-Gabe, wie in Vorarbeiten beschrieben, ebenfalls eine Reduktion des resultierenden Infarktareal erreicht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Nach PBS-Applikation zeigte sich ein Infarktareal/AAR von $41,24 \pm 3,939 \%$ ($n=5$), durch eine 1668-Thioat-Gabe konnte der Quotient um über die Hälfte auf $18,92 \pm 3,422 \%$ ($n=4$) reduziert werden. Nahezu identisch die Ergebnisse der Vorarbeit: Eine PBS-Behandlung resultierte in einem Quotient von $35,38 \pm 2,923 \%$, eine ODN-Gabe in einem von $19,71 \pm 4,421 \%$.

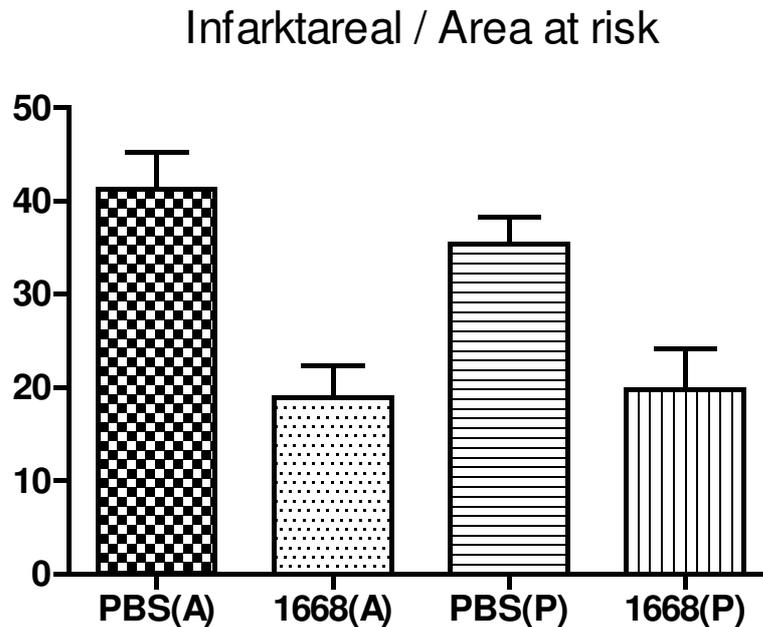


Abb. 12: Reproduzierbarkeit des Infarktarea prozentual zur Area at risk. Vergleich der eigenen Ergebnisse (A) mit denen aus Vorarbeiten (P).

3.3. Ergebnisse der quantitativen „Real-time“-PCR bei Wildtyp - Mäusen

Die Okklusion der LAD mit einhergehender ischämischer Reaktion im poststenotischen Areal induziert die Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine. Zusätzlich beeinflussen die applizierten Stimulanzen das inflammatorische System auf verschiedene Art und Weise (Kap. 1.5). Bei Wiederherstellung der Perfusion kommt es zur Einwanderung großer Mengen von stereotaktisch angelockten Immunzellen, welche die Entzündungsreaktion antreiben und so einen zusätzlichen Myokardschaden bedingen. Die folgenden Ergebnisse beschreiben in einer *in-vivo* Kinetik die differentielle Mediator-antwort abhängig von der Immunstimulation und der Dauer der Reperfusion (jeweils nach 30 Minuten und 3 Stunden). Es wird einerseits die Generierung pro- und antiinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) betrachtet, andererseits die Expression immunologischer Rezeptoren (TLR2, TLR4, TLR9), sowie die Produktion von iNOS. Die Quantifizierung der Parameter erfolgte mittels quantitativer „Real-time“-PCR (Kap. 2.4.3).

3.3.1. TNF- α - mRNA - Expression

1668-Thioat induzierte nach 30 Minuten Reperfusionzeit einen 6-fachen Anstieg der TNF- α -mRNA-Expression auf $5,645 \pm 2,083$, der gegenüber allen Gruppen außer 3 h-1668-Thioat signifikant war (Abb. 13). Die Basalexpression in der PBS-Gruppe lag nach 30 Minuten Reperfusion bei $1,004 \pm 0,1301$. Der RQ-Wert der TNF- α -Expression lag bei mit immunneutralem 1612-Thioat behandelten Mäusen bei $1,175 \pm 0,1170$, und bei mit immunsuppressivem H154-Thioat behandelten Mäusen bei $0,5196 \pm 0,07994$. Nach 3 Stunden während der Reperfusionzeit nach 1668-Thioat-Stimulation fiel die TNF- α -Expression auf einen RQ-Wert von $3,375 \pm 0,7578$ ab. Dieser Wert war im Vergleich zu den korrespondierendem 30 Minuten-Wert nicht signifikant erniedrigt. Er war jedoch tendenziell erhöht im Vergleich zu den Ergebnissen nach 3 Stunden andauernder Reperfusionzeit folgend einer Konditionierung mit PBS ($1,313 \pm 0,3187$), 1612- ($1,095 \pm 0,3876$) und H154-Thioat ($1,451 \pm 0,2566$). Es zeigte sich also nach einer kurzen Reperfusionzeit und immunstimulativer Vorbehandlung mit 1668-Thioat ein deutlich signifikanter Anstieg der TNF- α -mRNA-Expression, welcher sich im Verlauf der Reperfusion verringerte.

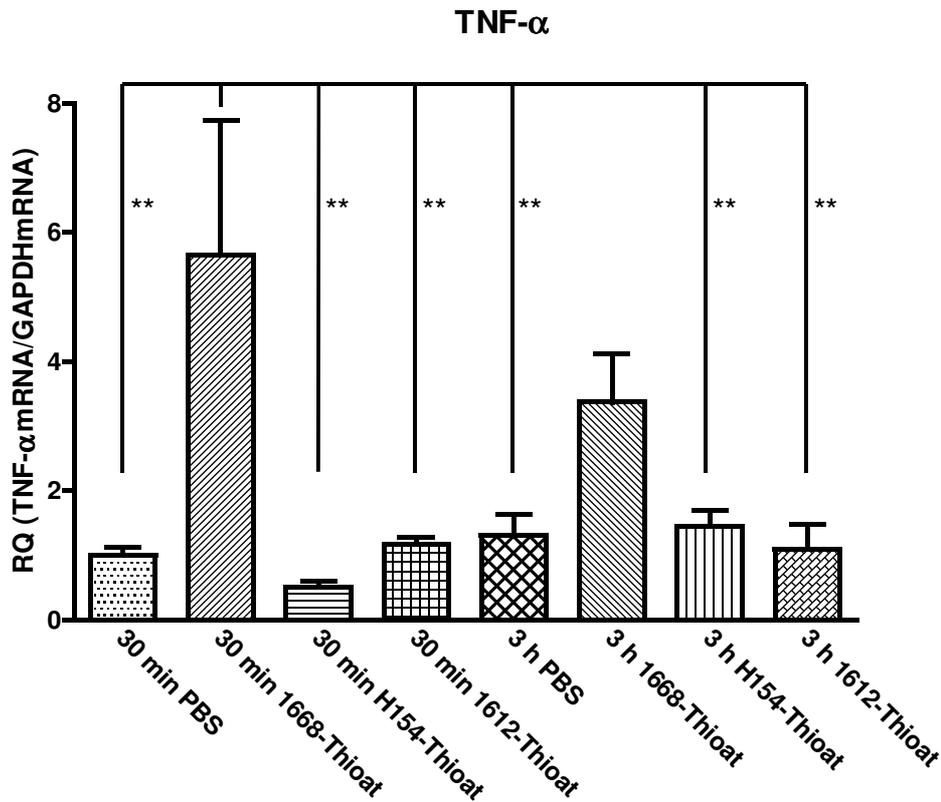


Abb. 13: mRNA-Expression von TNF- α im Herzen nach PBS-, 1668-, H154- und 1612-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 3 h 1668-Thioat $n = 4$; ** = $p < 0,01$

3.3.2. IL-1 β - mRNA - Expression

Die mRNA-Expression von IL-1 β im Herzen zeigte keine signifikanten Unterschiede der RQ-Werte nach unterschiedlichen Stimulationen sowie Reperfusionszeiten (Abb. 14). Der Befund nach 30-minütiger Reperfusionszeit lag in der Gruppe mit PBS-Gabe bei $1,477 \pm 0,2068$, das 1668-Thioat erbatte das Resultat $2,480 \pm 0,6699$. Der RQ-Wert für die Gruppe nach 1612-Thioat belief sich auf $1,294 \pm 0,2450$, der der Gruppe nach H154-Thioat auf $1,053 \pm 0,1103$. Die Expression nach 3-stündiger Reperfusionszeit zeigte sich in der Kontrollgruppe bei $2,516 \pm 0,9684$. Der RQ-Wert nach 1668-Thioat lag bei $2,141 \pm 0,3267$, nach 1612-Thioat bei $4,115 \pm 2,189$ und nach H154-Thioat bei $1,019 \pm 0,2894$.

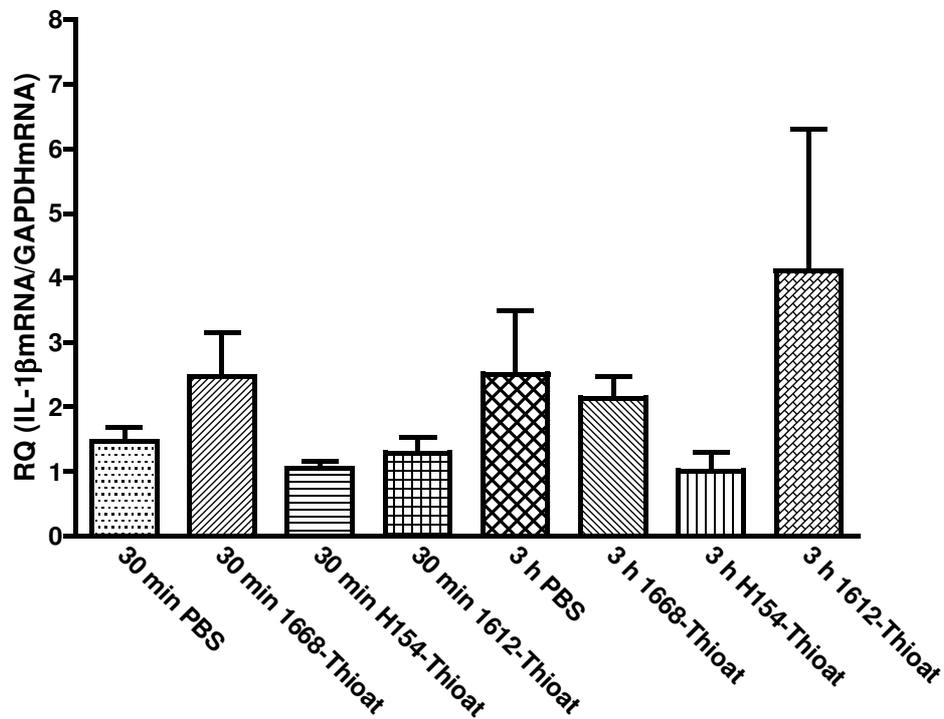
IL-1 β 

Abb. 14: mRNA-Expression von IL-1 β im Herzen im Herzen nach PBS-, 1668-, H154- und 1612-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 3 h 1668-Thioat $n = 4$

3.3.3. IL-6 - mRNA - Expression

Die IL-6-mRNA-Expression verhielt sich ähnlich der TNF- α -mRNA-Expression (Abb. 15). Das 1668-Thioat induziert in 30 Minuten Reperfusion einen Anstieg des IL-6 auf $3,776 \pm 1,188$, der zu allen anderen Werten, die zur gleichen Zeit gemessen wurden, signifikant war. Die IL-6-mRNA-Expression war nach 30-minütiger Reperfusion nach PBS-Vorbehandlung $1,216 \pm 0,1652$, nach 1612-Thioat-Stimulation und 30 Minuten Reperfusion $1,250 \pm 0,1908$ und nach H154-Thioat und 30 Minuten Reperfusion $0,7179 \pm 0,1361$. Zudem war der initiale IL-6-Anstieg nach 1668-Thioat signifikant erhöht im Vergleich zu den Werten, die nach 3 Stunden Reperfusion in der PBS-Gruppe ($1,216 \pm 0,3015$) und in der H154-Thioat-Gruppe ($1,114 \pm 0,3226$) erreicht wurden. Nach 3

Stunden Reperfusion fiel die durch 1668-Thioat angehobene IL-6-mRNA-Expression auf $2,376 \pm 0,3129$ ab. Zwischen den einzelnen präkonditionierenden Substanzen zeigten sich nach dieser längeren Reperfusion keine signifikanten Unterschiede mehr, die Expression nach 1612-Thioat liegt bei $2,053 \pm 0,8360$.

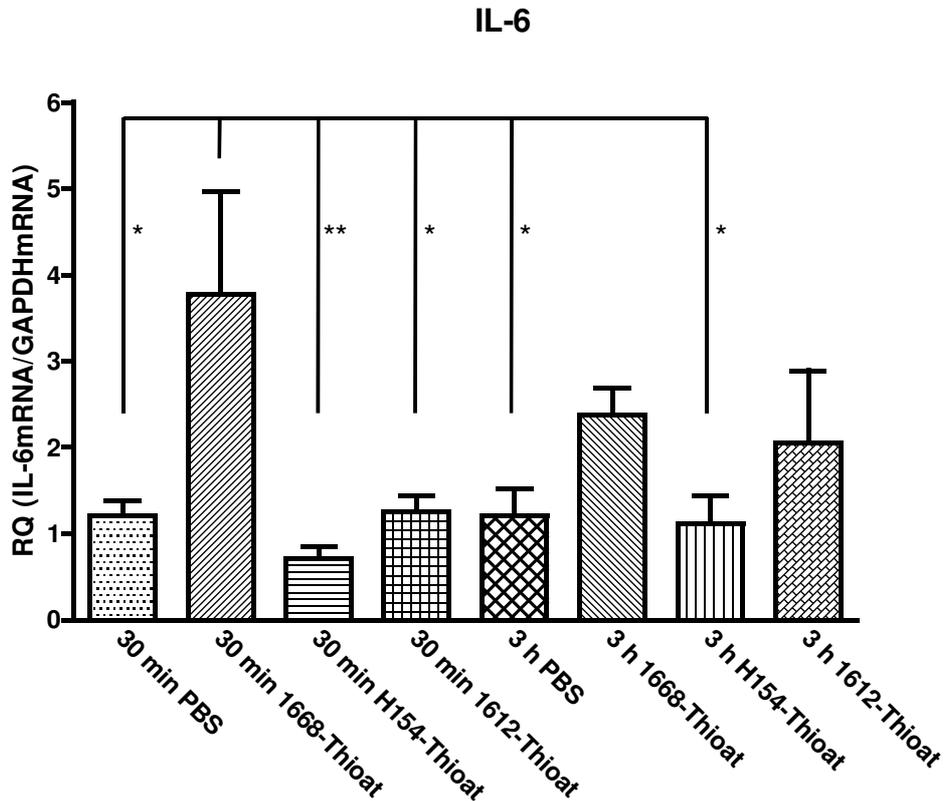


Abb. 15: mRNA-Expression von IL-6 im Herzen nach PBS-, 1668-, H154- und 1612-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 30 min 1668-Thioat $n = 4$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$

3.3.4. IL-10 - mRNA - Expression

Die Quantifizierung der antiinflammatorischen IL-10-mRNA-Expression führte zu einem sehr eindeutigen Resultat (Abb. 16). Nach 30-minütiger Reperfuionszeit präsentierte sich ein tendenzieller Anstieg der Expression nach immunstimulativer Vorbehandlung mit 1668-Thioat. Der RQ-Wert lag bei $4,363 \pm 1,223$, um den Faktor 6,5 höher verglichen mit der mRNA-Expression nach PBS-Gabe, die bei $0,6784 \pm 0,2666$

verharrte. Nach Stimulation mit 1612-Thioat wurde ein RQ-Wert von $0,4434 \pm 0,05339$ erreicht, nach H154-Thioat einer von $0,2880 \pm 0,09564$. Nach 3-stündiger Reperfusionzeit demaskierte sich der durch das 1668-Thioat induzierte Anstieg der IL-10-mRNA-Expression mit einem Wert von $20,06 \pm 4,783$. Dieser war gegenüber alle anderen Gruppen hochsignifikant erhöht. Die mRNA-Expression nach PBS-Gabe hatte einen Wert von $1,241 \pm 0,3798$, nach 1612-Thioat-Gabe lag der RQ-Wert bei $1,096 \pm 0,3955$, nach H154-Gabe bei $1,096 \pm 0,2270$.

Es kam also nur nach Vorbehandlung mit 1668-Thioat zeitlich zu einer ansteigenden Expression des antiinflammatorischen IL-10.

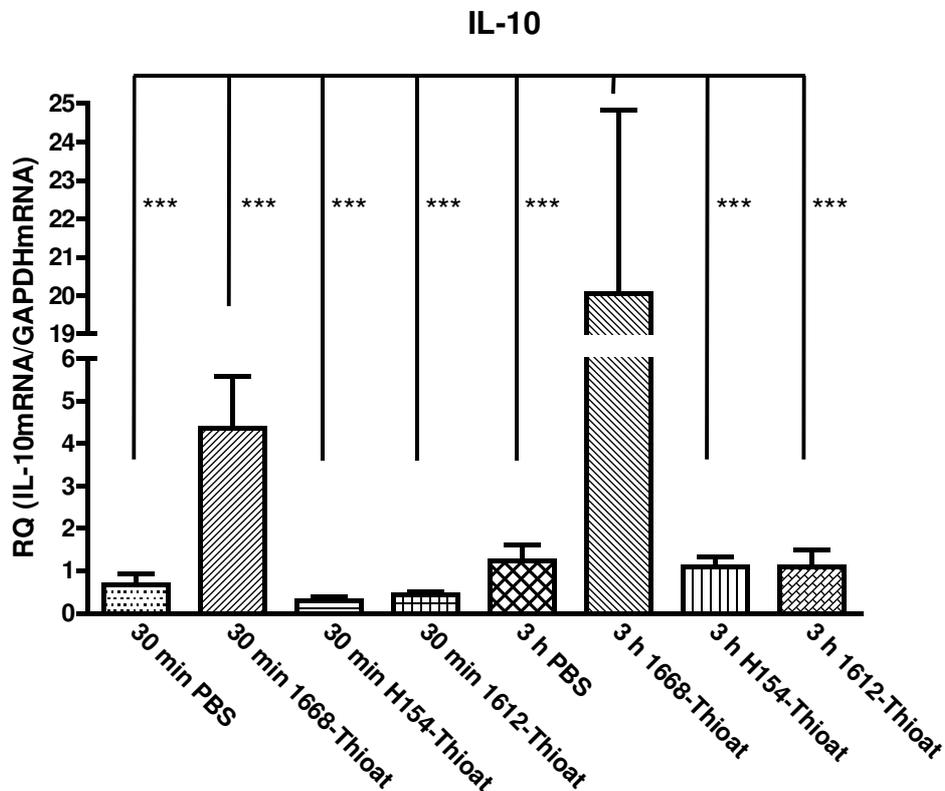


Abb. 16: mRNA-Expression von IL-10 im Herzen nach PBS-, 1668-, H154- und 1612-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 30 min H154- und 1668-Thioat $n = 4$; *** = $p < 0,001$

3.3.5. TLR2 - mRNA - Expression

Die Stimulation mit 1668-Thioat und 30 Minuten Reperfusion bewirkte einen tendenziellen Anstieg der Expression von TLR2 im Vergleich zu PBS, die bei $0,9558 \pm 0,1468$ lag, auf $1,572 \pm 0,6515$ (Abb. 17). Durch eine 1612- sowie H154-Thioat-Vorbehandlung erreichten die RQ-Werte nach 30 Minuten $0,3764 \pm 0,07462$ und $0,6898 \pm 0,1143$. Eine 3-stündige Reperfusion zeigt einen Anstieg der TLR2-mRNA-Expression auf $2,259 \pm 0,5684$, die gegenüber folgenden Behandlungen signifikant erhöht war: 30 Minuten 1612- und H154-Thioat, sowie 3 Stunden 1612-Thioat, der bei $0,5010 \pm 0,1487$ lag. Nur tendenziell erhöht war der Wert nach 3 Stunden 1668-Thioat gegenüber der mRNA-Expression nach PBS-Gabe von $1,227 \pm 0,3197$ und gegenüber 3 Stunden H154-Thioat von $1,317 \pm 0,2510$.

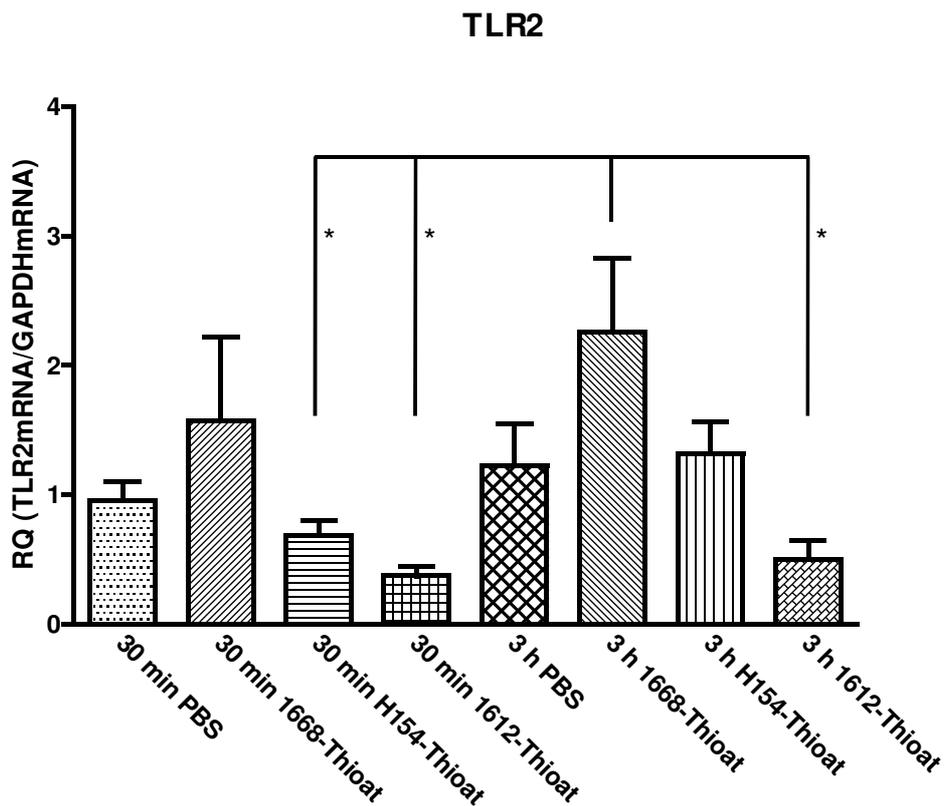


Abb. 17: mRNA-Expression von TLR2 im Herzen nach PBS-, 1668-, H154- und 1612-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 3 h 1668-Thioat $n = 4$; * = $p < 0,05$

3.3.6 TLR4 - mRNA - Expression

Die TLR4-mRNA-Expression veränderte sich durch die Stimulanzen zu keinem der gewählten Untersuchungszeitpunkte (Abb. 18). Die mRNA-Expression nach PBS-Gabe lag nach 30-minütiger Reperfusionzeit bei $1,025 \pm 0,05169$, nach 3-stündiger Reperfusionzeit bei $0,9488 \pm 0,1,50$. Die Immunstimulation mittels 1668-Thioat führte nach 30 Minuten zu einem RQ-Wert von $1,222 \pm 0,2756$, nach 3 Stunden zu einem von $1,297 \pm 0,2513$. Auch die Ergebnisse nach immunneutraler Stimulation unter 1612-Thioat divergierten nicht vom Ausgangswert, nach 30 Minuten resultieren $1,104 \pm 0,09106$, nach 3 Stunden $0,755 \pm 0,1894$. Letztlich zeigte auch eine immunsuppressive H154-Thioat-Gabe keine Auswirkungen auf die Expression. Nach 30 Minuten lag der RQ-Wert bei $0,9592 \pm 0,2064$, nach 3 Stunden bei $0,7614 \pm 0,05312$.

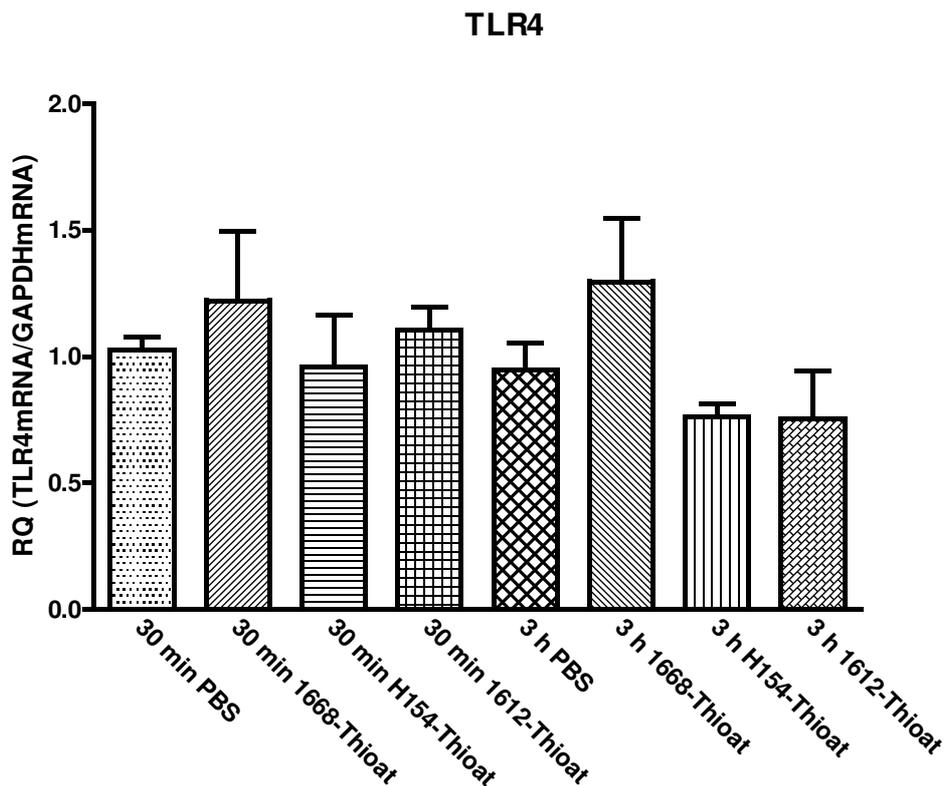


Abb. 18: mRNA-Expression von TLR4 im Herzen nach PBS-, 1668-, H154- und 1612-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 3 h 1668-Thioat $n = 4$

3.3.7. TLR9 - mRNA - Expression

Die TLR9-mRNA-Expression lag bei PBS-Mäusen nach einer 30-minütigen Reperfusionphase bei $0,5104 \pm 0,1475$ und steigerte sich durch eine gleichlange 1668-Thioat-Behandlung auf $1,629 \pm 0,4775$ (Abb. 19). Eine 1612- sowie H154-Thioat-Vorbehandlung führten 30 Minuten nach Ischämie zu RQ-Werten von $0,4896 \pm 0,06$ und $0,3116 \pm 0,08$. Nach 3 Stunden Reperfusionphase stieg die TLR9 mRNA-Expression nach 1668-Thioat-Stimulation auf einen RQ-Wert von $6,993 \pm 1,040$, welcher hoch signifikant ($p < 0,001$) über allen anderen Werten lag. Er war um den Faktor 5 größer als die Expression nach 3 Stunden in der PBS-Gruppe, die $1,466 \pm 0,2071$ betrug. Die Vorbehandlungen mit 1612- und H154-Thioat erreichten Werte von $1,787 \pm 0,41$ und $2.079 \pm 0,6370$.

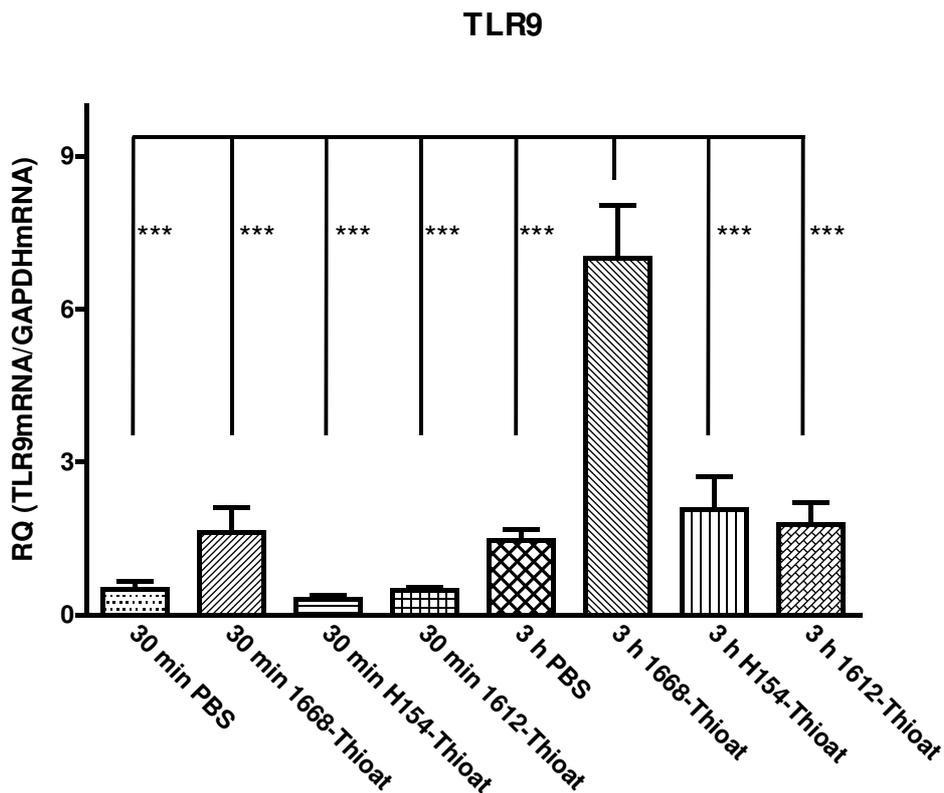


Abb. 19: mRNA-Expression von TLR9 im Herzen nach PBS-, 1668-, H154- und 1612-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 3 h 1668-Thioat $n = 4$; *** = $p < 0,001$

3.3.8. iNOS - mRNA - Expression

Die iNOS-mRNA-Expression war nach 1668-Thioat-Stimulation und 30-minütiger Reperfusion mit einem RQ-Wert von $1,635 \pm 0,9172$ tendenziell höher als die anderen Werte zu dieser Zeit, PBS ($0,7386 \pm 0,1163$), 1612-Thioat- ($0,86 \pm 0,1096$) und H154-Thioat-Stimulation ($0,6984 \pm 0,09$) (Abb. 20). Nach einer 3 Stunden andauernden Reperfusionsdauer wurde dieser Trend noch deutlicher, erreichte aber ebenfalls nicht das Signifikanzniveau. Das Ergebnis nach 1668-Thioat war mit $2,231 \pm 0,8124$ fast doppelt so hoch wie die mRNA-Expression in der PBS- ($1,18 \pm 0,18$) und der 1612-Thioat-Gruppe ($1,238 \pm 0,14$). Die H154-Thioat-Gruppe ($0,8856 \pm 0,1596$) wurde sogar noch deutlicher übertroffen.

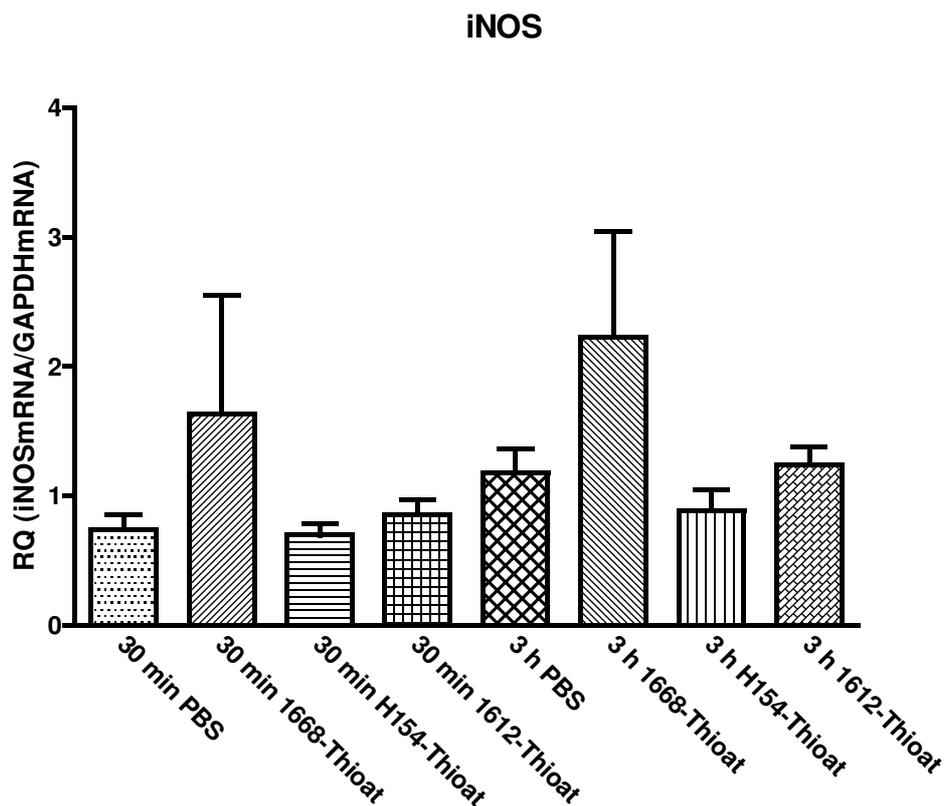


Abb. 20: mRNA-Expression von iNOS im Herzen nach PBS-, 1668-, H154- und 1612-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 3 h 1668-Thioat $n = 4$

3.4. Ergebnisse der quantitativen „Real-time“-PCR bei TLR9-D-Mäusen

Die folgenden Ergebnisse beschreiben nun in einer *in-vivo*-Kinetik die differentielle Mediatorantwort bei TLR9-defizienten Mäusen abhängig von Immunstimulation und Dauer der Reperfusion. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die in Kapitel 3.3 dargestellten signifikanten Unterschiede nach Applikation von bestimmten CpG-ODN tatsächlich TLR-9 vermittelt sind. Die die Unterschiede zwischen der PBS- und der 1668-Thioat-Gruppe als besonders relevant angesehen wurden und auch sehr groß waren, werden hier nur diese beiden betrachtet. Es wurden wieder einerseits die Generierung pro- und antiinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) untersucht, des Weiteren die Expression immunologischer Rezeptoren (TLR2, TLR4, TLR9), sowie die Produktion von iNOS.

3.4.1 Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine

Für die proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 ergaben sich zwischen den beiden betrachteten Gruppen mit PBS- und 1668-Thioat Vorbehandlung bei den TLR9-defizienten Tieren keine Unterschiede (Tabelle 3 und Abb. 21-23).

| | PBS | 1668-Thioat |
|---------------------------|--------------------|--------------------|
| TNF α , 30 Minuten | 1,453 \pm 0,2181 | 1,777 \pm 0,1176 |
| TNF α , 3 Stunden | 2,637 \pm 0,5274 | 2,633 \pm 0,4018 |
| IL-1 β , 30 Minuten | 1,253 \pm 0,2549 | 1,179 \pm 0,2270 |
| IL-1 β , 3 Stunden | 1,766 \pm 0,5568 | 2,312 \pm 0,3893 |
| IL-6, 30 Minuten | 1,290 \pm 0,2236 | 1,759 \pm 0,2311 |
| IL-6, 3 Stunden | 1,542 \pm 0,4961 | 1,776 \pm 0,0716 |
| IL-10, 30 Minuten | 2,483 \pm 0,4181 | 2,983 \pm 0,3422 |
| IL-10, 3 Stunden | 4,017 \pm 0,7500 | 4,409 \pm 0,3314 |

Tab. 3: mRNA-Expression der Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-10 in TLR9-D nach Stimulation mit PBS oder 1668-Thioat und je 30 min bzw. 3 h Reperfusion

Für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 zeigte sich eine Signifikanz im Vergleich zwischen 30 min PBS und 3 h 1668-Thioat, die RQ-Werte lagen bei $2,483 \pm 0,4181$ und $4,409 \pm 0,3314$. Das 3 h PBS Ergebnis belief sich auf $4,017 \pm 0,7500$, das von 30 min 1668-Thioat auf $2,983 \pm 0,3422$ (Abb. 24).

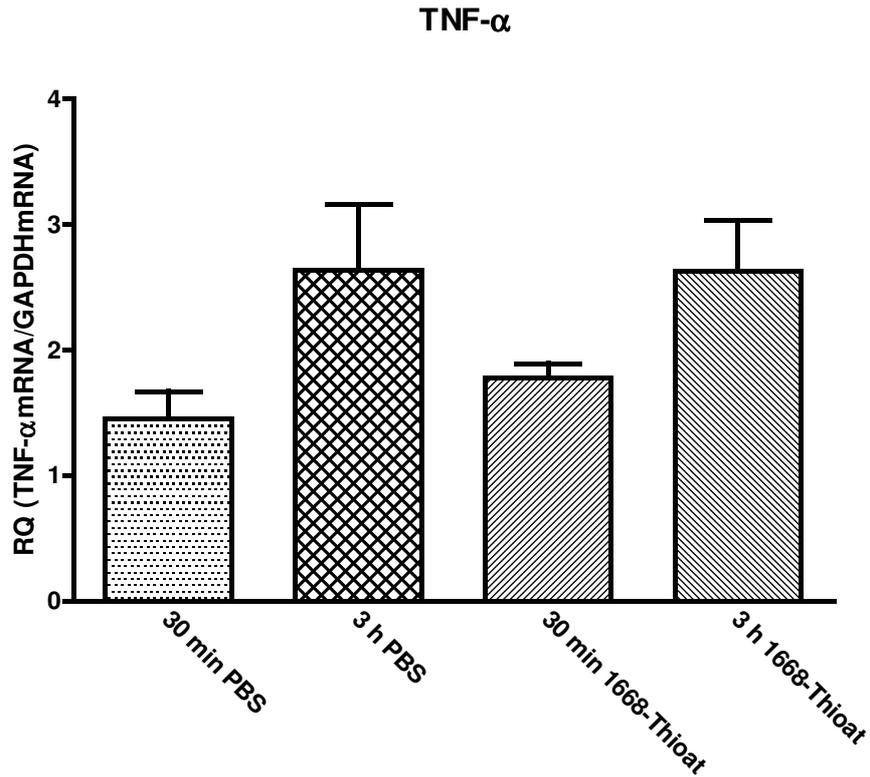


Abb. 21: mRNA-Expression von TNF- α im TLR9-D Herzen nach PBS- und 1668-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 30 min 1668-Thioat $n = 6$

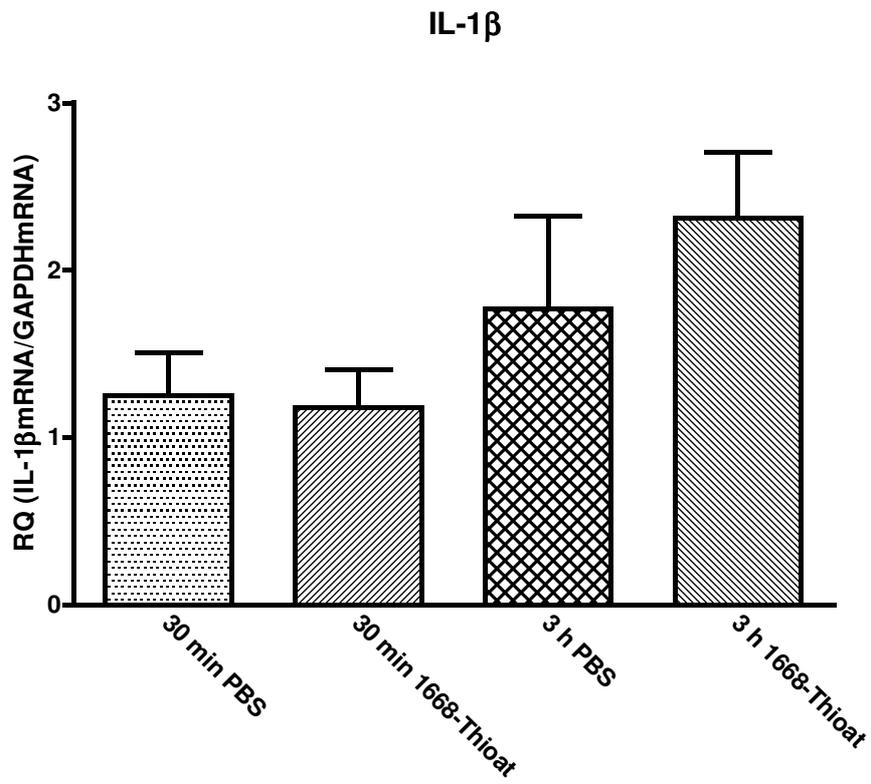


Abb. 22: mRNA-Expression von IL-1 β im TLR9-D Herzen nach PBS- und 1668-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 30 min 1668-Thioat $n = 6$

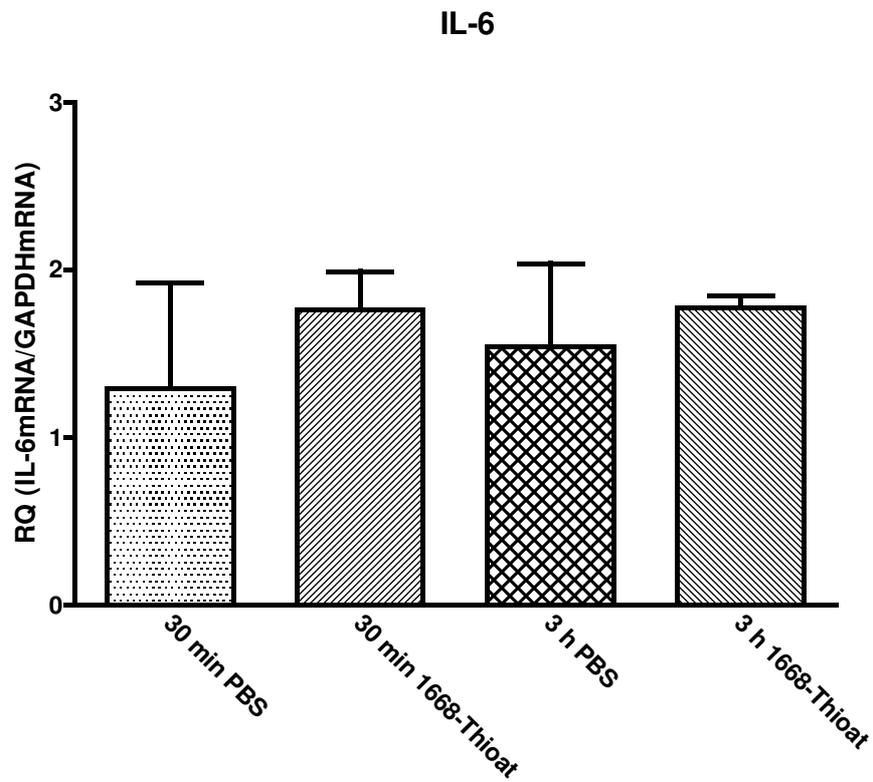


Abb. 23: *mRNA-Expression von IL-6 im TLR9-D Herzen nach PBS- und 1668-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; n = 5, außer 30 min 1668-Thioat n = 6*

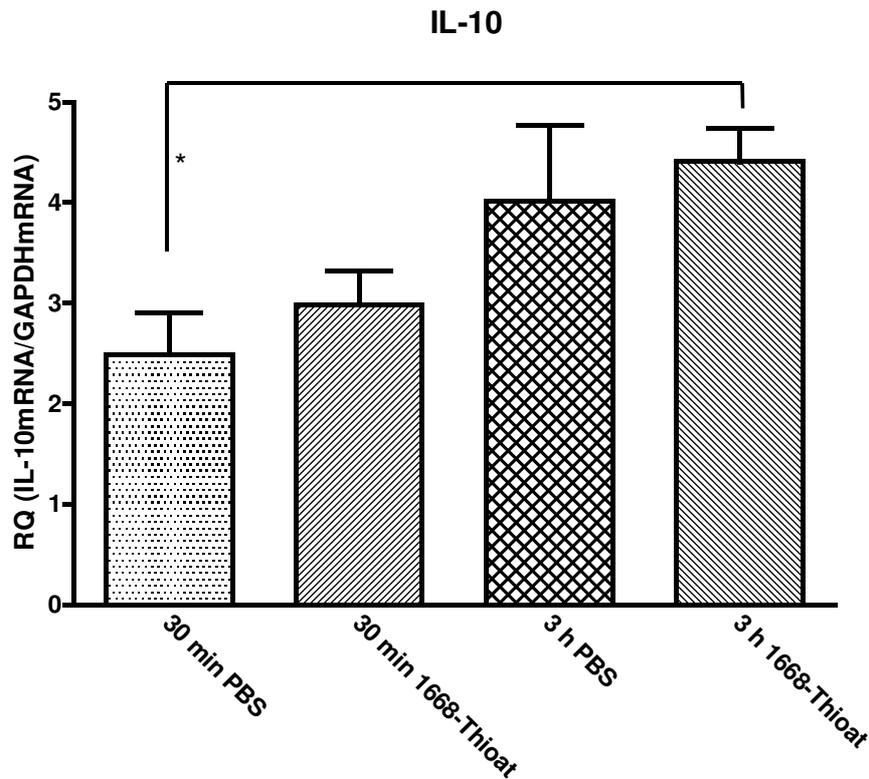


Abb. 24: mRNA-Expression von IL-10 im TLR9-D Herzen nach PBS- und 1668-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 30 min 1668-Thioat $n = 6$; * = $p < 0,05$

3.4.2 Expression der TLR2-, TLR4- und TLR9- mRNA

Auch die mRNA-Expression der TLRs wurde in den Herzen der TLR9-defizienten Mäusen unter unseren Bedingungen nicht beeinflusst (Abb. 25-27). Daher werden auch hier die genauen Messdaten in einer Tabelle zusammengefasst (Tab. 4).

| | PBS | 1668-Thioat |
|------------------|-----------------|-----------------|
| TLR2, 30 Minuten | 1,207 ± 0,1143 | 1,385 ± 0,0941 |
| TLR2, 3 Stunden | 1,293 ± 0,2190 | 1,802 ± 0,2140 |
| TLR4, 30 Minuten | 0,8639 ± 0,0363 | 0,9382 ± 0,0415 |
| TLR4, 3 Stunden | 0,9604 ± 0,1214 | 0,9510 ± 0,0858 |
| TLR9, 30 Minuten | 1,037 ± 0,1218 | 1,446 ± 0,1074 |
| TLR9, 3 Stunden | 1,162 ± 0,1152 | 1,143 ± 0,0604 |

Tab. 4: mRNA-Expression der TLR2, TLR4 und TLR9 bei TLR9-D nach Stimulation mit PBS oder 1668-Thioat und je 30 min bzw. 3 h Reperfusion

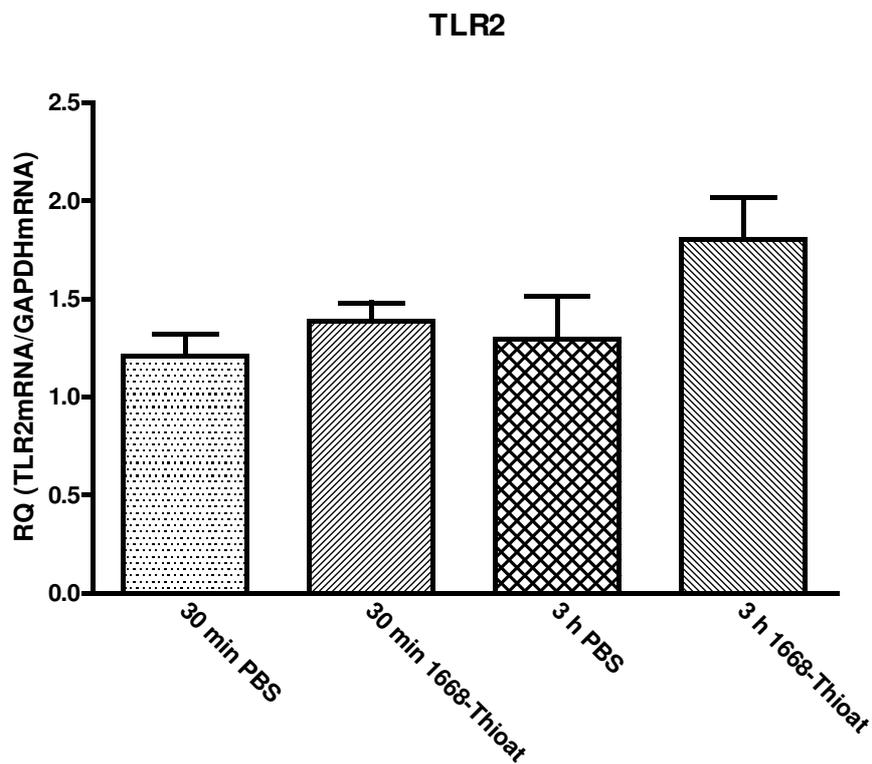


Abb. 25: mRNA-Expression von TLR2 im TLR9-D Herzen nach PBS- und 1668-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; n = 5, außer 30 min 1668-Thioat n = 6

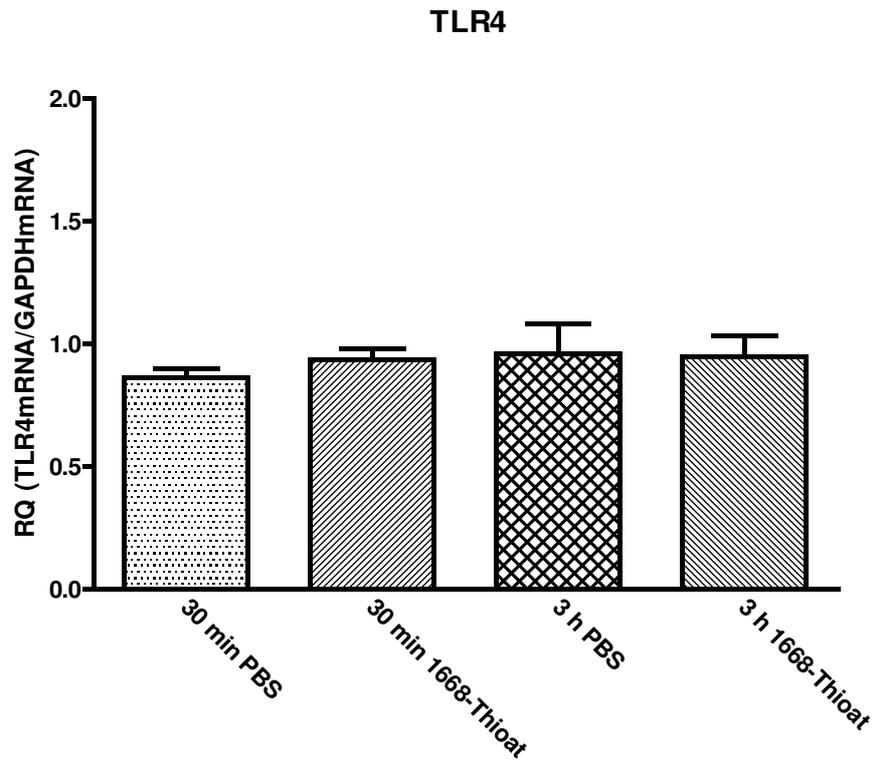


Abb. 26: mRNA-Expression von TLR4 im TLR9-D Herzen nach PBS- und 1668-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 30 min 1668-Thioat $n = 6$

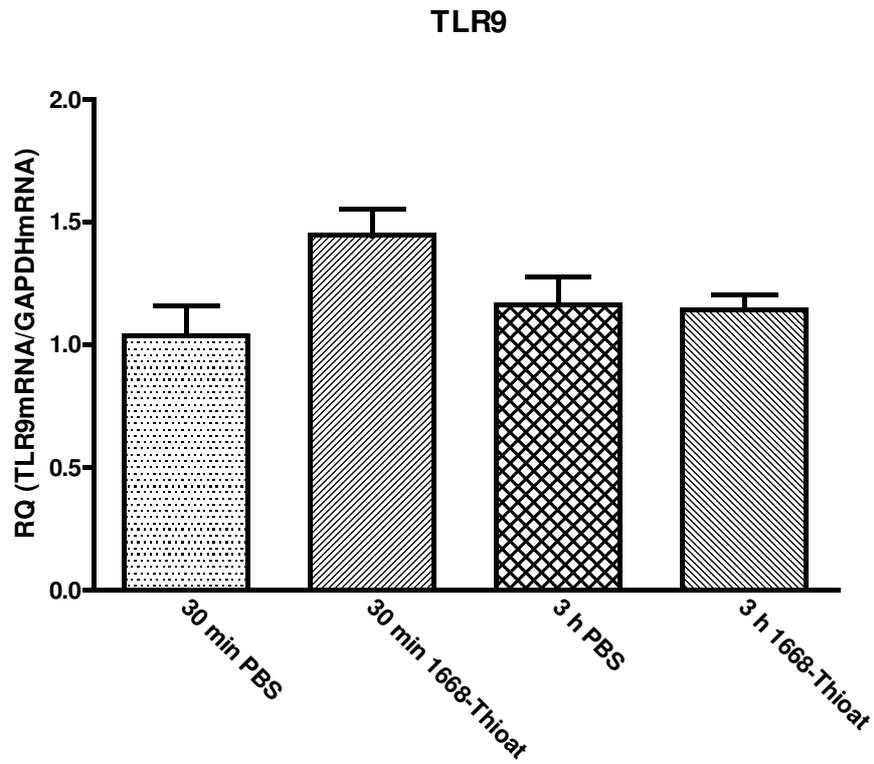


Abb. 27: mRNA-Expression von TLR9 im TLR9-D Herzen nach PBS- und 1668-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 30 min 1668-Thioat $n = 6$

3.4.3 Expression der iNOS - mRNA

Die Expression von iNOS variierte nicht nach Applikation von 1668-Thioat bei TLR9-D Mäusen (Abb. 28). Die Resultate nach PBS-Gabe lagen bei $0,9895 \pm 0,0955$ nach 30 Minuten Reperfusion und bei $0,7898 \pm 0,0898$ nach 3 Stunden. Nach 1668-Thioat-Gabe lagen die Werte nach 30 Minuten bei $1,085 \pm 0,0399$ und nach 3 Stunden bei $0,9272 \pm 0,0390$.

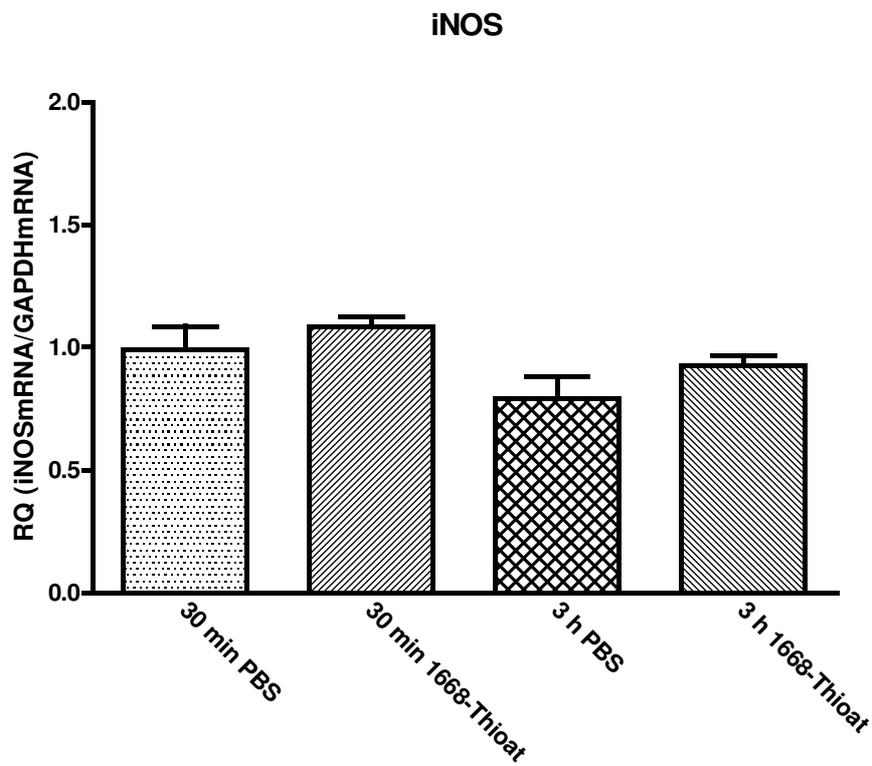


Abb. 28: mRNA-Expression von iNOS im TLR9-D Herzen nach PBS- und 1668-Thioat-Stimulation und jeweils 30 min und 3 h Reperfusion; $n = 5$, außer 30 min 1668-Thioat $n = 6$

4 Diskussion

Diese Arbeit untersucht die differentielle Mediatorantwort in der postischämischen Reperfusionphase nach CpG-ODN-Stimulation.

4.1 Mausmodell und I/R-Protokoll

Der Auswahl des Tiermodells liegen verschiedene Faktoren zugrunde. Eine Erforschung der pathophysiologischen Vorgänge, die einen wichtigen Teil der Schäden durch Ischämie und Reperfusion beim Myokardinfarkt ausmachen, ist essentiell zur Verbesserung der bestehenden Therapie und der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien. Eine Verwendung von Tierversuchen ist hier unerlässlich. Das Mausmodell wurde ausgewählt, da es sich auf Grund wissenschaftlicher, ethischer und wirtschaftlicher Kriterien sowie auf Grund der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse als geeignet erwiesen hat. Beim Einsatz von gendefizienten Tieren ist dieses Modell zudem zwingend erforderlich. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse eines Tiermodells auf den Menschen ist grundsätzlich nicht in vollem Umfang möglich. Muders und Elsner stellten bereits im Jahr 2000 Gründe, wie das zumeist junge Alter der Tiere, die plötzliche chirurgische und pharmakologische Intervention und die monofaktorielle Genese einer Erkrankung als Nachteile vieler Tiermodelle heraus. Der in dieser Arbeit behandelte Myokardinfarkt und die zugrunde liegende Arteriosklerose sind schleichende Entwicklungen, die meist im fortgeschrittenen Alter auftreten und mit anderen Erkrankungen – Übergewicht und Diabetes mellitus – gehäuft einhergehen. Auch diese vergesellschafteten Erkrankungen haben einen nachgewiesenen Einfluss auf das immunologische System. Dennoch hat sich das Mausmodell in unserer Arbeitsgruppe bewährt (Stapel, 2006).

Das Ischämie/Reperfusion-Modell wird in Anlehnung an das „closed chest“-Modell nach Nossuli angewandt und wurde nur geringfügig verändert (Nossuli et al., 2000; Osterkamp, 2006). Die Reproduzierbarkeit ist entsprechend der in Kapitel 3.2 dargestellten Ergebnisse sehr gut. Die zeitliche Trennung der Initialoperation und des I/R-Ereignis von 5-7 Tagen schließt einen Einfluss des operativen Traumas und der einhergehenden Inflammation weitestgehend aus. Es ist so möglich die Auswirkung der

verschiedenen Vorbehandlungen gesondert zu betrachten und zu vergleichen. Des Weiteren bietet das „closed chest“-Modell den großen Vorteil die einstündige Ischämie unter einer Sedierung mit Propofol® durchführen zu können. Eine tiefe Narkose mit einem inhalativen Narkotikum wie bei der Initialoperation mit Isofluran ist nicht nötig. Dies ist insbesondere wichtig, da verschiedene Arbeitsgruppen den präkonditionierenden Einfluss volatiler Anästhetika nachgewiesen haben (Belhomme et al., 1999; Cason et al., 1997; Kato und Foex, 2002; Ludwig et al., 2004). Propofol® dagegen ist ein gut verträgliches Injektionsnarkotikum, welches nur einen geringen Einfluss auf die Infarktgröße hat (Cope et al., 1997) und erst in sehr hohen Dosen kardioprotektive Effekte *in-vitro* gezeigt hat (Kato und Foex, 2002; Ko et al., 1997; Kokita et al., 1998).

Nachdem für eine Präkonditionierung mit 1668-Thioat (siehe Kapitel 1.5) in einem I/R-Protokoll nach 24 Stunden eine signifikante Kardioprotektion nachgewiesen werden konnte (Gölz, 2009; Markowski, 2007), erfolgte in dieser Arbeit die Quantifizierung der pro- und antiinflammatorischen Mediatorantwort in einer *in-vivo* Zeitkinetik. Es wurde der Effekt unterschiedlicher Substanzen in der postischämischen Reperfusionphase verglichen. Wie in der Einleitung in Kapitel 1.5 erläutert, wurde das 1668-Thioat, welches über die CpG-Motive mit dem TLR9 proinflammatorisch interagiert, verwendet (Hemmi et al., 2000; Knuefermann et al., 2008; Krieg et al., 2000). Zudem erfolgte die Kontrolle mittels zweier Nicht-CpG-ODNs, nämlich H154- und 1612-Thioat. Diese Auswahl erfolgte, wie auch schon in der Arbeit von Frau Gölz 2009 dargelegt, in Anlehnung an eine Studie von Yamada et al., die eine supprimierende Wirkung bestimmter ODNs ohne CpG-Motive auf die CpG-induzierte Entzündungsreaktion in der Lunge von Mäusen hatten nachweisen können (Yamada et al., 2004). Eine ganz aktuelle Studie von Meng et al., weist die Wirksamkeit einer neuen Klasse von TLR9-Agonisten nach: 3' modifizierte CpG-ODNs, die eine Phosphodiesterase-Struktur aufweisen, im Gegensatz zu den bisher eingesetzten ODNs mit einer Phosphorothioat-Struktur (Meng et al., 2011). Diese sollen, nachdem sie Serum-Nuklease-resistent konzipiert wurden, als noch wirksameres TLR9-Stimulanz fungieren. Nachteil dieser Studie ist jedoch, dass der Nachweis einer TLR9-Interaktion nur *in-vitro* erfolgte und nicht *in-vivo*. Die direkte Negativkontrolle erfolgt in der aktuell vorgelegten Arbeit mit der Kochsalz-Lösung PBS.

Neben den in Kapitel 1.6 beschriebenen Sepsis-relevanten Zytokinen und iNOS wurden des Weiteren die PRRs TLR2, 4 und 9 bestimmt. Die Quantifizierung der Rezeptor-mRNA erfolgte ebenfalls in Abhängigkeit der verschiedenen Stimulanzen. Knuefermann et al. hatten bereits 2008 die Zunahme der TLR9-mRNA-Expression nach einer 1668-Thioat Behandlung nachgewiesen. Ob der erneute Reiz durch eine I/R und ob Nicht-CpG-ODNs in diesem Protokoll Auswirkungen zeigen, wurde in der vorliegenden Studie untersucht. Bekannt ist, dass auch endogene Liganden zu einer Aktivierung der PRRs führen können. ROS (Frantz et al., 2001), Fibrinogen (Smiley et al., 2001), Hyaluronsäure (Termeer et al., 2002) und Fibronectin (Okamura et al., 2001) sind Substanzen, die bei einem I/R-Schaden freigesetzt werden können und Agonisten verschiedener PRRs darstellen. Die Expression der drei TLRs wurde untersucht, um zu testen, ob Expressionsunterschiede hier zu einer Erklärung einer kardioprotektiven Wirkung der Präkonditionierung mit 1668-Thioat beitragen könnten.

Als Zeitpunkte der Organentnahme wurden 30 Minuten und 3 Stunden gewählt. Der frühe Zeitpunkt, da bekannt ist, dass die inflammatorische Reaktion auf Reize, wie einen I/R-Schaden, ausgesprochen schnell zu einer Mediatorausschüttung führt. Die Daten der Arbeitsgruppe hatten nach 1-2 Stunden das Maximum der myokardialen Proteinexpression nach alleiniger CpG-ODN Stimulation demonstriert (Knuefermann et al., 2008). Die de-novo mRNA-Synthese wird dann im Verlauf von 3 Stunden beurteilt.

Um die tatsächliche Abhängigkeit der resultierenden Mediatorantwort vom TLR9-Signalweg nach 1668-Thioat Behandlung zu beweisen, wurden die in Kapitel 2 beschriebenen Versuche in einem „Knock out“-Modell vorgenommen. Hier wurde das besondere Augenmerk auf den Ausschluss eines CpG-ODN-Effekt gelegt, die Versuche wurden daher nicht mit H154- oder 1612-Thioat durchgeführt.

4.2 Mortalitätsraten

Die Mortalitätsraten aus Tabelle 2 sind im Einklang mit denen anderer Studien (Markowski, 2007). Nach einer Behandlung mit dem proinflammatorischen 1668-Thioat zeigt sich bei einer Dosierung von 5 nmol eine deutlich höhere Mortalität als nach der Applikation einer Nicht-CpG-ODNs beziehungsweise des PBS. Dies geht einher mit der durch Knuefermann et al. 2008 nachgewiesenen Steigerung der TNF- α und IL-1 β -

mRNA-Expression und den in der selben Studie festgestellten klinischen Zeichen eines Schock-ähnlichen Zustandes, wie Lethargie und Diarrhoe zwei Stunden nach Applikation. Vorangegangene Studien hatten für die genannten Zytokine die Entwicklung einer Sepsis sowie einer septischen Kardiomyopathie nachgewiesen (Cain et al., 1999; Kumar et al., 1996; Parker et al. 1984; Werdan und Müller-Werdan, 1996). Andere Daten zeigten sich bei Frau Gölz, sie fand 2009 keinen Unterschied der Mortalitätsraten zwischen mit PBS behandelten Mäusen und mit 5 nmol CpG-ODN behandelten Mäusen.

4.3 Analyse der differentiellen Zytokin- und iNOS-Antwort

Eine Stimulation mit einem CpG-ODN führt im Vergleich zu einer PBS-Vorbehandlung in der postischämischen Reperfusionphase zu einer signifikanten Zunahme der mRNA-Expression von TNF- α und IL-6. Diese Abweichung der proinflammatorischen Antwort auf einen I/R-Schaden ist in der früher Reperfusionphase besonders deutlich, fällt im Verlauf von 3 Stunden Reperfusion wieder ab, ist jedoch auch zu diesem Zeitpunkt noch erhöht im Vergleich zu PBS. Ein signifikanter Anstieg des ebenfalls proinflammatorischen Zytokins IL-1 β konnte durch eine CpG-Präkondition vor dem I/R-Protokolls nicht erreicht werden. Dies ist entgegen der Erwartungen, denen die Arbeit von Knuefermann zugrunde liegt (Knuefermann et al., 2008). Hier hatte die reine Stimulation die hoch signifikante Expressionszunahme von sowohl TNF- α und IL-6 als auch von IL-1 β bewirkt. Eine Erklärung könnten die unterschiedlichen CpG-Konzentrationen sein. Knuefermann et al. verwendeten 20 nmol pro Maus, eine Dosierung, die eine deutlich stärkere septische Reaktion und damit auch Mortalität induziert, als die in dieser Studie applizierten 5 nmol. Der Mediator IL-1 β wird in dieser Arbeit nicht durch eine Präkonditionierung beeinflusst, sondern sein Anstieg war entsprechend des Wertes der Kontrollgruppe PBS dem myokardialen I/R-Schaden zuzuschreiben. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von denen, die durch Hiasa et al., 2001 publiziert worden sind. Hier hatte sich nach einer Präkonditionierung mit IP (ischämischer Präkonditionierung) bzw. mit LPS und anschließender I/R eine Reduktion der mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine, und zwar sowohl von TNF- α und IL-6 als auch von IL-1 β gezeigt. Die Arbeitsgruppe benannte die reduzierte inflammatorische Antwort als

Ursache für den resultierenden, geringeren Myokardinfarkt. Diese Resultate sind jedoch nur eingeschränkt vergleichbar mit den in meiner Arbeit präsentierten, da die stimulierenden Substanzen unterschiedlich sind und über unterschiedliche Mechanismen zur Wirkung gelangen. Die möglichen immunsuppressiven Wirkungen des H154-Thioat ließen sich in diesem I/R-Protokoll nicht nachweisen (Yamada et al., 2004).

Ebenso abweichend von den Daten nach reiner Stimulation sind die Ergebnisse der iNOS-mRNA-Expression in diesem I/R-Protokoll (Knuefermann et al., 2008). Eine Präkonditionierung mit CpG-ODN oder mit einem Nicht-CpG-ODN bewirkt keine von der Kontrollgruppe abweichenden Resultate nach I/R. Die iNOS scheint nach einem Myokardinfarkt nur eine geringere Rolle zu spielen, als bei einer systemischen Inflammation, wie einer Sepsis. Dies bezüglich sollen die Ergebnisse, einer zur Zeit parallel angefertigten Arbeit weitere Erkenntnisse bringen. Herr Markowski registriert die gleichen Marker in der post-Stimulation- bzw. prä-Infarktphase, der dann mögliche Vergleich wird zeigen, ob eine Ischämie und der damit einhergehende Myozytenschaden überhaupt zu einem Anstieg von iNOS führt.

Eine 1668-Thioat-Behandlung und anschließende I/R führt des Weiteren – nachdem hier nach 30 Minuten ein signifikanter Anstieg der proinflammatorischen Marker nachgewiesen wurde – zu einer hoch signifikanten Zunahme des IL-10 im verzögerten Verlauf nach 3 Stunden Reperfusion. Eine Präkonditionierung mit einer immuno-stimulativen Substanz, wie dem 1668-Thioat führt also zu einer deutlichen Hochregulation der antiinflammatorischen IL-10-mRNA-Expression nach erneutem Reiz, nicht aber eine Präkonditionierung mit den Nicht-CpG-ODNs. Ähnliches wurde im Jahr 2000 durch Ogata et al. beschrieben. Während abdominalen Operationen – also einem schweren systemischen Reiz – registrierten sie die Plasmawerte von IL-10 und fanden einen signifikanten Anstieg dieses Zytokins. In diesem Zusammenhang wurde ferner eine transiente Hyporesponsivität auf eine Endotoxinreizung mit LPS gezeigt, welche die Arbeitsgruppe auf die antiinflammatorischen Wirkung von IL-10 zurückführte (Ogata et al., 2000).

4.4 Analyse der TLR2, 4- und der TLR9-Antwort

Die mRNA-Expression des TLR2 zeigt einen tendenziellen Anstieg nach einer Präkonditionierung mit 1668-Thioat, der nach einer Reperfusionphase von 3 Stunden signifikant im Vergleich zu einer Stimulation mit 1612-Thioat ist. Der Vergleich mit der Kontrollgruppe und vorangegangener PBS-Applikation zeigt jedoch keine signifikante Veränderung der TLR2-mRNA-Expression, so dass dem tendenziellen Anstieg im Verlauf von 3 Stunden Reperfusion am ehesten eine de-novo Proteinsynthese nach pathogenen, ischämischen Reiz und den dabei freigesetzten endogenen Liganden zugrunde liegt. Frantz et al. wiesen 2001 nach, dass eine Auseinandersetzung mit ROS zu einer Steigerung der TLR2-Aktivität in Kardiomyozyten führt (Frantz et al., 2001). ROS werden in hohem Maße bei einem myokardialen Infarkt freigesetzt (Nian et al., 2004). Ähnliches wurde ganz aktuell, am Jahr 2011 durch Selejan et al. beschrieben. Sie demonstrierten während eines akuten Myokardinfarkts und im kardiogenen Schock eine Hochregulation der TLR2-Expression sowie der TNF- α - und IL-6-Synthese. Diese Steigerung korrelierte in hohem Maße mit dem I/R-Schaden und der Reperusionszeit (Selejan et al., 2011).

Möglicherweise könnte in dieser Analyse das 1612-Thioat einen inhibierenden Effekt auf die Synthese der TLR2-mRNA haben, doch auch diese, zwar sichtliche Verminderung ist im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant.

Eine Stimulation mit einem 1668-Thioat und ein anschließendes I/R-Protokoll bewirkt eine hochsignifikante Zunahme der TLR9-mRNA-Synthese im verzögerten Verlauf. Dieser Steigerung nach 3 Stunden Reperfusionphase liegt eine de-novo Synthese nach ischämischen Reiz und vorangegangener CpG-ODN-Präkonditionierung zugrunde. Eine alleinige Aktivierung durch endogene Liganden infolge des ischämischen Zellunterganges kann durch den Vergleich mit der PBS-Kontrollgruppe sowie mit den Verläufen nach H154- und 1612-Thioat ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse beweisen zum ersten Mal, dass nicht nur die reine Stimulation eines Organismus mit einem TLR9-Agonisten zu dessen gesteigerter Synthese führt (Knuefermann et al., 2008) sondern, dass auch ein pathogener, aseptischer Reiz nach Präkonditionierung zu einer erneuten Hochregulation des PRR führt.

4.5 Analyse der Ergebnisse TLR9-defizienter Mäuse

Wie im Kapitel Material und Methoden erläutert, kann nach erfolgter Genotypisierung sicher davon ausgegangen werden, dass es sich bei den verwendeten Mäusen um TLR9-defiziente Tiere gehandelt hat. Alle beschriebenen Veränderungen, die eine Präkonditionierung mit 1668-Thioat, also dem TLR9-Agonisten, im anschließenden I/R-Protokoll bewirkte, waren bei TLR9-D Mäusen nicht zu sehen. Es kam im zeitlichen Verlauf und im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe weder zu einer Steigerung der inflammatorischen Marker noch des antiinflammatorischen IL10. Der Anstieg der TLR9-mRNA-Expression in der postischämischen Reperfusionphase blieb ebenfalls aus. Damit wurde nachgewiesen, dass die Wirkung des CpG-ODNs in diesem Protokoll tatsächlich abhängig vom TLR9-Signaltransduktionsweg ist.

4.6 Übergreifende Schlußfolgerung

Nach einer Präkonditionierung mit einem 1668-Thioat hinterlässt eine I/R-Phase nach 24 Stunden einen geringeren Myokardschaden, als ohne Präkonditionierung. Diese Erkenntnis konnte in Vorarbeiten unserer Gruppe demonstriert werden (Gölz, 2009; Markowski, 2007) und wurde in den Kontrollexperimenten dieser Arbeit bestätigt.

In dieser Arbeit konnte nun zum ersten Mal gezeigt werden, dass das genannte Protokoll zunächst zu einer signifikant gesteigerten Inflammation führt, die eindeutig vom TLR9-Signaltransduktionsweg abhängig ist. Dennoch geht ein geringeres Infarktareal in Bezug auf die AAR hervor. Der schädigende Effekt einer postischämischen Inflammation ist also geringer nach einer Präkonditionierung mit 1668-Thioat. Dies bedeutet, es muss eine ischämische Toleranz vorliegen. Nach den aktuellen Ergebnissen könnte dieser Toleranz eine angepasste immunologische Antwort zugrunde liegen, die auf einen zweiten pathogenen Stimulus nach stattgehabter Präkonditionierung moduliert verläuft.

Ich folgere erstens daraus, dass eine subletale Stimulation mit einem CpG-ODN einen Schutz vor einem harten Reiz wie einem Myokardinfarkt bewirkt. Entsprechend den dargelegten Ergebnissen ist eine signifikant gesteigerte Expression des antiinflammatorischen Mediators IL-10 eine mögliche Erklärung des soeben beschriebenen

Phänomens. Das Zytokin IL-10 bremst nach einer Präkonditionierung im Verlauf der postischämischen Reperfusionphase die zunächst übermäßige immunologische Reaktion und lässt den schädigenden Effekt einer I/R geringer ausfallen. Die inhibitorischen Fähigkeiten des IL-10 werden in einer ausführlichen Übersichtsarbeit von Bazzoni et al. bestätigt (Bazzoni et al., 2010). Hier wird unter anderem die von Moore et al., 2001 demonstrierte Inhibition proinflammatorischer Gene durch das IL-10 nach einer Exposition mit PRRs (LPS, LTA und CpG-ODNs) beschrieben (Moore et al., 2001).

Zweitens schließe sich aus den Ergebnissen, dass vermutlich andere immunologische Rückkopplungsmechanismen nach dem primären pathogenen Stimulus vermehrt aktiv sind, die die Wirkung des im Verlauf der Reperfusionphase hochregulierten TLR9 ausbremsen. Dies steht im Einklang mit der Arbeit von Mathur et al., die im Jahr 2011 eine Steigerung von NFκB-Inhibitoren nach CpG-ODN-Applikation und I/R-Protokoll demonstrieren konnten. Nach einer ODN-Stimulation wies diese Arbeitsgruppe eine Hochregulation der NFκB-Hemmstoffe TNFAIP3, NFκBIA, TRIM30 und TNIP1 nach (Mathur et al., 2011).

Eine primär überschießende immunologische Reaktion, die im präkonditionierten Organismus rasch durch verschiedene, inhibierende Rückkopplungsmechanismen ausgebremst wird, erklärt also das resultierende geringere Infarktareal nach Präkonditionierung mit einem CpG-ODN.

Eine Fehlerquelle in der Analyse der planimetrischen Arbeiten war gewesen, dass infolge der gesteigerten Letalität post-stimulationem und während des Myokardinfarkts nach 1668-Thioat-Applikation es zu einer positiven Mauselektion gekommen sein könnte, dass physiologisch bessere Herzen zur Auswertung gekommen sein könnten und so ein geringeres Infarktareal in Bezug auf die AAR zu erklären sei. Durch diese Analyse der differentiellen Mediatorantwort ist diese Fehlerquelle ausgeräumt. Die antiinflammatorische Modulation des immunologischen Systems ist signifikant stärker in der Gruppe der mit 1668-Thioat behandelten Mäusen.

Eine Stimulation mit dem H154-Thioat führt zu einer tendenziellen, jedoch nicht zu einer signifikanten Minderung der inflammatorischen Antwort in der postischämischen Reperfusionphase. Eine tatsächliche Inhibierung oder antiinflammatorische Wirkung, wie sie die Arbeit von Yamada et al., 2004 nachweist, konnte in diesem I/R-Protokoll nicht demonstriert werden. Ebenso erreichte eine Stimulation mit 1612-Thioat keine

Veränderung der differentiellen Mediatorantwort.

4.7 Ausblick

CpG-ODNs zeichnen sich durch ihre immunomodulierenden Eigenschaften aus. Der Einsatz als Impfadjuvantien, Antiallergene, Chemotherapeutika und immunoprotektive Substanz wurde daher bereits diskutiert (Elkins et al., 1999; Kline et al., 1998; Klinman et al., 1999; Krieg und Davis, 2001; Lipford et al., 1997). Die in dieser Studie demonstrierte erhöhte Mortalität nach reiner Stimulation mit 5 nmol 1668-Thioat und die durch Knuefermann et al., 2008 gesehenen Zeichen einer schwerer Sepsis nach 20 nmol-Gabe machen einen breiten klinischen Einsatz bislang jedoch fragwürdig. Das therapeutische Spektrum ist auf Grund dieser hohen Toxizität sehr eng. Dennoch lässt der Endpunkt eines reduzierten Infarktareals und die damit einhergehende bessere Langzeitprognose nach Myokardinfarkt die weitere Forschung und Austestung neuer CpG-ODNs ausgesprochen sinnvoll erscheinen. Bereits in der 90er Jahren erarbeiteten verschiedene Arbeitsgruppen abgewandelte CpG-ODNs, die in Wirkung und Nebenwirkung verbessert waren (Cowdery et al., 1996; Sparwasser et al., 1997a; Sparwasser et al., 1997b). Im Jahr 2003 wurde durch Agrawal und Kandimalla gezeigt, dass eine Modifikation der Basensequenz in einer veränderten Zytokinexpression sowie Zellaktivierung resultieren kann (Agrawal und Kandimalla, 2003). Basierend auf dieser Studie konnten verschiedene Arbeitsgruppen weitere CpG-ODNs entwickeln (Goodnow, 2006; Means und Luster, 2005) Unter anderem konnte eine Reduktion der unerwünschten Entwicklung von Autoimmunerkrankungen sowie der Sepsis im Allgemeinen erreicht werden. Sollte es möglich sein die Nebenwirkungen der CpG-ODNs zu kontrollieren, leitet ihre Wirksamkeit auf Immunzellen ein großes Feld therapeutischer Möglichkeiten ein. Durch die Aktivierung von Th1-Zytokinen wie IL-12 und INF- γ sind sie gegen verschiedene Infektionserkrankungen wirkungsvoll (Agrawal und Kandimalla, 2000; Dalpke et al., 2002; Klinman et al., 1996; Lewis et al., 2000). Darüber hinaus implizieren die Induktion der Interleukine 2 und 12, der Interferone und die Ergebnisse verschiedener Studien, ihre hohe Bedeutung bei der Therapie maligner Erkrankungen (Bode et al., 2011; Chiang et al., 2011; Holtick et al., 2011; Hong et al., 2011; Sommariva et al., 2011; Weng et al., 2011). Dies ist in Anbetracht der steigenden

sozioökonomischen Bedeutung von großer Wichtigkeit.

In unserer Arbeitsgruppe wird bald der Vergleich dieser Daten aus der Reperfusionphase mit den post-stimulationem erhobenen erfolgen. Ein weiterer Abschnitt unseres Forschungsprojektes wird die Mediatorantwort bei IL-10-"Knock out"-Mäusen untersuchen. Eine planimetrische Auswertung könnte zeigen, wie stark der antiinflammatorische Effekt auf den Endpunkt Infarktareal tatsächlich ist und dann einen möglichen Ansatzpunkt für den klinischen Einsatz darstellen.

5 Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in unserer Gesellschaft von hoher sozioökonomischer Bedeutung. Beim Myokardinfarkt führen sowohl die initiale Ischämie, als auch die rasch angestrebte Reperfusion auf Grund einer stattfindenden Inflammation zu einer potentiell irreversiblen Schädigung des Myokards. Eine myokardiale Präkonditionierung kann diese additive Schädigung durch die Reperfusion reduzieren. Dieser protektive Effekt ist für verschiedene Substanzen bereits nachgewiesen worden. Bekannt ist des Weiteren, dass eine singuläre Stimulation mit einem synthetischen Oligodesoxynukleotid (ODN) über den Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) initial zu einer schweren kardialen und systemischen Inflammation führt. Der TLR9 gehört zur Gruppe der phylogenetisch hoch konservierten Mustererkennungsrezeptoren ("pathogen recognition receptor", PRR) und identifiziert potentiell schädliche Liganden, welchen die ODN entsprechen. Bei einem sich anschließenden Ischämie/Reperfusion (I/R)-Ereignis resultiert dann jedoch ein signifikant geringeres Infarktareal. Dieses Phänomen kann durch meine Arbeit in Teilen erklärt werden.

In einem zweizeitigen Versuchsprotokoll wurden die Tiere zunächst einem operativen Eingriff unterzogen, zur Anlage einer lockeren Ligatur der linken anterior deszendierenden Koronararterie. Im weiteren Verlauf wurde, entsprechend des "closed-chest" Modells nach 5-7 Tagen zunächst eine Stimulation mit verschiedenen synthetischen ODNs (Thioate) sowie einer Placebo-Substanz ("phosphate buffer saline", PBS) vorgenommen und mit einer Latenz von 16 Stunden ein I/R-Protokoll durchgeführt. Verwendet wurde u. a. das 1668-Thioat, welches nachgewiesen immunstimulativ über den TLR9 wirkt. Nach festgelegten Zeiten von 30 Minuten und 3 Stunden Reperfusion erfolgte die Organentnahme zur Bestimmung der Inflamationsparameter TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 und iNOS sowie zur Messung der Expression von TLR2, 4 und 9.

Postischämisch kommt es bei den initial mit 1668-Thioat behandelten Mäusen zunächst zu einem Anstieg der proinflammatorischen Mediatoren gegenüber nicht immunstimulierten Tieren. Die TNF- α -Expression liegt nach 30 Minuten Reperfusion bei $5,645 \pm 2,083$, gegenüber der Basalexpression in der PBS-Gruppe, die bei $1,004 \pm 0,1301$ liegt. Nach 3 Stunden Reperfusionszeit sinkt diese signifikante Differenz auf $3,375 \pm 0,7578$ zu $1,313 \pm 0,3187$ ab. Ähnlich die Ergebnisse für das IL-6. Hier zeigt sich nach

30 Minuten ein signifikanter Anstieg der Expression nach proinflammatorischer Stimulation auf $3,776 \pm 1,188$, verglichen zur Basalexpression von $1,250 \pm 0,1908$. Im längeren Verlauf jedoch zeigt sich nach 1668-Behandlung eine deutlich gesteigerte Expression des antiinflammatorischen Botenstoff IL-10. Nach 30 Minuten Reperfusion präsentiert sich ein tendenzieller Anstieg der Expression vom Basalwert von $0,6784 \pm 0,2666$ auf $4,363 \pm 1,223$. Nach 3 Stunden demaskiert sich ein Anstieg auf hochsignifikante $20,06 \pm 4,783$, verglichen zu $1,241 \pm 0,3798$ nach PBS-Gabe. Dieses Zytokin reduziert die Bildung aller inflammatorischen Zytokine. So mildert es die pathologische Konsequenz, der während der Reperfusion initial übermäßigen immunologischen Reaktion durch die beschriebenen Mediatoren TNF- α und IL-6.

Eine weiteres prägnantes Ergebnis ist die im Verlauf der Reperfusion hochregulierte Expression des TLR9. Nach 3-stündiger Reperfusion zeigt sich ein RQ-Wert von $6,993 \pm 1,040$ nach 1668-Thioat-Applikation, während die Synthese nach stattgehabter PBS-Stimulation bei $1,466 \pm 0,2071$ liegt. Nach initialer Immunstimulation via TLR9 führt ein pathogener, aseptischer Reiz also erneut zu einer gesteigerten Expression dieses PRR. Die proinflammatorische Wirkung dieses Rezeptors wird durch die vermehrte Aktivität von Hemmstoffen des TLR9-NF κ B-Signaltransduktionsweg inhibiert und in seiner Pathogenität auf das Myokard gebremst.

Der schädigende Effekt einer postischämischen Inflammation ist also geringer nach einer Präkondition mit 1668-Thioat. Im murinen Organismus liegt eine ischämische Toleranz vor, der eine angepasste immunologische Antwort, mit gesteigerten inhibierenden Rückkopplungsmechanismen, auf einen zweiten, pathogenen Stimulus zugrunde liegt.

6 Literaturverzeichnis

Agrawal S, Kandimalla ER. Antisense therapeutics: is it as simple as complementary base recognition? *Mol Med* 2000; 6: 72-81

Agrawal S, Kandimalla ER. Modulation of Toll-like receptor 9 responses through synthetic immunostimulatory motifs of DNA. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1002: 30-42

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

Baldassare JJ, Bi Y, Bellone CJ. The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-1 β transcription. *J Immunol* 1999; 162: 5367-5373

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

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

Baumgarten G, Knuefermann P, Mann DL. Cytokines as emerging targets in the treatment of heart failure. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 216-223

Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N, Sivasubramanian N, Mann DL, Vallejo JG. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. *J Infect Dis* 2001; 183: 1617-1624

Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatella MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from the neutrophils. *Eur J Immunol* 2010; 40: 2360-2368

Belhomme D, Peynet J, Louzy M, Launay JM, Kitakaze M, Menasche P. Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 1999; 100: II340-II344

Belosjorow S, Schulz R, Dorge H, Schade FU, Heusch G. Endotoxin and ischemic preconditioning: TNF- α concentration and myocardial infarct development in rabbits. *Am J Physiol* 1999; 277: H2470-H2475

Bierhaus A, Humpert PM, Stern DM, Arnold B, Nawroth PP. Advanced glycation end product receptor-mediated cellular dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1043: 676-680

Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2011; 10: 499-511

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

Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di MF, French L, Tschopp J. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem* 1998; 273: 12203-12209

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

Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol* 2000; 164: 966-972

Cason BA, Gamperl AK, Slocum RE, Hickey RF. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits. *Anesthesiology* 1997; 87: 1182-1190

Chiang CL, Kandalafi LE, Coukos G. Adjuvants for enhancing the immunogenicity of whole tumor cell vaccines. *Int Rev Immunol* 2011; 30: 150-182

Chien GL, Wolff RA, Davis RF, Van Winkle DM. "Normothermic range" temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1014-1017

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159

Cope DK, Impastato WK, Cohen MV, Downey JM. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 1997; 86: 699-709

Cornelie S, Wiel E, Lund N, Lebuffe G, Vendeville C, Riveau G, Vallet B, Ban E. Cytosine-phosphate-guanine (CpG) motifs are sensitizing agents for lipopolysaccharide in toxic shock model. *Intensive Care Med* 2002; 28: 1340-1347

Cowan DB, Poutias DN, del Nido PJ, McGowan FX, Jr. CD14-independent activation of cardiomyocyte signal transduction by bacterial endotoxin. *Am J Physiol* 2000; 279: H619-H629

Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, Krieg AM. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN- γ in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 1996; 156: 4570-4575

Dalpke A, Zimmermann S, Heeg K. CpG DNA in the prevention and treatment of infections. *BioDrugs* 2002; 16: 419-431

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung e.V. Kommentare zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI). *Kardiologe* 2010; 4: 84-92

Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P, Taffet G, Michael LH, Crapo JD, Welz A, Entman ML. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 2700-2705

Dibbs Z, Kurrelmeyer K, Kalra D, Seta Y, Wang F, Bozkurt B, Baumgarten G, Sivasubramanian N, Mann DL. Cytokines in heart failure: pathogenetic mechanisms and potential treatment. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111: 423-428

Dörner K. Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie. Stuttgart - New York: Thieme, 2006

Duncker DJ, Klassen CL, Ishibashi Y, Herrlinger SH, Pavek TJ, Bache RJ. Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol* 1996; 270: H1189-H1199

Eddy LJ, Goeddel DV, Wong GH. Tumor necrosis factor- α pretreatment is protective in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys. Res Commun* 1992; 184: 1056-1059

Elkins KL, Rhinehart-Jones TB, Stibitz S, Conover JS, Klinman DM. Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* 1999; 162: 2291-2298

Ferrero E, Jiao D, Tsuberi BZ, Tesio L, Rong GW, Haziot A, Goyert SM. Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2380-2384

Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor κ B by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 5197-5203

Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* 1999; 104: 271-280

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 31-47

Gölz L. Die Bedeutung von CpG-Oligonukleotiden für den myokardialen Reperfusionsschaden. Dissertation der Hohen Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2009

Goodnow CC. Immunology. Discriminating microbe from self suffers a double toll. *Science* 2006; 312: 1606-1608

Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2002; 168: 5989-5992

Guo Y, Wu WJ, Qiu Y, Tang XL, Yang Z, Bolli R. Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol* 1998; 275: H1375-H1387

Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, Entman ML. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* 1999; 99: 546-551

Hale SL, Dave RH, Kloner RA. Regional hypothermia reduces myocardial necrosis even when instituted after the onset of ischemia. *Basic Res Cardiol* 1997; 92: 351-357

Hale SL, Kloner RA. Myocardial temperature in acute myocardial infarction: protection with mild regional hypothermia. *Am J Physiol* 1997; 273: H220-H227

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303: 1526-1529

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745

Hiasa G, Hamada M, Ikeda S, Hiwada K. Ischemic preconditioning and lipopolysaccharide attenuate nuclear factor- κ B activation and gene expression of inflammatory cytokines in the ischemia-reperfused rat heart. *Jpn Circ J* 2001; 65: 984-990

Holtick U, Scheulen ME, von Bergwelt-Baildon MS, Weihrauch MR. Toll-like receptor 9 agonists as cancer therapeutics. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; 20: 361-372

Hong S, Qian J, Li H, Yang J, Lu Y, Zheng Y, Yi Q. CpG or IFN- α are more potent adjuvants than GM-CSF to promote anti-tumor immunity following idotype vaccine in multiple myeloma. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 15: epub ahead of print

Inohara N, Koseki T, del PL, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- κ B. *J Biol Chem* 1999; 274: 14560-14567

Iretton RC, Gale M Jr. RIG-I like receptors in antiviral immunity and therapeutic applications. *Viruses* 2011; 3: 906- 919

Kalra D, Baumgarten G, Dibbs Z, Seta Y, Sivasubramanian N, Mann DL. Nitric oxide provokes tumor necrosis factor- α expression in adult feline myocardium through a cGMP-dependent pathway. *Circulation* 2000; 102: 1302-1307

- Kariko K, Weissman D, Welsh FA. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling – a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24: 1288-1304
- Kato R, Foex P. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can J Anaesth* 2002; 49: 777-791
- Kawagoe T, Sato S, Jung A, Yamamoto M, Matsui K, Kato H, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S. Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. *J Exp Med* 2007; 204: 1013-1024
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006; 13: 816-825
- Khaliulin I, Clarke SJ, Lin H, Parker J, Suleiman MS, Halestrap AP. Temperature preconditioning of isolated rat hearts – a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Physiol* 2007; 581: 1147-1161
- Kirschning CJ, Wesche H, Merrill AT, Rothe M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1998; 188: 2091-2097
- Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, Krieg AM. Modulation of airway inflammation by CpG oligonucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998; 160: 2555-2559
- Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2879-2883
- Klinman DM, Barnhart KM, Conover J. CpG motifs as immune adjuvants. *Vaccine* 1999; 17: 19-25
- Klinke R, Pape HC, Silbernagl S. *Physiologie*. Stuttgart - New York: Thieme, 2005
- Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of myocardial stunning, hibernation and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998; 97:1848-1867
- Knuefermann P, Sakata Y, Baker JS, Huang CH, Sekiguchi K, Hardarson HS, Takeuchi O, Akira S, Vallejo JG. Toll-like receptor 2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation* 2004; 110: 3693-3698
- 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. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 26-35

- Ko SH, Yu CW, Lee SK, Choe H, Chung MJ, Kwak YG, Chae SW, Song HS. Propofol attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Anesth Analg* 1997; 85: 719-724
- Kokita N, Hara A, Abiko Y, Arakawa J, Hashizume H, Namiki A. Propofol improves functional and metabolic recovery in ischemic reperfused isolated rat hearts. *Anesth Analg* 1998; 86: 252-258
- Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 35-43
- Krieg AM, Davis HL. Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3: 15-24
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374: 546-549
- Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 795-804
- Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor α and interleukin 1β are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183: 949-958
- Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5456-5461
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5: 190-198
- Lewis EJ, Agrawal S, Bishop J, Chadwick J, Cristensen ND, Cuthill S, Dunford P, Field AK, Francis J, Gibson V, Greenham AK, Kelly F, Kilkushie R, Kreider JW, Mills JS, Mulqueen M, Roberts NA, Roberts P, Szymkowski DE. Non-specific antiviral activity of antisense molecules targeted to the E1 region of human papillomavirus. *Antiviral Res* 2000; 48: 187-196
- Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol* 2002; 282: C227-C241
- Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 2000; 105: 497-504

- Lipford GB, Bauer M, Blank C, Reiter R, Wagner H, Heeg K. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell response to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2340-2344
- Ludwig LM, Tanaka K, Eells JT, Weihrauch D, Pagel PS, Kersten JR, Wartier DC. Preconditioning by isoflurane is mediated by reactive oxygen species generated from mitochondrial electron transport chain complex III. *Anesth Analg* 2004; 99: 1308-1315
- Markowski P, Gölz L, Stapel H, Grohé C, Baumgarten G, Knuefermann P, Meyer R. Toll like receptor 9 stimulation protects the heart against ischemia/reperfusion injury. *Acta Physiol* 2007; 198: 128
- Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592: 265-280
- Mathur S, Walley KR, Boyd JH. The TLR9 ligand CpG-C attenuates acute inflammatory cardiac dysfunction. *Shock* 2011; 7: Epub ahead of print
- Maulik N, Das DK. Potentiation of angiogenic response by ischemic and hypoxic preconditioning of the heart. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 13-24
- Means TK, Luster AD. Toll-like receptor activation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1062: 242-251
- Medzhitov R, Janeway CA., Jr. How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol* 2000; 12: 185-188
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA, Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; 2: 253-258
- Meng W, Yamazaki T, Nishida Y, Hanagata N. Nuclease resistant immunostimulatory phosphodiester CpG oligodeoxynucleotides as human Toll-like receptor 9 agonists. *BMC Biotechnology* 2011; 11: 88
- Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, Hartley CJ, Pham TT, Daniel SL, Funk E, Entman ML. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 277: H660-H668
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765
- Muders F, Elsner D. Animal models of chronic heart failure. *Pharmacol Res* 2000; 41: 605-612
- Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z, Mann DL. Tumor necrosis factor- α confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circulation* 1998; 97: 1392-1400

Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 2004; 94: 1543-1553

Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, Entman ML. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol* 2000; 278: H1049-H1055

O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 353-364

O'Neill LA, Greene C. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 1998; 63: 650-657

Ogata M, Okamoto K, Kohriyama K, Kawasaki T, Itoh H, Shigematsu A. Role of interleukin-10 on hyporesponsiveness of endotoxin during surgery. *Crit Care Med* 2000; 28: 3166-3170

Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC, Strauss JF. The extra domain A of fibronectin activates toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276: 10229-10233

Osterkamp S. Myokardiale Ischämie/Reperfusion und das angeborene Immunsystem. Die Bedeutung des "Toll-Like-Receptor" 4. Dissertation der Hohen Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2006

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

Parker MM, Shelhamer JH, Bacharach SL, Green MV, Natanson C, Frederick TM, Damske BA, Parrillo JE. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med* 1984; 100: 483-490

Piper HM, Meuter K, Schafer C. Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: S644-S648

Przyklenk K, Darling CE, Dickson EW, Whittaker P. Cardioprotection 'outside the box' – the evolving paradigm of remote preconditioning. *Basic Res Cardiol* 2003; 98: 149-157

Schulz R, Aker S, Belosjorow S, Heusch G. TNF α in ischemia/reperfusion injury and heart failure. *Basic Res Cardiol* 2004; 99: 8-11

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 17406-17409

Schwartz DA, Quinn TJ, Thorne PS, Sayeed S, Yi AK, Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract. *J Clin Invest* 1997; 100: 68-73

Selejan S, Pöss J, Walter F, Hohl M, Kaiser R, Kazakov A, Böhm M, Link A. Ischaemia-induced up-regulation of Toll like receptor 2 in circulating monocytes in cardiogenic shock. *Eur Heart J* 2011; 13: Epub ahead of print

Shames BD, Meldrum DR, Selzman CH, Pulido EJ, Cain BS, Banerjee A, Harken AH, Meng X. Increased levels of myocardial I κ B- α protein promote tolerance to endotoxin. *Am J Physiol* 1998; 275: H1084-H1091

Smiley ST, King JA, Hancock WW. Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 2001; 167: 2887-2894

Sommariva M, De Cecco L, De Cesare M, Sfondrini L, Ménard S, Melani C, Delia D, Zafforini N, Pratesi G, Uva V, Tagliabue E, Balsari A. TLR9 Agonists oppositely modulate DNA repair genes versus immun cells and enhance chemotherapy effects. *Cancer Res* 2011; 15: 6382-6390

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

Sparwasser T, Miethke T, Lipford G, Erdmann A, Hacker H, Heeg K, Wagner H. Macrophages sense pathogens via DNA motifs: Induction of tumor necrosis factor- α -mediated shock. *Eur J Immunol* 1997b; 27: 1671-1679

Stapel H. Die Bedeutung des Toll-like Rezeptor 4 für die myokardiale Schädigung durch Endotoxin und Ischämie-Reperfusion. Dissertation der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2006

Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2010. Destatis 2011

Tahep IP, Valen G, Starkopf J, Kairane C, Zilmer M, Vaage J. Pretreating rats with hyperoxia attenuates ischemia-reperfusion injury of the heart. *Life Sci* 2001; 68: 1629-1640

Tavener SA, Long EM, Robbins SM, McRae KM, Van RH, Kubes P. Immune cell Toll-like receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia. *Circ Res* 2004; 95: 700-707

Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002; 195: 99-111

Tsujimura H, Tamura T, Kong HJ, Nishiyama A, Ishii KJ, Klinman DM, Ozato K. Toll-like receptor 9 signaling activates NF- κ B through IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein in dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172: 6820-6827

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

Vanoverschelde JL, Wijns W, Depre C, Essamri B, Heyndrickx GR, Borgers M, Bol A, Melin JA. Mechanisms of chronic regional postischemic dysfunction in humans. New insights from the study of noninfarcted collateral-dependent myocardium. *Circulation* 1993; 87: 1513-1523

Vink A, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Functional role for toll-like receptors in atherosclerosis and arterial remodeling. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 515-521

Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, Akira S, Kelly KM, Reeves WH, Bauer S, Krieg AM. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* 2005; 202: 1575-1585

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

Wagner H, Hacker H, Lipford GB. Immunostimulatory DNA sequences help to eradicate intracellular pathogens. *Springer Semin Immunopathol* 2000; 22: 147-152

Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412: 346-351

Weng Y, Wang Y, Shi Y, Zhou W, Wang H, Wang C. TLR9 expression and its role in Chemosensitivity to DDP in human cervical cancer cells in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2011; 31: 550-554

Werdan K, Muller-Werdan U. Elucidating molecular mechanisms of septic cardiomyopathy - the cardiomyocyte model. *Mol Cell Biochem* 1996; 163-164: 291-303.

Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: An adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997; 7: 837-847

Yamada H, Ishii KJ, Klinman DM. Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit CpG-induced inflammation of the mouse lung. *Crit Care Med* 2004; 32: 2045-2049

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 937-952

Zacharowski K, Frank S, Otto M, Chatterjee PK, Cuzzocrea S, Hafner G, Pfeilschifter J, Thiemermann C. Lipoteichoic acid induces delayed protection in the rat heart: A comparison with endotoxin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1521-1528

Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 2003; 285: H579-H588

Ziegler-Heitbrock HW. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm* 1995; 45: 13-26

7 Danksagung

Den Personen, die mich bei dieser Promotion gefördert haben, möchte ich ganz herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Rainer Meyer (Insitut für Physiologiell) für das Überlassen der Thematik seine ausgesprochen konstruktive Unterstützung, die freundliche Betreuung und Sein fortwährendes Interesse an dieser Arbeit.

Den Mitarbeitern des Physiologischen Institutes, im Speziellen Frau Hanne Bock, danke ich für die stetige Hilfe und Freundlichkeit.

Herrn PD Dr. med. Pascal Knuefermann für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. med. Olaf Boehm für seine wegweisende Vermittlung in die Arbeitsgruppe.

Herrn Paul Markowski für die Einarbeitung in die OP-Methodik und für seine ständige Ansprechbarkeit und hilfsbereite Unterstützung.

Frau Dr. Pia Langhoff für ihre Unterstützung bei der Durchführung der PCR.