

Der Einfluss einer Stimulation von Toll-like Rezeptor 9 in einem murinen Second-Hit-Modell nach myokardialer Hypertrophie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Fabian Matias Foltz

aus Bonn

2021

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Jan Wilko Schrickel

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.05.2021

Aus dem Institut für Physiologie II
Direktor: Prof. Dr. Valentin Stein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Einleitung	9
1.1 Herzhypertrophie	9
1.2 Angeborenes Immunsystem	10
1.3 Herzhypertrophie und Sepsis - Septische Kardiomyopathie	13
1.4 TLR9-Aktivierung und Signaltransduktion	14
1.5 Ziele dieser Arbeit	19
2. Material und Methoden	20
2.1 Versuchstiere und deren Haltungsbedingungen	20
2.2 Gruppeneinteilung und Versuchsprotokoll	20
2.3 <i>In vivo</i> -Versuche	22
2.3.1 Anästhesie und Narkose	22
2.3.2 Transverse aortale Konstriktion und Scheinoperation	23
2.3.3 Hämodynamik - Herzkatheterisierung	26
2.3.4 Organentnahme	30
2.4 <i>In vitro</i> -Versuche	30
2.4.1 Organgewichte und Biometrie	30
2.4.2 Molekularbiologie	30
2.5 Statistik	34
2.6 Geräte und Materialien	34
2.6.1 Tierhaltung	34
2.6.2 <i>In vivo</i> -Versuche	35
2.6.3 <i>In vitro</i> -Versuche	37
2.6.4 Software	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Tierzahlen und Mortalität	39
3.2 Biometrie	41
3.2.1 Körpergewicht	41
3.2.2 Veränderung der Herzgewichte nach TAK	43
3.3 Hämodynamik	47

3.3.1	Herzfrequenz	47
3.3.2	Blutdruckergebnisse	49
3.4	Molekularbiologie	55
3.4.1	Hypertrophiemarker	55
3.4.2	PRRs	57
3.4.3	Zytokine	61
4.	Diskussion	65
4.1	Methode und theoretische Grundlage	65
4.2	Mausmodell	65
4.3	Mortalität	65
4.4	Veränderungen der biometrischen Parameter nach TAK	66
4.5	Hämodynamik	68
4.6	Hypertrophiemarker	70
4.7	PRRs	71
4.8	Proinflammatorische Zytokine	73
4.9	Abschließende Beurteilung und Ausblick	74
5.	Zusammenfassung	77
6.	Abbildungsverzeichnis	78
7.	Tabellenverzeichnis	83
8.	Literaturverzeichnis	85
9.	Danksagung	99

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of variance)
AP1	activator protein 1/ Aktivator Protein 1
aqua dest.	destilliertes Wasser
BNP	brain natriuretic peptide
BW	body weight/ Körpergewicht
C	Celsius
C57BL/6	Labormaus Inzuchtlinie
cDNA	komplementäre DNA
CpG	Cytidin-Phosphorsäure-Guanosin-Motiv/ 1668 Thioat/ TRL9-Agonist
CpG-DNA	CpG-deoxyribonucleic acid/ CpG-Desoxyribonukleinsäure
CpG-ODN	CpG-oligodeoxynucleotides/ CpG-Oligodesoxynukleotide
ct	cycle threshold/ Zyklus-Schwelle
DAP	diastolic arterial pressure/ diastolischer arterieller Blutdruck
DD	death domain/ Todes-Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFn	degrees of freedom numerator/ Zählerfreiheitsgrade
DFd	degrees of freedom denominator/ Nennerfreiheitsgrade
D-Gal	D-Galaktosaminsäure
DNA	deoxyribonucleic acid/ Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dsRNA	double stranded ribonucleic acid/ doppelsträngige Ribonukleinsäure
+dP/dt _{max}	maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit
-dP/dt _{min}	maximale Druckabfallsgeschwindigkeit
Endothelin-1	ET-1
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fr.	French, Maßeinheit, 1 Fr.= 0,33 mm Außendurchmesser 1 French= 1 Charrière

GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
G (Gauge)	Maßeinheit für Kanülendicke, 27G= 0,4 mm
G	Gravitationsbeschleunigung
GIT	Guanidiniumthiocyanat
HMGB1	high-mobility group protein B1
HR	heart rate/ Herzfrequenz
HSP	heat shock protein/ Hitzeschockprotein
HW	heart weight/ Herzgewicht
Ig	Immunglobulin/ Immunoglobulin
I κ B	inhibitor of κ B
IKK	I κ B kinase complex/ I κ B Kinase Komplex
IKK- α	inhibitor of nuclear factor κ B kinase subunit α (IKK1)
IKK- β	inhibitor of nuclear factor κ B kinase subunit β (IKK2)
IKK- γ	inhibitor of nuclear factor κ B kinase subunit γ
	NEMO
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IL-1R2	Interleukin-1 Rezeptor Typ II
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
i.p.	intraperitoneal
IRAK	IL-1R associated kinase/ IL-1R assoziierte Kinase
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucin-rich-repeats
LVEDD	left ventricular enddiastolic diameter/ linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVEDP	left ventricular enddiastolic pressure/ linksventrikulärer enddiastolischer Blutdruck
LVEDV	left ventricular enddiastolic volume/ linksventrikuläres enddiastolisches Volumen

LVDP	left ventricular diastolic pressure/ linksventrikulärer diastolischer Blutdruck
LVSP	left ventricular systolic pressure/ linksventrikulärer systolischer Blutdruck
LVW	left ventricular weight/ linksventrikuläres Gewicht
mg	Milligramm
µl	Mikroliter
MAP	mean arterial pressure/ mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	mitogen-activated protein kinase
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMTV	mouse mammary tumor virus/ murines Mäusemammatumor-Virus
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88/ Myeloid-Differenzierungsfaktor 88
NEMO	NF-κB essential modulator/ IKK-γ
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
ODN	oligodeoxynucleotides/ Oligodesoxynukleotide
OP	Operation
<i>p</i>	Wahrscheinlichkeit
p50	Transkriptionsfaktor p50
p65	Transkriptionsfaktor p65
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PCR	polymerase chain reaction/ Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphat buffered saline/ Pufferlösung

PRR	pattern recognition receptor
RQ	relative quantification/ relative Quantifizierung
RTD-PCR	real-time detection PCR
RSV	respiratory syncytial virus
SAP	systolic arterial pressure /systolischer arterieller Druck
SEM	standard error of the mean/ Standardfehler des Mittelwerts
SOP	Scheinoperation
ssRNA	single stranded ribonucleic acid/ einzelsträngige Ribonucleinsäure
SV	Schlagvolumen
TAB1	TAK-binding protein 1
TAB2	TAK-binding protein 2
TAK	transverse aortale Konstriktion
TAK1	TGF- β activated kinase/ TGF- β -aktivierte Kinase 1
TGF- β	transforming growth factor β
TIR	Toll/ IL-1R
TL	tibial length/ Tibialänge
TLR	Toll-like receptor/ Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF	α -associated factor 6/ TNF-assoziierter Faktor 6
UBC13	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13
UEV1A	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1
USP	United State Pharmacopeia, Einheit für die Stärke von chirurgischem Nahtmaterial
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
Vol.	Volumen
vgl.	vergleiche
vs	versus

1. Einleitung

1.1 Herzhypertrophie

Als Herzhypertrophie bezeichnet man gemeinhin eine Zunahme der Myokardmasse – sprich eine Vergrößerung des Herzmuskels als Reaktion auf Mehrarbeit respektive Mehrbelastung. Diese Mehrbelastung kann physiologischer (körperliches Training) oder pathologischer Natur (Klappenerkrankungen, Hypertonie, ischämische Herzerkrankung) sein. Dementsprechend wird zwischen physiologischer und pathologischer Herzhypertrophie unterschieden.

Die physiologische Herzhypertrophie erhält dabei die Herzfunktion, während es bei der pathologischen Herzhypertrophie zu Folgeerscheinungen wie Herzversagen, Arrhythmien und Herztod kommt (Pape et al., 2018).

Bei der physiologischen Hypertrophie kommt es als Reaktion auf physiologische Stimuli auf zellulärer Ebene zu einer Zunahme sowohl von Durchmesser als auch Länge der Kardiomyozyten. Dies erhöht die Kontraktilität, da nun mehr Sarkomere parallelgeschaltet werden. Gleichzeitig reduziert sich der Stress auf die Herzwand gemäß dem Gesetz von Laplace und das Herz präserviert seine Effektivität (Nakamura und Sadoshima, 2018).

Die pathologische Herzhypertrophie wird in zwei Formen unterteilt: die konzentrische und die exzentrische Form.

Die konzentrische Herzhypertrophie entspricht der Reaktion auf eine vermehrte Druckbelastung des Herzens (z. B. bei Aortenstenose oder essenzieller Hypertonie). Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer Zunahme des Durchmessers der Kardiomyozyten, wobei gleichzeitig der LVEDD (linksventrikulärer enddiastolischer Diameter) reduziert wird.

Die exzentrische Form entspricht der Reaktion des Herzmuskels auf eine vermehrte Volumenbelastung (z. B. Mitral- oder Aortenklappeninsuffizienz). Hierbei kommt es vornehmlich zu einer Längenzunahme der Kardiomyozyten mit konsekutiv reduzierter kontraktiler Funktion. Der LVEDD nimmt hierbei im Sinne einer Dilatation zu (Hunter und Chien, 1999; Nakamura und Sadoshima, 2018).

Neben diesen Unterschieden auf zellulärer Ebene unterscheiden sich physiologische und pathologische Hypertrophie wesentlich in ihrer molekularen Antwort auf die jeweiligen Stimuli. Bei der physiologischen Hypertrophie kommt es zu einer vermehrten Angio-

genese, verbesserter Energieeffizienz sowie auch gesteigerter Proteinsynthese, welche zum Ziel hat, die Energieversorgung der hypertrophierten Zelle zu verbessern und aufrecht zu erhalten. Bei der pathologischen Hypertrophie dagegen kommt es zur Aktivierung alternativer Signaltransduktionswege, welche schlussendlich zu mitochondrialer Dysfunktion, insuffizienter Angiogenese, veränderter Sarkomerstruktur und insbesondere intramyokardialer Fibrose führen (Nakamura und Sadoshima, 2018).

Somit kann bei einer physiologischen Hypertrophie die Kontraktilität erhalten bleiben, während bei der pathologischen Hypertrophie die Kontraktilität und damit auch die Herzfunktion reduziert ist. Auf molekularer Ebene sind es insbesondere der atriale natriuretische Faktor (ANF) sowie das brain natriuretic peptide (BNP), welche bei der pathologischen Herzhypertrophie über eine Aktivierung fetaler Gene hochreguliert beziehungsweise vermehrt exprimiert werden (Chien et al., 1991; Nakamura und Sadoshima, 2018).

Auf zellulärer Ebene scheint insbesondere die myokardiale Fibrose für Folgeerscheinungen wie Arrhythmien und Herzversagen respektive plötzlichen Herztod mitverantwortlich zu sein. Hierbei wurde sowohl für die Druck- als auch die Volumenbelastung bereits eine interstitielle Fibrose im Herzen beschrieben (Berk et al., 2007; Kong et al., 2014). Eine zentrale Rolle bei der Entstehung der kardialen Fibrose scheint dabei der transforming growth factor β (TGF- β) einzunehmen. Auch dieser wird über eine Reaktivierung fetaler Gene im pathologisch hypertrophierten Herzen exprimiert und gilt als pro-fibrotischer Mediator, welcher direkt Fibroblasten stimuliert und zur vermehrten Kollagensynthese anregt (Frangogiannis, 2018; Komuro, 1993).

1.2 Angeborenes Immunsystem

Das humane Immunsystem hat die Aufgabe, den menschlichen Organismus vor Infektionen durch äußere, pathogene Mikroorganismen oder körperfremde Einflüsse im Inneren zu schützen. Generell wird hierbei zwischen einem unspezifischem oder angeborenem sowie einem spezifischem beziehungsweise erworbenem Immunsystem unterschieden. Das spezifische Immunsystem impliziert eine zellulär vermittelte Immunantwort durch B- und T-Lymphozyten. Der antigen-erkennende B- und T-Zell-Rezeptor ist hierbei nicht genetisch determiniert, sondern wird durch eine somatische Gen-Neuanordnung willkürlich bestimmt. Dieser Prozess ermöglicht Millionen Varianten von Antigen-Rezeptoren mit

zufälliger Spezifität und struktureller Einzigartigkeit. Erst das Zusammentreffen mit dem für sie spezifischen Antigen führt zu Auswahl und anschließend klonaler Expansion (Horn, 2019). Diese Rezeptoren und Antikörper können, so nützlich sie auch sind, nicht an nachfolgende Generationen weitergegeben werden (Medzhitov und Janeway, 2000a; Medzhitov und Janeway, 2000c). Eine kurzfristige Ausnahme bildet die Weitergabe mütterlicher Antikörper transplazentar, welche den sogenannten „Nestschutz“ für etwa drei Monate generiert.

Das angeborene Immunsystem ist das phylogenetisch deutlich ältere System und allen Multizellorganismen gemein (Medzhitov und Janeway, 2000a). Dieses System wird aktiviert sobald ein Pathogen die äußere, mechanische Barriere, welche in der Regel aus Epithelien sowie antibakteriellen Enzymen (z.B. Lysozym) besteht, überwunden hat (Medzhitov und Janeway, 2000b).

Die Erkennung des Pathogens erfolgt hierbei über Rezeptoren, welche genetisch determiniert sind, folglich weitervererbt werden können und sich per natürlicher Selektion entwickelt haben. Da die Rezeptoren genetisch fixiert sind, ist ihr Variantenreichtum im Vergleich zu den B- und T-Zellrezeptoren deutlich eingeschränkt. Die Strategie liegt vielmehr darin, sich auf einige wenige, hoch konservierte Strukturen, welche große Gruppen von Mikroorganismen vereinen, zu fokussieren, statt jedes mögliche Antigen zu erkennen (Janeway, 1989; Medzhitov und Janeway, 2000a). Diese Strukturen mit konserviertem Muster sind das Ziel der angeborenen Immunabwehr und werden subsummiert unter dem Begriff „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs). Diese PAMPs weisen mehrere spezifische Eigenschaften auf: Erstens, sie werden nur von pathogenen Mikroorganismen produziert und nicht vom Wirtsorganismus; zweitens, sie sind unverzichtbar für das Überleben ihrer Mikroorganismen; drittens, sie werden gemeinsam von einer großen Gruppe von Mikroorganismen genutzt; viertens, ihre molekulare Struktur steht häufig für eine bestimmte Klasse von Mikroorganismen (Medzhitov und Janeway, 2000b; Palm und Medzhitov, 2009). Die Erkennung dieser PAMPs auf Seiten des Wirtsorganismus obliegt spezialisierten Rezeptoren, die als „pattern recognition receptors“ (PRRs) klassifiziert werden. Die PRRs sind dabei involviert in die Opsonierung von Bakterien und Viren, Phagozytose, Auslösung einer Signalkette beziehungsweise eines Signalweges und im Folgenden Induktion und Transkription antimikrobieller Peptide sowie proinflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF, IL-1 β) und Chemokine (Kawai und Akira,

2005; Lien und Ingalls, 2002; Medzhitov und Janeway, 2000b; Medzhitov und Janeway Jr, 1998). Eine große und wichtige Gruppe von Rezeptoren innerhalb der Gruppe der PRRs sind die Toll-like Rezeptoren. Der erste humane Toll-like Rezeptor wurde von Medzhitov et al. (1997) beschrieben. Mittlerweile sind 13 humane TLRs beschrieben. Dabei erkennt jeder TLR spezifische Muster mikrobiologischer Komponenten (Tab. 1 (Takeda und Akira, 2015)).

Tab. 1: TLRs und ihre Liganden (Takeda und Akira, 2015)

TLR	Ligands	Monoclonal antibody
TLR1	Triacyl lipopeptides	GD2.F4 (human)
TLR2	Peptidoglycan lipopeptides, lipoteichoic acid, lipoarabinomannan, GPI anchors, phenol- soluble modulins, zymosan, glycolipids	T2.5 (mouse and human) TL2.1 (human), mT2.7 (mouse), 6C2 (mouse)
TLR3	dsRNA	TLR3.7 (human)
TLR4	LPS, Taxol, RSV fusion protein, MMTV envelope protein, endogenous ligands, (HSPs, fibronectin, hyaluronic acid)	HA 125 (human), MTS510 (mouse, recognizes TLR4/MD-2)
TLR5	Flagellin	Q23D11 (mouse)
TLR6	Diacyl lipopeptides	C5C8 (human)
TLR7	ssRNA, imidazoquinolines	
TLR8	ssRNA, imidazoquinolines (only in humans)	
TLR9	CpG DNA	eB72-1665 (human)
TLR10	Unkonwn	
TLR11	Profilin, Flagellin	eB72-1665 (human)
TLR12	Profilin	
TLR13	Bacterial 23 S ribosomal RNA	

Die Toll-like Rezeptoren werden sowohl auf lymphoidem als auch nicht-lymphoidem Gewebe exprimiert. Sie wurden bereits auf Monozyten, neutrophilen Granulozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und dendritischen Zellen nachgewiesen (Kadowaki et al.,

2001). Toll-like Rezeptoren finden sich aber auch auf Endothelzellen sowie Herzmuskelzellen (Baumgarten et al., 2006a; Boyd et al., 2006; Lien und Ingalls, 2002).

1.3 Herzhypertrophie und Sepsis - Septische Kardiomyopathie

Die internationale Sepsisdefinition hat sich über die Jahre hinweg immer wieder gewandelt. Die erste Definition aus dem Jahr 1992 – genannt Sepsis-1 (Bone et al.) – wurde im Jahr 2001 überprüft und um Laborparameter sowie Symptome erweitert (Levy et al., 2003). Zuletzt wurde die Sepsisdefinition im Jahr 2014 im Rahmen einer Konsensuskonferenz grundlegend revidiert (Seymour et al., 2016). Eine akute Sepsis ist gemäß dieser Konsensuskonferenz eine lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer inadäquaten Wirtsantwort auf eine Infektion.

Gemäß der Gesundheitsberichterstattung des Bundes, einer gemeinschaftlichen Einrichtung des Robert Koch Institutes und des Statistischen Bundesamtes lag die Zahl, der an einer – bakteriellen – Sepsis Erkrankten im Jahr 2013 bei 96.107 (das entspricht 116 Fällen auf 100.000 Einwohner), im Jahr 2014 bei 106.385 (126 Fälle auf 100.000 Einwohner) sowie im Jahr 2015 bei 114.486 (133 Fälle auf 100.000 Einwohner) (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 18.11.2018a). Die Zahl der Sterbefälle lag in diesen Jahren bei 8.039 (Jahr 2013) (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 18.11.2018b), 8.578 (Jahr 2014) (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 18.11.2018c) sowie 9.356 (Jahr 2015) (Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 18.11.2018d). Wie die Zahlen eindrücklich belegen, handelt es sich hierbei offensichtlich um ein wachsendes Problem mit zu optimierenden Behandlungsstrategien.

Eine besondere Herausforderung, der sich die Intensivmediziner dabei ausgesetzt sehen, ist die Sepsis assoziierte/ induzierte oder septische Kardiomyopathie, die mit einer hohen Mortalität einhergeht.

Bereits in den 80er Jahren konnten mehrere Arbeitsgruppen eine reduzierte Ejektionsfraktion respektive eine reduzierte myokardiale Zellkontraktion von Patienten im septischen Schock *in vitro* und *in vivo* beschreiben (Calvin et al., 1981; Parker et al., 1984; Parrillo et al., 1985). In der Folge konnte die Arbeitsgruppe um Parrillo das Vorhandensein von TNF oder das Endotoxin gram-negativer Bakterien (Lipopolysaccharid/ LPS) als ursächlich für die kardiale Depression ausmachen (Natanson et al., 1989). Es zeigte sich hierbei eine erhöhte Mortalität (39 % gegenüber 7 %) für Patienten mit Endotoxinämie

(Parrillo, 1990). Die gleichen negativ inotropen Effekte konnten Kumar et al. (1996) für IL-1 β *in vitro* nachweisen. Für Fälle mit akutem beziehungsweise schwerem Herzversagen wurden erhöhte Serumspiegel von IL-6 beschrieben (MacGowan et al., 1997; Suzuki et al., 2005). Proinflammatorische Zytokine scheinen somit eine kritische Rolle in der Induktion einer kardialen Dysfunktion zu haben.

In den letzten Jahren konnten verschiedene Arbeitsgruppen aufzeigen, dass an der Expression und Produktion der proinflammatorischen Zytokine im Herzen und der damit einhergehenden kardialen Depression respektive Dysfunktion die PRRs TLR4, TLR2 und TLR9 direkt beteiligt sind beziehungsweise diese induzieren (Baumgarten et al., 2006b; Baumgarten et al., 2001; Boehm et al., 2013a; Knuefermann et al., 2004; Lohner et al., 2013).

Nachdem Baumgarten et al. (2002) nachgewiesen hatten, dass bereits nur im druckbelasteten Herzen die Expression proinflammatorischer Zytokine hochreguliert wird, konnten sie in der Folge den Nachweis erbringen, dass dieser Effekt nach einem zweiten Stimulus – dem sogenannten „Second-hit“ (LPS-Gabe i.p.) – noch ausgeprägter ausfiel (Baumgarten et al., 2006a). Das vorgeschädigte Herz scheint somit überschießend auf eine LPS-Stimulation zu reagieren.

In weiteren *in vitro*- wie auch *in vivo*-Studien arbeitete diese Arbeitsgruppe heraus, dass sowohl eine TLR-4-Defizienz (mit TLR4 Knock-out-Mäusen) als auch ein direkter Antagonismus mit dem Zweit-Generation-LPS-Analogon Eritoran (E5564) die kardiale Funktion erhalten, eine kardiale Hypertrophie verhindern und die intrakardiale Produktion proinflammatorischer Zytokine reduzieren können (Ehrentraut et al., 2015; Ehrentraut et al., 2011). Auch die Antagonisierung des Cytidin-Phosphorsäure-Guanosin-Motives (CpG) am TLR9 zeigte einen kardioprotektiven Effekt (Boehm et al., 2013b).

1.4 TLR9-Aktivierung und Signaltransduktion

Alle Toll-like Rezeptoren sind transmembranöse Rezeptorproteine und weisen einen ähnlichen, strukturellen Aufbau auf (Abb. 1 (Akira und Takeda, 2004)). Der intrazelluläre Anteil – die sogenannte TIR Domäne (Toll/- IL-1R) – ist sowohl Toll-like Rezeptoren als auch IL-1 Rezeptoren gemein. Sie besteht aus etwa 200 Aminosäuren, welche in drei hoch konservierten „Boxen“ organisiert sind, die Aufgaben der intrazellulären Signalkaskade sowie Rezeptor-Lokalisation übernehmen (Akira und Takeda, 2004; Bowie und

O'Neill, 2000; Slack et al., 2000). Anstelle der „Ig-like-domain“ des IL-1R, welche eine Proteindomäne mit der Möglichkeit zur Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Interaktion darstellt, besteht der extrazelluläre Teil der TLRs aus sogenannten „leucin-rich-repeats“ (LRR), wobei 19 bis 25 Tandem-Kopien dieses LRR Motivs vorliegen. Jede Kopie besteht hierbei aus 24 bis 29 Aminosäuren (Akira et al., 2006; Akira und Takeda, 2004).

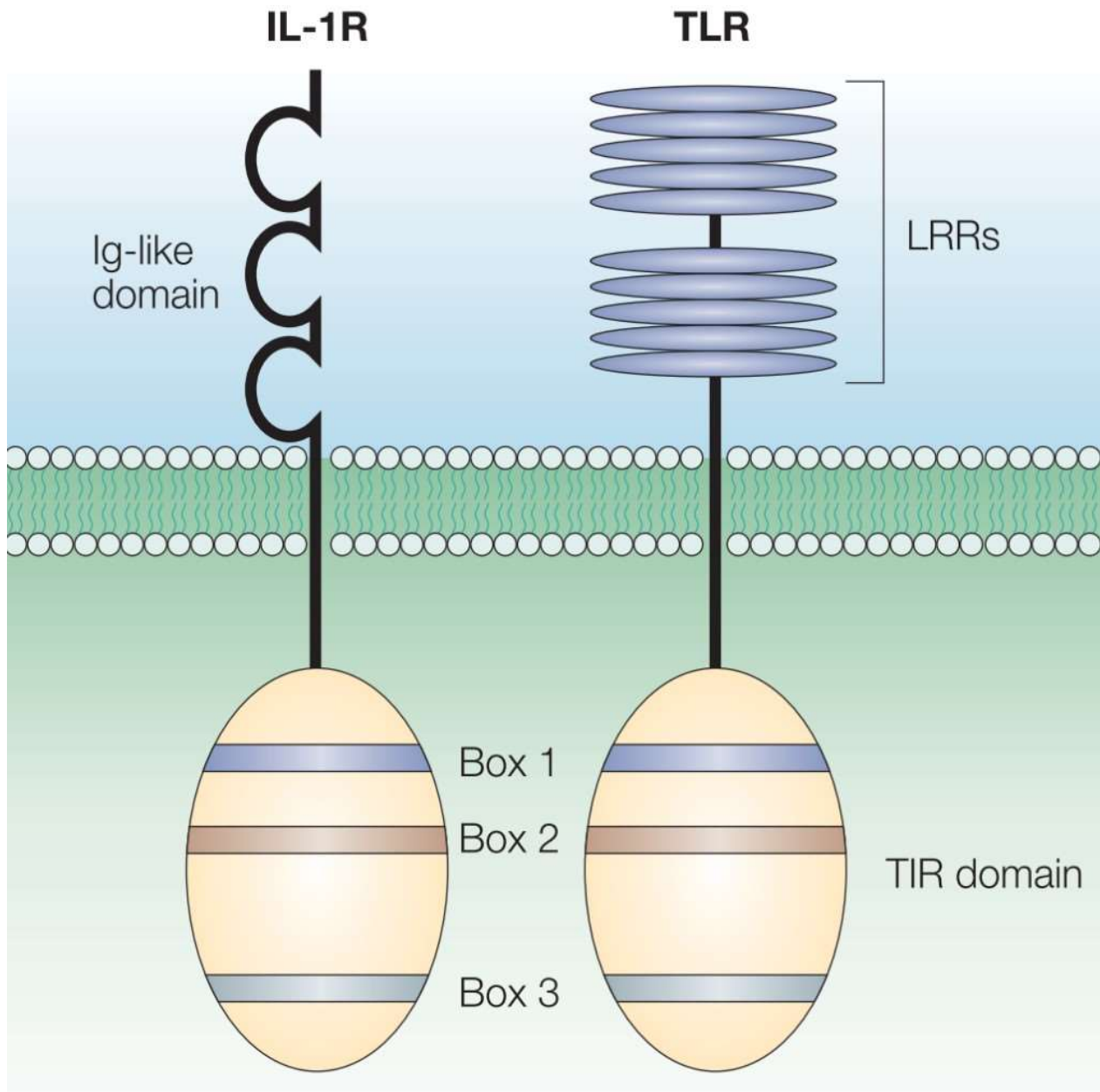


Abb. 1: Schematischer Aufbau des transmembranösen IL-1R und TLR: intrazelluläre TIR-Domäne und die extrazelluläre Ig-like-Domäne des IL-1R sowie die extrazellulären LRR der TLRs (Akira und Takeda, 2004)

Anders als TLR1, TLR2 und TLR4, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, liegt TLR9 intrazellulär – genauer: gebunden an das endoplasmatische Retikulum – vor und wird im Rahmen einer Zellaktivierung durch CpG-Deoxyribonucleic Acid (DNA/ Desoxyribonukleinsäure/ DNS) aus dem ER rekrutiert und Teil endosomaler respektive lysosomaler Kompartimente, wo er schließlich durch CpG-DNA stimuliert wird (Ahmad-Nejad et al., 2002; Latz et al., 2004b; Latz et al., 2004a). Man vermutet in der intrazellulären Verortung des TLR9 einen grundsätzlichen und wichtigen Faktor bei Vermeidung von Erkennung und Reaktion auf körpereigene DNA (Akira et al., 2006).

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, ist CpG-DNA der Ligand von TLR9. Bereits in den 90er Jahren konnten mehrere Arbeitsgruppen aufzeigen, dass bakterielle DNA mit einem CpG-Motiv – beziehungsweise sogenannte CpG-ODNs (CpG-Oligodesoxynukleotide) im Sinne künstlich synthetisierter Einzelstrang DNA-Oligodesoxynukleotide – potente immunstimulatorische Eigenschaften aufweisen und unter anderen B-Zellen aber auch NK-Zellen aktivieren sowie die Interferon- und Zytokin-Produktion induzieren (Decker et al., 2000; Krieg, 1996; Krieg et al., 1995; Yamamoto et al., 1992). Zwei Faktoren scheinen für den immunstimulatorischen Effekt von entscheidender Bedeutung zu sein. Zum einen existiert das CpG-Motiv in bakterieller DNA deutlich häufiger als in Vertebraten und zum anderen liegt bakterielle DNA – genauer das Cytosin – in der Regel unmethyliert vor, während das Cytosin von Vertebraten zu einem großen Anteil methyliert ist (Bird, 1986; Burge et al., 1992; Lipford, 1998). Letztlich konnten Hemmi et al. (2000) unter Zuhilfenahme von TLR9-Knock-out-Mäusen nachweisen, dass TLR9 der Rezeptor ist, welcher CpG-DNA erkennt und durch diese aktiviert wird.

Abb. 2 (Akira und Takeda, 2004) visualisiert den Signaltransduktionsweg des TLR schematisch.

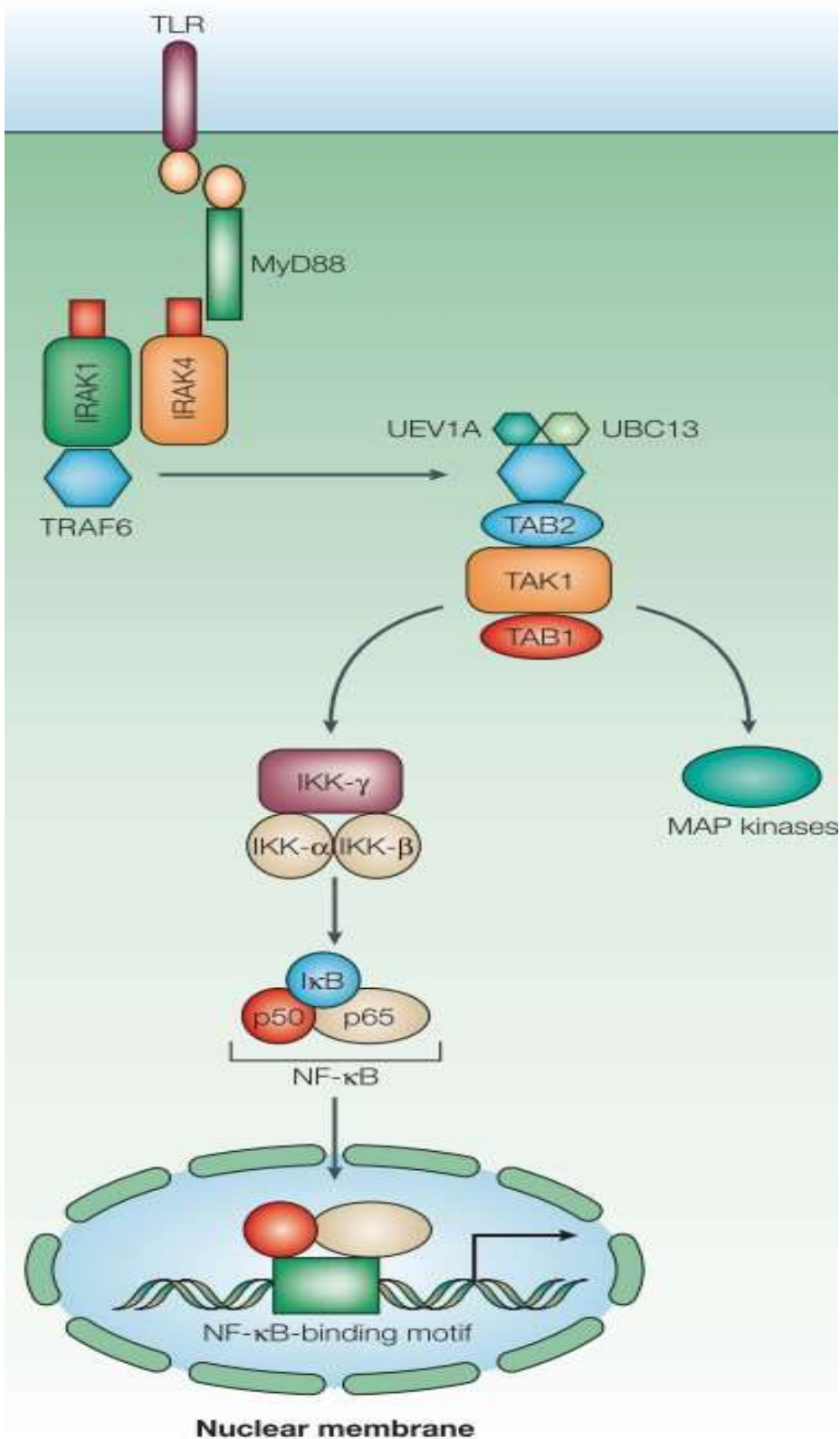


Abb. 2: TLR Signaltransduktionsweg: über eine MyD88-abhängige Signalkaskade wird unter Rekrutierung von IRAK-1 und -4 letztlich TAK1 aktiviert, der seinerseits MAP-Kinasen und den NF-κB aktiviert (Akira und Takeda, 2004)

Hierbei handelt es sich um eine MyD88-abhängige Signalkaskade. Nach Ligandenbindung unterläuft der TLR9 eine Konformationsänderung und assoziiert sich über die TIR-Domäne mit den Myeloid-Differenzierungsfaktor-88 (MyD88). Dieser besitzt in c-terminaler Position eine korrespondierende TIR-Domäne sowie eine Todes-Domäne (DD) in n-terminaler Position (Medzhitov et al., 1998; Schnare et al., 2000). Über die DD rekrutiert der MyD88 die IL-1R-assozierte-Kinase 4 und 1 (IRAK-4, IRAK-1), welche ebenfalls eine korrespondierende DD besitzen. Über Phosphorylierung werden die Kinasen aktiviert (Picard et al., 2003; Suzuki et al., 2002). Nach Aktivierung assoziiert sich IRAK-1 mit dem TNF-assoziierten Faktor 6 (TRAF 6), welcher als E3 Ubiquitin Ligase fungiert und mittels dem E2 Ubiquitinierungskomplex aus UBC13 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13) und UEV1A (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1) die TGF- β -aktivierte Kinase 1 (TAK1) per Ubiquitinierung aktiviert (Cao et al., 1996; Li et al., 2002). TAK1 kann nun die Transkriptionsfaktoren NF- κ B (nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells) und Aktivator Protein 1 (AP1) aktivieren. Im Falle des AP1 erfolgt dies über die Aktivierung von MAP-Kinasen (MAPK/ mitogen-activated protein kinase) (Akira et al., 2006; Wang et al., 2001). In die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sind zwei weitere Adapterproteine involviert: TAK-binding protein 1 und 2 (TAB1/ 2) (Shibuya et al., 1996; Takaesu et al., 2001; Takaesu et al., 2000). Der Aktivierungsprozess wird vermittelt durch den I κ B Kinase Komplex (inhibitor of κ B kinase complex/ IKK), welcher aus zwei katalytischen Einheiten – IKK- α / IKK1 und IKK- β / IKK2 (Inhibitor of nuclear factor κ B kinase subunit α und β) – sowie einer regulatorischen Einheit IKK- γ / NEMO (Inhibitor of nuclear factor κ B kinase subunit γ / NF- κ B essential modulator) besteht (Karin und Ben-Neriah, 2000). Nach Aktivierung durch TAK1 phosphoryliert der IKK I κ B, welcher daraufhin degradiert und den NF- κ B frei gibt, woraufhin dieser in den Nukleus translozieren kann. Der NF- κ B besteht aus den Transkriptionsfaktoren p50 und p65. Beide Transkriptionsfaktoren induzieren intranukleär nun ihrerseits die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-6 und IL-1 β (Akira und Takeda, 2004; Deng et al., 2000; Ninomiya-Tsuji et al., 1999; Takeda et al., 2003; Wang et al., 2001).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Die oben erwähnten Fakten und bestehenden Forschungsergebnisse zeigen deutlich die Wichtigkeit weiterer Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Sepsis induzierten Kardiomyopathie und der molekularen Mechanismen, die dieser zugrunde liegen. Für den TLR2- und den TLR4-Rezeptor wurden diese bereits nachgewiesen und beschrieben. Leider ergab sich aus diesem Wissen noch kein grundlegender Fortschritt in der klinischen Sepsis-Therapie. Eine groß angelegte Phase III-Studie mit Eritoran konnte im Endpunkt Gesamtmortalität nach 28 Tagen keine Vorteile gegenüber Placebos aufweisen (Opal et al., 2013). Genauer betrachtet ist es nicht verwunderlich, dass die Blockade eines einzigen PRR, der zudem noch weitere PAMPs außer LPS erkennt (siehe Tab. 1), die Gesamtmortalität eines so komplexen multifaktoriellen Geschehens wie einer Sepsis nicht signifikant reduzieren konnte (Martin et al., 2017). Umso bedeutender sind weitere Untersuchungen, um den Kenntnisstand über die zahlreichen TLRs zu erweitern und ihren Einfluss auf die kardiale Funktion in der Sepsis zu ergründen. Da auch die Stimulation des TLR9 mit CpG-DNA zu einem septischen Krankheitsbild führt, soll in dieser Arbeit – analog zum Second-hit Modell des TLR4-Rezeptors – der TLR9 in einem entsprechenden Second-hit-Setting untersucht werden (Baumgarten et al., 2006a; Hemmi et al., 2000; Sparwasser et al., 1997a; Sparwasser et al., 1997b). Auf folgende Hypothesen soll hierbei besonderes Augenmerk gerichtet werden:

1. Drei Tage nach transverser aortaler Konstriktion (TAK) wird ein Ausmaß an kardialer Hypertrophie erzielt, wie es schon vorher beschrieben wurde.
2. Die Gabe von CpG führt im hypertrophierten Herzen zu einer zusätzlichen Funktionseinschränkung.
3. Im hypertrophierten Herz wird durch die Gabe von CpG eine erhöhte Expression von sowohl PRRs als auch proinflammatorischen Markern erzielt.

Hierzu werden zum einen die hämodynamischen Effekte einer Stimulation mit CpG-ODN auf die kardiale Funktion analysiert und zum anderen die Expression bekannter TLRs und proinflammatorischer Zytokine gemessen. Diese Daten werden abschließend zueinander in Bezug gesetzt, um Rückschlüsse auf ihren Einfluss hinsichtlich der kardialen Funktion ziehen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und deren Haltungsbedingungen

Bei den Studientieren handelte es sich um ausschließlich weibliche Mäuse der Zuchtlinie C57BL/6. Die Tiere stammten von der Charles River Deutschland GmbH (Sulzfeld) sowie aus der institutseigenen Zucht (ehemalige Herkunft ebenfalls Charles River Deutschland). Die Aufzucht und Haltung erfolgte nach artgerechten, tierschutzrechtlichen und hygienischen Gesichtspunkten in transparenten 365 x 207 x 140 mm großen (Länge x Breite x Höhe), belüfteten Polycarbonatkäfigen. Unter gleichbleibenden klimatischen Bedingungen (Raumtemperatur von 20-22°C, relative Luftfeuchtigkeit von 50 % und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus) wurden 3-5 Tiere pro Einheit gehalten. Als Einstreu fand Altromin-Tiereinstreu-Granulat Verwendung (Altromin, Lage, Deutschland). Futter (Altromin Standarddiät Maus und Ratte) und Wasser stand den Tieren ad libitum zur Verfügung. Eine Genehmigung der Studien an den Tieren durch die Bezirksregierung Köln lag vor (Aktenzeichen 50.203.2-AC43 38/06).

2.2 Gruppeneinteilung und Versuchsprotokoll

Für die *in vivo*-Versuche wurden weibliche Tiere der Linie C57BL/6 im Alter von 12-15 Wochen verwendet.

Alle Tiere wurden vor Versuchsbeginn zunächst adspektorisch auf ihren Gesundheitszustand untersucht. Alle Tiere wurden im Anschluss thorakotomiert. Zur Erzeugung einer erhöhten Druckbelastung im Herzen wurde bei einem Teil der Tiere eine transversale aortale Konstriktion (TAK) durchgeführt, während ein anderer Teil lediglich einer Scheinoperation (SOP) unterzogen wurde. Drei Tage post operationem wurden die Tiere per intraperitonealer Injektion stimuliert. Sie erhielten hierzu i.p. ein priming mit 200 µl D-Gal (D-Galaktosaminsäure, entspricht 1 mg/kg Körpergewicht), welches den Mausorganismus durch Induktion einer Hepatitis für die Wirkung der CpG-ODNs sensibilisiert (Decker und Keppler, 1974; Hemmi et al., 2000; Sparwasser et al., 1997b; Yi et al., 2006). Nach 30 Minuten erhielten die Tiere anschließend 50 µl CpG-ODN (entspricht 200 nmol/kg Körpergewicht beziehungsweise 5 nmol absolute Dosis, siehe Abb. 3). Alternativ erhielten die Tiere 250 µl PBS (Phosphat buffered saline) als Placebolösung. Um einen eventuellen

Einfluss von D-Gal auf den Versuchsaufbau zu untersuchen, wurde ein Teil der Tiere zunächst normal mit 200 µl D-Gal vorbereitet und erhielt im Anschluss 100 µl PBS i. p.

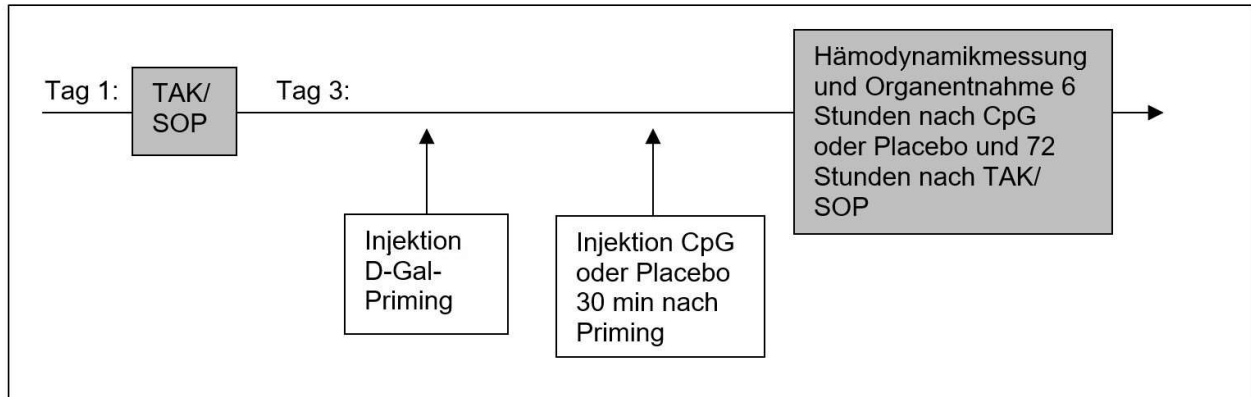


Abb. 3: Versuchsaufbau: An Tag 3 nach OP erfolgte zunächst das D-Gal-Priming und 30 Minuten später die CpG-/ Placebo (PBS) -Gabe. Nach weiteren 6 Stunden erfolgte zunächst die Hämodynamikmessung und anschließend die Organentnahme. Der Ablauf an Tag 3 wurde so organisiert, dass die Hämodynamikmessung und Organentnahme 72 Stunden nach TAK/ SOP erfolgte

Gemäß dem Versuchsplan ergab sich folgende Gruppeneinteilung:

Gruppe 1: SOP + PBS-Stimulation (Placebo)

Gruppe 2: TAK + PBS-Stimulation (Placebo)

Gruppe 3: SOP + D-Gal-Priming + PBS-Stimulation (Kontrolle)

Gruppe 4: TAK + D-Gal-Priming + PBS-Stimulation (Kontrolle)

Gruppe 5: SOP + D-Gal-Priming + CpG-Stimulation

Gruppe 6: TAK + D-Gal-Priming + CpG-Stimulation

2.3 *In vivo*-Versuche

2.3.1 Anästhesie und Narkose

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Plexiglas-Inhalationsbox mittels 2 Vol.-% Isofluran (Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) und einem O₂-Frischgasfluss von 2 Liter pro Minute. Nach Erreichen einer tiefen Narkose wurde das Tier in Rückenlage auf einem temperierten (37° C) Operationstisch fixiert. Die Aufrechterhaltung der Narkose bis zur Intubation wurde über einen Nasenkonus gewährleistet. Zur OP-Vorbereitung wurde die Maus im OP-Gebiet (Kinnregion bis Ende Sternum) rasiert und mit Polyvidon-Jod-Lösung (Betaisodona, Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland) desinfiziert. Unter stereomikroskopischer Sicht (Zeiss OP-Mikroskop, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit 9-facher Vergrößerung erfolgte der Hautschnitt vom Unterrand der Mandibula bis auf Höhe des 3. bis 4. Interkostalraumes. Die darunterliegenden, bilateral angelegten Speicheldrüsen und die vordere Trachealmuskulatur wurden stumpf abpräpariert und gespreizt. In die nun gut einsehbare Trachea wurde unter Sichtkontrolle die Endotrachealkanüle des Beatmungsgerätes (MiniVent, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) eingeführt (Abb. 4, (Bittig, 2005)). Die Ventilation erfolgte anschließend mit einer Atemfrequenz von 110 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen von 200 µl. Die Narkose wurde durch 2 Vol.-% Isofluran® bei einem O₂-Fluss von 1 Liter pro Minute aufrechterhalten.

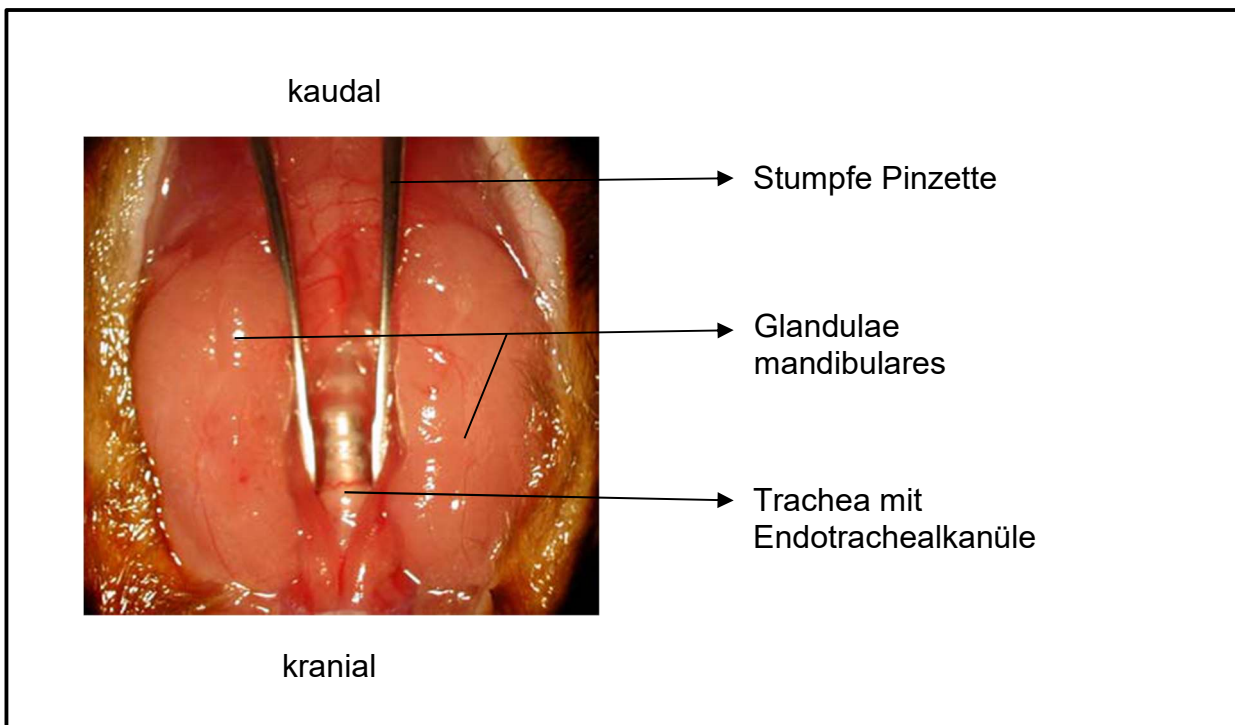


Abb. 4: Intubationsmethode, Halsbereich der Maus, Ventralansicht nach Hautschnitt und Präparation der Trachea (mit eingeführter Trachealkanüle) (entnommen aus Bittig (2005))

2.3.2 Transverse aortale Konstriktion und Scheinoperation

Die transverse aortale Konstriktion dient der Induzierung einer konzentrischen Hypertrophie durch Druckbelastung der linken Herzhälfte. Ausgelöst durch eine Widerstandserhöhung im linkventrikulären Ausflusstrakt. Als Grundlage diente die von Rockman et al. (1991) erstbeschriebene TAK-Operation mit kleinen Modifikationen (deAlmeida et al., 2010). Eine Scheinoperation wurde zu Kontrollzwecken durchgeführt. Beide Eingriffe erfolgten unter Zuhilfenahme eines Zeiss OP-Mikroskops unter 10 bis 16-facher Vergrößerung.

Wie eingangs bereits beschrieben, wurde das Tier zunächst narkotisiert, auf dem Operationstisch fixiert und intubiert (Kapitel 2.3.1). Nun wurde mittels einer Schere der Thorax parasternal bis auf Höhe der 2. Rippe eröffnet. In die Wundhöhle wurden zwei Retraktoren eingesetzt, der Thorax damit aufgespreizt und die darunterliegenden Thymuslappen dargestellt. Diese wurden stumpf präpariert und unter den Retraktoren fixiert. Hierunter ließ sich der Arcus aortae mit seinen abgehenden Gefäßen, Truncus brachiocephalicus, Arteria carotis communis sinistra und Arteria subclavia sinistra darstel-

len (Abb. 5, Bild A, (Bittig, 2005)). Die genannten Strukturen wurden vorsichtig stumpf vom umgebenden Gewebe frei präpariert. Im Anschluss wurde ein Seidenfaden der Stärke USP 5-0 unter dem Arcus hergeführt und zwei lockere gegenläufige, chirurgische Knoten angelegt. Direkt auf die Aorta unter dem ersten Knoten kam eine vorbereitete 4 mm lange 27-G Nadel (entspricht einem Außendurchmesser von 0,4 mm) zu liegen (Abb. 5, Bild B, (Bittig, 2005)). Jetzt wurden beide Knoten nacheinander fest zugezogen und die Kanülnadel rasch entfernt (Abb. 6, Bild A, (Bittig, 2005)). Durch diese Operation erreichte man eine Verringerung des Aortenbogendurchmessers von normalerweise ca. 1,2 mm auf 0,4 mm und somit eine Verengung um 65-70 % (Rockman et al., 1991).

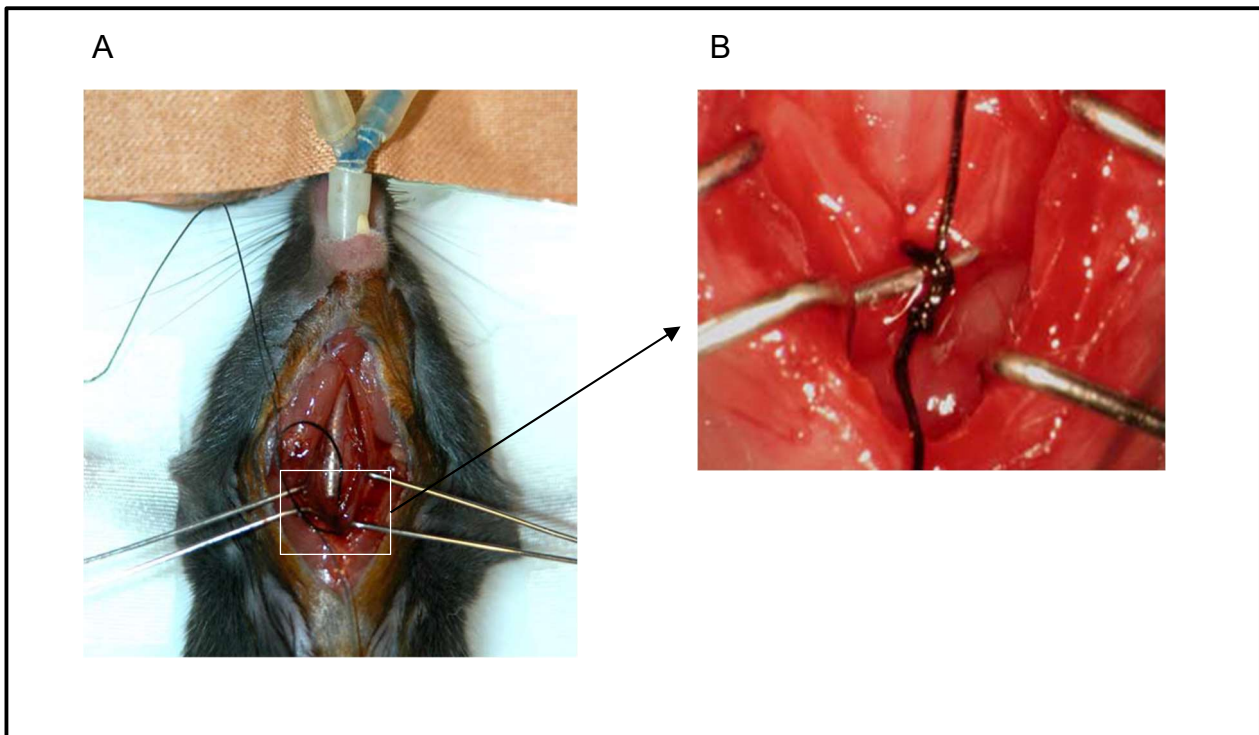


Abb. 5: Die transversale aortale Konstriktion; Bild A Übersichtsaufnahme: Maus mit Endotrachealkanüle und eröffnetem Thorax; Bild B Detailaufnahme weißer Kasten: präparierter Aortenbogen mit vorbereiteten Ligaturfäden und aufliegender Kanüle (entnommen aus Bittig (2005))

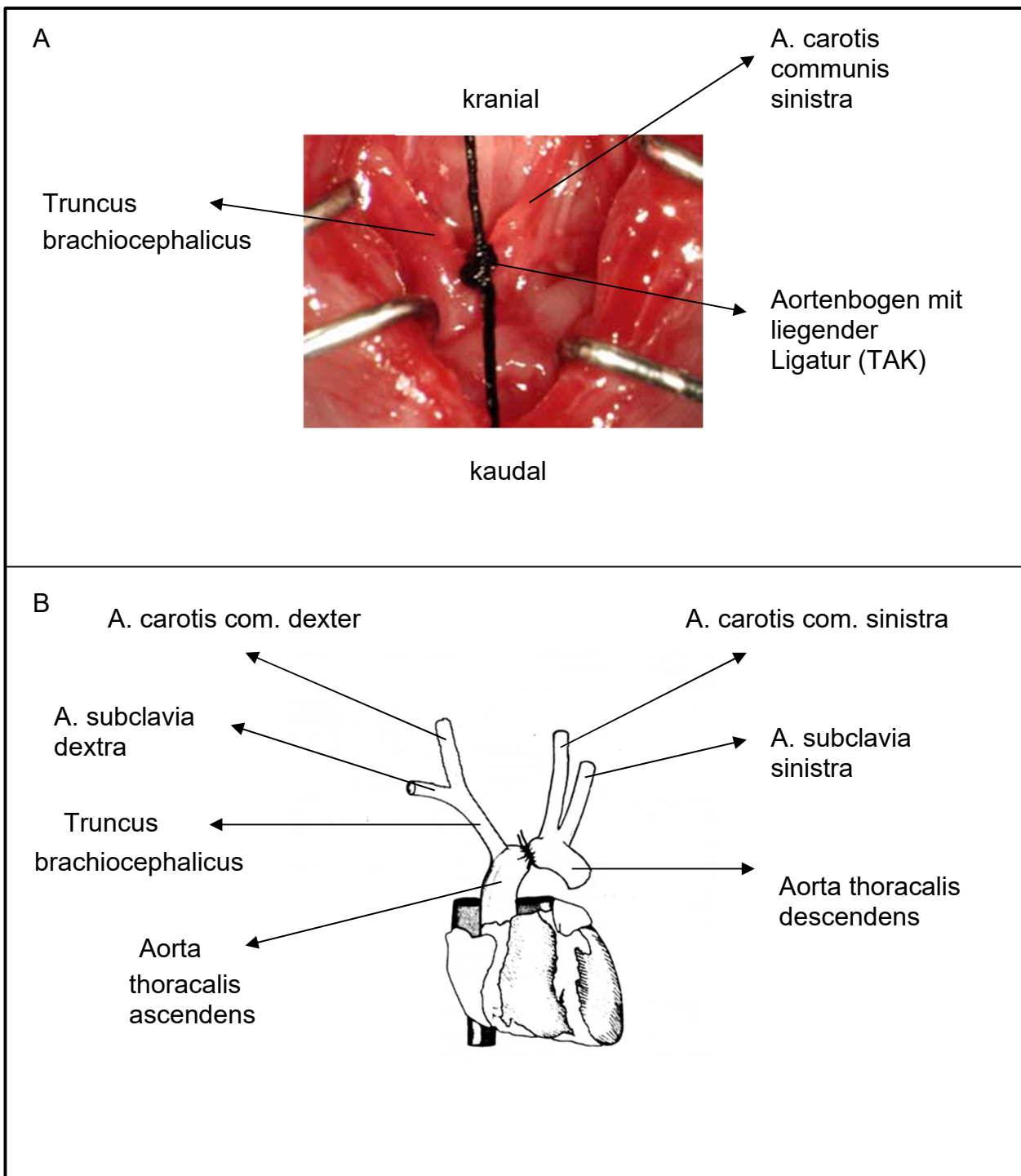


Abb. 6: Operationsübersicht und anatomische Strukturen; Bild A: Präparierter Aortenbogen mit den Abgängen der A. carotis communis sinistra und dem Truncus brachiocephalicus nach erfolgter aortaler Konstriktion (entnommen aus Bittig (2005)); Bild B: Schematische Übersicht der TAK nach Rockman et al. (1991)

Nach der erfolgten TAK wurden die Ligaturfäden gekürzt und die Retraktoren entfernt. Die bilateralen Thymuslappen wurden reponiert und der knöcherne Thorax über Einzelknopfnähte mit einem nicht resorbierbaren, monofilen Polypropylenfaden der Stärke USP 6-0 (Prolene, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Der Hautverschluss erfolgte über eine fortlaufende Naht mit einem nicht resorbierbaren, monofilen Polypropylenfaden der Stärke USP 8-0. Nach Eintritt einer ausreichenden Spontanatmung wurden die Mäuse extubiert und im Anschluss bis zur vollständigen Elimination der volatilen Narkotika unter einer Wärmelampe und 2 l/min O₂-Zufuhr überwacht.

Bei den Tieren, die einer Scheinoperation unterzogen wurden, erfolgte der Eingriff in analoger Weise. Jedoch wurde der Aortenbogen lediglich präpariert, ein Seidenfaden der Stärke USP 5-0 einmal unter dem Bogen durchgeführt und wieder vollständig entfernt. Danach erfolgten Thorax- und Hautverschluss ebenfalls gemäß dem oben beschriebenen Prozedere.

Alle Tiere erhielten zur postoperativen Analgesie 0,075 mg Buprenorphin i.p. (Temgesic®, gelöst in 0,1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung, Indivior, North Chesterfield, USA).

2.3.3 Hämodynamik – Herzkatheterisierung

72 Stunden nach durchgeführter TAK und 6 Stunden nach der entsprechenden Stimulation erfolgte eine invasive Blutdruckmessung sowie eine Einschätzung der linksventrikulären Funktion mittels eines 1,4 Fr. Millar-Katheters (Millar Instruments Inc., Houston, USA). Es handelt sich um eine Methode, die bei geschlossenem Thorax erfolgt und bereits eingehend beschrieben wurde (Doevendans et al., 1998; Lorenz und Robbins, 1997).

Zunächst wurden die Tiere, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, in Narkose versetzt und auf dem OP-Tisch in beschriebener Weise fixiert. Die Körpertemperatur des Tieres wurde sowohl über den beheizten OP-Tisch (37° Celsius) als auch über eine IR-Lampe auf 36° Celsius konstant gehalten. Zusätzlich wurde ein Extremitäten-EKG angelegt und über die Messung hinweg abgeleitet.

Nach Vorbereiten des OP-Gebietes (Enthaarung, Desinfektion) erfolgte ein medianer Hautschnitt von submental bis auf Höhe der oberen Thoraxapertur. Die weiteren Schritte erfolgten wieder unter zu Hilfenahme des Zeiss OP-Mikroskops unter 6 bis 10-facher Ver-

größerung. Alle Manipulationen sowohl am Tier als auch am Katheter wurden mit 2 Vol.-% Isofluran und 2 l/min Sauerstoff-Fluss durchgeführt, während die hämodynamischen Messungen unter 1 Vol.-% Isofluran und 1 l/min Sauerstoff-Fluss erfolgten, um den Einfluss der Narkotika auf die kardiale Funktion möglichst gering zu halten.

Die rechte Arteria carotis communis wurde aufgesucht und frei präpariert. Anschließend wurden drei vorbereitete Seidenfäden der Stärke USP 5-0 unter der Arterie durchgeführt. Mit dem ersten wurde die Arterie nach cranial ligiert und gespannt (Abb. 7, (Bittig, 2005)). Der mittlere Faden wurde zu einem lockeren Knoten gelegt und im kaudalen Drittel der Arterie platziert. Der dritte Faden wurde mittels eines Nadelhalters gefasst und so gespannt, dass die Blutzufuhr unterbrochen war (Abb. 7, (Bittig, 2005)). Nun wurde mit einer feinen Augenschere im kranialen Abschnitt der Arterie eine Inzision gesetzt, durch die der Katheter eingeführt werden konnte (Abb. 8, (Bittig, 2005)). Über den liegenden mittleren Knoten wurde der Katheter anschließend im Gefäß fixiert. Jetzt wurde der kaudale Faden gelockert und der Blutfluss im Gefäß wiederhergestellt (Abb. 9, (Bittig, 2005)). Der Katheter wurde nun vorsichtig bis vor die Aortenklappe vorgeschoben. Die richtige Lage zeigte sich durch ein Zittern des Katheters bei Kontakt zur Aortenklappe an. Der Katheter wurde nun 2-3 mm zurückgezogen, so dass alle Messungen an der gleichen Stelle stattfanden.

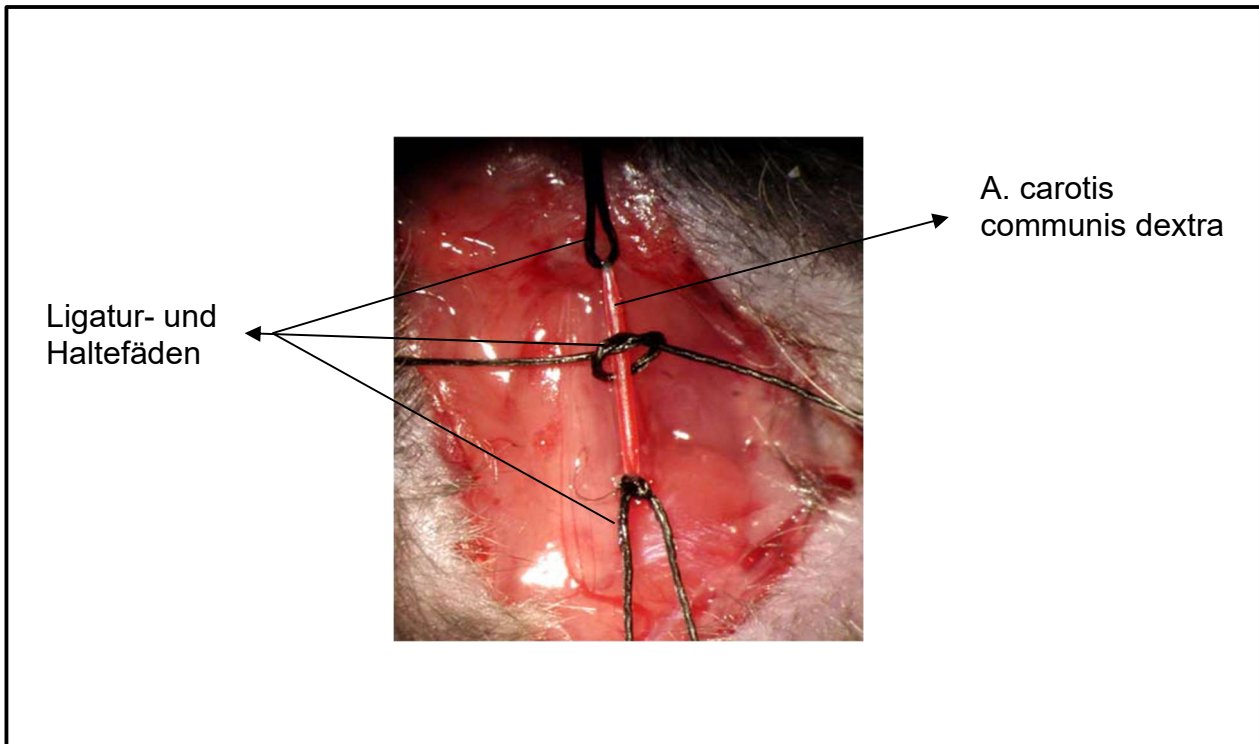


Abb. 7: Arteria carotis communis dextra mit vorbereiteten Haltefäden (entnommen aus Bittig (2005))

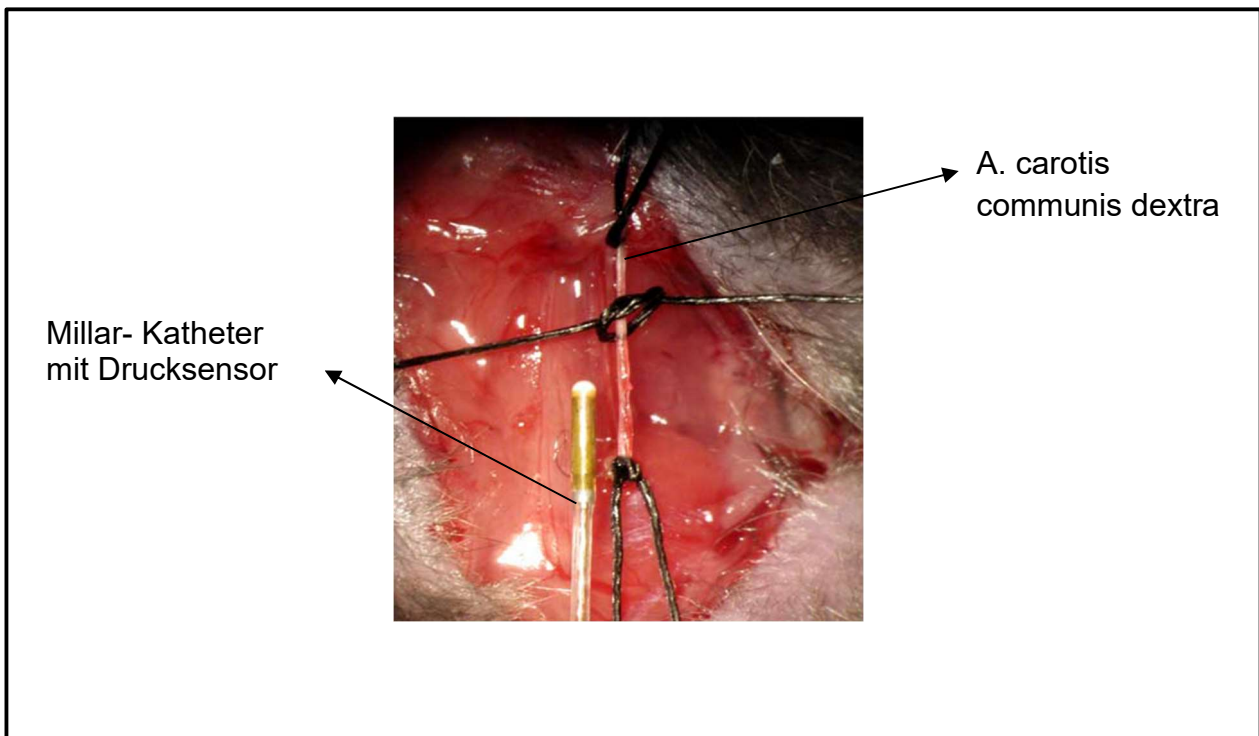


Abb. 8: A. carotis communis dextra nach Inzision sowie Millar-Katheter vor dem Einführen in das Gefäß (entnommen aus Bittig (2005))

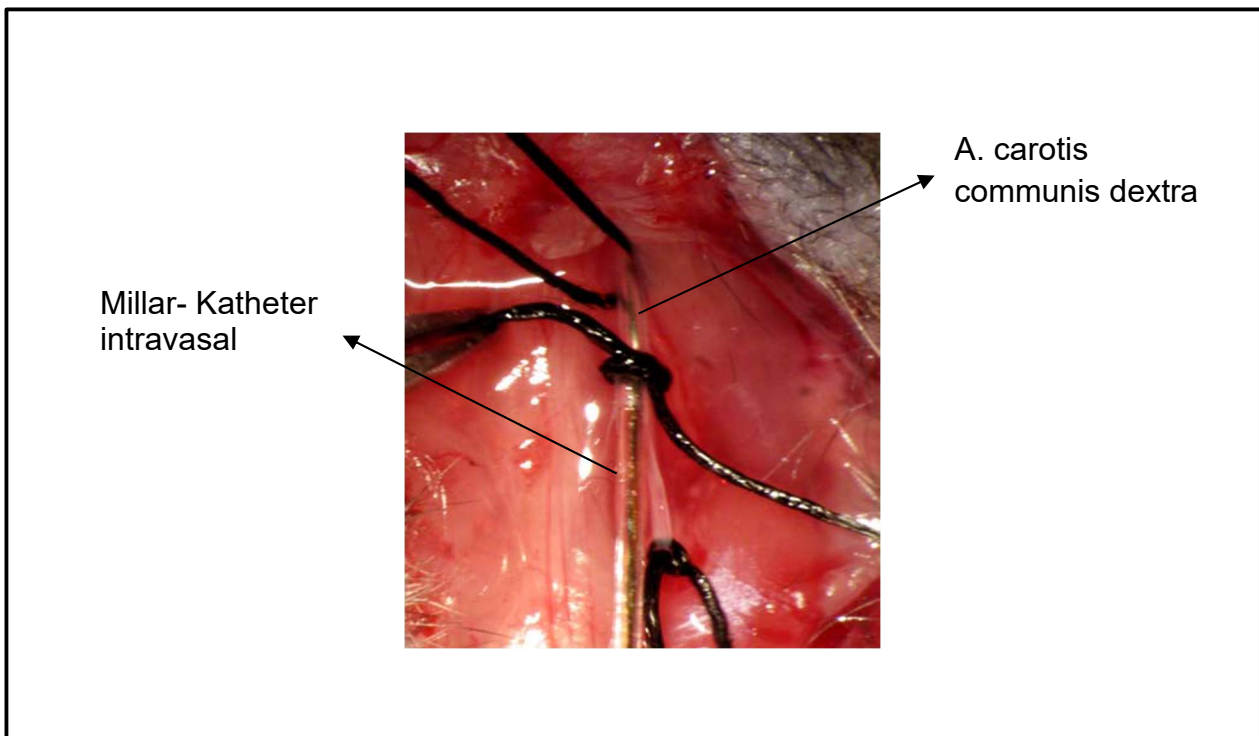


Abb. 9: Millar-Katheter intraluminal bei gelockertem, unterem Haltefaden (entnommen aus Bittig (2005))

Die Messungen erfolgten unter Zuhilfenahme eines Power Lab Data Acquisition Systems (ADInstruments, Castle Hill, Australien), an welches der Millar-Katheter angeschlossen wurde. Die simultane Auswertung der Daten wurde durch die Software Chart 5 (ADInstruments, Castle Hill, Australien), die über einen Computer mit dem System verbunden war, gewährleistet.

Zunächst wurde der periphere Blutdruck über 10 Minuten gemessen (SAP: systolic arterial pressure/systolischer arterieller Blutdruck; DAP: diastolic arterial pressure/diastolischer arterieller Blutdruck). Im Anschluss wurde der Katheter mit Drucksensor in den linken Ventrikel vorgeschoben. Bei Eintritt in den linken Ventrikel zeigte sich ein prompter Abfall des DAP und somit eine gute Lagepositionskontrolle. Wiederum wurde der Blutdruck über 10 Minuten gemessen. Die erfassten Parameter intraventrikulär waren der LVSP (left ventricular systolic pressure/linksventrikulärer systolischer Blutdruck) sowie der LVDP (left ventricular diastolic pressure/linksventrikulärer diastolischer Blutdruck). Ferner ließen sich anhand der Blutdruckkurve noch der $+dP/dt_{\max}$ (maximale Druckanstiegs-/ Kontraktionsgeschwindigkeit) und der $-dP/dt_{\min}$ (maximale Druckabfalls-/

Relaxationsgeschwindigkeit) als Gradmesser für linksventrikuläre Funktion und Compliance bestimmen.

2.3.4 Organentnahme

Nach Entfernen des Katheters wurde der mittlere Knoten zugezogen, um den Blutverlust des Tieres gering zu halten. Danach wurde das Tier über mehrere Minuten mit 3 Vol.-% Isofluran und 2 l/min Sauerstofffluss tief narkotisiert und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Folgende Organe wurden nach dem Tod des Tieres zur Analyse entnommen: Herz, Lunge, Tibia.

2.4 *In vitro*-Versuche

2.4.1 Organgewichte und Biometrie

Das Herz wurde zunächst in PBS-Lösung gewaschen und vorsichtig von noch anhängendem Gewebe freipräpariert. Dann wurden die Vorhöfe vom Ventrikel und auch der rechte vom linken Ventrikel getrennt. Nach umsichtigem Trocknen auf saugfähigem Zellstoff wurde das Gewicht beider Ventrikel sowie des linken Ventrikels allein auf einer Feinwaage (Fa. Ohaus, Pinebrook, USA) bestimmt. Ebenso wurde das Lungengewicht auf der Feinwaage bestimmt. Die Organe wurden im Anschluss in flüssigem Stickstoff bei -190° C schockgefroren und dann bei -80° C im Gefrierschrank gelagert.

Die Tibia wurde bei allen Tieren freipräpariert und mittels einer Schiebelehre (Fa. Mauser, St. Denis, Frankreich) vermessen.

2.4.2 Molekularbiologie

2.4.2.1 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den gewonnenen Proben erfolgte über die Guanidiniumthiocyanat-Methode gemäß (Chomczynski und Sacchi, 2006). Dabei wurden die Proben in einem Dispergiergerät (T 10 basic Ultra-Turrax, IKA GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Deutschland) in TRIzol Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) homogenisiert. Vor Beginn wurde der Homogenisator einmal in 4 M GIT (Guanidiniumthiocyanat) und zweimal in vorgekühltem DEPC-Wasser (0,1 % Diethylpyrocarbonat in 1 l aqua dest.)

gereinigt. Auf 100 mg Gewebeprobe kamen hierbei 1 ml TRIzol Reagent. Nach erfolgter Homogenisierung wurde das Homogenisat für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden je 200 µl Chloroform pro 1 ml TRIzol Reagent hinzupipettiert. Nach vorsichtiger Durchmischung auf einem Vortex Genie (Thermo Scientific, Bonn, Deutschland) wurde die Probe für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Im Anschluss wurden die Probenansätze in einer auf -9° C abgekühlten Eppendorf Zentrifuge (Zentrifuge 10 G 4000/min Typ 5810R, Eppendorf; Hamburg, Deutschland) für 30 Minuten bei 10 G zentrifugiert. Dadurch kam es zu einer Auftrennung des Probenansatzes in drei verschiedene Phasen. In der obersten, klaren Phase befand sich die gewünschte Gesamt-RNA. In der darunterliegenden, trüben Phase befanden sich die denaturierten Proteine. Die unterste Phase bestand aus TRIzol Reagent. Die oberste Schicht mit der gelösten sämtlichen RNA wurde heraus pipettiert und in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Um die Präzipitation der RNA zu induzieren, wurde die gewonnene Probe mit 500 µl Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) pro 1 ml angesetztem TRIzol Reagent vermischt und wieder für 10 Minuten auf Eis inkubiert.

Nach Kühlung erfolgte die erneute Zentrifugierung des hergestellten Ansatzes über 20 Minuten bei 10 G. Der Überstand des Zentrifugats wurde verworfen und das Sediment mit 75%igem Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Nach einer erneuten 10-minütigen Zentrifugation bei 10 G ließ sich nach wiederholtem Verwerfen des Überstands ein Sediment gewinnen, welches die Gesamt-RNA enthielt. Dieses wurde getrocknet und anschließend in 50 oder 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Bis zur Verwendung für weitere Versuche wurde die so isolierte RNA bei -80°C gelagert.

2.4.2.2 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Die RNA-Konzentrationsbestimmung der isolierten Proben erfolgte photometrisch mittels eines Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). 2 µl der isolierten Probe versetzt mit 98 µl DEPC-Wasser wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Je nach Grad der Absorption konnte die Konzentration der mRNA mit folgender Formel bestimmt werden:

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

2.4.2.3 Synthese der cDNA (komplementären DNA) /Reverse Transkription

Die zur Durchführung der Real-Time PCR benötigte cDNA, wurde über ein Omniscript Real-time-PCR-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland, Tab. 2) gewonnen. Pro Ansatz wurde 1 µg RNA verwendet, wobei der komplette Ansatz folgende Komponenten enthielt:

Tab. 2: Komponenten für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) gemäß dem Qiagen Omniscript Kit

10x Puffer RT	2 µl
dNTP Mix	2 µl
Oligo dT	2 µl
Omniscript Reverse Transkriptase	1 µl
RNase freies Wasser	Variabel
Template RNA	Variabel
Gesamtvolumen	20 µl

Die angesetzten Proben wurden in einem Thermocycler (Whatman Biometra T-Gradient 96, Biometra, Göttingen, Deutschland) 60 Minuten bei 37° Celsius inkubiert.

2.4.2.4 Real-time detection PCR (RTD-PCR)

Alle RTD-PCRs wurden mit dem TaqMan7400 (Applied-Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Mittels fluoreszenzmarkierter (6-FAM-phosphoramidit) TaqMan-Primer-Sonden (Tab. 3) konnte die Genexpression jeder einzelnen Probe bestimmt werden.

Tab. 3: Primer-Sonden zur Durchführung der RTD-PCR (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems)

Primer-Sonde	Produkt-Nummer
mANF	Mm01255748_g1
mBNP	Mm01255770_g1
mGADPH	Mm99999915_g1
mIL-1 β	Mm99999061_mH
mIL-6	Mm01210732_g1
mTLR1	Mm00446095_m1
mIL6R α	Mm01211445_m1
mTLR2	Mm01213946_g1
mTLR4	Mm00445273_m1
mTLR6	Mm02529782_s1
mTLR9	Mm00446193_m1
mTNF	Mm00443258_m1

Pro Ansatz – das heißt je Well – wurde eine Probe von 2,2 μ l cDNA (2,5 ng/ μ l) sowie 5 μ l TaqMan Universal PCR Mastermix, 0,5 μ l TaqManGene Expression Assay und 2,3 μ l DNase beziehungsweise RNase freies Wasser verwendet.

In einer „Two-step real-time-PCR“ erfolgte schließlich die absolute Quantifizierung. Bei der „Two-step-real-time-PCR“ folgen auf eine 10-minütige Denaturierung bei 95° C, 40 Zyklen à 15 Sekunden bei 95° C und ein abschließender Zyklus von 1 min bei 60° C. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SDS 2.2 (Applied Biosystems, Foster City, USA) welches die cycle-threshold-Werte (ct-Werte/ Zyklus-Schwelle) ermittelte. Bei der Abschätzung der spezifischen DNA-Menge fungierte das Maus-spezifische, konstitutiv exprimierte Gen („house-keeping-gene“) Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase („mouse GAPDH“) als endogene Kontrolle. Mittels des Algorithmus der relativen Quantifizierung (siehe Formel) wurden die erhaltenen ct-Werte auf das „house-keeping-gene“ standardisiert und im selben Schritt die Differenz zur C57BL/6 SOP PBS-Kontrollgruppe gebildet ($\Delta\Delta$ Ct-Methode). Die Ausgabe erfolgte als relative Quantität (relative quantity/ RQ) der Zielgene.

$$\text{Ratio} = \frac{2^{cT \text{ Zielgen Kontrolle} - cT \text{ Zielgen Sample}}}{2^{cT \text{ GAPDH Kontrolle} - cT \text{ GAPDH sample}}}$$

2.5 Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) ausgewertet und graphisch dargestellt. Durch eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) und den nachfolgendem Newman-Keuls post-hoc-Test wurden die Signifikanzen bezüglich der Gruppenunterschiede der einzelnen Parameter ermittelt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ galten die Differenzen als signifikant. Die erhobenen und errechneten Daten wurden graphisch in einem Balkendiagramm als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Zusätzlich werden im Text die Zähler- (DFn) und Nennerfreiheitsgrade (DFd) angegeben.

2.6 Geräte und Materialien

2.6.1 Tierhaltung

Tab. 4: Geräte und Materialien, Tierhaltung

Käfige Makrolon Typ II L	Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland
Standarddiätfutter Maus und Ratte	Altromin GmbH und Co. KG, Lage-Lippe, Deutschland
Tiereinstreu-Granulat	Altromin GmbH und Co. KG
Zuchttiere (C57/BL6, TLR9 ⁻)	Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland HET (Haus für experimentelle Therapie) Bonn, Deutschland, eigene Zucht

2.6.2 *In vivo*-Versuche

Tab. 5: Geräte, *in vivo*-Versuche

Endotrachealkanüle Durchmesser 1,0 mm	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Mikro-Tip Pressure Katheter aus Nylon mit 1,4-French-Drucksensor	Millar Instruments Inc., Houston, USA
Beatmungsgerät Minivent Typ 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
Power Lab Data Acquisition System	ADInstruments, Castle Hill, Australien
Operationsbesteck (Scheren, Pinzetten, Klemmen, Wund-Reraktoren, Nadelhalter)	Fine Science Tools, Inc., San Francisco, USA
Operationsmikroskop OpMi-191294	ZEISS, Oberkochen, Deutschland
OP-Tisch	Eigenanfertigung der Feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Instituts
Wärmebad (42 °C)	Rhema-Labortechnik, Hofheim, Deutschland
Eichgerät	Eigenbau
Waage	Fa Ohaus, Pinebrook, USA
Schieblehre	Fa. Mauser, St. Denis, Frankreich

Tab. 6: Materialien, *in vivo*-Versuche

Betaisodona Lösung®	Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland
Isofluran: Forene®	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden Deutschland
27G-Kanüle	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Temgesic® Injektionslösung 0,3 mg/ml Buprenorphinhydrochlorid	Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
D-GalN, D-Galaktosamin, 1 g/10 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS, Pufferlösung aus 135 mM NaCl, 1,3 mM KCl, 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ ·xH ₂ O, 0,5 mM KH ₂ PO ₄ und Aqua bidest., pH-Wert 7,4	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Seidenfäden 5-0	Serag Wiessner, Naila, Deutschland
Nahtmaterial 6-0, 8-0 Prolene®	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
CpG	1668 Thioat 5-TCCATGACGTTCTG ATGCT-3'; TibMolBiol, Berlin, Deutschland

2.6.3 *In vitro*-Versuche

Tab. 7: Geräte, *in vitro*-Versuche

Feinwaage	Fa. Ohaus, Pinebrook, USA
Schieblehre	Fa. Mauser, St. Denis, Frankreich
Dispergiergerät T 10 basic Ultra-Turrax	IKA GmbH & Co. KG, Deutschland
Thermocycler, Whatman Biometra T-Gradient 96	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge, 10G 4000/ min, Typ 5810R	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
BioPhotometer 6131	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
Vortex Genie	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
TaqMan 7400	Applied-Biosystems, Foster City, USA

Tab. 8: Materialien, *in vitro*-Versuche

DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, St Louis, USA
RNase freies Wasser	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Omniscript RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TaqMan® Universal PCR Mastermix	Applied-Biosystems, Foster City, USA
TaqMan® Gene Expression Assay	Applied-Biosystems, Foster City, USA
TaqMan®-Sonden im TaqMan® 7400	Applied-Biosystems, Foster City, USA
384 Well Platte	Applied-Biosystems, Foster City, USA
Guanidin Thiocyanat (GIT, #G6639)	Sigma-Aldrich, St Luis, USA
TRIzol (#15596-018)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.6.4 Software

Tab. 9: Verwendete Software

Chart for Windows 5.0	AD Instruments, Castle Hill, Australien
Prism v4.0	GraphPad Software, San Diego, USA
SDS Software 2.2	Applied Biosystems, Foster City, USA

3. Ergebnisse

3.1 Tierzahlen und Mortalität

Im Rahmen der *in vivo*-Versuche wurden insgesamt 97 Tiere untersucht. Letztlich flossen die Daten von 71 Tieren in diese Arbeit ein. Die Gesamtmortalität lag bei 27 % (siehe Tab. 10).

Tab. 10: Mortalität des gesamten Untersuchungskollektivs

Anzahl Tiere	97
Todesfälle	26
Mortalität	27 %

Die Mortalität unterschied sich innerhalb der verschiedenen Phasen des Versuchsaufbaus und weiterhin im jeweiligen Untersuchungskollektiv (siehe Tab. 11, Tab. 12).

Tab. 11: Peri-/Postoperative Todesfälle aufgeteilt nach scheinoperierten und mittels TAK operierten Mäusen

	SOP	TAK
Anzahl Tiere	51	46
Todesfälle	5	4
Überleben	90 %	91 %
Mortalität	10 %	9 %

Tab. 11 zeigt anschaulich, dass es zwischen den Tieren, die einer Scheinoperation und jenen, die der TAK unterzogen wurden, zunächst keinen Unterschied im Hinblick auf die Mortalität gab. Die Todesfälle traten vor allem in der Frühphase des Experiments – also während des Lernprozesses der Prozedur – auf und waren mit zunehmendem handwerklichem Geschick rückläufig. Die Ursache war meist eine akzidentelle Verletzung der A. mammaria bei der Eröffnung des Thorax mit einem konsekutiven starken Blutverlust, der entweder sofort oder in den Tagen postoperativ zum Tod der Tiere führte. Andere Ursachen lagen in einem iatrogenen Pneumothorax oder einer Atemdepression, sei es durch das inhalative Narkotikum (Isofluran®) oder durch die postoperative Temgesic®-Gabe.

Tab. 12: Todesfälle nach erfolgter Stimulation, aufgeteilt nach Untersuchungsgruppen

	SOP			TAK		
	SOP PBS	SOP D-Gal	SOP CpG 5 nmol	TAK PBS	TAK D-Gal	TAK CpG 5 nmol
Anzahl Tiere	15	13	18	16	13	13
Todesfälle	0	0	6	1	0	1
Überleben	100 %	100 %	67 %	94 %	100 %	92 %
Mortalität	0 %	0 %	33 %	6 %	0 %	8 %

Wie Sparwasser et al. (1997b) bereits beschrieben haben, lässt sich ab einer bestimmten CpG-Dosis ein septischer Schock induzieren, wenn die Maus zuvor durch ein D-Gal-Priming sensibilisiert wurden. Der Tod trat hierbei durch eine TNF-vermittelte Leberzell-Apoptose ein (Sparwasser et al., 1997a; Sparwasser et al., 1997b). Tatsächlich ließ sich bei diesen Mäusen dieser Schaden makroskopisch – im Rahmen der Organentnahme – durch eine hämorrhagisch veränderte Leber feststellen.

Die Tiere wiesen rasch nach der Stimulation Zeichen des septischen Schocks auf: Reduzierte Aktivität, Apathie, Tremor, verminderte Reaktion auf Stimulus sowie Piloarrektion (Shrum et al., 2014). Einige Tiere starben innerhalb der 6 Stunden Wartezeit bis zum Herzkatheter oder verstarben während der Narkoseeinleitung – am ehesten durch Auswirkungen der Isofluran®-Narkose auf die ohnehin beeinträchtigten Zirkulationsverhältnisse (vgl. Tab. 12).

Tab. 13: Todesfälle während Herzkatheter. Aufgeteilt nach Untersuchungsgruppen und unterschiedlicher CpG-Dosis

	SOP			TAK		
	SOP PBS	SOP D-Gal	SOP CpG 5 nmol	TAK PBS	TAK D-Gal	TAK CpG 5 nmol
Anzahl Tiere	15	13	12	15	13	12
Todesfälle	2	1	1	4	1	0
Überleben	87 %	92 %	92 %	73 %	92 %	100 %
Mortalität	13 %	8 %	8 %	27 %	8 %	0 %

Zu Todesfällen während der hämodynamischen Messung kam es selten (siehe Tab. 13). Die relativ hohe Mortalität in der TAK PBS-Gruppe lässt sich mit dem Erlernen der Untersuchungstechnik hinreichend erklären. Mit zunehmender Routine und Sicherheit nahm auch in dieser Gruppe die Sterblichkeit ab.

3.2 Biometrie

3.2.1 Körpergewicht

Um bei den biometrischen Daten möglichst genaue Vergleichswerte zu besitzen, wurde Wert daraufgelegt, Versuchstiere mit einem möglichst gleichen Körpergewicht zu operieren. So wurde gewährleistet, dass später ermittelte Parameter (siehe Kapitel 3.2.2), die anhand bestimmter biometrischer Größen (wie zum Beispiel die Länge der Tibia) normiert wurden, eine hohe Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen aufwiesen.

Abb. 10 zeigt, dass sich die Gewichte (body weight/ BW) der Versuchstiere zum Zeitpunkt der OP nicht signifikant unterschieden (SOP PBS: $18,08 \pm 0,51$ g; TAK PBS: $17,99 \pm 0,31$ g; SOP D-Gal: $18,19 \pm 0,63$ g; TAK D-Gal: $17,73 \pm 0,55$ g; SOP CpG: $17,79 \pm 0,50$ g; TAK CpG: $17,01 \pm 0,33$ g; DF_n: 5, DF_d: 82).

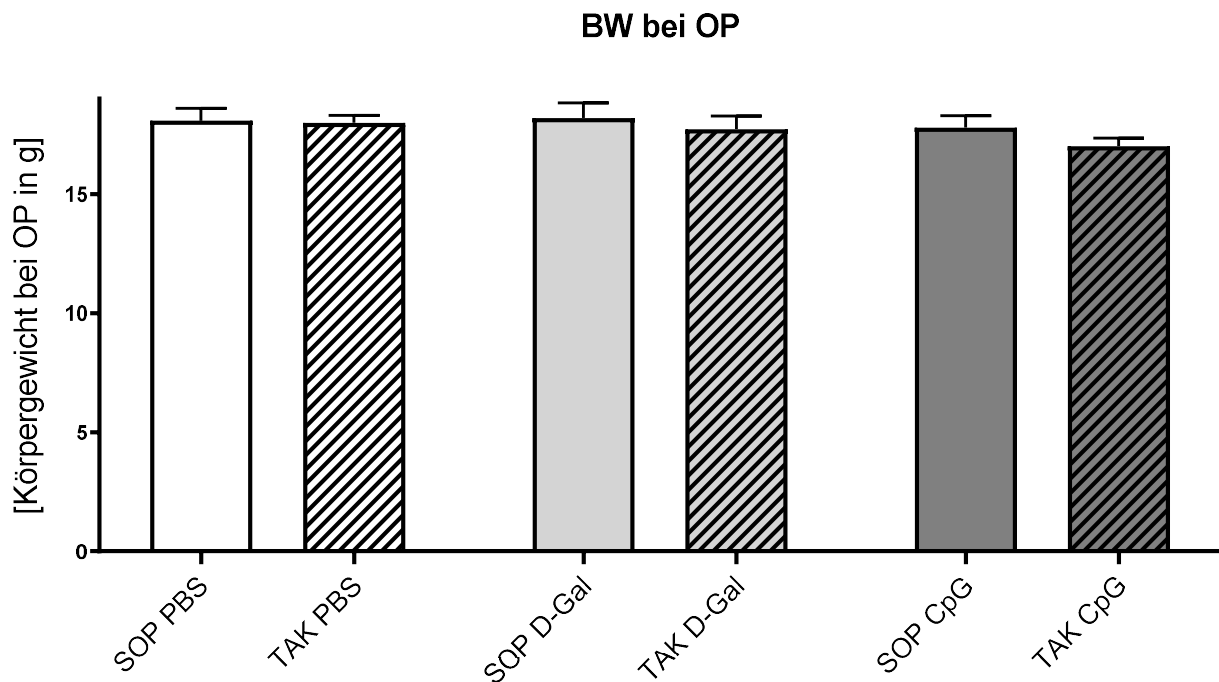


Abb. 10: Körpergewicht bei OP der einzelnen Versuchsgruppen, Angaben: MW ± SEM (n = 12-17)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

3.2.1.1 Veränderung des Körpergewichts

Der operative Eingriff, unabhängig ob Scheinoperation oder TAK, führte bei den Tieren zu einer Gewichtsabnahme im Zeitraum bis zur Katheterintervention.

Der Gewichtsverlust der Tiere, die der TAK unterzogen worden waren, lag nicht über dem Signifikanzniveau (SOP PBS: $-0,57 \pm 0,21 \text{ g} \triangleq 3 \%$; TAK PBS: $-1,82 \pm 0,29 \text{ g} \triangleq 10 \%$; SOP D-Gal: $-1,25 \pm 0,42 \text{ g} \triangleq 7 \%$; TAK D-Gal: $-1,85 \pm 0,44 \text{ g} \triangleq 10\%$; SOP CpG: $-0,99 \pm 0,31 \text{ g} \triangleq 6 \%$; TAK CpG: $-1,42 \pm 0,26 \text{ g} \triangleq 8 \%$; DF_n: 5; DF_d: 78), wie Abb. 11 verdeutlicht.

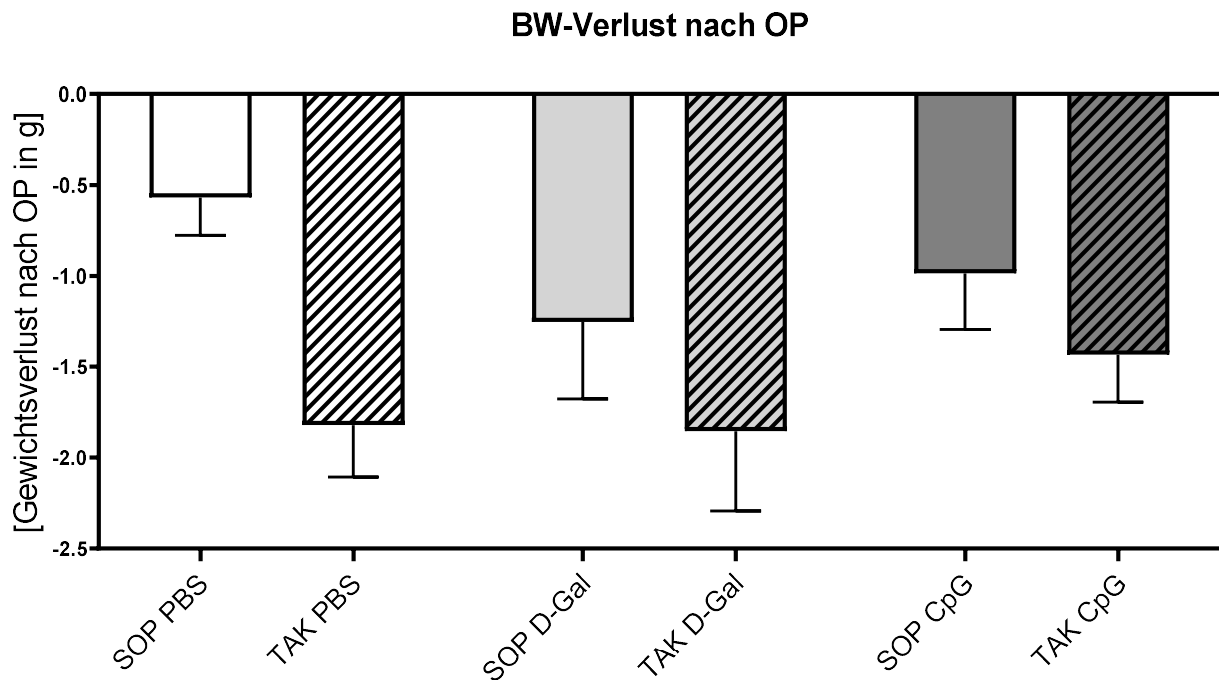


Abb. 11: Gewichtsverlust der Versuchstiere nach OP aufgeteilt nach Scheinoperation oder TAK, Angaben: MW \pm SEM (n = 12-17). Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

3.2.2 Veränderung der Herzgewichte nach TAK

Nach der Durchführung einer TAK zeigt sich eine Zunahme der Herzgewichte und hierbei vor allem der linksventrikulären Masse (Rockman et al., 1991). Der wesentliche Anteil dieser Muskelzunahme – als Reaktion auf die künstlich induzierte Widerstandserhöhung – findet in den ersten drei Tagen nach Eingriff statt (Rockman et al., 1991). Die Zunahme der Herzgewichte ist somit ein direkter Gradmesser für den Erfolg der TAK und die hierdurch verursachte linksventrikuläre Hypertrophie.

Das Herzgewicht der Tiere nach TAK war signifikant höher (im Mittel 18%) als das der scheinoperierten Tiere (SOP PBS: $87,48 \pm 2,55$ mg; TAK PBS: $98,14 \pm 3,90$ mg; SOP D-Gal: $85,75 \pm 3,12$ mg; TAK D-Gal: $102,9 \pm 5,02$ mg; SOP CpG: $82,26 \pm 3,17$ mg; TAK CpG: $100,2 \pm 3,76$ mg; DF_n: 5, DF_d: 78) siehe auch Abb. 12.

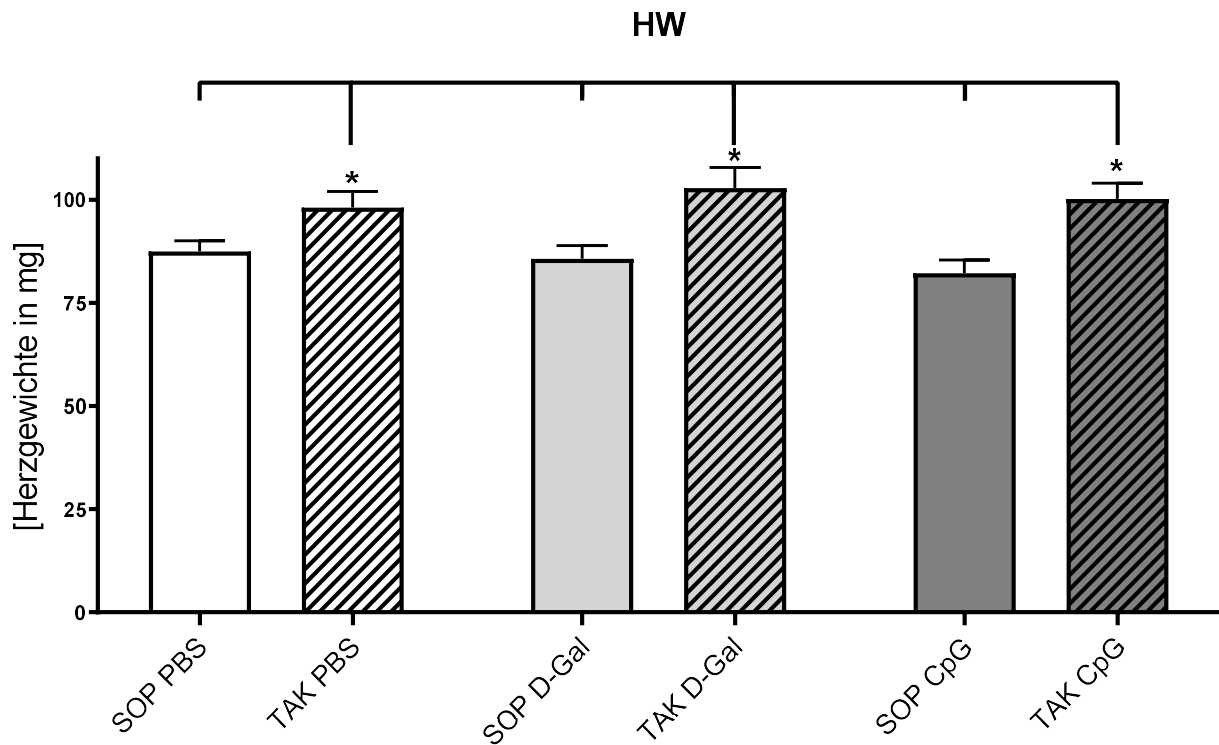


Abb. 12: Herzgewichte der einzelnen Versuchsgruppen, Angaben: MW ± SEM (n = 12-16)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

Folgerichtig zeigte auch das isolierte Gewicht des linken Ventrikels einen signifikanten Anstieg (im Mittel 22 % Zunahme der linksventrikulären Masse) in den TAK-Gruppen (SOP PBS: 71,26 ± 2,26; TAK PBS: 84,86 ± 3,75 mg; SOP D-Gal: 72,35 ± 2,57 mg; TAK D-Gal: 87,75 ± 4,32 mg; SOP CpG: 68,89 ± 2,56 mg; TAK CpG: 87,36 ± 3,63 mg; DF_n: 5, DF_d: 78). Vgl. auch Abb. 13.

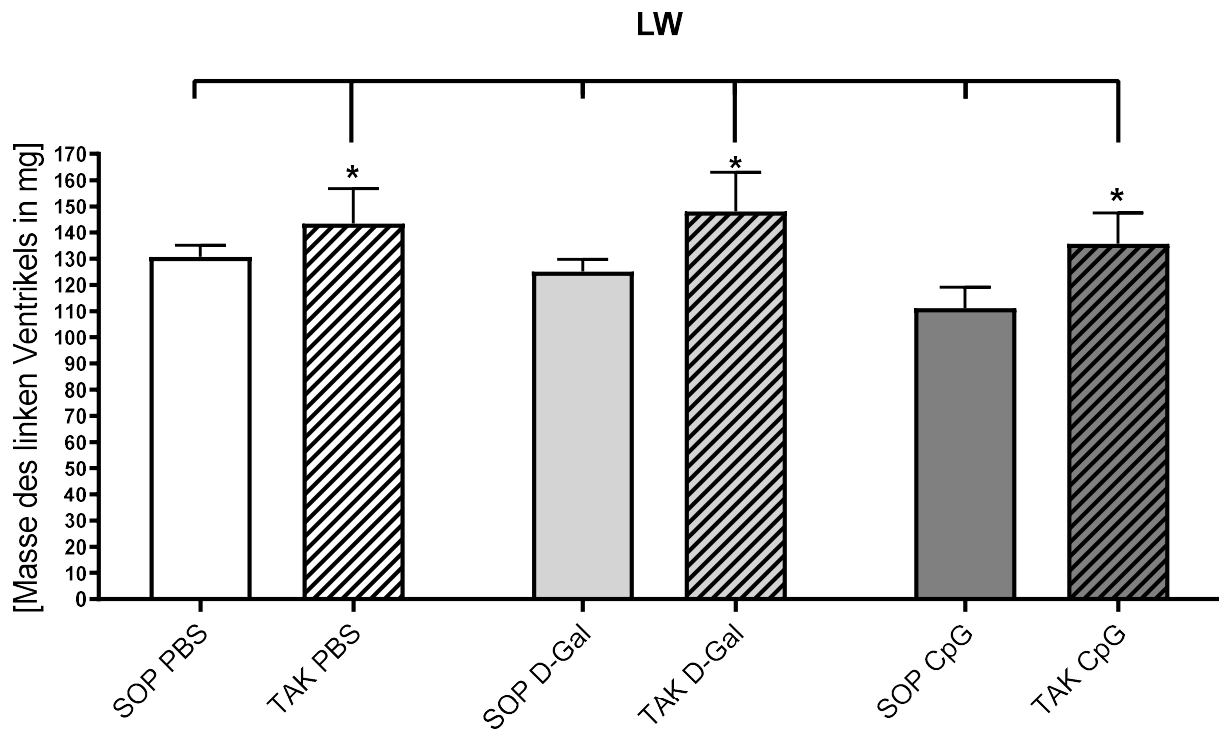


Abb. 13: Masse des linken Ventrikels der einzelnen Versuchsgruppen, Angaben: MW \pm SEM (n = 12-16)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

Um unterschiedliche Entwicklungsgrade der Maus vernachlässigen zu können, wurde die linksventrikuläre Masse zusätzlich auf das Körpergewicht (zum Zeitpunkt der OP) und die Tibia-Länge der Versuchstiere normiert (LVW/BW und LVW/TL).

Beide Herzparameter zeigten signifikant höhere Werte im Vergleich der TAK-Gruppen mit den Kontrollgruppen (vgl. Tab. 14, Abb. 14 und Abb. 15).

Im Mittel lag die linksventrikuläre Gewichtszunahme bei 34 % für LVW/BW sowie bei 24 % für LVW/TL. Zwischen den TAK-Gruppen selbst gab es keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 14: Herzparameter LVW/BW und LVW/TL der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 12-16); DFn: 5, DFd: 78
Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

	LVW/BW	LVW/TL
SOP PBS	4,09 \pm 0,05	4,05 \pm 0,12
TAK PBS	5,42 \pm 0,28	4,77 \pm 0,20
SOP D-Gal	4,20 \pm 0,16	4,13 \pm 0,15
TAK D-Gal	5,58 \pm 0,29	5,07 \pm 0,23
SOP CpG	4,11 \pm 0,07	3,87 \pm 0,13
TAK CpG	5,62 \pm 0,25	5,08 \pm 0,19

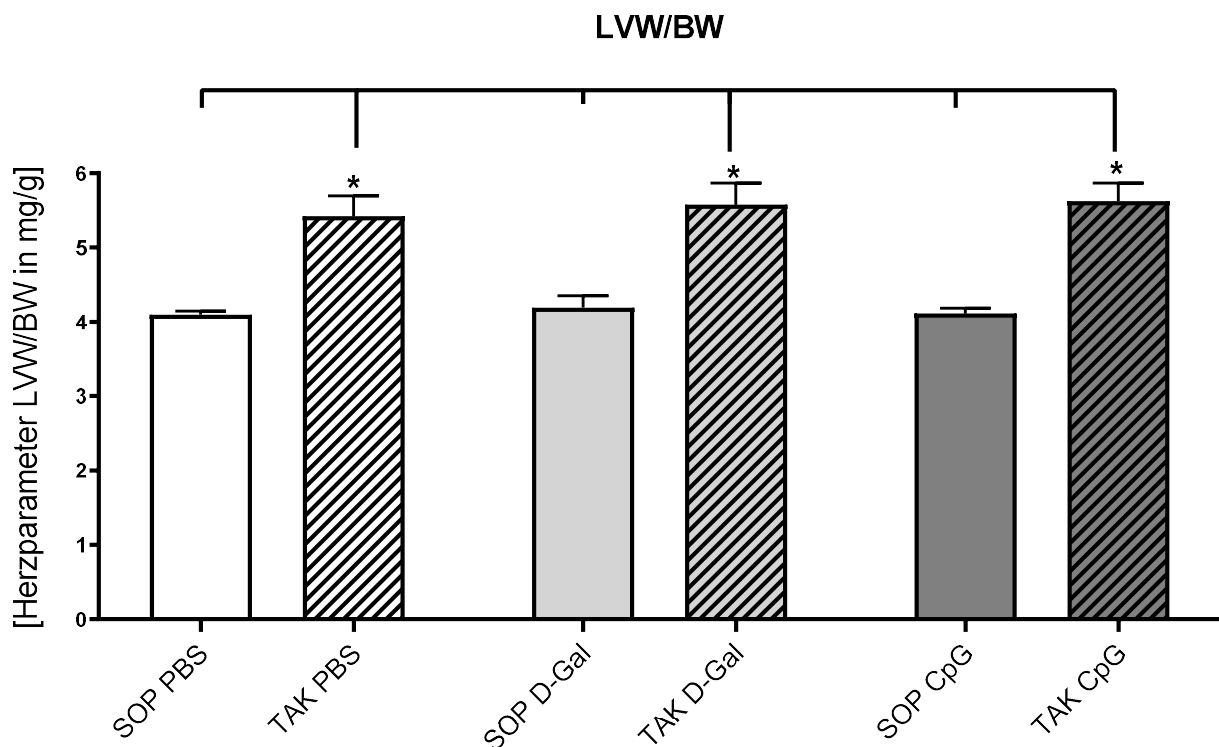


Abb. 14: Herzparameter LVW/BW der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 12-16)
Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

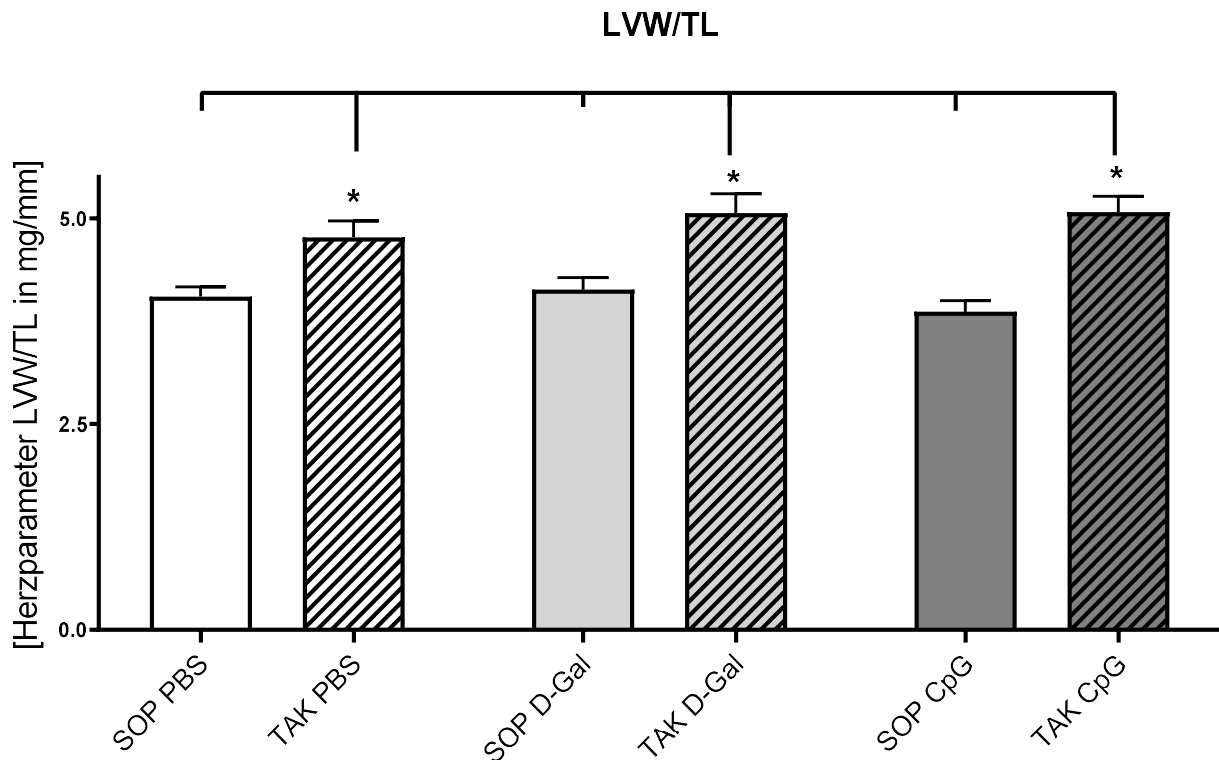


Abb. 15: Herzparameter LVW/TL der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW ± SEM (n = 12-16)
Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

3.3 Hämodynamik

3.3.1 Herzfrequenz

Sowohl durch die TAK-Operation als auch durch die CpG-Stimulation kam es nur in der TAK D-Gal-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz ($584,5 \pm 13,15$ 1/min $\cong 23$ % Anstieg gegenüber SOP D-Gal). Der Anstieg der SOP CpG-Gruppe gegenüber der SOP PBS-Gruppe entsprach dem, der sonst bei den TAK operierten Tieren zu verzeichnen war (siehe Tab. 15 und Abb. 16).

Tab. 15: Herzfrequenzen der einzelnen Versuchsgruppen sowie Vergleiche zwischen ausgewählten Gruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 10-14); DFn: 5, DFd: 60 Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

	HR	HR-Anstieg: Vergleich zwischen ausgewählten Gruppen
SOP PBS	454,2 \pm 18,32 1/min	SOP PBS/ TAK PBS \triangleq 13 %
TAK PBS	514,1 \pm 34,51 1/min	
SOP D-Gal	474,5 \pm 42,44 1/min	SOP D-Gal/ TAK D-Gal \triangleq 23 %
TAK D-Gal	584,5 \pm 13,15 1/min	
SOP CpG	531,5 \pm 17,05 1/min	SOP PBS/ SOP CpG \triangleq 17 %
TAK CpG	537,1 \pm 15,45 1/min	SOP CpG/ TAK CpG \triangleq 1 %

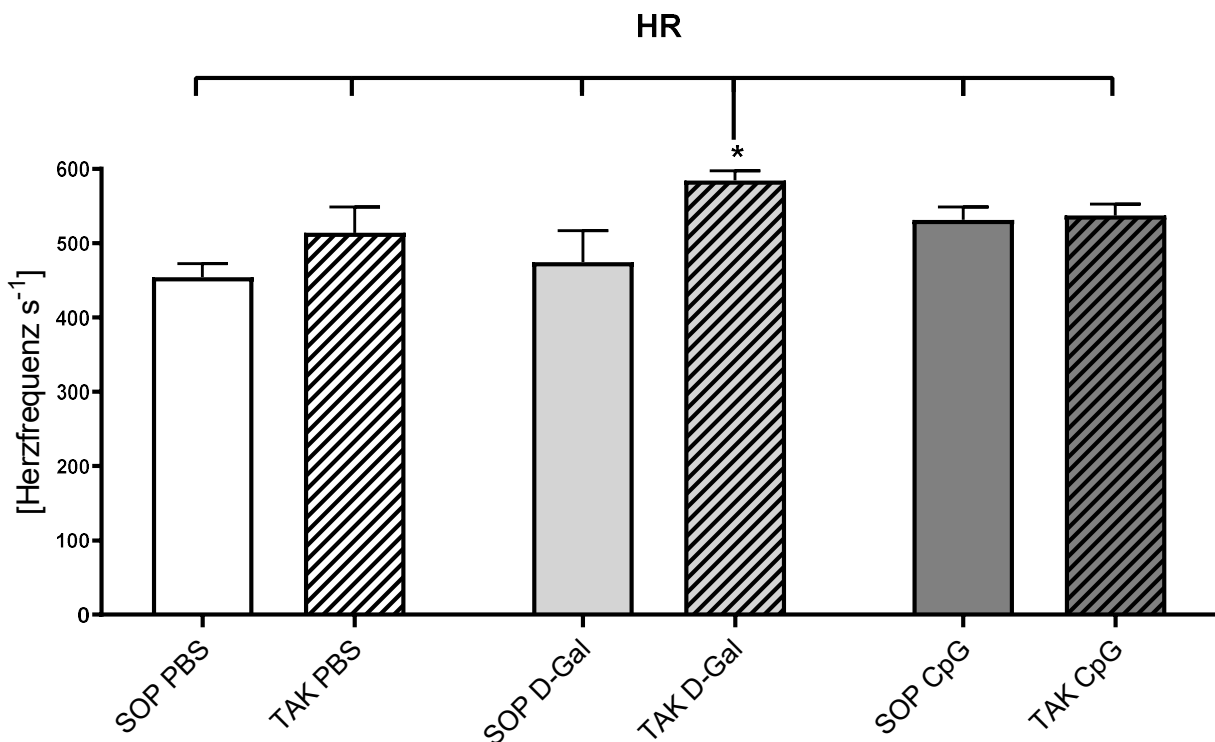


Abb. 16: Herzfrequenzen der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 10-14)

Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

3.3.2 Blutdruckergebnisse

Die Messungen mittels Millar-Katheter prästenotisch ergaben für alle Tiere, die der TAK unterzogen wurden, signifikant erhöhte systolische Blutdrücke (SAP) (im Mittel + 51,8 mmHg \pm 49%) im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren (Abb. 17). Die CpG-Stimulation hatte keinen sichtbaren Effekt auf den systolischen arteriellen Blutdruck (SOP PBS: 106,6 \pm 1,7 mmHg; TAK PBS: 154,6 \pm 5,5 mmHg; SOP D-Gal: 107,6 \pm 4,0 mmHg; TAK-D-Gal: 157,7 \pm 7,7 mmHg; SOP CpG: 100,6 \pm 5,2 mmHg; TAK CpG: 157,9 \pm 4,937 mmHg; DF_n: 5, DF_d: 62).

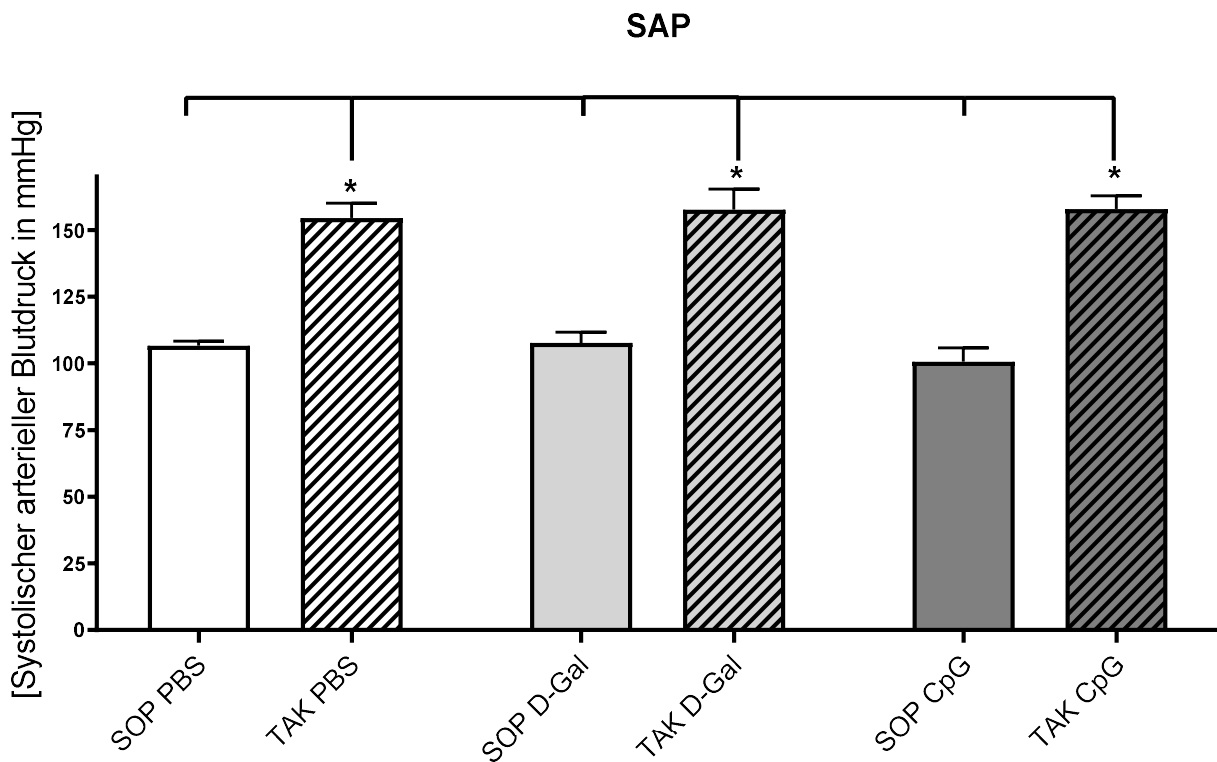


Abb. 17: Systolischer arterieller Blutdruck der Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 10-14)

Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

Der diastolische Blutdruck (DAP) war nach TAK-Behandlung und CpG-Stimulation nicht signifikant erniedrigt oder erhöht (Abb. 18) (SOP PBS: 78,85 \pm 1,5 mmHg; TAK PBS:

81,71 ± 3,6 mmHg; SOP D-Gal: 81,89 ± 3,6 mmHg; TAK D-Gal: 76,67 ± 2,9 mmHg; SOP CpG: 78,11 ± 4,7 mmHg; TAK CpG: 81,66 ± 3,0 mmHg; DF_n: 5, DF_d: 61).

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), der sich zu 2/3 aus dem systolischen und zu 1/3 aus dem diastolischen Blutdruck errechnet, war nach TAK signifikant erhöht (im Mittel + 19,3 mmHg \triangleq 21,3%). Für die CpG-Behandlung ließ sich kein Einfluss feststellen (Abb. 19) (SOP PBS: 90,28 ± 1,3 mmHg; TAK PBS: 111,6 ± 3,4 mmHg; SOP D-Gal: 94,65 ± 3,7 mmHg; TAK D-Gal: 108,5 ± 4,1 mmHg; SOP CpG: 86,56 ± 5,0 mmHg; TAK CpG: 109,0 ± 2,9 mmHg; DF_n: 5, DF_d: 60).

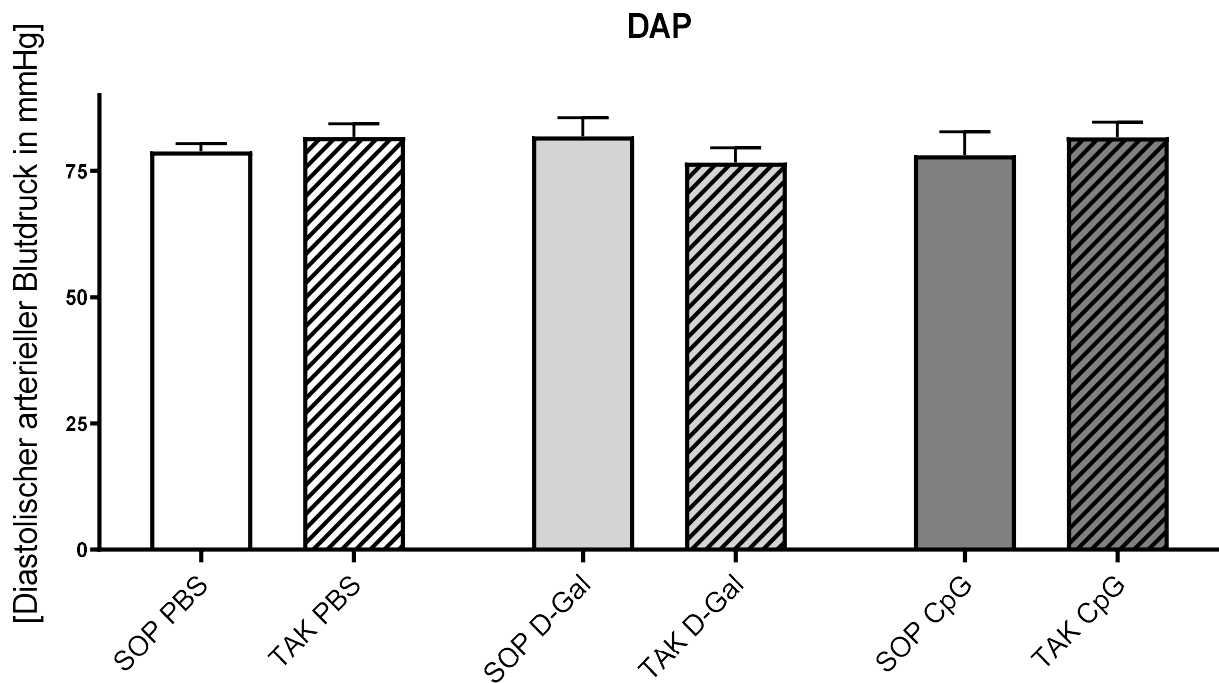


Abb. 18: Diastolischer arterieller Blutdruck der Versuchsgruppen; Angaben: MW ± SEM (n = 10-14)

Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

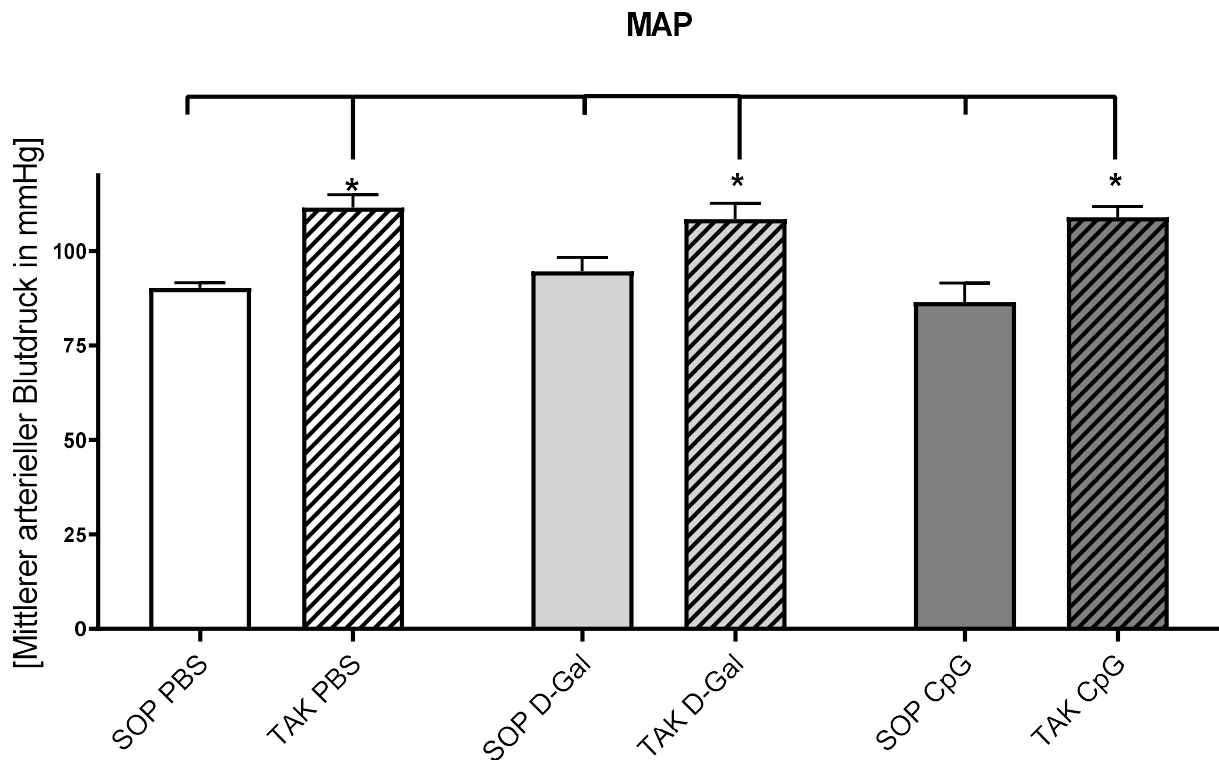


Abb. 19: Mittlerer arterieller Blutdruck der Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 10-14)

Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

TAK führte zu einem signifikant erhöhten linksventrikulären systolischen Blutdruck (LVSP) (im Mittel + 52,3 mmHg \pm 49,5%) und dies unabhängig von sonstigen Behandlungen der Tiere (Abb. 20) (SOP PBS: 103,1 \pm 1,8 mmHg; TAK PBS: 154,8 \pm 9,5 mmHg; SOP D-Gal: 112,8 \pm 6,4 mmHg; TAK D-Gal: 159,9 \pm 8,6 mmHg; SOP CpG: 100,7 \pm 4,1 mmHg; TAK CpG: 158,5 \pm 7,2 mmHg; DF_n: 5, DF_d: 43).

Die Messung des linksventrikulären diastolischen Blutdrucks (LVDP) ergab nur für die TAK PBS-Gruppe signifikant erhöhte Werte (+ 17,1 mmHg im Vergleich zur Kontrolle) aber auch zu allen anderen Gruppen. Sowohl die TAK D-Gal- als auch die TAK CpG-Gruppe lagen mit ihren Blutdruckwerten im Bereich der scheinoperierten Tiere (Abb. 21) (SOP PBS: 2,1 \pm 2,1 mmHg; TAK PBS: 19,2 \pm 3,7 mmHg; SOP D-Gal: 4,4 \pm 1,2 mmHg; TAK D-Gal: 10 \pm 3,5 mmHg; SOP CpG: 5,7 \pm 1,3 mmHg; TAK CpG: 8,1 \pm 0,8 mmHg; DF_n: 5, DF_d: 43).

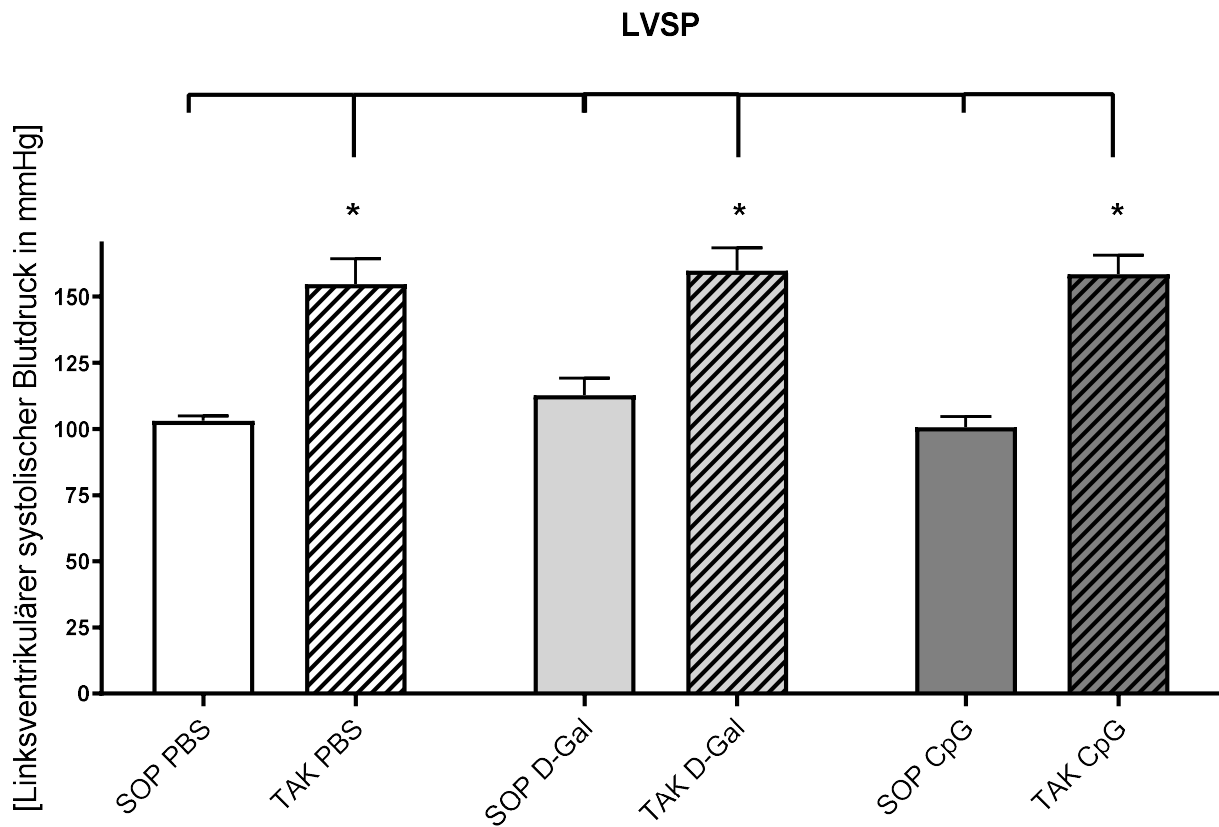


Abb. 20: Linksventrikulärer systolischer Blutdruck der Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 8-9)
Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

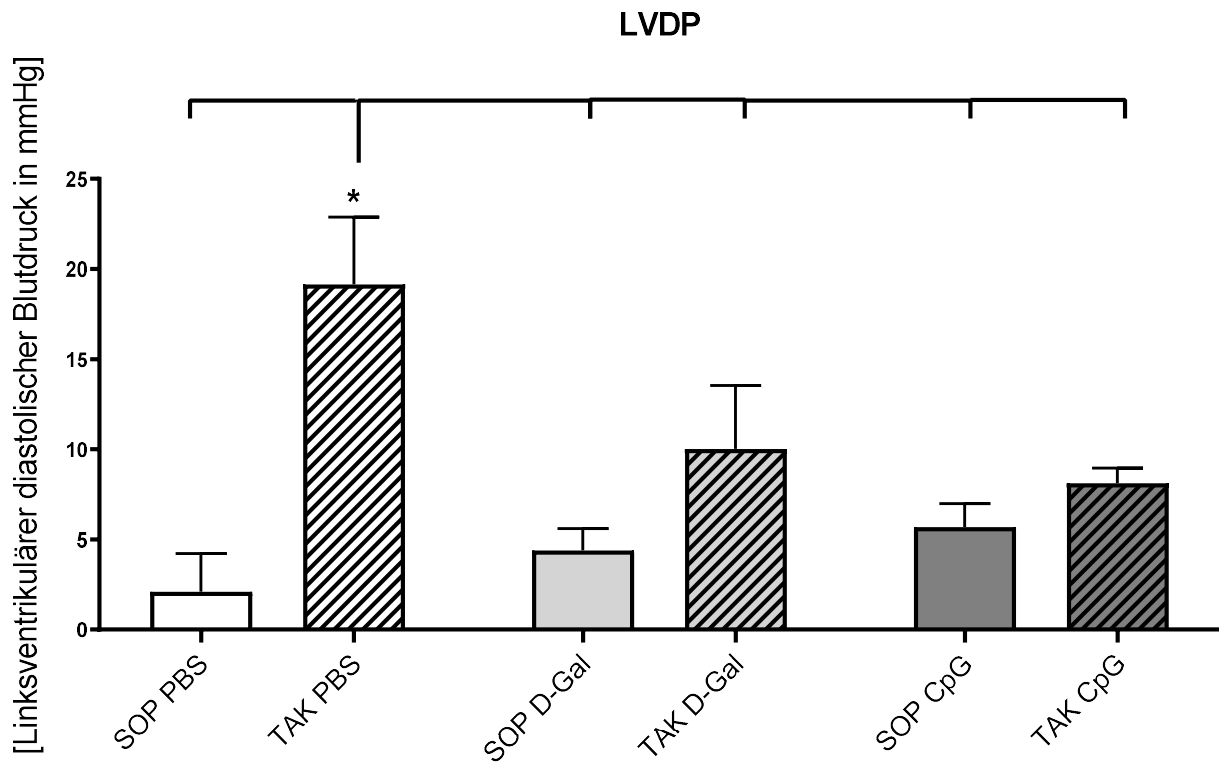


Abb. 21: Linksventrikulärer diastolischer Blutdruck der Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 8-9)
Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

Die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ($+dP/dt_{max}$) wie auch die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit ($-dP/dt_{min}$) zeigten im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede (Tab. 16 sowie Abb. 22 und Abb. 23).

Tab. 16: $+dP/dt_{\max}$ und $-dP/dt_{\min}$ der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 8-9); DF_n: 5, DF_d: 43
 Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

	$+dP/dt_{\max}$	$-dP/dt_{\min}$
SOP PBS	9775 \pm 750 mmHg/s	-11773 \pm 1266 mmHg/s
TAK PBS	8315 \pm 1381 mmHg/s	-7739 \pm 2166 mmHg/s
SOP D-Gal	12103 \pm 1863 mmHg/s	-11804 \pm 1794 mmHg/s
TAK D-Gal	9964 \pm 824 mmHg/s	-9276 \pm 1209 mmHg/s
SOP CpG	10499 \pm 826 mmHg/s	-10866 \pm 1192 mmHg/s
TAK CpG	10145 \pm 479 mmHg/s	-8752 \pm 874,0mmHg/s

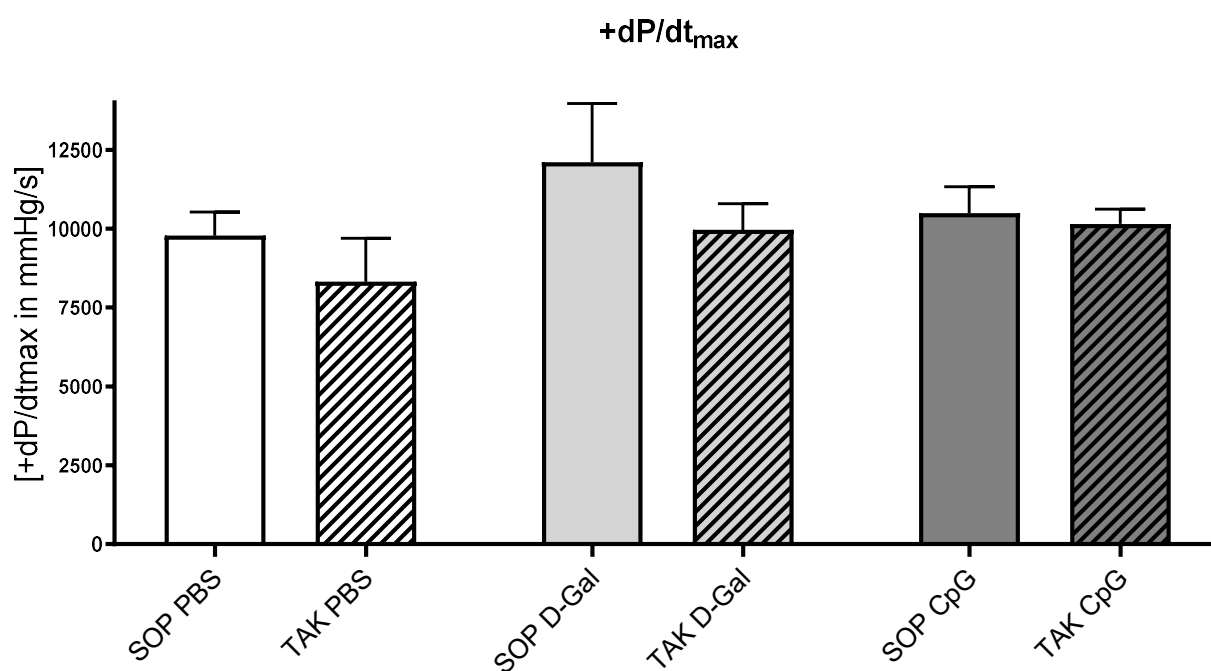


Abb. 22: $+dP/dt_{\max}$ der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 8-9)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

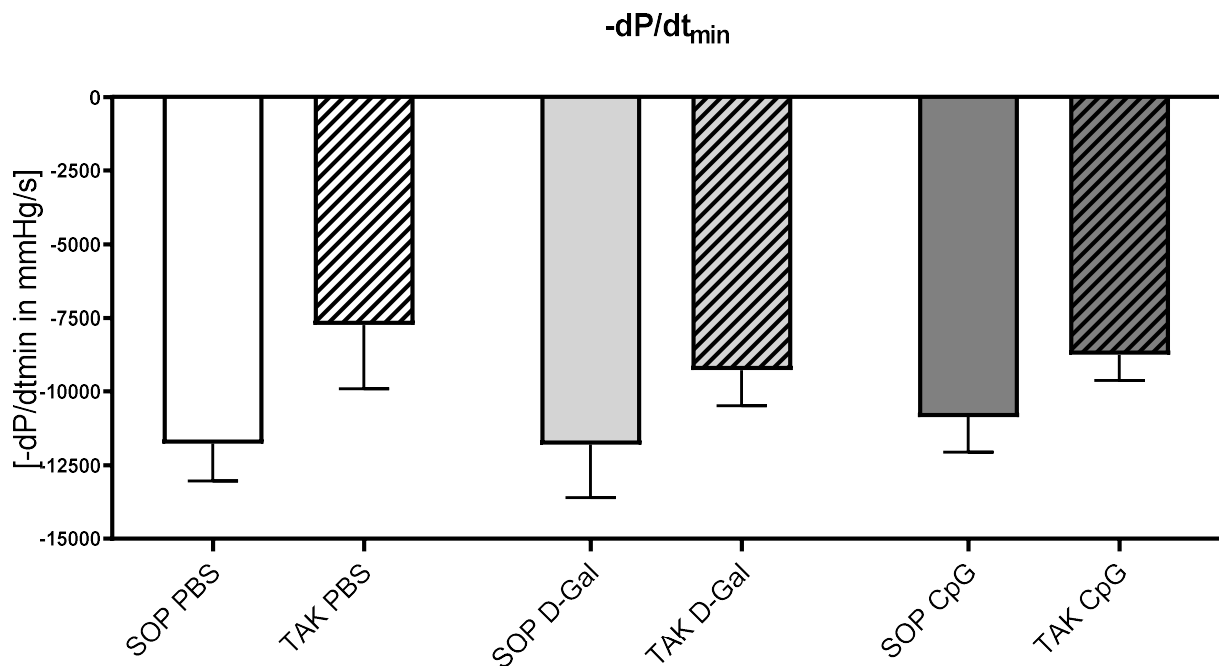


Abb. 23: $-dP/dt_{\min}$ der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 8-9). Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

3.4 Molekularbiologie

3.4.1 Hypertrophiemarker

Als klassische Marker der Herzhypertrophie und auch als Gradmesser für das Vorliegen oder die Entwicklung einer Herzinsuffizienz gelten der atriale natriuretische Faktor (ANF) sowie das brain natriuretic peptide (BNP). Die mRNA-Expression beider Enzyme wurde mittels quantitativer real-time PCR gemessen.

Generell wurde ANF in allen Tieren vermehrt exprimiert, die der TAK unterzogen wurden. Das Signifikanzniveau wurde dabei nur bei den mit D-Gal (+ 12,75 versus SOP D-Gal) und CpG (+ 8,67 versus SOP CpG) vorbehandelten Tieren erreicht. In Abb. 24 zeigt sich deutlich welchen Stimulus die TAK auf die Expression von ANF darstellt (SOP PBS: $1,81 \pm 0,94$; TAK PBS: $6,01 \pm 3,10$; SOP D-Gal: $2,04 \pm 0,29$; TAK D-Gal: $14,79 \pm 3,41$; SOP CpG: $3,60 \pm 1,77$; TAK CpG: $12,27 \pm 2,58$; DF_n: 5, DF_d: 28).

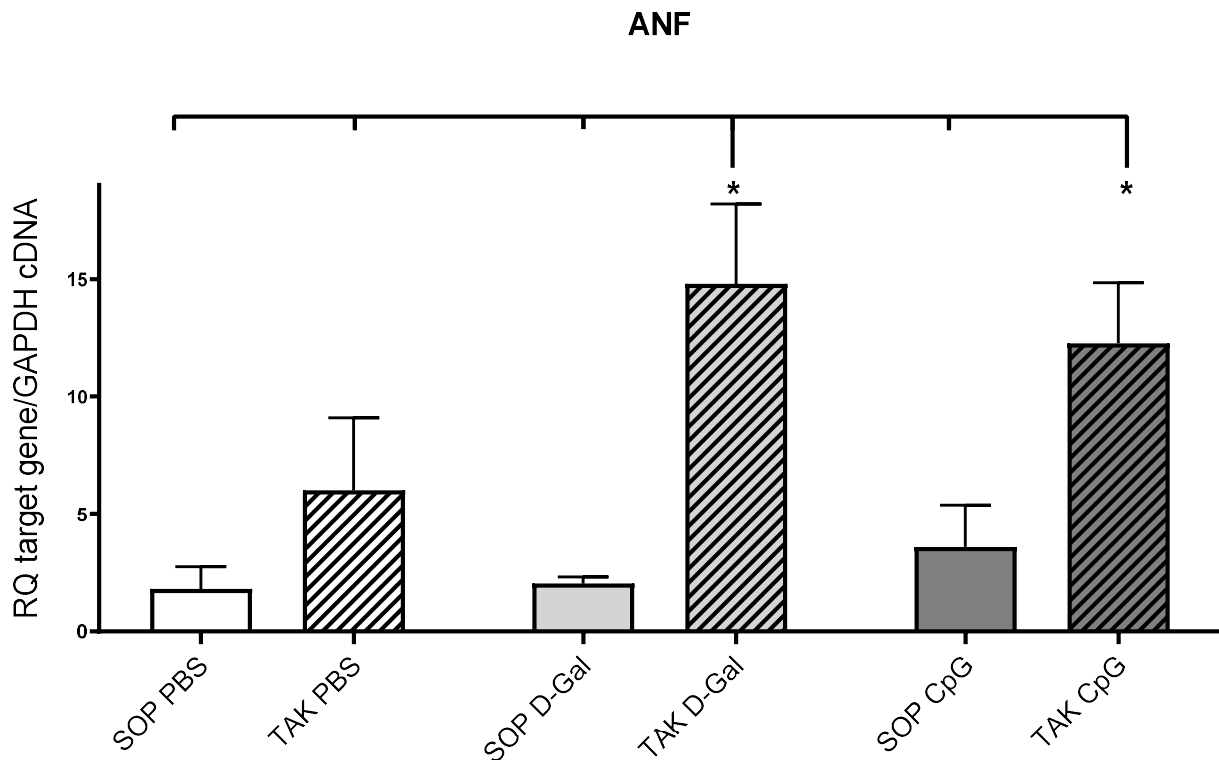


Abb. 24: ANF mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-6)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

Die Abb. 25 für BNP zeigt denselben Trend wie Abb. 24, letztlich konnte jedoch nur für die TAK D-Gal-Gruppe ein signifikanter Anstieg (+ 3,83 versus SOP D-Gal) der Expression von BNP gegenüber den anderen Gruppen nachgewiesen werden (SOP PBS: $1,55 \pm 0,43$; TAK PBS: $2,22 \pm 0,40$; SOP D-Gal: $0,48 \pm 0,08$; TAK D-Gal: $4,31 \pm 0,81$; SOP CpG: $0,21 \pm 0,06$; TAK CpG: $1,40 \pm 0,41$; DF_n: 5, DF_d: 28).

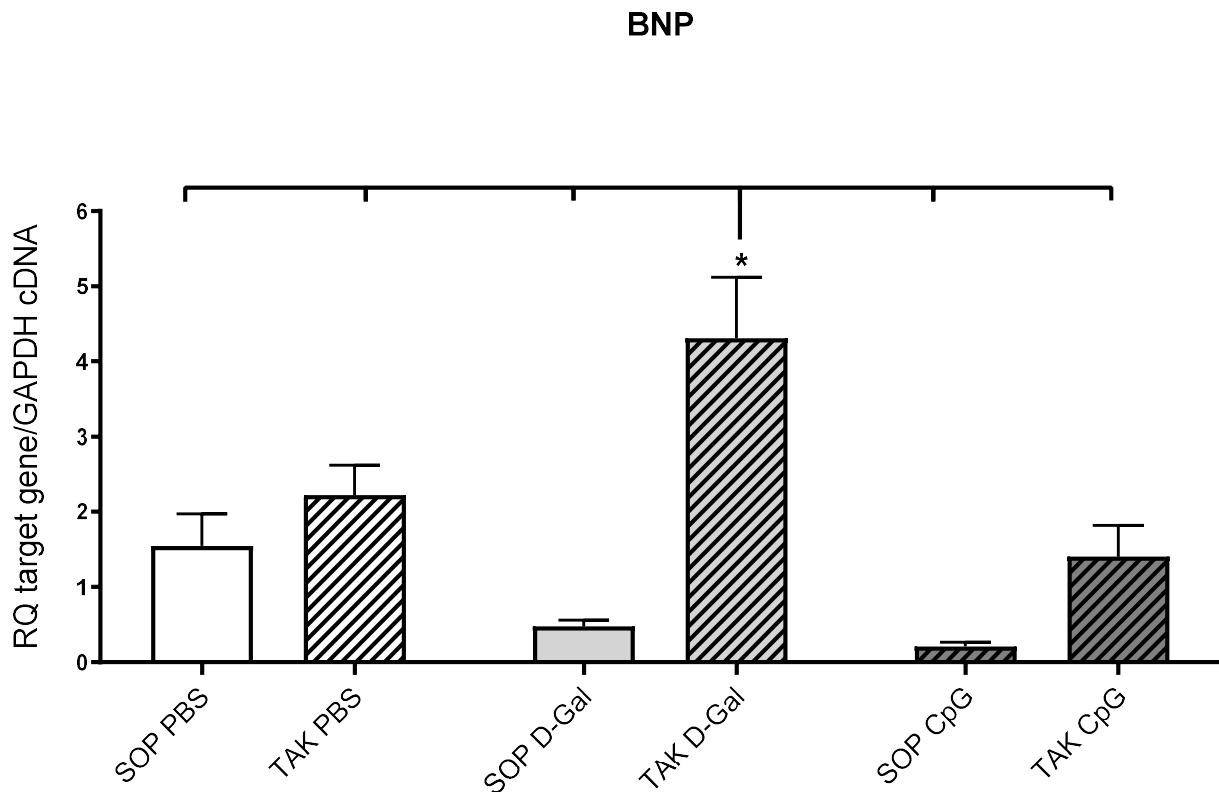


Abb. 25: BNP mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-6)
Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

3.4.2 PRRs

Von den bekannten pattern recognition receptors (PRRs) wurden in dieser Arbeit aus der Gruppe der Toll-like Rezeptoren die Rezeptoren TLR1, TLR2, TLR4 und TLR9 mittels quantitativer real-time PCR ausgewertet.

Die Expression des TLR1 konnte sowohl durch die TAK als auch durch eine CpG-Stimulation nicht signifikant gesteigert werden (siehe Abb. 26) (TAK PBS: 2595 ± 2595 ; SOP D-Gal: 542 ± 539 ; TAK D-Gal: 7544 ± 1561 ; SOP CpG: 10428 ± 4855 ; TAK CpG: 8507 ± 6115 ; DF_n: 5, DF_d: 29). Für SOP PBS wurde keine wesentliche Expression über der Baseline beobachtet.

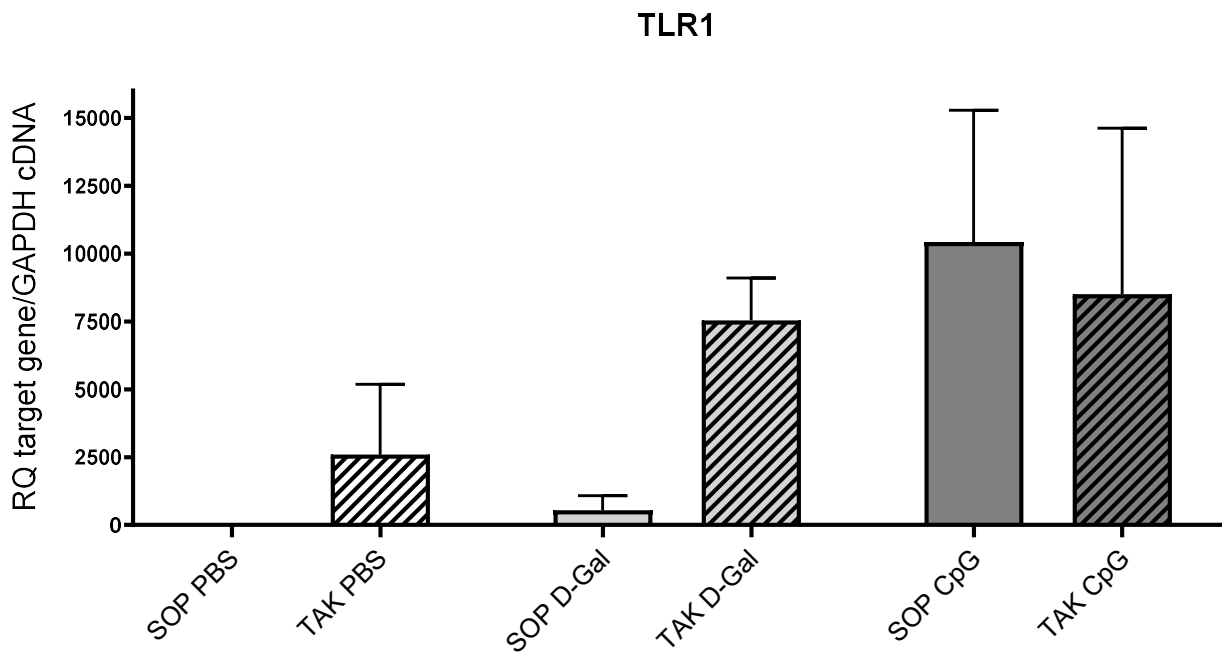


Abb. 26: TLR1 mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 5-7)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

TLR2 ließ sich gemäß Abb. 27 durch die TAK in seiner Expression nicht wesentlich steigern. Die CpG-Stimulation führte jedoch zu signifikant gesteigerten Expressionsraten (+ 4,8318 versus SOP PBS). In Kombination mit TAK fiel die Expression signifikant geringer aus, aber dennoch signifikant höher (+ 2,3711 versus TAK PBS) als in den übrigen Gruppen (SOP PBS: $0,6092 \pm 0,2636$; TAK PBS: $0,7249 \pm 0,3924$; SOP D-Gal: $0,8731 \pm 0,2815$; TAK D-Gal: $1,253 \pm 0,1721$; SOP CpG: $5,441 \pm 0,9696$; TAK CpG: $3,096 \pm 0,5460$; DF_n: 5, DF_d: 29).

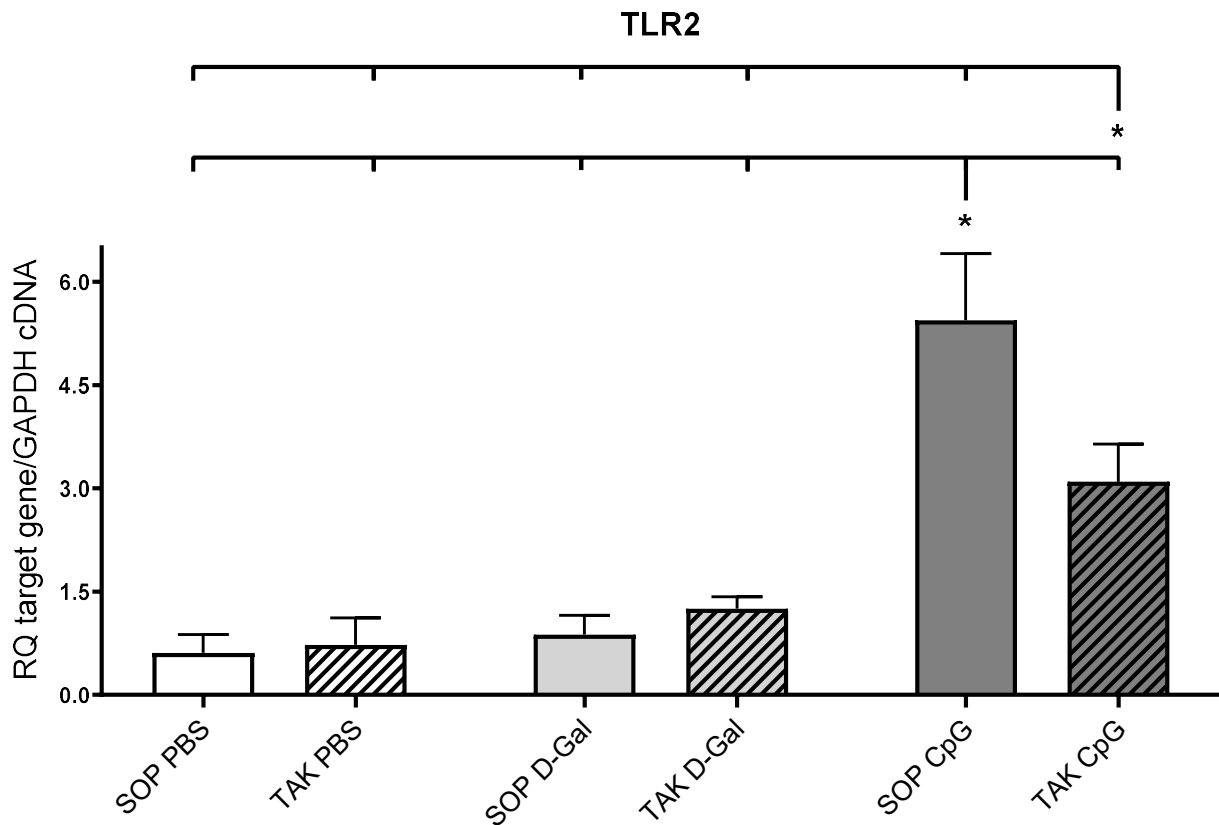


Abb. 27: TLR2 mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 5-7)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

Für TLR4 zeigte sich eine signifikant vermehrte Expression in der Kombination D-Gal plus TAK (+ 63061 versus SOP D-Gal) (siehe Abb. 28) (TAK PBS: 16985 ± 11519 ; SOP D-Gal: 31984 ± 19856 ; TAK D-Gal: 95045 ± 10268 ; SOP CpG: 29139 ± 18076 ; TAK CpG: 17190 ± 17190 ; DF_n: 5, DF_d: 29). Für SOP PBS wurde keine wesentliche Expression über der Baseline gemessen.

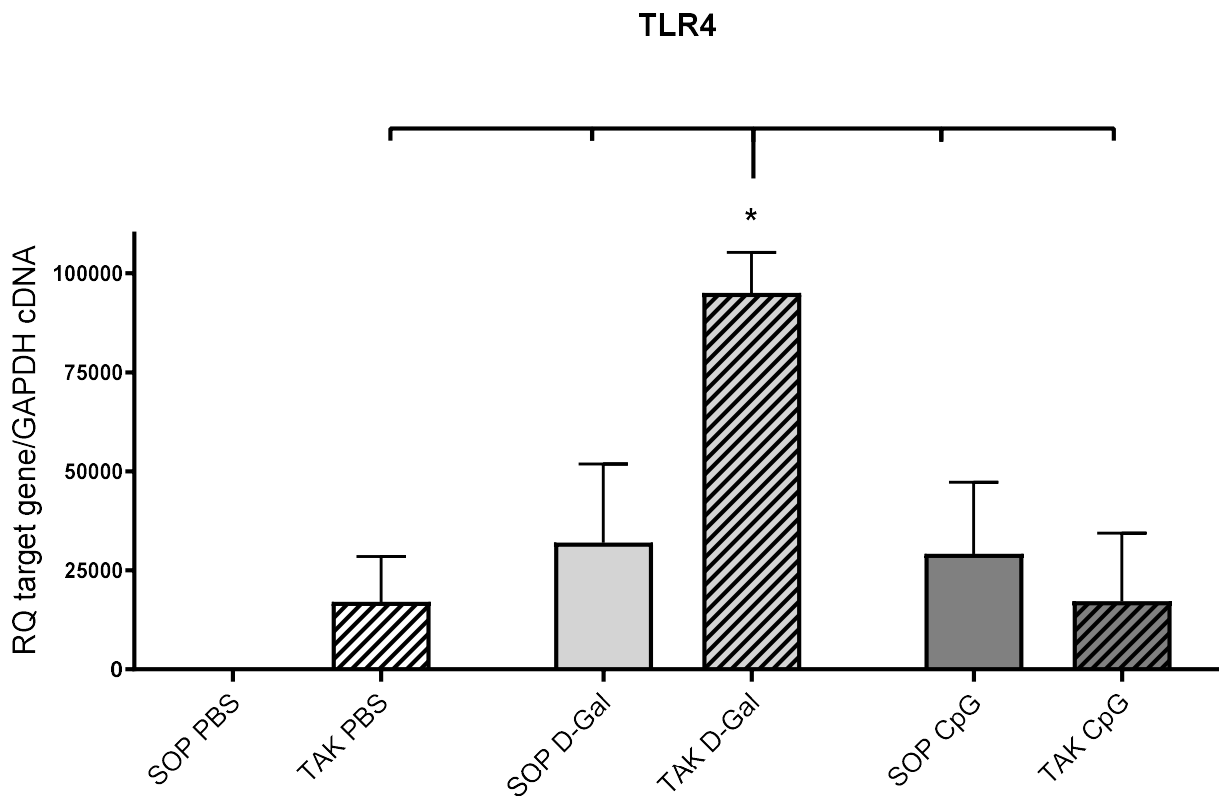


Abb. 28: TLR4 mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 5-7)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

TLR9, dessen direkter Ligand CpG darstellt, ließ sich sowohl durch die TAK als auch D-Gal, CpG sowie respektive die Kombination aus beidem nicht signifikant in seiner Expression steigern (siehe Abb. 29) (SOP PBS: $1,562 \pm 0,9039$; TAK PBS: $2,328 \pm 0,7473$; SOP D-Gal: $1,588 \pm 0,3946$; TAK D-Gal: $2,918 \pm 0,7558$; SOP CpG: $1,948 \pm 0,3425$; TAK CpG: $3,169 \pm 0,6702$; DF_n: 5, DF_d: 28).

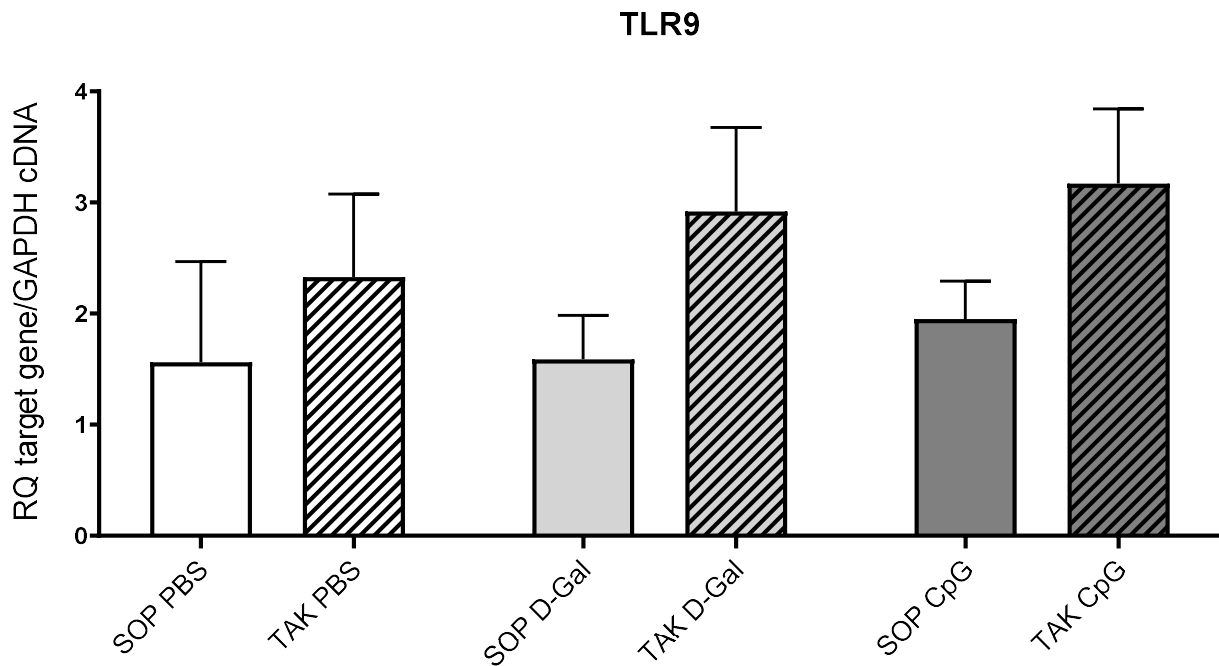


Abb. 29: TLR9 mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-6)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

3.4.3 Zytokine

Um den Einfluss der TAK und der CpG-Stimulation auf die Zytokinexpression zu untersuchen, wurde mittels Real-Time PCR die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF (Tumor-Nekrose-Faktor), IL-1 β (Interleukin-1 β) und IL-6 (Interleukin-6) erfasst.

Die TNF-Werte konnten auch in der Kombination von TAK und CpG-Stimulation das Signifikanzniveau nicht erreichen (Abb. 30) (SOP PBS: 3773 \pm 3702; TAK PBS: 38908 \pm 7702; SOP D-Gal: 17267 \pm 8004; TAK D-Gal: 32361 \pm 4993; SOP CpG: 120562 \pm 57738; TAK CpG: 145684 \pm 56047; DF_n: 5, DF_d: 28).

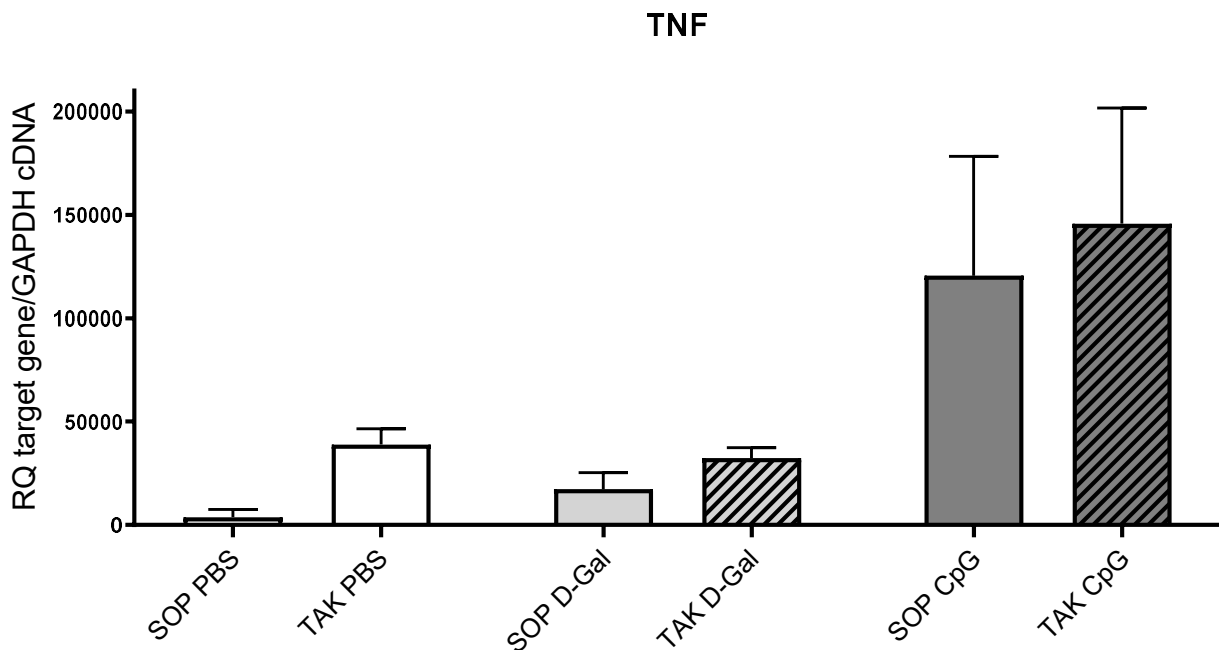


Abb. 30: TNF mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-6)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

Die IL-1 β -Expression verhielt sich ähnlich wie TNF mit Unterschieden in der Signifikanz. Es zeigte sich nach TAK oder CpG-Stimulation ein Anstieg. Das Signifikanzniveau wurde für die CpG-Stimulation (+ 2,7094 versus SOP PBS) oder diese in Kombination mit TAK (+ 2,0956 versus TAK PBS) erreicht, durch TAK allein, ergab sich kein signifikanter Anstieg (siehe Abb. 31). Es war kein synergistischer Effekt von TAK und CpG zu beobachten (SOP PBS: 0,1506 \pm 0,1417; TAK PBS: 0,6904 \pm 0,2089; SOP D-Gal: 0,3747 \pm 0,1627; TAK D-Gal: 2,216 \pm 0,6894; SOP CpG: 2,860 \pm 0,5205; TAK CpG: 2,786 \pm 0,9601; DF_n: 5, DF_d: 29).

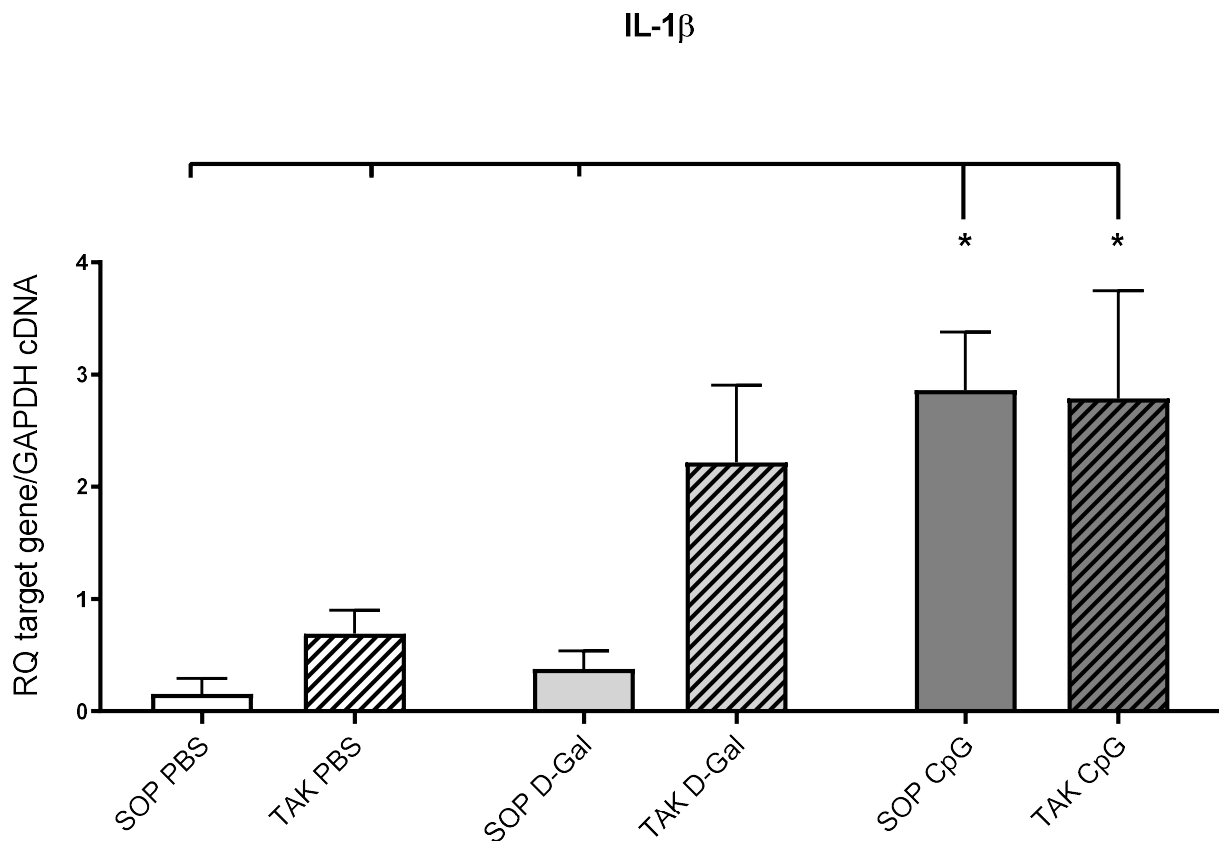


Abb. 31: IL-1 β mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-7)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

Für IL-6 fällt das Ergebnis deutlich uneinheitlicher aus. Zwar ließen sich auch hier Effekte von TAK und CpG auf die Expression nachweisen, allerdings wurden die höchsten Werte für die Kombination TAK plus D-Gal ermittelt, welche auch alleinig das Signifikanzniveau erreichte (+ 64279 versus TAK PBS) (siehe Abb. 32) (SOP PBS: 16969 \pm 12536; TAK PBS: 11445 \pm 5249; SOP D-Gal: 2860 \pm 985; TAK D-Gal: 76174 \pm 29089; SOP CpG: 42115 \pm 9420; TAK CpG: 35557 \pm 19602; DF_n: 5, DF_d: 29).

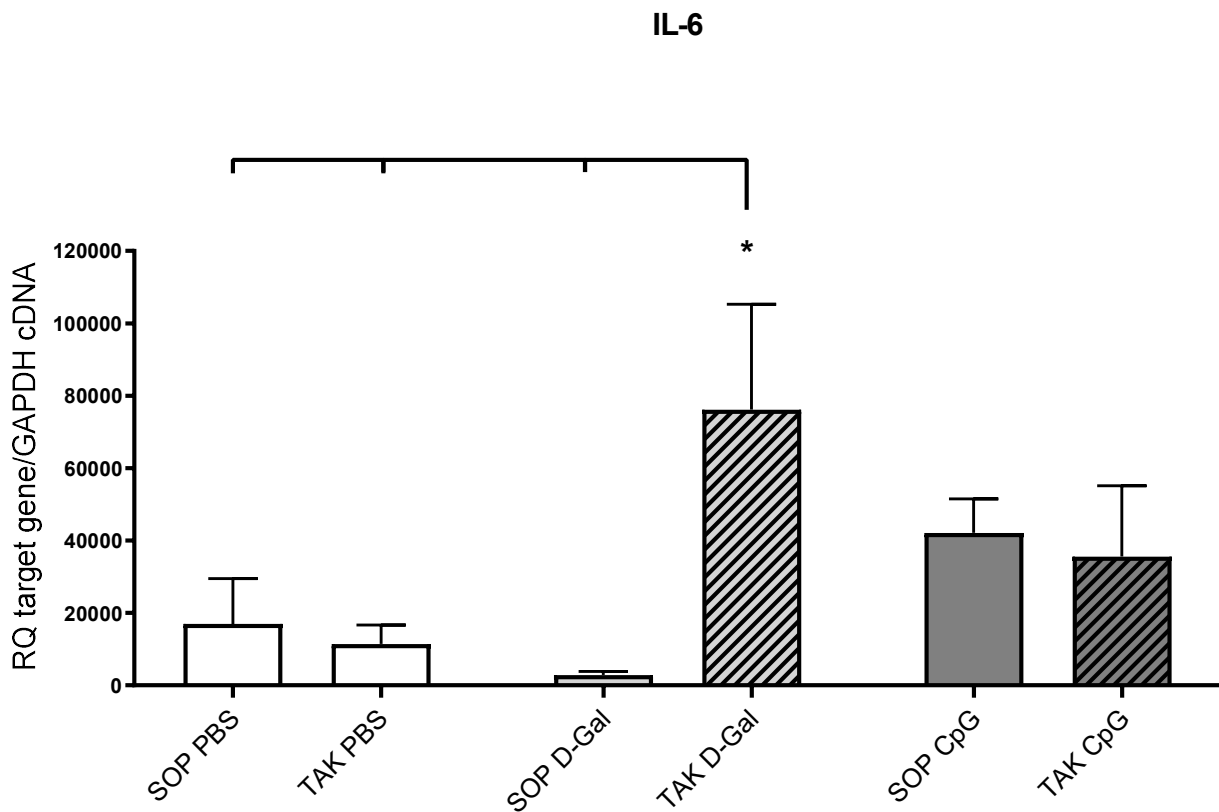


Abb. 32: IL-6 mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-7)
 Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.

Aufgrund der uneinheitlichen Datenlage bei den molekularbiologischen Untersuchungen im Folgenden einige Erläuterungen. Insgesamt war die Qualität der PCR-Daten nicht sehr hoch anzusetzen (siehe Abb. 26 und Abb. 28), die hohen Mittelwerte sind teils nur auf 1-2 Messwerte zurückzuführen und dies bei relativ kleiner Gruppengröße (siehe Freiheitsgrade). In Bezug auf die TNF-PCR (siehe Abb. 30) lagen hohe Expressionsunterschiede innerhalb der Gruppe vor. Diesbezüglich sei auch nochmal auf die ct-Wert-Ermittlung in Kap. 2.4.2.4 verwiesen. Insgesamt lässt sich die fehlende Signifikanz mit hoher Varianz innerhalb der Gruppen bei geringer Gruppengröße begründen.

4. Diskussion

4.1 Methode und theoretische Grundlage

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob ein durch pathologische Hypertrophie vorgeschädigtes Herz sensitiver auf einen zweiten Stimulus – in diesem Fall eine durch CpG-ODN induzierte Sepsis – reagiert. Die Hypertrophie wurde über eine transversale aortale Konstriktion (TAK) künstlich herbeigeführt (Kapitel 2.3.2.) Die TAK wurde über kardiale Gewichtsveränderungen der Versuchstiere und über die Bestimmung gängiger Herzhypertrophiemarker überprüft. Des Weiteren wurden sowohl hämodynamische Parameter erhoben als auch – mittels molekularbiologischer Methoden – die Expression bekannter PRRs und proinflammatorischer Zytokine gemessen, um die zweite und dritte Hypothese zu überprüfen.

4.2 Mausmodell

Das Mausmodell zur Untersuchung kardialer Prozesse und Krankheitserscheinungen ist seit vielen Jahren in der Grundlagenforschung etabliert. Vorteile sind hierbei die kurze Tragezeit der Tiere beziehungsweise ihre gute Verfügbarkeit über einschlägige Zuchtbetriebe. Darüber hinaus hat die Möglichkeit, einzelne Gene in der Maus gezielt auszuschalten und damit die Synthese der translatierten Proteine zu verhindern, zu einer weiten Verbreitung der Mausmodelle beigetragen. Insbesondere Veränderungen auf der kardialen Ventrikel Ebene lassen sich gut im Mausmodell abbilden, da die Ventrikelstruktur von Mensch und Maus vergleichbar ist (Doevendans et al., 1998). In Bezug auf die Körperoberfläche unterscheiden sich das Herzzeitvolumen und der kardiale Index nicht – und dass, obwohl die Herzfrequenz bei Mäusen mit 550-600 Schlägen pro Minute deutlich über der menschlichen Herzfrequenz liegt (Barbee et al., 1992; Krivitski et al., 1999).

4.3 Mortalität

Die Gesamt-Mortalität in dieser Arbeit über alle Versuchsgruppen, Operationen respektive invasive Untersuchungen hinweg betrug 27 %. Bei genauerer Betrachtung zeigen sich jedoch Unterschiede in Bezug auf die unterschiedlichen Phasen der Versuchsanordnung. Die peri-/postoperative Mortalität nach TAK beziehungsweise SOP betrug 9-10 %

(vergleiche Tab. 11). In der Literatur variiert die Mortalität von 10-39 % bis zu 2 Wochen nach erfolgter TAK, wobei hier eine erhöhte Mortalität aufgrund von Herzversagen angenommen werden muss (Liao et al., 2002; Nakamura et al., 2001; Rockman et al., 1991). Insgesamt kann man davon ausgehen, dass unsere peri-/postoperative Mortalität im Bereich der Norm für die TAK liegt und somit von einer fachgerechten Durchführung der OP-Methode auszugehen ist.

Im Verlauf gab es Unterschiede in der Mortalität nach erfolgter Stimulation zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen. So zeigte sich teilweise eine erhöhte Mortalität nach Stimulation mit den CpG-ODNs (bis zu 33 %; vgl. hierzu auch Tab. 12). Dies ist am ehesten der induzierten Sepsis mit entsprechender kardiovaskulärer Depression und der anschließenden Narkose geschuldet. Sparwasser et al. (1997b) beschreiben in ihrer Arbeit Dosen von 2,5-5 nmol. Unsere letztlich gewählte Dosis von 5 nmol, welche der üblichen Dosis von Sparwasser et al. entspricht, ließ signifikante Ergebnisse in der Hämodynamik und auch den molekularbiologischen Analysen erwarten. Mit einer Dosis von 5 nmol lag die Gesamtmortalität nach Stimulation und vor Katheter bei maximal 9 % (vgl. Tab. 12). Insgesamt ist somit von einer guten Verträglichkeit der Prozedur im betrachteten Zeitraum auszugehen.

Während der hämodynamischen Messungen lag die Mortalität gruppenübergreifend bei 11 % (siehe Tab. 13). Die akzidentelle Durchtrennung der zarten A. carotis communis war hierbei eine der Hauptursachen. Die relativ hohe Mortalität in der TAK PBS-Gruppe lässt sich mit dem Erlernen der Untersuchungstechnik hinreichend erklären. Mit zunehmender Routine und Sicherheit nahm auch in dieser Gruppe die Sterblichkeit ab.

4.4 Veränderungen der biometrischen Parameter nach TAK

Durch die TAK erreicht man eine sofortige Drucksteigerung in den prästenotischen Abschnitten (vgl. Abb. 6) ergo dem linken Ventrikel und konsekutiv linkem Vorhof sowie Aorta thoracalis ascendens und Truncus brachiocephalicus. Poststenotisch kommt es infolge der künstlich angelegten Widerstandserhöhung und des dadurch entstehenden Druckgradienten zu einem Abfall des arteriellen Blutdrucks. Dieser liegt je nach Literatur bei 37 bis 50 mmHg (Fard et al., 2000; Rockman et al., 1991). Der schlagartig erhöhte periphere Widerstand oder auch die Nachlasterhöhung führt zunächst zu einem reduzierten linksventrikulären Schlagvolumen (SV). Es verbleibt bei jedem Herzschlag

mehr Volumen im linken Ventrikel, so dass letztlich das linksventrikuläre enddiastolische Volumen (LVEDV) und der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) ansteigen. Die daraus nach dem Gesetz von Laplace bedingte erhöhte linksventrikuläre Wandspannung, welche wir als Vorlasterrhöhung bezeichnen, führt zu einer Vordehnung der Kardiomyozyten, die auf diesen Reiz mit einer erhöhten Kontraktilität und einem resultierend erhöhten Schlagvolumen antworten. Diesen Mechanismus bezeichnen wir als Frank-Starling-Mechanismus, welcher das Herz befähigt, ein gleichbleibendes Schlagvolumen bei erhöhtem peripherem Widerstand beizubehalten. Neben dem Frank-Starling-Mechanismus ist ein weiterer positiv inotroper Effekt beschrieben, der zusätzlich zum Tragen kommt. Er zeigt sich in einem erneuten Peak der Kontraktilität nach einigen Minuten und wird als Anrep-Effekt nach dem Erstbeschreiber oder als homeometrische Autoregulation bezeichnet (Anrep, 1912; Nichols et al., 1988; Sarnoff et al., 1960; Walston et al., 1978). Ursächlich ist eine intrinsische Autoregulation, welche über eine Aktivierung des Na^+/H^+ Austauschers zunächst die zytosolische Natriumkonzentration anhebt und über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher letztlich die zytosolische Calciumkonzentration erhöht und hierüber die Kontraktilität verbessert (Allen und Kurihara, 1982; Cingolani et al., 2013).

Die Einengung der Aorta um etwa 30 % ihres ursprünglichen Lumens führt in der Literatur nach 7 bis maximal 20 Tagen zu einer deutlichen linksventrikulären Hypertrophie mit einer Zunahme des Herzgewichtes respektive linksventrikulären Gewichtes um 30-60 % (Bittig, 2005; Nakamura et al., 2001; Rockman et al., 1991). Unsere Daten zeigen eine signifikante Zunahme der isolierten linksventrikulären Masse nach TAK im Mittel um 22 % (siehe Kapitel 3.2.2) sowie auch eine signifikante Zunahme der Herzgewichte insgesamt. Normieren wir das linksventrikuläre Gewicht auf das Körpergewicht beziehungsweise die Tibia-Länge, zeigt sich eine signifikante Zunahme der linksventrikulären Masse nach TAK im Mittel um 34 % respektive 24 %. Allerdings wurde in den zitierten Arbeiten die Hypertrophie nach 7 bis maximal 20 Tagen ausgewertet, während in der vorliegenden Studie die Hypertrophieentwicklung nach 3 Tagen betrachtet wurde. In der Studie von Baumgarten et al. (2006a) wurde auch die Hypertrophie nach 3 Tagen ausgewertet, sie ermittelten für den Parameter LVW/TL 25 % Zuwachs. Dies entspricht sehr gut dem hier ermittelten Wert von 24 %. Insgesamt zeigen die ermittelten Daten, dass die Versuche *lege artis* durchgeführt wurden und eine gute Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen

Gruppen sowie auch zu den Daten anderer Arbeitsgruppen besteht. Damit konnte die erste Hypothese bestätigt werden.

Der Gewichtsverlust nach OP erreichte in keiner Versuchsgruppe das Signifikanzniveau (vgl. Kapitel 3.2.1). Damit zeigt die Gewichtsentwicklung eine gute Verträglichkeit der Operationsmethode und auch keine deutliche Benachteiligung der Versuchstiere nach erfolgter TAK im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren.

4.5 Hämodynamik

Sowohl Liao et al. (2002) also auch Nakamura et al. (2001) sahen in ihren Arbeiten keine Zunahme der Herzfrequenz nach isolierter TAK. Auch Baumgarten et al. (2006a) konnten für ihre Vergleichsgruppe SOP PBS versus TAK PBS keinen Anstieg der Herzfrequenz verzeichnen. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen der SOP PBS- und TAK PBS-Gruppe (vgl. Abb. 16). Im Vergleich der Gruppen SOP D-Gal und TAK D-Gal konnten wir einen signifikanten Herzfrequenzanstieg verzeichnen. D-Gal ist ein Aminosucker, der nach Verabreichung (zum Beispiel i.p.) zu einer Akkumulation von UDP-Galactosamin-Derivaten in der Leber führt und konsekutiv zu einer Depletion des hepatischen UTP. Die selektive Defizienz von UTP führt zu einer nachlassenden Synthese von Makromolekülen (RNA, Proteine, Glykoproteine und Glykogen) aufgrund der gehemmten Transkription und in der Folge auch Translation. Sowohl histologisch als auch laborchemisch ähnelt der D-Gal-induzierte Leberschaden einer viralen Hepatitis (Decker und Keppler, 1974; Keppler et al., 1968). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte im Verlauf zeigen, dass D-Gal – in Kombination mit LPS – zu einem tödlichen septischen Schock führt und dies bei einer deutlich reduzierten LPS-Dosis. D-Gal sensibilisiert somit den Organismus für die Wirkungen des Endotoxins (Freudenberg et al., 1986; Galanos et al., 1979; Lehmann, 1987). Im Verlauf konnten weitere Arbeitsgruppen ähnliche Effekte des D-Gal für den CpG-induzierten septischen Schock nachweisen (Hemmi et al., 2000; Sparwasser et al., 1997b; Yi et al., 2006). Leider fand sich in der Literatur kein Hinweis über kardiale Effekte von D-Gal. Die Auslösung einer experimentellen Hepatitis in Kombination mit TAK scheint für den gemessenen Effekt aber keine Erklärung zu sein. Zumal wir in den Gruppen SOP CpG und TAK CpG wieder keinen Anstieg der Herzfrequenz verzeichnen konnten. Auch diese Versuchstiere hatten gemäß Versuchsprotokoll D-Gal erhalten. Lohner et al. (2013) konnten in ihrer Arbeit TLR9-vermittelte kardiodepressive Effekte nachweisen. Hier zeigte

sich ein signifikanter Abfall der Herzfrequenz, welcher in den verwendeten TLR9-defizienten Mausstämmen nicht nachgewiesen werden konnte. In dieser Arbeit wurde die TLR9-Stimulation jedoch nicht mit einer TAK kombiniert. Baumgarten et al. (2006a) sahen in ihrem „Second-hit-setting“ LPS plus TAK hingegen einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz im Vergleich TAK LPS versus TAK PBS.

Für die Blutdruckparameter SAP, MAP und LSVP fanden wir signifikante Anstiege der Vergleichsgruppen TAK versus SOP (vgl. Abb. 17, Abb. 19 und Abb. 20). Die TAK-Gruppen untereinander verhielten sich jedoch homogen, hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Auch Nakamura et al. (2001) konnten in ihrer Arbeit in den ersten Tagen nach TAK einen Anstieg des systolischen Blutdrucks ermitteln, der erst innerhalb von 10 Tagen wieder auf den Ausgangswert zurückkehrte. Baumgarten et al. (2006a) kommen in ihrer Arbeit auf ähnliche Ergebnisse der TAK-Gruppen im Vergleich mit den SOP-Gruppen. Allerdings zeigte sich in dieser Arbeit auch ein signifikanter Abfall der systolischen Blutdruckparameter in der TAK LPS-Gruppe im Vergleich mit TAK PBS sowie korrelierend in der Gruppe LPS im Vergleich zur PBS-Gruppe. Auch Lohner et al. (2013) und Boehm et al. (2013b) konnten in ihren Arbeiten nach TLR9-Stimulation (ohne TAK) einen Abfall des LVSP nachweisen. Einen Effekt, den wir in beiden CpG-Gruppen nicht reproduzieren konnten.

Für die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ($+dP/dt_{max}$) als Gradmesser für die Kontraktilität des Herzens konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls kein signifikanter Unterschied im Vergleich aller Gruppen zueinander nachgewiesen werden (siehe Abb. 22 und Tab. 16). Erneut konnten Lohner et al. (2013) sowie Boehm et al. (2013b) in ihren Arbeiten einen kardiodepressiven Effekt der TLR9-Stimulation ermitteln. Gleiches gilt für die Arbeit von Knuefermann et al. (2008), die ebenfalls kardiodepressive Effekte nach Exposition mit CpG-ODN nachweisen konnten. Auch Baumgarten et al. (2006a) wiesen für LPS einen vergleichbaren Effekt nach. Die nach Literaturrecherche vorliegenden Arbeiten zeigen allesamt kardiodepressive Effekte von LPS und CpG auf die hämodynamischen Parameter, die in dieser Studie nicht auftraten. Dies könnte auf eine verringerte Wirksamkeit der hier eingesetzten CpG-Charge zurückzuführen sein. Dagegen spricht, dass die adspektorische Untersuchung klare Symptome einer Sepsis ergab (siehe Kapitel 3.1). Weiterhin wurde in Voruntersuchungen mit der derselben Charge an CpG

eine Erhöhung der absoluten Dosis von 5 nmol auf 10 nmol getestet. Dies führte zu einem dramatischen Anstieg der Letalität.

Allerdings scheint die TAK kurz nach der Konstriktion zunächst eine erhöhte Kontraktilität zu induzieren. Signifikante Funktionseinbußen der kardialen Kontraktilität zeigen sich gemäß Takaoka et al. (2002) erst nach etwa sieben Tagen. So erscheint es plausibel, dass sich in unserer Versuchsanordnung noch keine relevante kardiale Insuffizienz respektive dekompensierte Hypertrophie ausgebildet hatte, sondern vielmehr ein kompensiertes Stadium vorlag. Die Sepsis-Induktion kam somit zu einem zu frühen Zeitpunkt.

4.6 Hypertrophiemarker

Um das Ausmaß der Herzhypertrophie beziehungsweise auch einer eventuell beginnenden Herzinsuffizienz zu evaluieren, wurde die Expression der natriuretischen Peptide ANF und BNP als Hypertrophiemarker und Marker der Herzinsuffizienz bestimmt. ANF und BNP sind Peptidhormone, die in den Kardiomyozyten des Atriums synthetisiert, gespeichert und freigesetzt werden (Bold et al., 1996; Ramos und Bold, 2006). Es handelt sich um neuroendokrine Hormone mit anti-hypertrophen, anti-hypertensiven und anti-fibrotischen Eigenschaften (Oliver et al., 1997; Tamura et al., 2000). Ihre Ausschüttung erfolgt zum einen mechanisch getriggert bei Dehnung der atrialen Kardiomyozyten und zum anderen unter Einfluss humoraler Faktoren und hier insbesondere Endothelin-1 (ET-1) (Bold et al., 1996). Aber auch unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokine – zum Beispiel via vermehrte Expression unter LPS-Stimulation – kommt es zu erhöhten Spiegel der natriuretischen Peptide im Blut (Ogawa und Bold, 2012). Hier zeigt sich bereits eine enge Verknüpfung von natriuretischen Peptiden und proinflammatorischen Zytokinen im Zusammenhang mit einem septischen Krankheitsbild sowie der Entwicklung einer myokardialen Dysfunktion respektive Herzinsuffizienz. Folgerichtig zu den Ergebnissen von Ogawa und Bold (2012) lassen sich erhöhte Spiegel von natriuretischen Peptiden auch im Rahmen einer Sepsis nachweisen (Charpentier et al., 2004; Witthaut et al., 2003). So sind sie – ähnlich wie die proinflammatorischen Zytokine – auch Prädiktoren für das Überleben respektive die Mortalität im Rahmen eines septischen Geschehens (Yucel et al., 2008). Im klinischen Alltag werden die natriuretischen Peptide aber vor allem als prognostische und diagnostische Marker zur Einschätzung einer beginnenden respektive manifesten Herzinsuffizienz eingesetzt (Burnett et al., 1986; van Veldhuisen et al., 2013).

Hierbei fungiert insbesondere BNP als Standard zur Evaluation eines Herzversagens beziehungsweise einer dekompensierten Herzinsuffizienz (Yancy et al., 2013; Yoshimura et al., 1993). Bei kombinierter linksventrikulärer Hypertrophie und Dysfunktion scheinen ANF und BNP gleichermaßen nützlich zur Risikoevaluation für kardiovaskuläre Ereignisse und Tod durch Herzversagen zu sein (Wang et al., 2004). Wie erwartet war die Expression für ANF und BNP in den TAK-Gruppen erhöht, erreichte aber im Fall von ANF nur in der D-Gal und CpG-Gruppe das Signifikanzniveau, während BNP nur in der TAK D-Gal-Gruppe signifikant erhöht war. Ein Effekt der CpG-Stimulation ließ sich – anders als unter LPS-Stimulation (siehe oben) – nicht feststellen. Möglicherweise ist diese uneinheitliche Datenlage dem Umstand geschuldet, dass die Tiere bereits nach drei Tagen stimuliert und untersucht wurden. Zwar hatte sich zu diesem Zeitpunkt eine relevante Hypertrophie entwickelt, wie die Auswertung der Herzgewichte eindeutig belegt (siehe Abschnitt 3.2.2 und 4.4). Allerdings befand sich diese offensichtlich in einem kompensierten Stadium, wie unsere hämodynamischen Messungen nahelegten (siehe Kapitel 3.3.2 und Kapitel 4.5). Die bereits im vorigen Kapitel aufgestellte Hypothese wird untermauert durch Untersuchungen von Takaoka et al. (2002), die erst nach sieben Tagen einen Abfall von $+dP/dt_{max}$ ermitteln konnten. Auch in der Arbeit von Liao et al. (2002) ließ sich eine dekompensierte Herzinsuffizienz erst nach vier Wochen und auch nur bei 46 % der Versuchstiere nach TAK nachweisen.

4.7 PRRs

Die Expression folgender Toll-like Rezeptoren wurde für Myokardgewebe nachgewiesen: TLR1, TLR2, TLR4 und TLR9 (Boyd et al., 2006; Frantz et al., 2001; Frantz et al., 1999). Für TLR2 und TLR4 existieren bereits eingehende Untersuchungen, dass diese die Expression proinflammatorischer Zytokine hochregulieren und dadurch eine myokardiale Dysfunktion bedingen (Baumgarten et al., 2006b; Knuefermann et al., 2004). Der Ligand von TLR2 ist LTA, wenngleich eine gewisse Reaktion auf LPS ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Takeuchi et al., 1999; Yang et al., 1998). TLR1 interagiert mit TLR2 und scheint darüber eine inhibitorische Wirkung zu haben (Hajjar et al., 2001). Zwar konnten wir eine erhöhte Expression von TLR1 nach TAK sowie auch nach CpG-Stimulation nachweisen, diese erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau (vgl. Abb. 26). Für den Toll-like Rezeptor 2 zeigte sich in dieser Arbeit ein signifikanter Anstieg nach Provokation

mit CpG sowie – wenngleich geringer – nach TAK plus CpG-Gabe (siehe Abb. 27). Der entscheidende Faktor scheint hier die Exposition mit dem Liganden CpG zu sein, ein synergistischer Effekt nach kardialer Vorschädigung war nicht zu erkennen. TLR2 scheint somit aber, eventuell auch sekundär, auf eine Stimulation mit CpG zu reagieren. Diese Veränderungen decken sich mit den Daten, die Lohner et al. (2013) für TLR2 (Bestimmung 18 Stunden nach Induktion einer polymikrobiellen Peritonitis) erhoben haben. CpG löst somit eine allgemeine Entzündung aus mit einer konsekutiven Hochregulation vieler Rezeptoren und Parameter.

Für TLR4 ließ sich lediglich ein signifikanter Anstieg in der TAK D-Gal-Gruppe nachweisen (Abb. 28). Ein alleiniger Effekt von D-Gal auf die Expression von Toll-like Rezeptoren wurde in der Literatur nicht untersucht. Allerdings konnten Knuefermann et al. (2008) in ihrer Arbeit keine inflammatorische Reaktion nach alleiniger D-Gal-Injektion feststellen. In den Ergebnissen von Lohner et al. (2013) konnte – konträr zu unseren Daten – eine erhöhte Expression von TLR4 unter Induktion einer polymikrobiellen Sepsis nachgewiesen werden. Freilich wurde das Signifikanzniveau – wie bei TLR2 – erst nach 18 Stunden erreicht und darüber hinaus ist bei anderer Versuchsanordnung keine isolierte TLR9-Stimulation erfolgt, was die Vergleichbarkeit der Daten einschränkt.

TLR9 zeigte nach TAK und nach CpG-Stimulation einen Anstieg der Expression, der in keinem Fall das Signifikanzniveau erreichte (vgl. Abb. 29). Dies deckt sich nicht mit den anderen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die in ihren Versuchsanordnungen teils mit direkter TLR9-Stimulation via CpG-ODN, teils auch unter Induktion einer polymikrobiellen Sepsis einen signifikanten Anstieg der TLR9-Expression messen konnten (Knuefermann et al., 2008; Lohner et al., 2013). Allerdings muss auf die unterschiedlichen Zeitpunkte der Probenentnahme eingegangen werden. Lohner et al. (2013) wiesen 36 Stunden nach Induktion der polymikrobiellen Sepsis einen signifikanten Anstieg der TLR9-Expression nach, Knuefermann et al. (2008) bei direkter TLR9-Stimulation via CpG-ODN bereits nach 2 Stunden – bei einem Abfall unter das Signifikanzniveau im Verlauf. Insbesondere der Versuchsaufbau von Knuefermann et al. (2008) scheint vergleichbar zu sein, was nahelegt, dass die Bestimmung der TLR9-Expression in unserem Fall zu spät erfolgte. Ein weiterer Unterscheidungspunkt ist die verabreichte CpG-Dosis, Knuefermann et al. (2008) verwendeten 1 nmol/g, während in dieser Arbeit äquivalent 0,2 nmol/g (200

nmol/kg) CpG-ODN verwendet wurden. Die verringerte Dosis hat möglicherweise zu dem veränderten Expressionsverhalten beigetragen.

4.8 Proinflammatorische Zytokine

Die proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-1 β und IL-6 sind die Mediatoren kardialer Depression im Rahmen eines septischen Geschehens (Kumar et al., 1996; MacGowan et al., 1997; Natanson et al., 1989). Des Weiteren sind diese proinflammatorischen Zytokine erhöht bei akuter wie auch chronischer Herzinsuffizienz (Levine et al., 1990; Testa et al., 1996). Ähnlich wie die natriuretischen Peptide korrelieren sie dabei mit der Schwere der Erkrankung gemäß der funktionellen Einteilung der New York Heart Association (Torre-Amione et al., 1996). Ferner fungieren sie als Prädiktoren für die Langzeit-Mortalität einer chronischen Herzinsuffizienz (Deswal et al., 2001; Tsutamoto et al., 1998). Obwohl in dieser Arbeit ähnliche Zustände im murinen Modell induziert wurden, zeigte die Auswertung der Zytokinexpression ein uneinheitliches Bild. TNF war unter CpG und TAK plus CpG zwar deutlich erhöht, erreichte aber keine Signifikanz gegenüber den anderen Versuchsgruppen (vgl. Abb. 30). IL-1 β wies ein ähnliches Expressionsmuster auf im Sinne einer gesteigerten Expression insbesondere unter CpG, TAK plus CpG sowie TAK plus D-Gal, welches im Falle von CpG und TAK plus CpG auch signifikant erhöht war (siehe Abb. 31). Für IL-6 zeigte sich nur in der Gruppe TAK D-Gal ein signifikanter Anstieg der Expression (siehe Abb. 32). Lohner et al. (2013) und Boehm et al. (2013b) konnten in vergleichbaren Versuchsgruppen jeweils signifikante Anstiege der proinflammatorischen Zytokine nachweisen (18 respektive 2 und 6 Stunden nach begonnener Stimulation). Knuefermann et al. (2008) konnten unter CpG-Stimulation nach 1-2 Stunden ebenfalls signifikante Anstiege der proinflammatorischen Zytokine ermitteln. Für LPS, den Ligand von TLR4, hatten Baumgarten et al. im Jahr 2001 diesen Effekt ebenfalls nachgewiesen und konnten im Jahr 2006 diesen Effekt für eine Kombination von TAK plus LPS noch übertreffen. Leider konnten wir diese Ergebnisse sowohl für die CpG-Stimulation allein als auch für die Kombination TAK plus CpG nicht erzielen. Es scheint, als läge das Maximum der Zytokin-Expression unter direkter Stimulation mit CpG zu einem früheren Zeitpunkt als 6 Stunden. Da nur zu einem Zeitpunkt im Versuchsaufbau Organe entnommen wurden, lässt sich über die Kinetik der Zytokin-Expression in dieser Arbeit keine Aussage treffen. Die Problematik der relativ niedrigen CpG-Dosis in dieser Arbeit

wurde in Kapitel 4.7 bereits erörtert und trifft für die Gruppe der proinflammatorischen Zytokine ebenfalls zu.

4.9 Abschließende Beurteilung und Ausblick

In Bezug auf unsere in der Einleitung formulierten Hypothesen ließen sich nicht alle mit dieser Arbeit bestätigen (siehe Kapitel 1.5.) Unsere erste Hypothese ließ sich vollständig durch die vorliegenden Daten verifizieren. Wie in Kapitel 4.4 aufgezeigt, erzielten wir nach TAK eine signifikante linksventrikuläre Gewichtszunahme entsprechend einer kardialen Hypertrophie.

Hypothese Nummer zwei ließ sich anhand der vorliegenden Daten falsifizieren. Die Gabe von CpG führte in keiner Gruppe zu signifikanten kardialen Funktionseinbußen (vgl. Kapitel 3.3 und 4.5). Wie bereits aufgezeigt, gab es hierfür zwei mögliche Ursachen. Erstens entwickelte sich in der kurzen Zeit bei keinem der Tiere eine kardiale Insuffizienz. Es fanden sich weder klinische Hinweise auf eine kardiale Dekompensation, wie zum Beispiel Dyspnoe, Gewichtszunahme oder reduzierte körperliche Aktivität (Faerber et al., 2011) noch konnten wir einen signifikanten Anstieg der Expression kardialer Hypertrophiemarker nachweisen (siehe Kapitel 3.4.1. und 4.6). Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten bereits aufzeigen, dass eine kardiale Dekompensation nach TAK deutlich später und auch nicht bei allen Tieren einer Untersuchungsgruppe zu erwarten ist (Arany et al., 2006; Faerber et al., 2011; Takaoka et al., 2002). Nakamura et al. (2001) konnten sogar dokumentieren, dass sich die kardiale Funktion nach TAK nach einem kurzen Einbruch erholt und bis zu 20 Tage nach TAK stabil bleibt. Somit hätte in der vorliegenden Versuchsanordnung nach TAK länger abgewartet werden müssen und die Tiere im Anschluss nach klinischen und biometrischen Parametern bezüglich einer dekompensierten Herzinsuffizienz ausgewählt werden müssen.

Die zweite mögliche Ursache könnte in der niedrigen CpG-Dosierung liegen, welche deutlich unterhalb der Dosierung von Knuefermann et al. (2008) lag. Obwohl die Tiere klinische Symptome der Sepsis aufwiesen (Kapitel 3.1), fanden wir kein Korrelat in unseren hämodynamischen Messungen. Es bleibt zu überlegen, ob die Messungen zu einem früheren Zeitpunkt nach Sepsisinduktion aussagekräftiger gewesen wären.

Dieser Umstand mag auch bei der dritten Hypothese, welche sich ebenfalls nicht verifizieren ließ, eine Rolle gespielt haben. Letztlich konnte die in Hypothese drei propagierte

Hochregulation von PRRs und proinflammatorischen Zytokinen im Herzen anhand unserer molekularbiologischen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Als Erklärungsansatz muss erneut auf die angesprochene CpG-Dosis sowie auf den Zeitpunkt der Probenentnahme verwiesen werden. So konnten Knuefermann et al. (2008) einen Peak sowohl der Expression von TNF, IL-6 und IL-1 β als auch der kardialen Expression von TLR-9 nach bereits zwei Stunden nachweisen, der im Verlauf der folgenden vier Stunden wieder deutlich abfiel. Korrespondierend mit unseren klinischen Eindrücken der Tiere lag das Erkrankungsmaximum und der vermutete humorale „Zytokinsturm“ vor unseren hämodynamischen Messungen und der anschließenden Probenentnahme. Allerdings hat in der Studie von Baumgarten et al. (2006a) mit LPS als Second-hit-Stimulanz genau der hier angewendete zeitliche Ablauf zu der in unserer Hypothese formulierten Reaktion geführt. LPS scheint als Stimulanz also deutlich stärker zu wirken.

In einer Studie von Ehrentraut et al. (2015) wurden die Ergebnisse eines größeren DFG-Projektes zu „Second-hit“ Stimulation nach TAK zusammengefasst. Es flossen die Ergebnisse dieser Dissertation sowie die von weiteren Co-Doktoranden ein. Das Versuchsprotokoll entsprach genau dem in Abb. 3 dargestellten. Es wurden als „Second-hit“ Stimuli LTA und CpG-ODN verglichen. In einem Punkt gingen die Ergebnisse von Ehrentraut et al. (2015) über die der vorliegenden Dissertation hinaus. Es wurde gezeigt, dass CpG-ODN als „Second-hit“ Stimulus einen starken Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 induzierte. Dieser Anstieg erklärt möglicherweise den schwachen Einfluss der CpG-ODN-Stimulation auf die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6, da IL-10 den Anstieg proinflammatorischer Zytokine verringert. CpG-ODN hat auch in anderen experimentellen Ansätzen zu starken IL-10 Anstiegen geführt und auf diese Weise zum Beispiel den Reperfusionsschaden einer kardialen Ischämie reduziert (Markowski et al., 2013).

Abschließend muss die Verwendung von D-Gal zur Sensibilisierung des Organismus auf die Gabe von CpG kritisch diskutiert werden. In der Gruppe TAK D-Gal konnten wir signifikante Anstiege von ANF (Abb. 24), BNP (Abb. 25) und TLR-4 (Abb. 28) verzeichnen. Obwohl diese in der TAK CpG-Gruppe nicht auftraten, welche ebenfalls gemäß Versuchsanordnung D-Gal erhalten hatten, ist zu erörtern, ob D-Gal für sich genommen eine Wirkung auf die Expression der PRRs und proinflammatorischen Zytokine hat. Sicher hat die Induktion einer aseptischen Hepatitis Einfluss auf das Expressionsmuster besagter

Zytokine und Rezeptoren (siehe Kapitel 4.5) (Keppler et al., 1968). Die durch D-Gal ausgelöste Entzündungsreaktion der Leber zeigte sich auch in den systemisch gemessenen Entzündungsparametern IL-1 β und IL-6 (siehe Abb. 31 und Abb. 32). Daher könnte die CpG-Gabe keine weitere Steigerung der Entzündung bewirkt haben.

5. Zusammenfassung

Die akute Kardiomyopathie sowie auch die exazerbierte Kardiomyopathie im Rahmen einer Sepsis ist nach wie vor eine der großen Herausforderungen im klinischen Sepsis-Management. Die PRRs und unter diesen insbesondere die Toll-like Rezeptoren sind als mögliche Ziele pharmakologischer Therapien identifiziert worden.

In der vorliegenden Studie wurde im Rahmen der Grundlagenforschung die Rolle und Beteiligung des TLR9 an der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie sowie im Rahmen eines septischen Geschehens in einem myokardialen Second-hit-Modell untersucht.

Hierzu wurde zunächst eine kardiale Hypertrophie mittels der transversen aortalen Konstriktion (TAK) induziert. Die Kontrollgruppe wurde scheinoperiert. Nach drei Tagen erhielten die Tiere PBS, D-Gal oder CpG (in Kombination mit D-Gal) intraperitoneal. Nach weiteren sechs Stunden erfolgten die hämodynamischen Messungen über intraarterielle und intraventrikuläre Blutdruckmessungen und abschließend die Organentnahme. Ermittelt wurden biometrische Daten der Organe sowie im Anschluss die Expression von Hypertrophie markern, PRRs sowie proinflammatorischen Zytokinen über molekularbiologische Untersuchungsmethoden.

Unter Stimulation des TLR9 mit CpG kam es zu keinen signifikanten hämodynamischen Funktionseinbußen in den Kathetermessungen. Im Gegenteil, alle TAK operierten Tiere – auch die mit CpG stimulierten – wiesen bessere Blutdruckparameter auf als die scheinoperierten Tiere. Die frühe kardiale Hypertrophie geht demnach nicht mit Funktionseinschränkungen einher.

Letztlich konnte auch bei der Expression von PRRs und proinflammatorischen Zytokinen keine eindeutige Hochregulation nach TAK und CpG-Stimulation in unseren molekularbiologischen Versuchen festgestellt werden. Die parallele Hochregulation von IL-10 scheint eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse zu bieten. Andererseits erklärt dies nicht die Ergebnisse der anderen Arbeitsgruppen in den Sepsis-Modellen mit CpG. Es bleibt zu diskutieren, ob ein verändertes Studiendesign hinsichtlich einer längeren Hypertrophie-Phase, einer geänderten CpG-Dosis sowie früheren hämodynamischen Messung als auch Organgewinnung einen statistisch signifikanten Nachweis erbringen könnte. Auch könnte der eventuelle Einfluss von D-Gal auf die Expression der PRRs und Zytokine genauer evaluiert werden.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Schematischer Aufbau des transmembranösen IL-1R und TLR: intrazelluläre TIR-Domäne und die extrazelluläre Ig-like-Domäne des IL-1R sowie die extrazellulären LRR der TLRs (Akira und Takeda, 2004)..... 15
- Abb. 2:** TLR Signaltransduktionsweg: über eine MyD88-abhängige Signalkaskade wird unter Rekrutierung von IRAK-1 und -4 letztlich TAK1 aktiviert, der seinerseits MAP-Kinasen und den NF-κB aktiviert (Akira und Takeda, 2004) 17
- Abb. 3:** Versuchsaufbau: An Tag 3 nach OP erfolgte zunächst das D-Gal-Priming und 30 Minuten später die CpG-/ Placebo (PBS) -Gabe. Nach weiteren 6 Stunden erfolgte zunächst die Hämodynamikmessung und anschließend die Organentnahme. Der Ablauf an Tag 3 wurde so organisiert, dass die Hämodynamikmessung und Organentnahme 72 Stunden nach TAK/ SOP erfolgte 21
- Abb. 4:** Intubationsmethode, Halsbereich der Maus, Ventralansicht nach Hautschnitt und Präparation der Trachea (mit eingeführter Trachealkanüle) (entnommen aus Bittig (2005))..... 23
- Abb. 5:** Die transversale aortale Konstriktion; Bild A Übersichtsaufnahme: Maus mit Endotrachealkanüle und eröffnetem Thorax; Bild B Detailaufnahme weißer Kasten: präparierter Aortenbogen mit vorbereiteten Ligaturfäden und aufliegender Kanüle (entnommen aus Bittig (2005))..... 24
- Abb. 6:** Operationsübersicht und anatomische Strukturen; Bild A: Präparierter Aortenbogen mit den Abgängen der A. carotis communis sinistra und dem Truncus brachiocephalicus nach erfolgter aortaler Konstriktion (entnommen aus Bittig (2005)); Bild B: Schematische Übersicht der TAK nach Rockman et al. (1991) 25
- Abb. 7:** Arteria carotis communis dextra mit vorbereiteten Haltefäden (entnommen aus Bittig (2005))..... 28

- Abb. 8:** A. carotis communis dextra nach Inzision sowie Millar-Katheter vor dem Einführen in das Gefäß (entnommen aus Bittig (2005)) 28
- Abb. 9:** Millar-Katheter intraluminal bei gelockertem, unterem Haltefaden (entnommen aus Bittig (2005))..... 29
- Abb. 10:** Körpergewicht bei OP der einzelnen Versuchsgruppen, Angaben: MW \pm SEM (n = 12-17) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 42
- Abb. 11:** Gewichtsverlust der Versuchstiere nach OP aufgeteilt nach Scheinoperation oder TAK, Angaben: MW \pm SEM (n = 12-17) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 43
- Abb. 12:** Herzgewichte der einzelnen Versuchsgruppen, Angaben: MW \pm SEM (n = 12-16) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt..... 44
- Abb. 13:** Masse des linken Ventrikels der einzelnen Versuchsgruppen, Angaben: MW \pm SEM (n = 12-16) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 45
- Abb. 14:** Herzparameter LVW/BW der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 12-16) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 46
- Abb. 15:** Herzparameter LVW/TL der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 12-16) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 47

- Abb. 16:** Herzfrequenzen der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 10-14) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt..... 48
- Abb. 17:** Systolischer arterieller Blutdruck der Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 10-14) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 49
- Abb. 18:** Diastolischer arterieller Blutdruck der Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 10-14) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 50
- Abb. 19:** Mittlerer arterieller Blutdruck der Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 10-14) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 51
- Abb. 20:** Linksventrikulärer systolischer Blutdruck der Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 8-9) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 52
- Abb. 21:** Linksventrikulärer diastolischer Blutdruck der Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 8-9) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 53
- Abb. 22:** $+dP/dt_{max}$ der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 8-9) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt..... 54

- Abb. 23:** $-dP/dt_{\min}$ der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 8-9) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt..... 55
- Abb. 24:** ANF mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-6) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 56
- Abb. 25:** BNP mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-6) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 57
- Abb. 26:** TLR1 mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 5-7) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 58
- Abb. 27:** TLR2 mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 5-7) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 59
- Abb. 28:** TLR4 mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 5-7) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 60
- Abb. 29:** TLR9 mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-6) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 61

- Abb. 30:** TNF mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-6) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 62
- Abb. 31:** IL-1 β mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-7) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 63
- Abb. 32:** IL-6 mRNA-Expression der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 4-7) Das Sternchen (*) kennzeichnet signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. 64

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	TLRs und ihre Liganden (Takeda und Akira, 2015).....	12
Tab. 2:	Komponenten für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) gemäß dem Qiagen Omniscript Kit.....	32
Tab. 3:	Primer-Sonden zur Durchführung der RTD-PCR (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems).....	33
Tab. 4:	Geräte und Materialien, Tierhaltung.....	34
Tab. 5:	Geräte, <i>in vivo</i> -Versuche.....	35
Tab. 6:	Materialien, <i>in vivo</i> -Versuche.....	36
Tab. 7:	Geräte, <i>in vitro</i> -Versuche.....	37
Tab. 8:	Materialien, <i>in vitro</i> -Versuche.....	37
Tab. 9:	Verwendete Software.....	38
Tab. 10:	Mortalität des gesamten Untersuchungskollektivs.....	39
Tab. 11:	Peri-/Postoperative Todesfälle aufgeteilt nach scheinoperierten und mittels TAK operierten Mäusen.....	39
Tab. 12:	Todesfälle nach erfolgter Stimulation, aufgeteilt nach Untersuchungsgruppen.....	40
Tab. 13:	Todesfälle während Herzkatheter. Aufgeteilt nach Untersuchungsgruppen und unterschiedlicher CpG-Dosis.....	41
Tab. 14:	Herzparameter LVW/BW und LVW/TL der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW ± SEM (n = 12-16) DFn: 5, DFd: 78 Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt.....	46

- Tab. 15:** Herzfrequenzen der einzelnen Versuchsgruppen sowie Vergleiche zwischen ausgewählten Gruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 10-14) DF_n: 5, DF_d: 60 Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt..... 48
- Tab. 16:** $+dP/dt_{\max}$ und $-dP/dt_{\min}$ der einzelnen Versuchsgruppen; Angaben: MW \pm SEM (n = 8-9) DF_n: 5, DF_d: 43 Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt..... 54

8. Literaturverzeichnis

Ahmad-Nejad P, Häcker 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, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499–511

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

Allen DG, Kurihara S. The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol* 1982; 327: 79–94

Anrep G von. On the part played by the suprarenals in the normal vascular reactions of the body. *J Physiol* 1912; 45: 307–317

Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman BM. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR- γ coactivator 1 α . *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 10086–10091

Barbee RW, Perry BD, Ré RN, Murgu JP. Microsphere and dilution techniques for the determination of blood flows and volumes in conscious mice. *Am J Physiol* 1992; 263: R728-R733

Baumgarten G, Kim S-C, Stapel H, Vervölgyi V, Bittig A, Hoefft A, Meyer R, Grohé C, Knuefermann P. Myocardial injury modulates the innate immune system and changes myocardial sensitivity. *Basic Res Cardiol* 2006a; 101: 427–435

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

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

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

Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 568–575

Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 1986; 321: 209–213

Bittig A. Der Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Hypertrophieantwort nach Druckbelastung im Myokard der Maus, Dissertation: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2005

Boehm O, Knuefermann P, Plueck J, Schwederski M, Ehrentraut H, Kebir S, Lohner R, Velten M, Morath S, Koch A, Zacharowski K, Grohé C, Hoeft A, Baumgarten G, Meyer R. TLR2 stimulation induces cardiac inflammation but not cardiac depression in vivo. *J Inflamm* 2013a; 10: 33

Boehm O, Markowski P, van der Giet M, Gielen V, Kokalova A, Brill C, Hoeft A, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. In vivo TLR9 inhibition attenuates CpG-induced myocardial dysfunction. *Mediators Inflamm* 2013b: 1–9

Bold AJ de, Bruneau BG, Kuroski de Bold ML. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. *Cardiovasc Res* 1996; 31: 7–18

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RMH, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101: 1644–1655

Bowie A, O'Neill LAJ. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 508–514

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

- Burge C, Campbell AM, Karlin S. Over- and under-representation of short oligonucleotides in DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1358–1362
- Burnett JC, Kao PC, Hu DC, Heser DW, Heublein D, Granger JP, Opgenorth TJ, Reeder GS. Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science* 1986; 231: 1145–1147
- Calvin JE, Driedger AA, Sibbald WJ. An assessment of myocardial function in human sepsis utilizing ECG gated cardiac scintigraphy. *Chest* 1981; 80: 579–586
- Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996; 383: 443–446
- Charpentier J, Luyt C-E, Fulla Y, Vinsonneau C, Cariou A, Grabar S, Dhainaut J-F, Mira J-P, Chiche J-D. Brain natriuretic peptide: a marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis. *Crit care Med* 2004; 32: 660–665
- Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J* 1991; 5: 3037–3046
- Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006; 1: 581–585
- Cingolani HE, Pérez NG, Cingolani OH, Ennis IL. The Anrep effect: 100 years later. *Am J Physiol* 2013; 304: H175-H182
- deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XHT. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp* 2010
- Decker K, Keppler D. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1974; 71: 77–106
- Decker T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2000; 95: 999–1006

- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; 103: 351–361
- Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure. *Circulation* 2001; 103: 2055–2059
- Doevendans PA, Daemen MJ, Muinck ED de, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 34–49
- Ehrentraut H, Ehrentraut SF, Boehm O, El Aissati S, Foltz F, Goelz L, Goertz D, Kebir S, Weisheit C, Wolf M, Meyer R, Baumgarten G. Tlr4 deficiency protects against cardiac pressure overload induced hyperinflammation. *PLoS ONE* 2015; 10: 1-15
- 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* 2011; 36: 613–620
- Faerber G, Barreto-Perreia F, Schoepe M, Gilsbach R, Schrepper A, Schwarzer M, Mohr FW, Hein L, Doenst T. Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: reduced peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator levels and mitochondrial dysfunction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 141: 492-500
- Fard A, Wang CY, Takuma S, Skopicki HA, Pinsky DJ, Di Tullio MR, Homma S. Noninvasive assessment and necropsy validation of changes in left ventricular mass in ascending aortic banded mice. *J Am Soc Echocardiogr* 2000; 13: 582–587
- Frangogiannis NG. Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med* 2018; 65: 70–99
- Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor κ B by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 5197–5203
- Frantz S, Kobzik L, Kim Y-D, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* 1999; 104: 271–280

Freudenberg MA, Keppler D, Galanos C. Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin. *Infect Immun* 1986; 51: 891–895

Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5939–5943

Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Diagnosedaten der Krankenhäuser Deutschland 2010-2016; 2018a [Stand: 18.11.2018]. Verfügbar unter: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC?TARGET=&PAGE=_XWD_866&OPINDEX=2&HANDLER=_XWD_CUBE.SETPGS&DATACUBE=_XWD_894&D.001=1000001&D.946=12277&D.011=44302

Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Sterbefälle Sterbeziffern 2013; 2018b [Stand: 18.11.2018]. Verfügbar unter: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=33999993&nummer=6&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=29037085

Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Sterbefälle Sterbeziffern 2014; 2018c [Stand: 18.11.2018]. Verfügbar unter: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=33999993&nummer=6&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=96604643

Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Sterbefälle Sterbeziffern 2015; 2018d [Stand: 18.11.2018]. Verfügbar unter: http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=31073748&nummer=6&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=25835773

Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB. Cutting Edge: functional interactions between Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulins. *J Immunol* 2001; 166: 15–19

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

- Horn F. Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 7., Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2019
- Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 1999; 341: 1276–1283
- Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54: 1–13
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Waal Malefyt R de, Kastelein RA, Bazan F, Liu Y-J. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 863–870
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 621–663
- Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2005; 17: 338–344
- Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by d-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 1968; 9: 279–290
- Knuefermann P, Sakata Y, Baker JS, Huang C-H, Sekiguchi K, Hardarson HS, Takeuchi O, Akira S, Vallejo JG. Toll-like receptor 2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation* 2004; 110: 3693–3698
- Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Ehrentraut H, Rüdiger M, Boehm O, Fink K, Dreiner U, Grohé C, Hoefft A, Baumgarten G, Koch A, Zacharowski K, Meyer R. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 26–35
- Komuro I. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Ann. Rev. Physiol.* 1993; 55: 55–75
- Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71: 549–574
- Krieg AM. Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. *Trends Microbiol* 1996; 4: 73–77

- 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
- Krivitski NM, Starostin D, Smith TL. Extracorporeal recording of mouse hemodynamic parameters by ultrasound velocity dilution. *ASAIO J* 1999; 45: 32–36
- Kumar A, Venkateswarlu T, Dee L. Tumor necrosis factor α and interleukin 1β are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183: 949–958
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004a; 5: 190–198
- Latz E, Visintin A, Espevik T, Golenbock DT. Mechanisms of TLR9 activation. *J Endotoxin Res* 2004b; 10: 406–412
- Lehmann V. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J Exp Med* 1987; 165: 657–663
- Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990; 323: 236–241
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent J-L, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31: 1250–1256
- Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 5567–5572
- 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 aortic-banded mice: necropsy validation. *Am J Physiol* 2002; 282: H1703-H1708
- Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit care Med* 2002; 30: 1-11
- Lipford G. Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol* 1998; 6: 496–500

Lohner R, Schwederski M, Narath C, Klein J, Duerr GD, Torno A, Knuefermann P, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Boehm O. Toll-like receptor 9 promotes cardiac inflammation and heart failure during polymicrobial sepsis. *Mediators Inflamm* 2013; 1–13

Lorenz JN, Robbins J. Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse. *Am J Physiol* 1997; 272: H1137-H1146

MacGowan GA, Mann DL, Kormos RL, Feldman AM, Murali S. Circulating interleukin-6 in severe heart failure. *Am J Cardiol* 1997; 79: 1128–1131

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

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

Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000a; 343: 338–344

Medzhitov R, Janeway CA. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000b; 173: 89–97

Medzhitov R, Janeway JC. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000c; 8: 452–456

Medzhitov R, Janeway Jr CA. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* 1998; 10: 351–353

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394–397

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

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

Nakamura M, Sadoshima J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol* 2018; 15: 387–407

Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* 1989; 169: 823–832

Nichols CG, Hanck DA, Jewell BR. The Anrep effect: an intrinsic myocardial mechanism. *Can J Physiol Pharmacol* 1988; 66: 924–929

Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I κ B as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999; 398: 252–256

Ogawa T, Bold AJ de. Uncoordinated regulation of atrial natriuretic factor and brain natriuretic peptide in lipopolysaccharide-treated rats. *Biomarkers* 2012; 17: 140–149

Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim H-S, Reddick RL, Pandey KN, Milgram SL, Smithies O, Maeda N. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14730–14735

Opal SM, Laterre P-F, Francois B, LaRosa SP, Angus DC, Mira J-P, Wittebole X, Dugernier T, Perrotin D, Tidswell M, Jauregui L, Krell K, Pachel J, Takahashi T, Peckelsen C, Cordasco E, Chang C-S, Oeyen S, Aikawa N, Maruyama T, Schein R, Kalil AC, van Nuffelen M, Lynn M, Rossignol DP, Gogate J, Roberts MB, Wheeler JL, Vincent J-L. Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *JAMA* 2013; 309: 1154–1162

Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009; 227: 221–233

Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S. *Physiologie*. 8., Auflage. Stuttgart: Thieme; 2018

Parker MM, James H. Shelhamer, MD, Stephen L Bacharach. Ph.D. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med* 1984; 100: 483–490

Parrillo JE. Septic shock in humans. *Ann Intern Med* 1990; 113: 227–242

Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *J Clin Invest* 1985; 76: 1539–1553

Picard C, Puel A, Bonnet M, Ku C-L, Bustamante J, Yang K, Soudais C, Dupuis S, Feinberg J, Fieschi C, Elbim C, Hitchcock R, Lammas D, Davies G, Al-Ghonaium A, Al-Rayes H, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Al-Mohsen IZ, Frayha HH, Rucker R, Hawn TR, Aderem A, Tufenkeji H, Haraguchi S, Day NK, Good RA, Gougerot-Pocidallo M-A, Ozinsky A, Casanova J-L. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science* 2003; 299: 2076–2079

Ramos H, Bold AJ de. Gene expression, processing, and secretion of natriuretic peptides: physiologic and diagnostic implications. *Heart Fail Clin* 2006; 2: 255–268

Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, Ross J, 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 USA* 1991; 88: 8277–8281

Sarnoff SJ, Mitchell JH, Gilmore JP, Remensnyder JP. Homeometric autoregulation in the heart. *Circ Res* 1960; 8: 1077–1091

Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Current Biology* 2000; 10: 1139–1142

Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, Brunkhorst FM, Rea TD, Scherag A, Rubenfeld G, Kahn JM, Shankar-Hari M, Singer M, Deutschman CS, Escobar GJ, Angus DC. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 762–774

Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, Ueno N, Irie K, Nishida E, Matsumoto K. TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF- β signal transduction. *Science* 1996; 272: 1179–1182

Shrum B, Anantha RV, Xu SX, Donnelly M, Haeryfar SMM, McCormick JK, Mele T. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Res Notes* 2014; 7: 233

Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE, Dower SK. Identification of two major sites in the type I Interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 2000; 275: 4670–4678

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

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

Suzuki H, Sato R, Sato T, Shoji M, Iso Y, Kondo T, Shibata M, Koba S, Katagiri T. Time-course of changes in the levels of interleukin 6 in acutely decompensated heart failure. *Int J Cardiol* 2005; 100: 415–420

Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh W-C. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 2002; 416: 750–756

Takaesu G, Kishida S, Hiyama A, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Molecular Cell* 2000; 5: 649–658

Takaesu G, Ninomiya-Tsuji J, Kishida S, Li X, Stark GR, Matsumoto K. Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase leads to activation of TAK1 by inducing TAB2 translocation in the IL-1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2475–2484

- Takaoka H, Esposito G, Mao L, Suga H, Rockman HA. Heart size-independent analysis of myocardial function in murine pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol* 2002; 282: H2190-H2197
- Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol* 2015; 109: 14.12.1-14.12.10
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335–376
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11: 443–451
- Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto R, Katsuura G, Mukoyama M, Itoh H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4239–4244
- Testa M, Yeh M, Lee P, Fanelli R, Loperfido F, Berman JW, LeJemtel TH. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *Am J Cardiol* 1996; 28: 964–971
- Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD). *Am J Cardiol* 1996; 27: 1201–1206
- Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, Mabuchi N, Sawaki M, Kinoshita M. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of Interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1998; 31: 391–398
- van Veldhuisen DJ, Linssen GCM, Jaarsma T, van Gilst WH, Hoes AW, Tijssen JGP, Paulus WJ, Voors AA, Hillege HL. B-type natriuretic peptide and prognosis in heart failure patients with preserved and reduced ejection fraction. *Am J Cardiol* 2013; 61: 1498–1506
- Walston A, Rembert JC, Fedor JM, Greenfield JC. Regional myocardial blood flow after sudden aortic constriction in awake dogs. *Circ Res* 1978; 42: 419–425

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 TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T, Wolf PA, Vasan RS. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2004; 350: 655–663

Witthaut R, Busch C, Fraunberger P, Walli A, Seidel D, Pilz G, Stuttmann R, Speichermann N, Verner L, Werdan K. Plasma atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide are increased in septic shock: impact of interleukin-6 and sepsis-associated left ventricular dysfunction. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1696–1702

Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* 1992; 36: 983–997

Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, Drazner MH, Fonarow GC, Geraci SA, Horwich T, Januzzi JL, Johnson MR, Kasper EK, Levy WC, Masoudi FA, McBride PE, McMurray JJV, Mitchell JE, Peterson PN, Riegel B, Sam F, Stevenson LW, Tang WHW, Tsai EJ, Wilkoff BL. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 2013; 128: 1810–1852

Yang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998; 395: 284–288

Yi A-K, Yoon H, Park J-E, Kim B-S, Kim HJ, Martinez-Hernandez A. CpG DNA-mediated induction of acute liver injury in D-galactosamine-sensitized mice: the mitochondrial apoptotic pathway-dependent death of hepatocytes. *J Biol Chem* 2006; 281: 15001–15012

Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Jougasaki M, Mukoyama M, Nakao K, Imura H. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1993; 87: 464–469

Yucel T, Memiř D, Karamanlioglu B, Süt N, Yuksel M. The prognostic value of atrial and brain natriuretic peptides, troponin I and C-reactive protein in patients with sepsis. *Exp Clin Cardiol* 2008; 13: 183–188

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Rainer Meyer bedanken, der mich über all die Jahre und zuletzt bereits in seinem Ruhestand mit viel Expertise und Geduld durch den Schaffensprozess dieser Arbeit hervorragend begleitet hat.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Georg Baumgarten für die Überlassung des Themas und Ermöglichung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Heidi Ehrentraut, die mich in all den Jahren nie aufgegeben und mich immer wieder kontaktiert hat, um mich zu animieren und zu motivieren.

Ferner danke ich den damaligen Doktoranden und wissenschaftlichen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe am Physiologischen Institut II der Universität Bonn, die mich in OP- und Messverfahren eingewiesen und mir während meiner Versuche mit fachlichen Hinweisen und moralischer Unterstützung zur Seite gestanden haben. Dies gilt auch und insbesondere für das Team um Hanne Bock, die ich jederzeit um Rat fragen konnte.

Dank gebührt auch meinen lieben Kollegen Paula, Stephan und Nils, die mich durch kritische Nachfragen zum Schreibprozess stets auf Trab gehalten haben und die mir selbst mit gutem Beispiel vorangegangen sind.

Vielen Dank auch an meine Freundin Inga, die mir ihren professionellen Blick zur Korrektur dieser Arbeit geschenkt hat.

Meiner Frau danke ich dafür, dass sie mir ein mutiges Vorbild war und dass sie immer an mich geglaubt hat. Meinen Kindern danke ich dafür, dass sie tagsüber eine wundervolle Ablenkung und nachts mein unermüdlicher Antrieb waren.

Meinen Eltern danke ich für ihre liebevolle Erziehung und ihren moralischen Kompass, die mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin.

Jeder der oben genannten hat einen entscheidenden Anteil an dieser Arbeit, ohne den diese wahrscheinlich nie fertig gestellt worden wäre.