

Bedeutung des Inflammasoms für das kardiale Remodelling nach Ischämie/Reperfusion am murinen Modell

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Robert Alexander Gadow

aus Neuss

2022

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Lars Gero Eichhorn
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Hartmut Vatter

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.03.2022

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Mark Coburn

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	12
1.1. Häufigkeit von Herz-/Kreislaufkrankungen	12
1.1.1. Koronare Herzkrankheit (KHK) und Atherosklerose	13
1.1.2. Koronardurchblutung und koronare Flussreserve	14
1.2. Der akute Myokardinfarkt	15
1.2.1. Einteilung des Herzinfarktes	16
1.2.2. Therapie des Herzinfarktes	16
1.3. Zelluläre Pathophysiologie des Myokardinfarkt	17
1.3.1. Auswirkung auf die Hämodynamik	17
1.3.2. Auswirkung auf Metabolite und Ionenkonzentrationen des Herzens	18
1.3.3. Histopathologische Auswirkungen	19
1.4. Reperfusionsschaden	20
1.4.1. Strategien zur Minimierung des Reperfusionsschadens	21
1.5. Rolle der Inflammation	22
1.5.1. Rolle von NF- κ B, Interleukinen und Chemokinen	23
1.5.2. Zelluläre Immunantwort	25
1.6. Das Inflammasom	27
1.6.1. Das NLRP3-Inflammasom	27
1.6.2. Das AIM2-Inflammasom	30
1.6.3. cGAS/STING-Signalweg	31
1.7. A151 Oligodeoxynukleotid	32
1.8. Übersetzung in das Kleintiermodell	34
1.9. Ansatz des Projektes und Fragestellung	35
2. Material und Methoden	36
2.1. Methodischer Ansatz zur Beantwortung der Fragestellung	36
2.2. Versuchstiere und Haltungsbedingungen	37
2.3. Versuchsprotokolle und tierchirurgische Operationen	37

2.3.1.	Versuchsgruppen	39
2.3.2.	Closed-Chest Modell	41
2.3.3.	Myokardiale Ischämie	44
2.4.	<i>Messung der Herzfunktion mit dem Leitfähigkeits-Millar-Katheter</i>	45
2.4.1.	Prinzip des Leitfähigkeitskatheters	46
2.4.2.	Narkose, Wiegen und Relaxation	47
2.4.3.	Katheterisierung des linken Ventrikels	47
2.4.4.	Saline Kalibrierung zur Ermittlung der parallelen Konduktanz	48
2.4.5.	RVU-Küvetten-Kalibrierung	49
2.4.6.	Aufzeichnung hämodynamischer Daten	49
2.4.7.	Entnahme und Aufbereitung der Mäuseherzen	50
2.5.	<i>Ausschlusskriterien</i>	50
2.6.	<i>Histologische Techniken</i>	51
2.6.1.	Fixierung zur histologischen Auswertung	51
2.6.2.	Schnittanfertigung	52
2.6.3.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	52
2.6.4.	Auswahl der histologischen Präparate; Höhenbestimmung am H&E Schnitt	53
2.6.5.	Sirius-Rot-Färbung	54
2.6.6.	α -SMAc Färbung	54
2.6.7.	Auswertung der histologischen Untersuchung	55
2.7.	<i>Statistik</i>	56
2.8.	<i>Materialien und Geräte</i>	57
2.8.1.	Allgemeine Laborgeräte	57
2.8.2.	Verbrauchsmaterialien & Chemikalien	58
3.	Ergebnisse	59
3.1.	<i>Effekte von STING^{-/-} auf kardiale Funktion und Narbenbildung im Vergleich zu WT-Mäusen</i>	59
3.1.1.	Narbenbildung in STING ^{-/-} vs. WT	59
3.1.2.	Ejektionsfraktion & Cardiac Index bei STING ^{-/-} vs. WT	62
3.2.	<i>Narbenbildung in TLR9^{-/-} Tieren nach Präkonditionierung mit A151</i>	64
3.3.	<i>Narbenbildung nach Präkonditionierung sowie therapeutischer Gabe mit A151</i>	65
3.4.	<i>Cardiac Index in TLR9^{-/-} Tieren nach präkonditionierender Applikation von A151</i>	66
3.5.	<i>Cardiac Index nach Präkonditionierung sowie therapeutischer Gabe mit A151</i>	67

4. Diskussion	68
4.1. <i>Rolle des STING Signalwegs bei MI</i>	69
4.2. <i>Rolle der A151 ODN Therapie</i>	70
4.3. <i>Klinische Anwendbarkeit</i>	72
4.4. <i>Schlussfolgerung und Ausblick</i>	73
5. Zusammenfassung	74
6. Abbildungsverzeichnis	76
7. Tabellenverzeichnis	77
8. Literaturverzeichnis	78
9. Danksagung	102

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACB	Aortokoronare Koronarbypassoperation
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AHA	<i>American Heart Association</i>
AIF	<i>Apoptosis-Inducing Factor</i>
AIM2	<i>Absent In Melanoma 2</i>
AP	Angina Pectoris
ASC	<i>Apoptosis-associated Speck like protein containing a Caspase recruitment domain</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	<i>bcl-2-associated K protein</i>
BAX	<i>bcl-2-associated X protein</i>
bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CABG	Koronarer Bypass (<i>Coronary Artery Bypass Graft</i>)
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand 2</i>
CCR2	<i>Chemokine Receptor Type 2</i>
CDN	Cyclische Dinukleotide
cGAS	Cyclische GMP-AMP-Synthase
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CI	<i>Cardiac Index</i>
CLR	<i>C-type Lectin Receptors</i>
CO	<i>Cardiac Output</i>
cTn	Kardiales Troponin (<i>Cardiac Troponin</i>)
CXC	CXC Chemokine
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DE	Deutschland
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HMGB1	<i>High-Mobility-Group-Protein B1</i>
HSI	<i>Hue Saturation Intensity</i>
HSP	Hitze-Schock-Proteine
HZV	Herzzeitvolumen
IAP	Instabile Angina Pectoris
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten der WHO
ICR	Interkostalraum
IFNAR	Typ-1-Interferon-Rezeptor
IL	Interleukin
iNOS	Makrophagenständige NO-Synthase
IRF3	Interferon-Regulationsfaktor 3
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
LRR	<i>Leucin Rich Repeats</i>
M.	Musculus
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrix-Metalloproteasen
mPTP	<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>
NBD	<i>Nucleotide Binding oligomerization Domain</i>
NEK7	<i>NIMA-related Kinase 7</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor - κB</i>
NLR	<i>Nod-Like Receptor</i>

NLRP3	<i>NLR family pyrin domain containing 3</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	<i>Nucleotide binding Oligomerization Domain</i>
NOMI	<i>Non-Occlusion Myocardial Infarction</i>
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken-Elevationsinfarkt
ODN	Oligodeoxynukleotide
OMI	<i>Occlusion Myocardial Infarction</i>
OMM	äußere Mitochondrienmembran
OP	Operation
ORW	oberer Referenzwert
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Solution, pH 7,4 (Gibco)</i>
PCI	Perkutane Koronarintervention
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PYD	Pyrin-Domäne
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
RGB	Rot Grün Blau
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RLR	<i>RIG-I-Like RNA helicases</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale bzw. <i>Reactive Oxygen Species</i>
RVU	<i>Relative Volume Unit</i> – Kalibrierungseinheit des Linksherzkatheters
SR	Sirius Rot
SpR	sarkoplasmatisches Retikulum
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 1</i>
STAT4	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 4</i>
STAT6	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 6</i>
STEMI	ST-Strecken-Elevationsinfarkt
STING	<i>STimulator of INterferon Genes</i>
TBK1	<i>TANK-Binding Kinase 1</i>
TLR	<i>Toll-Like Rezeptor</i>

TNF-α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
TVA	Tierversuchsantrag
WBST	Wandbewegungsstörungen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
WT	Wildtyp
α-SMAc	<i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i>

1. Einleitung

1.1. Häufigkeit von Herz-/Kreislaufkrankungen

Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems sind laut Statistischem Bundesamt die mit Abstand häufigste Todesursache in Deutschland („Statistisches Bundesamt“, 2021). Im Jahr 2019 starben 331.211 Menschen an einer Herz-/Kreislaufkrankung, was einem Anteil von etwa 35% entspricht. Auch volkswirtschaftlich spielen Erkrankungen des kardiovaskulären Systems eine große Rolle. Im Jahr 2015 entfiel mit 13,7% bzw. 46,4 Milliarden EUR der größte Anteil der Krankheitskosten in Deutschland auf den Formenkreis der Herz-/Kreislaufkrankungen (ICD I00 bis ICD I99) („Krankheitskosten in Mio. EUR für Deutschland“, 2019).

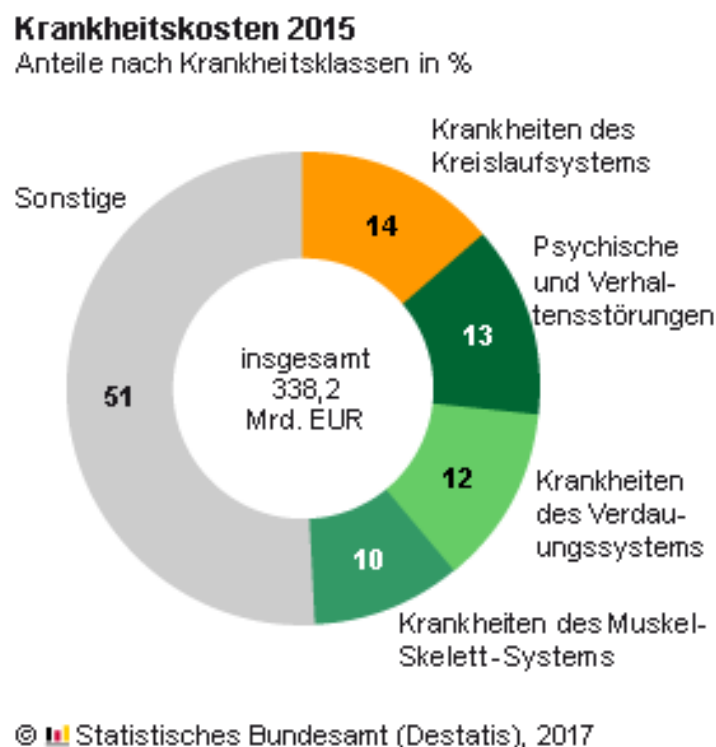


Abb. 1 Krankheitskosten 2015 – Anteile nach Krankheitsklassen in % („Krankheitskosten Statistisches Bundesamt“, 2017)

Neben den direkten Kosten im Gesundheitswesen führen Herz-/Kreislaufkrankungen auch langfristig zu hohen indirekten sozioökonomischen Kosten. Diese setzen sich zusammen aus Arbeitsausfall bzw. frühzeitigem Renteneintritt infolge kurzfristiger oder andauernder Arbeitsunfähigkeit, Invalidität oder Tod. Volkswirtschaftlich kommt es hier

auf verschiedenen Ebenen zu Schaden. Es entstehen Produktivitätsausfälle sowie Beitragsverluste auf Ebene der Sozialversicherungen. Ökonomische Berechnungen gehen sogar davon aus, dass die direkten Krankheitskosten nur etwa zu 40% an den Gesamtkosten betragen (Klever-Deichert et al., 1999). Die Erforschung der pathophysiologischen Vorgänge von Herz-/Kreislaufkrankungen zur Verbesserung von Prävention, Therapie und Rehabilitation ist daher von essentieller Bedeutung, um diesen großen gesamtwirtschaftlichen Schaden zu reduzieren.

Der Begriff der Herz-/Kreislaufkrankungen bzw. der Kardiovaskulären Erkrankungen ist nicht einheitlich definiert und beschreibt eine große Bandbreite an Erkrankungen sowohl des Herzens als auch der Gefäße (Bauer, 2005). Diese Dissertation konzentriert sich hauptsächlich auf den Teilbereich der Ischämie und Reperfusion beim Myokardinfarkt (MI). Besonderes Augenmerk liegt dabei auf der immunologischen Auswirkung der intermittierenden Ischämie sowie dem daraus resultierenden Funktionsverlust. Ziel ist es, zu einem besseren Verständnis der Immunreaktion nach MI beizutragen, um deren aktive Beeinflussung mit dem Ziel eines Funktionserhalts in Zukunft zu fördern.

1.1.1. Koronare Herzkrankheit (KHK) und Atherosklerose

Die Atherosklerose bezeichnet eine degenerative Erkrankung der Gefäße, insbesondere am Herzen, die sich klinisch manifestieren kann. Die Koronare Herzkrankheit (KHK) beschreibt dementsprechend die klinisch relevante Manifestation der Atherosklerose an Arterien der Koronarversorgung (*NVL Chronische KHK, 5. Auflage Version 1, 2019*). Atherosklerose (umgangssprachlich: Arterienverkalkung) bezeichnet dabei die Ablagerung atherosklerotischer Plaques in und nicht wie oft fälschlich angenommen an der Gefäßwand (Libby et al., 2014). Mit einer Lebenszeitsprävalenz von 9,3% (95% KI 8,4; 10,3) bei 40-79-Jährigen (n = 5 901) ist die KHK von hoher Relevanz für das Gesundheitssystem. Die „*Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland*“ (*DEGS1*) hat gezeigt, dass die Lebenszeitprävalenz des Herzinfarkts in Deutschland bei 4,7% (95% KI 4,0; 5,5) und der KHK (exklusive Herzinfarkt) bei 8,0% (95% KI 7,2; 9,0) liegt. Die Geschlechtsunterschiede beim Herzinfarkt (Frauen 2,5%; Männer 7%) sowie bei der KHK (Frauen 6,4%; Männer 12,3) sind gravierend (Gößwald et al., 2013).

Es handelt sich bei der KHK um einen langsam voranschreitenden degenerativen Prozess, der mutmaßlich mit einer Dysfunktion endothelialer Zellen der Gefäßwand beginnt und mit der Ablagerung von Blutfetten, insbesondere Cholesterine, sowie chronischen Entzündungsreaktionen einhergeht. Dieser Prozess führt zu einer voranschreitenden Stenosierung der Gefäße. Aktuelle Therapiekonzepte zielen auf eine Verzögerung der adhären Plaques ab, da eine Beseitigung der krankheitsverursachenden Gefäßplaques aktuell nicht möglich ist. Die aktuelle Leitlinie der European Society of Cardiology (ESC) gibt als Therapieziel bei High-Risk-Patienten eine Reduktion des LDL um mindestens 50% auf Werte <70 mg/dL (1,8 mmol/L) an, bei Very-High-Risk-Patienten sogar auf unter 55 mg/dL (1,4 mmol/l) (Mach et al., 2020). Durch Prävention und verbesserte Behandlungsstrategien konnte die altersadjustierte Mortalität der KHK in den USA zwischen 1980 und 2000 um über 50% gesenkt werden (Ford et al., 2007). Trotz der Erfolge darin, die Plaqueprogression zu verzögern, bleibt die KHK weltweit die führende Todesursache (Lozano et al., 2012).

1.1.2. Koronardurchblutung und koronare Flussreserve

Bei Belastung steigt der Sauerstoffverbrauch des Herzen stark an. Die Sauerstoffextraktion des Myokards beträgt in Ruhe bereits 60-70 %, es verbleiben also kaum mehr als 30 % des angebotenen O_2 im venösen Koronarblut. Bei Belastung kann die Extraktion daher höchstens um 30 % steigen. Der erhöhte Sauerstoffbedarf muss folglich im Wesentlichen über eine Steigerung der koronaren Perfusion gedeckt werden, die physiologischerweise um mehr als das Fünffache gesteigert werden kann. Die Differenz zwischen basaler und maximaler Perfusion bezeichnet man als koronare Flussreserve.

Das Endothel kontrolliert physiologischerweise den Gefäßtonus, indem es die mechanische Spannung des Blutflusses wahrnimmt und auf diese mit der Produktion von vasoaktiven Substanzen reagiert. Es bildet unter anderem Stickstoffmonoxid (NO), das die Guanylatzyklase anregt, welche wiederum cGMP (Cyclisches Guanosinmonophosphat) produziert und zu einer Weitung des Gefäßes führt. NO hemmt außerdem das Wachstum der glatten Muskulatur, die Anhaftung von Thrombozyten und Immunzellen an der Gefäßwand und weitere histologische Umbauvorgänge. (Schmidt et al., 2011). Bei dysfunktionalen Endothelzellen kann der Gefäßtonus über den NO-

Signalweg nicht mehr adäquat reguliert werden, da ein NO-Mangel auftritt. Als Folge kommt es zu einer mangelnden Gefäßerweiterung unter Belastung und somit zu einem Minderangebot an Sauerstoff. Da der Volumenstrom durch ein Blutgefäß nach Hagen-Poiseuille exponentiell vom Radius des Gefäßes abhängt, haben schon kleinste Verringerungen des Innendurchmessers starke Auswirkungen auf die Flussrate und somit auf die Sauerstoffversorgung im Endstromgebiet. Liegt nun eine Verengung der Koronargefäße sowie ein Elastizitätsverlust und endotheliale Dysfunktion durch eine Atherosklerose vor, so kann die Koronardurchblutung bei starker körperlicher Anstrengung, psychischer Erregung oder schon in Ruhe insuffizient werden, was sich meistens durch dumpfe, einschnürende Schmerzen hinter dem Brustbein (retrosternal) zeigt. Dieser Symptomkomplex wird als Angina Pectoris bezeichnet. Ein akuter MI entsteht typischerweise durch die Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques. Die Ruptur führt sekundär zur Aktivierung der Blutgerinnung und zur Bildung eines Thrombus an der Plaqueoberfläche. Diese Thrombusbildung vermindert den Gefäßdurchmesser zusätzlich mit der Konsequenz einer Minderperfusion des nachgeschalteten Versorgungsareals. Die resultierende Gewebehypoxie führt schließlich zum Zelltod.

1.2. Der akute Myokardinfarkt

Ein akuter MI entsteht meist durch eine atherosklerotische Plaqueruptur oder ein thromboembolisches Ereignis und beschreibt einen akuten Verschluss einer oder mehrerer Koronararterien und führt somit zu einer myokardialen Ischämie. Diese ist definiert als Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und -nachfrage (Jennings, 1970), bei dem es zu anaerobem Stoffwechsel sowie insuffizientem Abtransport der Abfallmetaboliten des Myokards kommt (Verdouw et al., 1998). In den allermeisten Fällen beschränkt sich die Ischämie auf einen regionalen Bereich, da nur das nachgeschaltete Versorgungsgebiet der stenosierten Koronararterie betroffen ist. Durch das metabolische Ungleichgewicht verschiebt sich die aerobe Energiegewinnung der Myokardzellen hin zur anaeroben Energiegewinnung (Braasch Wolfgang et al., 1968; Liedtke et al., 1976), was zu einer Anhäufung von Laktat und einem pH-Abfall führt. Durch diese Vorgänge kommt es zu einer gestörten Membranfunktion, zu Verschiebungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen und Änderungen des Zellvolumens (Jennings et al., 1975). Ischämiezeiten von mehr als 20 Minuten führen zu nekrotischem Untergang des

Herzgewebes, was auch als Koagulationsnekrose bezeichnet wird (Jennings et al., 1960). Diese Nekroseform ist die häufigste und geht mit einer Zellschwellung, Denaturierung der zytoplasmatischen Proteine sowie einer Zersetzung der Zellbestandteile einher.

In Deutschland hatte der akute MI im Jahr 2019 eine altersstandardisierte (Alter 25 bis 84 Jahre) 28-Tage-Letalität von 50,2 % bei Männern und 57,1 % bei Frauen („Herzinfarkt Mortalität Morbidität und Letalität“, o. J.).

1.2.1. Einteilung des Herzinfarktes

Für die klinische Tätigkeit spielt die Einteilung des Herzinfarktes nach Genese, wie es die aktuelle Leitlinie (2018) der ESC vorsieht, eher eine untergeordnete Rolle (Thygesen et al., 2019). Für eine Therapieentscheidung ist zumeist die Unterteilung in einen ST-Strecken-Elevationsinfarkt (STEMI) und einen Nicht-ST-Strecken-Elevationsinfarkt (NSTEMI) ausschlaggebend (Núñez-Gil et al., 2019; Roffi et al., 2016). Typischerweise werden sowohl Patienten mit STEMI, NSTEMI und instabiler Angina Pectoris (IAP), also infarkttypischer Symptomatik für mindestens 20 Minuten ohne elektrokardiographische bzw. serologische Hinweise eines MI, unter dem Sammelbegriff Akutes Koronarsyndrom (ACS) zusammengefasst.

Aktuell gibt es Tendenzen dazu, von der klassischen Einteilung in STEMI und NSTEMI abzuweichen und den Fokus darauf zu legen, ob eine akute koronare Okklusion vorliegt, die von einer unverzüglichen interventionellen Therapie profitiert. Man spricht von einer Occlusion Myocardial Infarction (OMI) bzw. einer Non-Occlusion Myocardial Infarction (NOMI). Der Grund für diesen neuartigen Ansatz liegt darin, dass der aktuelle Standard der STEMI/NSTEMI Einteilung einen zu hohen Fokus auf die ST-Strecke legt und dadurch regelmäßig Patienten mit therapiebedürftigen Okklusionen nicht behandelt werden oder aber Patienten ohne Interventionsbedarf einer PCI unterzogen werden, die von dieser therapeutisch nicht profitieren. Der Anteil wird auf 25 – 30 % der NSTEMI Patienten beziffert (Wang et al., 2009).

1.2.2. Therapie des Herzinfarktes

Zentrales Element der Behandlungsstrategie beim Koronarverschluss ist die schnellstmögliche Wiederherstellung einer adäquaten Blutversorgung des

nachgeschalteten ischämischen Myokards. Diese wird nach der aktuellen Leitlinie der ESC und der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) bevorzugt in Form einer primären perkutanen Koronarintervention (PCI) vorgenommen, sofern diese innerhalb von 12 Stunden nach Symptombeginn bzw. 120 Minuten ab Stellung der STEMI-Diagnose durchgeführt werden kann (DGK und ESC, 2018). Eine primäre Lysetherapie kommt in Deutschland aufgrund der flächendeckenden Versorgung mit Herzkathetern immer seltener zum Einsatz. Beim NSTEMI wird nach Leitlinie der ESC die Indikation zur PCI oder ACB-Operation von verschiedenen Faktoren abhängig gemacht, z.B. einem relevanten cTn-Anstieg oder Abfall, dynamischen EKG-Veränderungen, vorhandenen Begleiterkrankungen oder einer eingeschränkten Pumpfunktion des Herzens (Roffi et al., 2016).

Insgesamt steht die möglichst schnelle Reperfusion durch Wiedereröffnung des Gefäßes nach akutem MI im Fokus der verschiedenen Therapieansätze. Dabei lassen sich positive Effekte wie eine geringere Mortalität und eine verminderte Infarktgröße bei Rekanalisation noch bis vier Stunden nach Verschluss nachweisen (Sheehan et al., 1988). Paradoxerweise wird durch die Wiederherstellung der Koronarperfusion die primäre Gewebsverletzung, die durch die Minderperfusion entstanden ist, zunächst sogar verstärkt (Jennings et al., 1960). Dieses Phänomen wird als Reperfusionsschaden bezeichnet.

1.3. Zelluläre Pathophysiologie des Myokardinfarkt

1.3.1. Auswirkung auf die Hämodynamik

Die Myokardischämie ist die Konsequenz eines Ungleichgewichtes zwischen Sauerstoff-Angebot und -Nachfrage (Jennings, 1970). Obwohl die ursächlichen atherosklerotischen Plaques mit der Zeit wachsen und akkumulieren, führen sie selbst bei hochgradigen Stenosen in Ruhe meist nicht zu einer Reduktion des Blutflusses. Sie bewirken aber, dass bei erhöhtem kardialen Sauerstoffbedarf, beispielsweise durch Belastung oder durch eine Tachyarrhythmie, das Sauerstoffangebot nicht ausreichend gesteigert werden kann (siehe dazu 1.1.2.). Dies führt zur Myokardischämie und dem Symptomkomplex der Angina Pectoris. Kommt es also durch eine Okklusion zu einer Unterbrechung des Blutflusses, wird eine Kaskade an Prozessen ausgelöst, die in einen zellulären Schaden bis hin zum Zelltod (bezeichnet als „*acute ischemic injury*“) mündet. Anfangs sind diese

Schäden noch reversibel und eine Reperfusion führt zu einer vollständigen Erholung. Wenn die Ischämie aber länger als 15 – 20 Minuten anhält, werden die Schäden jedoch irreversibel und es kommt zum Zelltod (Bolli und Marbán, 1999; Sack, 2006).

1.3.2. Auswirkung auf Metabolite und Ionenkonzentrationen des Herzens

Eine Myokardischämie führt zu einem abrupten Wechsel der Energiegewinnung. Um weiter Adenosintriphosphat (ATP) zu generieren, wechseln Herzmuskelzellen von einer oxidativen Phosphorylierung hin zu alternativen, anaeroben Stoffwechselwegen (Braasch Wolfgang et al., 1968; Liedtke et al., 1976).

Sie verbrauchen ihre hochenergetischen Kreatinphosphatreserven, die ihnen theoretisch über einige Minuten erlauben trotz Ischämie die Kontraktilität aufrecht zu erhalten. (Braasch Wolfgang et al., 1968). Ohne ihre verzehrten Energiereserven können die Kardiomyozyten ihre Homöostase nicht aufrechterhalten und sterben ab.

Die metabolischen Effekte der Myokardischämie führen zu Störungen in den intra- und extrazellulären Ionenkonzentrationen, was grundlegende elektrophysiologische Konsequenzen mit sich zieht (Carmeliet, 1999). Der Abfall des intra- und extrazellulären pH, der durch die anaeroben Prozesse und den mangelnden Abtransport der Metaboliten verursacht wird, inhibiert zudem eine Vielzahl der Ionenkanäle und führt zu einem Abfall des Ruhepotentials, zu einer Verlängerung des Aktionspotentials und zu einer verfrühten Nachdepolarisation (Coraboeuf et al., 1980). Das erhöhte intrazelluläre Na^+ triggert eine Depolarisation der Herzmuskelzelle, durch die es zu einem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} kommt. Der $\text{Na}^2+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter funktioniert bei einem starken Anstieg des intrazellulären Na^+ in entgegengesetzter Richtung und befördert Ca^{2+} in die Zelle. Dieser „reverse mode“ sowie die vermehrte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SpR) im Rahmen von Aktionspotenzialen (Garciaarena et al., 2013) führen zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} (Avkiran, 2001). Durch die Erhöhung des intrazellulären Calciums wird die sarkoplasmatische Calciumpumpe stimuliert (Swietach et al., 2015). Durch konsekutive Ca^{2+} -Überladung des SpR kommt es zur spontanen Freisetzung von Calcium, was zu spontanen pro-arrhythmogenen Aktionspotenzialen führt (Cheng et al., 1996; Janse und Wit, 1989). Sekundär kommt es auch zu einem Anstieg des mitochondrialen Ca^{2+} (Bernardi und Rasola, 2007). Metabolische Veränderungen führen somit zu einer pro-arrhythmogenen Situation.

1.3.3. Histopathologische Auswirkungen

Alle beschriebenen Prozesse führen zu einer massiven Störung der Myozytenphysiologie und -architektur. Durch die oben beschriebene metabolische Ausnahmesituation kommt es schon nach wenigen Minuten zu ultrastrukturellen Veränderungen.

Die frühesten lichtmikroskopischen Zeichen einer Nekrose lassen sich nach Okklusion bereits nach ungefähr 3 Stunden im Infarktgebiet nachweisen. Die Literatur beschreibt Karyolysen (Auflösung des Zellkerns durch Abbau der DNA mittels Desoxyribonukleasen), Myozytolyse (Auflösen von Muskelzellen) und eine Hypereosinophilie. Außerdem zeigt sich regelhaft ein interstitielles Ödem (Bragadeesh et al., 2008; Eichbaum, 1975; Klöner et al., 1974).

Im Allgemeinen kann der Zelltod auf zwei mechanistische und morphologisch unterschiedliche Weisen ablaufen:

- 1) **Apoptose** als programmierter Zelltod mit Zellschrumpfung, Fragmentierung in Apoptosekörperchen und deren Abbau durch Phagozyten
- 2) **Nekrose** als unregulierter Prozess mit Zellschwellung und Membranpermeabilitätsstörungen

Apoptose führt zu einem vollständigen Abbau der toten Zellen ohne Aktivierung einer inflammatorischen Reaktion. Nekrose hingegen verursacht die Freisetzung von Botenstoffen, die eine Inflammation triggern. Neuere Erkenntnisse deuten allerdings darauf hin, dass unter bestimmten Konstellationen auch beide Zelltodformen nebeneinander anzutreffen sind (Konstantinidis et al., 2012; Nicotera und Melino, 2004). Der MI stellt eines der bekannten Beispiele dar, bei dem beide Formen des Zelltodes in relevanter Weise ablaufen. Zum Zeitpunkt der Ischämie dominiert die Nekrose. Ab der Reperfusion werden pro-apoptotische Signalwege aktiviert und es dominiert ein eher apoptotisches Zellsterben (Gottlieb, 2011; Gottlieb et al., 1994).

Die Apoptose scheint dabei über mindestens zwei verschiedene Mechanismen aktiviert zu werden. Am besten verstanden sind der intrinsische Signalweg, der über mitochondriale Signale vermittelt wird, sowie der extrinsische Signalweg, vermittelt über die Bindung von extrazellulären „*death ligands*“ an membranassoziierte „*death receptors*“ (Ong und Gustafsson, 2012).

Von der Apoptose abzugrenzen ist die Nekrose. Die Nekrose ist durch die Öffnung der „*mitochondrial permeability transition pore*“ (mPTP), einer Pore in der inneren Mitochondrienmembran, charakterisiert. Diese Öffnung wird durch einen Ca^{2+} Einfluss in die Mitochondrien getriggert. Sie führt einerseits zum abruptem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und sequenziellem Abbruch der ATP-Synthese, andererseits zum Wassereintritt in die mitochondriale Matrix mit resultierender Zellschwellung. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials verhindert den Transport wichtiger Ionen (abgesehen von H^+) und Metaboliten wie Zucker für den Energiehaushalt der Zelle und führt daher zum Abbruch der Energieproduktion in Form von ATP und ultimativ zum Zelltod. Gleichzeitig kann ein unkontrollierter Wassereinstrom in die Mitochondrien eine Ruptur der Mitochondrienmembran verursachen, die wiederum in einer Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren und Caspasenaktivierung resultiert (Baines et al., 2005).

1.4. Reperfusionsschaden

In Deutschland steht die möglichst schnelle Reperfusion durch Wiedereröffnung des okkludierten Gefäßes nach akutem MI im Fokus der verschiedenen Therapieansätze. Der finale myokardiale Schaden im Rahmen eines akuten MI ist das Ergebnis eines Zusammenspiels aus Ischämie und dem bereits erwähnten Reperfusionsschaden. Der Reperfusionsschaden bezeichnet myokardiale, vaskuläre oder elektrophysiologische Dysfunktionen die durch die Reperfusion von ischämischem Gewebe entstehen. Paradoxerweise führt die Wiederherstellung des Blutflusses zu einem zusätzlichen Schaden und Komplikationen (Sheehan et al., 1988; Simoons et al., 1986; White et al., 1987). Man schätzt, dass der Reperfusionsschaden für bis zu 50% des finalen Myokardschadens verantwortlich ist (Hausenloy et al., 2013).

Anfangs sind ischämische Schäden reversibel. Hält die Anoxie jedoch länger an, wird der Schaden irreversibel und die Zellen sterben ab. Bevor ischämische Kardiomyozyten jedoch sterben, sind sie für eine gewisse Zeitperiode vulnerabel für weitere schädliche, reperfusionsbedingte Effekte. Hierzu zählen mikrovaskuläre Obstruktionen, die durch die Rekanalisation nicht reperfundiert werden und einen reduzierten distalen Fluss verursachen können. Sie können durch Mikroembolien aus Plaques, neue Thrombenbildung, externe Kompression durch das entstehende interstitielle Ödem oder

auch durch reflektorische Vasokonstriktion entstehen. Diese mikrovaskuläre Dysfunktion wird auch als „No-reflow“-Phänomen bezeichnet und beschreibt die Beeinträchtigung des Blutflusses im Stromgebiet hinter der Obstruktion (Hoffmann et al., 2003). Auch lokale Inflammation und das entstehende interstitielle wie intrazelluläre Ödem zählen zu diesen schädlichen reperfusionsbedingten Effekten (Fernández-Jiménez et al., 2015). Die Reperfusion des kardialen Endstromgebietes ist aber essentiell, um eine volle Regeneration des ischämischen Gewebes zu ermöglichen (Iliceto et al., 1996).

Die Wiederherstellung des Blutflusses führt außerdem zu einer Hyperkontraktilität der Kardiomyozyten durch die erhöhte intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration in Kombination mit einem abrupt normalisierten pH-Milieu und einem physiologischen Sauerstoff- und Energieangebot (Meissner und Morgan, 1995). Es werden schon Minuten nach der Reperfusion ROS im ischämischen Gewebe produziert, die direkt Kardiomyozyten schädigen, indem sie Membranproteine und Phospholipide verändern oder aber die bereits beschriebene inflammatorische Kaskade auslösen (Toyokuni, 1999).

Stimuliert durch Zytokin- und Komplementsekretion durch beschädigtes Myokard (Vinten-Johansen, 2004) kommt es zu einer Leukozytenaggregation. Auch plasmamembranständige Phospholipase A produziert vermehrt Arachidonsäure, einen wichtigen inflammatorischen Mediator, der Neutrophile stimuliert. Auslöser für die Aktivierung des Komplementsystems ist die Reperfusion. Ein großer Anteil des Reperfusionsschadens ist auf die komplexen Entzündungsvorgänge die sowohl vor als auch nach der Reperfusion im Myokard ablaufen zurückzuführen.

1.4.1. Strategien zur Minimierung des Reperfusionsschadens

Da die wichtigste Behandlungsstrategie bei MI, die Reperfusionstherapie, wie zuvor beschrieben, selbst in erheblichem Maß zur Schädigung des Myokards beiträgt (Yellon und Hausenloy, 2007), wurde bereits intensiv an Strategien zur Minderung des Reperfusionsschadens geforscht und sie erlangen zunehmend an Bedeutung. Grundsätzlich werden hier zwei unterschiedliche Ansätze, die den Reperfusionsschaden vermindern sollen, unterschieden: Präkonditionierung und Postkonditionierung

Die Präkonditionierung bezeichnet eine mechanische oder pharmakologische Intervention, die zeitlich gesehen vor dem eigentlichen Ischämieereignis appliziert wird. Postkonditionierung meint eine mechanische oder pharmakologische Intervention, die zeitlich gesehen unmittelbar vor oder nach der Reperfusionstherapie, aber nach dem Ischämieereignis angewandt wird.

Die Präkonditionierung konnte sich bereits in der klinischen Anwendung bewähren, ist bisher aber nur bei geplanten Interventionen oder Operationen von Relevanz, nicht aber für akute Ischämieereignisse. Beide Strategie nutzen dieselben protektiv wirkenden Signalwege (Hausenloy et al., 2013).

1.5. Rolle der Inflammation

Durch den Zelluntergang der Myokardzellen werden proinflammatorische Stoffe wie „*Damage-Associated Molecular Patterns*“ (DAMP) frei und aktivieren Toll-Like Rezeptoren (TLR), den „*Receptor for Advanced Glycation End-products*“ (RAGE) und IL-Rezeptoren. Zu den DAMPs zählen HMGB1 (Ghigo et al., 2014), die S100-Proteine (Volz et al., 2012), Interleukin (IL)-1 α (Lugrin et al., 2015), ATP, extrazelluläre DNA bzw. RNA und Hitze-Schock-Proteine (HSP) (Jin et al., 2014). Die Aktivierung dieser Rezeptoren lockt neutrophile Granulozyten an und triggert somit eine Inflammation (Jennings Robert B., 2013; Lindsey et al., 2002). TLRs gehören zu den sogenannten Pattern Recognition Receptors (PRR), die der angeborenen Immunabwehr angehören und zur Erkennung von Pathogenen dienen. Sie erkennen die Pathogene anhand hochkonservierter, speziesspezifischer Muster, die als *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP) bezeichnet werden. Zu den PRRs gehören mindestens die vier Subtypen der *Toll-like Rezeptoren* (TLRs), die *Nod-like receptor*-Familie (NLRs), die *RIG-I-like RNA helicases* (RLRs) und die *C-type lectin receptors* (CLRs). Bis heute ist TLR9, ein Mitglied der TLR-Familie, der einzige identifizierte endosomale DNA-Sensor (Hemmi et al., 2000).

Neben der Aktivierung des Immunsystems durch DAMPs und PAMPs kommt es bei Ischämie zusätzlich zu einem Anstau von reaktiven Sauerstoffradikale (ROS), die sonst im gesunden Herzen durch inhibitorische Enzymkaskaden und intrazelluläre Antioxidantien ausgeglichen werden. Im Rahmen der Ischämie sind die antioxidativen Mechanismen jedoch geschädigt, was einen relativen ROS-Überschuss bedingt. ROS

aktiviert auch das Komplementsystem, indem es P-Selektin exprimiert. Durch die Aktivierung des „*nuclear factor*“ (NF)- κ B Systems (Hensley et al., 2000) wird zudem die Zytokin- und Chemokinsynthese hoch reguliert.

Ein weiterer ROS-Effekt ist die Öffnung der mPTP und somit die Freisetzung proapoptotischer Moleküle (Gibson et al., 2016).

1.5.1. Rolle von NF- κ B, Interleukinen und Chemokinen

Die oben beschriebenen TLR-, RAGE und IL-Rezeptoren sowie die ROS aktivieren das NF- κ B System, welches eine Vielzahl an Genen reguliert, die für Inflammation, Zelladhäsion, Zellüberleben und Wachstumskontrolle relevant sind (Lenardo und Baltimore, 1989; Stancovski und Baltimore, 1997). Loss-of-function Studien haben gezeigt, dass das NF- κ B System beim MI sowohl schädliche als auch nützliche Prozesse aktiviert. Das NF- κ B System aktiviert eine Vielzahl parallel ablaufender Prozesse am infarzierten Herzen, die sowohl eine wichtige Rolle bei Reparaturprozessen als auch bei schädlichen Prozessen spielen (Gordon et al., 2011). Durch das NF- κ B System werden proinflammatorische Zytokine, Proteine, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen regulieren, induziert (Christia et al., 2013; Dewald et al., 2004). Hier ist vor allem die Interleukin(IL)-1 Familie, der Tumor Nekrose Faktor (TNF- α) und die Interleukin(IL)-6 Familie zu nennen. Hohe Parameter dieser Zytokine sind ein positiver Prädiktor für ein schlechtes Outcome bei MI (Fang et al., 2015).

1.5.1.1. Interleukine

IL-1 wird von Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet und induziert endotheliale Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin, an welche Leukozyten aus dem Blutstrom binden können. Auf diesem Weg stimuliert IL-1 die Leukozytenmigration in das beschädigte Gewebe. IL-1 ist ein essentieller Moderator in der Aktivierung der inflammatorischen Kaskade, die auf einen MI folgt und ist relevant für die Pathogenese des Reperfusionsschaden bzw. des kardialen Remodelling.

IL-1 α und IL-1 β sind die ältesten bekannten Proteine der IL-1 Familie. Mittlerweile sind 11 Liganden bekannt, von denen die meisten proinflammatorisch wirken. IL-1 bleibt aber bis heute das Model für die Mediation der Inflammation (Dinarello, 2011a).

IL-1 α ist ein „*dual-function*“ Zytokin, was bedeutet, dass es sowohl im Nukleus die Transkription von Proteinen beeinflusst als auch im klassischen Sinn extrazellulär über Rezeptoren, insbesondere den IL-1-Rezeptor-1, wirkt. Es wird als Vorläuferprotein synthetisiert und im Zytoplasma eingelagert. Schon seine Vorläuferform fungiert als DAMP und kann somit die inflammatorische Kaskade auslösen, wenn sie aus dem Zytoplasma frei wird. IL-1 α stimuliert daher über die oben beschriebenen Mechanismen des NF- κ B Systems die Transkription und Sekretion von IL-1 β und IL-18 aus Monozyten. Die Ausschüttung von IL-1 β in beschädigtem Gewebe erfordert die Bildung sogenannter Inflammasome. Diese sind zytoplasmatische Multiproteinkomplexe, die als molekulare Plattformen über Enzymkaskaden zur Freisetzung von aktivem IL-1 β führen (Schroder und Tschopp, 2010). Studien zeigen, dass die IL-1 β Synthese nach MI in Leukozyten, Fibroblasten und Gefäßzellen, aber auch in Kardiomyozyten hochreguliert wird (Christia et al., 2013; Dewald et al., 2004). IL-1 β als ein Torwächter der Inflammation kann als früher Marker für die inflammatorische Antwort am Herzen nach MI dienen (Dinarello, 2011b). Erhöhte Plasmalevel von IL-1 β sind hochgradig mit beeinträchtigter Myokardfunktion und linksventrikulärer Hypertrophie nach Reperfusion assoziiert worden (Dinarello, 2011, S. Dina). Aufgrund der wichtigen Rolle von IL-1 scheint es vielversprechend, die IL-1 Signalkaskade als Therapieziel für Patienten mit MI anzusehen (Saxena et al., 2016).

1.5.1.2. Chemokine

Neben den genannten Zytokinen werden auch sogenannte Chemokine, chemotaktisch aktive Zytokine, sezerniert und spielen eine Rolle in der Rekrutierung verschiedener Leukozyten (Frangogiannis, 2007). Zwei Gruppen gilt es hier hervorzuheben. Zum einen die CC Chemokine, die potente Monozyten-Aktivatoren sind und diese im Infarktgebiet rekrutieren, beispielsweise das „*monocyte chemoattractant protein*“ (MCP)-1/CCL2 (Dewald et al., 2005). Zum anderen die CXC Chemokine wie CXCL8/IL-8, die eine „ELR“ (Glu-Leu-Arg) Tripeptidsequenz enthalten und als potente Neutrophilen-Aktivatoren fungieren (Ivey et al., 1995). ELR-negative CXC Chemokine wie CXCL10 scheinen hingegen Neutrophile nicht zu beeinflussen, sondern Lymphozyten zu rekrutieren, die dann antifibrotische und angiostatische Effekte haben.

1.5.2. Zelluläre Immunantwort

Die Aktivierung der Inflammation nach MI wurde für viele unterschiedliche Zellen des Herzens beschrieben, die während der postischämischen Inflammation mit den migrierenden Immunzellen interagieren. Die untergehenden Kardiomyozyten liefern den hauptsächlichsten inflammatorischen Trigger für die Aktivierung der Gefäß- und Immunzellen und der Fibroblasten. Aber nicht nur die untergehenden Zellen, sondern auch intakte Kardiomyozyten nehmen während der Inflammation an der Synthese von Zytokinen teil (Gwechenberger et al., 1999). Die zahlreichen Fibroblasten werden in den ersten Stunden der Inflammation aktiviert und aktivieren ihrerseits das Inflammasom und produzieren somit aktives IL-1 β und andere proinflammatorische Zytokine sowie Chemokine (Kawaguchi Masanori et al., 2011; Lafontant et al., 2006).

DAMPs aktivieren Endothelzellen und exprimieren Adhäsionsmoleküle auf deren Oberfläche und fördern somit die Migration im Blut zirkulierender Leukozyten. Sie sind außerdem eine wichtige Quelle proinflammatorischer Chemokine (Bujak et al., 2009; Frangogiannis et al., 2000).

Eine Schlüsselrolle bei der zellulären Antwort spielen Monozyten und die von Monozyten abgeleiteten Makrophagen, sowohl ortsständige wie auch infiltrierende. Die ortsständigen Makrophagen lassen sich anhand der Expression von „*Chemokine Receptor Type 2*“ (CCR2) in embryonale CCR2⁻ und post-natale CCR2⁺ unterteilen, welche Monozyten entstammen. Dieser Rezeptor sowie sein korrespondierender Ligand CCL2 spielen eine essentielle Rolle bei der Migration der Monozyten bzw. Makrophagen ins Gewebe (Bajpai et al., 2019, 2018). Makrophagen, die in heterogenen Populationen existieren, kann man grob in M1- und M2-Phänotypen unterteilen (Murray et al., 2014). Erstere sind klassischerweise assoziiert mit proinflammatorischen Vorgängen und werden induziert durch IFN γ , LPS, und TNF- α . Sie sezernieren unter Stimulation hohe Level an proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12, IL-23, IL-1 und IL-6 (Martinez et al., 2008). M2-Makrophagen hingegen fungieren anti-inflammatorisch und pro-regenerativ, da sie insbesondere IL-10, Wachstumsfaktoren wie VEGF und Matrix-Metalloproteasen (MMP) sezernieren (Martinez et al., 2008). Entzündungszellen, insbesondere Makrophagen, exprimieren die Komponenten des Inflammasoms und sind die wichtigste zelluläre Quelle aktiven IL-1 β . Ihre Rolle kann durch Stadien der Infiltration ins Myokard und nachfolgende Effekte im Gewebe beschrieben werden. Unmittelbar nach der Ischämie sterben

ortsständige Makrophagen im Infarktgewebe ab, was zu einem kompletten Verlust in der Infarktzone innerhalb 24 Stunden nach dem Infarkt führt. Diese residente Makrophagenpopulation wird rasch innerhalb 24 Stunden durch infiltrierende, aus Monozyten entsprungene Makrophagen ersetzt (Heidt et al., 2014). Am ersten bis dritten Tag zeigen diese infiltrierenden Makrophagen einen proinflammatorischen, M1-ähnlichen, Phänotyp, der eine Entzündung propagiert und den Abtransport toter Zellen erleichtert. Nach weiteren zwei bis vier Tagen nach Infarkt beginnen diese Makrophagen einen reparativen M2-ähnlichen Phänotyp anzunehmen, der die Entzündung reduziert und Herzgewebe wiederaufbaut (Ma et al., 2018). Im Mausmodell zeigte sich, dass anfangs proinflammatorische Ly6Chigh Makrophagen über CCR2/CCL2 Signalwege rekrutiert werden, später dann pro-regenerative Ly6Clow Makrophagen via CX3CR1 Signalwege (Nahrendorf et al., 2007). Außerdem tritt eine metabolische Umprogrammierung bei den infiltrierenden Makrophagen auf, was dazu führt, dass oxidative Phosphorylierung ca. ab dem fünften post-ischämischen Tag stattfindet (Mouton et al., 2018). Es gibt also nicht nur die Möglichkeit einer Rekrutierung der unterschiedlichen Phänotypen über separate Signalwege, sondern auch durch einen metabolischen Switch. Insgesamt spielen Makrophagen aufgrund ihrer Heterogenität und Plastizität eine zentrale Rolle während der Inflammation. Anfangs werden proinflammatorische Monozyten über Chemokine und das Komplementsystem rekrutiert, die dann später durch reife Makrophagen ersetzt werden. Diese scheinen viele Rollen bei der Heilung des Infarktschadens zu spielen (Aurora et al., 2014; O'Rourke et al., 2019). Neutrophile Granulozyten werden durch die Sekretion von Chemokinen und die Komplementaktivierung rekrutiert und infiltrieren das beschädigte Gewebe. Eine signifikante über Neutrophilen vermittelte Verschlimmerung des Gewebeschadens durch zytotoxische Effekte ist bisher nicht klar nachweisbar (Bonaventura et al., 2019; Bujak et al., 2008). Auch Lymphozyten, insbesondere B-Zellen, spielen eine wichtige Rolle in der Mobilisierung und Aktivierung proinflammatorischer Monozyten nach MI (Zouggari et al., 2013).

Insgesamt zeigt sich, dass durch einen MI verschiedene proinflammatorische Kaskaden ausgelöst werden, die schließlich zur Bildung des Inflammasoms und somit zur Aktivierung von IL-1 β führen. Diese Vorgänge sind physiologische Reparaturprozesse, können aber paradoxerweise auch selbst schädliche Effekte haben, wenn sie überschießend aktiviert werden.

1.6. Das Inflammasom

Die Freisetzung intrazellulärer Proteine (DAMPs) nach einem ischämischen Gewebeschaden führt zur Aktivierung einer Entzündungsreaktion. Die spezifische Identifikation und Bindung von DAMPs durch PRRs spielt eine entscheidende Rolle bei der Reaktion des Immunsystems auf gewebeschädigende Einflüsse wie Ischämie oder Gewebstraumen. Beim Prozessieren von Zytokinen kommt dem Inflammasom, einem zytoplasmatischen Multiproteinkomplex, eine wichtige Bedeutung zu.

Aktuell sind verschiedene Inflammasome bekannt, die alle nach den spezifischen PRRs benannt sind, die sie zur Formation eines funktionstüchtigen Inflammasoms führen. Diese Proteine gehören – mit Ausnahme des PYHIN Proteins AIM2 (*Absent in melanoma 2*) - in die Familie der *NOD-like receptor* (NLRs), die eine dreigliedrige Domänenarchitektur aufweist: eine *death fold* oder auch Pyrin-Domäne (PYD) am N-Terminus, eine zentrale *nucleotide-binding oligomerization domain* (auch NACHT oder NOD bzw. NBD) und eine Domäne mit Leucin-reichen repeats (LRR) am C-Terminus (Toldo et al., 2015).

1.6.1. Das NLRP3-Inflammasom

Das NLRP3 („*NLR family pyrin domain containing 3*“) Inflammasom, auch bekannt als Kryopyrin, gehört aktuell zu den am besten untersuchten Inflammasomen. Das NLRP3 Inflammasom wird durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Stimuli über K⁺-Efflux und ROS Produktion aktiviert (Broz und Dixit, 2016; Lamkanfi und Dixit, 2014). Hierzu zählen endogene Aktivatoren wie extrazelluläres ATP, Calciumpyrophosphatdihydrat, Cholesterolkristalle, sowie exogene Aktivatoren wie Asbest und Silikat (Latz et al., 2013). Das Inflammasom besteht im Wesentlichen aus einer DAMP-erkennenden Sensor-Komponente, einem Gerüstprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) und der Pro-Caspase 1. Neuere Erkenntnisse zeigen auch „*NIMA-related Kinase 7*“ (NEK7) als Bestandteil des NLRP3 Inflammasoms (Sharif et al., 2019; Shi et al., 2016). Die Sensor-Komponente besteht aus zytosolischen PRRs die PAMPs oder DAMPs detektieren und dann mit dem ASC interagieren. Diese PRRs enthalten das NLRP3 Protein, welches hauptsächlich in Makrophagen und eben als Bestandteil des Inflammasom exprimiert wird (Lu und Wu, 2015; Tao et al., 2013). NLRP3 enthält LRRs, eine zentrale NBD- und eine PYD-Domäne.

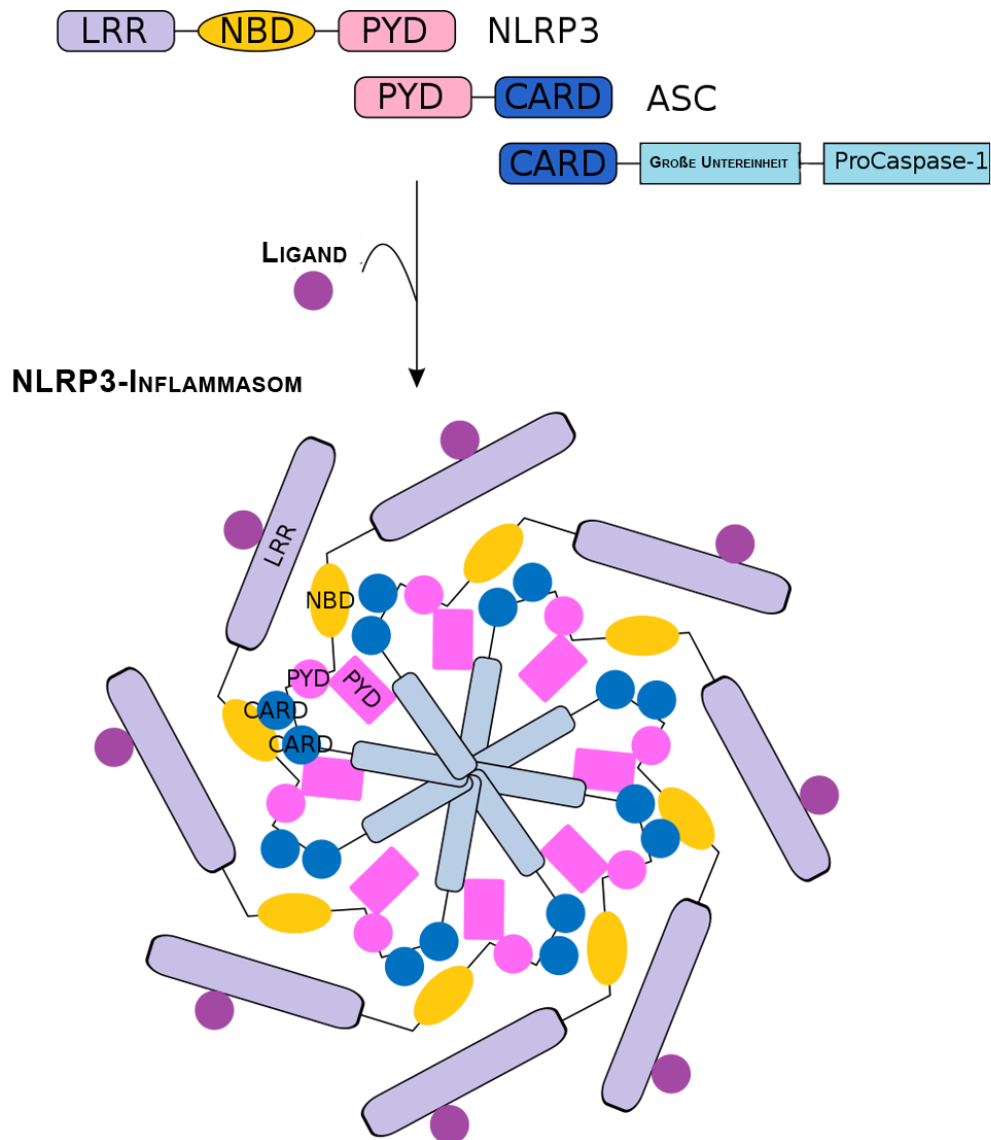


Abb. 2 Das NLRP3 Inflammasom in seiner oligomerisierten Struktur
Schematische Darstellung, modifiziert nach („Inflammasom“, 2021)

Sobald ein aktivierender Ligand erkannt wird, oligomerisiert NLRP3 und interagiert über seine PYD-Domäne mit der PYD-Domäne des ASC, welches wiederum aus einer PYD- und einer CARD-Domäne (*caspase recruitment domain - CARD*) besteht (Rock et al., 2010; Takahashi, 2019). Die CARD rekrutiert dann durch Bindung an die CARD der Pro-Caspase-1 die selbige. Pro-Caspase-1 besteht selbst aus einer CARD und katalytischen Domänen (p10 und p20). Diese Interaktionen führen dann dazu, dass im Inflammasomkomplex die inaktive Pro-Caspase-1 durch autokatalytische proteolytische Spaltung zu Caspase-1 aktiviert wird. Die aktive Form Caspase-1 prozessiert Zytokine

wie die inaktiven zytosolischen pro-IL-1 β und pro-IL-18 in ihre aktiven Formen sowie Gasdermin D (Broz und Dixit, 2016). Die aktiven Formen IL-1 β und IL-18 werden dann in den Extrazellulärraum sezerniert. Eine Aktivierung des Inflammasoms führt also zu einer erhöhten Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β .

Caspase-1 spielt zudem eine fundamentale Rolle bei der Induktion der Pyroptose (Fink und Cookson, 2006). Pyroptose führt im Gegensatz zur Apoptose zur Ruptur der Zellmembran und zum Freiwerden von intrazellulärem und proinflammatorischem Inhalt (Bergsbaken et al., 2009). Zur Nekrose lässt sie sich dadurch abgrenzen, dass sie kontrolliert abläuft und die Entzündung des Gewebes das gewünschte Resultat ist, um eine schnelle Immunreaktion zu initiieren (Man et al., 2017). Die Pyroptose ist wahrscheinlich der Mechanismus, durch den das NLRP3 Inflammasom den Zelltod der Kardiomyozyten induziert, und nicht durch die Produktion von IL-1 β (Toldo et al., 2015). Gasdermin D wurde neuerlich als wichtiger Mediator der Pyroptose identifiziert und wird auch durch Caspase-1 enzymatisch aktiviert (He et al., 2015; Shi et al., 2015).

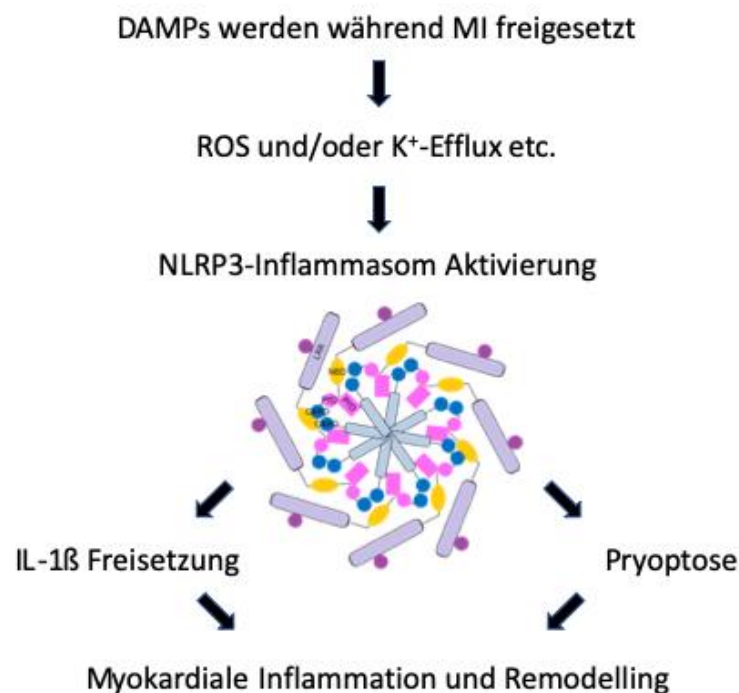


Abb. 3 Rolle des NLRP3 Inflammasoms bei MI

DAMPs aus dem beschädigten Myokard bei MI aktivieren das NLRP-3 Inflammasom via ROS und/oder K⁺-Efflux. NLRP3 Aktivierung treibt dann die IL-1 β Freisetzung aus den Kardiomyozyten und Pyroptose in den Kardiomyozyten, was wiederum die kardiale Inflammation und das Remodelling aktiviert. Schematische Darstellung in Anlehnung an Takahashi et al. 2019

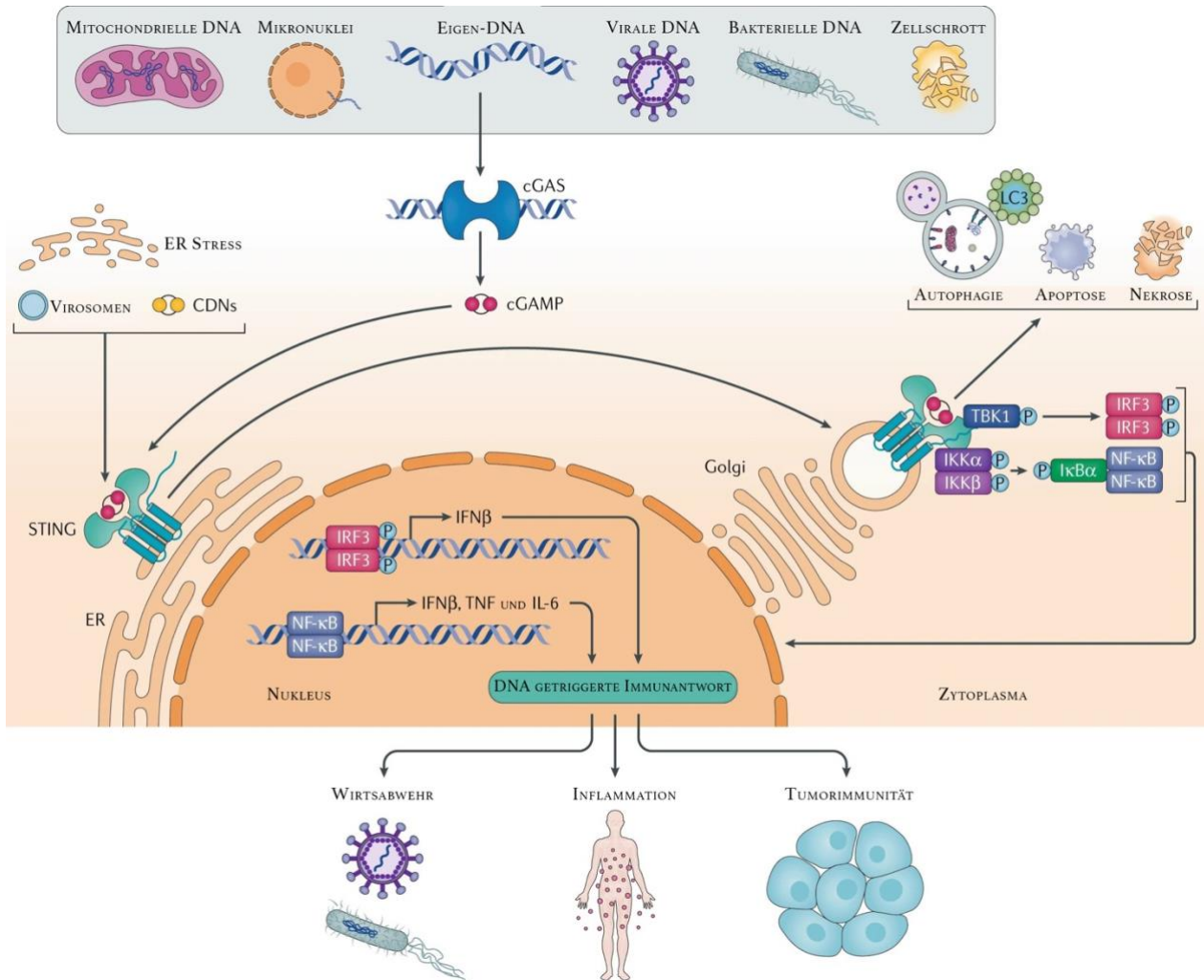
Da viele der Aktivatoren des Inflammasoms bei ischämischem Zelluntergang entstehen, spielt das NLRP3 Inflammasom eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Entzündungsreaktion nach MI (Toldo et al., 2015). Kawaguchi et al. haben bereits die entscheidende Bedeutung des Inflammasoms, im Besonderen von ASC, bei der IL-1 β Produktion im myokardialen I/R Modell demonstriert (Kawaguchi Masanori et al., 2011).

1.6.2. Das AIM2-Inflammasom

Interferon-induzierbares Protein AIM2, auch als *absent in melanoma 2* beschrieben, bildet Teile des AIM2-Inflammasoms (Schroder und Tschopp, 2010). Im Unterschied zum NLRP3-Inflammasom besteht die Sensorkomponente beim AIM2-Inflammasom vorwiegend aus dem zytosolischen Protein AIM2. AIM2 besteht aus einer HIN200 Domäne, die an DNA bindet, und einer Pyrin-Domäne, die an ASC binden kann. AIM2 detektiert dementsprechend als direkter Rezeptor die Anwesenheit zytoplasmatischer doppelsträngiger DNA (dsDNA). Die Aktivierung von AIM2 wurde bereits in Zusammenhang mit viralen und bakteriellen Infektionsprozessen beobachtet, jedoch ist auch eine Erkennung körpereigener DNA durch AIM2 gezeigt worden (Fernandes-Alnemri et al., 2009, S. 2; Hornung et al., 2009; Roberts et al., 2009). AIM2 rekrutiert, genau wie NLRP3, das universelle Gerüstprotein ASC, welches dann über die gleichen Signalwege die Protease Caspase-1 aktiviert. Es zeigte sich bereits, dass AIM2 synchron zu NLRP3 als Reaktion auf dsDNA eine Caspase-1-medierte Pyroptose einleitet.

Da Kawaguchi et al. 2011 bereits die herausstechende Rolle des ASC-Signalweges gezeigt hatten, postulierte unsere Arbeitsgruppe eine vergleichbare signifikante Reduktion der postischämischen Fibrosierung und eine Verringerung der kardialen Dysfunktion bei AIM2^{-/-} Tieren. Wir konnten diese Hypothese in unseren Versuchen bestätigen (unpublizierte Daten).

1.6.3. cGAS/STING-Signalweg

**Abb. 4** cGAS-STING-Signalweg

Die Phosphorylierung wird durch P angezeigt. In Anlehnung an (Motwani et al., 2019)

Zwei weitere bekannte Sensoren für zytosolische DNA sind die cyclische GMP-AMP-Synthase (cGAS) und das im Endoplasmatische Retikulum (ER) lokalisierte Adapterprotein *Stimulator of Interferon genes* (STING). Gemeinsam bilden sie den cGAS-STING-Signalweg. Die zytosolische DNA-Erkennung durch den cGAS-STING-Signalweg ist an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt. Die Hauptfunktion dieses Signalwegs ist die Wirtsabwehr, aber neue Studien haben eine Verbindung zwischen diesem Signalweg und der Entwicklung einer Vielzahl von Entzündungszuständen hergestellt und eine Rolle bei der Tumorummunität aufgedeckt (Ablasser und Chen, 2019). STING wurde bereits 2011 als Sensor für cyclische Dinukleotide (CDNs) beschrieben, der

intrazelluläre Pathogene identifizieren kann (Burdette et al., 2011). cGAS ist wie AIM2 ein DNA-Sensor, der dem angeborene Immunsystem angehört und eine Typ 1 Interferon Antwort auslöst, sobald er aktiviert wird. Lange ging man davon aus, dass es sich bei cGAS um ein zytosolisches Protein handelt. Neue Erkenntnisse zeigen aber, dass cGAS vorherrschend im Nukleus lokalisiert ist und eine Autoaktivierung dort inhibiert wird. Dies geschieht durch kontinuierliche Sequestrierung und Hemmung durch Chromatin, die gemeinsam einen inaktiven Status verursachen (Michalski et al., 2020).

DNA aus verschiedenen Quellen kann in das Zytosol gelangen und den cGAS-STING-Signalweg aktivieren. Die DNA-Bindung aktiviert cGAS, welches den zweiten Botenstoff und 2'3' cGMP-AMP (cGAMP) synthetisiert (Sun et al., 2013; Wu et al., 2013). Dieses cGAMP als endogenes CDN ist ein Ligand für das Adapterprotein STING. Andere Stimuli als cGAMP, einschließlich ER-Stress, Virosomen und CDNs, können STING ebenfalls aktivieren (Holm et al., 2012; Moretti et al., 2017; Yin et al., 2012). Nach der Aktivierung transloziert STING aus dem ER in den Golgi, wo es Kinasen wie die TANK-bindende Kinase 1 (TBK1) und die I κ B-Kinase (IKK) rekrutiert, die den Interferon-Regulationsfaktor 3 (IRF3) bzw. den Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)-Inhibitor I κ B α phosphorylieren. Phosphorylierter IRF3 dimerisiert und transloziert in den Nukleus, um die Transkription von Genen zu aktivieren, die Typ-I-Interferone wie Interferon- β (IFN β) kodieren (Sun et al., 2013). Die I κ B α -Phosphorylierung führt außerdem zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern, wo es die Transkription von Genen aktiviert, Interferone und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 kodiert. Die STING-Signalisierung führt auch zur Aktivierung anderer zellulärer Prozesse wie Autophagie, Apoptose und Nekrose (Gui et al., 2019; Sarhan et al., 2019). Es gibt Hinweise, dass über den cGAS-STING-Signalweg Apoptose unabhängig von Transkriptionsaktivitäten über den mitochondrialen Apoptose Signalweg ausgelöst wird (Paludan et al., 2019).

1.7. A151 Oligodeoxynukleotid

Freiwerdende endogene DNA fungiert als wichtiger DAMP und triggert bekanntlich eine inflammatorische Immunantwort über die beschriebenen Signalwege. Im Gegensatz dazu inhibieren bestimmte DNA-Sequenzen wie die TTAGGG-Wiederholung, die häufig in Säugetier-Telomeren vorkommt, eine Immunantwort (Gursel et al., 2003). Synthetische Oligodeoxynukleotide (ODNs), die den immunsuppressiven Effekt der TTAGGG-

Wiederholung zu imitieren versuchen, wurden von vielen Arbeitsgruppen synthetisiert und erforscht. Mehrere Mechanismen tragen zu der suppressiven Aktivität solcher ODN bei. Studien deuten darauf hin, dass suppressive ODN in die Phosphorylierung von Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) und 4 (STAT4) eingreifen und dadurch die Entzündung blockieren, die durch STAT-assoziierte Signalkaskaden vermittelt wird. In Tiermodellen können suppressive ODN zur Vorbeugung oder Behandlung von Krankheiten eingesetzt werden, die durch eine anhaltende Immunaktivierung gekennzeichnet sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TTAGGG-Multimere eine breite Anwendung bei der Behandlung von Krankheiten finden könnten, die durch übermäßige/anhaltende Immunaktivierung gekennzeichnet sind (Klinman et al., 2009). Das meistuntersuchte Beispiel für solch ein ODN ist A151. A151 besteht aus vier TTAGGG-Motiven, die die repetitiven Elemente in Säugetier-Telomeren imitieren sollen.

Mittels dieses A151 lassen sich eine große Fülle an Immunantworten inhibieren, unter anderem die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen, T-Zellen, TLR9-Signalwege sowie ebenfalls die AIM2 Aktivierung (Bode et al., 2014; Bouladoux et al., 2012; Kaminski et al., 2013). Bemerkenswerterweise zeigten Analysen, dass die A151-Behandlung keinen entzündungshemmenden Zustand induziert, sondern eher das DNA-Sensing blockiert (Kaminski et al., 2013). Intensive Forschung in diesem Bereich hat bereits gezeigt, dass A151 in vielen inflammatorischen Prozessen inhibierend eingesetzt werden kann (Bayik et al., 2016a). Zhao et al. untersuchten bspw. die Effekte einer A151 Behandlung bei ischämischen Schlaganfällen im Rattenmodell und konnten breite anti-inflammatorische Wirkungen zeigen. A151 verringerte die Produktion von Caspase-1, IL-1 β und NLRP3 durch aktivierte Makrophagen. Die Schwere des ischämieinduzierten Gewebeschadens im Gehirn konnte ebenso reduziert werden (Deroide et al., 2013; Iadecola und Anrather, 2011; Zhang et al., 2014; Zhao et al., 2015). Zhaos Ergebnisse deuten eindeutig darauf hin, dass die Modulation der Inflammasom-Aktivität durch A151 zu einer Reduktion der proinflammatorischen Zytokin-Produktion durch Makrophagen beitragen kann, die ischämischen Bedingungen ausgesetzt sind. Daher könnte die Modulation der ischämischen Pathobiologie durch A151 eine Rolle bei der Entwicklung neuer Ischämiepräventions- und -therapiestrategien spielen. Neuere

Daten zeigen außerdem, dass A151 auch den cGAS-STING-Signalweg inhibiert (Steinhagen et al., 2018).

1.8. Übersetzung in das Kleintiermodell

Für diese Studie wurde das in unserer Arbeitsgruppe etablierte *close-chest* Infarktmodell bei Mäusen benutzt bei dem eine Möglichkeit zur reversiblen Okklusion des *Ramus interventricularis anterior (RIVA)* geschaffen wird (Kim et al., 2012a). Dazu wird in einem ersten Schritt ein 8-0 Prolene Faden um die RIVA gelegt, welcher transthorakal in eine subkutane Tasche ausgeleitet wird. Um eine Erholung der Versuchstiere sowie eine Trennung des inflammatorischen Operationstraumas von der sterilen Inflammation der Ischämie/Reperfusion zu gewährleisten, erholen sich die Mäuse für mindestens 5 Tage. Im zweiten Schritt nach sieben Tagen wird in Narkose durch Zug an dem zuvor eingebrachten Prolene-Faden eine EKG-kontrollierte Okklusion der RIVA für 30 Minuten durchgeführt. Die adäquate Okklusion wird permanent durch ein EKG kontrolliert. Je nach Protokoll (PCR-Untersuchung, Histologie oder Ähnlichem) werden die benötigten Abschlussuntersuchungen (z.B. Linksherzkatheteruntersuchung) durchgeführt und die Tiere anschließend in Narkose getötet und die Herzen der histologischen Untersuchung zugeführt. Datengrundlage dieser Dissertation sind Herzkatheteruntersuchungen und Histologie nach 7 bzw. 28 Tagen.

1.9. Ansatz des Projektes und Fragestellung

Beim MI kommt es durch Zelltod zur Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Trigger, insbesondere endogener DNA. Dabei spielen AIM2 und STING als zytosolische DNA-Sensoren eine essenzielle Funktion in der Regulation der Immunantwort (Briard et al., 2020).

Die Modulation der aus einem Herzinfarkt resultierenden Entzündungskaskade ist das vornehmliche Ziel einer translationalen pharmakologischen Forschung. Zellkulturelle Untersuchungen zeigten für das Oligonukleotid A-151 einen anti-inflammatorischen Effekt bei ischämischen Prozessen (Zhao et al., 2015). Eigene Experimente in der Zellkultur bestätigten die Wirkung von A151 in der AIM2-Signalkaskade, zeigten aber eine noch stärkere Wirkung des Oligonukleotids beim cGas-STING Signalweg (Vorarbeiten der Arbeitsgruppe). Auch die mit etwas zeitlichem Versatz erschiene Publikation von Steinhagen et al. betont die vielversprechenden Möglichkeiten der A151-Modulation im Zusammenhang mit dem cGAS-STING Signalweg (Steinhagen et al., 2018).

Diese Dissertation untersucht daher im ersten Schritt den Effekt eines STING-knockouts auf die postischämische Narbenbildung und die kardiale Funktion im murinen Herzinfarktmodell. Im zweiten Schritt wird sowohl die präkonditionierende als auch die therapeutische Wirkung von A151-Oligonukleotiden in Wildtypmäusen untersucht. Unsere Hypothese lautete: Wir postulieren eine STING-vermittelte Reduktion der postischämischen Fibrosierung und eine Verbesserung der kardialen Funktion bei therapeutischer Applikation von A151 ODN.

Im Folgenden werden die Versuchsgruppen und -protokolle sowie die einzelnen Methoden genauer erläutert.

2. Material und Methoden

2.1. Methodischer Ansatz zur Beantwortung der Fragestellung

Im Rahmen dieser Dissertation verwendeten wir in allen Versuchsgruppen ein etabliertes MI-Modell für Mäuse (Kim et al., 2012a) mit einer Ischämiezeit von 30 Minuten. Alle dieser Schrift zugrundeliegenden Messungen und histologischen Auswertungen mit Ausnahme der α -SMAc-Auswertung (dies nach 7 Tagen) wurden 28 Tage nach Infarkt durchgeführt. Die Vergleichbarkeit der RIVA-Ligation wurde sowohl über vergleichbare Infarkthöhen im histologischen Hämatoxylin-Eosin-Schnitt als auch durch die Evaluation der intrainerventionellen EKGs gewährleistet.

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss des cGAS-STING-Signalweges auf die postischämische Narbenbildung und Herzfunktion untersucht, indem STING knockout Tiere mit WT Tieren verglichen wurden.

In der zweiten Versuchsreihe wurde zunächst der präkonditionierende Ansatz einer A151 ODN Gabe untersucht. Anschließend wurde dann der therapeutische Ansatz untersucht, da dieser von größter klinischer Relevanz ist. Fokus der Fragestellung war hier, ob mit dem A151 ODN Motiv nach 28 Tagen eine signifikante Reduktion der postischämischen Fibrosierung und eine Verringerung der kardialen Dysfunktion festzustellen ist. Hierfür wurden ausschließlich WT Tiere verwendet.

In einer letzten Versuchsreihe wurde dann untersucht inwiefern dieser Effekt über den cGAS-STING-Signalweg bzw. den TLR9 Rezeptor vermittelt wird. Es ist bereits bekannt, dass A151 eine inhibierende Wirkung auf TLR9 zeigt und dass diese inhibierende Wirkung auf TLR-induzierte Antworten wichtig für die Unterdrückung von Entzündungen und schädlichen Immunantworten ist (Kawai und Akira, 2010). Ziel der Versuche war es, ein genaueres Verständnis des cGAS-STING-Signalweges und der Wirkung von A151 auf diesen Signalweg zu entwickeln. Zum Ausschluss einer TLR9 vermittelten positiven Wirkung des applizierten A151 Motivs dienten TLR9 Knockout Tiere mit präkonditionierender A151 Applikation als Vergleich zu WT Tieren mit präkonditionierender A151 Applikation. Wenn A151 seine Wirkung über STING vermittelt, sollte sich kein Unterschied zwischen den WT Tieren und den TLR9 knockout Tieren darstellen.

2.2. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle an den Versuchstieren durchgeführten Maßnahmen wurden durch das zuständige Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes unter dem Aktenzeichen TVA 84-02.04.2012.A359 und dem Folgeantrag TVA 84-02.04.2015.A105 genehmigt. Die Versuchstiere wurden in Gruppen von höchstens fünf Tieren in durchsichtigen, belüfteten Filtertop-Käfigen der Blue Line Linie (Firma Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeissberg) gehalten. Auf einem Meter Höhe mit einer Hell/Dunkelphase von 7:00 – 19 Uhr (Hell) und 19:00 bis 7:00 Uhr (Dunkel) betrug die Beleuchtung 200 Lux. Bei einer Raumtemperatur von 22 °C (+/- 2 °C) betrug die Luftwechselrate 16 pro Stunde. Zur Ernährung diente ssniff-Futter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE) sowie Wasser ad libitum. Vor Nutzung der Käfige (Standard Bestückung mit Nahrung, Wasser und Einstreu (Altromin-Tiereinstreu-Granulat)) wurden alle Käfige autoklaviert. Die Trennung von den Elterntieren und Aufteilung nach Geschlecht der Jungtiere erfolgte mit 4-6 Wochen. Alle Versuche wurden unter Beachtung der geltenden Tierschutzbestimmungen durchgeführt (National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 2011).

Als Versuchstiere wurden C57BL/6 Wildtyp Mäuse im Alter von zehn Wochen und einem Körpergewicht von 20 bis 25 g von Charles River Laboratories (97633 Sulzfeld, DE), TLR9-defiziente (TLR9^{-/-}) Mäuse (eigene Zucht) und STING^{-/-} Tiere (eigene Zucht) verwendet und im Tierhaus des Universitätsklinikums Bonn (Haus für Experimentelle Therapie HET, Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn) untergebracht.

2.3. Versuchsprotokolle und tierchirurgische Operationen

Alle beschriebenen operativen Eingriffe wurden vom Arbeitsgruppenleiter durchgeführt, da so eine möglichst hohe qualitative Homogenität der Versuchsgruppen gewährleistet werden konnte. Die Beschreibung der OP-Technik ist für das Verständnis der Versuchsprotokolle und der Ergebnisinterpretation essentiell und wird daher im Folgenden kurz wiedergegeben. Der Mehrwert dieser Dissertation liegt in der ausführlichen histologischen Analyse, der planimetrischen Infarktgrößenbestimmung der

jeweiligen Versuchstiere und deren kritischen Diskussion, nicht in der Etablierung der chirurgischen Methoden.

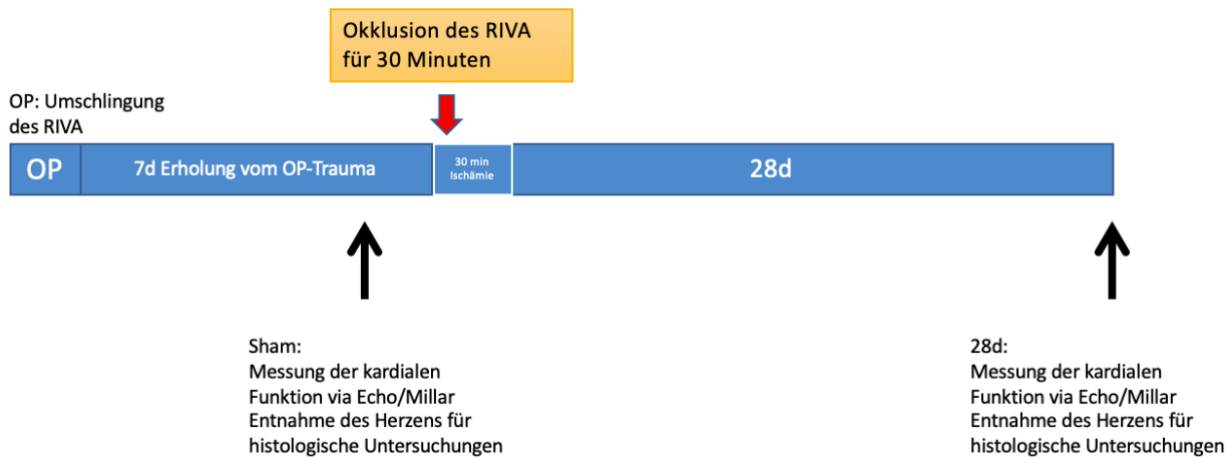


Abb. 5 Allgemeines Versuchsprotokoll

Das verwendete Ischämie- und Reperusionsmodell umfasst ein dreizeitiges Vorgehen. Im ersten Arbeitsschritt (Instrumentierung) erfolgte in Narkose die Umschlingung des RIVA. Danach wurde den Versuchstieren eine Erholungsphase von sieben Tagen von der Initialoperation gewährt. Im zweiten Arbeitsschritt erfolgte, ebenfalls in Narkose, die Okklusion des RIVA durch Zug an der Fadenschlaufe mit einem definierten Gewicht unter EKG-Kontrolle für 30 Minuten. Abweichende Versuchsprotokolle, insbesondere bezüglich der Applikation von A151 vor bzw. nach Infarkt, werden im Folgenden in den einzelnen Versuchsgruppen erläutert. Zu Vergleichszwecken wurde zudem eine Schein-OP-Gruppe (im Weiteren sham genannt) ausgewertet, die im selben Stil instrumentiert, jedoch nicht infarziert wurde.

Im dritten Arbeitsschritt wurde 28 Tage nach Okklusion des RIVA und nach Wiegen der Maus sowie Messung mit dem Millar-Katheter das Herz unter Narkose entnommen. Anschließend wurde es zur histologischen Analyse sowie zur planimetrischen Infarktgrößenbestimmung weiterverarbeitet. Das dreizeitige Vorgehen wird in der Folge näher erklärt.

2.3.1. Versuchsgruppen

2.3.1.1. WT vs. STING Knockout

In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung des STING-Knockouts (n=10, sham n=5) im Vergleich zu Wildtieren (n=12, sham n=5) bei Verwendung des beschriebenen Ischämie- und Reperfusionsmodells untersucht. Dies war notwendig, da die STING^{-/-}-Tiere noch nicht in ihrer Infarktausdehnung beschrieben wurden und wir eine Bestätigung unserer Hypothese der Relevanz des STING Signalweges benötigten.

2.3.1.2. WT vs. A151 - präkonditionierende Applikation vor Infarkt

In dieser Versuchsreihe wurden für WT und TLR9^{-/-} jeweils Gruppen mit verschiedenen Applikationsschemata von A151 untersucht. Wir begannen mit einer Dosis von 0,2 nmol/g Mausgewicht A151 (A151 (5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'), Hersteller: Integrated DNA Technologies):

- 1) Low-Dose ODN A151 Gruppe: i.v. Gabe von 0,2 nmol/g Mausgewicht A151 16 Stunden vor Infarkt (gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf eine Konzentration von 0,02 nmol/μl)

Bei der Applikationsmenge von 0,2 nmol/g Mausgewicht stellte unsere Arbeitsgruppe weder bei TLR9^{-/-} noch bei WT-Tieren einen protektiven Effekt fest. Eine Steigerung um den Faktor 10 zeigte deutliche Effekte. Fortan wurden die Versuche mit folgenden unterschiedlichen Applikationsprotokollen und Vergleichsgruppen durchgeführt:

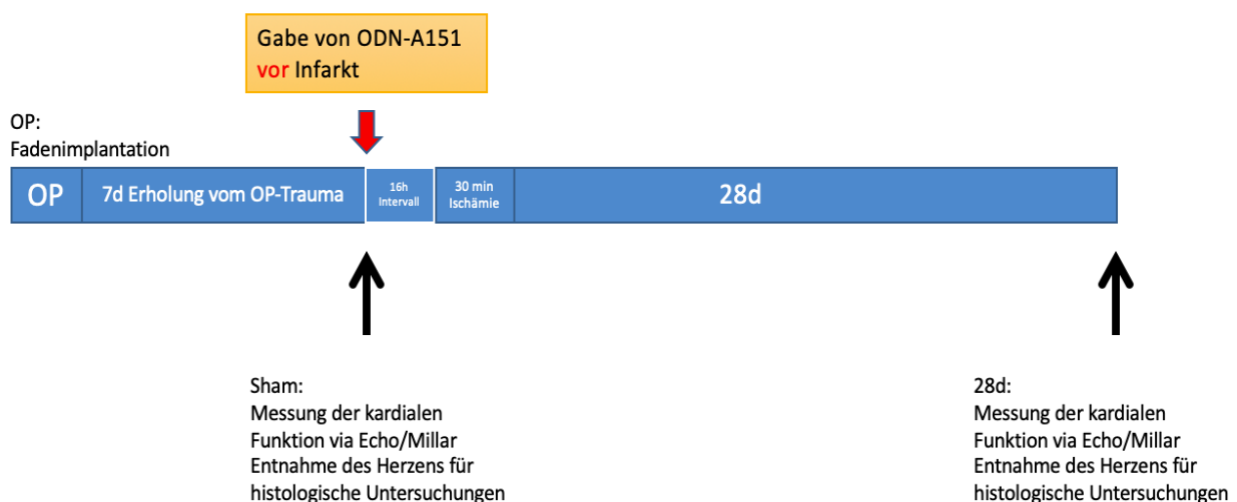


Abb. 6 Versuchsprotokoll mit präkonditionierender Applikation vor Infarkt

Nach Instrumentierung der RIVA und 7-tägiger Rekonvaleszenz erfolgte 16 Stunden vor Infarkt eine präkonditionierende Applikation von A151 in der Konzentration von 2 nmol/g Mausgewicht. Primärer Endpunkt war die histologische und hämodynamische Auswertung nach 28 Tagen. Neben der sham-Gruppe (Instrumentierung, jedoch kein Infarkt; lediglich Gabe eines äquivalenten Volumen PBS) erhielt die eine Gruppe A151 (A151 (5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3'), Hersteller: Integrated DNA Technologies) und die Kontrollgruppe inaktives ODN (C151 (5'-TTCAAATTCAAATTCAAATTCAA-3'), Hersteller: Integrated DNA Technologies) in selber Konzentration. Es ergaben sich folgende Gruppen:

- 1) Sham WT, n=11: Instrumentierung, Keine Ischämie, PBS-Gabe
- 2) Sham TLR9^{-/-}, n=6: Instrumentierung, Keine Ischämie, PBS-Gabe
- 3) ODN A151 WT (Prophylaktisch) Gruppe, n=9:
i.v. Gabe von 2 nmol/g Mausgewicht A151 16 Stunden vor Infarkt (gelöst in PBS auf eine Konzentration von 0,2 nmol/μl)
- 4) Control ODN WT (Prophylaktisch) Gruppe, n=7:
i.v. Gabe von 2 nmol/g Mausgewicht C151 16 Stunden vor Infarkt (gelöst in PBS auf eine Konzentration von 0,2 nmol/μl)
- 5) ODN A151 TLR9^{-/-} (Prophylaktisch) Gruppe, n=7:
i.v. Gabe von 2 nmol/g Mausgewicht A151 16 Stunden vor Infarkt (gelöst in PBS auf eine Konzentration von 0,2 nmol/μl)
- 6) Control ODN TLR9^{-/-} (Prophylaktisch) Gruppe, n=10:
i.v. Gabe von 2 nmol/g Mausgewicht C151 16 Stunden vor Infarkt (gelöst in PBS auf eine Konzentration von 0,2 nmol/μl)

2.3.1.3. WT vs. A151 therapeutisch

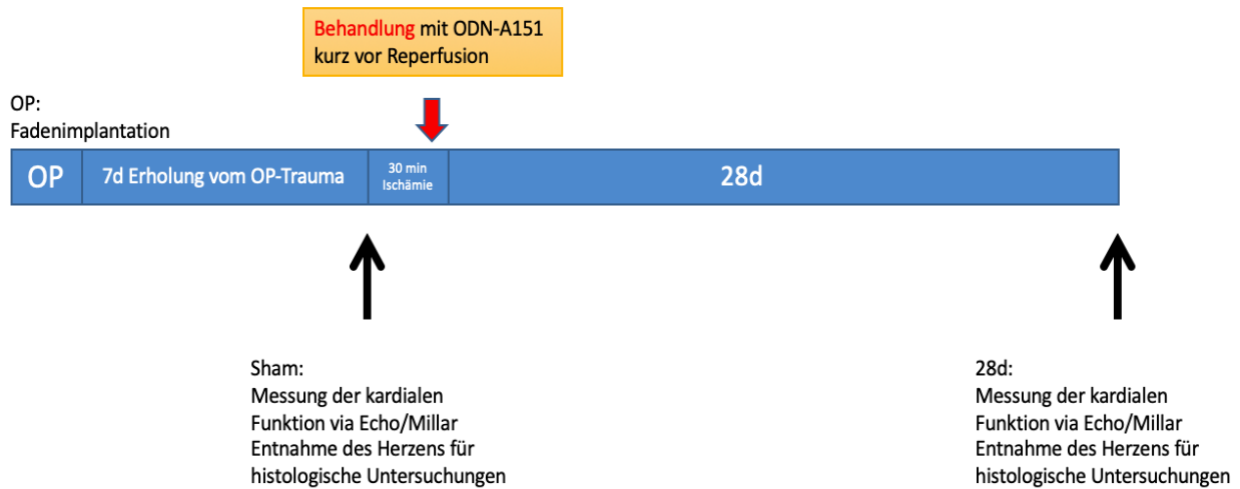


Abb. 7 Versuchsprotokoll mit therapeutischer Applikation

Zunächst erfolgt die Instrumentierung, nach 7 Tagen eine 30-minütige Ischämie und anschließend 3 Minuten vor Start der Reperfusion die Applikation von A151 in der Konzentration von 2 nmol/g Mausgewicht. Als Abschlussuntersuchung nach 28 Tagen werden histologische und hämodynamische Parameter gemessen. Auch hier gab es eine Kontrollgruppe mit C151.

- 1) ODN A151 WT (Therapeutisch) Gruppe, n=9:
Gabe von 2 nmol/g Mausgewicht A151 3 Minuten vor Start der Reperfusion (gelöst in PBS auf eine Konzentration von 0,2 nmol/μl) i.v.
- 2) Control ODN WT (Therapeutisch) Gruppe, n=11:
Gabe von 2 nmol/g Mausgewicht C151 3 Minuten vor Start der Reperfusion (gelöst in PBS auf eine Konzentration von 0,2 nmol/μl) i.v.

2.3.2. Closed-Chest Modell

Bei allen Versuchen verwendeten wir ein modifiziertes „*Closed-chest*“-Modell entsprechend aktuell empfohlener Studienlage (Kim et al., 2012b; Lindsey et al., 2018). Der operative Zugang zum Herzen erfolgte im Sinne einer Mikro-Thorakotomie über den linken 4. Interkostalraum (ICR), um auf den deutlich invasiveren, parasternalen Zugang verzichten zu können. Dies reduziert das Operationstrauma, den Schmerzmittelbedarf

sowie das Wundinfektionsrisiko und erleichtert die Heilung. Dem Operationstrauma folgt unweigerlich eine Immunreaktion, welche abhängig von der Invasivität zum Zytokinausstoß führt, welcher wiederum Mechanismen der Ischämie/Reperfusion beeinflusst und somit erheblichen Einfluss auf die Infarktgröße hat (Nossuli et al., 2000). Den Versuchstieren wurde eine siebentägige Erholungszeit nach Instrumentierung gewährt, um bewusst eine zeitliche Trennung des Operationstraumas von der Ischämie und Reperfusion zu erreichen. Dies hat zur Folge, dass die inflammatorische Antwort minimiert wird bzw. die I/R außerhalb der Operationsinflammation geschieht (Jong et al., 2003).

2.3.2.1. Instrumentierung und Anästhesie

Alle operativen Maßnahmen wurden unter einem Stereomikroskop M80 (Leica M80) mit einer Lichtquelle (KL1500LCD) durchgeführt. Ziel der Instrumentierung ist es, eine reversible Okklusion des RIVA zu ermöglichen, um ein Ischämieereignis mit anschließender Rekanalisation des verschlossenen Herzkranzgefäßes zu modellieren.

Die Narkoseeinleitung erfolgte mit 4 – 5 Vol.% Isofluran bei einer Flussrate von 1 L/min Sauerstoff in einer Einleitungsbox. Bei spontan atmender Maus ohne Abwehrreaktion wurde das Versuchstier auf den gewärmten OP-Tisch (Harvard Apparatus; Holliston, Massachusetts, USA) umgelagert und das Inhalationsanästhetikum zunächst mittels eines nasalen Konus zugeführt und die Narkosetiefe mittels Schmerzreiz überprüft. Bei ausbleibender Schmerzantwort wurden die Extremitäten der Maus vorsichtig mit Pflasterstreifen auf dem OP-Tisch fixiert. Die Erhaltung der Körpertemperatur (37 °C) wurde mittels einer rektalen Temperatursonde kontrolliert und über eine Regulationseinheit (Harvard Apparatus, Homeothermic Blanket Control Unit) rückgekoppelt und gesichert.

Nach Enthaarung der Brust und des Halses mittels „Pilca Enthaarungs-Creme extra mild“ (DMV Diedrichs Markenvertrieb GmbH & Co, DE) erfolgte die aseptische Hautdesinfektion des Operationsgebietes mit Povidon-Jod-Lösung für drei Minuten. Gemäß der Empfehlung der „Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz e.V.“ zur Analgesie wurde den Versuchstieren ein subkutanes Buprenorphin-Depot (Temgesic, 0,1 mg/kg in 150 µl physiologischer NaCl-Lösung KG) subkutan injiziert. Um eine gesicherte Intubation zu garantieren, wurde anschließend nach entsprechender chirurgischer Präparation ein 22

G Metalltubus unter Sichtkontrolle in die Trachea vorgeschoben und der Schildknorpel vorsichtig mit einer Knopfpinzette fixiert. Die Lagekontrolle wurde unter Berücksichtigung der Thoraxbewegung kontrolliert. Die Beatmung erfolgte volumenkontrolliert über den Kleintierventilator (Minivent Type 845, Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus). Beatmet wurde nach Etablierung des Tubus mit 2 Vol.% Isofluran und einer Flussrate von 1,0 L/min Sauerstoff, mit einer Atemfrequenz von 105/min und einem Tidalvolumen von 10 µl/g KG.

2.3.2.2. Chirurgisches Vorgehen

Der interkostale Zugang wurde unter sterilen Bedingungen auf der linken Seite präpariert. Für die detaillierte chirurgische Präparation des RIVA verweise ich auf die Arbeiten von Kim et al. (Kim et al., 2012b). Zur Okklusion des RIVA wurde dieser mit einem monofilen 8-0 Prolene Faden umstochen (Ethicon, EPM8746 Prolene 8-0, Polypropylen, monofil). Die beiden Fadenenden wurden durch einen 1 mm langen Polyethylen (PE)-10 Schlauch gezogen, der zuvor 24 h in 100 % Ethanol desinfiziert wurde und als Okkluder dient. Mittels einer Kalt-Nadel (UNIMED, 8211, Kalt 3) wurden die Fäden an der linken Thoraxhälfte herausgezogen. Ein Fadenende wurde mit Hilfe der Kaltnadel im dritten ICR ausgestochen, das andere aus dem bereits eröffneten vierten ICR geleitet. Dadurch diente die vierte Rippe dem Okkluder als Hypomochlion, damit bei Zug an der Fadenschlaufe der Blutfluss durch den RIVA komplett unterbunden wurde und gleichzeitig die Herzachse nicht mechanisch stark beeinflusst wurde. Es erfolgte zur Lagekontrolle ein Okklusionstest unter laufender EKG Aufzeichnung an den Extremitäten nach Einthoven. An die entstandene Schlaufe der Fadenenden wurde hierfür ein 5 g Gewicht gehangen (Eckle et al., 2011). Dieses Vorgehen sicherte die korrekte Umschlingung des RIVA im Herzgewebe (Scofield und Singh, 2016). Im Anschluss wurde sofort wieder reperfundiert und die Fäden gelockert. Der Okkluder verblieb zwischen Herz und Thoraxwand, die freien, extrathorakalen Enden der 8-0 Ligatur zu einer Schlaufe gelegt, verknotet und in eine zuvor präparierte subkutane Tasche gelegt, und der Thorax wurde wieder verschlossen. Bei suffizienter Spontanatmung wurde extubiert und bis zum vollständigen Erwachen durch eine Infrarotlampe im beheizten Käfig gewärmt.

2.3.3. Myokardiale Ischämie

Die Mäuse erholten sich im verwendeten Closed-Chest Modell nach der OP für 7 Tage von der posttraumatischen Inflammation, um dann die Infarzierung mit zeitlichem Abstand zum OP-Trauma zu erhalten. Die Narkose hierfür erfolgte gewichtsadaptiert durch Injektion von 5 - 10 ml/kg KG eines Gemisches aus 10 % Ketamin, 2 % Xylazin und 0,05 % Atropin (Kim et al., 2012b). Nach der zuvor beschriebenen Hautdesinfektion, der Überprüfung der Schmerzabwehr und der Intubation wurde die Maus mit 21 % Sauerstoff (Raumluft) kontrolliert beatmet. Durch die veränderte Narkoseführung sollen die kardioprotektiven Effekte einer Isofluran-Narkose sowie Verfälschungen durch eine erhöhte Sauerstoffkonzentration verhindert werden (Chen et al., 2018; Feng et al., 2005; Zaugg et al., 2002). Die Überwachung der Körpertemperatur erfolgte erneut über eine rektale Sonde, da die Ausdehnung der Infarktgröße auch proportional zur Körpertemperatur verläuft (Chien et al., 1994). Nach minimaler Wiedereröffnung des Hautschnitts wurde die subkutan liegende 8-0 Fadenschlaufe mobilisiert. Zur Okklusion erfolgte der Zug durch Anhängen eines 5 g Gewichtes an die 8-0 Fadenschlaufe. Dies ermöglichte gleichmäßige, bzw. vergleichbare Ischämien (Eckle et al., 2011). Der Ischämieverlauf wurde über drei subkutane Nadelelektroden (ADInstruments, PowerLab 8/30 mit Animal Bio Amp) abgeleitet und EKG-kontrolliert sowie mittels Labchart (Labchart 7Pro, Version 7.3.5) aufgezeichnet. Eine ST-Streckenhebung von >0,5 fache der R-Zacke galt als signifikant und markierte den Beginn der 30-minütigen Ischämie. Im Verlauf wurde das EKG kontinuierlich kontrolliert und der Wundbereich feucht gehalten. Nach Abschluss der verschiedenen Interventionsmaßnahmen wurde die 30-minütige Ischämie durch Entfernen der Gewichte beendet. Die 8-0 Fadenschlaufe verblieb wieder im Subkutangewebe und die Haut wurde wie bei der Initial-OP verschlossen, die Maus extubiert und gewärmt. Nach Verschluss des Thorax erholten sich die Mäuse 7 bzw. 28 Tage. Während der ersten 4 Tage fand alle 12 Stunden eine Gabe von 200 µg Temgesic zur Analgesie statt. Je nach Versuchsgruppe wurde eine A151 Applikation vor bzw. nach Ischämie durchgeführt oder komplett belassen.

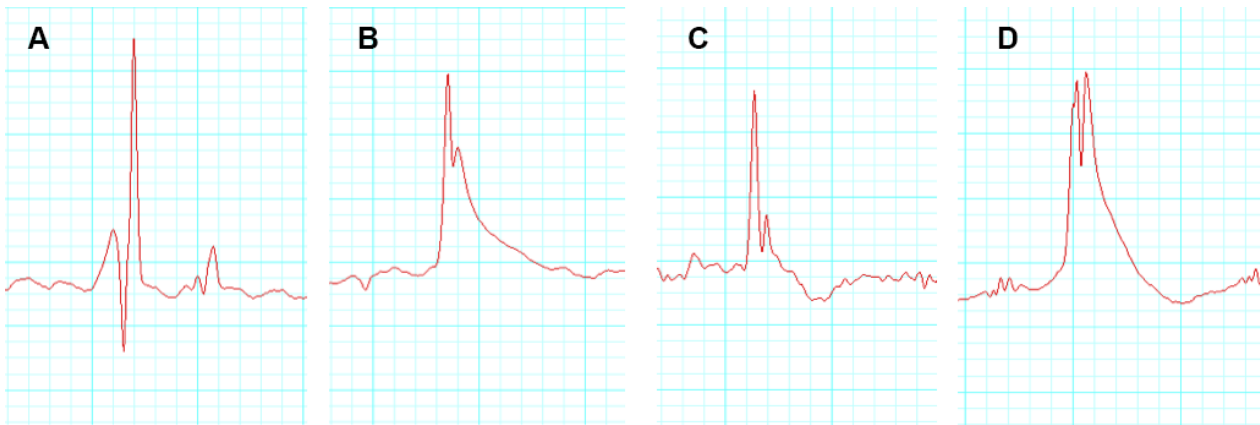


Abb. 8 Beispiel-EKGs

Bild A) zeigt ein Baseline-EKG; Bild B) ein Infarkt EKG nach 5min Okklusion; Bild C) zeigt ein EKG unmittelbar nach Entlastung des Okklusionsfadens; Bild D) zeigt das Reperfusion-EKG 2 Minuten nach Entlastung des Okklusionsfadens

2.4. Messung der Herzfunktion mit dem Leitfähigkeits-Millar-Katheter

Während bildgebende Verfahren wie Echokardiographie oder kardiales MRT funktionelle Messungen liefern, sind diese Messungen in hohem Maße abhängig von Vor- bzw. Nachlast. Vor- bzw. Nachlast-unabhängige Messungen der kardialen Kontraktilität und Relaxation erfordern dynamische Messungen des ventrikulären Drucks und der Volumenverhältnisse über eine Bandbreite von Vorlast und Nachlast. Dieses Verständnis der Druck-Volumen-Beziehung geht auf die wegweisenden Arbeiten von Sagawa und Kollegen zurück (Suga et al., 1980; Sunagawa et al., 1983). Die Untersuchung mit dem Leitfähigkeitskatheter (Millar Instruments, SPR-839NR mit MPVS Ultra) liefert eben diese detaillierten, Vor- bzw. Nachlast-unabhängigen Informationen über die Herzfunktion (Abraham und Mao, 2015). Sie ist der Goldstandard für die funktionelle Beurteilung hämodynamischer Parameter (Clark und Marber, 2013). Eine in-vivo-Anwendung dieser Analysen wurde mit dem technischen Fortschritt und der Entwicklung von Leitfähigkeitskathetern in den 1980er Jahren möglich. Diese ermöglichten es Kass und Kollegen, Druck-Volumen-Schleifenanalysen am Menschen durchzuführen (Kass et al., 1999, 1988). Die Miniaturisierung der Leitfähigkeitskatheter und Verbesserungen der chirurgischen Techniken in den späten 1990er Jahren (Georgakopoulos et al., 1998) machten die Analyse der Herzfunktion von Nagetieren möglich. Dieser Fortschritt hat schnell zu einer weit verbreiteten Anwendung der Druck-Volumen-Schleifen-Analyse geführt und viele Einblicke in die Herzphysiologie von Säugetieren ermöglicht (Cingolani

und Kass, 2011). Die Leitfähigkeit bzw. der Leitwert entsprechen der Konduktanz und werden im Folgenden synonym verwendet.

2.4.1. Prinzip des Leitfähigkeitskatheters

Die physikalische Grundlage bei der Verwendung von Leitfähigkeitskathetern und der Interpretation der daraus gewonnenen Daten ist die Beziehung zwischen Volumen und Leitfähigkeit. Der Leitwert ist negativ proportional zur Spannung, die mittels eines Katheters gemessen wird, dessen proximale Elektroden in der Regel unterhalb der Aortenklappe und dessen distale Elektroden am Apex des linken Ventrikels platziert werden (Baan et al., 1984). Zwischen den Elektroden wird ein elektromagnetisches Feld aufgebaut, in dem Änderungen der Spannung oder des Leitwertes durch Änderungen des Stromflusses zwischen den Elektroden gemessen werden können. Der Leitwert des Blutes ist abhängig von Viskosität, Zusammensetzung und Temperatur und unterscheidet sich deutlich von dem des myokardialen Gewebes. Der signifikante Anteil an der Leitfähigkeit wird durch das Blut im Ventrikel beigetragen, gleichzeitig muss der Beitrag der Ventrikelwand, der als parallele Konduktanz (V_p) bezeichnet wird, von der gemessenen Leitfähigkeit subtrahiert werden, um absolute LV-Volumenmessungen zu erhalten. Genau betrachtet beschreibt V_p den Anteil der Gesamtkonduktanz, der von den Elektroden über das elektrische Feld erfasst wird, aber nicht zum intraventrikulären Volumen gehört, also hauptsächlich das umgebende Myokard (Georgakopoulos und Kass, 2000). Gleichzeitig misst ein Mikromanometer auf dem Katheter den Herzinnendruck. So lassen sich nach Kalibrierung simultane Druck- und Volumendaten in Echtzeit und während der Herzaktion messen und der Herzzyklus in Form einer Druck-Volumen-Kurve aufzeichnen. Die Methoden zur Durchführung dieser Korrektur, auch Saline-Kalibrierung genannt, werden im Folgenden noch detailliert erklärt (siehe 2.4.4.). Die Umrechnung der erfassten Daten in Volumeneinheiten erfolgt anhand der Formel, die von Baan et al. beschrieben wird:

$$V = (1/\alpha) (\rho L^2) [G - G_p],$$

wobei V das Volumen, α ein einheitlicher Feldkorrekturfaktor, ρ der Widerstand des Blutes, L der Abstand zwischen den Elektroden, G der Leitwert und G_p die parallele Konduktanz ist (Pacher et al., 2008). Bemerkenswert ist, dass der einheitliche

Feldkorrekturfaktor bei Mäusen aufgrund der kleinen Kammervolumina annähernd bei 1 liegt, also vernachlässigbar wird.

Während der Messungen wird die Konduktanz als Spannungssignal in Volt^{-1} erfasst und von der Software (Millar PV) automatisch in relative Volumeneinheiten umgerechnet. Die Umrechnung der erfassten relativen Volumeneinheiten in reale Volumina erfolgt mittels einer Kalibrierungsgeraden, die durch die sogenannte RVU-Küvetten-Kalibrierung erstellt wird. Auch diese wird im Folgenden noch erläutert. Die Aufzeichnung der Daten erfolgt mittels MPVS Ultra (Millar Instruments) und PowerLab sowie Labchart, die Auswertung mittels PVAN (Version 3.6, Millar Instruments).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit dem Leitfähigkeitskatheter eine Vielzahl hämodynamischer Daten sowohl Vorlast-abhängig als auch -unabhängig in Echtzeit erfasst werden können. Da die Messung ein sehr invasives Verfahren darstellt, wird sie fast nur im Tiermodell angewandt (Lee et al., 2003).

2.4.2. Narkose, Wiegen und Relaxation

Nach der inhalativen Narkoseeinleitung mit 2% Isofluran bei 0,5 L Sauerstoff/min erfolgte zunächst ein Wiegen der Versuchstiere. Das Mausgewicht wird in der Auswertung für gewichtsabhängige Parameter benötigt und ist daher als Messparameter sehr wichtig. Die Verbringung der Maus auf den OP-Tisch sowie die Intubation erfolgte analog zu den bereits beschriebenen Vorgängen bei Infarzierung nach dem Wiegen auf der Feinwaage. Um Atmungsartefakten bei der Messung der Druck-Volumen-Kurven entgegenzuwirken, erfolgte eine intraperitonealen Applikation von Mivacurium in einer Dosierung von 1,2 mg/kg KG zur Relaxation. Die Narkoseaufrechterhaltung während der Messung wurde mit 1 % Isofluran und 0,5 O₂ l/min durchgeführt.

2.4.3. Katheterisierung des linken Ventrikels

Vor der eigentlichen Messung wurde der Millar-Katheter für 30 Minuten in einer Spritze mit 0,9 % NaCl Lösung bei 37 °C äquilibriert. Nun folgte ebenfalls im Rahmen der Vorbereitung die Druck-Eichung über das Programm MVPS Ultra Control (Millar Instruments, Houston; Texas). Hierbei war darauf zu achten, dass die Sensoren an der Wasser/Luft-Grenze des Katheters mit Flüssigkeit bedeckt waren und kein direkten Kontakt zur Spritze bestand.

Zur Katheterisierung wurde der Intubationshautschnitt erweitert und die Speicheldrüsen sowie der M. sternocleidomastoideus dextra nach lateral mobilisiert. Anschließend wurde die A. carotis communis dextra im medialen Halsdreieck aufgesucht und unter Schonung des Nervus vagus freipräpariert. Es wurden proximal wie distal Blutsperren mittels 6-0 Seidenfäden angelegt. Nun wurde der Katheter mit Mikroinstrumentarium in die A. carotis communis eingebracht und zunächst bis an die Aortenklappe vorgeschoben. Hier folgte eine Druckmessung in der A. aortae unter EKG-Kontrolle. Dann wurde der Katheter kontrolliert retrograd in den linken Ventrikel vorgeschoben bis sich eine physiologische ventrikuläre Druck-Volumen-Kurve zeigte.

2.4.4. Saline Kalibrierung zur Ermittlung der parallelen Konduktanz

Die bereits beschriebene parallele Konduktanz ist Teil der Gesamtkonduktanz, mit der die Ermittlung der Volumina erfolgt. Sie stört die Berechnung insofern, als sie zu erhöhten Volumina führt, wenn sie nicht herausgerechnet wird. Durch die intravenöse Injektion eines hypertonen Kochsalzlösungs-Bolus (10 µl, NaCl 15 %) kann man die parallele Konduktanz aus der Gesamtkonduktanz ermitteln. Durch die Osmolaritätssteigerung erhöht sich kurzzeitig das Konduktanzsignal, während das intraventrikuläre Volumen gleich bleibt. Es kommt somit zu einer Erhöhung der Konduktanz im Ventrikel, während die parallele Konduktanz konstant bleibt. Die gemessenen enddiastolischen und endsystolischen Konduktanzsignale werden von der Software automatisch in Volumeneinheiten umgerechnet und sind proportional zueinander. Dies kann man sich zu Nutze machen und die parallele Konduktanz berechnen, da alle anderen Faktoren ($V(t)$ und Korrekturfaktor a) gleichbleiben. Die sich daraus ergebende Geradengleichung lautet:

$$V_{es} = m \cdot V_{ed} + n$$

(V_{es} = endsystolisches; V_{ed} = enddiastolisches Volumen; m = Steigung;

n = y-Achsenabschnitt)

Ihr Schnittpunkt mit der Geraden $y=x$ ist definiert als das der parallelen Konduktanz entsprechende Volumen (Pacher et al., 2008).

Technisch erfolgt die Bestimmung der parallelen Konduktanz nach Positionierung des Katheters im linken Ventrikel. Die V. jugularis externa der linken Seite wird präpariert und mit einer 10 µl Hamilton Spritze punktiert. Anschließend wurden drei Messungen nach schneller Injektion von 10 µl 15 % NaCl Lösung durchgeführt.

2.4.5. RVU-Küvetten-Kalibrierung

Die Umrechnung der erfassten relativen Volumeneinheiten in reale Volumina erfolgt mittels einer Kalibrierungsgeraden. Dafür wird nach Abschluss der Datenerfassung der Thorax unter Durchtrennung der Rippen in der Medioklavikularlinie eröffnet. Mit einer heparinisierten Spritze wird Blut aus dem linken Ventrikel in eine Kalibrierungsküvette (Millar Instruments, 910-1049) mit mehreren Zylindern von bekannten Volumina gefüllt. Anschließend wird in den Zylindern mit dem Leitfähigkeitskatheter die Konduktanz ermittelt. Bei kontinuierlicher Messung unter Bewegung des Katheters in einem Zylinder wird jeweils der höchste RVU-Wert weiterverwendet. Anhand der in den Zylindern gemessenen Konduktanz und der sich daraus ergebenden relativen Volumeneinheiten wird die Kalibrierungsgerade zur Umrechnung in reale Volumeneinheiten erstellt (Pacher et al., 2008).

2.4.6. Aufzeichnung hämodynamischer Daten

Für die valide Messung hämodynamischer Daten ist die korrekte Positionierung des Katheters im linken Ventrikel essentiell. Diese Position wird wie oben beschrieben erreicht. Alle Druckmessungen wurden in Apnoe und Relaxierung durchgeführt, um Störfaktoren durch die Beatmung oder diaphragmale Bewegungen zu eliminieren. Die erfassten Daten werden mittels LabChart und PVAN ausgewertet. Folgende Parameter wurden erfasst:

Ejektionsfraktion (EF): Die Ejektionsfraktion gibt an, wieviel Prozent des enddiastolischen Volumens in der Systole aus dem Ventrikel ausgeworfen werden.

Cardiac Output (CO): CO entspricht dem Herzzeitvolumen (HZV). CO beschreibt das Volumen des Blutes, das in einer festgelegten Zeitspanne vom Herzen gepumpt wird. Übliche Einheit ist Liter pro Minute, bzw. Herzminutenvolumen.

Cardiac Index (CI): Der *Cardiac Index* oder Herzindex ist ein Parameter zur Beurteilung der Herzleistung und berechnet sich aus dem Quotienten aus HZV und Körperoberfläche. Die Körperoberfläche kann ausgehend von Körpergewicht (KG) und Körpergröße berechnet werden. Bei Mäusen errechnet sich der CI vereinfacht als Quotient aus HZV und KG.

2.4.7. Entnahme und Aufbereitung der Mäuseherzen

Nach analoger Anästhesie und Intubation zur Katheteruntersuchung erfolgte die Eröffnung der Haut entlang der Mittellinie des Thorax und wurde bis zur Mitte des Abdomens fortgeführt. Dann wurde das Diaphragma und die Rippen in der vorderen Axillarlinie beidseits durchtrennt. Das Herz wurde durch Absetzen der Gefäße aus dem Thorax entnommen. Nach Waschen und Ausdrücken des Herzens in kardiopleger Lösung (4 g NaCl p.A.; 1 g Natriumhydrogencarbonat; 2 g Glucose; 3 g 2,3-Butanedione monoxime; 3,8 g EGTA; 0,0002 g Nifedipine; 2 ml Heparin 10000 U/L; 3,73 KCl, gelöst in 1 L 0,9 % NaCl pH 7,2-7,5) wurde die Aorta ascendens mit einer 24 G Viggo kanüliert und mit 4-%iger Zink Formaldehydlösung pH 5,2 (Shandon Zinc Formal-Fixx Concentrate; Thermo Scientific) mit einem Druckgradienten von 60 mmHg retrograd perfundiert (Michael et al., 1999). Durch eine Inzision zwischen linkem Herzohr und linkem Atrium wurde ein 26G Katheter mit einem 100 mm langem PE50 Schlauch eingeführt. Abschließend wurde das Herz in einem mit Zink Formaldehydlösung gefüllten Gefäß für mindestens 12 Stunden (max. 24 Std) bei 7 °C gelagert. Die so fixierten Herzen wurden anschließend aus der Zink Formaldehydlösung entfernt, für mindestens 2 Stunden mit Leitungswasser gewässert und dann bis zur weiteren Verarbeitung in 70 % Ethanol bei 7-8 °C gelagert.

2.5. Ausschlusskriterien

Bei den chirurgischen Methoden handelt es sich um technisch höchst anspruchsvolle operative Maßnahmen, bei denen eine Vielzahl möglicher Komplikationen denkbar sind, die zu einem Ausschluss der Tiere führen. Die möglichen Komplikationen wurden im Rahmen der Projektvorbereitung erfasst.

Im Rahmen der chirurgischen Interventionen sind als Komplikationen größere Blutungen durch Verletzung epikardialer Venen und des RIVA sowie schwere Herzrhythmusstörungen aufgrund der Manipulation am Herz denkbar. Aufgrund der Thoraxeröffnung kann es außerdem zu Ventilationsstörungen und nach Thoraxverschluss zum Pneumothorax und gegebenenfalls Spannungspneumothorax kommen. Auch eine postoperative Sepsis und Wundinfektionen gehören zum Spektrum der möglichen Komplikationen. Im Rahmen der I/R kann es zu ausgedehnten Infarkten mit konsekutivem Versterben des Versuchstieres kommen. Eine fehlende ST-Streckenhebung sowie ein

fehlendes Reperfusion-EKG führen ebenso zum Versuchsausschluss. Bei der Herzkatheterisierung sind Blutungen aus der A. carotis bzw. ein Abreißen derselben beim Einführen des Katheters denkbar. Außerdem ist es möglich, dass sich der Katheter aufgrund postoperativ entstandener intrathorakaler Verwachsungen nicht in das Herz vorschieben lässt.

Insgesamt versterben im Rahmen eingetretener Komplikationen ca. 20 % der Versuchstiere bzw. werden vorzeitig aufgrund von technischen Komplikationen aus dem Versuch oder der Auswertung genommen.

2.6. Histologische Techniken

2.6.1. Fixierung zur histologischen Auswertung

Nach der bereits beschriebenen Entnahme der Herzen wurden diese für die histologische Auswertung 18 - 24 Stunden in Z-Fix (1 % Zinc Normal Fixx; Thermo Scientific, Kalamazoo, US) im 15 ml Falcon Tube (Greiner, Frickenhausen, DE) im Kühlschrank zur Fixierung gelagert. Im Anschluss folgte eine Rehydrierung der Proben unter fließendem, kaltem Leitungswasser für ca. 2 - 4 Stunden und schließlich eine Lagerung in 70 % Isopropanol (VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois FR) im Kühlschrank oder direktes Einbetten. Vor Einbettung wurden die Herzen aus dem Alkohol entfernt, auf der Feinwaage (Explorer, OHAUS GmbH, Giessen DE) gewogen und die Herzgewichte in Excel notiert. Anschließend wurden die Herzen in einzelnen Histokästchen im Gewebereinbettautomat vom Typ Karussell Modell STP-120 (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE) in aufsteigenden Isopropanol-Konzentrationen entwässert, dann in Xylol aufbereitet und paraffiniert. Wir nutzten das Versuchsprotokoll Programm P1 des Gewebereinbettautomaten. Die eigentliche Einbettung erfolgte mit Paraffin (Typ 6 Richard Allan Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) am Einbettautomat Microm EC-350-1/2 (Micron, Boise, Idaho, USA). Um eine gleichbleibende Lage der Herzen im Paraffin zu gewährleisten, wurden die Herzen mit der Klappenebene in Richtung Paraffinoberkante fixiert. Durch Kühlung der Paraffinblöcke für min. 1,5 Stunden bei -10 °C wurde eine gleichmäßige Qualität der Paraffinstruktur gewährleistet. Anschließend wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.6.2. Schnitthanfertigung

Der Schnitt der eingebetteten Herzen erfolgte am Microtom von Leica Modell SM 2000 R. Es wurden jeweils 10 Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt, dann wurden 250 µm Gewebe verworfen und eine neue Schnittebene á 10 Schnitte angefertigt. Schnittbeginn war bei optischer Erkennbarkeit des beginnenden rechten und linken Ventrikels im Gewebeblock. Die so entstandenen Schnittserien ermöglichten mehrere Auswertungsmethoden auf derselben Ventrikelhöhe. Je nach Herzgröße entstanden so ca. 90-120 Schnitte bzw. 9-12 Schnittebenen. Die entstandenen 5 µm starken Schnitte wurden zuerst in ein 38°C warmes Wasserbad gelegt und dann mit einem Pinsel auf einen Histobond® Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE) übertragen. Schließlich gingen die Schnitte für min. 24 h im Venticell® Heizschrank bei 42 °C in die Trocknung um eine ausreichende Fixation auf dem Objektträger zu gewährleisten.

2.6.3. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zunächst wurde zur Orientierung jeweils der erste Schnitt jeder 10er Schnittserie mit den Farbstoffen Hämatoxylin und Eosin gefärbt (H&E-Färbung). Sie ist eine Routinefärbung, bei der das aufbereitete Hämatoxylin saure Strukturen, insbesondere Zellkerne, blau färbt und das Eosin Strukturen, wie etwa die Plasmaproteine oder Kollagen, rötlich färbt. Man spricht von eosinophilen Strukturen. Wir arbeiteten mit folgendem Färbeprotokoll:

Die Deparaffinierung der Schnitte erfolgte in 3 Xylolbädern à 10 Min. Danach wurde eine absteigende Isopropanolreihe zur Rehydrierung von zweimal 98 sowie einmal 90 und 70 % Alkohol durchlaufen, um anschließend kurz mit destilliertem Wasser den Alkohol abzuspülen. Die Kernfärbung erfolgte in Hämatoxylinlösung (nach Mayer: 1 g Hämatoxylin; 0,2 g NaJo₃; 50 g Kalialaun, 50 g Chloralhydrat; 1 g Zitronensäure; 1000 ml Aquadest; 10 ml Hämalaunlösung (alle Substanzen von Fa. Merck KGaA, Darmstadt, DE)) für 5 Minuten. Die Schnitte wurden nun 5 Minuten unter fließendem warmem Wasser gewässert und dann in 0,5 % Eosin für 1 - 2 Minuten plasmagefärbt. Anschließend wurde dreimal in Aqua dest. gespült und es folgte die Differenzierung über 3 - 6-faches Eintauchen in aufsteigender Reihenfolge in 70 und 90 % Isopropanol sowie zweimal 5 Minuten in 98 % Isopropanol. Vor dem Eindeckeln wurden die gefärbten Schnitte noch 3 x 7 Minuten in Xylol gebadet. Das Eindecken erfolgte mit Roti Histokitt II Xylol löslichem

Eindeckmedium (Entellan VWR Art.Nr. 1079600500) und 18 x 18 mm Deckgläsern. Alle Arbeitsschritte wurden unter dem Abzug durchgeführt.

2.6.4. Auswahl der histologischen Präparate; Höhenbestimmung am H&E Schnitt

Die Schnitte der jeweiligen Schnittserie eines Herzens, welche die H&E-Färbung durchlaufen haben, dienen der Höhenbestimmung zur weiteren Auswertung. Durch dieses Verfahren konnten die unterschiedlich großen Mäuseherzen besser miteinander verglichen werden. Benutzt wurde dazu ein Mikroskop von Olympus MODEL BX41TF mit 10X Objektiv: Zunächst wurde die Höhe der Ligatur, der Einstichstelle des Fadens um den RIVA, bestimmt. Sie kennzeichnet sich durch ein sehr zellreiches Perikard sowie Myokard in der Umgebung der RIVA. Physiologisch liegt das Perikard dem Myokard als lockere Verschiebeschicht auf, ohne einwandernde Entzündungszellen. Der Zellreichtum begründet sich durch die vorangegangene Inflammationsreaktion auf den Einstich. Es wurden sowohl die „Über-Ligatur“ (noch keine Verwachsungen/Infiltrationen) als auch die „Unter-Ligatur“ (keine Verwachsungen/Infiltrationen mehr) Schnittebenen bestimmt. Die dritte zu bestimmende Schnittebene war diejenige unter den Papillarmuskeln. Sie ist definiert als Ebene, in der die drei isolierten Papillarmuskeln nicht mehr ins Ventrikellumen reichen, sondern nur noch einzelne Trabekel als randständige Vorwölbungen erkennbar sind. Die Papillarmuskelzellen haben im Gegensatz zu den längsgeschnittenen Zellkernen des Myokards einen runden Zellkern. Diese Ebene definierte im Anschluss die Schnittserie für die Sirius-Rot (SR) Färbung, da davon auszugehen ist, dass auf dieser Höhe die maximale Ausdehnung der Infarkt Narbe liegt. Abhängig vom Präparat und dessen Qualität kann ggf. eine Ebene höher oder tiefer die ideale Höhe zur Auswertung liegen, weshalb wir sowohl eine Ebene über wie unter der „Ebene unter den Papillarmuskeln“ Schnitte für die SR-Färbung und Auswertung genommen haben. Dies ermöglichte uns die Infarkt Narbe auf insgesamt drei aneinander liegenden Schnittebenen beurteilen zu können und ein holistischeres Bild des Herzens gewinnen zu können.

2.6.5. Sirius-Rot-Färbung

Nach der Höhenbestimmung wurden von jedem Herzen drei verschiedene Ebenen wie beschrieben mit SR gefärbt. Die SR Färbung ist eine histologische Färbetechnik, um Kollagen im Gewebe anzufärben (Nielsen et al., 1998). Es stellt sich hellrot dar, während das gesunde Myokard hellgelb wird. Wir arbeiteten mit folgendem Färbeprotokoll:

Analoges Vorgehen beim Deparaffinieren und Rehydrieren der Paraffinschnitte wie bei der H.E. Färbung (siehe oben). Die Färbung erfolgte in Sirius Red 0,1 % (0,1 g Direkt 80 (Aldrich chemical Company, WI, USA) + 100 ml gesättigte Pikrinsäure 5 - 10 min stehen lassen und filtrieren) für 15 Minuten. Die Dehydrierung der gefärbten Präparate erfolgte durch 5 x Eintauchen in Aqua dest., 70 % und 90 % Isopropanol, 10 x Eintauchen in zwei Bädern mit 100 % Isopropanol und 15 x Eintauchen in drei Xylolbädern. Das Eindeckeln erfolgte analog zur H.E. Färbung (alle Substanzen ohne explizite Angaben von Fa. Merck KGaA, Darmstadt, DE).

2.6.6. α -SMAc Färbung

Diese immunhistochemische Färbetechnik dient dazu das α -Aktin der glatten Muskelzellen („*alpha-smooth muscle actin*“, α -SMAc) im Gewebe anzufärben. Das α -Aktin wird sowohl von arteriellen Gefäßen wie auch Myofibroblasten im Gewebe exprimiert und kann als Surrogatparameter für Proliferations- bzw. Differenzierungsreize verwendet werden. Die niedrigere Expression des α -SMAc dient als Hinweis auf reduzierte Kollagenauf- bzw. umbauvorgänge. Bei der Färbung binden monoklonale Anti-Aktin-Antikörper an das α -Aktin, während die anderen Aktin Isoformen nicht detektiert werden. Anschließend werden die Antikörper mit einem Mouse on Mouse (M.O.M.)-Peroxidase-Kit gefärbt und sichtbar gemacht. Entdeckt wurde die Färbung bereits 1986 (Skalli et al., 1986).

Zur Vorbereitung für die Färbung wurden die Objektträger für ca. 30 Minuten in 3 % H₂O₂ inkubiert und in PBS 2 x 5 Minuten ausgewaschen. Dann folgte eine Inkubation mit Maus IgG-Block (MKB-2213-1, Vector Laboratories CA US, 3 Tropfen Stammlösung auf 10 ml PBS) für 60 Minuten und ein erneutes Auswaschen in PBS 2 x 5 Minuten. Für das Aufbringen des 1A4 SM-Aktin-Antikörperklons (α -smooth muscle actin monoclonal anti mouse, A2547, Sigma-Aldrich US) mussten die Objektträger zunächst mit M.O.M.-Protein-Verdünnungslösung (480 μ l Proteinkonzentrat in 6 ml PBS) für 5 Minuten inkubiert

werden. Dann wurde der Antikörper mit der M.O.M.-Lösung 1:250 verdünnt (10 µl AK + 990 µl M.O.M.-Lösung = 1:100, davon 800 µl + 1200 µl M.O.M.-Lösung = 1:250) und nach dem Ausklopfen der Präparate für 30 Minuten mit SM-Aktin AK. 1:250 inkubiert. Das Eindeckeln erfolgte analog zur H.E. Färbung (alle Substanzen ohne explizite Angaben von Fa. Merck KGaA, Darmstadt, DE).

2.6.7. Auswertung der histologischen Untersuchung

2.6.7.1. Sirius-Rot Kollagenauswertung

Die SR-gefärbten Herzschnitte wurden mit 4-facher Vergrößerung (5 ms Belichtungszeit; Lichtintensität 4) fotografiert. Da bei 4-facher Vergrößerung nicht der gesamte Ventrikel auf ein Foto passt, wurden mit Hilfe der Analyse Software AnalySIS® 3.0 (Olympus Soft Imaging System GmbH, 1999) mehrere Einzelaufnahmen eines Schnittes zu einem Gesamtfoto zusammengeführt. Es wurde ein Weißabgleich durchgeführt und eine Umwandlung des Übersichtsbildes aus dem RGB-Farbraum (RotGrünBlau) in ein HSI (*Hue Saturation Intensity*) Abbild durchgeführt. Durch diese Bildoptimierungen wurden Kontraste verstärkt, um das Kollagen tiefrot und intaktes Myokard intensiv gelb darzustellen. Durch die manuelle Nachbearbeitung der Aufnahmen mittels Photoshop (Adobe Photoshop CS2 Vers.: 9.02; ©1990-2005) konnte Kollagen, das nicht zur Infarktnarbe gehörte (wie z.B. Perikard und Gefäßwänden), sowie der für die Auswertung der Narbenfläche irrelevante rechte Ventrikel aus dem Bild entfernt werden. Somit entstand eine Aufnahme, die mit Hilfe des Programmes MakroPrisca (AnalySIS® 3.0 Version 2.8; Olympus Soft Imaging System GmbH, 1999) ausgewertet werden konnte. Anschließend wurde der prozentuale Anteil des kollagenösen Infarktgewebes am linken Ventrikel gemessen sowie die Gesamtfläche der Kollagennarbe und die Fläche des Lumens im linken Ventrikel. Dies geschah, indem die weißen Phasen, die leeren Flächen im Testbild, den gefärbten Bereichen, insbesondere der „*Area of interest*“ (tiefrotes Kollagen der Infarktnarbe), gegenübergestellt wurden. Die Markierung der jeweiligen Bildbereiche fand über Farbschwellenwerte statt, daher war eine vorherige sorgfältige Kontrolle des Kontrastes und der Bildqualität unabdingbar. Die Farbschwellenwerte der Auswertung wurden für die jeweiligen Schnittebenen dokumentiert, um eine gleichbleibende Qualität sowie Reproduzierbarkeit der Auswertung zu gewährleisten. Die gemessenen prozentualen Anteile der drei SR-gefärbten Ebenen eines Mausherzen

wurden anschließend gemittelt, um eine durchschnittlichen Narbengröße für jedes Herz angeben zu können. Alle Ergebnisse wurden nach Versuchsgruppen sortiert in Excel übertragen und mit den verwendeten Farbschwellenwerten verknüpft.

2.6.7.2. α -SMAc Auswertung

Die α -SMAc gefärbten Schnitte wurden mit 200-facher Vergrößerung (2 ms Belichtungszeit; Lichtintensität 3-4) fotografiert. Es wurden immer drei Detailbilder des Infarktareals angefertigt. Anschließend erfolgte die Nachbearbeitung mittels Photoshop analog zur SR Auswertung und die Auswertung mittels MakroPrisca (AnalySIS® 3.0 Version 2.8; Olympus Soft Imaging System GmbH, 1999).

2.7. Statistik

Alle Ergebnisse sind als Median \pm Interquartilsabstand $X_{0,25} - X_{0,75}$ (IQR) dargestellt. Nach Testung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk führten wir einen *one way ANOVA*-Test sowie einen *Tukey's multiple comparison test* (Tukey's-Test) durch. Individuelle $P < 0.05$ wurde als signifikant betrachtet. GraphPad InStat Statistik Software Version 8.1 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) wurde für die statistische Analyse genutzt.

2.8. Materialien und Geräte

2.8.1. Allgemeine Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Analysenwaage	Explorer, OHAUS GmbH, Giessen DE
Trockenschrank	Venticell, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Planegg DE
Entwässerungskarussell	STP120, ehem. Microm jetzt ThermoFisher Scientific
Ausgießstation	Microm EC 350-1, ehem. Microm jetzt ThermoFisher Scientific
Kühlplatte	Myr EC 350-2, ehem. Microm jetzt ThermoFisher Scientific
Kühlschrank (+4°C)	Liebherr Modell UK 1524 Index 23D/001, Liebherr GmbH, Ochsenhausen DE
Mikrotom	Leica SM2000R, Techno-Med GmbH, Bielefeld DE
Streckplatte	Leica HI 1210, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch DE
Wasserbad	Leica HI 1220, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch DE
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Mikroskop	Olympus BX41, Olympus, Hamburg DE
Mikroskopkamera	Olympus DP70
cellF	Olympus Software Image System (OSIS), Münster DE
AnalySIS®	Olympus Software Image System (OSIS), Münster DE
PVAN	Millar Instruments, Houston, TX, US

Tabelle 1 Allgemeine Laborgeräte

2.8.2. Verbrauchsmaterialien & Chemikalien

Material bzw. Chemikalien	Hersteller
Filterpapier	MN 615 ¼ REF 531 018 (Macherey-Nagel, Düren DE)
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt DE
Objektträger	Marienfeld HistoBond, Paul Marienfeld GmbH & CoKG, Lauda-Königshofen DE
Deckgläser	Walter-CMP GmbH & Co, Kiel DE
Lagerungsboxen	SHUR/Stor Filing System, Triangle Biomedical Sciences, Durham NC US
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt DE
Natriumiodat	Merck KGaA, Darmstadt DE
Kalialaun	Merck KGaA, Darmstadt DE
Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt DE
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt DE
Eosin G Lösung 0,5% wässrig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe DE
Pikrinsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt DE
Direkt Red 80	Aldrich chemical Company, WI, USA
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt DE
Isopropanol	VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois FR
Aqua dest.	Behropur Wasservollentsalzer, behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf DE
Xylol	VWR International S.A.S, Fontenay-sous-Bois FR
Paraffin	Type 3, 6 & 9, ThermoFisher Scientific US
PBS	Gibco, ThermoFisher Scientific US
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt DE
M.O.M. IgG Block	Vector Laboratories CA US
1A4 SM-Aktin-AK	Sigma-Aldrich US

Tabelle 2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

3. Ergebnisse

3.1. Effekte von STING^{-/-} auf kardiale Funktion und Narbenbildung im Vergleich zu WT-Mäusen

3.1.1. Narbenbildung in STING^{-/-} vs. WT

Bereits in den mikroskopischen Übersichtsaufnahmen in 4-facher Vergrößerung erkennt man die Unterschiede in der Narbengröße. 28 Tage nach MI sieht man mikroskopisch regelhaft größere und solidere Infarkt Narben bei den WT-Tieren als bei den STING^{-/-} Tieren. Abbildung 10 zeigt hier einige repräsentative Herzschnitte.



Abb. 9 Repräsentative Herzschnitte (eigene Aufnahme)

Die obere Zeile sind WT Tiere, die untere Zeile STING^{-/-}. Alle Schnitte sind SR gefärbt, das kollagenöse Narbengewebe zeigt sich hellrot.

Die Narbenbildung nach 28 Tagen post MI wurde anhand der SR-Färbung planimetrisch quantifiziert und zeigte sich wie in der Abbildung 10 dargestellt bei der STING^{-/-} Versuchsgruppe (n=10) im Median mit 8,1 % im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe (n=12) mit Median 13,25 % signifikant verringert (Median 13,25 % (IQR 11,68 - 15,04 %) vs Median 8,1 % (IQR 6,47 - 12,43 %)). Sowohl die WT (n=5, Median 1,13 % (IQR 0,72 - 1,87)) als auch die STING^{-/-} sham Gruppen (n=5, Median 2,128 (IQR 1,65 - 2,34 %)) zeigen eine vernachlässigbar geringe Narbenbildung, was für ein wenig invasives operatives Vorgehen spricht.

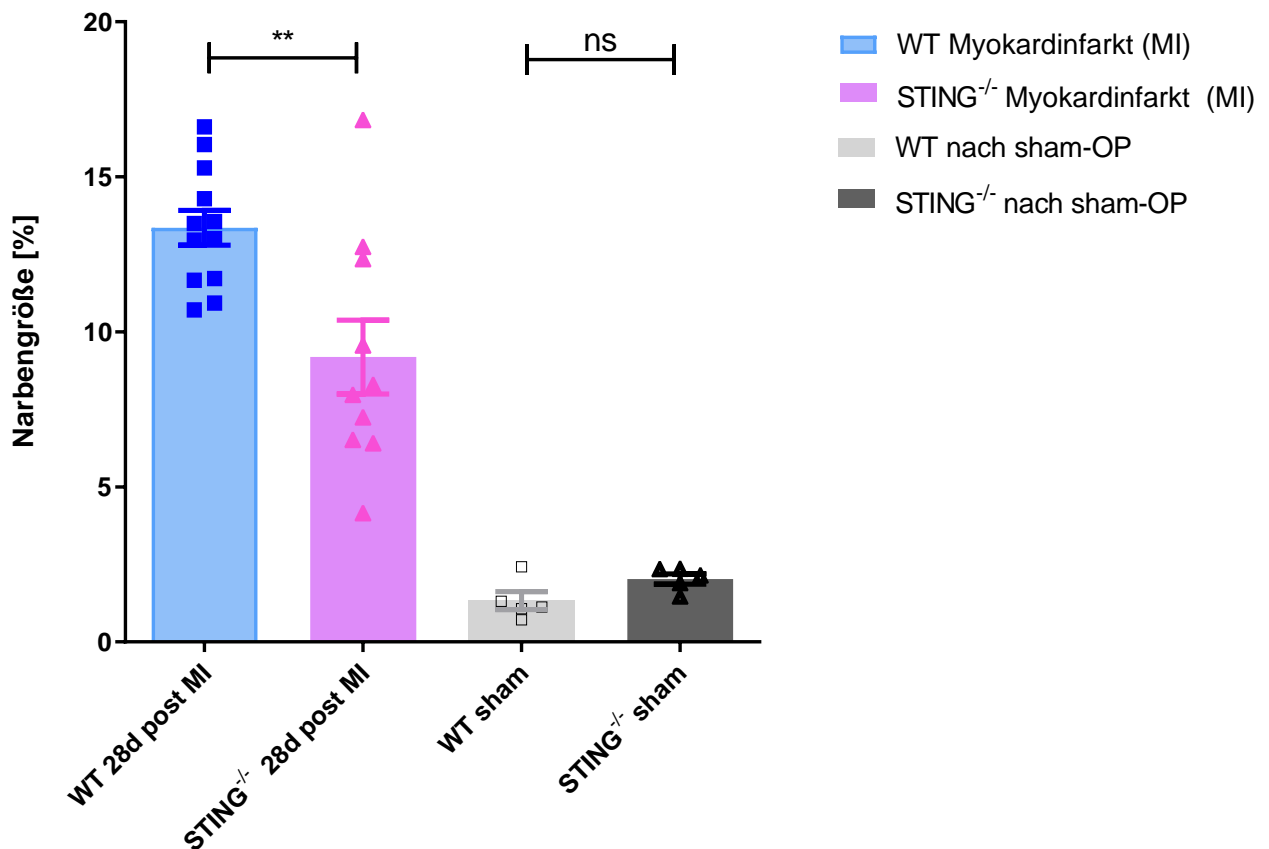


Abb. 10 Planimetrische Analyse der Narbenbildung in % des linken Ventrikels

Die Streudiagramme (Scatterplots) zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM) ** kennzeichnet einen statistischen Unterschied im Tukey's multiple comparison test (mean diff. 4,169; 95 % CI of difference 1,280 – 7,059); ns kennzeichnet keinen signifikanten Unterschied (mean diff. -0,6936; 95 % CI of difference -4,961 - 3,574). WT 28d post MI n=12, STING^{-/-} 28d post MI n=10, WT sham n=5, STING^{-/-} sham n=5.

Auch bei detaillierter mikroskopischer Analyse unter 10-facher Vergrößerung erkennt man eindeutig in der STING^{-/-} Gruppe eine geringere und verzweigtere Narbenbildung im Vergleich zur WT Gruppe, die eher dichte und flächigere Narben zeigt. Dies spricht dafür, dass das Remodelling in der STING^{-/-} Gruppe vorteilhafter verläuft und bereits abgeschlossen ist, während es bei WT noch im Gange ist, die Heilung also verzögert stattfindet.

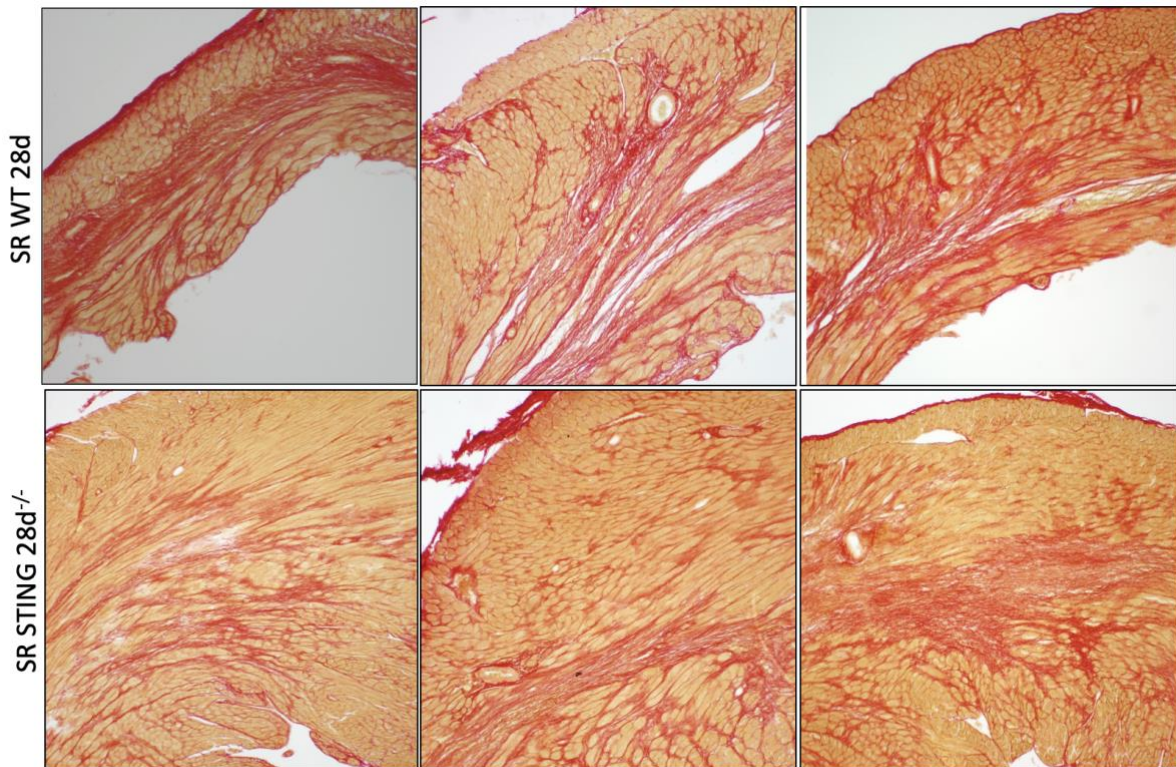


Abb. 11 Repräsentative SR-Detailaufnahmen des linken Ventrikels 28 Tage nach 30-minütiger Ischämie (eigene Aufnahme)
Die obere Zeile sind WT Tiere, die untere Zeile $STING^{-/-}$. Alle Schnitte sind SR gefärbt, das kollagenöse Narbengewebe zeigt sich hellrot.

Die α -SMAc-Färbung zeigt bei detaillierter mikroskopischer Analyse mit 10-facher Vergrößerung, dass sich in der $STING^{-/-}$ Gruppe weniger Myofibroblasten darstellen als bei den WT-Tieren. Dies spricht dafür, dass der Gewebeumbau bei der $STING^{-/-}$ Gruppe vermutlich schon abgeschlossen ist, während das Remodelling bei WT noch im vollen Gange ist, die Heilung also verzögert stattfindet.

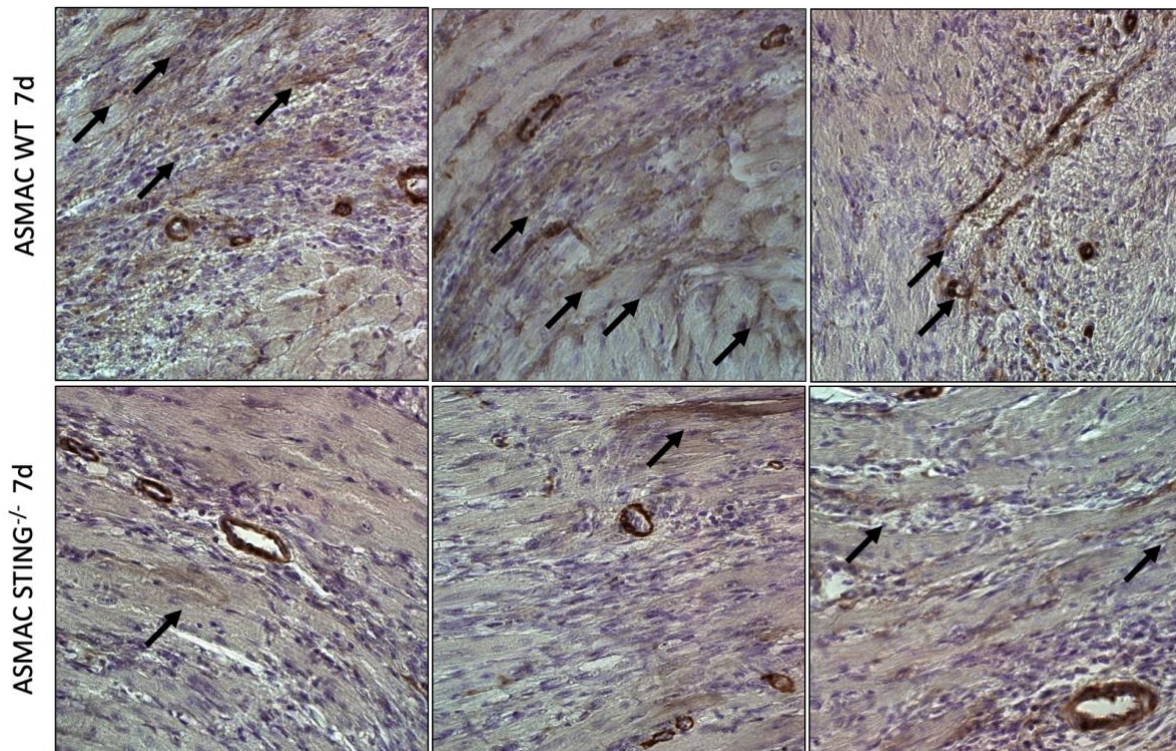


Abb. 12 Repräsentative α -SMAC-Detaillenaufnahmen des linken Ventrikels 7 Tage nach 30-minütiger Ischämie (Aufnahmen der Arbeitsgruppe)
Die obere Zeile sind WT Tiere, die untere Zeile $STING^{-/-}$. Alle Schnitte sind α -SMAC gefärbt, die Myofibroblasten sind beispielhaft mit schwarzen Pfeilen markiert.

3.1.2. Ejektionsfraktion & Cardiac Index bei $STING^{-/-}$ vs. WT

Die Ejektionsfraktion (EF) und der “*Cardiac Index*” (CI) waren wie in der Abbildung 13 und 14 dargestellt bei der $STING^{-/-}$ Versuchsgruppe (n=10) signifikant höher im Verhältnis zur Wildtyp-(WT)-Kontrollgruppe (n=12). Die EF betrug in WT-Mäusen im Median 19 % vs. 38 % in $STING^{-/-}$ (IQR 16 - 28 % vs. 33 - 41 %). Der CI betrug im WT im Median 230 vs. 400 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ (IQR 189 - 318 vs. 347 - 486 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$). In den beiden sham Gruppen (n jeweils 5) zeigte sich im Median eine vergleichbare EF und CI (35 % (IQR 31 – 40 %) vs. 40 % (IQR 35 -45 %)) und somit eine vergleichbare OP-Technik (Tukey’s-Test (mean diff. -4,496; 95% CI of difference -15,45 - 6,462). Dies steht im Einklang mit den histologisch kleineren Narben der $STING^{-/-}$ Versuchsgruppe.

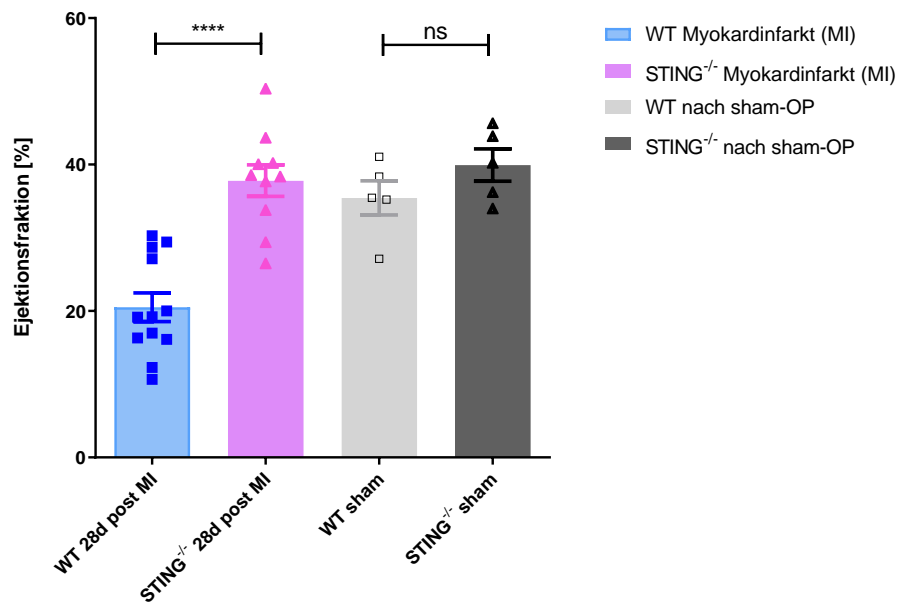


Abb. 13 Statistische Analyse der Ejection Fraction (EF) in %

Die Streudiagramme (Scatterplots) zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). **** kennzeichnet einen statistischen Unterschied im Tukey's-Test (mean diff. -17,28; 95 % CI of difference -24,70 - -9,861); ns kennzeichnet das Fehlen einer Signifikanz (mean diff. -4,496; 95 % CI of difference -15,45 - 6,462).

WT 28d post MI n=12, STING^{-/-} 28d post MI n=10, WT sham n=5, STING^{-/-} sham n=5.

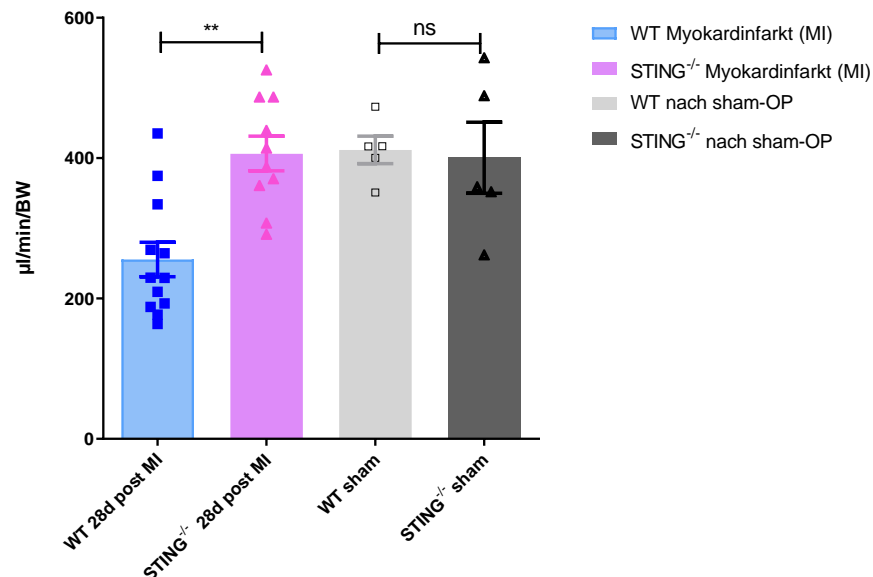


Abb. 14 Statistische Analyse des „Cardiac Index“ (CI) in µl/min/gBW

Die Streudiagramme (Scatterplots) zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). ** kennzeichnet einen statistischen Unterschied im Tukey's-Test (mean diff. -150,9 µl/min/gBW; 95 % CI of difference -248,1 - 53,67); ns kennzeichnet das Fehlen einer Signifikanz (mean diff. 11,16; 95 % CI of difference -132,4 - 154,7).

WT 28d post MI n=12, STING^{-/-} 28d post MI n=10, WT sham n=5, STING^{-/-} sham n=5.

3.2. Narbenbildung in TLR9^{-/-} Tieren nach Präkonditionierung mit A151

Abbildung 16 zeigt zunächst die TLR9^{-/-}-Narbenbildung, planimetrisch quantifiziert anhand der SR-Färbung, bei präkonditionierender Gabe von PBS, ODN-Ctrl. und ODN-A151 16h vor 30-minütiger Infarzierung. In TLR9^{-/-} zeigt sich ein narbenreduzierender Effekt durch ODN-A151 im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (Median 17,41 % (IQR 13,75 - 19,01 %, n=6) vs. Median 8,68 % (IQR 6,82 - 11,59 %, n=7)) sowie zur ODN-Ctrl.-Gruppe (Median 12,50 % (IQR 11,10 - 14,85 %, n=10) vs. Median 8,68 % (IQR 6,82 - 11,59 %, n=7)). Dies zeigt, dass die A151 Applikation ihren Effekt nicht primär über den TLR9 Rezeptor ausübt.

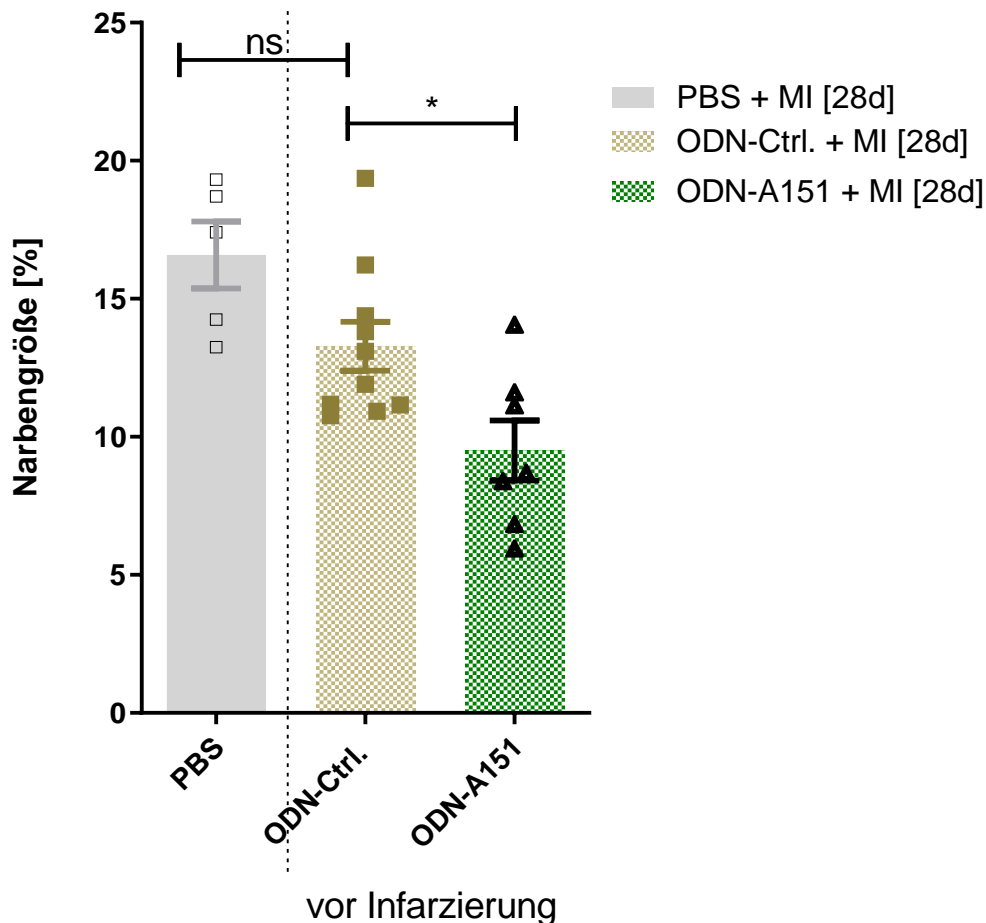


Abb. 15 Planimetrische Analyse der Narbenbildung in % des linken Ventrikels in TLR9^{-/-} Mäusen

Die Streudiagramme (Scatterplots) zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). * kennzeichnet einen statistischen Unterschied im Tukey's-Test (mean diff. 3,771; 95 % CI of difference 0,2701 – 7,271); ns kennzeichnet das Fehlen einer Signifikanz (mean diff. 3,306; 95 % CI of difference -0,5842 – 7,197).

PBS n=6, ODN-Ctrl. n=10, ODN-A151 n=7.

3.3. Narbenbildung nach Präkonditionierung sowie therapeutischer Gabe mit A151

Abbildung 16 zeigt den Effekt von A151 auf die Narbengröße bei präkonditionierender sowie therapeutischer Gabe in WT-Mäusen. Statistisch zeigt sich bei prophylaktischer Gabe im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (n= 12, Median 12,50 % (IQR 12,23-14,86 %)) sowie zur ODN-Ctrl.-Gruppe (n=7, Median 12,42 % (IQR 10,49-14,19 %)) eine signifikante Reduktion der Narbengröße bei ODN-A151 (n=9, Median 9,33 % (IQR 7,46-9,93 %)). Bei therapeutischer Gabe stellt sich diese Reduktion in der ODN-A151-Gruppe (n=7, Median 8,33 % (IQR 7,41-12,24 %)) im Vergleich zur ODN-Ctrl.-Gruppe (n=10, Median 13,80 % (IQR 11,39-16,08 %)) ebenso dar. Dies bestätigt die Wirksamkeit des ODN-A151.

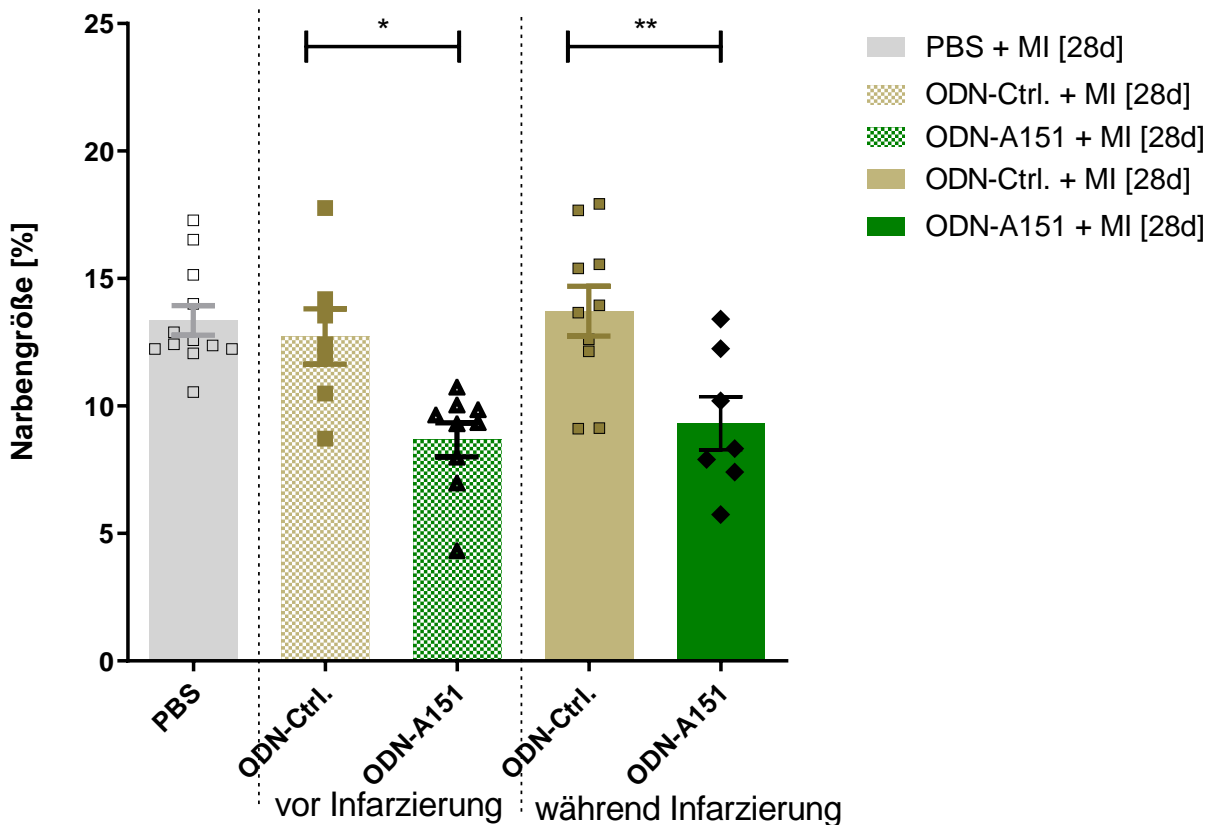


Abb. 16 Planimetrische Analyse der Narbenbildung in % des linken Ventrikels in WT-Mäusen

Die Streudiagramme (Scatterplots) zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). ** kennzeichnet einen statistischen Unterschied im Tukey's-Test (mean diff. 4,399; 95 % CI of difference 0,8360 – 7,963); * kennzeichnet einen statistischen Unterschied im Tukey's-Test (mean diff. 4,051; 95 % CI of difference 0,4074 – 7,695). PBS n=12, vor Infarzierung ODN-Ctrl. n=7, vor Infarzierung ODN-A151 n=9, während Infarzierung ODN-Ctrl. n=10, während Infarzierung ODN-A151 n=7.

3.4. Cardiac Index in TLR9^{-/-} Tieren nach präkonditionierender Applikation von A151

Abbildung 17 zeigt den „*Cardiac Index*“ (CI) der präkonditionierenden TLR9^{-/-} Tiere. Der CI ist bei der präkonditionierenden Applikation des ODN-A151 (n=8, Median 379,0 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ (IQR 358,0 – 450,1 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$)) signifikant höher als bei der ODN-Ctrl.-Gruppe (n=11, Median 232,4 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ (IQR 175,9 – 298,8 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$)) oder der PBS-Vergleichsgruppe (n=7, Median 233,0 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ (IQR 189,2 – 282,7 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$)). Dies zeigt ebenfalls, dass die A151 Applikation ihren Effekt nicht primär über den TLR9 Rezeptor ausübt. Die funktionellen Ergebnisse decken sich mit den histologischen Ergebnissen (siehe Abb. 16).

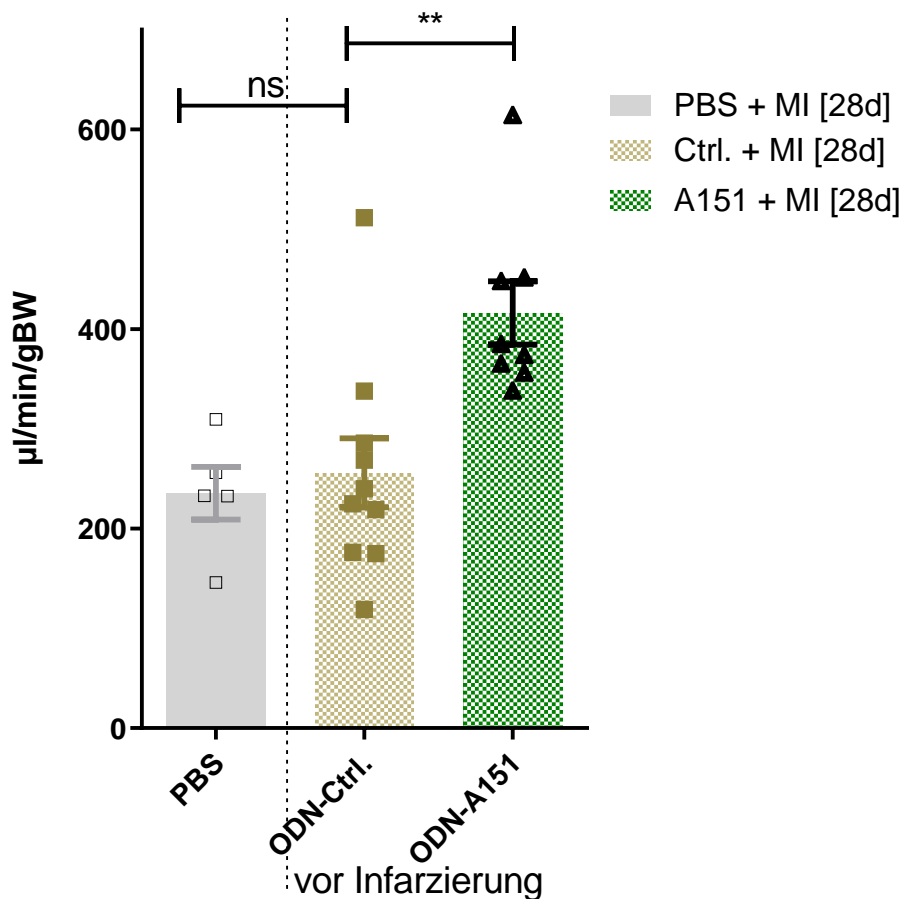


Abb. 17 Statistische Analyse des „*Cardiac Index*“ (CI) in $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ in TLR9^{-/-}. Die Streudiagramme (Scatterplots) zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). ** kennzeichnet einen statistischen Unterschied im Tukey's-Test (mean diff. -160,3 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$; 95 % CI of difference -273,5 – -47,14 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$); ns kennzeichnet das Fehlen einer Signifikanz (mean diff. -20,43 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$; 95 % CI of difference -151,1 – 110,2 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$). PBS n=7, ODN-Ctrl. n=11, ODN-A151 n=8.

3.5. Cardiac Index nach Präkonditionierung sowie therapeutischer Gabe mit A151

Abbildung 18 zeigt den Effekt von A151 auf den „*Cardiac Index*“ (CI) bei prophylaktischer sowie therapeutischer Gabe in WT-Mäusen. Statistisch zeigt sich bei prophylaktischer Gabe im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe (n=11, Median 92,31 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ (IQR 83,83 – 172,9 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$)) sowie zur ODN-Ctrl.-Gruppe (n=6, Median 184,1 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ (IQR 151,0 – 247,6 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$)) eine signifikante Verbesserung des CI bei ODN-A151 (n=9, Median 364,6 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ (IQR 315,7 – 467,7 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$)). Bei therapeutischer Gabe stellt sich diese Verbesserung in der ODN-A151-Gruppe (n=9, Median 399,2 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ (IQR 285,9 – 538,2 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$)) im Vergleich zur ODN-Ctrl.-Gruppe (n=11, Median 246,4 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ (IQR 181,8 – 279,2 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$)) ebenso dar. Die funktionellen Ergebnisse decken sich mit den histologischen Ergebnissen (siehe Abb. 16).

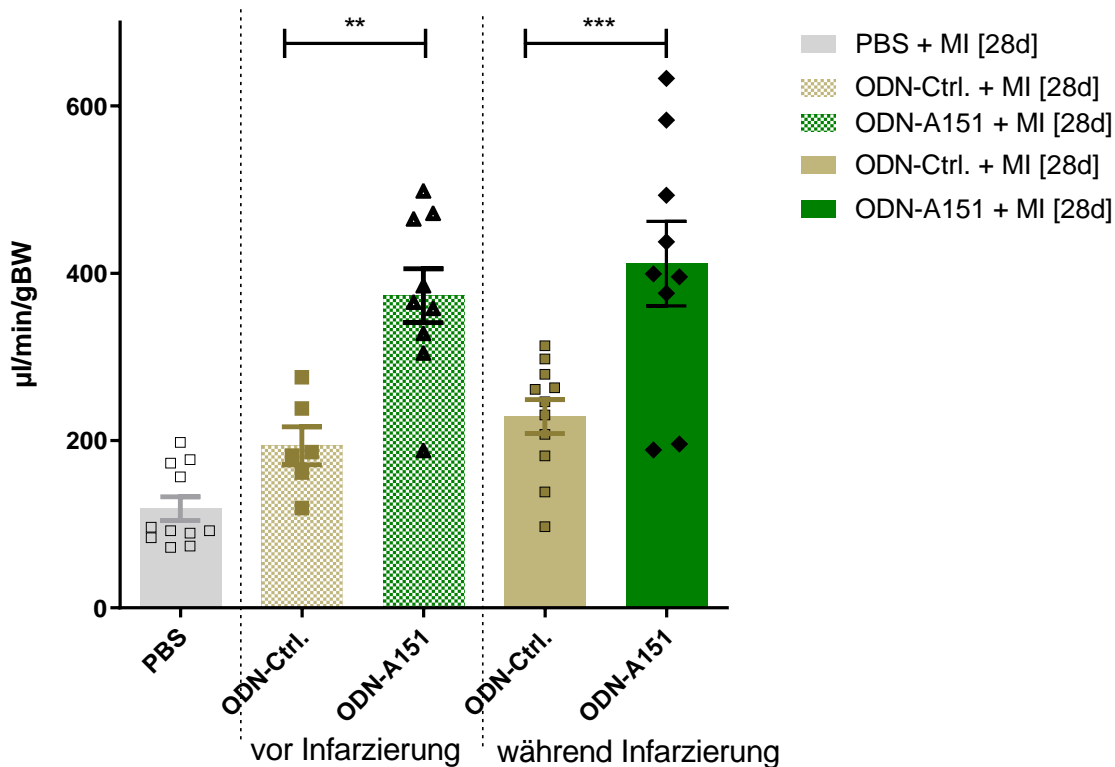


Abb. 18 Statistische Analyse des „*Cardiac Index*“ (CI) in $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ in WT-Mäusen. Die Streudiagramme (Scatterplots) zeigen das arithmetische Mittel sowie den Standardfehler (SEM). ** kennzeichnet einen statistischen Unterschied im Tukey's-Test (mean diff. -179,3 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$; 95 % CI of difference -316,6 – -42,06 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$); *** kennzeichnet einen statistischen Unterschied im Tukey's-Test (mean diff. -182,6 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$; 95 % CI of difference -299,7 – -65,59 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$). PBS n=11, vor Infarzierung ODN-Ctrl. n=6, vor Infarzierung ODN-A151 n=9, während Infarzierung ODN-Ctrl. n=11, während Infarzierung ODN-A151 n=9.

4. Diskussion

Ziel der Therapie eines akuten MI ist neben dem Überleben des Patienten das Ausmaß des Infarktes bzw. die Reduktion der Herzfunktion möglichst gering zu halten. Als Goldstandard gilt seit Jahren die schnellstmögliche Rekanalisation der Koronarstenose oder des Koronarverschlusses, um so die schädigende Ischämiezeit möglichst früh zu terminieren. In den meisten Industriestaaten ist die Verfügbarkeit der perkutanen Koronarangiographie (PCI) mittlerweile flächendeckend eingeführt, so dass sich die Zeit bis zur Rekanalisation kaum noch verbessern lässt.

Allerdings kommt es bedingt durch die Reperfusion zum Einwandern von Entzündungszellen. Diese sekundäre Schädigung (sterile Entzündungsreaktion) wird als Reperfusionsschaden bezeichnet (siehe dazu auch 1.4). Durch den angestoßenen Remodellingprozess kommt es zu kardialen Umbauprozessen (Yellon und Hausenloy, 2007). Ein großer Anteil des späteren Funktionsverlustes durch Narbengewebe wird diesem Reperfusionsschaden zugeschrieben. Die Modulation des Reperfusionsschadens ist Gegenstand intensiver Forschung. Jeglicher modulatorischer Ansatz der therapeutischen Einflussnahme auf den Reperfusionsschaden schlug in der Vergangenheit fehl. Zwar konnten Interventionen oder die Gabe von Medikamenten vor der Ischämie (Präkonditionierung) im Tiermodell verbesserte Ergebnisse in der Pumpfunktion zeigen (Bulluck und Hausenloy, 2015; Markowski et al., 2013; Murry et al., 1986). Da die Behandlung mit dem jeweiligen Agens aber jeweils vor Induktion der Ischämie erfolgen muss, fehlt die Übertragbarkeit in den klinischen Alltag.

Die Modulation der Immunreaktion nach MI gilt als klinisch vielversprechender Ansatz. Sie bietet in der Praxis entgegen prophylaktischer Ansätze bei *in vitro* Protokollen den Vorteil, dass sie therapeutisch nach durchgeführter Reperfusionstherapie appliziert werden kann. Der STING-Signalweg steht im Zusammenhang mit der Erkennung von Eigen-DNA als DAMP nach MI und spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort auf den MI. Potente und spezifische Inhibitoren des proinflammatorischen cGAS-STING-Signalwegs sind daher vielversprechende Therapeutika für die postischämische Behandlung des MI (Chen et al., 2016).

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass der STING-Signalweg eine entscheidende Rolle bei Remodellingprozessen nach MI spielt. Zudem konnten diese

Erkenntnisse erstmals pharmakologisch genutzt werden, um durch Gabe einer ODN TTAGGG-Sequenz sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch das Remodelling nach Infarkt zu beeinflussen. Es verringerte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe die Narbengröße und mehrere kardiale Funktionsmessung fielen besser aus (EF, CI, CO). Im letzten Schritt konnte gezeigt werden, dass die positiven Effekte alleinig STING-vermittelt sind und die TLR9-Kaskade keinen oder nur einen verschwindend geringen modulierenden Effekt zu haben scheint.

4.1. Rolle des STING Signalwegs bei MI

Der myokardiale Zelltod, der während eines MI auftritt, führt zur Freisetzung von großen Mengen zelleiger DNA und triggert somit über DAMPs die Aktivierung steriler Entzündungsprozesse, die dann von der angeborenen Immunabwehr ausgelöst werden. Es wurde bereits gezeigt, dass sowohl ASC als auch AIM2 einen signifikanten Einfluss auf die postischämische Inflation und Fibrosierung haben (Kawaguchi Masanori et al., 2011). Um zu untersuchen, ob der STING-Signalweg einen Einfluss auf die postischämische Narbenbildung und die Herzfunktion hat, haben wir STING^{-/-} Tiere mit WT Tieren in unserer ersten Versuchsgruppe verglichen. Diese erste Versuchsgruppe war notwendig, da die STING^{-/-} Tiere in ihrer Infarktausdehnung und postischämischen kardialen Funktion bisher nicht beschrieben wurden. Als Kontrollgruppe dienten jeweils STING^{-/-} sham und WT sham Tiere. Die Vergleichbarkeit der RIVA-Ligation wurde sowohl über vergleichbare Infarkthöhen im histologischen H&E Schnitt als auch durch die Evaluation der intrainterventionellen EKGs gewährleistet.

Wir postulierten einen negativen Einfluss des STING-Signalwegs auf die Remodelling Vorgänge nach MI. In den histologischen SR Detailaufnahmen zeigte sich in der STING^{-/-} Gruppe geringere und verzweigtere Narbenbildung im Vergleich zur WT Gruppe, die eher dichte und flächigere Narben zeigte. Auch planimetrisch zeigten STING^{-/-} Mäuse deutlich geringerer Mengen an Kollagen. Die reduzierte Myofibroblastenaktivierung in der α -SMAc-Färbung (Chen und Frangogiannis, 2013) deutet nach sieben Tagen bereits auf einen geringeren Kollagenumsatz bzw. -aufbau in STING knockout Tieren vs. WT-Tieren hin, was auch die insgesamt kleinere Narbengröße nach 28 Tagen erklären könnte.

STING aktiviert IRF3 sowie eine Typ 1 Interferon Produktion. Außerdem führt es zur Freisetzung von NF- κ , welches gemeinsam mit IRF3 in den Nukleus gelangt und dort

Interferone und proinflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1 β und IL-6 exprimiert (Sun et al., 2013). In Studien zeigen STING depletierte Mäuse eine beeinträchtigte Typ 1 Interferon Produktion nach MI. Die Unterbrechung der IRF3-abhängigen Signalübertragung führt zu einer verringerten kardialen Expression von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und einer verringerten kardialen Entzündungszellinfiltration sowie zu einer verminderten ventrikulären Dilatation und einer verbesserten Herzfunktion (King et al., 2017). STING spielt somit eine Schlüsselrolle bei der postischämischen Inflammation und stellt daher ein potenzielles pharmakologisches Target dar.

In unserer Studie konnte erstmal gezeigt werden, dass ein knockout der STING Signalkaskade in Mäusen die Infarktgröße und die Herzfunktion nach MI im Vergleich zu den WT-Tieren verbessert. Die Ergebnisse unserer Versuche decken sich mit den Ergebnissen von King et al. aus 2017, die zeigten, dass STING^{-/-} Mäuse, ebenso wie cGAS, IRF3 und dem Typ-1-Interferon-Rezeptor (IFNAR) depletierte Mäuse, ein besseres Überleben nach MI zeigen. Auch King et al. postulieren ein mögliches therapeutisches Ziel für die Kardioprotektion nach MI in Form von IRF3 und der Typ-1-Interferon Antwort in toto. Die zeitliche Überschneidung der Forschung unserer Arbeitsgruppe mit der Gruppe um King et al. und die Konzentration auf andere Projekte führten dazu, dass unsere Erkenntnisse um die STING^{-/-} Tiere bisher nicht publiziert wurden.

4.2. Rolle der A151 ODN Therapie

In unseren Versuchen reduzierte die Gabe von A151 ODN sowohl im prophylaktischen wie auch im therapeutischen Versuchsprotokoll die Narbengröße und führte auch funktionell zu einem verbesserten Outcome nach MI.

Die Verwendung immunsuppressiver ODNs bei der Behandlung von akuten und chronischen Krankheiten wurde erstmals 2005 durch Klinman et al. postuliert (Klinman et al., 2005). Die Gabe von TTAGGG-Multimere blockierte die Produktion von proinflammatorischen und T-Helfer-Typ-1-Zytokinen, was eine therapeutischen Verwendung weiter unterstützte (Klinman et al., 2009). Ashman et al. postulierten die Wirkung abseits des TLR9 Rezeptors, da die biologische Aktivität immunsuppressiver ODNs nicht direkt mit TLR9 korrelierte (Ashman et al., 2011). Kaminski et al. zeigten 2013, dass die Vorbehandlung von dendritischen Zellen und Makrophagen mit suppressiven ODNs (A151) die AIM2-Inflammasom-Komplexbildung verhindert und die Induktion von

Typ I IFN, TNF α und ISG als Reaktion auf zytosolische dsDNA aufhob (Kaminski et al., 2013).

Zhao et al zeigten 2015, dass A151 beim Schlaganfall die IL-1 β -Produktion durch aktivierte Makrophagen aus dem Knochenmark reduziert. Weiterhin zeigten sie, dass A151 die Reifung von Caspase-1 und IL-1 β , die Spiegel der iNOS- und NLRP3-Proteine sowie die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials in solchen Zellen reduziert. Insgesamt stellten sie fest, dass A151 ischämische Hirnschäden reduziert und postulierten, dass die Modulation der ischämischen Pathobiologie durch A151 eine Rolle bei der Entwicklung neuer Ischämiepräventions- und -therapiestrategien spielen (Zhao et al., 2015). Steinhagen et al. zeigte 2018, dass A151 effektiv die Aktivierung von cGAS als Reaktion auf zytosolische DNA hemmt und dadurch die Typ-I-IFN-Produktion durch humane Monozyten hemmt, indem A151 mit DNA um die Bindung an cGAS konkurriert. Diese suppressive Aktivität von A151 war sowohl von der Telomeren-Sequenz als auch vom Phosphorothioat-Rückgrat abhängig (Steinhagen et al., 2018).

Bereits seit längerem ist bekannt, dass TLR9 die postischämische Inflammation beeinflusst und dass ODNs grundsätzlich auch mit TLR9 interferieren (Hemmi et al., 2000; Kawai und Akira, 2010; Trieu et al., 2006). Markowski et al konnten bereits zeigen, dass CpG-ODNs einen positiven präkonditionierenden Effekt über TLR9-Aktivierung vermitteln (Markowski et al., 2013). Einige Gruppen zeigten, dass durch TLR9-Aktivierung eine schützende Wirkung über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs während der zerebralen Ischämie-Reperfusionverletzung und der myokardialen Ischämie-Reperfusionverletzung bei Mäusen vermittelt wird (Cao et al., 2013; Lu et al., 2014). Andererseits wurde auch gezeigt, dass eine TLR9-Aktivierung über die Aktivierung des p38MAPK-Signalweg den myokardiale Reperfusionsschaden verstärkt (Xie et al., 2018). Insgesamt bleibt also unklar, wie genau sich die Aktivierung bzw. Modifikation von TLR9 auf das Remodelling nach Ischämie auswirkt (Kumar, 2021). Unsere Versuche zeigten jedoch, dass die Applikation von A151 auch in TL9 Knockout-Tieren zu einer Reduktion der Infarkt Narbe führten, womit wir die TLR9 Signalkaskade als wesentlichen Effektorweg ausschließen konnten.

Wir können in dieser Arbeit erstmalig zeigen, dass die Gabe von A151 die postischämische Phase nach MI positiv beeinflusst und sowohl auf zellulärer Ebene als auch auf funktioneller Ebene die Auswirkungen des Reperfusionsschaden wirkungsvoll

abschwächt. Die Arbeitsgruppe um Li et al. zeigte im Einklang mit unseren Ergebnissen jüngst, dass die Hemmung des cGAS-STING-Signalwegs die Entzündungslast bei Ischämie nach Schlaganfällen relevant verringert (Li et al., 2020).

4.3. Klinische Anwendbarkeit

Der therapeutische Ansatz ist dem prophylaktischen Ansatz in seiner Anwendbarkeit weit überlegen, weil er nach stattgefundenem MI eingesetzt werden kann. Eine Prophylaxe würde eine breite Anwendung mit leichter Verträglichkeit und gutem Kosten-Nutzen-Verhältnis voraussetzen, die bei unserem experimentellen Modell nur schwer postulierbar scheint. A151 ODN und andere ODNs werden bereits in der Therapie zahlreicher Autoimmun- sowie Infektionskrankheiten verwendet (Bayik et al., 2016b). Es gibt bereits Ansätze zur klinischen parenteralen Applikation immunmodulatorischer ODNs (Klinman et al., 2009; Scheiermann und Klinman, 2014). Neuere Studien beschäftigten sich ebenfalls mit einer möglichen oralen Applikation von ODNs mit vielversprechenden Erkenntnissen im Mausmodell (Wang et al., 2015). Eine Übertragung unseres Therapieansatzes auf den Menschen ist daher grundsätzlich denkbar.

Limitierend sei erwähnt, dass experimentelle Tiermodelle mit homogenen, gesunden und gleichaltrigen Mäusen nur sehr eingeschränkt auf die klinische Praxis übertragbar sind. Typischerweise tritt ein Herzinfarkt in Deutschland zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr auf, während in den meisten experimentellen Studien am Tiermodell junge Tiere verwendet werden. Es konnte bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass mit zunehmenden Alter der Tiere die Resistenz gegenüber Strategien zur Kardioprotektion wie bspw. einer Prä- (Schulman et al., 2001) und Postkonditionierung zunimmt (Boengler et al., 2009; Przyklenk et al., 2008). Weitere Faktoren, die das Ansprechen auf Strategien zur Kardioprotektion beeinflussen wie bspw. das Geschlecht werden ebenfalls nicht berücksichtigt (Ferdinandy et al., 2007). Auch bestehende Komorbiditäten beeinflussen das Outcome nach MI (Przyklenk et al., 2008; Sivaraman et al., 2010; Wagner et al., 2008) und sind im experimentellen Tiermodell nur schwer zu berücksichtigen (Hausenloy et al., 2010). Vor allem die im Kleintiermodell übliche Okklusion einer vorher gesunden Koronararterie unterscheidet sich von dem MI durch Thrombosierung eines rupturierten atherosklerotischen Plaques. Außerdem wird im Tiermodell zur Vergleichbarkeit und im Sinne einer hohen Sensitivität eine konstante Ischämie- und Reperusionszeit verwendet,

während im klinischen MI-Kollektiv die relevante Ischämiezeit deutlich variabler ist - regelhaft deutlich über 30 Minuten. Ergänzend ist eine residuelle Stenose bzw. sind periphere tromboembolische Ereignisse nach klinischer PCI-Therapie wahrscheinlicher als im Kleintiermodell (Heusch und Schulz, 2009).

4.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Wir konnten in diesem Teilprojekt zeigen, dass der cGAS-STING-Signalweg eine entscheidende Rolle bei postischämischen Remodellingprozessen spielt. Durch die Modulation von DNA-erkennenden Rezeptoren wird die Inflammation im murinen Herzinfarktmodell positiv beeinflusst, was zu einer kleineren Narbenbildung und zu einer verbesserten Pumpfunktion führt. Durch Applikation des Oligonukleotids A151 ließ sich der positive Effekt des STING-knockouts auch in WT-Tieren imitieren – und dies sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch. Hier bietet sich der für eine klinische Translation wohl vielversprechendste pharmakologische Ansatz. Eine potenziell klinische Anwendung unserer Ergebnisse würde auf die intravasale Applikation des Oligonukleotid A151 bei Patienten im Rahmen einer PCI abzielen.

Allerdings setzt die klinische Anwendung ein noch detaillierteres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen im Tiermodell voraus. So spielen bei den STING^{-/-} Tieren - analog zu WT-Tieren - gewebständige Makrophagen (sog. *tissue-resident macrophages*) eine entscheidende Rolle für die Entstehung des Reperfusionsschadens (O'Rourke et al., 2019). Durch die Verwendung von Knochenmarkschimären soll daher im nächsten Forschungsschritt geklärt werden, ob der protektive Effekt durch Depletion von STING-knockout Knochenmark und Nativtransfer von WT-Knochenmark rückläufig ist.

Von großer Bedeutung sind außerdem Versuche zur Erfassung langfristiger Effekte der Gabe von A151-ODN auf Infarktausdehnung und insbesondere Herzfunktion, um einen anhaltend positiven Effekt auch über den 28. Tag hinaus nachzuweisen. Die Beeinflussung der Wirkung durch variable Faktoren wie Alter, Geschlecht, Komorbiditäten und Medikamente sollte ebenso eruiert werden wie auch die extrakardialen Wirkungen und Nebenwirkungen der Applikation von A151 ODN.

5. Zusammenfassung

Zahlreiche experimentelle Strategien zur Therapie des Myokardinfarkts zielen auf eine Reduktion des sogenannten Reperfusionsschadens ab. Dieser bezeichnet myokardiale, vaskuläre oder elektrophysiologische Dysfunktionen, die durch die Reperfusion von ischämischem Gewebe entstehen und schädliche Inflammationsprozesse auslösen. Ein großer Anteil des späteren myokardialen Funktionsverlustes wird diesem Reperfusionsschaden zugeschrieben. Bisher haben jegliche Versuche, diese negativen Entzündungsreaktionen therapeutisch zu modulieren, fehlgeschlagen. Wir wissen, dass die Immunantwort, insbesondere auf die zahlreich freiwerdende Eigen-DNA beim ischämiebedingten myokardialen Zelltod, eine wesentliche Rolle bei der Entstehung des Reperfusionsschadens spielt. Daher verfolgten wir mit unseren Versuchen die Absicht, diese schädlichen Immunreaktionen besser zu verstehen und schließlich positiv zu modulieren.

Zunächst untersuchten wir in einem etablierten Mausmodell den Effekt des STING Knockouts in Bezug auf die postischämische Narbenbildung und Herzfunktion, da wir in der STING-Signalkaskade einen vielversprechenden pharmakologischen Angriffspunkt sahen. Anschließend haben wir untersucht, ob das inhibitorische Oligonukleotid A151 bei therapeutischer Applikation eine Reduktion der postischämischen Fibrosierung und Verringerung der kardialen Dysfunktion über den STING-Signalweg verursacht.

Durch unsere Versuche konnten wir in einem ersten Schritt eine signifikante Reduktion der Narbengröße mit einhergehender Verbesserung der kardialen Funktionsparameter durch den STING Knockout zeigen und somit unsere Hypothese zur Wichtigkeit des STING Signalwegs stützen. Die Applikation des A151 Motivs führte zu einer signifikanten Reduktion der Narbengröße mit einhergehender Verbesserung der kardialen Funktionsparameter. Wir zeigten außerdem, dass A151 auch bei TLR9 Knockout Tieren positive Effekte auf die Infarktarnenausdehnung vermittelt und dass der protektive Effekt daher am ehesten über STING vermittelt wird und nicht über den TLR9-Rezeptor, welchen A151 auch hemmt.

Wir konnten in dieser Arbeit erstmalig zeigen, dass die Gabe von A151 die postischämische Phase nach MI positiv beeinflusst und sowohl auf histologischer Ebene als auch auf funktioneller Ebene den Reperfusionsschaden wirkungsvoll reduziert. Die

Inhibition DNA-erkennender Rezeptoren durch A151 verspricht großes klinisches Potenzial. Eine postischämische Therapie mit A151 wäre prinzipiell denkbar, ähnliche Ansätze werden bereits in experimentellen und klinischen Studien zu therapeutischen Zwecken verwendet (Bayik et al., 2016b; Scheiermann und Klinman, 2014). Unsere Erkenntnisse laden dazu ein, den vielversprechenden pharmakologischen Einsatz von A151 genauer zu untersuchen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Krankheitskosten 2015 – Anteile nach Krankheitsklassen in % („Krankheitskosten Statistisches Bundesamt“, 2017)	12
Abb. 2 Das NLRP3 Inflammasom in seiner oligomerisierten Struktur	28
Abb. 3 Rolle des NLRP3 Inflammasoms bei MI	29
Abb. 4 cGAS-STING-Signalweg	31
Abb. 5 Allgemeines Versuchsprotokoll	38
Abb. 6 Versuchsprotokoll mit präkonditionierender Applikation vor Infarkt	39
Abb. 7 Versuchsprotokoll mit therapeutischer Applikation	41
Abb. 8 Beispiel-EKGs	45
Abb. 9 Repräsentative Herzschnitte (eigene Aufnahme)	59
Abb. 10 Planimetrische Analyse der Narbenbildung in % des linken Ventrikels	60
Abb. 11 Repräsentative SR-Detailaufnahmen des linken Ventrikels 28 Tage nach 30-minütiger Ischämie (eigene Aufnahme)	61
Abb. 12 Repräsentative α -SMAc-Detailaufnahmen des linken Ventrikels 7 Tage nach 30-minütiger Ischämie (Aufnahmen der Arbeitsgruppe)	62
Abb. 13 Statistische Analyse der Ejection Fraction (EF) in %	63
Abb. 14 Statistische Analyse des „ <i>Cardiac Index</i> “ (CI) in $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$	63
Abb. 15 Planimetrische Analyse der Narbenbildung in % des linken Ventrikels in TLR9 ^{-/-} Mäusen	64
Abb. 16 Planimetrische Analyse der Narbenbildung in % des linken Ventrikels in WT-Mäusen	65
Abb. 17 Statistische Analyse des „ <i>Cardiac Index</i> “ (CI) in $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ in TLR9 ^{-/-}	66
Abb. 18 Statistische Analyse des „ <i>Cardiac Index</i> “ (CI) in $\mu\text{l}/\text{min}/\text{gBW}$ in WT-Mäusen	67

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Allgemeine Laborgeräte	57
Tabelle 2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	58

8. Literaturverzeichnis

Ablasser A, Chen ZJ. cGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation. *Science* 2019; 363: eaat8657. doi:10.1126/science.aat8657

Abraham D, Mao L. Cardiac Pressure-Volume Loop Analysis Using Conductance Catheters in Mice. *J. Vis. Exp. JoVE* 2015; . doi:10.3791/52942

Akar FG, Aon MA, Tomaselli GF, O'Rourke B. The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 3527–3535. doi:10.1172/JCI25371

Ashman RF, Goeken JA, Latz E, Lenert P. Optimal oligonucleotide sequences for TLR9 inhibitory activity in human cells: lack of correlation with TLR9 binding. *Int. Immunol.* 2011; 23: 203–214. doi:10.1093/intimm/dxq473

Aurora AB, Porrello ER, Tan W, Mahmoud AI, Hill JA, Bassel-Duby R, Sadek HA, Olson EN. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J. Clin. Invest.* 2014; 124: 1382–1392. doi:10.1172/JCI72181

Avkiran M. Protection of the ischaemic myocardium by Na⁺/H⁺ exchange inhibitors: potential mechanisms of action. *Basic Res. Cardiol.* 2001; 96: 306–311. doi:10.1007/s003950170037

Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 1984; 70: 812–823. doi:10.1161/01.cir.70.5.812

Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005; 434: 658–662. doi:10.1038/nature03434

Bajpai G, Bredemeyer A, Li W, Zaitsev K, Koenig AL, Lokshina I, Mohan J, Ivey B, Hsiao H-M, Weinheimer C, Kovacs A, Epelman S, Artyomov M, Kreisel D, Lavine KJ. Tissue Resident CCR2⁻ and CCR2⁺ Cardiac Macrophages Differentially Orchestrate Monocyte Recruitment and Fate Specification Following Myocardial Injury. *Circ. Res.* 2019; 124: 263–278. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.314028

- Bajpai G, Schneider C, Wong N, Bredemeyer A, Hulsmans M, Nahrendorf M, Epelman S, Kreisel D, Liu Y, Itoh A, Shankar TS, Selzman CH, Drakos SG, Lavine KJ. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat. Med.* 2018; 24: 1234–1245. doi:10.1038/s41591-018-0059-x
- Bauer AW. Kardiovaskuläre Erkrankungen. , in: Gerabek, W.E. (Hrsg.), *Enzyklopädie Medizingeschichte* 2005; S. 722–728
- Bayik D, Gursel I, Klinman DM. Structure, mechanism and therapeutic utility of immunosuppressive oligonucleotides. *Pharmacol. Res.* 2016a; 105: 216–225. doi:10.1016/j.phrs.2015.11.010
- Bayik D, Gursel I, Klinman DM. Structure, mechanism and therapeutic utility of immunosuppressive oligonucleotides. *Pharmacol. Res.* 2016b; 105: 216–225. doi:10.1016/j.phrs.2015.11.010
- Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2009; 7: 99–109. doi:10.1038/nrmicro2070
- Bernardi P, Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell. Biochem.* 2007; 45: 481–506. doi:10.1007/978-1-4020-6191-2_18
- Bode C, Wang J, Klinman DM. Suppressive oligodeoxynucleotides promote the generation of regulatory T cells by inhibiting STAT1 phosphorylation. *Int. Immunopharmacol.* 2014; 23: 516–522. doi:10.1016/j.intimp.2014.09.027
- Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc. Res.* 2009; 83: 247–261. doi:10.1093/cvr/cvp033
- Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 609–634. doi:10.1152/physrev.1999.79.2.609
- Bonaventura A, Montecucco F, Dallegri F, Carbone F, Lüscher TF, Camici GG, Liberale L. Novel findings in neutrophil biology and their impact on cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 2019; 115: 1266–1285. doi:10.1093/cvr/cvz084
- Bouladoux N, Hall JA, Grainger JR, dos Santos LM, Kann MG, Nagarajan V, Verthelyi D, Belkaid Y. Regulatory role of suppressive motifs from commensal DNA. *Mucosal Immunol.* 2012; 5: 623–634. doi:10.1038/mi.2012.36

- Braasch Wolfgang, Gudbjarnason Sigmundur, Puri Pritpal S., Ravens Kurt G., Bing Richard J. Early Changes in Energy Metabolism in the Myocardium Following Acute Coronary Artery Occlusion in Anesthetized Dogs. *Circ. Res.* 1968; 23: 429–438. doi:10.1161/01.RES.23.3.429
- Bragadeesh T, Jayaweera AR, Pascotto M, Micari A, Le DE, Kramer CM, Epstein FH, Kaul S. Post-ischaemic myocardial dysfunction (stunning) results from myofibrillar oedema. *Heart Br. Card. Soc.* 2008; 94: 166–171. doi:10.1136/hrt.2006.102434
- Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146–1149. doi:10.1161/01.CIR.66.6.1146
- Briard B, Place DE, Kanneganti T-D. DNA Sensing in the Innate Immune Response. *Physiology* 2020; 35: 112–124. doi:10.1152/physiol.00022.2019
- Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2016; 16: 407–420. doi:10.1038/nri.2016.58
- Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, Frangogiannis NG. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am. J. Pathol.* 2008; 173: 57–67. doi:10.2353/ajpath.2008.070974
- Bujak M, Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Xia Y, Leucker T, Zymek P, Veeranna V, Tager AM, Luster AD, Frangogiannis NG. Induction of the CXC chemokine interferon-gamma-inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction. *Circ. Res.* 2009; 105: 973–983. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.199471
- Bulluck H, Hausenloy DJ. Ischaemic conditioning: are we there yet? *Heart Br. Card. Soc.* 2015; 101: 1067–1077. doi:10.1136/heartjnl-2014-306531
- Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, Hayakawa Y, Vance RE. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature* 2011; 478: 515–518. doi:10.1038/nature10429
- Cao Z, Ren D, Ha T, Liu L, Wang X, Kalbfleisch J, Gao X, Kao R, Williams D, Li C. CpG-ODN, the TLR9 agonist, attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury: involving activation of PI3K/Akt signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 1832: 96–104. doi:10.1016/j.bbadis.2012.08.008

- Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 917–1017. doi:10.1152/physrev.1999.79.3.917
- Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat. Immunol.* 2016; 17: 1142–1149. doi:10.1038/ni.3558
- Chen S, Lotz C, Roewer N, Broscheit J-A. Comparison of volatile anesthetic-induced preconditioning in cardiac and cerebral system: molecular mechanisms and clinical aspects. *Eur. J. Med. Res.* 2018; 23:. doi:10.1186/s40001-018-0308-y
- Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 1833: 945–953. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.023
- Cheng H, Lederer MR, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks and $[Ca^{2+}]_i$ waves in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 1996; 270: C148-159. doi:10.1152/ajpcell.1996.270.1.C148
- Chien GL, Wolff RA, Davis RF, van Winkle DM. „Normothermic range“ temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovasc. Res.* 1994; 28: 1014–1017
- Christia P, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Chen W, Dobaczewski M, Reddy A, Frangogiannis NG. Systematic Characterization of Myocardial Inflammation, Repair, and Remodeling in a Mouse Model of Reperfused Myocardial Infarction. *J. Histochem. Cytochem.* 2013; 61: 555–570. doi:10.1369/0022155413493912
- Cingolani OH, Kass DA. Pressure-volume relation analysis of mouse ventricular function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011; 301: H2198-2206. doi:10.1152/ajpheart.00781.2011
- Clark JE, Marber MS. Advancements in pressure-volume catheter technology - stress remodelling after infarction. *Exp. Physiol.* 2013; 98: 614–621. doi:10.1113/expphysiol.2012.064733
- Coraboeuf E, Deroubaix E, Coulombe A. Acidosis-induced abnormal repolarization and repetitive activity in isolated dog Purkinje fibers. *J. Physiol. (Paris)* 1980; 76: 97–106
- Deroide N, Li X, Lerouet D, Van Vré E, Baker L, Harrison J, Poittevin M, Masters L, Nih L, Margail I, Iwakura Y, Ryffel B, Pocard M, Tedgui A, Kubis N, Mallat Z. MFGE8 inhibits inflammasome-induced IL-1 β production and limits postischemic cerebral injury. *J. Clin.*

Invest. 2013; 123: 1176–1181. doi:10.1172/JCI65167

Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Of Mice and Dogs: Species-Specific Differences in the Inflammatory Response Following Myocardial Infarction. *Am. J. Pathol.* 2004; 164: 665–677. doi:10.1016/S0002-9440(10)63154-9

Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, Rollins BJ, Entman ML, Frangogiannis NG. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ. Res.* 2005; 96: 881–889. doi:10.1161/01.RES.0000163017.13772.3a

DGK, ESC (Hrsg.). Pocket-Leitlinie (Version 2017). 2018; Börm Bruckmeier Verlag GmbH
Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011a; 117: 3720–3732. doi:10.1182/blood-2010-07-273417

Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2011b; 41: 1203–1217. doi:10.1002/eji.201141550

Eckle T, Koeppen M, Eltzhig H. Use of a Hanging Weight System for Coronary Artery Occlusion in Mice. *J. Vis. Exp. JoVE* 2011; . doi:10.3791/2526

Eichbaum FW. „Wavy“ myocardial fibers in spontaneous and experimental adrenergic cardiopathies. *Cardiology* 1975; 60: 358–365. doi:10.1159/000169735

Fang L, Moore X-L, Dart AM, Wang L-M. Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *J. Geriatr. Cardiol. JGC* 2015; 12: 305–312. doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2015.03.020

Feng J, Lucchinetti E, Ahuja P, Pasch T, Perriard J-C, Zaugg M. Isoflurane postconditioning prevents opening of the mitochondrial permeability transition pore through inhibition of glycogen synthase kinase 3 β . *Anesthesiology* 2005; 103: 987–995

Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol. Rev.* 2007; 59: 418–458. doi:10.1124/pr.107.06002

Fernandes-Alnemri T, Yu J-W, Datta P, Wu J, Alnemri ES. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* 2009; 458: 509–

513. doi:10.1038/nature07710

Fernández-Jiménez R, García-Prieto J, Sánchez-González J, Agüero J, López-Martín GJ, Galán-Arriola C, Molina-Iracheta A, Doohan R, Fuster V, Ibáñez B. Pathophysiology Underlying the Bimodal Edema Phenomenon After Myocardial Ischemia/Reperfusion. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015; 66: 816–828. doi:10.1016/j.jacc.2015.06.023

Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell. Microbiol.* 2006; 8: 1812–1825. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00751.x

Ford ES, Ajani UA, Croft JB, Critchley JA, Labarthe DR, Kottke TE, Giles WH, Capewell S. Explaining the decrease in U.S. deaths from coronary disease, 1980-2000. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356: 2388–2398. doi:10.1056/NEJMsa053935

Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ. Res.* 2012; 110: 159–173. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243162

Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb. Haemost.* 2007; 97: 738–747

Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, Entman ML. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2000; 165: 2798–2808. doi:10.4049/jimmunol.165.5.2798

Garciarena CD, Youm JB, Swietach P, Vaughan-Jones RD. H⁺-activated Na⁺ influx in the ventricular myocyte couples Ca²⁺-signalling to intracellular pH. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2013; 61: 51–59. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.04.008

Georgakopoulos D, Kass DA. Estimation of parallel conductance by dual-frequency conductance catheter in mice. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 2000; 279: H443–H450. doi:10.1152/ajpheart.2000.279.1.H443

Georgakopoulos D, Mitzner WA, Chen CH, Byrne BJ, Millar HD, Hare JM, Kass DA. In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: H1416-1422. doi:10.1152/ajpheart.1998.274.4.H1416

Ghigo A, Franco I, Morello F, Hirsch E. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc. Res.* 2014; 102: 270–280. doi:10.1093/cvr/cvu030

Gibson CM, Giugliano RP, Kloner RA, Bode C, Tendera M, Jánosi A, Merkely B, Godlewski J, Halaby R, Korjian S, Daaboul Y, Chakrabarti AK, Spielman K, Neal BJ, Weaver WD. EMBRACE STEMI study: a Phase 2a trial to evaluate the safety, tolerability, and efficacy of intravenous MTP-131 on reperfusion injury in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Eur. Heart J.* 2016; 37: 1296–1303. doi:10.1093/eurheartj/ehv597

Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF- κ B in the heart: to be or not to NF- κ B. *Circ. Res.* 2011; 108: 1122–1132. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226928

Gößwald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E, Busch MA. [Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2013; 56: 650–655. doi:10.1007/s00103-013-1666-9

Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2011; 16: 233–238. doi:10.1177/1074248411409581

Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 1994; 94: 1621–1628

Gui X, Yang H, Li T, Tan X, Shi P, Li M, Du F, Chen ZJ. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature* 2019; 567: 262–266. doi:10.1038/s41586-019-1006-9

Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2003; 171: 1393–1400. doi:10.4049/jimmunol.171.3.1393

Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker KA, Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, Entman ML. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* 1999; 99: 546–551. doi:10.1161/01.cir.99.4.546

Hausenloy DJ, Baxter G, Bell R, Bøtker HE, Davidson SM, Downey J, Heusch G, Kitakaze

M, Lecour S, Mentzer R, Mocanu MM, Ovize M, Schulz R, Shannon R, Walker M, Walkinshaw G, Yellon DM. Translating novel strategies for cardioprotection: the Hatter Workshop Recommendations. *Basic Res. Cardiol.* 2010; 105: 677–686. doi:10.1007/s00395-010-0121-4

Hausenloy DJ, Erik Bøtker H, Condorelli G, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Heusch G, Lecour S, van Laake LW, Madonna R, Ruiz-Meana M, Schulz R, Sluijter JPG, Yellon DM, Ovize M. Translating cardioprotection for patient benefit: position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc. Res.* 2013; 98: 7–27. doi:10.1093/cvr/cvt004

He W, Wan H, Hu L, Chen P, Wang X, Huang Z, Yang Z-H, Zhong C-Q, Han J. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res.* 2015; 25: 1285–1298. doi:10.1038/cr.2015.139

Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager HB, Sebas M, Iwamoto Y, Sun Y, Da Silva N, Panizzi P, van der Laan AM, van der Lahn AM, Swirski FK, Weissleder R, Nahrendorf M. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circ. Res.* 2014; 115: 284–295. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303567

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. doi:10.1038/35047123

Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28: 1456–1462. doi:10.1016/s0891-5849(00)00252-5

Herzinfarkt Mortalität Morbidität und Letalität [WWW Document]. o. J.; . URL https://www.gbe-bund.de/gbe/abrechnung.prc_abr_test_logon?p_uid=gast&p_aid=0&p_knoten=FID&p_sprache=D&p_suchstring=6770 (zugegriffen 8.26.21).

Heusch G, Schulz R. Neglect of the coronary circulation: some critical remarks on problems in the translation of cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* 2009; 84: 11–14. doi:10.1093/cvr/cvp210

Hoffmann R, Haager P, Lepper W, Franke A, Hanrath P. Relation of coronary flow pattern to myocardial blush grade in patients with first acute myocardial infarction. *Heart Br. Card. Soc.* 2003; 89: 1147–1151. doi:10.1136/heart.89.10.1147

Holm CK, Jensen SB, Jakobsen MR, Cheshenko N, Horan KA, Moeller HB, Gonzalez-Dosal R, Rasmussen SB, Christensen MH, Yarovinsky TO, Rixon FJ, Herold BC, Fitzgerald KA, Paludan SR. Virus-cell fusion as a trigger of innate immunity dependent on the adaptor STING. *Nat. Immunol.* 2012; 13: 737–743. doi:10.1038/ni.2350

Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey DR, Latz E, Fitzgerald KA. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; 458: 514–518. doi:10.1038/nature07725

Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* 2011; 17: 796–808. doi:10.1038/nm.2399

Iliceto S, Galiuto L, Marchese A, Cavallari D, Colonna P, Biasco G, Rizzon P. Analysis of microvascular integrity, contractile reserve, and myocardial viability after acute myocardial infarction by dobutamine echocardiography and myocardial contrast echocardiography. *Am. J. Cardiol.* 1996; 77: 441–445. doi:10.1016/s0002-9149(97)89334-4

Inflammasom [WWW Document]. Wikipedia 2021; . URL <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Inflammasom&oldid=209031076> (zugegriffen 6.19.21).

Ivey CL, Williams FM, Collins PD, Jose PJ, Williams TJ. Neutrophil chemoattractants generated in two phases during reperfusion of ischemic myocardium in the rabbit. Evidence for a role for C5a and interleukin-8. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 2720–2728. doi:10.1172/JCI117974

Janse MJ, Wit AL. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol. Rev.* 1989; 69: 1049–1169. doi:10.1152/physrev.1989.69.4.1049

Jennings RB. Myocardial ischemia—Observations, definitions and speculations. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1970; 1: 345–349. doi:10.1016/0022-2828(70)90033-7

Jennings RB, Ganote CE, Reimer KA. Ischemic tissue injury. *Am. J. Pathol.* 1975; 81:

179–198

Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Pathol.* 1960; 70: 68–78

Jennings Robert B. Historical Perspective on the Pathology of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circ. Res.* 2013; 113: 428–438. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300987

Jin C, Cleveland JC, Ao L, Li J, Zeng Q, Fullerton DA, Meng X. Human myocardium releases heat shock protein 27 (HSP27) after global ischemia: the proinflammatory effect of extracellular HSP27 through toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *Mol. Med. Camb. Mass* 2014; 20: 280–289. doi:10.2119/molmed.2014.00058

Jong WMC, Reitsma PH, ten Cate H, de Winter RJ. Modified two-step model for studying the inflammatory response during myocardial ischemia and reperfusion in mice. *Comp. Med.* 2003; 53: 522–526

Kaminski JJ, Schattgen SA, Tzeng T-C, Bode C, Klinman DM, Fitzgerald KA. Synthetic oligodeoxynucleotides containing suppressive TTAGGG motifs inhibit AIM2 inflammasome activation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 2013; 191: 3876–3883. doi:10.4049/jimmunol.1300530

Kass DA, Chen CH, Curry C, Talbot M, Berger R, Fetters B, Nevo E. Improved left ventricular mechanics from acute VDD pacing in patients with dilated cardiomyopathy and ventricular conduction delay. *Circulation* 1999; 99: 1567–1573. doi:10.1161/01.cir.99.12.1567

Kass DA, Midei M, Graves W, Brinker JA, Maughan WL. Use of a conductance (volume) catheter and transient inferior vena caval occlusion for rapid determination of pressure-volume relationships in man. *Cathet. Cardiovasc. Diagn.* 1988; 15: 192–202. doi:10.1002/ccd.1810150314

Kawaguchi Masanori, Takahashi Masafumi, Hata Takeki, Kashima Yuichiro, Usui Fumitake, Morimoto Hajime, Izawa Atsushi, Takahashi Yasuko, Masumoto Junya, Koyama Jun, Hongo Minoru, Noda Tetsuo, Nakayama Jun, Sagara Junji, Taniguchi Shun'ichiro, Ikeda Uichi. Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts Is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* 2011; 123: 594–604.

doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982777

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 2010; 11: 373–384. doi:10.1038/ni.1863

Kim S-C, Boehm O, Meyer R, Hoefft A, Knüfermann P, Baumgarten G. A Murine Closed-chest Model of Myocardial Ischemia and Reperfusion. *J. Vis. Exp. JoVE* 2012a; . doi:10.3791/3896

Kim S-C, Boehm O, Meyer R, Hoefft A, Knüfermann P, Baumgarten G. A murine closed-chest model of myocardial ischemia and reperfusion. *J. Vis. Exp. JoVE* 2012b; e3896. doi:10.3791/3896

King KR, Aguirre AD, Ye Y-X, Sun Y, Roh JD, Ng RP, Kohler RH, Arlauckas SP, Iwamoto Y, Savol A, Sadreyev RI, Kelly M, Fitzgibbons TP, Fitzgerald KA, Mitchison T, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R. IRF3 and Type I Interferons Fuel a Fatal Response to Myocardial Infarction. *Nat. Med.* 2017; 23: 1481–1487. doi:10.1038/nm.4428

Klever-Deichert G, Hinzpeter B, Hunsche E, Lauterbach KW. Kosten koronarer Herzkrankheiten über die verbleibende Lebenszeit von KHK-Fällen – Eine Analyse des aktuellen Bestandes an KHK-Fällen in Deutschland aus gesellschaftlicher Perspektive. *Z. Für Kardiologie* 1999; 88: 991–1000. doi:10.1007/s003920050381

Klinman DM, Gursel I, Klaschik S, Dong L, Currie D, Shirota H. Therapeutic potential of oligonucleotides expressing immunosuppressive TTAGGG motifs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005; 1058: 87–95. doi:10.1196/annals.1359.015

Klinman DM, Tross D, Klaschik S, Shirota H, Sato T. Therapeutic applications and mechanisms underlying the activity of immunosuppressive oligonucleotides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; 1175: 80–88. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04970.x

Kloner RA, Ganote CE, Whalen DA, Jennings RB. Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow. *Am. J. Pathol.* 1974; 74: 399–422

Konstantinidis K, Whelan RS, Kitsis RN. Mechanisms of cell death in heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32: 1552–1562. doi:10.1161/ATVBAHA.111.224915

Krankheitskosten in Mio. EUR für Deutschland [WWW Document]. 2019; . URL http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/WS0100/_XWD_FORMPROC#SVG (zugegriffen 7.7.19).

Krankheitskosten Statistisches Bundesamt [WWW Document]. Stat. Bundesamt 2017; . URL https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankheitskosten/_inhalt.html (zugegriffen 6.19.21).

Kübler W, Spieckermann PG. Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1970; 1: 351–377. doi:10.1016/0022-2828(70)90034-9

Kumar V. The Trinity of cGAS, TLR9, and ALRs Guardians of the Cellular Galaxy Against Host-Derived Self-DNA. *Front. Immunol.* 2021; 11:. doi:10.3389/fimmu.2020.624597

Lafontant PJ, Burns AR, Donnachie E, Haudek SB, Smith CW, Entman ML. Oncostatin M differentially regulates CXC chemokines in mouse cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006; 291: C18-26. doi:10.1152/ajpcell.00322.2005

Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and Functions of Inflammasomes. *Cell* 2014; 157: 1013–1022. doi:10.1016/j.cell.2014.04.007

Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 397–411. doi:10.1038/nri3452

Lavandero S, Troncoso R, Rothermel BA, Martinet W, Sadoshima J, Hill JA. Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives. *Autophagy* 2013; 9: 1455–1466. doi:10.4161/auto.25969

Lee W-S, Huang W-P, Yu W-C, Chiou K-R, Ding PY-A, Chen C-H. Estimation of preload recruitable stroke work relationship by a single-beat technique in humans. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003; 284: H744-750. doi:10.1152/ajpheart.00455.2002

Lenardo MJ, Baltimore D. NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* 1989; 58: 227–229. doi:10.1016/0092-8674(89)90833-7

Li Q, Cao Y, Dang C, Han B, Han R, Ma H, Hao J, Wang L. Inhibition of double-strand DNA-sensing cGAS ameliorates brain injury after ischemic stroke. *EMBO Mol. Med.* 2020; 12: e11002. doi:10.15252/emmm.201911002

Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP. *The Vascular Biology of Atherosclerosis.* , in:

Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine 2014; Elsevier Health Sciences, S. 873–890

Liedtke AJ, Hughes HC, Neely JR. Effects of excess glucose and insulin on glycolytic metabolism during experimental myocardial ischemia. *Am. J. Cardiol.* 1976; 38: 17–27. doi:10.1016/0002-9149(76)90057-6

Lindsey ML, Bolli R, Canty JM, Du X-J, Frangogiannis NG, Frantz S, Gourdie RG, Holmes JW, Jones SP, Kloner RA, Lefer DJ, Liao R, Murphy E, Ping P, Przyklenk K, Recchia FA, Schwartz Longacre L, Ripplinger CM, Van Eyk JE, Heusch G. Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 2018; 314: H812–H838. doi:10.1152/ajpheart.00335.2017

Lindsey ML, Gannon J, Aikawa M, Schoen FJ, Rabkin E, Lopresti-Morrow L, Crawford J, Black S, Libby P, Mitchell PG, Lee RT. Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction. *Circulation* 2002; 105: 753–758. doi:10.1161/hc0602.103674

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FGR, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo J-P, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran

A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KMV, Nasser K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De León FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh P-H, Yip P, Zabetian A, Zheng Z-J, Lopez AD, Murray CJL, AlMazroa MA, Memish ZA. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond. Engl.* 2012; 380: 2095–2128. doi:10.1016/S0140-6736(12)61728-0

Lu A, Wu H. Structural mechanisms of inflammasome assembly. *FEBS J.* 2015; 282: 435–444. doi:10.1111/febs.13133

Lu C, Ha T, Wang X, Liu L, Zhang X, Kimbrough EO, Sha Z, Guan M, Schweitzer J, Kalbfleisch J, Williams D, Li C. The TLR9 ligand, CpG-ODN, induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of PI3K/Akt signaling. *J. Am. Heart Assoc.* 2014; 3: e000629. doi:10.1161/JAHA.113.000629

Lugrin J, Parapanov R, Rosenblatt-Velin N, Rignault-Clerc S, Feihl F, Waeber B, Müller O, Vergely C, Zeller M, Tardivel A, Schneider P, Pacher P, Liaudet L. Cutting edge: IL-1 α is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2015; 194: 499–503. doi:10.4049/jimmunol.1401948

Ma Y, Mouton AJ, Lindsey ML. Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 2018; 191: 15–28. doi:10.1016/j.trsl.2017.10.001

Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen M-R, Tokgozoglul L, Wiklund O, Mueller C, Drexel H, Aboyans V, Corsini A, Doehner W, Farnier M, Gigante B,

Kayikcioglu M, Krstacic G, Lambrinou E, Lewis BS, Masip J, Moulin P, Petersen S, Petronio AS, Piepoli MF, Pintó X, Räber L, Ray KK, Reiner Ž, Riesen WF, Roffi M, Schmid J-P, Shlyakhto E, Simpson IA, Stroes E, Sudano I, Tselepis AD, Viigimaa M, Vindis C, Vonbank A, Vrablik M, Vrsalovic M, Zamorano JL, Collet J-P, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, John Chapman M, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen M-R, Tokgozoglu L, Wiklund O, Windecker S, Aboyans V, Baigent C, Collet J-P, Dean V, Delgado V, Fitzsimons D, Gale CP, Grobbee D, Halvorsen S, Hindricks G, Iung B, Jüni P, Katus HA, Landmesser U, Leclercq C, Lettino M, Lewis BS, Merkely B, Mueller C, Petersen S, Petronio AS, Richter DJ, Roffi M, Shlyakhto E, Simpson IA, Sousa-Uva M, Touyz RM, Nibouche D, Zelveian PH, Siostrzonek P, Najafov R, van de Borne P, Pojskic B, Postadzhiyan A, Kypris L, Špinar J, Larsen ML, Eldin HS, Viigimaa M, Strandberg TE, Ferrières J, Agladze R, Laufs U, Rallidis L, Bajnok L, Gudjónsson T, Maher V, Henkin Y, Gulizia MM, Mussagaliyeva A, Bajraktari G, Kerimkulova A, Latkovskis G, Hamoui O, Slapikas R, Visser L, Dingli P, Ivanov V, Boskovic A, Nazzi M, Visseren F, Mitevska I, Retterstøl K, Jankowski P, Fontes-Carvalho R, Gaita D, Ezhov M, Foscoli M, Giga V, Pella D, Fras Z, de Isla LP, Hagström E, Lehmann R, Abid L, Ozdogan O, Mitchenko O, Patel RS. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk - The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur. Heart J.* 2020; 41: 111–188. doi:10.1093/eurheartj/ehz455

Man SM, Karki R, Kanneganti T-D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol. Rev.* 2017; 277: 61–75. doi:10.1111/imr.12534

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

Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization.

Front. Biosci. J. Virtual Libr. 2008; 13: 453–461. doi:10.2741/2692

Meissner A, Morgan JP. Contractile dysfunction and abnormal Ca²⁺ modulation during postischemic reperfusion in rat heart. *Am. J. Physiol.* 1995; 268: H100-111. doi:10.1152/ajpheart.1995.268.1.H100

Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, Seropian IM, Van Tassell BW, Salloum FN, Kannan HR, Menna AC, Voelkel NF, Abbate A. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108: 19725–19730. doi:10.1073/pnas.1108586108

Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, Hartley CJ, Pham TT, Daniel SL, Funk E, Entman ML. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am. J. Physiol.* 1999; 277: H660-668

Michalski S, de Oliveira Mann CC, Stafford CA, Witte G, Bartho J, Lammens K, Hornung V, Hopfner K-P. Structural basis for sequestration and autoinhibition of cGAS by chromatin. *Nature* 2020; 587: 678–682. doi:10.1038/s41586-020-2748-0

Moretti J, Roy S, Bozec D, Martinez J, Chapman JR, Ueberheide B, Lamming DW, Chen ZJ, Horng T, Yeretssian G, Green DR, Blander JM. STING Senses Microbial Viability to Orchestrate Stress-Mediated Autophagy of the Endoplasmic Reticulum. *Cell* 2017; 171: 809-823.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.09.034

Motwani M, Pesiridis S, Fitzgerald KA. DNA sensing by the cGAS–STING pathway in health and disease, Fig. 2. *Nat. Rev. Genet.* 2019; 20: 657–674. doi:10.1038/s41576-019-0151-1

Mouton AJ, DeLeon-Pennell KY, Rivera Gonzalez OJ, Flynn ER, Freeman TC, Saucerman JJ, Garrett MR, Ma Y, Harmancey R, Lindsey ML. Mapping macrophage polarization over the myocardial infarction time continuum. *Basic Res. Cardiol.* 2018; 113: 26. doi:10.1007/s00395-018-0686-x

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege J-L, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN, Wynn TA. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014; 41: 14–20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124–1136. doi:10.1161/01.cir.74.5.1124

Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J-L, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 3037–3047. doi:10.1084/jem.20070885

National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed. , The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health 2011; National Academies Press (US), Washington (DC)

Nicotera P, Melino G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 2004; 23: 2757–2765. doi:10.1038/sj.onc.1207559

Nielsen LF, Moe D, Kirkeby S, Garbarsch C. Sirius red and acid fuchsin staining mechanisms. *Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm.* 1998; 73: 71–77. doi:10.3109/10520299809140509

Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, Entman ML. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; 278: H1049-1055. doi:10.1152/ajpheart.2000.278.4.H1049

Núñez-Gil IJ, Riha H, Ramakrishna H. Review of the 2017 European Society of Cardiology's Guidelines for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-Segment Elevation and Focused Update on Dual Antiplatelet Therapy in Coronary Artery Disease Developed in Collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2019; 33: 2334–2343. doi:10.1053/j.jvca.2018.09.032

NVL Chronische KHK, 5. Auflage Version 1. 2019;

Ong S-B, Gustafsson AB. New roles for mitochondria in cell death in the reperfused myocardium. *Cardiovasc. Res.* 2012; 94: 190–196. doi:10.1093/cvr/cvr312

Ørn S, Ueland T, Manhenke C, Sandanger Ø, Godang K, Yndestad A, Mollnes TE, Dickstein K, Aukrust P. Increased interleukin-1 β levels are associated with left ventricular hypertrophy and remodelling following acute ST segment elevation myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention. *J. Intern. Med.* 2012; 272: 267–276. doi:10.1111/j.1365-2796.2012.02517.x

O'Rourke SA, Dunne A, Monaghan MG. The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019; 6: doi:10.3389/fcvm.2019.00101

Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure–volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat. Protoc.* 2008; 3: 1422–1434. doi:10.1038/nprot.2008.138

Paludan SR, Reinert LS, Hornung V. DNA-stimulated cell death: implications for host defence, inflammatory diseases and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 2019; 19: 141–153. doi:10.1038/s41577-018-0117-0

Przyklenk K, Maynard M, Darling CE, Whittaker P. Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; 51: 1393–1398. doi:10.1016/j.jacc.2007.11.070

Roberts TL, Idris A, Dunn JA, Kelly GM, Burnton CM, Hodgson S, Hardy LL, Garceau V, Sweet MJ, Ross IL, Hume DA, Stacey KJ. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. *Science* 2009; 323: 1057–1060. doi:10.1126/science.1169841

Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu. Rev. Immunol.* 2010; 28: 321–342. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101311

Roffi M, Patrono C, Collet J-P, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, Bax JJ, Borger MA, Brotons C, Chew DP, Gencer B, Hasenfuss G, Kjeldsen K, Lancellotti P, Landmesser U, Mehilli J, Mukherjee D, Storey RF, Windecker S, Baumgartner H, Gaemperli O, Achenbach S, Agewall S, Badimon L, Baigent C, Bueno H, Bugiardini R, Carerj S, Casselman F, Cuisset T, Erol Ç, Fitzsimons D, Halle M, Hamm C, Hildick-Smith D, Huber K, Iliodromitis E, James S, Lewis BS, Lip GYH, Piepoli MF, Richter D, Rosemann T, Sechtem U, Steg PG, Vrints C, Luis Zamorano J, Zamorano JL, Aboyans V, Achenbach

S, Agewall S, Badimon L, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Carerj S, Dean V, Erol Ç, Fitzsimons D, Gaemperli O, Kirchhof P, Kolh P, Lancellotti P, Lip GY, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Roffi M, Torbicki A, Carneiro AV, Windecker S, Chilingaryan A, Weidinger F, Najafov R, Sinnaeve PR, Terzic I, Postadzhiyan A, Milicic D, Eftychiou C, Widimsky P, Bang L, El Etriby A, Marandi T, Pietilä M, Kedev S, Koning R, Aladashvili A, Neumann F-J, Tsioufis K, Becker D, Guðnason T, Matetzky S, Bolognese L, Mussagaliev A, Beishenkulov M, Latkovskis G, Serpytis P, Pereira B, Magri CJ, Grosu A, Abir-Khalil S, Larsen AI, Budaj A, Mimoso JMV, Gingham C, Averkov O, Nedeljkovic MA, Studencan M, Barrabés JA, Held C, Rickli H, Peters RJ, Murali MS, Atalar E, Swanson N, Parkhomenko A. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation - Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 2016; 37: 267–315. doi:10.1093/eurheartj/ehv320

Sack MN. Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. *Cardiovasc. Res.* 2006; 72: 210–219. doi:10.1016/j.cardiores.2006.07.010

Sandanger Ø, Ranheim T, Vinge LE, Bliksøen M, Alfsnes K, Finsen AV, Dahl CP, Askevold ET, Florholmen G, Christensen G, Fitzgerald KA, Lien E, Valen G, Espevik T, Aukrust P, Yndestad A. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia–reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 2013; 99: 164–174. doi:10.1093/cvr/cvt091

Sarhan J, Liu BC, Muendlein HI, Weindel CG, Smirnova I, Tang AY, Ilyukha V, Sorokin M, Buzdin A, Fitzgerald KA, Poltorak A. Constitutive interferon signaling maintains critical threshold of MLKL expression to license necroptosis. *Cell Death Differ.* 2019; 26: 332–347. doi:10.1038/s41418-018-0122-7

Saxena A, Russo I, Frangogiannis NG. Inflammation as a therapeutic target in myocardial infarction: learning from past failures to meet future challenges. *Transl. Res.* 2016; 167: 152–166. doi:10.1016/j.trsl.2015.07.002

Scheiermann J, Klinman DM. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine* 2014; 32: 6377–6389. doi:10.1016/j.vaccine.2014.06.065

Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (Hrsg.). *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie*, 31. ed. , Springer-Lehrbuch 2011; Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-01651-6

Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140: 821–832. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040

Schulman D, Latchman DS, Yellon DM. Effect of aging on the ability of preconditioning to protect rat hearts from ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001; 281: H1630-1636. doi:10.1152/ajpheart.2001.281.4.H1630

Scofield SLC, Singh K. Confirmation of Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury in Mice Using Surface Pad Electrocardiography. *J. Vis. Exp. JoVE* 2016; . doi:10.3791/54814

Sharif H, Wang L, Wang WL, Magupalli VG, Andreeva L, Qiao Q, Hauenstein AV, Wu Z, Núñez G, Mao Y, Wu H. Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. *Nature* 2019; 570: 338–343. doi:10.1038/s41586-019-1295-z

Sheehan FH, Doerr R, Schmidt WG, Bolson EL, Uebis R, von Essen R, Effert S, Dodge HT. Early recovery of left ventricular function after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: an important determinant of survival. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1988; 12: 289–300. doi:10.1016/0735-1097(88)90397-x

Shi H, Wang Y, Li X, Zhan X, Tang M, Fina M, Su L, Pratt D, Bu CH, Hildebrand S, Lyon S, Scott L, Quan J, Sun Q, Russell J, Arnett S, Jurek P, Chen D, Kravchenko VV, Mathison JC, Moresco EMY, Monson NL, Ulevitch RJ, Beutler B. NLRP3 activation and mitosis are mutually exclusive events coordinated by NEK7, a new inflammasome component. *Nat. Immunol.* 2016; 17: 250–258. doi:10.1038/ni.3333

Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, Zhuang Y, Cai T, Wang F, Shao F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 2015; 526: 660–665. doi:10.1038/nature15514

Simoons ML, Serruys PW, van den Brand M, Res J, Verheugt FW, Krauss XH, Remme WJ, Bär F, de Zwaan C, van der Laarse A. Early thrombolysis in acute myocardial infarction: limitation of infarct size and improved survival. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1986; 7: 717–728. doi:10.1016/s0735-1097(86)80329-1

Sivaraman V, Hausenloy DJ, Wynne AM, Yellon DM. Preconditioning the diabetic human myocardium. *J. Cell. Mol. Med.* 2010; 14: 1740–1746. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00796.x

Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzonana G, Gillessen D, Gabbiani G. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J. Cell Biol.* 1986; 103: 2787–2796. doi:10.1083/jcb.103.6.2787

Sridhar S, Botbol Y, Macian F, Cuervo AM. Autophagy and disease: always two sides to a problem. *J. Pathol.* 2012; 226: 255–273. doi:10.1002/path.3025

Stancovski I, Baltimore D. NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* 1997; 91: 299–302. doi:10.1016/s0092-8674(00)80413-4

Statistisches Bundesamt [WWW Document]. *Stat. Bundesamt* 2021; . URL <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle.html> (zugegriffen 8.23.21).

Steinhagen F, Zillinger T, Peukert K, Fox M, Thudium M, Barchet W, Putensen C, Klinman D, Latz E, Bode C. Suppressive oligodeoxynucleotides containing TTAGGG motifs inhibit cGAS activation in human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 2018; 48: 605–611. doi:10.1002/eji.201747338

Suga H, Sagawa K, Demer L. Determinants of instantaneous pressure in canine left ventricle. Time and volume specification. *Circ. Res.* 1980; 46: 256–263. doi:10.1161/01.res.46.2.256

Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP Synthase is a Cytosolic DNA Sensor that Activates the Type-I Interferon Pathway. *Science* 2013; 339:. doi:10.1126/science.1232458

Sunagawa K, Maughan WL, Burkhoff D, Sagawa K. Left ventricular interaction with arterial load studied in isolated canine ventricle. *Am. J. Physiol.* 1983; 245: H773-780. doi:10.1152/ajpheart.1983.245.5.H773

Swietach P, Spitzer KW, Vaughan-Jones RD. Na⁺ ions as spatial intracellular messengers for co-ordinating Ca²⁺ signals during pH heterogeneity in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 2015; 105: 171–181. doi:10.1093/cvr/cvu251

Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 2001; 107: 7–11. doi:10.1172/JCI11830

Takahashi M. Role of NLRP3 Inflammasome in Cardiac Inflammation and Remodeling after Myocardial Infarction. *Biol. Pharm. Bull.* 2019; 42: 518–523. doi:10.1248/bpb.b18-00369

Tao J-H, Zhang Y, Li X-P. P2X7R: A potential key regulator of acute gouty arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 2013; 43: 376–380. doi:10.1016/j.semarthrit.2013.04.007

Thygesen et al. ESC-Pocket-Leitlinie: Vierte Definition des Myokardinfarktes (Version 2018). 2019;

Toldo S, Mezzaroma E, Mauro AG, Salloum F, Van Tassell BW, Abbate A. The inflammasome in myocardial injury and cardiac remodeling. *Antioxid. Redox Signal.* 2015; 22: 1146–1161. doi:10.1089/ars.2014.5989

Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol. Int.* 1999; 49: 91–102. doi:10.1046/j.1440-1827.1999.00829.x

Trieu A, Roberts TL, Dunn JA, Sweet MJ, Stacey KJ. DNA motifs suppressing TLR9 responses. *Crit. Rev. Immunol.* 2006; 26: 527–544. doi:10.1615/critrevimmunol.v26.i6.50

Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc. Res.* 1998; 39: 121–135. doi:10.1016/S0008-6363(98)00069-8

Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 2004; 61: 481–497. doi:10.1016/j.cardiores.2003.10.011

Volz HC, Laohachewin D, Seidel C, Lasitschka F, Keilbach K, Wienbrandt AR, Andrassy J, Bierhaus A, Kaya Z, Katus HA, Andrassy M. S100A8/A9 aggravates post-ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF-kB signaling. *Basic Res. Cardiol.* 2012; 107: 250. doi:10.1007/s00395-012-0250-z

Wagner C, Kloeting I, Strasser RH, Weinbrenner C. Cardioprotection by postconditioning is lost in WOKW rats with metabolic syndrome: role of glycogen synthase kinase 3beta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2008; 52: 430–437. doi:10.1097/FJC.0b013e31818c12a7

Wang TY, Zhang M, Fu Y, Armstrong PW, Newby LK, Gibson CM, Moliterno DJ, Van de Werf F, White HD, Harrington RA, Roe MT. Incidence, distribution, and prognostic impact of occluded culprit arteries among patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes undergoing diagnostic angiography. *Am. Heart J.* 2009; 157: 716–723. doi:10.1016/j.ahj.2009.01.004

Wang Y, Yamamoto Y, Shigemori S, Watanabe T, Oshiro K, Wang X, Wang P, Sato T, Yonekura S, Tanaka S, Kitazawa H, Shimosato T. Inhibitory/suppressive oligodeoxynucleotide nanocapsules as simple oral delivery devices for preventing atopic dermatitis in mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2015; 23: 297–309. doi:10.1038/mt.2014.239

White HD, Norris RM, Brown MA, Takayama M, Maslowski A, Bass NM, Ormiston JA, Whitlock T. Effect of intravenous streptokinase on left ventricular function and early survival after acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 1987; 317: 850–855. doi:10.1056/NEJM198710013171402

Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. *Science* 2013; 339: 826–830. doi:10.1126/science.1229963

Xie L, He S, Kong N, Zhu Y, Tang Y, Li J, Liu Z, Liu J, Gong J. Cpg-ODN, a TLR9 Agonist, Aggravates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Activation of TLR9-P38 MAPK Signaling. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2018; 47: 1389–1398. doi:10.1159/000490828

Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* 2010; 12: 814–822. doi:10.1038/ncb0910-814

Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357: 1121–1135. doi:10.1056/NEJMra071667

Yin Q, Tian Y, Kabaleeswaran V, Jiang X, Tu D, Eck MJ, Chen ZJ, Wu H. Cyclic di-GMP sensing via the innate immune signaling protein STING. *Mol. Cell* 2012; 46: 735–745. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.029

Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Schaub MC. Volatile anesthetics mimic cardiac preconditioning by priming the activation of mitochondrial K(ATP) channels via

multiple signaling pathways. *Anesthesiology* 2002; 97: 4–14

Zhang N, Zhang X, Liu X, Wang H, Xue J, Yu J, Kang N, Wang X. Chrysophanol Inhibits NALP3 Inflammasome Activation and Ameliorates Cerebral Ischemia/Reperfusion in Mice. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 370530. doi:10.1155/2014/370530

Zhao J, Mou Y, Bernstock JD, Klimanis D, Wang S, Spatz M, Maric D, Johnson K, Klinman DM, Li Xiaohong, Li Xinhui, Hallenbeck JM. Synthetic Oligodeoxynucleotides Containing Multiple Telemeric TTAGGG Motifs Suppress Inflammasome Activity in Macrophages Subjected to Oxygen and Glucose Deprivation and Reduce Ischemic Brain Injury in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. *PLoS One* 2015; 10: e0140772. doi:10.1371/journal.pone.0140772

Zougari Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guérin C, Vilar J, Caligiuri G, Tsiantoulas D, Laurans L, Dumeau E, Kotti S, Bruneval P, Charo IF, Binder CJ, Danchin N, Tedgui A, Tedder TF, Silvestre J-S, Mallat Z. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat. Med.* 2013; 19: 1273–1280. doi:10.1038/nm.3284

9. Danksagung

Zunächst gilt mein größter Dank meinem Doktorvater PD Dr. Lars Eichhorn, der mich bereits vor der Anfertigung dieser Dissertation an das wissenschaftliche Arbeiten und die experimentelle Forschung herangeführt hat. Ich möchte mich außerdem für die jahrelange ausgezeichnete Betreuung während der Versuche und der Erstellung dieser Dissertation bedanken. Ein großer Dank gilt außerdem dem Team, insbesondere Christine Peigney, des Forschungslabors OPZ der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie der Universitätsklinik Bonn um PD Dr. Daniel Duerr.

Meinem jahrelangen Mitbewohner Fabian Ullrich möchte ich für die Begleitung durch alle Höhen und Tiefen des Projekts sowie die stete Motivation danken. Dankend erwähnen möchte ich ebenfalls meinen Bruder, der diese Arbeit mehrfach zur Korrektur gelesen hat. Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, Dr. Isabella Martínez-Gadow und Dr. Karsten Gadow, die mir meine Ausbildung ermöglicht und mich während dieser stets unterstützt und begleitet haben.