

Einfluss von TLR9 auf die Herzhypertrophie am Mausmodell

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

Dorothea Hof
aus Siegen
2014

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Schrickel

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.10.2014

Aus dem Physiologischen Institut II der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. D. Swandulla

Meinen Eltern, meiner Familie
und meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Herzmuskelhypertrophie.....	10
1.2	Geschlechtsspezifische Unterschiede.....	11
1.3	Angeborenes Immunsystem: Toll-like Rezeptoren.....	12
1.4	TLR9 - Aktivierung und Signaltransduktion.....	15
1.5	Einfluss von Toll-like Rezeptoren auf Herzmuskelhypertrophie	17
1.6	Ziele dieser Arbeit.....	19
2	Materialien und Methoden	20
2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	20
2.2	Gruppeneinteilung und Versuchsprotokoll.....	20
2.3	In vivo Eingriffe.....	22
2.3.1	Anästhesie.....	22
2.3.2	Trans-Aortale Konstriktion.....	24
2.3.3	Sham (Scheinoperation).....	26
2.3.4	Hämodynamik.....	27
2.3.5	Blutentnahme.....	29
2.3.6	Organentnahme.....	29
2.4	Materialien.....	30
2.4.1	Materialien für die Tierhaltung	30
2.4.2	Geräte	30
2.4.3	Verbrauchsmaterialien.....	31
2.5	Statistik.....	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Tierzahlen.....	33
3.2	Mortalität.....	33
3.3	Körpergewichte.....	34
3.3.1	Körpergewicht absolut.....	34

3.3.2	Körpergewichtsänderung vor und nach Operationen	35
3.4	Gewicht des linken Ventrikels (LV).....	36
3.4.1	Gewicht des linken Ventrikels normiert auf das Körpergewicht.....	37
3.4.2	Gewicht des linken Ventrikels normiert auf die Tibialänge (LV/TL).....	38
3.4.3	Zuwachs des Gewichtes des linken Ventrikels normiert auf die Tibialänge.....	40
3.5	Lungengewicht.....	41
3.6	Herzfrequenz (Heart Rate, HR).....	42
3.7	Systolischer arterieller Blutdruck (SAP).....	43
3.8	Diastolischer arterieller Blutdruck (DAP).....	44
3.9	Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP).....	45
3.10	Linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP).....	46
3.11	Linksventrikulärer diastolischer Druck (LVDP).....	47
3.12	Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dtmax).....	48
3.13	Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dtmin).....	49
4	Diskussion	50
4.1	Limitation und Diskussion der Methode der Studie.....	50
4.2	Akute und chronische Auswirkungen einer Aortenkonstriktion auf Herz und Lunge nach 14 Tagen	51
4.3	Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Hypertrophieantwort.....	52
4.4	Rolle des TLR9 in der Myokardhypertrophie nach Druckbelastung – Ein Vergleich mit TLR4.....	54
4.5	Ausblick: Behandlung mit TLR9 Liganden.....	58
5	Zusammenfassung	59
6	Literaturverzeichnis	61
7	Danksagung	76
8	Lebenslauf	77

Abkürzungsverzeichnis

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AP 1	Aktivatorprotein 1
BNP	Natriuretisches Peptid Typ B
CPG	Cytidin-Phosphorsäure-Guanosin-Motiv
CPG-ODN	CPG-Oligodesoxynukleotid
cTGF	Connective tissue Growth Factor
C57BL/6	Wildtyp-Zuchtstamm
C57M Sham	Wildtyp, scheinoperierte Männchen
C57 MTAC	Wildtyp, TAK-operierte Männchen
C57W Sham	Wildtyp, scheinoperierte Weibchen
C57W TAC	Wildtyp, TAK-operierte Weibchen
DAMP/DAMPs	Damage-associated molecular pattern molecule/-s
DAP	Diastolischer arterieller Blutdruck
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dP/dt_{\max}	Maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
dP/dt_{\min}	Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit
EF	Ejektionsfraktion
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
et al.	Et alii
Fc Region	„Fragment chrystalized“ Region von Antikörpern
Fc-Rezeptor	erkennt Fc Regionen von Antikörpern
fibronectin EDA	Fibronektin Extradomäne A
GP	Glykoprotein
HMGB 1	High-mobility
HSP	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
I κ B	Inhibitor von kappa B

IkK	Inhibitorische kappa B Kinase
IRAK	IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon-regulierender Faktor
LDH	„Low density“ Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Gewicht des linken Ventrikels
LV/BW	Linksventrikuläres Gewicht normiert auf Körpergewicht
LVDP	Linksventrikulärer diastolischer Druck
LVMP	Linksventrikulärer mittlerer Druck
LVSP	Linksventrikulärer systolischer Druck
LV/TL	Linksventrikuläres Gewicht normiert auf die Tibialänge
MABP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAL	Myelin und Lymphozyt Protein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAP3K7	Mitogen-aktivierte Protein Kinase 7 Kinase Kinase
My88D	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
NFκB	Nukleärer Faktor kappa B
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern molecules
PI3 Kinase	Phosphatidylinositol-3 Kinase
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
P	Phosphat/Phosphorylierung
SAP	Systolischer arterieller Blutdruck
Sham	Schein-Operation
TAB	TAK1-bindendes Protein
TAK	Trans-aortale Konstriktions-OP
TAK 1	Synonym zu MAP3K7, TGFβ-aktivierte Kinase 1
TGF	Transforming growth factor
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor Domäne
TLR	„Toll-like“ Rezeptor
TLR9D M Sham	TLR 9 defiziente scheinoperierte Männchen
TLE9D M TAC	TLR 9 defiziente TAK-operierte Männchen

TLR9D W Sham	TLR 9 defiziente scheinoperierte Weibchen
TLR9D W TAC	TLR 9 defiziente TAK-operierte Weibchen
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
TRAF	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing Interferon- β
Ub	Ubiquitin/Ubiquitinierung

1 Einleitung

1.1 Herzmuskelhypertrophie

Ein bedeutender Faktor bei Herzerkrankungen in der westlichen Welt ebenso wie in anderen Breitengraden ist die Herzmuskelhypertrophie, eine Zunahme der Muskelmasse des Herzens. Es gibt mehrere Gründe für die Entstehung einer Herzmuskelhypertrophie, die man auf Druck- oder Volumenbelastungen des Herzens, hormonelle, immunmodulatorische und andere Ursachen zurückführen kann.

Eine Druckbelastung des Herzens z.B. bei arterieller Hypertonie (der Volkskrankheit Nummer eins) oder bei Herzklappenfehlern wie z.B. einer Aortenstenose, führt zu einer vergrößerten Nachlast des Herzens. Um dem chronisch erhöhten Druck begegnen zu können, findet ein Anpassungsmechanismus statt: Die Muskelmasse des Herzens vergrößert sich, es kommt zu einer konzentrischen Muskelhypertrophie des Herzens. Dabei verdicken sich die einzelnen Herzmuskelfasern, so dass sich bei unveränderter Länge nur ihr Durchmesser erhöht. Darüber hinaus kann sich durch neurohumorale Adaptionsmechanismen die Nachlast erhöhen (Ferrara et al., 2002).

Bei der Volumenbelastungen des Herzens kommt es auf Grund der erhöhten Wandspannung des Herzens akut zu einer Steigerung der Kontraktionskraft (Frank-Starling-Mechanismus) und auf kürzere oder längere Sicht auch zu einer Hypertrophie der Herzmuskelfasern. Hier findet man eine exzentrische Hypertrophie, die Herzmuskelzellen nehmen an Länge zu und es kommt zu einer Dilatation des Herzens (Carabello 2002; Katz et al., 2013).

Wichtige Folge einer Hypertrophie kann eine Herzinsuffizienz sein, die oft die Lebensqualität der Patienten stark einschränkt und zu einer stark verkürzten Lebenserwartung führt (O'Connor et al., 2012). Zudem war die Diagnose Herzinsuffizienz neben Geburten und Alkoholismus 2011 die häufigste Hauptdiagnose vollstationär behandelter Patienten und neben Myokardinfarkten und bösartigen Neubildungen die häufigste Todesursache 2010 und 2011 (Statistisches Bundesamt, 2014).

1.2 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Das Geschlecht spielt auch bei der Entwicklung einer Herzmuskelhypertrophie eine große Rolle. Die Muskelmasse des Herzens nimmt mit zunehmendem Alter bei Frauen zu, während die Muskelmasse der Männer sich nicht verändert (Dannenberget al., 1989). Dies wird durch eine Studie von Olivetti et al. unterstützt, die zeigt, dass die linksventrikuläre Masse bei Männern abnimmt, wobei sich die Myozytenzahl vermindert, dafür aber das Volumen der Zellen zunimmt. Bei Frauen bleibt die linksventrikuläre Masse unverändert, ebenso auch Zahl und Volumen der Kardiomyozyten (Olivetti et al., 1995). Während Männer eher eine systolische Herzinsuffizienz entwickeln, haben Frauen öfter eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (EF) oder eine diastolische Herzinsuffizienz (Cleland et al., 2003; Regitz-Zagrosek, 2006; Regitz-Zagrosek et al., 2007 und 2010).

Diese Unterschiede lassen sich teilweise durch Östradiolwirkungen erklären: Dubey et al. zeigten, dass Östradiol das Wachstum kardialer Fibroblasten hemmt (Dubey et al., 1998). Zusätzlich führte die Gabe von Östrogenen bei männlichen Versuchstieren zu einer verringerten druckbedingten Hypertrophie (van Eickels et al., 2001). Lim et al. beobachteten, dass postmenopausale mit 17 β -Östradiol und Progesteron substituierte Frauen nach zehnjähriger Hormoneinnahme ein signifikant niedrigeres Herzgewicht aufwiesen (Lim et al., 1999). Östrogene bewirken sowohl bei hypertensiven Frauen (Mendelsohn und Karas, 2005; Modena et al., 1999), als auch im Mausmodell eine bessere myokardiale Anpassung an eine Druckbelastung (van Eickels et al., 2001). Bei gleichermaßen reduzierter systolischer Funktion haben Frauen ein besseres Outcome als Männer (O'Meara et al., 2007; Simon et al., 2001; Witt et al., 2008). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass weibliche Versuchstiere zu einem späteren Zeitpunkt ein Herzversagen erleiden oder sterben (Czubryt et al., 2003; Leinwand, 2003) und männliche Mäuse nach TAK eine größere Zunahme der Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio hatten (Skavdahl et al., 2005; Übersichtsartikel: Regitz-Zagrosek et al., 2010).

Körperliche Bewegung führt dagegen bei Frauen zu einer vermehrten konzentrischen Hypertrophie (De Bono et al., 2006; Foryst-Ludwig et al., 2011; Konhilas et al., 2004), gleichzeitig werden vermeintlich protektive Mechanismen - wie eine vermehrte Aktivierung des Akt-Signalwegs - aktiviert (Camper-Kirby et al., 2001). Männliche Tiere entwickeln mehr Fibrose (Fliegner et al., 2010; Witt et al., 2008).

Nach TAK kam es bei männlichen und weiblichen Tieren gleichermaßen zu einer Erhöhung von Hypertrophie-Genen wie α -Actin, ANP, BNP und CTGF, während Gene, welche die mitochondriale Funktion kontrollieren, in männlichen Tieren nach TAK weniger exprimiert wurden. Metabolische Gene wurden bei weiblichen Tieren im Vergleich zu männlichen Tieren weniger herunterreguliert (Haddad et al., 2008; Regitz-Zagrosek et al., 2010).

Östrogenrezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Hypertrophie: Sie regulieren über 17 β -Estradiol Aktivierung die Expression von 17 β -Estradiol Zielgenen (u.a. ANP), welche eine Rolle bei der myokardialen Hypertrophie spielen (Babiker et al., 2004; Grohé et al., 1997; Mahmoodzadeh et al., 2010 und 2012). Östrogenrezeptor α -defiziente Mäuse haben eine erhöhte Anzahl an L-Typ Calcium Kanälen (Johnson et al., 1997). Östrogenrezeptoren sind beteiligt an Zell-Zell Interaktion und Prävention von Apoptose (Groten et al., 2005; Jovanovic et al., 2000; Mammoodazeh et al., 2012; Patten et al., 2004). Östrogenrezeptor β -defiziente weibliche Mäuse zeigten mehr kardiale Fibrose, die Zahl apoptotischer Nuklei war bei β -defizienten Männchen stärker erhöht als bei den Weibchen (Fliegner et al., 2010). Östrogenrezeptor β ist sowohl für männliche als auch weibliche Mäuse nach TAK von Vorteil, er ist möglicherweise an der Aufrechterhaltung der Energie Homöostase in weiblichen Mäusen beteiligt und begrenzt die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Apoptose in beiden Geschlechtern (Fliegner et al., 2010; Übersichtsartikel: Regitz-Zagrosek et al., 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mehrere Studien darauf hindeuten, dass Östrogene die Herzmasse beeinflussen und bei Frauen zu einer verminderten bzw. verzögerten Ausbildung einer Herzhypertrophie führen.

1.3 Angeborenes Immunsystem: Toll-like Rezeptoren

Unser Immunsystem hat die Aufgabe, eindringende pathogene Keime zu eliminieren. Es teilt sich in zwei Hauptkomponenten auf: Das angeborene und das erworbene Immunsystem. Über das angeborene Immunsystem war lange Zeit kaum etwas bekannt, während man das erworbene Immunsystem schon früh in T- und B-Zell-vermittelte Immunabwehr unterschied. B- und T-Lymphozyten können mit Hilfe von Antigenrezeptoren (z.B. Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren) körperfremde Organismen und Antigene als „fremd“ erkennen. Dabei sind B-Lymphozyten durch Produktion von Immunglobuli-

nen an der humoralen Immunantwort beteiligt, während T-Lymphozyten bei der C-Zell-vermittelten Reaktion eine Rolle spielen. Das erworbene Immunsystem unterscheidet sich vom angeborenen dadurch, dass Antigene erkannt werden und sich ein „Gedächtnis“ entwickelt. Beim erneuter Exposition eines bestimmten Antigens erfolgt eine schnellere Antwort (Kogut und Klasing, 2009).

Das erworbene Immunsystem existiert nur in Wirbeltieren, das angeborene dagegen auch in Insekten und Weichtieren. Das angeborene Immunsystem ist bereits sofort nach der Geburt aktiv und reagiert schon in den ersten Stunden nach Aktivierung durch Pathogene (Fearon und Locksley, 1996; Hoffmann et al., 1999). Hierbei findet keine vorherige Sensibilisierung des Organismus statt, Virulenzfaktoren werden ohne vorherigen Kontakt als „fremd“ erkannt und mittels Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, Granulozyten und Lymphozyten) bekämpft. Man geht sogar davon aus, dass durch das angeborene Immunsystem über 99% aller Infektionen beherrscht werden können (Hörner et al., 2004).

Es war jedoch lange nicht bekannt, über welchen Rezeptor Immunzellen wie z.B. Makrophagen und dendritische Zellen durch Lipopolisaccharid (LPS) aus gram-negativen Bakterien aktiviert werden. In den 90er Jahren konnte man sowohl bei den Fruchtfliegen *Drosophila*, die nur ein angeborenes Immunsystem besitzen, als auch bei Mäusen diese Funktionen in Zusammenhang mit einer Rezeptorgruppe, den Toll-like Rezeptoren, bringen (Übersichtsarbeit: Janeway und Medzhitov, 2002; Takeda und Akira, 2005). Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, sie sind transmembranär gelegen, manche TLRs liegen extrazellulär, manche intrazellulär. Der Name „Toll-like“ kam dadurch zustande, dass man ein dem Toll-Rezeptorprotein ähnlichen Baustein in den TLRs fand. Der Name Toll-like Rezeptor wurde von der Tübinger Biologin, Christiane Nüsslein-Volkhard, gewählt, weil Fliegen ohne diesen Rezeptor „toll“, d.h. ungewöhnlich aussahen (Übersichtsartikel: O'Neill, 2005). Der Rezeptor ist zuständig für die Differenzierung des Rückens vom Bauch bei Fliegenembryonen (Janeway und Medzhitov, 2002; O'Neill, 2005). Mittlerweile wurden insgesamt 13 TLRs entdeckt. Am besten erforscht sind TLR2 und TLR4 (Akira et al., 2006; Kawai und Akira, 2006). Tabelle 1 enthält die wichtigsten TLRs, ihre Liganden und den Ursprung ihrer Liganden. Die Erkennung von fremden Strukturen findet durch sogenannten PAMPs, den pathogen-associated molecular patterns wie z.B. LPS oder bakterielle CpG DNA statt (Janeway und

Medzhitov, 2002). Diese PAMPs sind z.B. Bestandteile von Bakterien oder Viren (bakterielle, virale und fungale Nukleinsäure, fungales B-Glucan, Zellwandkomponenten, das bakterielle Protein Flagellin, Lipopolysaccharid von gramnegativen Bakterien u.a.) und werden von TLRs erkannt. Im Gegensatz zu PAMPs, welche oft für das bakterielle Überleben essentiell sind, spielen DAMPs (damage associated molecular patterns) wie ihr Name schon sagt bei Zellschäden (z.B. bei Nekrose) und sterilen Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle (Newton und Dixit, 2012). DAMPs sind endogene Moleküle, die während Entzündungsreaktionen in den Zellen zu finden sind. Beispiel für DAMPs sind ATP, das Zytokin IL-1 α , β -Defensine und IgG-Chromatin Komplexe. Tabelle 1 zeigt mehrere Beispiele für PAMPs und DAMPs, sowie ihren Angriffspunkt an verschiedene Toll-like Rezeptoren.

PAMP	DAMP	TLR	Adaptor Protein	Transkriptionsfaktor
Diacylierte Lipopeptide	β -Defensin-3	TLR1/2	MyD88, MAL	NF κ B
Triacylierte Lipopeptide		TLR 2/6	MyD88, MAL	NF κ B
	Serum Amyloid A, Neutrophile Elastase, HSP60, HSP70, GP96, Surfactant A und D, Eosinophil-derived Neurotoxin, Biglykan, Versican, Hyaluronsäure, HMBG1, Antiphospholipid Antikörper	TLR2		
Doppelstrang-RNA	mRNA	TLR3	TRIF	IRFs, NF κ B
LPS	Bicycan, Heparan Sulfat, Hyaluronsäure, Neutrophile Elastase, Serum Amyloid A, Oxidiertes LDL, Fibronectin EDA, Fibrinogen, Tenascin C, Lactoferrin, β -Defensin-2, gesättigte Fettsäuren, HMGB1, HSP22, HSP60, HSP70, HSP72, GP96, Lactoferrin	TLR4	MyD88, MAL, TRIF, TRAM	NF κ B, IRFs
Flagellin		TLR5	MyD88	NF κ B
Guanosin- und uridinreiche Einzelstrang-RNA	Antiphospholipid Antikörper	TLR7/8	MyD88	IRFs, NF κ B
Unmethylierte CpG Dinukleotide, Hämoxoin	IgG-Chromatin Komplexe	TLR9	MyD88	IRFs, NF κ B

Tabelle 1: TLRs, DAMPS und PAMPs (nach Chotirmall et al., 2011), Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis und Text

1.4 TLR9 - Aktivierung und Signaltransduktion

Toll-like Rezeptor 9, der Rezeptor um den es in dieser Arbeit geht, ist ein im Endosom lokalisiertes Protein, das bakterielle CpGs und mitochondriale DNA erkennt (Zhang et al., 2010). Während die meisten anderen TLRs wie z.B. auch TLR4 auf der Plasmamembran (Zelloberfläche) liegen, wandert TLR9 bei Zellaktivierung ins Endosom (Ahmad-Nejad et al., 2002; Heil et al., 2003; Latz et al., 2004, siehe Abbildung 1). Dies geschieht entweder auf direktem Weg durch Fusion oder über die Plasmamembran mit anschließender Endozytose (Latz et al., 2004).

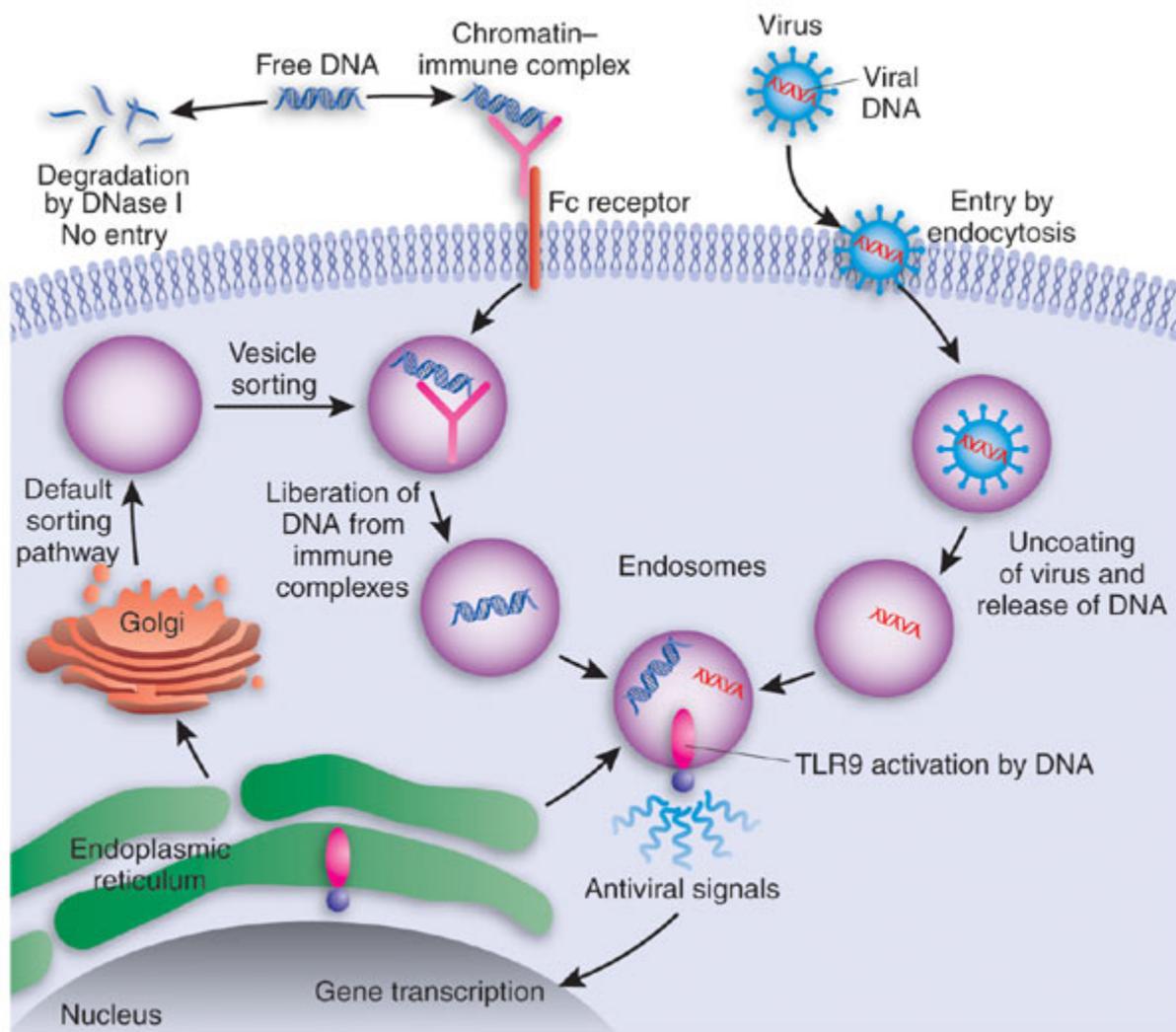


Abbildung 1: TLR9 Aktivierung nach Bauer (2006), Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis und Text

Schon länger ist bekannt, dass unmethylierte CpG DNA immunstimulatorische Effekte hat (Krieg et al., 1995; Krieg, 2000). Mittlerweile weiß man, dass TLR9 unmethylierte CpG Motive aus bakterieller DNA erkennt (Hemmi et al., 2000). Bedeutend für diese Erkennung ist, dass bakterielle DNA durch das Fehlen von CpG-Methylierungs-Enzymen im Gegensatz zum Eukaryonten-Genom unmethyliert ist (Krieg, 2000). Die unmethylierten CpG Motive sind von spezifischen Sequenzen umgeben, die für die Aktivierung des Rezeptors mitverantwortlich sind (Bauer et al., 2001, Hemmi et al., 2000; Krieg et al., 1995). Ebenso ist bekannt, dass TLR9 mitwirkt an der Erkennung verschiedener Viren (Krug et al., 2004), (siehe auch Abb. 2).

TLR9 erkennt sowohl DNA von gramnegativen als auch von grampositiven Bakterien (Hemmi et al., 2000).

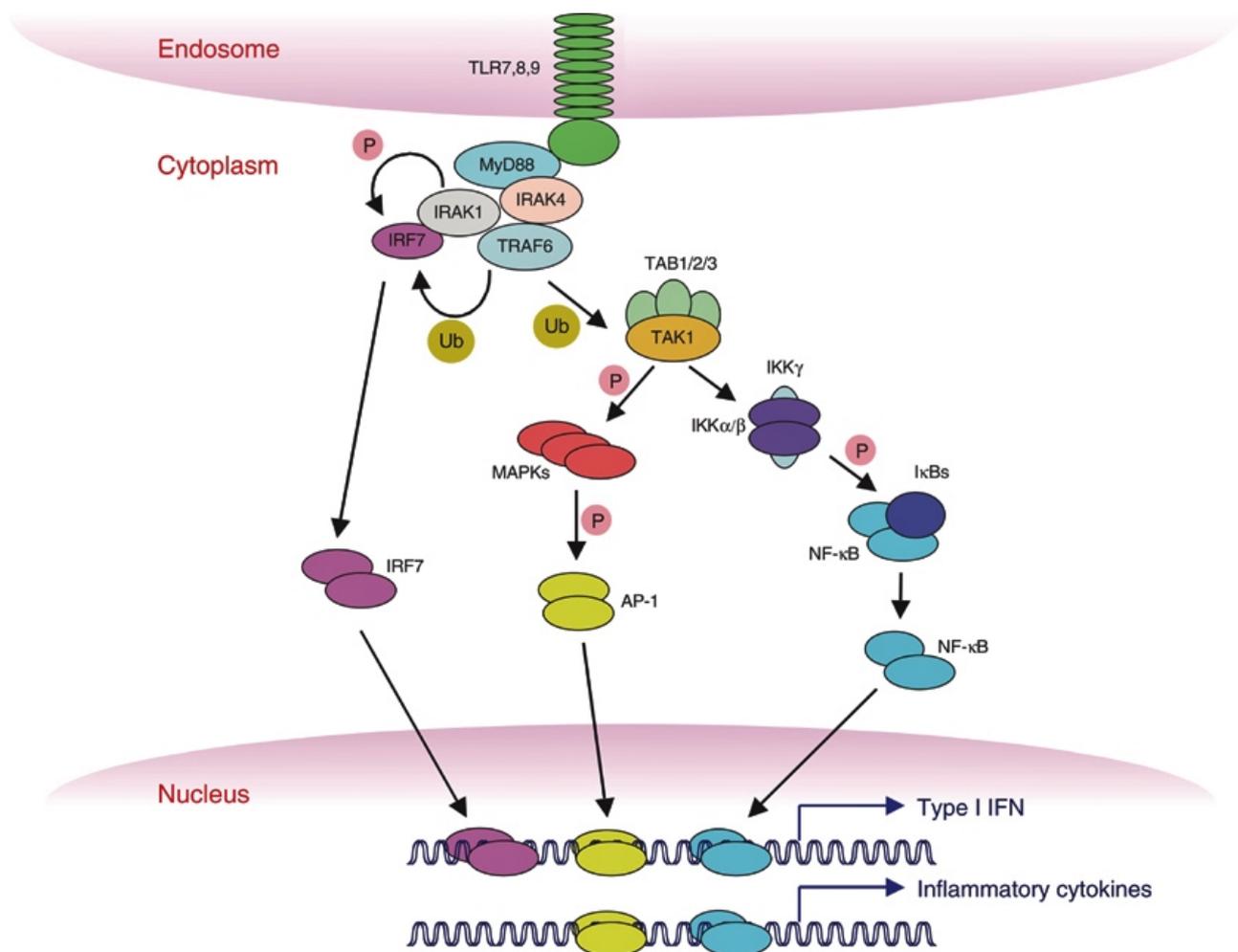


Abbildung 2: Signaltransduktionsweg von TLR9, Kawai und Akira (2006), Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis und Text

Bindet nun bakterielle DNA über CpG-Repeats an TLR9, bildet sich ein TLR9-Dimer in der endosomalen Membran, was zu einer Konformationsänderung führt. Dies führt zu einer Bindung des zytoplasmatischen „myeloid differentiation marker 88“, dem MyD88, an die TLR9 Rezeptoren (Medzhitov et al., 1998). An diesen Komplex lagern sich verschiedene „Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinasen“, die IRAKs (siehe Abbildung 2), an. Sie phosphorylieren sich untereinander und führen somit zu einem „Rekrutment“ des „Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten Faktor-6“, dem TRAF6. Es folgt eine Kaskade: „Transforming growth factor-activating kinase-1“ (TAK1) verbindet sich mit „transforming growth factor-activating kinase-1 binding protein“ (TAB) und führt zu einer Aktivierung der „inhibitory- κ B-kinase“ (IKK). Der „Inhibitor von κ B“ (IKB) wird phosphoryliert und bewirkt, dass der Nukleäre Faktor κ B (NF κ B) in den Nukleus transloziert (Wang et al., 2001). Der Weg kann statt über NF κ B zu laufen auch über die Aktivierung einer „Mitogen-aktivierten-Proteinkinase ablaufen“. Dabei wird der Transkriptionsfaktor AP-1 phosphoryliert und transloziert in den Nukleus. Sowohl NF κ B als auch AP-1 fungieren als Transkriptionsfaktoren und steuern die Expression inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-12.

Im Nukleus reguliert NF κ B sowohl die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α als auch des Effektormoleküls iNOS (Übersichtsartikel: Baeuerle und Baltimore, 1996; Baldwin Jr., 1996; Islam et al., 2013; Wu et al., 2013). NF κ B spielt bei der Immunantwort eine besondere Rolle, da er viele Zytokine und Chemokine aktiviert (Baldassare et al., 1999; Burns et al., 1998; Cario et al., 2000; O'Neill und Greene, 1998; Takeuchi et al., 2000; Wesche et al., 1997; Zheng et al., 2013).

1.5 Einfluss von Toll-like Rezeptoren auf Herzmuskelhypertrophie

Durch NF- κ B bzw. AP-1 werden Zytokine freigesetzt (s.o.). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten beweisen, dass Virulenzfaktoren wie LPS, bakterielle DNA bzw. CpG-DNA (verschiedene PAMPs) durch Bindung an TLRs zur kardialen Expression von TNF, IL-6 und IL-1 β führten (Baumgarten et al., 2001; Dibbs et al., 1999; Knuefermann et al., 2008; Muller-Werdan et al., 1998; Werdan und Muller-Werdan, 1996). Über diese PAMPs wird also kardial eine Entzündung ausgelöst.

Ein ähnliches Verhalten konnte für TLR9 gezeigt werden (Boehm et al., 2013): TLR9-defiziente Mäuse hatten bei einer durch 1668-Thioat (TLR9 Agonist) induzierten Sepsis und folgender Kardiodepression ein deutlich besseres Outcome als Vergleichstiere der Kontrollgruppe. Es kam zu einer Erhöhung von TNF-, IL1 und IL6 mRNA Expression. Wurden der Kontrollgruppe zusätzlich H154 Thioat (TLR9 Inhibitor) verabreicht, so hatte dieses eine kardioprotektive und mortalitätssenkende Wirkung. Gao et al. konnten 2013 am Mausmodell zeigen, dass durch vorherige Aktivierung von TLR9 (mittels CpG-Oligonukleotid, einem TLR9 Ligand) eine kardiale Dysfunktion in einer nach Applikation von CpG-ODN induzierten polymicrobialen Sepsis abgeschwächt werden konnte (Gao et al., 2013). Dieser Effekt kam durch Aktivierung der PI3Kinasen/Akt und ERK signaling zustande.

Ebenso konnte aber auch gezeigt werden, dass eine Druckbelastung des Herzens oder eine Ischämie zur kardialen Freisetzung der genannten Zytokine führte (Baumgarten, 2002; Kurrelmeyer et al., 2000). Es konnte auch beobachtet werden, dass TLR4-defiziente Mäuse kleinere myokardiale Infarktzone im Ischämie/Reperfusionversuch zeigten (Kim et al., 2007; Oyama et al., 2004; Stapel et al., 2006).

Es existieren mehrere Studien bezüglich des Einflusses von TLR4 auf eine Herzmuskelhypertrophie: Liu et al. konnten 2008 zeigen, dass eine vorherige Gabe von TLR4 Agonisten vor einer kardiovaskulärer Hypertrophie und Fibrose schützten (Liu et al., 2008). Möglicherweise wird durch die vorherige Gabe von TLR4 Agonisten die Entzündungsreaktion durch DAMPs reduziert. Ha et al. wiesen 2005 nach, dass TLR4-defiziente Mäuse eine verminderte Hypertrophieantwort auf Druckbelastung zeigten (Ha et al., 2005a). Da DAMPs über Bindung an TLR4 die kardiale Hypertrophie vergrößern, ist dieser Effekt bei TLR4-Defizienz weniger zu beobachten.

Ebenso konnte nach CpG-OLN Vorbehandlung eine myokardiale Ischämie/Reperfusionsschaden abgeschwächt werden (Cao et al., 2012; Markowski et al., 2013). Auch bei TLR9-Defizienz konnte ein verminderter Ischämie/Reperfusionsschaden gezeigt werden (Markowski et al., 2013). Ein mögliches DAMP, welches an TLR9 bindet, wäre mitochondriale DNA.

Eine Präkonditionierung mit TLR4 und TLR9 Antagonisten vermindert den Ischämie/Reperfusionsschaden: Durch Vorbehandlung von Mäusen mit Eritoran, einem TLR4 Antagonisten, wurde die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie nach erhöhter Druckbelas-

tung vermindert, die Ausschüttung von BNP abgeschwächt, die Expression proinflammatorischer Zytokine reduziert und Remodeling-Mechanismen verhindert (Ehrentraut et al., 2011a). Der gleiche Effekt konnte auch bei TLR9 beobachtet werden (Markowski et al., 2013).

Unter Berücksichtigung der oben stehenden Ergebnisse stellen wir die Hypothese auf, dass TLR9-Defizienz möglicherweise auch die Entwicklung der kardialen Hypertrophie beeinflusst.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Ziele dieses Forschungsprojektes waren,

Zum einen die Bedeutung von TLR9 für die Myokardhypertrophie nach Druckbelastung zu evaluieren

außerdem herauszufinden, ob ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Hypertrophieantwort bei TLR9-defizienten Tieren untereinander oder im Vergleich mit der Kontrollgruppe existierte.

Ebenso sollte untersucht werden, wie die Hypertrophieantwort nach 14 Tagen (im Gegensatz zu anderen noch nicht veröffentlichten Studien, in denen man einen Abstand von 3 Tagen wählte) ausfiel.

Dazu wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere - sowohl eines TLR9-defizienten Stammes als auch eines Vergleichstammes (C57BL/6) - einer Trans-aortalen Kostriktions-OP (TAK) unterzogen und nach 14 Tagen eine Messung der Hämodynamik (sowohl peripher in der Arteria carotis als auch im Herzen) vorgenommen. Daraufhin wurden die Organe entnommen und Herz- und Lungengewicht bestimmt.

Diese Arbeit ist klinisch relevant im Hinblick auf eine bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen beobachtete linksventrikuläre Hypertrophie (induziert durch Hypertonie, Herzklappenerkrankungen, Aortenstenose oder ischämische Erkrankungen). Der Einfluss von TLR9 auf eine Herzmuskelhypertrophie ist von Bedeutung für die Fragestellung, ob TLR9 Agonisten oder Antagonisten in Zukunft eine Herzmuskelhypertrophie

und eine daraus entstehende Herzinsuffizienz abschwächen oder rückgängig machen können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Zum einen wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse der Zuchtlinie C57BL/6 verwendet, die als eigene Nachzucht im Physiologischen Institut der Universität Bonn unter artgerechten Haltungsbedingungen selbst aufgezogen wurden. Dieser Tierstamm wurde ursprünglich von Charles River Deutschland bezogen. Der Tierstamm C57BL/6 war der Wildtypstamm. Dem gegenüber wurden männliche und weibliche TLR9-defiziente Tiere verwendet.

Die TLR9-defizienten (TLR9D) Mäuse waren uns als Brutpaar freundlicherweise von Prof. Shisuo Akira, Osaka Universität, Osaka, Japan, zur Verfügung gestellt worden (Hemmi et al., 2000). Die Tiere hatten einen C57BL/6 Hintergrund.

Die Mäuse wurden in transparenten einzeln belüfteten Käfigen gehalten. Es waren maximal 5 Tiere in einem Käfig. Futter in Form einer Altromin Standarddiät und Wasser standen zur freien Verfügung und wurden regelmäßig gewechselt. Die Mäuse wurden unter einem 12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus gehalten. Die durchgeführten Experimente dieser Arbeit waren von der Bezirksregierung Köln genehmigt.

2.2 Gruppeneinteilung und Versuchsprotokoll

Um sowohl den Einfluss des TLR9 auf die Herzhypertrophie als auch den geschlechtsspezifischen Unterschied am Mausmodell zu erforschen, wurden die Versuchstiere in 8 Gruppen aufgeteilt (s.u.). In den ersten 4 Gruppen wurde der Stamm C57BL/6 verwendet und in den Gruppen 5-8 der Stamm TLR9D (TLR9-defiziente Tiere). Es wurden sowohl eine TAK zur Induktion einer Herzhypertrophie, als auch eine Scheinoperation durchgeführt. Bei der TAK-Operation wurde das Lumen der thorakal gelegenen Aorta auf eine genormte Größe verengt, indem man nach Narkoseeinleitung, Intubation und Thoraxeröffnung einen Seidenfaden um die Aorta platzierte und auf ein bestimmtes Lu-

men verengte. Bei der Scheinoperation (Sham) wurde ebenso der Thorax eröffnet, aber ohne Platzierung des Seidenfadens der Thorax wieder verschlossen.

Außerdem wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse beider Tierstämme verwendet. Die Gruppeneinteilung war wie folgt:

Stamm C57BL/6 :

- Gruppe 1: C57BL/6 Weibchen Trans-Aortale Konstriktions OP(TAK): C57W TAC
- Gruppe 2: C57BL/6 Weibchen Sham (Scheinoperation): C57W Sham
- Gruppe 3: C57BL/6 Männchen TAK: C57M TAC
- Gruppe 4: C57BL/6 Männchen Sham: C57M Sham

Stamm TLR9-defizient (TLR9D):

- Gruppe 5: TLR9 defiziente Weibchen TAK: TLR9D W TAC
- Gruppe 6: TLR9 defiziente Weibchen Sham (Scheinoperation): TLR9D W Sham
- Gruppe 7: TLR9 defiziente Männchen TAK: TLR9D M TAC
- Gruppe 8: TLR9 defiziente C57BL/6 Männchen Sham: TLR9D M Sham

Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der TAK/Sham variierte zwischen 12 und 15 Wochen. Genau 14 Tage (+/- 6 h) nach der TAK/Sham wurde die Messung der Hämodynamik mittels eines Milliar Katheters in erneuter Narkose vorgenommen. Dabei wurde sowohl peripher in der A. carotis dextra als auch zentral im linken Ventrikel verschiedene Parameter erhoben:

peripher:

- Systolischer Druck (SAP)
- Diastolischer Druck (DAP)
- Arterieller Mitteldruck (MABP)

zentral:

- Linksventrikulärer Systolischer Druck (LVSP)
- Linksventrikulärer Diastolischer Druck (LVDP)
- Linksventrikuläre Mitteldruck (LVMD)

- maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt_{max})
- maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min})
- Herzfrequenz (HR)

Daraufhin wurden Herz, Lunge und Tibia wie unten beschrieben entnommen, gewogen/gemessen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Daten der hämodynamischen Messung wurden mit dem Programm Prism 4 for Windows (GraphPad Software, Inc.) ausgewertet.

2.3 *In vivo* Eingriffe

2.3.1 Anästhesie

2.3.2 Trans Aortale Konstriktion (TAK)

2.3.3 Scheinoperation (Sham)

2.3.4 Hämodynamik

2.3.5 Blutentnahme

2.3.6 Organentnahme

Alle Operationen erfolgen unter dem Stereomikroskop in mindestens 10facher Vergrößerung, bei dem Kathetern sogar bis 40fach.

2.3.1 Anästhesie

Die Anästhesie der Tiere erfolgte initial mit 2 % Isofluran Narkosegasgemisch bei einem Flow von ca. 2 Liter O_2/min per inhalationem. Dazu wurden die Tiere in eine Inhalationsbox gesetzt. Nach Beginn der Anästhesie wurde das Körpergewicht bestimmt und die Tiere dann auf dem OP Tisch fixiert. Die Mäuse wurden dort initial mit 2 % Isofluran bei einem Flow von 1 Liter O_2/min über einen Nasenkonus beatmet.

Während der gesamten Narkose wurden die Tiere über ein dem OP Tisch angeschlossenes Wärmebad und eine temperaturabhängige Infrarotlampe, die an einen rektal liegenden Sensor gekoppelt war, auf einer Körpertemperatur von 37°C konstant gehalten. Der Operationstisch enthielt ebenso eine Absaugvorrichtung, um überschüssiges Narkosegas abzusaugen, sowie ein Beatmungsgerät, um die Tiere kontrolliert mit einem bestimmten Atemzugvolumen zu beatmen.

Abhängig von der geplanten Operation (TAK/Sham oder Hämodynamik) wurden die Tiere intubiert. Bei Eingriffen mit Eröffnung des Thoraxes, wie es bei der TAK oder Sham der Fall ist, war eine Intubation erforderlich, da die Lunge auf Grund des gesetzten Pneumothoraxes und der elastischen Zugkräfte der Lunge sonst kollabieren würde. Vor der Intubation musste die Trachea freipräpariert werden, indem man nach einem ca. 1-2 cm großen Hautschnitt die Glandulae mandibulares auseinanderzog und die praetracheale Muskulatur mit einer schmalen Pinzette nach lateral mobilisierte (Abbildung 3).

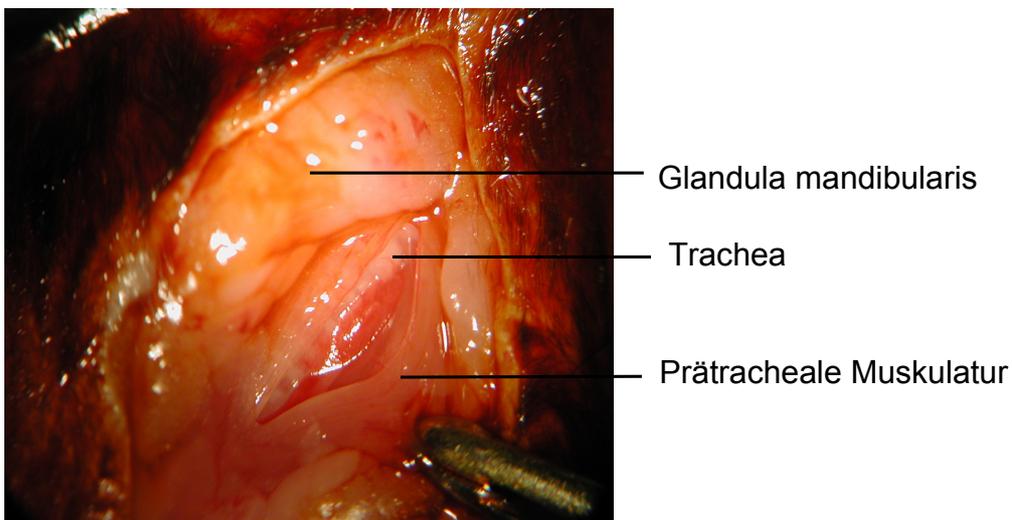


Abbildung 3: OP-Situs: Mobilisieren der prätrachealen Muskulatur vor der Intubation

Nach Einführen eines ca. 1 mm durchmessenden Tubus in die Trachea unter Sicht, wurde die Maus mit einem 2 % Isofluran-Gemisch bei 1 Liter O_2 /min (wie vorher), mit einem Volumen von ca 200 Mikroliter/min (abhängig von dem Körpergewicht) und einer Frequenz von ca 110 Atemzügen/min beatmet.

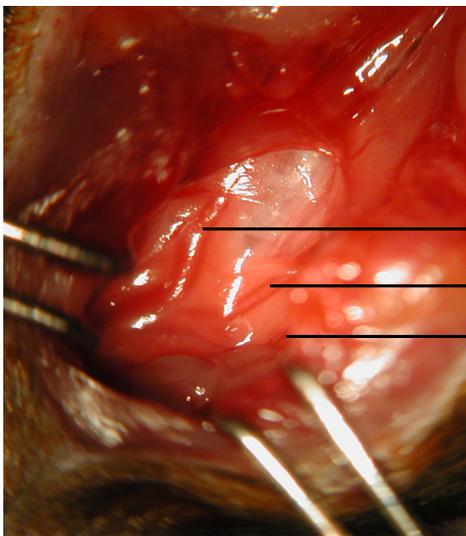
Bei der Messung der Hämodynamik war eine Intubation nicht erforderlich, da ein Katheter durch die A. carotis dextra ohne Eröffnung des Thorax ins Herz eingeführt wurde. Die Spontanatmung blieb während der ganzen Operation erhalten. Da Isofluran - wenn auch weniger als andere Narkosegase - blutdrucksenkend wirkt, wurde die Messung der Blutdrücke in möglichst leichter Narkose vorgenommen. Nach der Platzierung des Katheters (s.u.) wurde das Narkosegasgemisch auf 1 % Isofluran gedreht, der Flow auf ca. 4-6 Li-

ter O₂ hochgedreht und nach mindestens 3 minütigem Anfluten bei Isofluran 1 % und einem O₂ Flow von 1 l/min gemessen.

2.3.2 Trans-Aortale Konstriktion

Die Maus wurde nach Narkoseeinleitung mit 2 % Isofluran auf einem Operationstisch (Eigenbau Physiologisches Institut) festgespannt. Bei TAK und Sham werden vor der Intubation 1,2 ml Temgesic (Buprenorphin)-Lösung/20 g Körpergewicht intraperitoneal zur Analgesie injiziert, um besonders den postoperativen Schmerz zu dämpfen.

Nach der Intubation (s.o.) wurde der Thorax eröffnet, indem sowohl Clavicula als auch 1. und 2. Rippe links parasternal mit einer OP-Schere durchtrennt wurden. Mittels zweier Retraktoren wurde der Brustkorb auseinander gehalten, so dass man Thymus und den darunter liegenden Aortenbogen erreichen konnte. Der zweilappige Thymus wurde in der Mitte auseinander gezogen und der Aortenbogen freipräpariert, so dass die drei Abgänge Truncus brachiocephalicus, Arteria carotis communis sinistra und Arteria subclavia sinistra sichtbar waren (Abbildung 4).



Truncus brachiocephalicus
A. carotis communis sinistra
A. subclavia sinistra

Abbildung 4: OP-Situs: Aortenbogen mit Abgängen der Arterien

Die TAK sollte zwischen Truncus brachiocephalicus und A. carotis communis sinistra erfolgen.

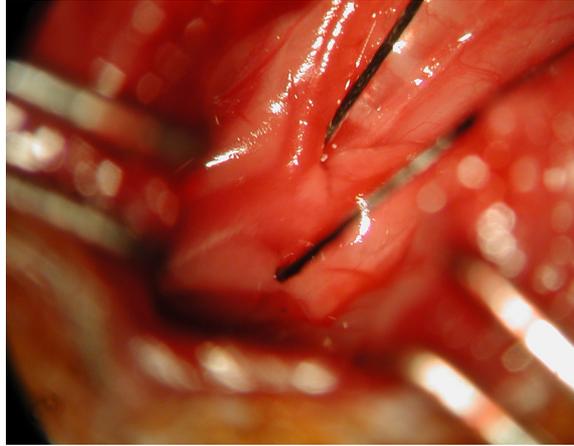


Abbildung 5: Implantation des Fadens

Dazu wurde nach Mobilisation des Aortenbogens mittels einer schmalen Pinzette ein 5/0er Seidenfaden unter der Aorta an genannter Stelle durchgeführt (Abbildung 5). Es wurden zwei Schlaufen in dem Faden gemacht, um ihn nachher schnell verknoten zu können. Zwischen Aortenbogen und locker umgelegten Seidenfaden wurde ein kurzes Stück einer 27 G Kanüle gelegt, die als Platzhalter fungierte, um nach der TAK noch dieses Lumen in der Aorta zu erhalten (Abbildung 6)

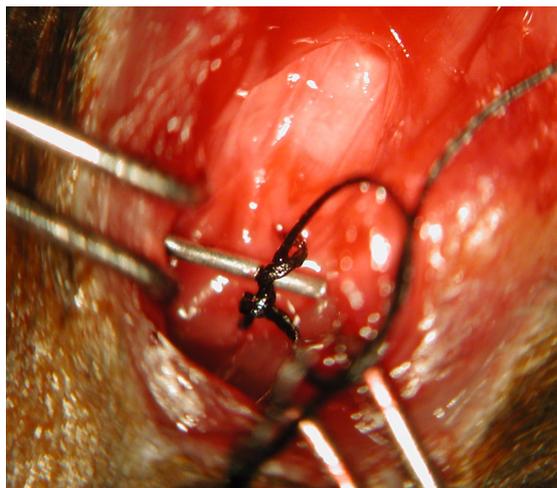
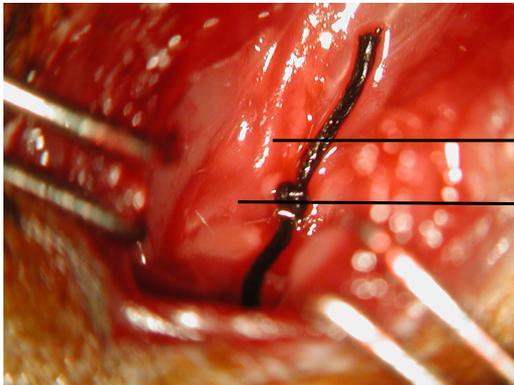


Abbildung 6: Kanüle als Platzhalter

Danach wurden die Schlaufen bis zum Anschlag zugezogen und ein Knoten gebunden. Sofort wurde die 27 G Kanüle entfernt, so wurde der Blutfluss aufrecht erhalten. Abbildung 7 zeigt den Faden nach Implantation.



Truncus brachiocephalicus

Aortenbogen mit Faden

Abbildung 7: Implantierter TAK-Faden am Aortenbogen

Der Thymus wurde wieder in seine ursprüngliche Position gezogen, die Retraktoren entfernt und der Thorax mit zwei Einzelheftnähten mit 6/0 (oder 4/0) Prolenefaden verschlossen.

Nach fortlaufender Hautnaht mit 6/0 Prolene unter nur noch 1 % Isofluran zur Narkoseausleitung wurde die Maus unter Beatmung mit 100 % Sauerstoff nach Einsetzen der Spontanatmung und Bewegung extubiert und eventuell noch in der Narkosekammer mit 100 % Sauerstoff nachbeatmet.

2.3.3 Sham (Scheinoperation)

Hier erfolgte das gleiche Vorgehen wie bei der TAK mit der Ausnahme, dass man nach dem Freipräparieren des Aortenbogens keinen Faden unter dem Aortenbogen durchzog, sondern nach kurzem Berühren des Aortenbogens (um die Manipulation der TAK nachzuempfinden) den Thorax und die Haut wieder verschloss.

2.3.4 Hämodynamik

Zwei Wochen nach der TAK/Sham erfolgte die Messung der Hämodynamik. Ziel war es, sowohl peripher als auch zentral im linken Ventrikel Blutdrücke, Anstiegsgeschwindigkeiten, Herzfrequenz u.a. zu messen, um sowohl den Erfolg der TAK zu prüfen als auch zu evaluieren, ob es bei diesen Parametern signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (besonders C57 vs. TLR9-Defizienz und weiblich vs. männlich) gab. Vor der Messung der Hämodynamik wurde noch ein EKG abgeleitet und der Katheter in einem Eichgerät geeicht. Dazu wurde der Katheter in eine flüssigkeitsgefüllte Druckkammer gelegt, diese abgedichtet und ein Druck von 100 mmHg aufgebaut und wieder auf 0 mmHg abgelassen. Das Eichgerät war mit dem Druckmessprogramm Charts 6 für Windows eines Computers gekoppelt, so dass bei 0 und 100 mmHg geeicht werden konnte.

Nach dem erneuten Hautschnitt wurde die A. carotis communis dextra aufgesucht und freipräpariert (cave N. vagus). Dieses war am leichtesten dadurch zu erreichen, dass man rechts der prätrachealen Muskulatur in die Tiefe stumpf freipräparierte bis die pulsierende A. carotis, teilweise bedeckt von Ästen der V. jugularis, sichtbar wurde. Die Arterie wurde cranial mit einem Knoten abgebunden, caudal mit einer Schlinge und einem Nadelhalter unter Zug gebracht, so dass kein Blut mehr durch den freipräparierten Abschnitt fließen konnte. Außerdem wurden noch zwei Schlaufen als Halterung für den Katheter um die A. carotis geschlungen (siehe auch Abbildungen 8, 9 und 10). Daraufhin wurde mit einer kleinen Augenschere möglichst weit cranial (aber kaudal des Knotens) eine kleine Inzision in die A. carotis gesetzt, die vordere Wand der A. carotis mit einer umgebogenen Nadel hochgehalten und der Katheter in die Arterie eingeführt (Abbildung 8). Nachdem er mit mindestens einer Schlaufe fixiert war (Abbildung 9), konnte die kaudale Schlinge gelockert werden und der Katheter vorgeschoben werden (Abbildung 10).



Abbildung 8: Einführung des Katheters



Abbildung 9: Fixierung des Katheters



Abbildung 10: Verschieben des Katheters

Anhand der Druckkurven (besonders am diastolischen arteriellen Druck) konnte bestimmt werden, ob man sich peripher oder zentral befand. Nach Reduktion der Narkose (s.o.: Isofluran 1 %) wurde peripher für mindestens 8 Minuten gemessen. Die Messungen erfolgten bei 36 °C Körpertemperatur, wobei eine Infrarotlampe an einen rektal liegenden Sensor gekoppelt war. Diese erlosch, sobald die optimale Messtemperatur erreicht war. Nach der peripheren Messung wurde versucht, den Katheter ins Herz zu schieben, um den Blutdruck auch im linken Ventrikel zu bestimmen. Geführt wurde der Katheter entweder mit der Hand oder einer eigens dafür gebauten Pinzette (Eigenbau Physiologisches Institut). Die Narkose wurde für diese Manipulation wieder vertieft auf 2 % Narkosegasgemisch. Da der Katheter blind geführt wurde, stellte sich manchmal die korrekte Platzierung im Herzen als schwierig heraus, weil der Katheter einen kleinen Bogen nach links dorsal nehmen und die Aortenklappe durchdringen musste. Dieses Hindernis ließ sich manchmal durch leichten Zug an der A. carotis dextra beheben. Sobald der linke Ventrikel erreicht war sank der diastolische arterielle Druck (DAP) auf Werte unter 15 mmHg und die Druckpulscurve war nicht mehr dikrotisch. Es wurden der linksventrikuläre systolische Druck (LVSP), der linksventrikuläre diastolische Druck (LVDP), die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}), die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) und die Herzfrequenz (HR) gemessen. Nach mindestens 8 minü-

tiger Messung im linken Ventrikel (LV) wurde die Narkose vertieft und der Katheter zurück gezogen und aus der A. carotis entfernt.

2.3.5 Blutentnahme

Sofort nachdem der Katheter entfernt wurde, konnte Blut aus der A. carotis mittels einer 1 ml Einmalspritze entnommen werden. Daraufhin wurde die Probe für ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit das Blut gerinnen konnte, da man das Serum und nicht das Plasma (mit noch vorhandenen Gerinnungsfaktoren) benötigte. Des Weiteren wurde die Blutprobe für ca. 10 Minuten zentrifugiert, daraufhin wurde das Serum abpipettiert, in ein Eppendorf Gefäß gegeben, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.6 Organentnahme

Nachdem der Tod des Tieres sowohl durch die Blutentnahme als auch durch zusätzlichen Genickbruch herbeigeführt war, wurden Lungenflügel, Herz und rechte Tibia entnommen und in PBS Lösung gelegt.

Unter dem Stereomikroskop wurden die Lungengefäße abpräpariert und der rechte Ventrikel des Herzens von dem Linken getrennt. Das Septum verblieb an dem linken Ventrikel, so dass der rechte Ventrikel nur aus einem fast dreieckigen Muskellappen bestand. Alle Organe wurden auf einer Feinwaage gewogen und die Tibialänge mit einer Schiebellehre bestimmt. Anschließend wurden auch die Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4 Materialien

2.4.1 Materialien für die Tierhaltung

Einstreu:	Altromin-Tiereinstreu-Granulat
Futter:	Altromin-Standarddiät Maus und Ratte, Altromin GmbH und Co. KG, Lage-Lippe
Käfige:	Makrolon, Typ II L, Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld
Zuchttiere:	Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld

2.4.2 Geräte

für Operationen

Beatmung:	Endotrachealkanüle Durchmesser 1,0 mm Minivent Typ 845; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Druck-Eichgerät:	Hugo-Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Operationsbesteck:	Verschiedene Scheren, Pinzetten (stumpfe Löffelpinzetten und feine Pinzetten), Nadelhalter (Allgaier Instrumente, Frittlingen)
OP-Mikroskop:	OpMi-1, ZEISS, Oberkochen
OP-Tisch:	Eigenanfertigung der feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Instituts mit angeschlossenem Wärmebad (42 °C); Rhema-Labortechnik, Hofheim
Temperaturregler:	RAPID-Regler, Fa. Hengstler, Aldingen
Thermometer:	Greisinger electronic GmbH, Regenstauf, Durchmesser des Thermometerfühlers: 1 mm
Wundretraktoren:	Eigenanfertigung der feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Instituts

Für Weiterverarbeitung der Proben:

Feinwaage:	Model Voyager, Ohaus, Giessen
Pipetten:	Eppendorf Reference, Eppendorf AG, Hamburg
Reagiergefäß 1,5 ml:	Sarstedt, Nümbrecht

Schieblehre: Fa. Mauser, St. Denis, Frankreich

Zentrifuge: Model 5415R; Eppendorf AG

Messsystem

Auswertung: Prism 4 for Windows, GraphPad Software, Inc., San Diego, USA

Datenverarbeitung: Power Lab Data Acquisition System; ADInstruments, Castle Hill, Australien

Katheter: Millar-Katheter-System - Model SRP-671 mit 1,4-French-Drucksensor, Millar Instruments Inc., Houston, USA

Software: Chart 6 für Windows, Prism 5 (Auswertung), Excel, Microsoft (Tabellenkalkulation)

2.4.3 Verbrauchsmaterialien

Desinfektion: Betaisodona Lösung, Mundipharma GmbH, Limburg

Eppendorf Gefäße: Eppendorf AG

Fäden für Haut-/Muskelnaht:

Vicryl 6/0, Ethicon GmbH Norderstedt

Prolene-Fäden 6/0, 4/0 (monofil) mit atraumatischer Nadel,

Johnson&Johnson, Somerville New Jersey, USA

Medikamente: Temgesic: Essex Pharma GmbH, München

Narkose: Isofluran, Delta Select, Dreieich

Kanülen, 27 G: Braun, Melsungen

Seidenfaden: Seraflex 5/0, Fa. Serag Wiessner, Naila

PBS Lösung: Pufferlösung aus NaCl, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 und Aqua bi dest., pH Wert 7,4, Hersteller Gibco, Life Technologies

2.5 Statistik

Die Ergebnisse der Hämodynamik, der Körper- und Organgewichte und der Tibiallänge wurden in Excel-Tabellen zusammengefasst und Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Programmes Prism 4 for Windows, GraphPad Software, Inc., San Diego, USA, ausgewertet. Signifikanzen wurden mit Hilfe des One-way ANOVA Tests und eines post-hoc Testes nach Newman-Keuls ermittelt. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ galten als signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Tierzahlen

In die Studie gingen 179 Tiere ein (siehe Tabelle 2). 142 Tiere konnten nach 14 Tagen katheterisiert werden. Allerdings konnten von den 142 Kathetermessungen nur 69 Messungen im linken Ventrikel durchgeführt werden, da die Einführung des Katheters blind war und oft kein Vorschieben möglich war.

Tierzahlen und Mortalität

	C57Tw	C57Sw	C57Tm	C57Sm	TLR9DTw	TLR9DSw	TLR9DTm	TLR9DSm	Tierzahl insgesamt
Tierzahl TAK-OP	37	19	27	13	21	13	37	12	179
Gestorben nach TAK	14	0	8	0	4	0	11	0	37
Tierzahl kathetert	23	19	19	13	17	13	26	12	142
Katheter inkl. Herzmessung	8	9	11	7	10	10	7	7	69
Mortalität TAK	0,38	0	0,3	0	0,19	0	0,3	0	

Tabelle 2: Tierzahlen und Mortalität

3.2 Mortalität

37 Tiere starben einige Tage nach der TAK, während nach der Sham-Operation keine Sterbefälle registriert wurden (siehe Tabelle 2). Die Mortalität der TAK-Tiere lag dabei im Durchschnitt knapp unter 30% (29,25%). Vergleicht man die Gruppen untereinander, fällt eine Diskrepanz der Mortalität zwischen C57 Weibchen und TLR9-defizienten Weibchen auf: Während die Mortalität bei C57 Weibchen überdurchschnittlich bei 38% lag, war in der Gruppe TLR9-defizienter Weibchen nur eine Mortalität von 19% zu verzeichnen.

3.3 Körpergewichte

3.3.1 Körpergewicht absolut

Es fällt auf, dass die Körpergewichte der Männchen unabhängig von dem Tierstamm größer sind als die der Weibchen. Abbildung 11 bildet die Körpergewichte der einzelnen Gruppen am Tag der Kathetermessung (14 Tage nach TAK/Sham) ab, so dass die Organgewichte, welche sofort nach der Kathetermessung bestimmt wurden, auf die Körpergewichte normierbar sind.

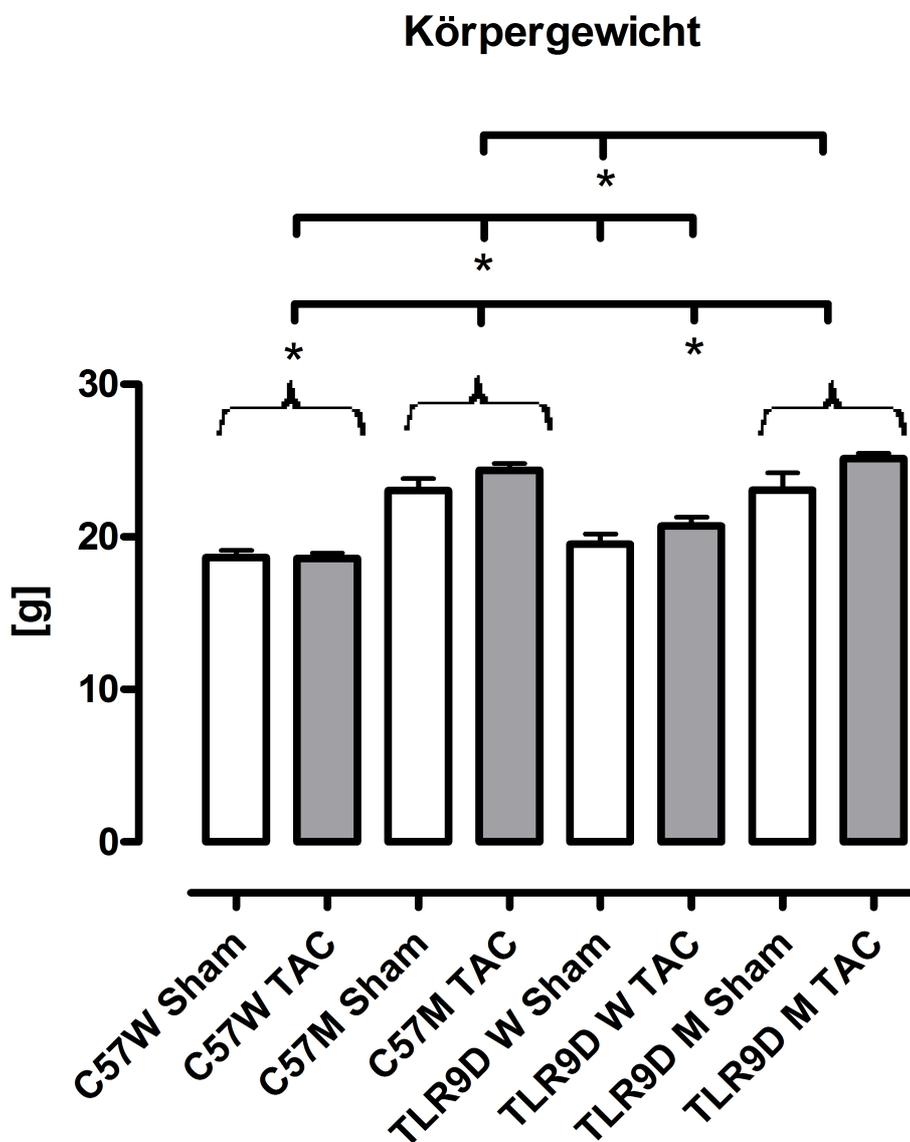


Abbildung 11: Körpergewichte 14d nach Operation

3.3.2 Körpergewichtsänderung vor und nach Operationen (Bodyweight difference)

Das Körpergewicht wurde jeweils vor der TAK- bzw. Scheinoperation bestimmt. Nach 14 Tagen und unmittelbar vor der Messung der Hämodynamik wurden die Versuchstiere erneut gewogen. Aus der Differenz vorher zu nach der Operation wurde der Körpergewichtsdifferenz-Graph erstellt (Abbildung 12).

Es ergaben sich keine signifikanten Veränderungen. Allerdings fällt auf dass die Tiere postoperativ eher an Gewicht verloren, wenn auch nur minimal. Eine Ausnahme stellt die Gruppe C57 Weibchen dar, die minimal an Gewicht zunahm. In dieser Gruppe gab es allerdings die größte Mortalität, so dass hier vermutlich schon eine Selektion der widerstandsfähigsten Tiere stattgefunden hat.

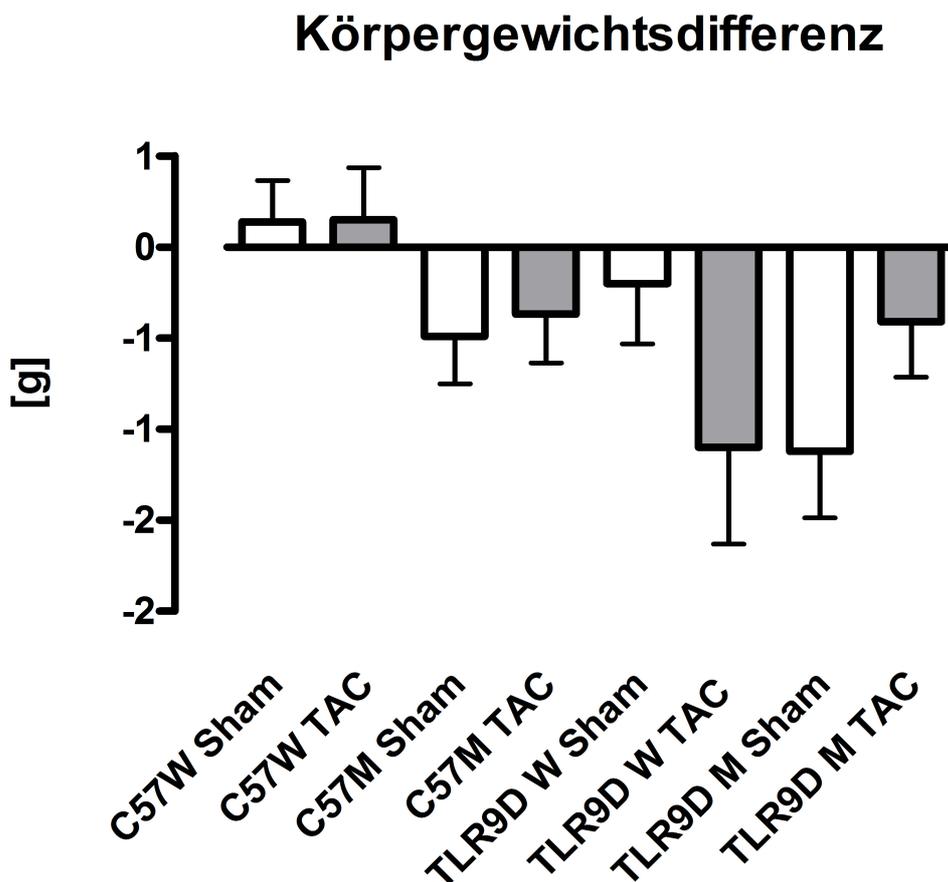


Abbildung 12: Veränderung des Körpergewichtes vor TAK/Sham vs. 14 d nach TAK/Sham

3.4 Gewicht des linken Ventrikels (LV)

Bei dem Vergleich des Gewichtes des linken Ventrikels als Maß für eine Herzhypertrophie ergaben sich die folgenden Ergebnisse: Die LV-Gewichte der Sham Tiere wiesen keine signifikanten Unterschiede untereinander auf. Es war kein Einfluss des Geschlechts oder Genotyps nachweisbar.

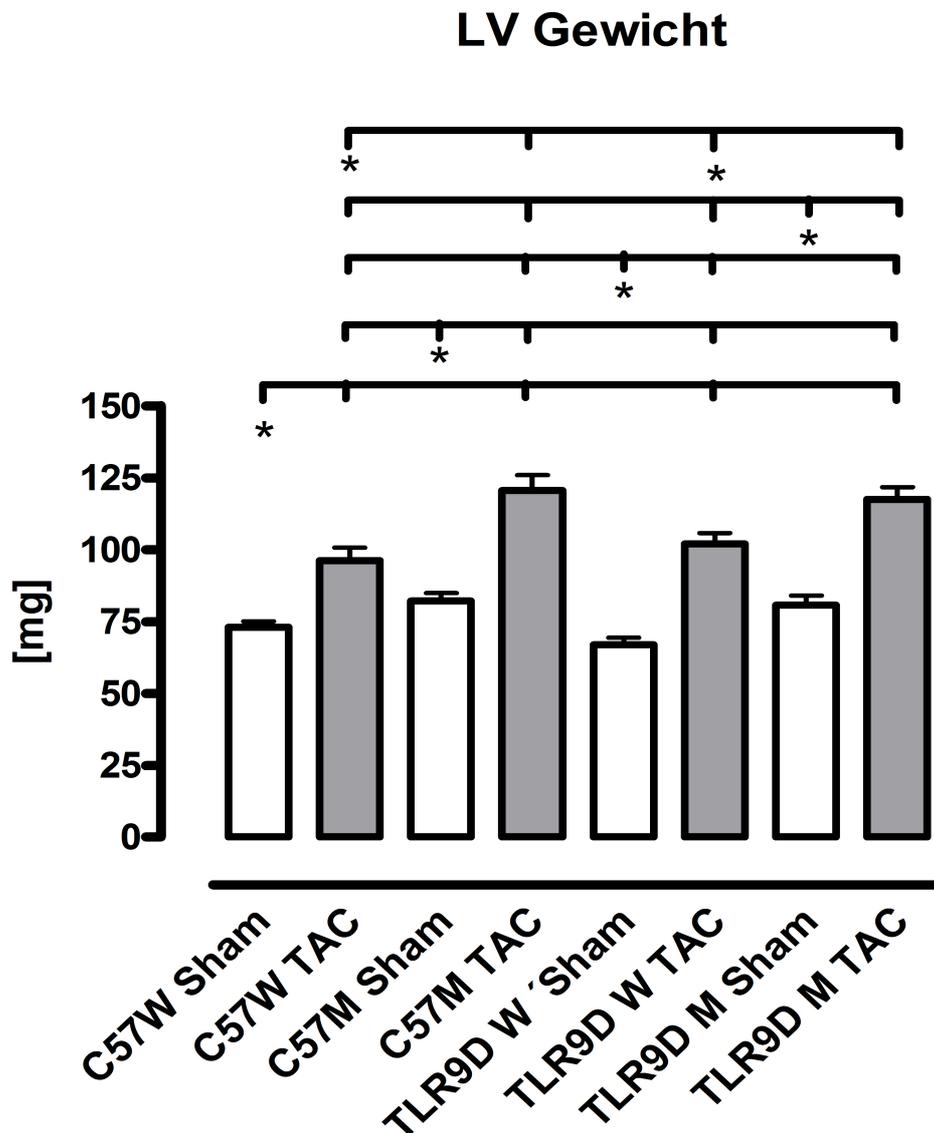


Abbildung 13: Gewicht des linken Ventrikels 14 d nach TAK/Sham

Dagegen bewirkte die TAK-OP bei allen Tieren eine hoch signifikante Erhöhung des linksventrikulären Gewichtes und auch generell war jede TAK Gruppe in der Zunahme des LV-Gewichtes signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (Abbildung 13).

Das LV-Gewicht der TAK-Weibchen war gegenüber allen TAK-Männchen signifikant erniedrigt, also sowohl innerhalb desselben Genotyps als auch im Vergleich zum jeweils anderen Genotyp. Interessanterweise zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen (C57Tw vs. TLR9DTw; C57Tm vs. TLR9Tm).

Errechnet man die Zunahme der linksventrikulären Masse Sham versus TAK, so erhält man im Mittel eine Zunahme der Masse um ca. 44 % (siehe Tabelle 4). In der Gruppe der TLR9 defizienten weiblichen Mäuse war die Zunahme der linksventrikulären Masse im Gegensatz zu den weiblichen Wildtypmäusen erhöht (52 % versus 31,7 %, siehe Tabelle 4).

Zunahme LV TAK vs Sham

	C57m	C57w	TLR9Dm	TLR9Dw	Durchschnitt
LV TAK [mg]	120,62	96,14	117,5	101,98	109,06
LV Sham [mg]	82,13	72,99	80,78	67,08	75,74
Zunahme auf [%]	146,86	131,7	145,47	152,04	144,02
Zunahme um [%]	46,86	31,7	45,47	52,04	44,02

Tabelle 3: Zunahme LV-Masse

3.4.1 Gewicht des linken Ventrikels normiert auf das Körpergewicht (LV/Bodyweight)

Um den Einfluss unterschiedlicher Körpergewichte auszugleichen, wurden die linksventrikulären Gewichte auf das Körpergewicht der Versuchstiere normiert.

Hier ergab sich ebenso wie bei den an der Tibialänge normierten Gewichten eine hohe Signifikanz im Vergleich der TAK-operierten zu den scheinoperierten Tieren ($p < 0,001$). Dieses war in allen Gruppen unabhängig von Geschlecht und Tierstamm gleich signifikant (Abbildung 14).

Durch die Normierung auf das Körpergewicht fallen die geschlechtsspezifischen Unterschiede weg. Dieses liegt an den höheren Körpergewichten der männlichen Tiere im Vergleich zu den weiblichen.

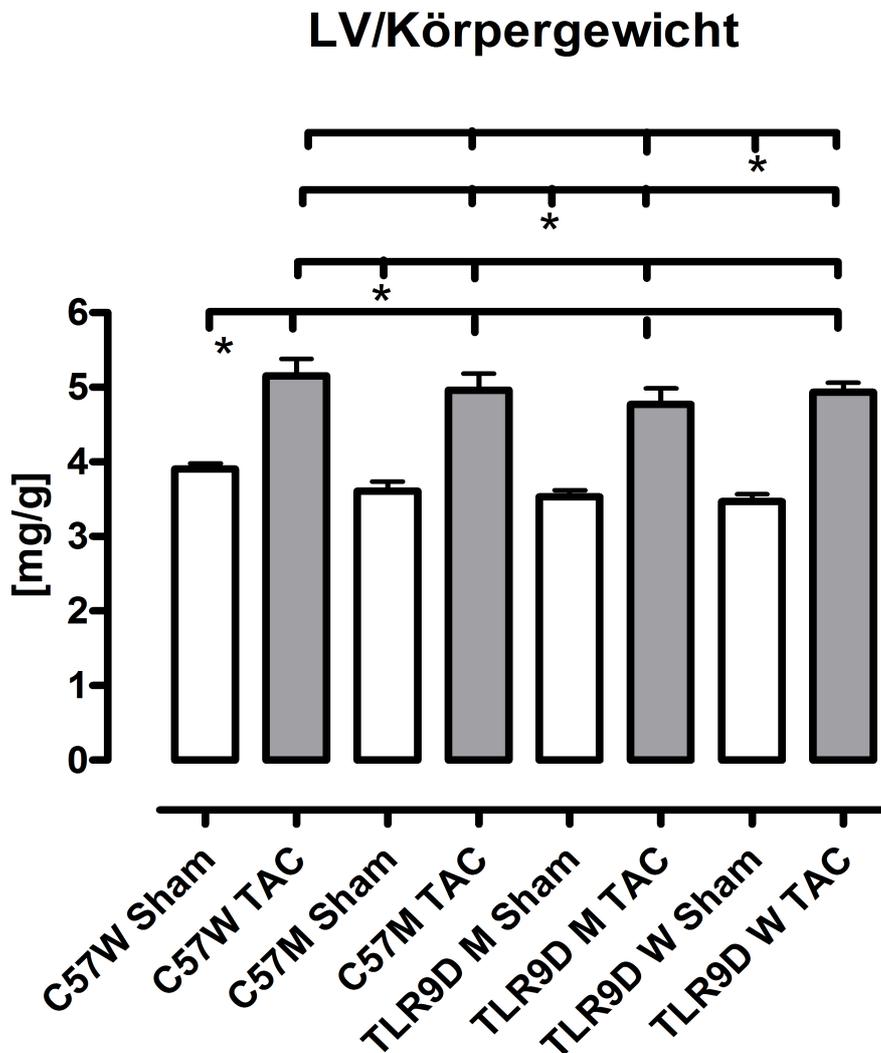


Abbildung 14: Gewicht des linken Ventrikels normiert auf das Körpergewicht

3.4.2 Gewicht des linken Ventrikels normiert auf die Tibiallänge (LV/TL)

Eine weitere Methode der Normierung der Herzgewichte stellt die Division des Gewichts des linken Ventrikels durch die Tibiallänge dar (Abbildung 15). So konnte man das Herzgewicht auf die Körpergröße normiert beurteilen. Im Vergleich zu dem nicht normierten

Gewicht des linken Ventrikels (LV, siehe vorhergehender Graph) ergaben sich keine Änderungen (außer eine etwas geringere Signifikanz im Vergleich TLR9D TAK Weibchen im Vergleich zu C57 TAK Männchen: Die Signifikanz betrug hier $p < 0,01$ statt der vorherigen $p < 0,001$).

Alle anderen Signifikanzen blieben zu 100 % auch nach der Normierung erhalten. Bei dieser Art der Normierung waren also die geschlechtsspezifischen Unterschiede nicht beeinträchtigt.

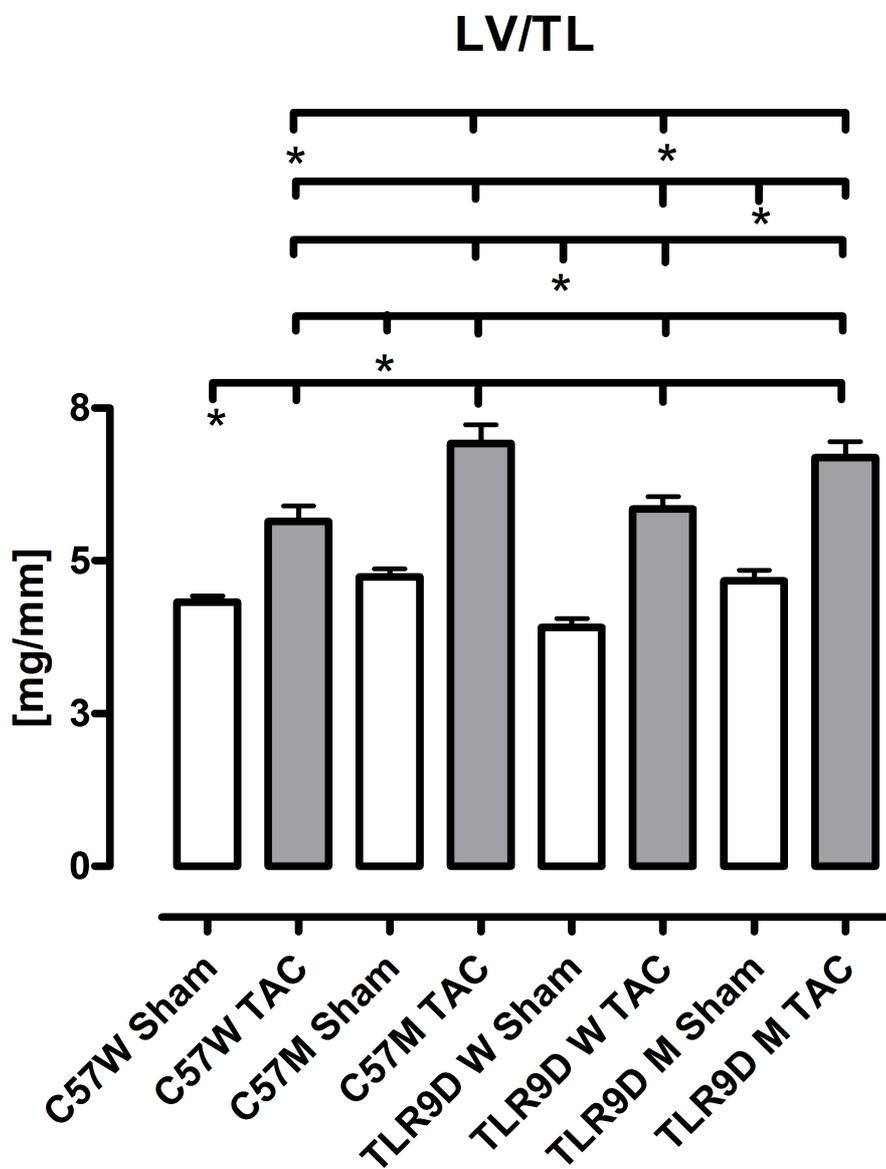


Abbildung 15: Gewicht des linken Ventrikels normiert auf die Tibialänge

3.4.3 Zuwachs des Gewichtes des linken Ventrikels normiert auf die Tibiallänge

Um den Zuwachs des Gewichtes der normierten linken Ventrikel zu bestimmen, wurden die Einzelwerte des LV/TL der TAK-operierten Mäuse durch den Mittelwert der jeweiligen Sham-Gruppe dividiert. Im Vergleich der jeweiligen Gruppen gab es allerdings keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 16), d.h. der Zuwachs wurde weder durch den Genotyp noch durch das Geschlecht beeinflusst.

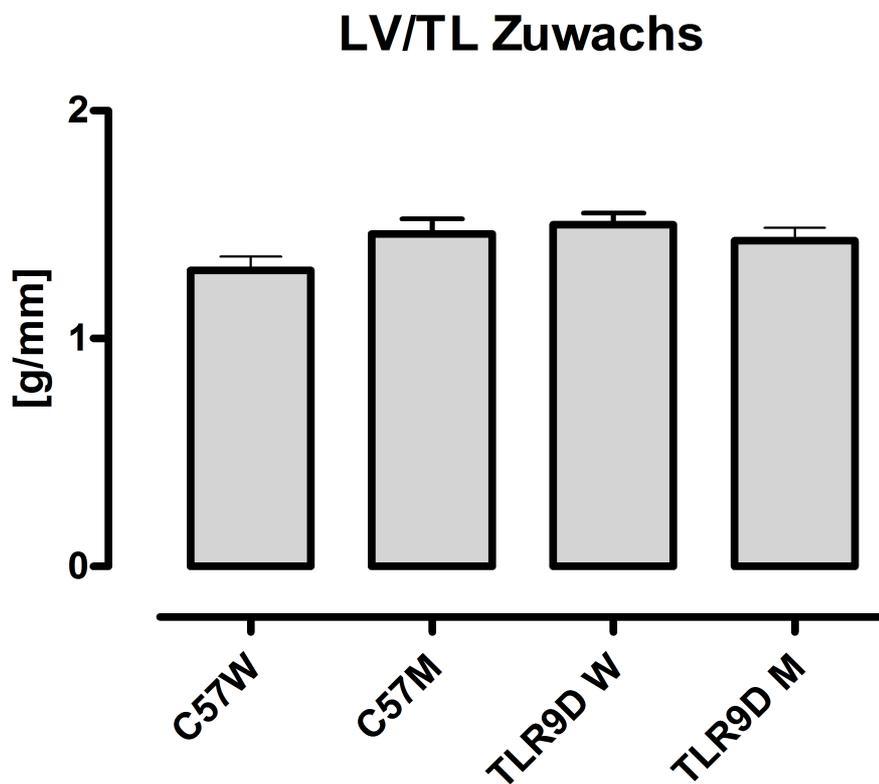


Abbildung 16: Zuwachs des Gewichtes des linken Ventrikels genormt auf die Tibiallänge

3.5 Lungengewicht

Nach Organentnahme wurde auch das Gewicht der Lungen bestimmt. Hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Allerdings zeigt sich als Tendenz, dass die Lungengewichte der TAK-operierten Tiere geringfügig höher waren als die der scheinoperierten Tiere. Außerdem waren die Lungengewichte der männlichen Tiere auch ohne Operation relativ gesehen höher als die der weiblichen Tiere (wie auch das linksventrikuläre Gewicht, siehe vorausgegangene Abbildungen), so dass die Zunahme des Lungengewichtes bei den weiblichen Tieren größer war (Abbildung 17).

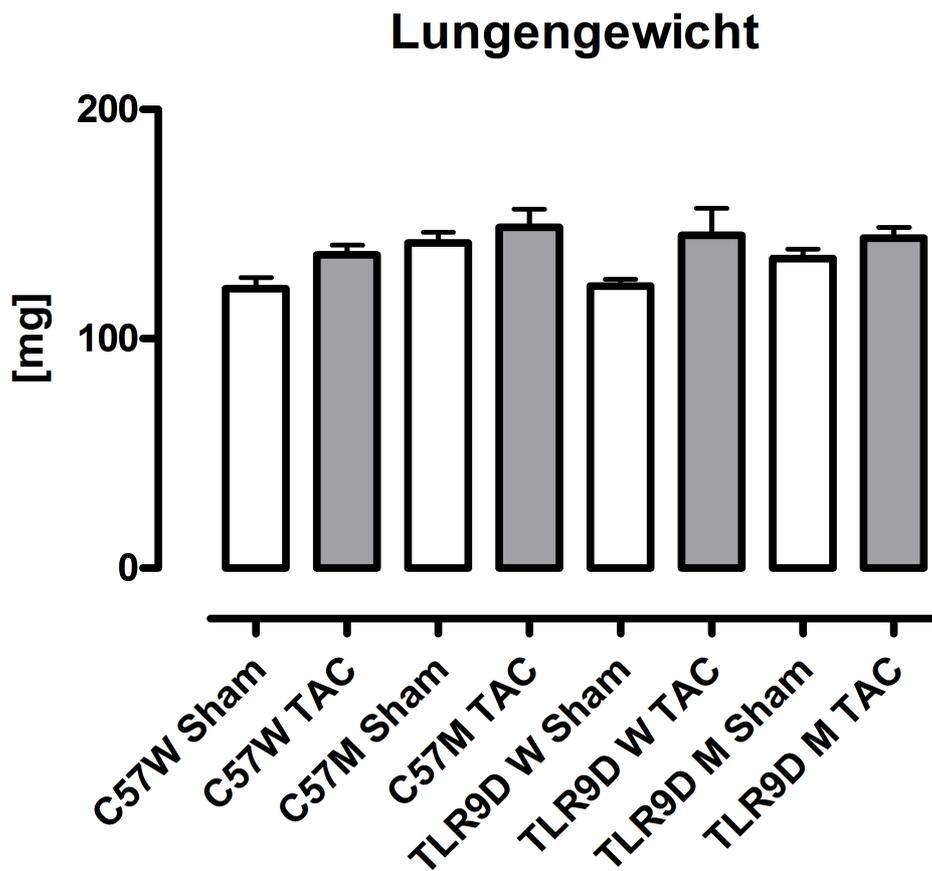


Abbildung 17: Veränderungen des Lungengewichtes

3.6 Herzfrequenz (Heart Rate, HR)

Die Messung der Herzfrequenz peripher ergab Frequenzen um 500 min^{-1} bei den Sham-Tieren. Zwischen den Sham-Gruppen zeigten sich keine Unterschiede. Die TAK-Gruppen zeigten generell eine Tendenz zu höheren Werten (Abbildung 18). Jedoch ergab sich nur bei den C57 TAK Weibchen im Vergleich zu den Sham Gruppen (mit Ausnahme der männlichen TLRD Shams) ein signifikanter Unterschied.

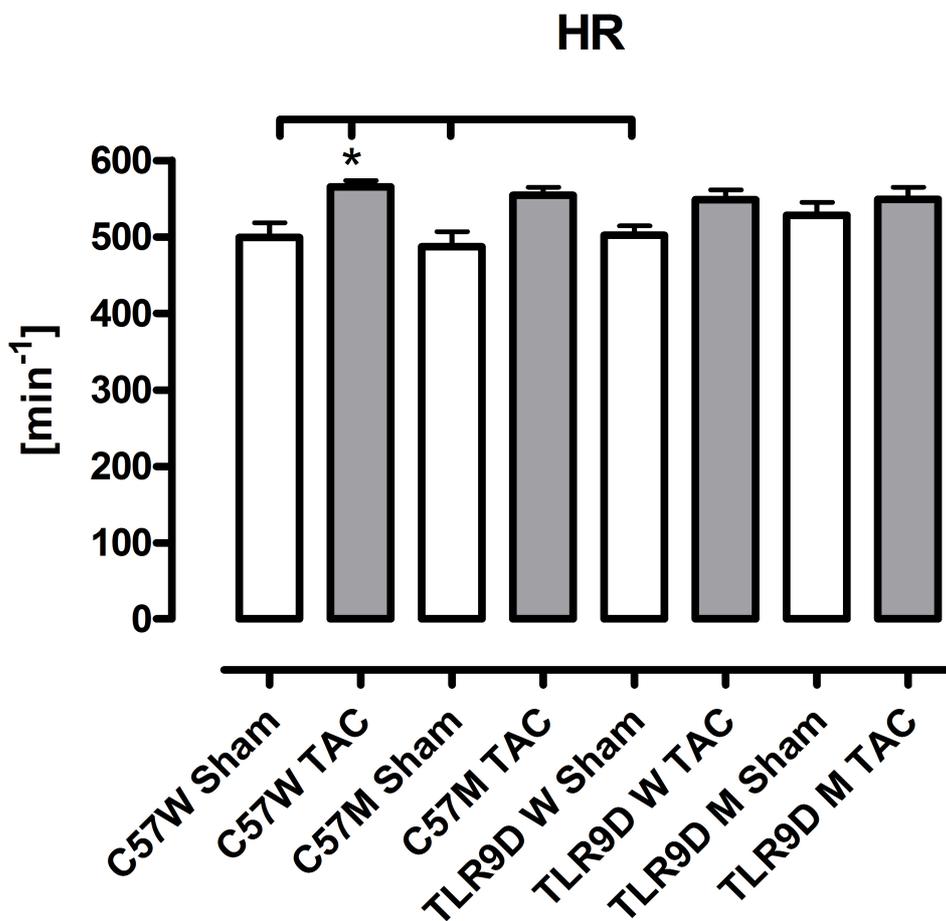


Abbildung 18: Herzfrequenz der Mäuse 14 d nach TAK/Sham

3.7 Systolischer arterieller Blutdruck (SAP)

Generell lag der systolische Blutdruck bei den Sham Tieren zwischen 89 und 130 mmHg (= Vergleich der Einzelwerte. Mittelwerte des systolischen SAP lagen zwischen 102 und 116 mmHg). Signifikante Unterschiede zwischen den Sham-Gruppen gab es nicht. Die TAK führte in allen Gruppen zu einer hochsignifikanten Erhöhung des systolischen Blutdruckes auf Werte um 160 mmHg.

Dieser Effekt war unabhängig von dem Tierstamm (C57 bzw. TLR9D) und Geschlecht, da sich weder zwischen den einzelnen Tierstämmen noch zwischen Männchen und Weibchen signifikante Unterschiede in der hämodynamischen Messung ergaben (Abbildung 19).

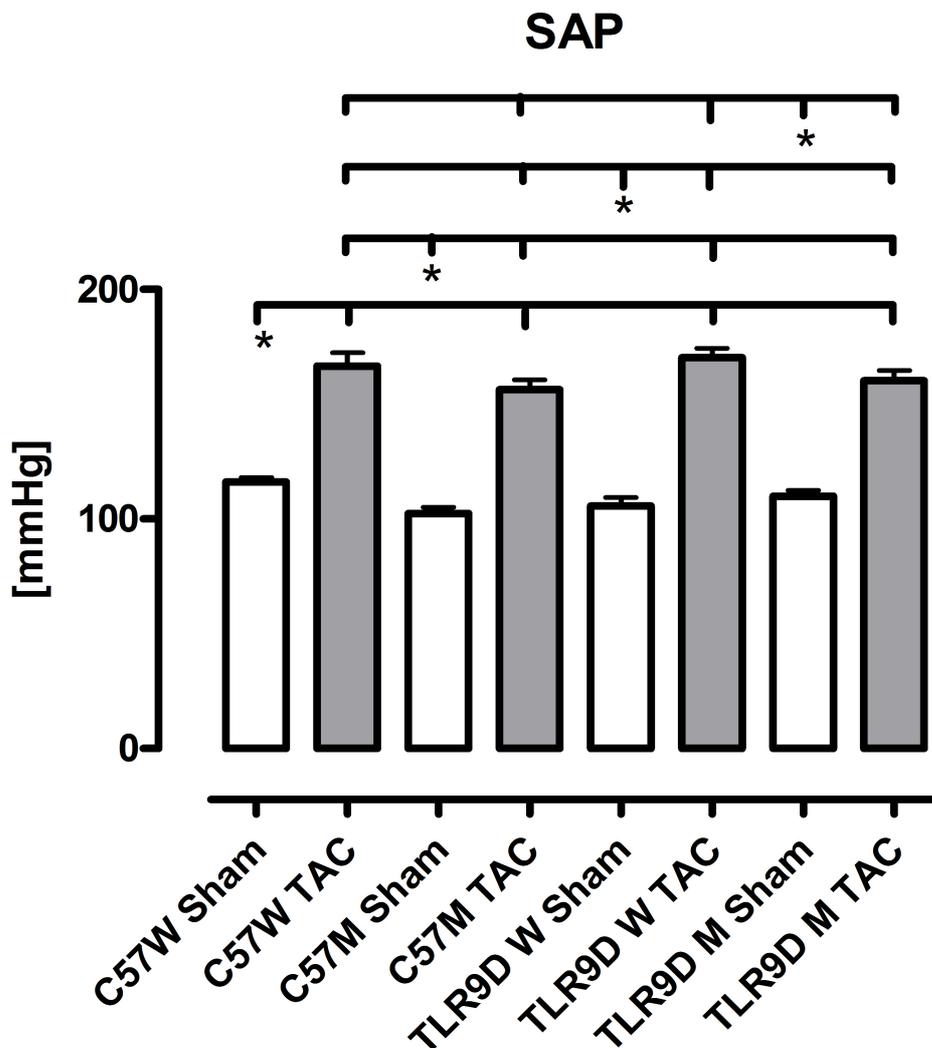


Abbildung 19: Systolischer arterieller Blutdruck (peripher) 14 d nach TAK/Sham

3.8 Diastolischer arterieller Blutdruck (DAP)

Bei den diastolischen arteriellen Blutdrücken zeigt sich lediglich eine Signifikanz zwischen männlichen C57 Sham und weiblichen TAK-Tieren beider Tierstämme (Abbildung 20). Es zeigte sich auch als Tendenz, dass der Blutdruck der TAK-Tiere im Vergleich zu den Sham-Tieren leicht erhöht ist. Außerdem zeigt sich, dass bei TAK-operierten weiblichen Tieren im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, der periphere diastolische Druck etwas höher war als bei den männlichen TAK-Tieren.

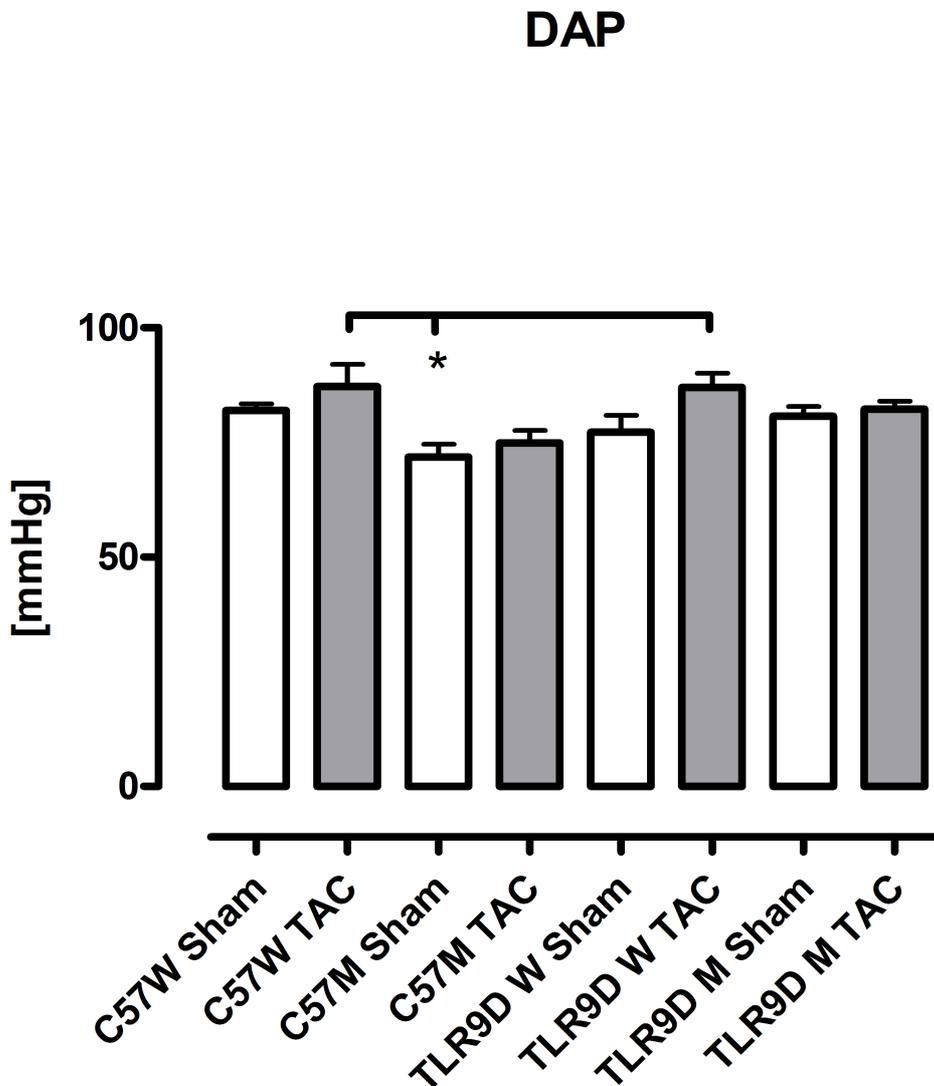


Abbildung 20: Diastolischer arterieller Blutdruck (peripher) 14 d nach TAK/Sham

3.9 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP)

Der mittlere arterielle Blutdruck verhielt sich ähnlich wie der SAP: In allen Gruppen wurde eine signifikante ($p < 0.001$) Zunahme des Blutdruckes bei TAK operierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen gemessen (Abbildung 21). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen C57 und TLR9D Tieren gemessen. Allerdings ergab sich eine schwache Signifikanz ($p < 0.05$) zwischen C57 Männchen und C57 Weibchen:

Die Weibchen zeigten einen höheren mittleren arteriellen Blutdruck als die Männchen dieses Stammes. Dieser Effekt konnte auch bei den Tieren des Stammes TLR9D beobachtet werden, hier war er aber nicht signifikant.

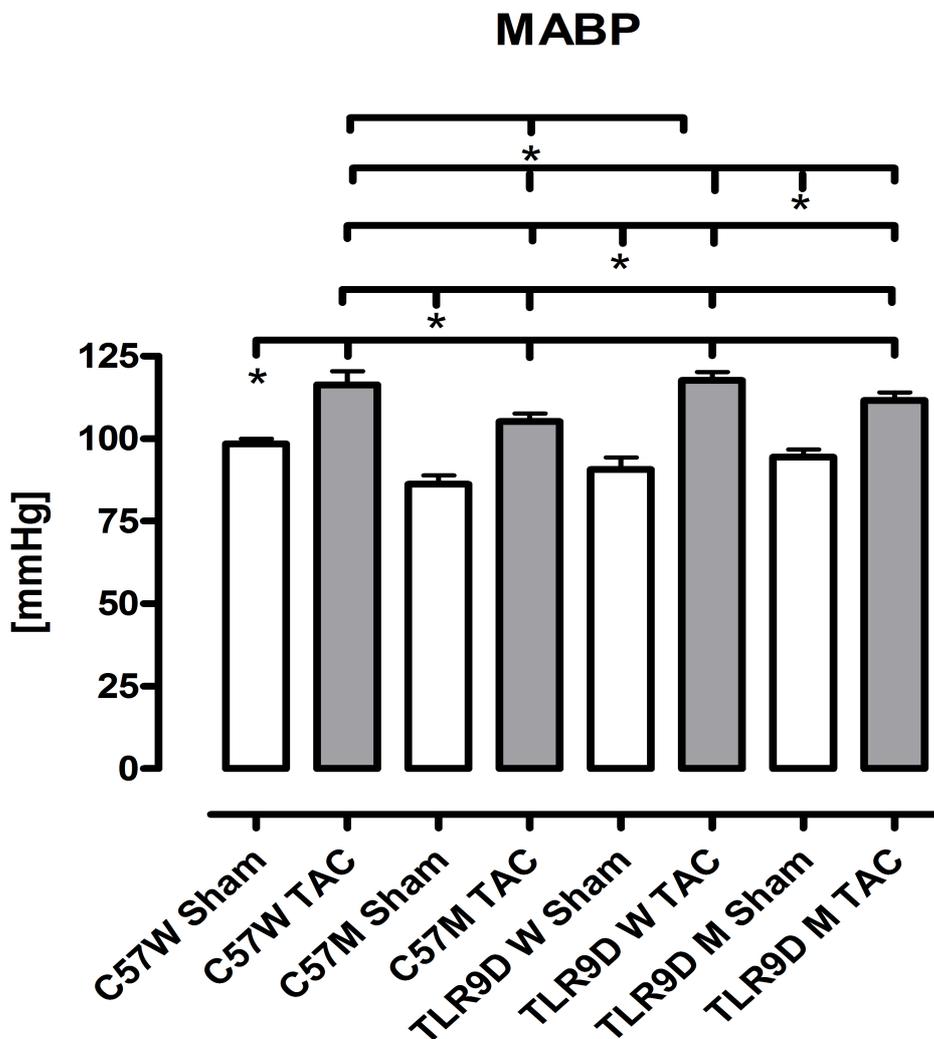


Abbildung 21: Mittlerer arterieller Druck (peripher) 14 Tage nach TAK/Sham

3.10 Linksventrikulärer Systolischer Druck (LVSP)

In allen TAK-operierten Gruppen war im linken Ventrikel der systolische Druck signifikant höher als in den Vergleichsgruppen der Scheinoperation ($p < 0,001$) (Abbildung 22). Allerdings waren aber weder im Vergleich Männchen zu Weibchen, noch im Vergleich C57 zu TLR9D Signifikanzen zu verzeichnen.

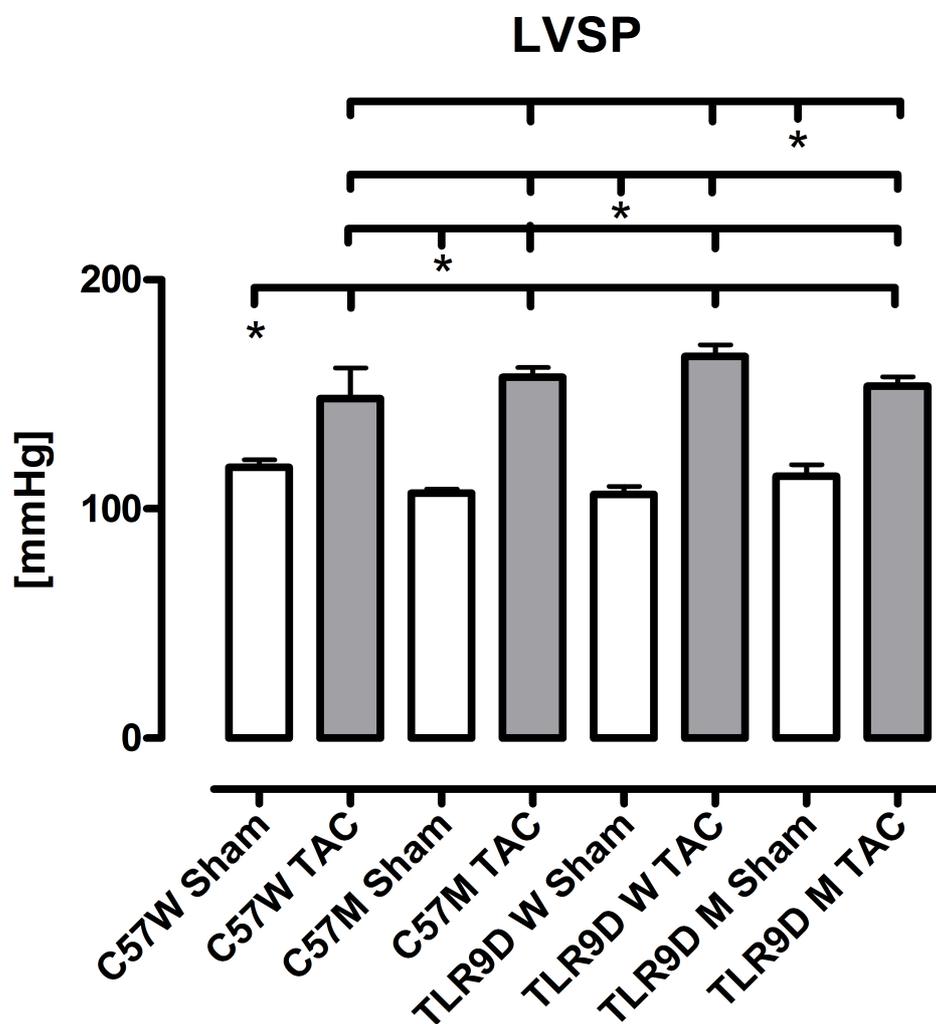


Abbildung 22: Linksventrikulärer systolischer Druck

3.11 Linksventrikulärer Diastolischer Druck (LVDP)

Die weiblichen Sham-Tiere wiesen mit 11 mmHg den höchsten diastolischen Druck aller Sham Tiere auf, was (außer im Vergleich zu den TLR9-defizienten Sham Tieren) nicht signifikant war (Abbildung 23). Generell war der LVDP in den TAK-Gruppen etwas erhöht gegenüber den Sham-Tieren, allerdings wurde innerhalb eines Tierstammes und eines Geschlechts kein Signifikanzniveau erreicht.

Der LVDP war in den weiblichen C57 TAK-Tieren mit Abstand höher als in allen anderen Gruppen, daher ergaben sich zwischen den weiblichen C57 TAK-Tieren und allen anderen Gruppen außer der Kontrollgruppe C57 W Sham signifikante Unterschiede.

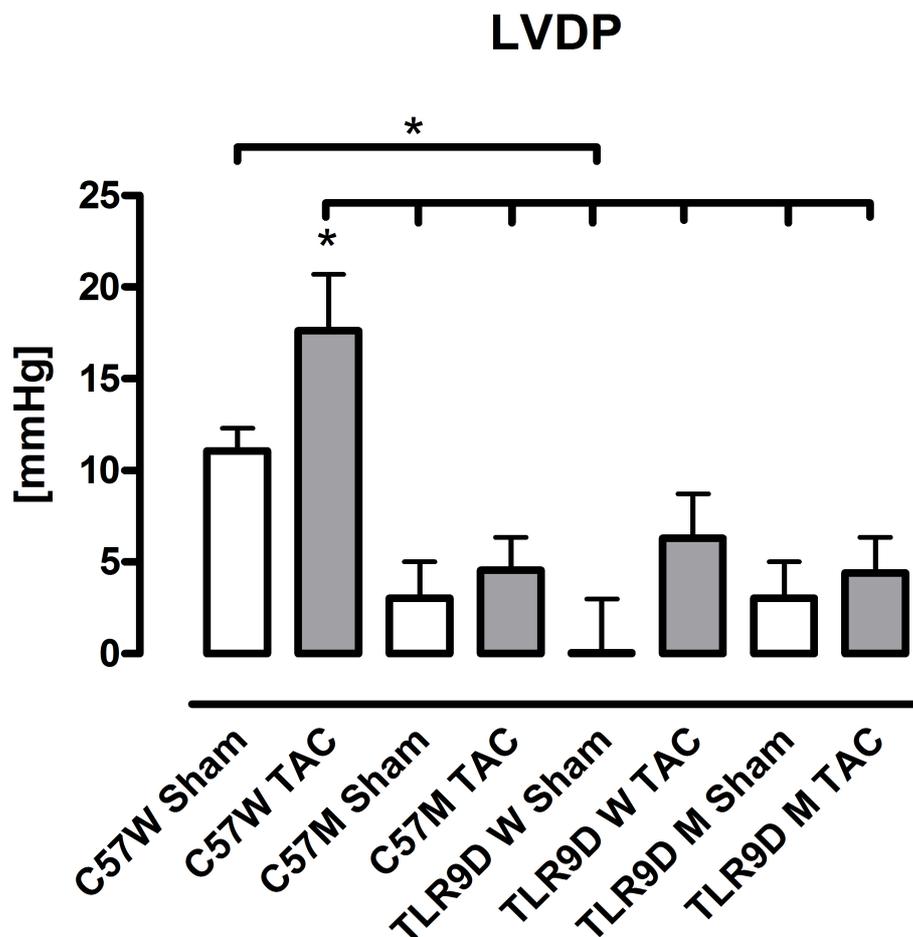


Abbildung 23: Linksventrikulärer Diastolischer Druck

3.12 Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max})

Bei der Messung der Hämodynamik wurde die maximale Anstiegsgeschwindigkeit als Maß für die Kontraktilität des Herzmuskels genommen. Es zeigte sich, dass die TAK operierten Tiere einen leichten Verlust der Kontraktilität (durch das durch die Hypertrophie geschädigte Herz) aufweisen. Dieser Effekt war bei den TLR9-defizienten Tieren weniger zu beobachten als bei den Tieren des Stammes C57 (Wildtyp) (siehe Abbildung 24), er war jedoch nicht signifikant.

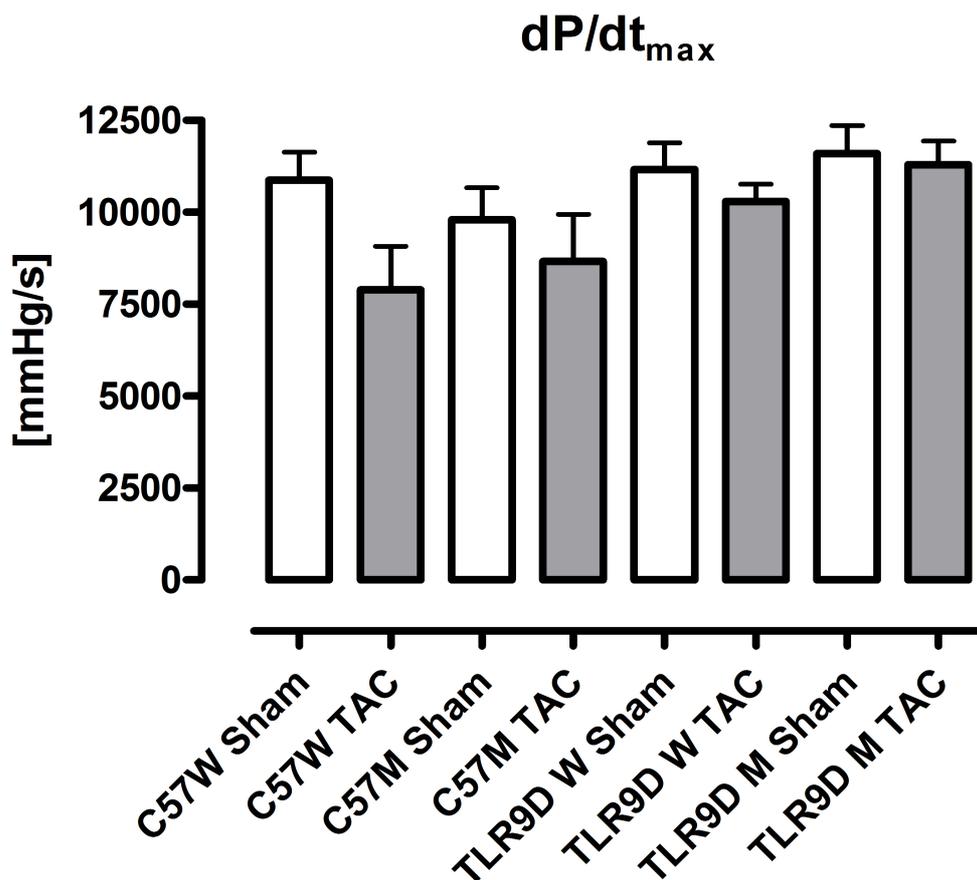


Abbildung 24: Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit

3.13 Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{\min})

Die Messung der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit ergab eine signifikant erhöhte Druckabfallsgeschwindigkeit der C57 TAK Weibchen im Vergleich zu den anderen Tierstämmen (C57M TAC, TLR9D M TAC, TLR9D W TAC) (Abbildung 25). Im Vergleich der Tierstämme zeigten TLR9-defiziente Tiere eine erhöhte Relaxationsgeschwindigkeit, dieser Effekt war allerdings nicht signifikant.

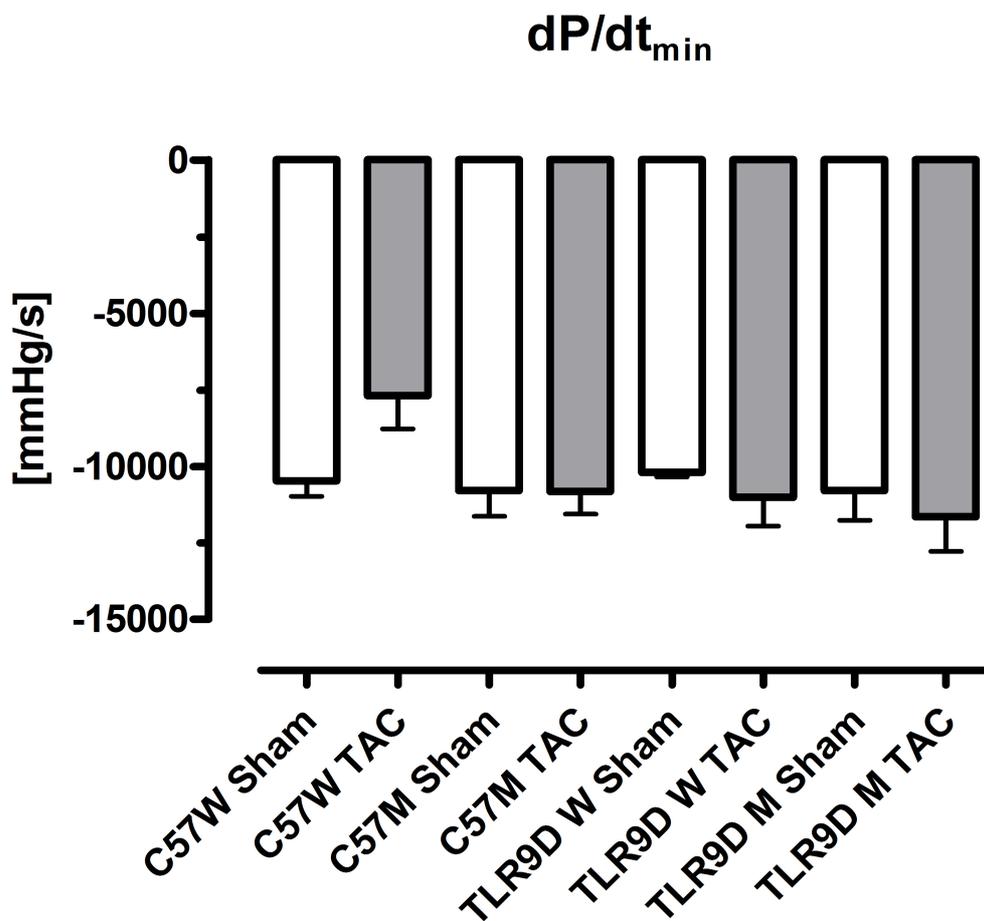


Abbildung 25: Maximale Druckabfallsgeschwindigkeit

4 Diskussion

4.1 Limitation und Diskussion der Methode der Studie

Methodisch lässt sich diese Studie mit anderen Ergebnissen in der Fachliteratur vergleichen. Durch die TAK wurde der Aortendurchmesser auf ca. 30 % des Ausgangsdurchmessers verringert, so dass durch die Drucküberlastung des Herzens eine linksventrikuläre Hypertrophie ausgelöst wird (Ehrentraut et al., 2011a). Die Ausbildung einer Hypertrophie beginnt am 3.-10. postoperativen Tag (Ehrentraut et al., 2011a; Nakamura et al., 2001). In einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde die Ausbildung einer Hypertrophie nach 7 Tagen untersucht (Kebir, 2012), 7 Tage nach TAK fand sich bereits eine signifikante Zunahme der LV/Körpergewicht-Ratio bei Wildtypmäusen und TLR 9-defizienten Tieren.

Bei allen TAK-Operationen wurden in der vorliegenden Studie eine Zunahme der linksventrikulären Masse nach 14 Tagen um ca. 44 % erreicht, ebenso war ein deutlicher Blutdruckanstieg zu verzeichnen. Rockman et al. konnten 1991 bereits ähnliche Zunahmen zeigen: Bei Verwendung einer 27G Nadel und einem Tieralter von 8 Wochen nach 7 Tagen eine Zunahme der linksventrikulären Masse um 41 % (Rockman et al., 1991). Fraglich ist jedoch, inwiefern das Ausmaß der Hypertrophieantwort von der Kraft, mit der ein Knoten über der Nadel als Platzhalter geknüpft wird, abhängt. Ebenso kann die Hypertrophie dadurch beeinflusst werden ob sich ein Knoten trotz guter Fixierung sekundär löst oder der Faden in die Aorta einwächst (Lygate et al., 2006). Es gibt also viele Faktoren warum auch selbst in der Literatur die Werte für die Zunahme einer Hypertrophieantwort bei ähnlichen Versuchsbedingungen abweichen. Die Blutdruckwerte sind noch anfälliger auf jeweilige Störungen: Viele Faktoren wie Körpertemperatur, Schmerz, Geräuschpegel, Tiefe der Anästhesie, Sensitivität des Katheters, Genauigkeit des Eichgerätes etc. haben Einfluss auf die jeweiligen Messungen. Unser Anliegen war es, durch eine genormte Körpertemperatur und eventuell zusätzliche Aufwärmung über Wärmebett und Wärmelampe, präoperative Schmerzausschaltung durch Buprenorphin intraperitoneal, Reduktion des Geräuschpegels soweit möglich und eine genormte Anästhesietiefe während der Messung (1l O₂ mit 1 % Isofluran/min), eine standardisierte Messung zu ermöglichen.

Betreffs der Mortalität konnten ähnliche Werte wie in anderen Studien erreicht werden: Liao et al. verzeichneten ebenso eine Mortalität von ca. 30 % 14 Tage nach TAK (Liao et al., 2002). Durchschnittlich wurde in dieser Studie eine Mortalität von 29,3 % nach 14 Tagen beobachtet. Ob die Unterschiedliche Mortalität zwischen C57W TAC und TLR9D W TAC (38 % vs. 19 %) inzidentuell oder durch einen kardioprotektiven Einfluss der TLR9-Defizienz ist, konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2 Akute und chronische Auswirkungen einer Aortenkonstriktion auf Herz und Lunge nach 14 Tagen

Die druckinduzierte Herzinsuffizienz ist in unserer Gesellschaft eine häufige und ernst zu nehmende Krankheit. In dieser Studie konnten einige Pathomechanismen an Hand von *in-vivo* Mausmodellen gezeigt werden: Durch die Verringerung des Aortendurchmessers um ca. 70 % des Lumens (27 G Nadel als Platzhalter), findet durch Anpassungsmechanismen eine Umwandlung im kardiovaskulären System statt: Durch die erhöhte Druckbelastung des linken Ventrikels hypertrophiert dieser, um die Ejektionsfraktion konstant zu halten (Kobayashi et al., 1996; McPherson et al., 2001; Rodriguez-Porcel et al., 2006). Dies konnte anhand der Zunahme des Gewichtes der linken Ventrikel um ca. 44 % nach TAK-OP gezeigt werden. Dieses ist konform mit diversen anderen Studien, in denen eine Zunahme der linksventrikulären Masse um 30-65 % nach TAK-OP erreicht wurde (Rockman et al., 1991; Skavdahl et al., 2005; Weinberg et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass eine myokardiale Hypertrophie durch Aktivierung des NF- κ B Pathways durch Fibrinogen ausgelöst werden kann (Li et al., 2009) und durch Blockierung der NF- κ B Aktivierung die Ausbildung einer Herzmuskelhypertrophie abgeschwächt werden konnte (Ha et al., 2005b). Es kommt zu einer inflammatorischen Reaktion, in der auch TLRs beteiligt sind, welche zu einer Fibrosierung des Herzmuskelgewebes führt (Velten et al., 2012). Dadurch kommt es zu einer verminderten Kontraktilität des Herzmuskels (siehe auch Abbildung 24).

Als Maß für die erhöhte Druckbelastung wurde der periphere und linksventrikuläre Blutdruck gemessen. Auch hier sah man in allen Gruppen eine hochsignifikante Zunahme des systolischen Blutdruckes nach TAK-OP.

Betreffs der Lungengewichte konnte in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe (Kebir, 2012) nach 7 Tagen eine gering signifikante Zunahme der Lungengewichte nach

TAK verzeichnet werden. Dieses konnte in dieser Studie 14 Tagen nach TAK tendenziell auch gesehen werden, war hier jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 17).

4.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Hypertrophieantwort

Die Zunahme der linksventrikulären Masse war unabhängig von Tierstamm und Geschlecht nachweisbar, hatte jedoch unterschiedliche Ausmaße: Die männlichen TAK-Tiere reagierten mit einer stärkeren Gewichtszunahme des linken Ventrikels. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen van Eickels et al., die zeigen konnten, dass bei weiblichen Mäusen nach Druckbelastung eine bessere myokardiale Anpassung als bei männlichen Tieren stattfindet (van Eickels et al., 2001). Auch bei hypertensiven Frauen konnte dieser Effekt beobachtet werden (Mendelssohn und Karas, 2005; Modena et al., 1999). Gleichzeitig haben Frauen bei reduzierter systolischer Funktion ein besseres Outcome als Männer (O'Meara et al., 2007; Simon et al., 2001; Witt et al., 2008). Diese Wirkung kommt unter anderem durch Östrogene zustande, welche an den Östrogen β -Rezeptor binden (Mahmoodzadeh et al., 2012; Skavdahl et al., 2005).

Für die Entstehung einer kardialen Hypertrophie sind Östrogenrezeptoren bedeutend: Sie regulieren die Expression von 17β -Estradiol Zielgenen, welche eine Rolle bei der myokardialen Hypertrophie spielen (Babiker et al., 2004; Grohé et al., 1997; Mahmoodzadeh et al., 2010 und 2012). Östrogenrezeptore sind beteiligt an Zell-Zell Interaktion und Prävention von Apoptose (Groten et al., 2005; Jovanovic et al., 2000; Mahmoodzadeh et al., 2012; Patten et al., 2004). Die Defizienz von Östrogenrezeptor β führt zu vermehrter kardialer Fibrose (Fliegner et al., 2010). Östrogenrezeptor β ist für Mäuse beider Geschlechter nach TAK von Vorteil, er ist möglicherweise an der Aufrechterhaltung der Energie Homeostase in weiblichen Mäusen beteiligt und begrenzt die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Apoptose in beiden Geschlechtern (Fliegner et al., 2010; Übersichtsartikel: Regitz-Zagrosek et al., 2010).

Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass männliche Tiere prinzipiell ein höheres Körpergewicht hatten, so dass die Zunahme der linksventrikulären Masse normiert auf das Körpergewicht bei Männchen und Weibchen nicht signifikant verschieden war. Die

Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie gemessen an dem Körpergewicht war in dieser Studie unabhängig von dem Geschlecht. Skavdahl et al. zeigten 2005 eine erhöhte Zunahme der Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio bei männlichen Tieren im Vergleich zu weiblichen 14 Tage nach TAK. Dieser Effekt konnte hier nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu blieben bei einer Normierung auf die Tibialänge die geschlechtsspezifischen Unterschiede weiter bestehen. Nach der Körpergröße zu urteilen (LV/TL) war die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie bei den Männchen größer als bei den Weibchen. Dieses lässt darauf schließen, dass Tibialänge und Körpergewicht der Versuchstiere nicht miteinander korrelieren. Das Körpergewicht ist mehr als die Körperlänge Schwankungen ausgesetzt, da sich das Gewicht je nach Alter, klinischem Allgemeinzustand der Mäuse und anderen Faktoren ändert und nicht voraussagbar ist (siehe auch Abbildung 12). Dieses wurde bereits in einer Longitudinal-Studie von Yin et al. 1982 bestätigt, wo gezeigt wurde, dass kardiale Hypertrophie genauer durch eine Herzgewicht/Tibialänge Ratio als durch eine Herzgewicht/Körpergewicht-Ratio quantifiziert werden kann, da sie unabhängiger vom Alter der Tiere ist (Yin et al., 1982). Während in dieser Studie die Mortalität 14 Tage nach TAK bei männlichen Tieren ungefähr bei 30 % lag, war die Mortalität von weiblichen Tieren unterschiedlich: Wildtypmäuse zeigten eine Mortalität von 38 % nach TAK, während TLR9 defiziente Tiere nach TAK eine Mortalität von nur 19 % hatten. Ob dieser Effekt zufällig entstanden ist oder nicht, lässt sich nicht bestätigen.

Hierbei handelt es sich nicht um eine Longitudinal-Studie, sondern um eine Bestandsaufnahme zu einem bestimmten Zeitpunkt. In Longitudinal-Studien von Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass weibliche Versuchstiere zu einem späteren Zeitpunkt ein Herzversagen erleiden oder sterben (Czubryt et al., 2003; Leinwand, 2003).

Betreffs des Blutdruckes zeigte sich bei den weiblichen Tieren im Gegensatz zu den Männchen ein erhöhter mittlerer Blutdruck peripher. Im Stamm C57 war dies sogar signifikant. Somit haben die männlichen Tiere zwar höhere linksventrikuläre Gewichte, dafür aber leicht geringere systolische und diastolische periphere Blutdrücke.

Der systolische im Herzen gemessene Blutdruck war bei Männchen und Weibchen nicht unterschiedlich.

Auch in Ischämie-Reperfusionen-Modellen konnte bei weiblichen Mäusen eine bessere postischämische Erholung und kleinere Infarktzone als bei männlichen Vergleichstieren gesehen werden (Gabel et al., 2005; Wang et al., 2006).

Beim Menschen hat sich gezeigt, dass Frauen öfter eine Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (EF) ausbilden oder eine diastolische Herzinsuffizienz entwickeln als Männer (Cleland et al., 2003; Regitz-Zagrosek, 2006, Regitz-Zagrosek et al., 2007 und 2010). Außerdem lässt sich sagen, dass mehrere Studien darauf hindeuten, dass Östrogene die Herzmasse beeinflussen und bei Frauen zu einer verminderten bzw. verzögerten Ausbildung einer Herzhypertrophie führen (Cleland et al., 2003; Fliegner et al., 2010; Übersichtsartikel: Regitz-Zagrosek et al., 2010).

4.4 Rolle des TLR9 in der Myokardhypertrophie nach Druckbelastung – Ein Vergleich mit TLR4

In dieser Studie sollte der Einfluss von TLR9 auf eine Myokardhypertrophie untersucht werden. Um die Bedeutung von TLR9 in diesem Zusammenhang zu erfassen, ist es wichtig, primär auf TLR4 einzugehen.

Der am weitesten erforschte Toll-like Rezeptor, TLR4, hat unter anderem auch einen Einfluss auf die kardiale Funktion, sei es im Rahmen von Kardiodepression bei Sepsis, im Rahmen einer Ischämie/Reperfusionsschadens oder auch bei der Entstehung und dem Ausmaß einer Myokardhypertrophie nach Druckbelastung:

Eine Sepsis mit konsekutiver Kardiodepression konnte durch prophylaktische Gabe von Eritoran, einem TLR4 Antagonisten, abgeschwächt werden. Während kardiale proinflammatorische Zytokine nicht reduziert waren, wurden vaskuläre Zytokine nach Eritoran-Gabe weniger exprimiert (Ehrentraut et al., 2011b). Es konnte auch beobachtet werden, dass TLR4-defiziente Mäuse kleinere Infarktzone im kardialen Ischämie/Reperfu-sionsversuch entwickelten (Kim et al., 2007; Oyama et al., 2004; Stapel et al., 2006).

TLR4-defiziente Mäuse zeigten eine verminderte Hypertrophieantwort auf Druckbelastung (Ha et al., 2005). Liu et al. konnten 2008 zeigen, dass TLR4 Agonisten vor kardio-vaskulärer Hypertrophie und Fibrose schützen (Liu et al., 2008). Möglicherweise wird durch die vorherige Gabe von TLR4 Agonisten die Entzündungsreaktion durch DAMPs reduziert. Es findet vermutlich ein Preconditioning oder Priming statt, welches eine Ent-

zündungsreaktion auslöst und die Entwicklung einer Hypertrophie abschwächt. Da DAMPs über Bindung an TLR4 die kardiale Hypertrophie vergrößern, ist dieser Effekt bei TLR4-Defizienz weniger zu beobachten. Eine Studie von Ehrentraut et al. bekräftigt diese These: Eine Vorbehandlung von Mäusen mit Eritoran (TLR4 Antagonist) führte zu einer verminderten Ausbildung einer kardiale Hypertrophie nach erhöhter Druckbelastung, die Ausschüttung von BNP wurde abgeschwächt, die Expression pro-inflammatorischer Zytokine reduziert und Remodeling-Mechanismen verhindert (Ehrentraut et al., 2011a). Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass TLR4-Antagonismus oder Defizienz kardioprotektiv wirkt.

Ein ähnliches Verhalten konnte für TLR9 gezeigt werden. Dass Toll-like Rezeptoren in Kardiomyozyten zu einem Verlust der Kontraktilität führen und NF κ B abhängig eine Zytokinproduktion induzieren, konnte von Boyd et al. bereits 2006 gezeigt werden (Boyd et al., 2006). Knüfermann et al. führten 2008 eine Studie mit isolierten Kardiomyozyten durch, in der bei TLR9-defizienten Mäusen und C57-Mäusen (Wildtyp) sowohl inflammatorische Marker, als auch die myokardiale Kontraktilität gemessen wurden. Während bei den Wildtypmäusen nach Exposition mit synthetischer bakterieller DNA (CpG-ODN) eine vermehrte Expression von inflammatorischen Zytokinen (TNF α , IL-1 β und IL-6) gemessen wurde und sich ebenso eine Abnahme der myokardialen Kontraktion zeigte, war dieser Effekt bei TLR9-defizienten Mäusen nicht nachzuweisen. Damit gibt es Hinweise dafür, dass bakterielle DNA einen negativ inotropen Effekt durch Aktivierung von TLR9 ausübt. Diese Studie zeigte erfolgreich, dass TLR9 eine funktionelle Signifikanz in der Entstehung kardiovaskulärer Krankheiten hat (Knüfermann et al., 2008; Takahashi, 2008).

Weitere *in vivo* Studien bekräftigten diese These: TLR9-defiziente Mäuse hatten bei einer durch 1668-Thioat (TLR9 Agonist) induzierten Sepsis und daraus resultierender Kardiodepression weniger kardiale Entzündungsreaktion, eine bessere kardiale Funktion und ein verbessertes Überleben als Vergleichstiere der Kontrollgruppe (Boehm et al., 2013). Wurden der Kontrollgruppe zusätzlich H154 Thioat (TLR9 Inhibitor) verabreicht, so hatte dieses eine kardioprotektive und mortalitätssenkende Wirkung.

Vorherige Aktivierung von TLR9 (mittels CpG-Oligonukleotid, einem TLR Ligand) am Mausmodell schwächte eine kardiale Dysfunktion in einer (nach Applikation von Cp-

G-ODN) induzierten polymicrobialen Sepsis ab (Gao et al., 2013). Andere Studien konnten ebenso zeigen, dass die Gabe von CpG-ODN (als TLR9 Agonist) durch Präkonditionierungs-Mechanismen die Organe vor ischämischem Schaden und Sepsis schützt (Hyakkoku et al., 2010; Krieg, 2006; Stevens et al., 2008).

Ebenso konnte nach CpG-ODN Vorbehandlung eine myokardialer Ischämie/Reperfusionsschaden abgeschwächt werden (Cao et al., 2012; Markowski et al., 2013).

Wir vermuteten, dass TLR9 eventuell ähnlich wie TLR4 einen Einfluss auf die kardiale Hypertrophie hat. Aus diesem Grunde wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe in verschiedenen Studien mit TLR9-defizienten Mäusen durchgeführt. In einer anderen Studie (Kebir, 2012) wählte man ein Abstand zwischen TAK und hämodynamischer Messung/Organentnahme von 7 Tagen. Dort zeigten sich im Vergleich zu dieser Studie erhöhte periphere systolische Blutdrücke bei TLR9-defizienten Tieren (22 mmHg Zunahme im Vergleich zu den C57-TAK-Kontrolltieren). Ebenso wurden bei den TLR9-defizienten Tieren ein erhöhter Spiegel an BNP gemessen, einem klinischen Marker für Hypertrophie und kardiale Dysfunktion. BNP wird bei vermehrter Wanddehnung (z.B. durch Volumenbelastung des Herzens) ausgeschüttet und mindert die Ausbildung einer Herzinsuffizienz (Ehrentraut et al., 2010; Gerber et al., 2003; Nishikimi et al., 2006; Ritchie et al., 2009). Um zu sehen ob die nach 7 Tagen gemessenen BNP-Spiegel eine Verminderung der LV-Hypertrophie zur Folge hatten, wurde der Zeitabstand auf 14 Tage vergrößert (siehe diese Studie). Hier fand sich jedoch keine Verminderung der Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie. Dagegen war die initiale Blutdruckdifferenz zwischen TLR9 -defizienten und C57 Mäusen nach 14 Tagen fast aufgehoben (Unterschied von 4 mmHg statt 22 mmHg nach 7 Tagen, siehe auch Abbildung 19). Es ist möglich, dass die erhöhten BNP-Level der TLR 9-defizienten Tieren durch Abschwächung des Blutdruckanstieges eine noch größere Zunahme der linksventrikulären Masse verhindert haben (siehe auch Ehrentraut et al., 2010).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass 14 Tage nach TAK nicht gesehen werden konnte, dass TLR9-Defizienz auf direktem Wege das Fortschreiten einer Herzhypertrophie verhindert, so wie es bei TLR4-Defizienz oder Antagonismus erfolgt. Es ist möglich, dass endogene Liganden die während der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie

und Dysfunktion freigesetzt werden nur an TLR4 und nicht an TLR9 binden (Ehrentraut et al., 2010).

Neueren Erkenntnissen zufolge konnte in einem *in vivo*-Modell eine medikamentös durch Isoproterenol (einem β -selektiven Adrenalin-Abkömmling) ausgelöste Myokardhypertrophie durch das CpG-Oligonucleotid C274 (TLR9 Agonist) verbessert und abgeschwächt werden (Yang et al., 2013). CpG-ODNs aktivieren den PI3K α -Akt Signalweg in Kardiomyozyten. Die genaue Funktion dieses Mechanismus ist noch nicht vollständig erforscht. Außerdem hat diese Studie ihre Limitationen dadurch, dass die Hypertrophie nicht durch TAK sondern medikamentös erzeugt wurde.

Oka et al. konnten 2012 zeigen, dass mitochondriale DNA, welche der Autophagie entgeht, an TLR9 binden und eine Entzündungsreaktion in Kardiomyozyten auslösen kann. Dieses führte zu einer Myokarditis oder dilatativen Kardiomyopathie 10 Tage nach TAK (Oka et al., 2012). Autophagie ist ein adaptiver Mechanismus, der das Herz vor hämodynamischem Stress schützt (Nakai et al., 2007). DNase II in Kardiomyozyten verdaut mitochondriale DNA, um das Herz vor einer Entzündungsreaktion als Folge von hämodynamischem Stress zu schützen. Bei DNase-defizienten Tieren konnte nach TAK eine linksventrikuläre Dilatation und eine schwere kontraktile Dysfunktion gesehen werden (Oka et al., 2012). Dieses kommt dadurch zustande, dass nach Zellschaden mitochondriale DAMPs freigesetzt werden. Diese DAMPs enthalten Formyl Peptide und mitochondriale DNA, welche über Formyl-Peptid Rezeptor 1 und TLR9 menschliche Neutrophile aktivieren (Zhang et al., 2010).

Während in dieser Studie 14 Tage nach TAK kein Unterschied in der Hypertrophieantwort zwischen Wildtyp und TLR9-defizienten Mäusen gesehen werden konnte, zeigte sich 10 Wochen nach TAK bei TLR9-defizienten Mäusen schmalere Ventrikel, eine bessere kardiale Funktion und weniger Lungenstauung (Oka et al., 2012). Des Weiteren war das Ausmaß der Fibrose in TLR9 defizienten Tieren abgeschwächt. Die Applikation von Oligonucleotid 2088 (TLR9 Inhibitor) verbesserte das Überleben von Wildtypmäusen. Somit lassen sich in der Literatur Hinweise darauf finden, dass TLR9 an der Entwicklung einer Herzinsuffizienz beteiligt ist.

4.5 Ausblick: Behandlung mit TLR9-Liganden

Der direkte Einfluss von TLR9 auf die Entstehung einer kardialen Hypertrophie konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Es gibt jedoch eine aktuelle Studie von Velten et al., in der es Hinweise dafür gab, dass nach Behandlung mit einem synthetischen Oligonukleotid (1668-Thioat) als Ligand für den TLR9-Rezeptor, das Fortschreiten einer kardialen Hypertrophie abgeschwächt werden kann: Durch Immunmodulation wurde das kardiale Remodelling einschließlich der Ausbildung von Fibrosierungen im Herzgewebe reduziert und die kardiale Funktion aufrechterhalten (Velten et al., 2012). Vorbehandlung mit 1668-Thioat erhöht die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10, so dass es zu einer reduzierten Entzündung kommt.

Da CpG ODNs (TLR9 Liganden) auch in einer induzierten Sepsis die Herzfunktion verbesserte (Gao et al., 2013) und eine durch Isoproterenol induzierte kardiale Hypertrophie verbesserten (Yang et al., 2013) gibt es Hinweise darauf, dass durch Modulation der Immunantwort eine versprechende therapeutische Möglichkeiten für Patienten mit Herzinsuffizienz entstehen könnten, wodurch das kardiale Remodeling positiv beeinflusst würde.

5 Zusammenfassung

Toll-like Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, unter anderem auch bei der Entstehung einer Herzmuskelhypertrophie. Es gibt mehrere Studien, die den Einfluss von TLR4 auf die Herzmuskelhypertrophie nachweisen. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von TLR9 im Hinblick auf die Entstehung einer Herzmuskelhypertrophie am Mausmodell zu evaluieren, ebenso wurden geschlechtsspezifische Unterschiede ermittelt.

Es wurden sowohl TLR9-defiziente Mäuse als auch Wildtypmäuse des Tierstammes C57BL/6 einer Trans-aortalen Konstriktions-OP (TAK-OP) bzw. als Vergleich einer Schein-Operation (Sham-OP) unterzogen. Ebenso erfolgte eine geschlechterspezifische Gruppierung. 14 Tage nach TAK-/Sham-OP wurde eine hämodynamische Messung mittels Katheter in der A. carotis und dem linken Ventrikel durchgeführt. Darauffolgend wurde die Hypertrophieantwort anhand der Organgewichte (Herz- und Lunge) bestimmt.

Alle Tiere, welche einer TAK-OP unterzogen wurden, wiesen nach 14 Tagen erhöhte periphere und zentrale Blutdruckwerte auf. Ebenso nahm die Muskelmasse des Herzens um 44% zu. Das linksventrikuläre Gewicht war bei den männlichen Tieren im Vergleich zu den Weibchen nach TAK absolut und normiert auf die Tibialänge signifikant erhöht. Normiert auf das Körpergewicht konnte dieser Effekt nicht gesehen werden. Es gab hinsichtlich der Hypertrophieantwort keinen Unterschied im Vergleich der Tierstämme (Wildtyp versus TLR9-defiziente Tiere). Allerdings zeigte sich im Vergleich zu den Wildtypmäusen ein bei TLR9-Defizienz weniger ausgeprägter Verlust der Kontraktilität und eine erhöhte Relaxationsgeschwindigkeit. Diese Effekte waren jedoch nicht signifikant.

TLR9-Defizienz verhindert nicht auf direktem Wege das Fortschreiten einer Herzhypertrophie nach TAK, so wie es bei TLR4-Defizienz oder Antagonismus erfolgt. Es ist möglich, dass endogene Liganden die während der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Dysfunktion freigesetzt werden nur an TLR4 und nicht an TLR9 binden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass TLR9 bei inflammatorisch gesteuerten Fibrosierungsreaktionen bei einer Entstehung einer Herzmuskelhypertrophie mitwirkt und durch TLR9-Defizi-

enz ein mögliches Fortschreiten über noch ungeklärte Mechanismen verhindert werden kann.

6 Literaturverzeichnis

Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1958-1968

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

Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Thijssen V, Bronsaer RJ, Grohé C, van Bilsen M, Doevendans PA. 17 β -estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation* 2004; 109: 269-276

Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20

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

Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683

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 U S A* 2001; 98: 9237-9242

Bauer S. Toll-erating self DNA. *Nat Immunol* 2006; 7: 13-15

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

Boehm O, Markowski P, van der Giet M, Gielen V, Kokalova A, Brill C, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. *In Vivo* TLR9 inhibition attenuates CpG-induced myocardial dysfunction. *Mediators Inflamm* 2013; 2013: 217297

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

Camper-Kirby D, Welch S, Walker A, Shiraishi I, Setchell KD, Schaefer E, Kajstura J, Anversa P, Sussman MA. Myocardial Akt activation and gender: Increased nuclear activity in females versus males. *Circ Res* 2001; 88: 1020-1027

Cao Z, Ren D, Ha T, Liu L, Wang X, Kalbfleisch J, Gao X, Kao R, Williams D, Li C. CpG-ODN, the TLR9 agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury: Involving activation of PI3K/Akt signaling. *Biochim Biophys Acta* 1832; 96-104

Carabello BA. Concentric versus eccentric remodeling. *J Card Fail* 2002; 8: 258-263

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

Chotirmall SH, Harvey BJ, McElvaney NG, Greene CM. Pulmonary Inflammation in Cystic Fibrosis: Impact of Innate Immunity and Estrogen. *Int J Clin Rev* 2011; 08: 02

Cleland JG, Swedberg K, Follath F, Komajda M, Cohen-Solal A, Aguilar JC, Dietz R, Gavazzi A, Hobbs R, Korewicki J, Madeira HC, Moiseyev VS, Preda I, van Gilst WH, Wi-

dimsky J, Freemantle N, Eastaugh J, Mason J. The EuroHeart Failure survey programme: a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: Patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J* 2003; 24: 442-463

Czubryt MP, McAnally J, Fishman GI, Olson EN. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100: 1711-1716

Dannenber AL, Levy D, Garrison RJ. Impact of age on echocardiographic left ventricular mass in a healthy population (the Framingham Study). *Am J Cardiol* 1989; 64: 1066-1068

De Bono JP, Adlam D, Paterson DJ, Channon KM. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am J Physiol* 2006; 290: R926-R934

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

Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK, Keller PJ. 17Beta-Estradiol, its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension* 1998; 31: 522-528

Ehrentraut H, Kebir S, Hof D, El Aissati S, Foltz F, Goelz L, Goertz D, Graewe M, Wolf MM, Knuefermann P, Meyer R, Baumgarten G. Progression of murine cardiac hypertrophy is not prevented by TLR2 and TLR9 deficiency. *Acta Physiol* 2010; 198: 677

Ehrentraut H, Weber C, Ehrentraut S, Schwederski M, Boehm O, Knuefermann P, Meyer R, Baumgarten G. The toll-like receptor 4-antagonist eritoran reduces murine cardiac hypertrophy. *Eur J Heart Fail* 2011a; 13: 602-610

Ehrentraut S, Lohner R, Schwederski M, Ehrentraut H, Boehm O, Noga S, Langhoff P, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. *In vivo* Toll-like Receptor 4 antagonism restores cardiac function during endotoxemia. *Shock* 2011b; 36: 613-620

Ferrara R, Mastroilli F, Pasanisi G, Censi S, D'Aiello N, Fucili A, Valgimigli M, Ferrari R. Neurohormonal modulation in chronic heart failure. *Eur Heart J* 2002; 4: D3-D11

Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272: 50-53

Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, Witt H, Kararigas G, Dworatzek E, Staub E, Martus P, Ruiz Noppinger P, Kintscher U, Gustafsson JA, Regitz-Zagrosek V. Female sex and estrogen receptor- β attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am J Physiol* 2010; 298: R1597-R1606

Foryst-Ludwig A, Kintscher U. Metabolic impact of estrogen signalling through E_{α} and $ER\beta$. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 122: 74–81

Gabel SA, Walker VR, London RE, Steenbergen C, Korach KS, Murphy E. Estrogen receptor beta mediates gender differences in ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 289-297

Gao M, Ha T, Zhang X, Wang X, Liu L, Kalbfleisch J, Singh K, Williams D, Li C. The Toll-like receptor 9 ligand, CpG oligodeoxynucleotide, attenuates cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis, involving activation of both phosphoinositide 3 kinase/Akt and extracellular-signal-related kinase signaling. *J Infect Dis* 2013; 207: 1471-1479

Gerber IL, Stewart RA, Legget ME, West TM, French RL, Sutton TM, Yandle TG, French JK, Richards AM, White HD. Increased plasma natriuretic peptide levels reflect symptom onset in aortic stenosis. *Circulation* 2003; 107: 1884-1890

Grohé C, Kahlert S, Lobbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett* 1997; 416: 107-112

Groten T, Pierce AA, Huen AC, Schnaper HW. 17 beta-estradiol transiently disrupts adherens junctions in endothelial cells. *FASEB J* 2005; 19: 1368-1370

Ha T, Li Y, Hua F, Ma J, Gao X, Kelley J, Zhao A, Haddad GE, Williams DL, William BI, Kao RL, Li C. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. *Cardiovasc Res* 2005a; 68: 224-234

Ha T, Li Y, Gao X, McMullen J, Shioi T, Izumo S, Kelley JL, Zhao A, Haddad GE, Williams DL, Browder IW, Kao RC, Li C. Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mTOR and NfnB activation *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine* 2005b; 39: 1570-1580

Haddad GE, Saunders LJ, Crosby SD, Carles M, del Monte F, King K, Bristow MR, Spinale FG, Macgillivray TE, Semigran MJ, Dec GW, Williams SA, Hajjar RJ, Gwathmey JK. Human cardiac-specific cDNA array for idiopathic dilated cardiomyopathy: Sex-related differences. *Physiol Genomics* 2008; 33: 267-277

Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2987-2997

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

Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Role of the innate immune response in sepsis. *Anaesthesist* 2004; 53: 10-28

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; 284: 1313-1318

Hyakkoku K, Hamanaka J, Tsuruma K, Shimazawa M, Tanaka H, Uematsu S, Akira S, Inagaki N, Nagai H, Hara H. Toll-like receptor 4 (TLR4), but not TLR3 or TLR9, knockout mice have neuroprotective effects against focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 2010; 171: 258-267

Islam KN, Bae JW, Gao E, Koch WJ. Regulation of Nuclear Factor κ B (NF- κ B) in the Nucleus of Cardiomyocytes by G Protein-coupled Receptor Kinase 5 (GRK5). *J Biol Chem* 2013; 288: 35683-35689

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

Johnson BD, Zheng W, Korach KS, Scheuer T, Catterall WA, Rubanyi GM. Increased expression of the cardiac L-type calcium channel in estrogen receptor-deficient mice. *J Gen Physiol* 1997; 110: 135-140

Jovanovic S, Jovanovic A, Shen WK, Terzic A. Low concentrations of 17 β -estradiol protect single cardiac cells against metabolic stress-induced Ca²⁺ loading. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 948-952

Katz DH, Beussink L, Sauer AJ, Freed BH, Burke MA, Shah SJ. Prevalence, clinical characteristics, and outcomes associated with eccentric versus concentric left ventricular hypertrophy in heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Cardiol* 2013; 112: 1158-1564

Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006; 13: 816-825

Kebir S. Toll-like-Rezeptor 9 hat keinen Einfluss auf die myokardiale Hypertrophie - Beobachtungen an einem murinen *in-vivo* Modell. 2012

Kim SC, Ghanem A, Stapel H, Tiemann K, Knuefermann P, Hoeft A, Meyer R, Grohé C, Knowlton AA, Baumgarten G. Toll-like receptor 4 deficiency: smaller infarcts, but no gain in function. *BMC Physiol* 2007; 7: 5

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

Kobayashi S, Yano M, Kohno M, Obayashi M, Hisamatsu Y, Ryoike T, Ohkusa T, Yamakawa K, Matsuzaki M. Influence of aortic impedance on the development of pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation* 1996; 94: 3362-3368

Kogut MH, Klasing K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: Introduction and overview. *Appl Poult Res* 2009; 18: 103-110

Konhilas JP, Maass AH, Luckey SW, Stauffer BL, Olson EN, Leinwand LA. Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *Am J Physiol* 2004; 287: H2768-H2776

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

Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 35-43

Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 471-484

Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM, Colonna M. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 2004; 21: 107-119

Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarte G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramian N, Entman ML, Mann DL. Endogenous myocardial tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 290: 5456-5461

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

Leinwand LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest* 2003; 112: 302-307

Li T, Wang Y, Liu C, Hu Y, Wu M, Li J, Guo L, Chen L, Chen Q, Ha T, Li C, Li Y. MyD88-dependent nuclear factor- κ B activation is involved in fibrinogen-induced hypertrophic response of cardiomyocytes. *J Hypertens* 2009, 27: 1084-1093

Liao Y, Ishikura F, Beppu S, Asakura M, Takashima S, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Kuzuya T, Node K, Kitakaze M, Hori M. Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aorticbanded mice: necropsy validation. *Am J Physiol* 2002; 282: H1703-H1708

Lim WK, Wren B, Jepson N, Roy S, Caplan G. Effect of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol* 1999; 83: 1132-1134

Liu YY, Cai WF, Yang HZ, Cui B, Chen ZR, Liu HZ, Yan J, Jin W, Yan HM, Xin BM, Yuan B, Hua F, Hu ZW. Bacillus Calmette-Guérin and TLR4 agonist prevent cardiovas-

cular hypertrophy and fibrosis by regulating immune microenvironment. *J Immunol* 2008; 180: 7349-7357

Lygate CA, Schneider JE, Hulbert K, ten Hove M, Sebag-Montefiore LM, Cassidy PJ, Clarke K, Neubauer S. Serial high resolution 3D-MRI after aortic banding in mice: band internalization is a source of variability in the hypertrophic response. *Basic Res Cardiol* 2006; 101: 8-16

Mahmoodzadeh S, Dworatzek E, Fritschka S, Pham TH, Regitz-Zagrosek V. 17beta-Estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via MAP kinase in fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2010; 85: 719-728

Mahmoodzadeh S, Fliegner D, Dworatzek E. Sex differences in animal models for cardiovascular diseases and the role of estrogen. In: Regitz-Zagrosek V, ed. *Sex and Gender Differences in Pharmacology, Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2012: 24-48

Markowski P, Boehm O, Goelz L, Haesner AL, Ehrentraut H, Bauerfeld K, Tran N, Zacharowski K, Weisheit C, Langhoff P, Schwederski M, Hilbert T, Klaschik S, Hoeft A, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. Pre-conditioning with synthetic CpG-oligonucleotides attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via IL-10 up-regulation. *Basic Res Cardiol* 2013; 108: 376

McPherson JA, Barringhaus KG, Bishop GG, Sanders JM, Rieger JM, Hesselbacher SE, Gimple LW, Powers ER, Macdonald T, Sullivan G, Linden J, Sarembock IJ. Adenosine A (2A) receptor stimulation reduces inflammation and neointimal growth in a murine carotid ligation model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 791-796

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

Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005; 308: 1583-1587

Modena MG, Muia N Jr, Aveta P, Molinari R, Rossi R. Effects of transdermal 17beta-estradiol on left ventricular anatomy and performance in hypertensive women. *Hypertension*, 1999; 34: 1041-1046

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

Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med* 2007; 13: 619-624

Nakamura A, Rokosh DG, Paccanaro M, Yee RR, Simpson PC, Grossman W, Foster E. LV systolic performance improves with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice. *Am J Physiol* 2001; 281: H1104-H1112

Newton K, Dixit VM. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012. <http://cshperspectives.cshlp.org/content/4/3/a006049.long> (Zugriffsdatum 22.01.2014)

Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 318-28

O'Connor CM, Whellan DJ, Wojdyla D, Leifer E, Clare RM, Ellis SJ, Fine LJ, Fleg JL, Zannad F, Keteyian SJ, Kitzman DW, Kraus WE, Rendall D, Piña IL, Cooper LS, Fiuzat M, Lee KL. Factors related to morbidity and mortality in patients with chronic heart failure

with systolic dysfunction: the HF-ACTION predictive risk score model. *Circ Heart Fail* 2012; 5: 63-71

Oka T, Hikoso S, Yamaguchi O, Taneike M, Takeda T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T, Nakayama H, Nishida K, Akira S, Yamamoto A, Komuro I, Otsu K. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature* 2012; 485: 251-255

Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P. Gender differences and aging: Effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1068-1079

O'Meara E, Clayton T, McEntegart MB, McMurray JJV, Pina IL, Granger CB, Ostergren J, Michelson EL, Solomon SD, Pocock S, Yusuf S, Swedberg K, Pfeffer MA. Sex differences in clinical characteristics and prognosis in a broad spectrum of patients with heart failure: results of the candesartan in heart failure: assessment of reduction in mortality and morbidity (CHARM) program. *Circulation* 2007; 115: 3111-3120

O'Neill LA. Das immunologische Frühwarnsystem. *SdW* 2005; 08: 68-75

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

Oyama J, Blais C Jr, Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004; 109: 784-789

Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, Alsheikh-Ali A, Eder S, Force T, Mendelsohn ME, Karas RH. 17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload. *J Card Fail* 2008; 14: 245-253

Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 425-438

Regitz-Zagrosek V, Brokat S, Tschope C. Role of gender in heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; 49: 241-251

Regitz-Zagrosek V, Oertelt-Prigione S, Seeland U, Hetzer R. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circ J* 2010; 74: 1265-1273

Ritchie RH, Rosenkranz AC, Kaye DM. B-type natriuretic peptide: Endogenous regulator of myocardial structure, biomarker and therapeutic target. *Curr Mol Med* 2009; 9: 814-825

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J Jr, Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an *in vivo* murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8277-8281

Rodriguez-Porcel M, Zhu XY, Chade AR, Amores-Arriaga B, Caplice NM, Ritman EL, Lermann A, Lermann LO. Functional and structural remodeling of the myocardial microvasculature in early experimental hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H978-H984

Simon T, Mary-Krause M, Funck-Brentano C, Jaillon P. Sex differences in the prognosis of congestive heart failure: results from the cardiac insufficiency bisoprolol study (CIBIS II). *Circulation* 2001; 103: 375-380

Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, Myers P, Demianenko T, Mao L, Rockman HA, Korach KS, Murphy E. Estrogen receptor-beta mediates male female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol* 2005; 288: H469-476

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

Statistisches Bundesamt, 2014: 20 häufigste Diagnosen bei Krankenhauspatienten. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankenhaeuser/Krankenhaeuser.html> (Zugriffsdatum: 27.01.2014)

Stevens SL, Ciesielski TM, Marsh BJ, Yang T, Homen DS, Boule JL, Lessov NS, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor 9: a new target of ischemic preconditioning in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 1040-1047

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376

Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14

Takahashi T. Toll-like receptors and myocardial contractile dysfunction. *Cardiovascular Research* 2008; 78: 3-4

Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol* 2000; 12: 113-117.

Van Eickels M, Grohe C, Cleutjens JP, Janssen BJ, Wellens HJ, Doevendans PA. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 2001; 104: 1419-1423

Velten M, Duerr GD, Pessies T, Schild J, Lohner R, Mersmann J, Dewald O, Zacharowski K, Klaschik S, Hilbert T, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Boehm O, Knuefermann P. Priming with synthetic oligonucleotides attenuates pressure overload-induced inflammation and cardiac hypertrophy in mice. *Cardiovasc Res* 2012; 96: 422-432

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

Wang M, Crisostomo P, Wairiuko GM, Meldrum DR. Estrogen receptor- α mediates acute myocardial protection in females. *Am J Physiol* 2006; 290: H2204-H2209

Weinberg EO, Mirotsov M, Gannon J, Dzau VJ, Lee RT, Pratt RE. Sex dependence and temporal dependence of the left ventricular genomic response to pressure overload. *Physiol Genomics* 2003; 12: 113-127

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

Witt H, Schubert C, Jaekel J, Fliegner D, Penkalla A, Tiemann K, Stypmann J, Roepcke S, Brokat S, Mahmoodzadeh S, Brozova E, Davidson MM, Ruiz Noppinger P, Grohé C, Regitz-Zagrosek V. Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J Mol Med* 2008; 86: 1013-1024

Wu L, Hu C, Huang M, Jiang M, Lu L, Tang J. Heat shock transcription factor 1 attenuates TNF α -induced cardiomyocyte death through suppression of Nf κ B pathway. *Gene* 2013; 527: 89-94

Yang L, Cai X, Liu J, Jia Z, Jiao J, Zhang J, Li C, Li J, Tang XD. CpG-ODN attenuates pathological cardiac hypertrophy and heart failure by activation of PI3K α -Akt signaling. *PLoS One* 2013; 8: e62373. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3640052/> (Zugriffsdatum 22.01.2014)

Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 1982; 243: H941-H947

Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010; 464: 104-107

Zheng Z, Li Z, Chen S, Pan J, Ma X. Tetramethylpyrazine attenuates TNF- α -induced iNOS expression in human endothelial cells: Involvement of Syk-mediated activation of PI3K-IKK-I κ B signaling pathways. *Exp Cell Res* 2013; 319: 2145-2151

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen denen bedanken, die mir während des Studiums und bei der Entstehung und Erstellung meiner Doktorarbeit geholfen haben:

- An erster Stelle Herrn Professor Rainer Meyer aus der Physiologie II. Ich danke Ihnen dafür, dass Sie sich jederzeit für meine Probleme und Fragen Zeit genommen haben, mir Rat und Hilfe gegeben haben und mich bezüglich meiner Promotion am meisten gefördert haben. Danke für alle Korrekturen und Tipps und auch für Ihr Verständnis für meine abenteuerlichen Reisen selbst während der Promotion.
- Als nächstes den Mitarbeitern des Physiologischen Institutes, besonders Frau Hanne Bock für die Hilfe bei der Tierhaltung, den Mitarbeitern der EDV und der Werkstatt für Programminstallationen und Reparaturen.
- Dominik Kraus für die Einarbeitung in die OP-Techniken
- Beate, Sied, Sakina, Lina und all die anderen, die parallel an ihrer Promotion beschäftigt waren und meinen Laboralltag belebt haben.
- Heidi Ehentraut für die Auswertung einiger Daten für die Publikation
- Ariane Cieslak vom Studiendekanat für die Hilfe bei der Form
- Meiner Familie und meinen Freunden, die mitgezittert und mich immer wieder angetrieben haben, meine Promotion endlich fertig zu stellen, besonders meinen Eltern Johannes und Renate Hof.