

**Angeborenes Immunsystem
und septische Kardiomyopathie:
Bedeutung von TLR9 für eine
myokardiale Entzündungsreaktion
durch bakterielle DNA**

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

vorgelegt von:

Peter Krings

aus: Mönchengladbach

2007

Angefertigt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Hoeft
2. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Meyer

Tag der Mündlichen Prüfung: 29. Juni 2007

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin,
Universitätsklinikum Bonn der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. A. Hoeft

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Widmung

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet, die mich während meines Medizinstudiums jederzeit unterstützt haben und damit einen erfolgreichen Abschluss und diese Doktorarbeit möglich gemacht haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	10
1.1 Sepsis.....	10
1.1.1 Definition	10
1.1.2 Epidemiologie der Sepsis.....	13
1.1.3 Pathophysiologie der Sepsis.....	15
1.1.4 Septische Kardiomyopathie	19
1.2 Angeborenes Immunsystem und Toll-like Rezeptoren.....	24
1.3 Immunostimulatorische DNA und Toll-like Rezeptor 9 (TLR9)	26
1.4 Toll-like Rezeptoren und septische Kardiomyopathie.....	31
1.5 Arbeitshypothese.....	32
2. Material und Methoden.....	33
2.1 TLR9 Mäuse.....	33
2.2 Stimulation und Asservierung des Untersuchungsmaterials.....	34
2.2.1 Einleitung	34
2.2.2 Injektionsprotokoll	34
2.3 RNA – Isolation	35
2.4 Ribonuclease Protection Assay (RPA).....	36
2.4.1 Einleitung	36
2.4.2 Durchführung des RPA	37
2.4.3 Auswertung	40
2.5 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	43
2.5.1 Proteinisolation für ELISA	43
2.5.2 Durchführung des ELISA	43
2.6 Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	45
2.6.1 Einleitung	45
2.6.2 Proteinisolation für EMSA.....	46
2.6.3 Durchführung des EMSA.....	47
2.7 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	50
2.7.1 Einleitung	50

2.7.2	Durchführung der RT-PCR.....	50
2.8	Statistik.....	51
3.	Ergebnisse	53
3.1	Kardiale Zytokin-mRNA-Expression	53
3.1.1	mRNA-Expression von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).....	53
3.1.2	mRNA Expression von Interleukin-1 β (IL-1 β).....	54
3.1.3	mRNA Expression von Interleukin-6 (IL-6).....	56
3.2	Kardiale Proteingewebespiegel von Zytokinen	58
3.2.1	Proteingewebespiegel von TNF- α	58
3.2.2	Proteingewebespiegel von IL-1 β	59
3.2.3	Proteingewebespiegel von IL-6.....	60
3.3	Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B im Herzen	61
3.4	mRNA Expression von iNOS im Myokard	62
4.	Diskussion	64
4.1	Das Mausmodell zur Induktion einer septischen Kardiomyopathie	64
4.2	Induktion von NF κ B, Zytokinen und iNOS nach Stimulation mit CpG-DNA.....	66
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick.....	70
5.	Zusammenfassung.....	72
6.	Literaturverzeichnis.....	73
7.	Danksagung	83

Abkürzungsverzeichnis

aPTT	aktivierte Partielle Thromboplastinzeit
ARDS	„adult respiratory distress syndrom“
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinonsäure
CARS	„compensatory antagonistic response syndrom“
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
DC	dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
D-GalN	D-Galaktosamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	„Enzym-linked Immunosorbent Assay“
EMSA	„Electrophoretic Mobility Shift Assay“
GACU-Pool	Lösung aus Guanosin, Adenosin, Cytosin und Uracil
HIV	„human immunodeficiency virus“
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	„inhibitory κ B kinase“
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthethase
INR	„international normalized ratio“
IRAK	„interleukin-1-receptor-associated-kinase“
JNK	„c-Jun-N-terminal kinase“
LIF	Leukozyten inhibierender Faktor
LPS	Lipopolysaccharid

MARS	„mixed antagonistic response syndrom“
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MKK6	mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase 6
MODS	„multiple organ dysfunction syndrom“
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MyD88	„myloid differentiation marker 88“
NFκB	„nuclear factor κB“
NIK	NFκB „inducing kinase“
NO	Stickstoffmonoxid
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	„pathogen associated microbial pattern“
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PIRO	Akronym für „predisposition“, „insult / infection“, „response“, „organ dysfunction“
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PRR	„pattern recognition receptor“
RES	retikuloendotheliales System
RNase	Ribonuklease
RPA	„Ribonuklease Protection Assay“
RT-PCR	reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SIRS	„systemic inflammatory response syndrom“
SOFA-Score	„Sequential Organ Failure Assessment-Score“
TAK1	„TGFβ-aktivated-kinase-1“
TBE	Standardpuffer aus Tris-Borat und EDTA
TGFβ	„transforming growth factor β“
TIR-Domäne	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TLR9	Toll-like Rezeptor 9
TLR9-D	TLR9 defizient, „knock-out“
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TNM-System	Tumor, Lymphknoten, Metastase; internationales Klassifikationssystem der „Union internationale contre le cancer“

TRAF6	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziiertes-Faktor-6
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
UTP	Uraciltriphosphat
vs	versus
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Sepsis

1.1.1 Definition

Der Versuch, den Begriff „Sepsis“ zu definieren hat Generationen von Medizinern beschäftigt, ohne dass man zu einem befriedigenden und allgemeingültigen Ergebnis gekommen ist. Die klassische Definition von W. Schottmüller aus dem Jahre 1914 forderte einen primären Sepsisherd und eine davon ausgehende hämatogene Streuung (Schottmüller, 1914).

Die heute gültige Definition zur Klassifikation der Sepsis geht auf eine Konsensuskonferenz aus Vertretern des „American College of Chest Physicians“ (ACCP) und der „Society of Critical Care Medicine“ (SCCM) aus dem Jahre 1991 zurück. Dort wurde der Begriff „systemic inflammatory response syndrom“ (SIRS) eingeführt, und die Krankheitsbilder SIRS und Sepsis wurden wie folgt definiert.

Ein SIRS stellt eine allgemeine, entzündliche Abwehrreaktion auf unterschiedliche Aggressionen dar und manifestiert sich durch das Auftreten von zwei oder mehr der folgenden Reaktionen: Temperatur über 38°C (oder unter 36°C), Herzfrequenz über 90 Schläge/min, Atemfrequenz über 20 Atemzüge/min oder $p_a\text{CO}_2$ unter 32mmHg, Leukozytenzahl über 12.000/mm³ oder unter 4.000/mm³ oder mehr als 10% unreife Neutrophile. Dagegen wurde die Sepsis definiert als das Auftreten dieser allgemein entzündlichen Antwort als Reaktion auf eine mikrobiologische Infektion. Der septische Patient ist demnach der Patient mit einem SIRS aus infektiöser Ursache. Des Weiteren wurden die Begriffe schwere Sepsis, septischer Schock und „multiple organ dysfunction syndrom“ (MODS) eingeführt und präzise definiert (Society of Critical Care Medicine, 1992) (Tabelle 1). Diese Definitionen haben weite Verbreitung erfahren und die Verständigung in der Wissenschaft hinsichtlich dieses Krankheitsbildes vereinfacht.

Nach der Einführung dieser neuen Begriffe und Definitionen in die klinische Praxis wurde deutlich, dass mehr als zwei Drittel der Patienten einer Intensivstation diese SIRS-Kriterien erfüllten (Rangel-Frausto et al., 1995). Außerdem wurde kritisiert, dass die SIRS-Kriterien zu unspezifisch seien und die Krankheitsbilder SIRS und Sepsis nicht eindeutig definierten. Aufgrund dieser Einschränkungen wurden die SIRS-Kriterien von einigen Autoren als „für der Praxis unbrauchbar“ eingestuft (Marshall, 2000; Vincent, 1997). Diese Erkenntnis führte 2001 zu einer weiteren Expertenrunde, der „International Sepsis Definitions Conference“, bei der neue

wissenschaftliche Ergebnisse diskutiert und ihre Relevanz für die Definitionen der ersten Konsensuskonferenz beurteilt wurden. Man kam zu dem Ergebnis, dass die alten Definitionen weiterhin Gültigkeit besitzen und sowohl in der Klinik als auch von Wissenschaftlern benutzt werden sollen. Allerdings wurde die Liste der klinischen Zeichen und Laborparameter zur Diagnosesicherung der Sepsis erweitert, ohne dass Grenzwerte für die einzelnen Parameter genannt werden, da diese für die Krankheit Sepsis noch zu bestimmen sind (Levy et al., 2003): Häodynamische Instabilität, messbar mittels erniedrigtem systolischem, mittlerem und diastolischem Blutdruck, erhöhte venöse Sauerstoffsättigung, Gerinnungsstörung an Hand veränderter INR und aPTT, Oligurie und erhöhtes Kreatinin als Zeichen der beginnenden Niereninsuffizienz sowie Leberfunktionsstörung durch erhöhte Transaminasen. Außerdem wurde vorgeschlagen zur Bestimmung des Grades der Organdysfunktion bei schwerer Sepsis ein Punktesystem, z. B. den „Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)-Score“ zu benutzen. Auch die Diskussion über spezifische Kriterien im Sinne eines Inflammations- oder Sepsismarkers wurde auf der Konferenz aufgegriffen. Interleukin-6 (IL-6) und Procalcitonin wurden als potentielle Kandidaten genannt (Harbarth et al., 2001; Hausfater et al., 2002; Oberholzer et al., 2005). Procalcitonin ist bei systemisch wirksamer Infektion im Serum der Patienten erhöht und dient darüber hinaus der Differenzierung infektiöser von nicht infektiösen Ursachen einer Aktivierung des inflammatorischen Systems (Rau et al., 1997; Selberg et al., 2000). Diese Entzündungsmarker können aber zurzeit wegen begrenzter Datenlage noch nicht uneingeschränkt empfohlen werden.

Ein weiterer Vorschlag der Konferenz von 2001 war die Einführung des Verlaufs- und Prognosesystems PIRO. PIRO ist an das TNM (Tumor, Lymphknoten, Metastase)- System für Tumorerkrankungen angelehnt und bedeutet „predisposition“, „insult / infection“, „host response“ und „organ dysfunction“. Unter Prädisposition werden genetische Variationen, Vor- und Begleiterkrankungen sowie religiöse und kulturelle Faktoren subsumiert, die einen Einfluss auf Verlauf und Ausgang der Sepsis und die zu wählende Therapie haben (Levy et al., 2003). Wichtige Faktoren unter dem Stichwort Infektion sind Eintrittspforte und Art des Erregers. Die Evaluation der Inflammation („response“) ist schwierig und wird am ehesten durch die oben beschriebenen Entzündungsmarker erfolgen. Das Ausmaß der Organdysfunktion, gemessen mit dem SOFA-Score, ist entscheidend für die Prognose und kann zur differenzierten Therapie beitragen (Ferreira et al., 2001). Das PIRO-System und die genannten Definitionen und Kriterien müssen in der Klinik und der Forschung eingeführt werden und sich bewähren. In einer kürzlich

durchgeführten Umfrage unter ärztlichen Leitern von deutschen Intensivstationen gaben nur 50% der Befragten an, die ACCP/SCCM-Kriterien in der Praxis zu benutzen (Brunkhorst, 2006). In einer anderen Studie bezweifelten 87% der befragten Intensivmediziner die Validität der ACCP/SCCM-Kriterien (Poeze et al., 2004).

Eine andere Sepsis-Definition, bei der nicht Diagnosekriterien sondern die Pathophysiologie im Mittelpunkt steht lautet wie folgt.

„Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“ (Schuster und Müller-Werdan, 2000).

SIRS	Systemisch-entzündliche Reaktion auf verschiedene schwere klinische Insulte, charakterisiert durch zwei oder mehr der folgenden Symptome: a) Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$, b) Herzfrequenz $>90/\text{min}$, c) Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder $p_a\text{CO}_2 <32\text{mmHg}$, d) Leukozyten $>12.000/\text{mm}^3$ oder $<4.000/\text{mm}^3$ oder $>10\%$ unreife Formen;
Sepsis	Systemische Reaktion auf eine Infektion, charakterisiert durch zwei oder mehr der folgenden Symptome: a) Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$, b) Herzfrequenz $>90/\text{min}$, c) Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder $p_a\text{CO}_2 <32\text{mmHg}$, d) Leukozyten $>12.000/\text{mm}^3$ oder $<4.000/\text{mm}^3$ oder $>10\%$ unreife Formen;
Schwere Sepsis	Sepsis, assoziiert mit Organdysfunktion, Minderperfusion oder Hypotonie. Minderdurchblutung und Durchblutungsstörung können beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf: Laktatazidose, Azidose, Oligurie oder eine akute Änderung der Bewusstseinslage.
septischer Schock	Sepsisinduzierter Schock mit Hypotonie trotz adäquater Volumensubstitution, einhergehend mit Hypoperfusionszeichen oder

	Organdysfunktionszeichen; letztere können beinhalten, sind aber nicht beschränkt auf: Laktatazidose, Azidose, Oligurie oder eine akute Änderung der Bewusstseinslage. Patienten, die infolge einer Therapie mit positiv inotropen oder vasokonstriktiven Substanzen nicht mehr hypoton sind, aber dennoch Zeichen der Hypotonie oder Organdysfunktion aufweisen, werden trotzdem dem Stadium des septischen Schocks zugeordnet.
„Multiple organ dysfunction syndrom“ (MODS)	Dermaßen geänderte Organfunktion bei Akutkranken, dass die Homöostase ohne Intervention nicht mehr aufrechterhalten werden kann.
akute septische Kardiomyopathie	Myokardschädigung im Rahmen einer Sepsis mit der Folge einer im Verhältnis zum systemischen Gefäßwiderstand verminderten Pumpfunktion des Herzens.

Tabelle 1: Definition von SIRS, Sepsis, schwerer Sepsis, septischen Schock und MODS nach der Konsensuskonferenz von 1991 (Society of Critical Care Medicine, 1992); Definition von akuter septischer Kardiomyopathie nach Werdan K, Müller-Werdan U (Müller-Werdan, 1998; Werdan, 1996).

1.1.2 Epidemiologie der Sepsis

Die Sepsis ist ein häufiges und schweres Krankheitsbild, das mit einer hohen Mortalität einhergeht und von hoher sozioökonomischer Relevanz ist. In Deutschland leiden 0,8 bis 2% der stationär aufgenommenen Patienten an einer Sepsis. Die Prävalenz auf deutschen Intensivstationen beträgt 12% für Sepsis und 11% für schwere Sepsis. In einer aktuellen Studie des Kompetenznetzwerks Sepsis geht man von 110.000 bis 154.000 Sepsis Patienten pro Jahr aus. Dies entspricht einer Inzidenz von 161 bis 226 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr. Die Häufigkeit von schwerer Sepsis und septischem Schock auf Intensivstationen wird auf 52.000 bis 75.000 Fälle pro Jahr geschätzt, was einer Inzidenz von 76 bis 110 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr entspricht. Damit ist die Häufigkeit von schwerer Sepsis und septischem Schock vergleichbar mit der Inzidenz des akuten Myokardinfarktes mit 143 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Brunkhorst, 2006; Rychlik und Pfeil, 2002). In den USA verursachen 751.000 Sepsis Patienten, die im Durchschnitt 19,6 Tage im Krankenhaus verbringen, Gesamtkosten in Höhe von 16,7 Milliarden Dollar pro Jahr (Angus et al., 2001; Angus und Wax, 2001).

In Abhängigkeit vom Schweregrad der Sepsis steigt die Mortalität von 3%, wenn kein SIRS-Kriterium erfüllt ist, bis auf 17%, wenn vier SIRS-Kriterien erfüllt sind. Auch die Zahl der betroffenen Organsysteme ist prognostisch wichtig und entscheidend für die Therapie. Das Letalitätsrisiko steigt um 15-20% mit jedem zusätzlichen Organ mit Funktionsversagen (Hörner et al., 2004). In einer Studie zur Epidemiologie der Sepsis auf drei Intensiv- und drei Normalstationen in den USA betrug die Letalität 16%, bei schwerer Sepsis 20% und bei septischem Schock 46%. Die Gesamtmortalität wird mit 28,6% beziffert (Rangel-Frausto et al., 1995). Mit den daraus resultierenden 215.000 Todesfällen pro Jahr hat die schwere Sepsis einen Anteil von 9,3% bei den Todesursachen und ist damit nach Einschätzung der Autoren auch in den USA in seiner Bedeutung dem akuten Myokardinfarkt gleichzusetzen (Angus et al., 2001; Centers for Disease Control, 1990). In Deutschland liegt die Letalität durch septischen Schock während des Aufenthalts auf der Intensivstation bei 47%. Die Krankenhausletalität beträgt 54%. Mit näherungsweise 40.000 Todesfällen ist die schwere Sepsis/der septische Schock nach der koronaren Herzkrankheit und dem akutem Myokardinfarkt die dritthäufigste Todesursache auf deutschen Intensivstationen (Brunkhorst, 2006).

Die Inzidenz der Sepsis hat zugenommen auf Grund einer zunehmenden Anzahl immunsupprimierter Patienten, einer erhöhten Frequenz multiresistenter Erreger sowie der weit verbreiteten Verwendung von Fremdmaterialien zur Implantation. Die Zunahme der Inzidenz beträgt 1,5% pro Jahr (Angus et al., 2001).

Die epidemiologisch wichtigen Daten zur akuten septischen Kardiomyopathie werden im Kapitel 1.1.4 Septische Kardiomyopathie dargestellt.

1.1.3 Pathophysiologie der Sepsis

Die einer Sepsis zu Grunde liegende Infektion geht von einem Fokus aus, der prinzipiell in allen Geweben lokalisiert sein kann. Eine Übersicht über die am häufigsten betroffenen Organe gibt Tabelle 2.

Sepsisherde	[%]
Respirationstrakt	39,3%
Intraabdomineller Fokus / Pelvis	23,0%
Harnwege	0,8%
Haut / Wunde	10,7%
Fremdkörper / Katheter	1,6%
Endokarditis	2,5%
Zerebrospinalflüssigkeit	2,5%
Andere	4,1%

Tabelle 2: Verteilung der infektiösen Sepsisherde (Reinhart et al., 1996).

Das Spektrum der Sepsis auslösenden Mikroorganismen ist breit, da auch traditionell als gering pathogen eingestufte Keime (z. B. *Staphylococcus epidermidis*) bei entsprechenden prädisponierenden Faktoren zur Sepsis führen können. Eine zusammenfassende Übersicht der auslösenden Mikroorganismen bietet Tabelle 3.

Keimspektrum	[%]
Grampositiv	39,5%
Gramnegativ	35,0%
Pilze	7,4%
Intraabdominelle Anaerobier	2,4%
Andere / nicht klassifizierte Keime	4,5%
Polymikrobielle Infektion	11,1%

Tabelle 3: Sepsiskeimspektrum (Sands et al., 1997).

Prinzipiell gibt es drei mögliche Verläufe einer Infektion: 1. Eliminierung und Auflösung der Infektion, 2. chronische Entzündung und 3. tödliche entzündliche Erkrankung mit überschießender oder ungenügender Immunantwort.

Prädisponierende Faktoren, die das Immunsystem schwächen und so einer Infektion den Weg bahnen, können die unterschiedlichsten Erkrankungen und Zustände sein. Eine Untersuchung bei 446 Sepsisfällen einer medizinischen Universitätsklinik offenbarte folgende prädisponierende Faktoren: Tumorleiden (16%), Diabetes mellitus (15%), Nierenerkrankungen (13%), Lebererkrankungen (10%) und Hämoblastosen (9%). 29% der Patienten waren nicht durch prädisponierende Faktoren belastet (Vincent, 1985). Bei chirurgischen Patienten kommen Polytraumata, Verbrennungen und große risikoreiche Eingriffe als prädisponierende Erkrankungen hinzu.

Ob der Organismus die Infektion lokal terminieren kann oder ob es zur Blutbahninvasion kommt hängt im Wesentlichen von drei Faktoren ab:

- a) Zahl, Pathogenität und Virulenz der Erreger,
- b) Funktion der körpereigenen Abwehrmechanismen,
- c) Reaktion des Wirtsorganismus.

Folge der Überwindung der körpereigenen Abwehrmechanismen ist die Einschwemmung von Mikroorganismen und deren toxischer Produkte in Blutbahn und Gewebe. Der Wirtsorganismus reagiert darauf mit einer akut entzündlichen Allgemeinreaktion. Wenn diese an sich sinnvolle Abwehrreaktion aus der Kontrolle der physiologischen Inhibitormechanismen und damit in unkontrollierter, überschießender, generalisierter Form nicht mehr nur die auslösenden Pathogene eliminiert, sondern autodestruktive Schädigungen körpereigener Zellsysteme und Organe verursacht, entsteht das Krankheitsbild der Sepsis.

An der Entstehung einer Sepsis sind in besonderem Maße folgende bakterielle Produkte beteiligt:

- a) Endotoxin bzw. Lipopolysaccharide (LPS),
- b) Peptidoglykane,
- c) Porenbildner,
- d) Superantigene,
- e) bakterielle DNA.

Diesen bakteriellen Produkten ist gemeinsam, dass sie zu den Triggersubstanzen gehören, die eine Signalkaskade mit nachfolgender Mediatorausschüttung in Gang setzen können. Sie werden deshalb als Initiatoren bezeichnet. Innerhalb der Vielzahl der daraufhin freigesetzten Mediatoren

zeichnet sich eine gewisse Hierarchie ab, auch wenn aufgrund der vielfältigen Interaktionen von einem Zytokinnetzwerk auszugehen ist. Die Mediatoren werden deshalb in frühe und sekundäre Mediatoren unterteilt (Müller-Werdan und Schuster, 2005).

Zu den frühen Mediatoren zählen besonders die proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-8 (IL-8). Als Reaktion auf eine proinflammatorische Phase werden auch antiinflammatorische Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-4 (IL-4) und „transforming-growth-factor- β “ (TGF β) gebildet. Eine Sonderstellung nimmt Interleukin-6 (IL-6) ein, da es pro- und antiinflammatorische Eigenschaften besitzt, indem es einerseits zur Synthese von Akutphaseproteinen führt und andererseits IL-10 induziert.

Sekundäre Mediatoren, auch als finale Mediatoren oder Effektoren bezeichnet, sind diejenigen Mediatoren, die unmittelbar für die funktionellen und strukturellen Organschädigungen verantwortlich sind. Wichtige sekundäre Mediatoren sind Komplementfaktoren, Arachnidonsäurederivate (Prostaglandine und Leukotriene), Proteasen, und Sauerstoffradikale sowie der plättchenaktivierende Faktor (PAF) und Stickstoffmonoxid (NO).

Die bakteriellen Bestandteile und die körpereigenen Mediatorsubstanzen verursachen über bisher nicht völlig aufgeklärte Mechanismen die klinisch zu beobachtenden Symptome. Dabei kommt es zunächst zu einer akuten Verschlechterung des Allgemeinzustandes mit Schüttelfrost und anhaltendem Fieber. Es folgen Veränderungen der Respiration, Zirkulation, Blutgerinnung und des Stoffwechsels. Klinische Zeichen dieser Veränderungen sind Tachypnoe, respiratorische Insuffizienz, Tachykardie und Blutdruckabfall mit erhöhtem Bedarf an Volumen und Katecholaminen. Die Gerinnungsstörung wird durch Petechien, Verminderung der Thrombozyten und Anstieg der Fibrinspaltprodukte evident. Metabolische Veränderungen können Hyperglykämie, Anstieg der Blutlaktatkonzentration, Umstellung auf katabolen Stoffwechsel und relative Nebenniereninsuffizienz umfassen. Zur weiteren Progression der Erkrankung tragen insbesondere die zunehmende Verschlechterung der Respiration und des kardiozirkulatorischen Systems bei. Bereits in der Frühphase der Sepsis ist die Entstehung eines „adult respiratory distress syndrom“ (ARDS) möglich. Dieses entsteht u. a. als Folge der systemischen Entzündungsreaktion mit Ausschüttung von Zytokinen und Leukozytenaktivierung. Dies führt zu einem diffusen Lungenparenchymschaden mit Permeabilitäts- und Diffusionsstörung. Durch das entstehende Lungenödem kommt es zur hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion mit der Folge eines Anstiegs des pulmonalarteriellen Druckes und arterieller Oxygenierungsstörung.

Die Störung des kardiozirkulatorischen Systems manifestiert sich auf drei Ebenen.

- a) Als akute septische Kardiomyopathie (siehe Kapitel 1.1.4)
- b) als Störung der Makrozirkulation
- c) als Störung der Mikrozirkulation

Das Hauptcharakteristikum der Störung der Makrozirkulation ist die Vasodilatation, die überwiegend einer vermehrten NO-Produktion der Gefäßwand zugeschrieben wird. Dadurch vermindert sich der systemische Gefäßwiderstand im septischen Schock. Klinisch imponiert bei diesen Patienten eine ausgeprägte Hypotonie. Der Mikrozirkulationsschaden wird durch die systemische Entzündungsreaktion und Gerinnungsaktivierung katalysiert. Durch rigide Erythrozyten und Leukozyten, die Kapillaren verschließen können, kommt es zur Abnahme der funktionellen Kapillardichte um 30 bis 40%. Die erhöhte Endothelpermeabilität („capillary leak syndrom“) ist Resultat der systemischen Entzündungsreaktion. Typischerweise findet sich bei der schweren Sepsis/septischen Schock eine Schädigung der Endothelbarriere. Es resultieren ein intravasaler Protein- und Volumenmangel mit Ausbildung von Ödemen. Weitere wichtige Faktoren, die zum Kollaps der mikrozirkulatorischen Funktion beitragen sind eine gestörte Autoregulation, eine verminderte Reaktivität gegenüber Katecholaminen und eine Aktivierung der Gerinnungskaskade.

Obwohl bei septischen Patienten häufig die Störungen des kardiopulmonalen Systems im Vordergrund stehen und den Hauptansatzpunkt für die intensivmedizinische Therapie bilden, kommt es beim septischen Schock durch O₂-Angebots-, Diffusions- und Verwertungsstörung zu Funktionsstörungen aller Zellen, so dass letztendlich jedes Organ betroffen sein kann. Häufig imponieren neben ARDS, septischer Kardiomyopathie, Makro- und Mikrozirkulationsstörung im Rahmen eines „multiple organ dysfunction syndrom“ (MODS) ebenfalls Nierenversagen und septische Enzephalopathie. Das irreversible MODS ist die schwerste Komplikation der Sepsis und ist für bis zu 50% der Sepsistodesfälle verantwortlich (Müller-Werdan, 1998; Parrillo, 1989). Die beschriebenen Prozesse finden während der proinflammatorischen Phase der Sepsis bzw. des SIRS statt. Wenn nun die antiinflammatorische Gegenregulation das Krankheitsgeschehen dominiert, kann es zur monozytären Immunparalyse kommen. Für diese Phase der Sepsis wurde der Begriff „compensatory antiinflammatory response syndrom“ (CARS) eingeführt. Beim Vorliegen von mehreren pro- und antiinflammatorischen Episoden während einer Sepsis spricht man vom „mixed antagonistic response syndrom“ (MARS) (Bone, 1996).

1.1.4 Septische Kardiomyopathie

In der vorantibiotischen Ära handelte es sich bei der Manifestation einer Sepsis am Herz um eine purulent-abszedierende Entzündung, die von Romberg bereits 1921 als „septische akute Myokarditis“ beschrieben wurde (Romberg, 1921). Diese Erkrankung kommt heute auf Grund effektiver antiinfektiöser Therapie in dieser Form praktisch nicht mehr vor. In der modernen Medizin manifestiert sich die Herzbeteiligung im Rahmen der Sepsis als spezifische Kardiomyopathie, die durch eine potenziell reversible Pumpfunktionseinschränkung und erhöhte ventrikuläre Compliance charakterisiert ist. Für diese Herzschiädigung in der Sepsis wurde 1989 von H.-P. Schuster der Begriff akute septische Kardiomyopathie eingeführt (Schuster, 1989). Eine akute septische Kardiomyopathie wird bei 44% der Sepsis-Patienten beobachtet (Charpentier et al., 2004; Schuster und Müller-Werdan, 2000). In diesem Patientenkollektiv steigt die Letalität auf bis zu 70% an (Abbildung 1). Je ausgeprägter die Myokarddepression eines

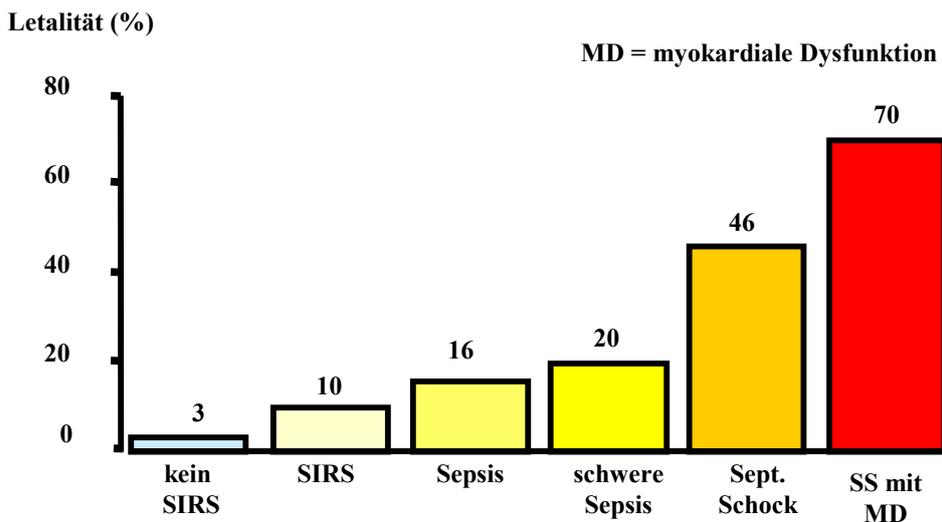


Abbildung 1: Anstieg der Letalität von Infektion ohne SIRS bis zu septischem Schock mit myokardialer Dysfunktion. SS = septischer Schock; MD = myokardiale Dysfunktion

Patienten, desto größer ist die Gefahr zu versterben (Vincent et al., 1992). Die akute septische Kardiomyopathie ist demnach in erheblichem Maße für die Prognose mitbestimmend.

Die Bedeutung einer kardialen Beteiligung bei einer Sepsis wird häufig unterschätzt. Scheinbar ist die Pumpleistung des septischen Patienten im Vergleich zu der des Gesunden nicht wesentlich eingeschränkt. Initial kann es im Rahmen der Sepsis zu einer hyperdynamen Kreislaufsituation kommen (Herzindex: $>5,5 \text{ l/min}\cdot\text{m}^2$; systemischer Gefäßwiderstand: $<600 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-5}\cdot\text{sec}$)

(Niemer, 1992), bei der die kardiale Pumpleistung nicht eingeschränkt oder sogar erhöht ist. Die Pumpfunktionseinschränkung wird jedoch dann evident, wenn das Herzzeitvolumen in Relation zur im septischen Schock stark erniedrigten Nachlast gesetzt wird. Um bei erniedrigtem systemischen Gefäßwiderstand einen adäquaten Blutdruck aufrecht zu erhalten, wäre ein Anstieg des Herzzeitvolumen auf das Zwei- bis Dreifache der Norm notwendig. Wenn zur Beurteilung der Herzfunktion Nachlast-spezifische Normalwerte für Herzzeitvolumen und Herzindex zugrunde gelegt werden, beobachtet man nur inadäquat gesteigerte Herzfunktionsparameter und kommt so zur Diagnose akute septische Kardiomyopathie (Abbildung 2). Nur durch die Verwendung Nachlast-spezifischer Normalwerte für HZV, Herzindex und Schlagvolumen kann der Schweregrad einer septischen Kardiomyopathie richtig eingeschätzt werden (Müller-Werdan und Schuster, 2005).

Das klinische Bild der akuten septischen Kardiomyopathie ist charakterisiert durch eine frühzeitig dokumentierte Abnahme der Ejektionsfraktion und einer Zunahme des enddiastolischen Volumen Index (EDVI) bei gleichbleibendem bzw. inadäquat gesteigertem oder sogar leicht erniedrigtem Schlagvolumenindex (Parrillo, 1989). Die Zunahme des EDVI geht nicht mit einem erhöhten enddiastolischen Druck einher, da bei einer Sepsis die ventrikuläre Compliance – im Sinne einer Rechtsverschiebung der Druck/Volumen-Kurve – zunimmt (Parrillo, 1989). Diese Veränderungen von Herzfunktionsparametern sind bei Überleben der Sepsis nach 10 bis 14 Tagen reversibel (Ognibene et al., 1988; Parker et al., 1984).

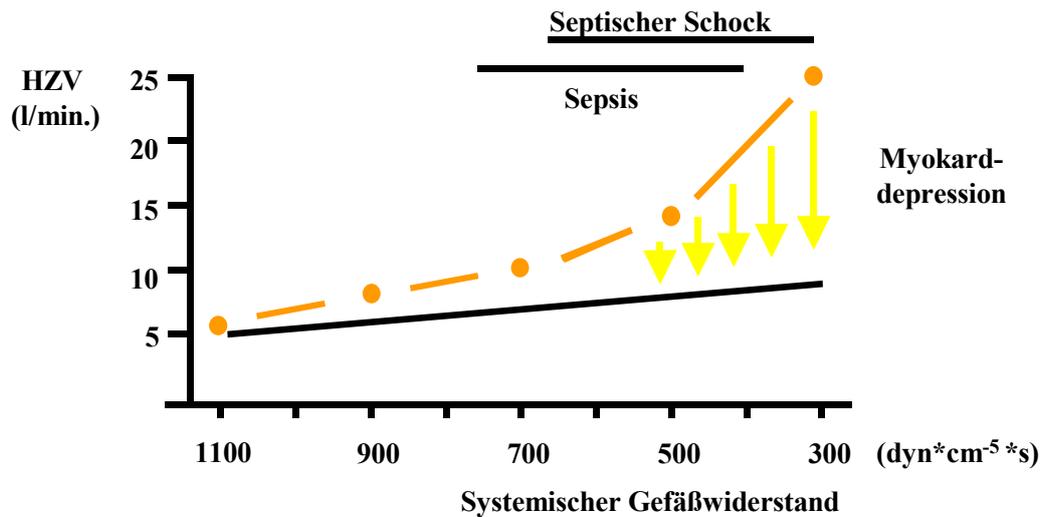


Abbildung 2: Myokard Depression in der Sepsis. Zur Aufrechterhaltung eines arteriellen Mitteldrucks von 90mmHg wäre bei zunehmendem Abfall des systemischen Gefäßwiderstandes der errechnete Anstieg des Herzzeitvolumens(o-o) erforderlich. Die tatsächlich in der Sepsis gemessenen Werte liegen jedoch in der Regel niedriger (-). HZV = Herzzeitvolumen (nach Müller-Werdan und Schuster, 2005)

Weitere Charakteristika der akuten septischen Kardiomyopathie umfassen regionale und globale Kontraktionsstörung, eine Dilatation des Herzens, einen hohen Koronarfluss, Rhythmusstörungen und autonome Dysfunktion. Bei häufig gleichzeitigem Vorliegen eines ARDS kann es insbesondere zur rechtsventrikulären Dysfunktion und Dilatation kommen. Dies kann durch Abnahme des linksventrikulären Füllungsdrucks und mechanische Beeinträchtigung des linken Ventrikels durch Kammerseptumshift nach links zu einer weiteren Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion führen. Insbesondere bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit besteht die Gefahr, dass es im manifesten Schock zur superponierten hypoxischen Herzschiädigung kommt. Komplizierend kommt hinzu, dass Infarktzeichen im EKG bei Sepsis häufig unspezifisch sind. Ein Anstieg der herzspezifischen Laborparameter Troponin T und Troponin I findet sich bei 30 bis 80% der Patienten mit Sepsis (Klein-Gunnewiek und van de Leur, 2003). Ob der Troponinanstieg auch in der Sepsis immer einen irreversiblen Herzschaden reflektiert ist jedoch fraglich (Wu, 2001).

Als wesentliche Ursache für den bei niedrigem systemischen Widerstand inadäquaten Herzindex wird eine Kardiodepression vermutet. Diese konnte bisher weder auf eine Koronarinsuffizienz (Cunnion et al., 1986), noch auf eine erhöhte Inzidenz von Rhythmusstörungen (Müller-Werdan et al., 1997) zurückgeführt werden. Stattdessen konnten im Blut zirkulierende Faktoren isoliert

werden, die für einen Teil der Kardiodepression verantwortlich zu sein scheinen. Der nicht weiter charakterisierte kardiodepressive Peptidfaktor (CDF) z. B. hemmt den Ca^{2+} -Einwärtsstrom in humanen Kardiomyozyten (Hallstrom et al., 1991).

Eine andere gut belegte negativ inotrope Mediatorerkaskade beginnt mit dem von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildeten „Myocardial depressant substance“ (MDS), die als eine Kombination von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ identifiziert wurde. Nach Immunpräzipitation dieser beiden Zytokine aus dem Serum von Patienten reduzierte sich das Ausmaß der kardialen Dysfunktion (Kumar et al., 1996). Diese Zytokine induzieren die Bildung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS), die über eine vermehrte Freisetzung von NO und via einer cGMP-regulierten Hemmung des Ca^{2+} -Einwärtsstroms zur Kardiodepression führt (Kojda und Kottenberg, 1999) Weitere negativ inotrope Effekte von NO sind die Desensibilisierung der Myofilamente gegenüber Calcium und die Abnahme des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) über die Aktivierung der cGMP-abhängigen Phosphodiesterase. NO gilt ebenfalls als Auslöser des „oxidativ burst“ (Produktion reaktiver zytotoxischer Sauerstoffmetabolite) und kompromittiert die mitochondriale Funktion.

Tierexperimentell konnten für $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ alternative Signaltransduktionswege nachgewiesen werden. Nach Exposition gegenüber $\text{TNF-}\alpha$ bildeten Kardiomyozyten aus Ratten aus Spingomyelin Sphingosin, das den Ryanodin-Rezeptor blockiert und so die Calcium-abhängige Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum verhindert (Oral et al., 1997). Eine andere Arbeitsgruppe bestätigte diese Ergebnisse, indem sie nachweisen konnten, dass $\text{TNF-}\alpha$ den L-Typ-Calcium Strom blockiert (Krown et al., 1995).

$\text{IL-1}\beta$ aktiviert den Arachnidonsäurestoffwechsel durch Induktion von Zyklooxygenase-2 (COX-2) und Phospholipase A_2 . Durch COX-2 Inhibitoren konnte die Produktion von Prostaglandin E_2 und die hämodynamischen Veränderungen durch $\text{IL-1}\beta$ verhindert werden (Dinarello, 1996; Okusawa et al., 1988).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Produktion proinflammatorischer Mediatoren maßgeblich an der Ausbildung der myokardialen Dysfunktion bei einer Sepsis beteiligt ist. In der Diskussion über die Herkunft der Zytokine haben neue Forschungsergebnisse über Toll-like Rezeptoren (TLRs) und kardiale Dysfunktion neue Horizonte hinsichtlich pathophysiologischem Verständnis und neuen Therapieoptionen eröffnet. Die bis dato vorliegenden Ergebnisse werden im Kapitel 1.4 Toll-like Rezeptoren und septische Kardiomyopathie eingehend dargestellt.

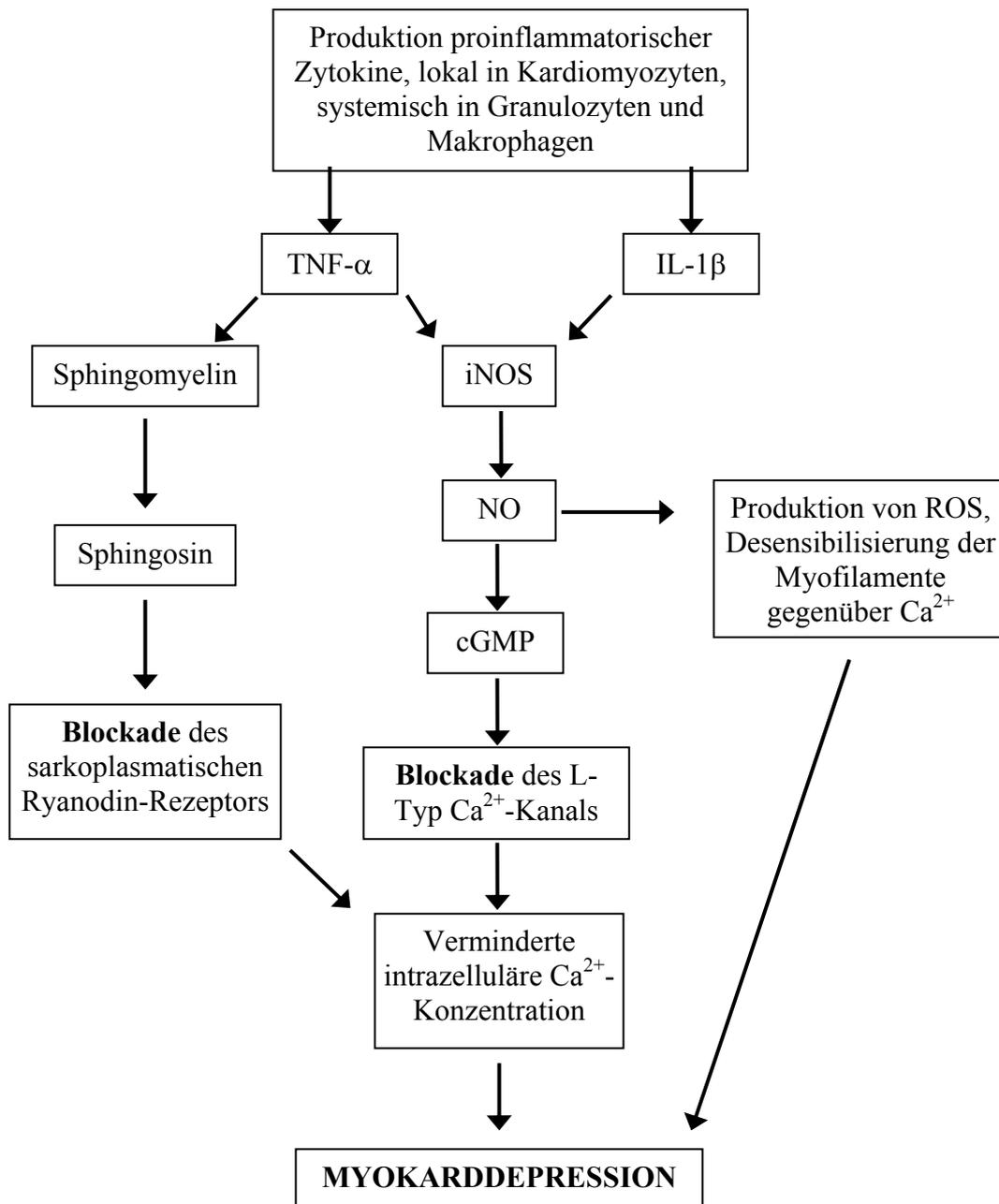


Abbildung 3: Schematische Darstellung möglicher molekularer Mechanismen, die an der Ausbildung der septischen Kardiomyopathie beteiligt sind. $\text{TNF-}\alpha$ = Tumornekrosefaktor- α , $\text{IL-1}\beta$ = Interleukin- 1β , iNOS = induzierbare NO-Synthetase, NO = Stickstoffmonoxid, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, ROS = reaktive Sauerstoffverbindungen

1.2 Angeborenes Immunsystem und Toll-like Rezeptoren

Traditionell unterscheidet man ein angeborenes von einem erworbenen Immunsystem. Letzteres wird durch B- und T-Lymphozyten und deren Antigenrezeptoren repräsentiert, zeichnet sich durch klonale Proliferation, Spezifität und Gedächtnisfunktion aus und hat sich in der Evolution zu einem späteren Zeitpunkt entwickelt als das angeborene Immunsystem. Deshalb findet man dieses komplexe Abwehrsystem nur bei Wirbeltieren.

Ein angeborenes Immunsystem wurde in Ansätzen schon vor über einem Jahrhundert von Metchnikoff beschrieben (Metchnikoff, 1902). Jedoch konzentrierten sich wissenschaftliche Untersuchungen lange Zeit auf das erworbene, adaptive Immunsystem, welches als überlegen und wichtiger erachtet wurde. In jüngster Zeit stellte sich heraus, dass sich die Aufgabe des angeborenen Immunsystems nicht darauf beschränkt, eine Infektion solange einzudämmen, bis adaptive Mechanismen in Gang gesetzt werden können, sondern dass vielmehr auch die Initiation der adaptiven Immunität Aufgabe des angeborenen Systems ist. Man nimmt außerdem an, dass 99% aller Infektionen allein durch das angeborene Immunsystem beherrscht werden (Hörner et al., 2004).

Für diese Aufgaben stehen vielfältige humorale als auch zelluläre Elemente zur Verfügung. Zu den humoralen Faktoren zählen vor allem das Komplementsystem, aber auch Lysozym und Akut-Phase-Proteine. Granulozyten und Zellen des retikulo-endothelialen Systems (RES), d. h. Makrophagen, Monozyten, Langerhans-Zellen, dendritische Zellen (DC) und weitere Antigen-präsentierende Zellen repräsentieren die zelluläre angeborene Immunität.

Die Frage nach der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen im System der angeborenen Immunität konnte mit der Entdeckung von „pathogen associated microbial pattern“ (PAMP) und „pattern recognition receptors“ (PRR, Mustererkennungsrezeptoren) aufgeklärt werden. Neben einer für jeden Erreger spezifischen Immunantwort im Sinne der Antikörperbildung besitzen Bakterien, Pilze und Viren invariable, phylogenetisch konservierte Strukturen, die nicht spezifisch für ein bestimmtes Bakterium sind, aber die Unterscheidung zwischen pathogenen und körpereigenen Merkmalen erlauben. Diese Strukturen haben kostimulatorische Eigenschaften und werden als „pathogen associated microbial pattern“ (PAMP) bezeichnet. PAMPs sind für das Überleben der Mikroorganismen essentielle Strukturen, die nur bei diesen und nicht im Wirt vorkommen. Dazu gehört neben LPS

von gramnegativen Bakterien und Lipoteichonsäure von grampositiven Bakterien auch bakterielle DNA (Krieg et al., 1995; Messina et al., 1991).

Diese bakteriellen Produkte werden von PRRs erkannt, die zurzeit in zwei Klassen eingeteilt werden.

- a) Die Gruppe der Scavenger-Rezeptoren wie der Mannose-Rezeptor, das Mannan-bindende Lectin, DEC 205 und das Serum Amyloid Protein, die für die Phagozytose von Mikroorganismen verantwortlich sind.
- b) Die Gruppe der Toll-like Rezeptoren (TLRs), die Abwehrzellen aktivieren und eine akute Entzündungsreaktion hervorrufen.

Das Protein Toll wurden zunächst bei der Fruchtfliege (*Drosophila* sp.) beschrieben. Im Embryonalstadium steuert dieses Protein die dorsoventrale Polarität und ist in der adulten Fliege als Bestandteil eines primitiven Immunsystems für die Erkennung von fungalen Proteinen verantwortlich. Die Forschungsarbeiten von Frau Prof. C. Nüsslein-Volhardt, die zur Entdeckung des Proteins Toll und der Aufklärung der Funktion im Embryonalstadium von *Drosophila* führten (Anderson et al., 1985b; Anderson et al., 1985a), wurden 1995 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Mittlerweile wurden acht weitere Proteine der Toll-Rezeptor-Familie in *Drosophila* identifiziert; darunter 18-wheeler, das eine zentrale Rolle in der Abwehr bakterieller Infektionen spielt (Tauszig et al., 2000; Williams et al., 1997).

Im humanen Genom wurden bis jetzt 11 TLRs identifiziert und einige genauer charakterisiert (Zhang et al., 2004). Der am besten charakterisierte Rezeptor ist Toll-like Rezeptor 4 als membranständiger Rezeptor für LPS aus der Zellwand gramnegativer Bakterien. Dabei gehört TLR4 zu einem Rezeptorkomplex aus CD14, TLR4 und MD-2. TLR2 ist der Oberflächenrezeptor für grampositive Organismen (z. B. *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*) und deren Zellwandbestandteile (Knuefermann et al., 2004a; Lien et al., 1999; Schwandner et al., 1999; Yoshimura et al., 1999) sowie für bakterielle Lipoproteine und Hefe (Aliprantis et al., 1999; Underhill et al., 1999). Erst kürzlich wurden Liganden auch für weitere TLRs identifiziert (Doppelstrang-RNA für TLR3, bakterielles Flagellin für TLR5; bakterielle DNA von sowohl gramnegativen als auch von grampositiven Bakterien für TLR9) (Alexopoulou et al., 2001; Hayashi et al., 2001; Hemmi et al., 2000). Jedoch besteht weiterhin Forschungsbedarf hinsichtlich der Identifizierung von weiteren spezifischen Liganden, der Aufklärung der intrazellulären Signalkaskade mit den in der Folge induzierten Entzündungsmediatoren und vor allem der Einordnung der Funktion der verschiedenen TLRs in

unterschiedlichen Organen im Rahmen der Abwehrreaktion bei einer Infektion, Sepsis oder SIRS.

1.3 Immunostimulatorische DNA und Toll-like Rezeptor 9 (TLR9)

Bakterielle DNA bzw. synthetische Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) fungieren als PAMP. Der Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) ist der spezifische und notwendige Rezeptor für bakterielle DNA über den eine Immunantwort initiiert wird (Hemmi et al., 2000).

Die immunostimulatorische Aktivität bakterieller DNA wurde unwissentlich bereits vor über 100 Jahren entdeckt und therapeutisch genutzt. Tokunaga et al. zeigten, dass die Antitumoraktivität des von William Coley 1892 erstmals verabreichten Coley's Toxin auf bakterielle DNA zurückzuführen ist (Yamamoto et al., 1992).

Einige Jahre später konnte mit synthetischen Oligodesoxynukleotiden (ODN) nachgewiesen werden, dass unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin-Motive (CpG-Motive) in bakterieller DNA zur Erkennung durch Immunzellen und zur Induktion einer Immunantwort führen. Im Unterschied zur bakteriellen DNA, in der CpG-Dinukleotide mit der rechnerisch zu erwartenden Häufigkeit von 1:16 auftreten, findet sich bei der DNA von Wirbeltieren eine CpG-Suppression, d. h. CpG-Motive sind viermal seltener. Darüber hinaus ist die Mehrheit der CpG-Dinukleotide eukaryonter DNA an der 5. Stelle des Cytosin methyliert, wodurch sie ihre immunostimulatorische Wirkung verlieren. Des Weiteren hängt die stimulatorische Potenz von dem speziesspezifischen Kontext ab, in dem das CpG-Motiv steht. So ist das am stärksten stimulierende Hexamer in Mäusen GACGTT und in humanen Zellen GTCGTT. Dieses und drei weitere CpG-Motive kommen im humanen Genom nur mit einer Häufigkeit von $0,72 \pm 0,13 \times 10^{-4}$ vor, während die vier am wenigsten stimulierenden Hexamere mit einer Häufigkeit von $2,17 \pm 0,87 \times 10^{-4}$ auftreten. In *E. coli* ist die Häufigkeit dieser Nukleotidsequenzen nicht signifikant unterschiedlich (Krieg et al., 1995). Insgesamt sind stimulierende CpG-Motive in prokaryonter DNA 20fach häufiger als in eukaryonter DNA (Schwartz et al., 1997).

Im Laufe der Evolution haben auch einige Mikroorganismen zur Umgehung des Immunsystems eine CpG-Suppression entwickelt. Dies konnte für Viren und intrazelluläre Parasiten nachgewiesen werden (Karlin et al., 1994b; Karlin et al., 1994a; Shpaer und Mullins, 1990).

Neben der Suppression stimulierender DNA zur Verhinderung der Aktivierung von TLR9 durch körpereigene DNA enthält eukaryote DNA in den Telomeren der Chromosome zusätzlich immunologisch dämpfende Sequenzen. Im Gegensatz zu Bakterien, die in der Regel ein zirkuläres DNA-Molekül besitzen, haben Vertebraten lineare Chromosomen, deren Enden Telomeren heißen. Die Telomeren enthalten repetitive DNA Sequenzen, die u. a. für Zellzyklus, Zellalterung und Transkriptionsregulation mitverantwortlich sind. Eine kürzlich entdeckte Funktion der Telomeren ist die antagonistische Wirkung am TLR9 – dem Rezeptor für CpG-Motive – durch Multimere des Hexanukleotids TTAGGG, das in den Telomeren in großer Zahl vorhanden ist, z. B. bei Gewebsschädigung freigesetzt wird und dann eine überschießende Aktivierung des Immunsystems über TLR9 verhindern kann (Gursel et al., 2003).

Oligonukleotide, die ein Phosphothioat-Rückgrat haben, können von Nukleasen nicht abgebaut werden und haben deshalb einen stärkeren stimulierenden Effekt auf das Immunsystem als unveränderte ODN (Krieg et al., 1995).

Mit der Entdeckung des TLR9 begannen umfangreiche Forschungsarbeiten zur Aufklärung der Signaltransduktion und Wirkung von TLR9, deren Ergebnisse nachfolgend beschrieben sind.

TLRs sind transmembranäre Proteine, die zwei charakteristische Domänen aufweisen:

- a) die extrazelluläre leucin-reiche Domäne, die für das Erkennen der PAMPs verantwortlich ist und
- b) die von Insekten bis zu Vertebraten hoch konservierte intrazelluläre Domäne, die der intrazellulären Domäne des IL-1-Rezeptors gleicht. Deshalb wird sie als Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet.

Trotz dieser Gemeinsamkeiten aller TLRs unterscheiden sich die Signaltransduktionswege der einzelnen TLRs – bedingt durch eine Vielzahl unterschiedlicher Adapterproteine und durch unterschiedliche Lokalisation in der Zelle (Zellmembran vs. intrazellulär) – beträchtlich. Deshalb kann an dieser Stelle nur die Signalkaskade für den TLR9 beschrieben werden.

TLR9 ist der spezifische und notwendige Rezeptor, um eine Immunantwort auf bakterielle DNA bzw. synthetische CpG-ODN hervorzurufen (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000). Im Gegensatz zu den anderen TLRs, die auf der Zellmembran lokalisiert sind, befindet sich der TLR9 auf ruhenden Zellen in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Von dort gelangt er durch Fusion mit der Plasmamembran und anschließender Endozytose oder auf direktem Weg durch Fusion von endoplasmatischen Retikulum mit Endosomen ins lysosomale Zellkompartiment (Latz et al., 2004). Um an den Rezeptor zu binden, wird die DNA zunächst –

wahrscheinlich durch Klathrin-abhängige Endozytose oder einen bisher nicht identifizierten Korezeptor – internalisiert. Der Kontakt zwischen TLR9 und bakterieller DNA findet im lysosomalen Zellkompartiment statt (Ahmad-Nejad et al., 2002). Im Endosom bewirken CpG-Motive die Dimerisierung von zwei Rezeptoren. Dies führt zur Konformationsänderung und zur Rekrutierung von „myloid differentiation marker 88“(MyD88) an die intrazytoplasmatische TIR-Domäne. An der N-terminalen sogenannten „death“-Domäne von MyD88 lagert sich die Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase (IRAK) an und wird durch Autophosphorylierung aktiviert. Im nächsten Schritt löst sich die IRAK vom Rezeptorkomplex und aktiviert den Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierten-Faktor-6 (TRAF6). Dieser verbindet über „transforming growth factor-activating-kinase-1“ (TAK1) und „transforming growth factor-activating kinase-1 binding protein“ den Rezeptor-assoziierten Komplex mit dem zytoplasmatischen NFκB-Signalosom (Irie et al., 2000). Die Aktivierung von „NFκB-inducing-kinase“ (NIK) und „inhibitory-κB-kinase“ (IKK) führt zur Freisetzung und nukleären Translokation von „nuclear-factor-kappa-B“ (NFκB). Im Zellkern reguliert NFκB die Transkription proinflammatorischer Zytokine, wie TNF-α und iNOS (Baeuerle und Baltimore, 1996; Baldwin, 1996), (Abbildung 4).

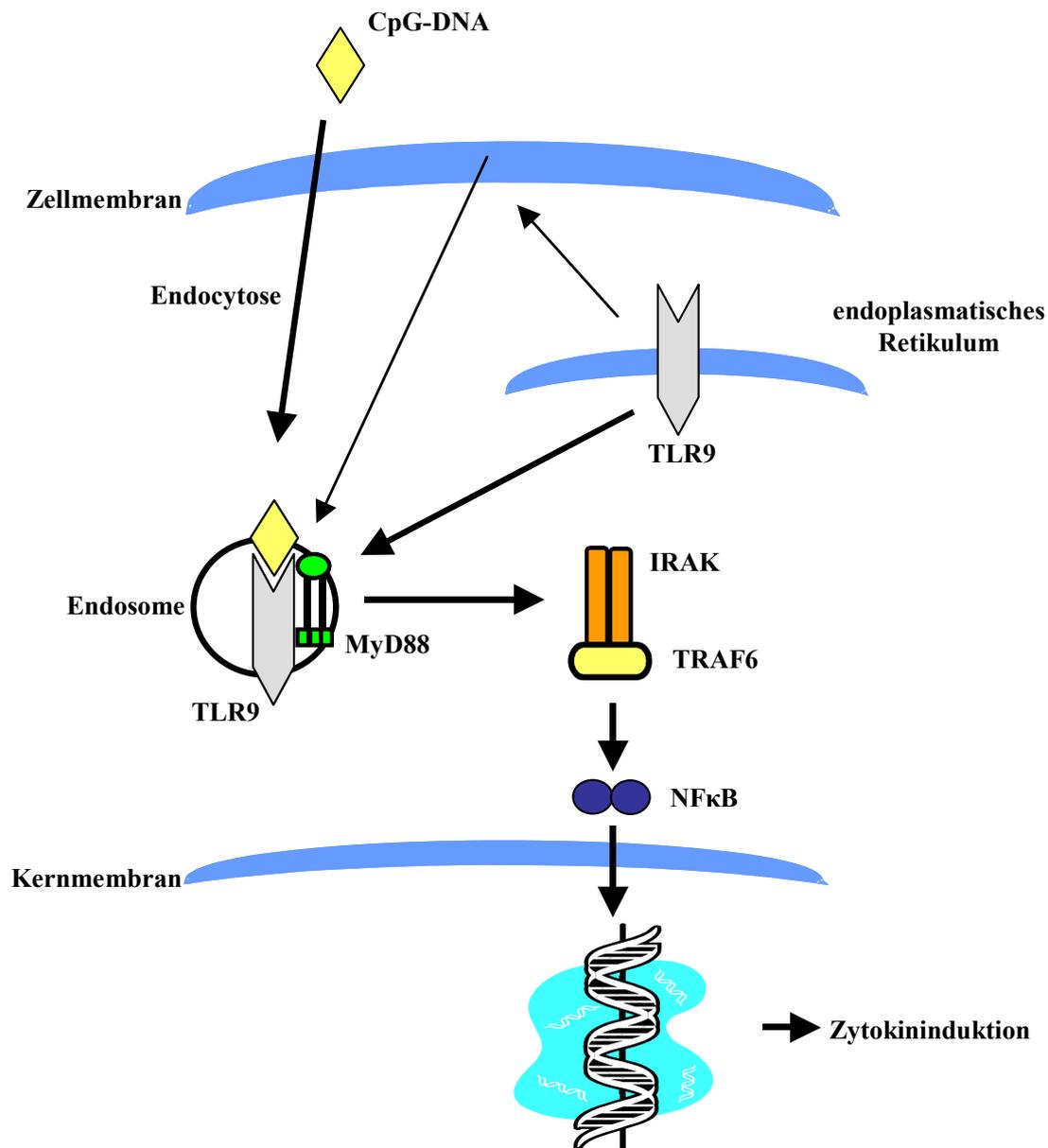


Abbildung 4: Schematische auf wesentliche Abläufe reduzierte Darstellung der Signalkaskade des TLR9. Bakterielle DNA mit immunostimulatorischen CpG-Motiven wird internalisiert und im Endosom von TLR9 erkannt. Die intrazelluläre Signalkaskade mündet über Aktivierung von MyD88, IRAK und TRAF6 in der nukleären Translokation von NFκB, der proinflammatorische Zytokine induziert. TLR9 = Toll-like Rezeptor 9, MyD88 = “myloid differentiation marker 88”, IRAK = Interleukin-1-Rezeptor assoziierte Kinase, TRAF6 = Tumornekrosefaktor-Rezeptor-assoziierter-Faktor-6, NFκB = nukleärer Faktor κB.

In einem alternativen Signaltransduktionsweg aktiviert TRAF6 die „MAP-kinase-kinase-6“ (MKK6). Dies führt zur Aktivierung der „mitogen activated protein kinases“ (MAP-Kinasen) „c-

Jun-N-terminal-kinase“ (c-JNK) und p38, wodurch der Transkriptionsfaktor AP-1 aktiviert wird (Yi und Krieg, 1998), (zusammengefasst in Ashkar und Rosenthal, 2002).

Am distalen Ende der Signalkaskade steht die Synthese und Regulation von Effektormolekülen, die sich nach der jeweils aktivierten Zellart unterscheiden.

Dendritische Zellen, die den TLR9 exprimieren, werden durch bakterielle DNA zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-12, TNF- α und Interferon- α (IFN α) angeregt. Des Weiteren verhindert CpG-DNA in DC die Apoptose über den „phosphatidylinositide-3-OH-kinase-pathway“ (Park et al., 2002). In der Zellkultur von „bone marrow derived dendritic cells“ (BMDDC) bewirkt die Stimulation mit CpG-DNA eine erhöhte Expression vom Haupthistokompatibilitätskomplex II (MHC II), welcher eine erhöhte Antigen-präsentierende Kapazität bewirkt (Sparwasser et al., 1998). Dies und die Eigenschaft von DC nach Aktivierung in Lymphknoten einzuwandern, verdeutlicht ihre Bedeutung bei der Verknüpfung von angeborener und erworbener Immunität.

Bakterielle DNA und CpG-ODN sind starke Aktivatoren von B-Lymphozyten in allen Vertebraten. CpG-Motive führen dazu, dass B-Lymphozyten in den Zellzyklus eintreten, sich teilen und antiapoptotisch wirksame Gene exprimieren (Yi et al., 1996a; Yi et al., 1998). B-Zellen exprimieren verstärkt MHC II, kostimulatorische Moleküle wie CD 80 und CD 40 und sezernieren IL-6, das für die Produktion von IgM benötigt wird, und IL-10, das als antiinflammatorisches Zytokin die überschießende Bildung von IL-12 verhindert (Takenaka et al., 1997).

CpG-DNA führt in murinen Makrophagen und Monozyten zur nukleären Translokation von NF κ B (Stacey et al., 1996) und zur Produktion von TNF- α (Sparwasser et al., 1998). Humane Monozyten werden nur in Anwesenheit von DC aktiviert (Hartmann und Krieg, 1999; Hornung et al., 2002; Kadowaki et al., 2001).

Neutrophile Granulozyten besitzen den TLR9 nicht (Hornung et al., 2002), wandern aber, angelockt von einer durch CpG-DNA hervorgerufenen Entzündung, im Sinne einer Chemotaxis in das betroffene Gewebe ein und verstärken so das Abwehrsystem in der Bekämpfung von Mikroorganismen (Weighardt et al., 2000).

Natürliche Killer-Zellen und T-Lymphozyten tragen zwar den TLR9 auf den Membranen des endoplasmatischen Retikulums, können aber nicht direkt durch CpG-DNA aktiviert werden. Nur wenn gleichzeitig Monozyten anwesend sind, produzieren NK-Zellen Interferon- γ (IFN γ), welches die Antikörper Produktion in B-Lymphozyten reguliert.

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

1.4 Toll-like Rezeptoren und septische Kardiomyopathie

Nach der Entdeckung der TLRs fokussierte sich das wissenschaftliche Interesse auf die Aufklärung der Funktion der TLRs im angeborenen Immunsystem. Dabei wurden viele Studien an immunkompetenten Zellen durchgeführt. In den letzten Jahren konnten TLRs jedoch auch in den meisten anderen Geweben, unter anderem in Herz, Lunge, ZNS und der Niere nachgewiesen werden. Daher musste das klassische Konzept der TLRs als exklusive Bestandteile des angeborenen Immunsystems erweitert werden. Man geht nun davon aus, dass sie eine zentrale Rolle bei jeglicher Art von „stress response“ Reaktion spielen (Knuefermann et al., 2004b). Hinsichtlich der Bedeutung von TLRs bei kardialer Dysfunktion und septischer Kardiomyopathie liegen erste Studien vor. Zarembek und Godowski konnten die meisten TLRs sowie die entsprechenden Adapterproteine auf mRNA-Ebene im Myokard nachweisen. Dabei unterscheidet sich das Ausmaß der Expression von TLR2, TLR4 und TLR9 nur unwesentlich (Zarembek und Godowski, 2002).

Der zurzeit am besten erforschte Toll-like Rezeptor ist der TLR4, der gemeinsam mit CD14 und MD-2 als LPS-Rezeptor fungiert. Untersuchungen an Wildtyp (WT)- und C3H/HeJ (TLR4-defizienten)-Mäusen nach Stimulation mit LPS zeigten, dass in C3H/HeJ-Mäusen die TLR4 Signalkaskade nicht aktiviert wird und dass konsekutiv auch keine kardiodepressiven Zytokine gebildet werden. Die WT-Mäuse hingegen zeigten in der Echokardiographie eine schwere kardiale Pumpfunktionseinschränkung (Baumgarten et al., 2001; Nemoto et al., 2002). Diese Ergebnisse konnten durch eine ähnliche Arbeit mit CD14-defizienten Mäusen bestätigt werden. Im Gegensatz zu den WT-Mäusen waren CD14-defiziente Mäuse gegenüber einer LPS-induzierten Zytokininduktion und NF κ B-Aktivierung sowie einer Myokarddepression geschützt (Knuefermann et al., 2002b). In einem anderen Mausmodell zur septischen Kardiomyopathie und TLR2 zeigte sich im Rahmen einer systemischen Infektion mit *Staphylococcus aureus*, dass die

Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene bei den TLR2-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen signifikant abgeschwächt war. Ebenso konnte eine Aktivierung von IRAK und dem Transkriptionsfaktor NF κ B nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* nur in WT-Mäusen, nicht aber in TLR2-D Mäusen beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich ein autoregulatorischer Mechanismus für TLR2 mit Zunahme der Rezeptorexpression 2h nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* (Knuefermann et al., 2004a). Nachdem lange unklar war, durch welchen Mechanismus Pathogene in der septischen Kardiomyopathie kardiodepressive Zytokine induzieren, konnte diese Frage durch die genannten wegweisenden Arbeiten zu TLR2 und TLR4 aufgeklärt werden (Knuefermann et al., 2002a). Es ist folglich davon auszugehen, dass bakterielle Produkte über TLR-abhängige Mechanismen zu einer vermehrten Expression von proinflammatorischen Zytokinen führen. Diese Mediatoren sind wiederum für das Auftreten eines septischen Herz-Kreislaufversagens mitverantwortlich.

Zur Rolle von bakterieller DNA für die Ausbildung einer septischen Kardiomyopathie sowie der funktionellen Bedeutung von TLR9 im Myokard liegen noch keine Studien vor. Bekannt ist, dass DNA von gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie synthetische CpG-ODN dazu in der Lage sind eine Entzündungsreaktion bis hin zur Sepsis zu induzieren (Sparwasser et al., 1997a).

1.5 Arbeitshypothese

In der vorliegenden Arbeit wurde die Arbeitshypothese untersucht, ob bakterielle DNA bzw. synthetische CpG-Oligonukleotide über einen TLR9-abhängigen Mechanismus zu einer kardialen Zytokinexpression und somit zu einer kardialen Inflammation führt.

2. Material und Methoden

2.1 TLR9 Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden männliche und weibliche Mäuse verwendet, die zwischen 8 und 12 Wochen alt waren und für diese Studie gezüchtet wurden. Die Zucht wurde mit der Verpaarung von vier hinsichtlich des Gens für Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) heterozygoten Mäusen begonnen, die freundlicherweise von MD. PhD. Shizuo Akira, Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan zur Verfügung gestellt wurden. Die transgenen Mäuse wurden durch homologe Rekombination an embryonalen Stammzellen aus C57BL/6-Mäusen hergestellt (Hemmi et al., 2000).

Für die Versuche wurden ausschließlich homozygote Tiere verwendet. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR mit DNA aus Mäuseschwänzen. Zur Isolation der genomischen DNA wurde das DNeasy-Tissue-Kit (Qiagen, Hilden Deutschland) verwendet. Für die PCR wurden spezifische Primer ebenfalls von MD. PhD. Shizuo Akira zur Verfügung gestellt. Der Primer „wild-type“ war spezifisch für das unveränderte Gen für TLR9 und hatte die folgende Sequenz: 5'-GAA GGT TCT GGG CTC AAT GGT CAT GTG-3'. Der Primer „neo1500“ mit der Sequenz 5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3' war spezifisch für das TLR9-Gen, in das als Kontrolle eine Neomycin-Resistenz-Kassette eingebaut war wodurch das Genprodukt keine Funktion erhielt. Die Bindungsstelle für den Primer „extra“ lag außerhalb des veränderten Bereiches. Dieser Primer war verantwortlich für die DNA-Amplifikation in entgegengesetzter Richtung zu „wild-typ“ und „neo1500“ und hatte die Sequenz 5'-GCA ATG GAA AGG ACT GTC CAC TTT GTG-3'. Zur Genotypisierung wurden PCR-Ansätze aus den Primer-Paaren „wild-type“ und „extra“ sowie „neo1500“ und „extra“ benötigt. Die PCR-Machine (Whatman Biometra T-Gradient 96, Biometra, Göttingen, Deutschland) war auf 35 Zyklen mit einem Zyklus bestehend aus 30 Sekunden 94°C, 1 Minute 67°C, 1 Minute 74°C programmiert. Beim letzten Zyklus blieb die Temperatur für 10 Minuten bei 74°C, bevor die Proben auf 4°C gekühlt wurden, bis sie aus der PCR-Machine entnommen wurden. Das amplifizierte Produkt war ca. 1200 bp lang. Wenn in beiden Ansätze ein PCR Produkt detektierbar war, war die Maus heterozygot. Wenn nur im Ansatz „wild-type“ und „extra“ ein PCR-Produkt zu finden war, handelte es sich um eine Wildtyp (WT)-Maus mit normalem TLR9. Ein PCR-Produkt

ausschließlich im Ansatz „neo1500“ und „extra“ war gleichbedeutend mit einer TLR9-defizienten (TLR9-D)-Maus.

Zur Unterbringung der Mäuse standen separate, vollklimatisierte Räume im Tierstall des Hauses für experimentelle Tiermedizin der Universitätsklinik Bonn zur Verfügung.

Ein Tierversuchsantrag wurde gestellt und durch die Bezirksregierung Köln genehmigt (Aktenzeichen 50.203.2 - BN 43, 28/01).

2.2 Stimulation und Asservierung des Untersuchungsmaterials

2.2.1 Einleitung

Der TLR9 ist verantwortlich für das Erkennen von bakterieller DNA bzw. deren Fragmente anhand von sogenannten nicht-methylierten CpG-Motiven. In der vorliegenden Arbeit wurde den Mäusen ein synthetisches CpG-Oligonukleotid (ODN) injiziert, das ein stabilisierendes Phosphothioat-Rückgrat enthielt (CpG-B). Es handelt sich um 1668-Thioat (Oligonukleotid 500 nmol, Tib MolBiol, Berlin, Deutschland) mit einer Fragmentlänge von 20 Basenpaaren und folgender Sequenz: 5' – TCCATGACGTTTCCTGATGCT – 3'. Das ODN 1668-Thioat besitzt die für Mäuse optimal stimulierende Nukleotidsequenz, bewirkt B-Zell-Reifung und Ausschüttung von TNF- α aus Makrophagen und wurde bereits in bedeutenden vorangegangenen Studien verwendet (Hemmi et al., 2000; Krieg et al., 1995; Sparwasser et al., 1997a; Sparwasser et al., 1997b). Die Zytokinproduktion wurde zu den Zeitpunkten null, eine, zwei, vier und sechs Stunden nach Stimulation an WT- und TLR9-D-Mäusen, also in insgesamt zehn Gruppen untersucht. Den Mäusen in der Gruppe 0h WT und 0h TLR9-D wurde kein CpG-ODN injiziert. Diese dienten als Kontrollgruppe.

2.2.2 Injektionsprotokoll

Den Versuchstieren wurde zunächst 200 μ l einer 100 g/l D-Galaktosamin-Lösung (D-GalN) (Roth, Karlsruhe, Deutschland) (20 mg/Maus) intraperitoneal injiziert. Eine halbe Stunde nach der ersten Injektion folgte eine Behandlung der Mäuse mit 20 nmol 1668-Thioat in 200 μ l Wasser ad injectabile (Braun, Melsungen, Deutschland), ebenfalls als intraperitoneale Injektion. Dieses Injektionsprotokoll wurde von Sparwasser et al. als Mausmodell zum septischen Schock durch bakterielle DNA eingeführt. Die vorangehende Injektion von D-GalN bewirkt in der Leber der

Versuchstiere eine Sensibilisierung gegenüber dem durch das CpG-ODN freigesetzten TNF- α und verursacht durch einen TNF- α -vermittelten Leberzellschaden einen tödlichen toxischen Schock (Sparwasser et al., 1997a; Sparwasser et al., 1997b).

Anschließend wurden die Mäuse zu den festgelegten Zeitpunkten nach Injektion durch zervikale Dislokation euthanasiert.

Mit Schere und Pinzette (chirurgisch) wurden die Mäuse knapp unterhalb des knöchernen Thorax quer von einer Seite zur anderen (mittlere Axillarlinie) laparotomiert. Entlang der Axillarlinien wurde der Thorax bis zur Axilla geöffnet. Nach Durchtrennung des Diaphragmas wurde die vordere Thoraxwand nach kranial geklappt, so dass man freie Sicht auf Herz, Lunge und Leber erhielt. Diese Organe wurden herauspräpariert, in 4°C kaltem PBS (0,58 M Na₂HPO₄, 0,17 M NaH₂PO₄, 0,68 M NaCl, pH 7,3 Merck, Darmstadt, Deutschland) gewaschen und in flüssigem Stickstoff (Linde, Köln, Deutschland) Schock-gefroren. Die so gewonnenen Gewebeproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C konserviert.

2.3 RNA – Isolation

Alle Schritte dieses Versuches wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt, um eine Degradierung der gewonnenen RNA zu verhindern. Zunächst wurden in jedes 15 ml Reaktionsgefäß (Sarsteadt, Nümbrecht, Deutschland) 3 ml TRIzol-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gegeben. Anschließend wurden die Herzen aus dem -80°C kalten Tiefkühlschrank in diese Reaktionsgefäße überführt und mit dem Gewebehomogenisator (Ultra-Turrax TP 18-10 Janke & Kunkel KG, Stauffen im Breisgau, Deutschland) zerkleinert, bis keine groben Stücke mehr zu erkennen waren. Nach der Verarbeitung eines jeden Herzens wurde der Homogenisator durch Spülen mit 4 M GIT-Lösung aus Guanidine (Sigma, Steinheim, Deutschland) und zweimaligem Spülen mit 0,1%iger Lösung DEPC-Wasser (Sigma) von Geweberesten befreit. Nach 10-minütiger Inkubation in TRIzol wurde 600 μ l Chloroform (Merck) zu den zerkleinerten Herzen gegeben. Nach kurzer Durchmischung mittels eines Vortex-Genie (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) und einer weiteren Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis wurden die Proben bei 4882*g (4000 U/min) und 4°C 30 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge CPKR, Beckman Instruments GmbH, München, Deutschland). Es bildeten sich drei Phasen. Die oberste Phase,

klar bis gelblich, enthielt die RNA und wurde jeweils vorsichtig abpipettiert und in neue 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Die beiden übrigen Phasen wurden dekantiert.

Um die RNA auszufällen, wurde 1,5 ml Isopropanol (Merck) hinzugegeben, durchmischt und 30 Minuten auf -80°C gekühlt. Anschließend wurden die Proben unter denselben Bedingungen wie zuvor zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation hatte sich ein Pellet gebildet, das mit 75%igem Ethanol (Merck) gewaschen wurde. Nach weiteren 20 Minuten Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet. Danach wurde es in 200 μl DEPC-Wasser aufgenommen und mit einem Photometer (BioPhotometer 6131, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) der RNA-Gehalt durch Bestimmung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Verunreinigungen der RNA wurden durch Bestimmung der Extinktion bei 230 nm und 280 nm ausgeschlossen. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte nun die Konzentration der gewonnenen RNA errechnet werden. Zuletzt wurden von jeder Probe zwei Aliquots mit je 100 μl in 1,5 ml RNase-freien Reaktionsgefäßen (Eppendorf) bis zum weiteren Gebrauch bei -80°C tiefgefroren.

2.4 Ribonuclease Protection Assay (RPA)

2.4.1 Einleitung

Der „Ribonuclease Protection Assay“ (RPA) ist eine sensitive und schnelle Methode, um spezifische mRNA-Transkripte zu identifizieren und zu quantifizieren. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Adaptierung des „S1 Nuclease Assays“, wobei RNA-Sonden an Stelle von DNA-Sonden genutzt werden und die S1-Nuklease durch eine Einzelstrang-spezifische Ribonuklease (RNase) ersetzt wird, da die Behandlung von RNA:RNA-Doppelsträngen mit Ribonuklease reproduzierbarer ist als die Behandlung von RNA:DNA-Hybrid-Doppelsträngen mit S1-Nuklease. Der „S1 Nuclease Assay“ und der RPA sind robuste, praktisch austauschbare Techniken, um das Vorhandensein und die Struktur von mRNA-Transkripten zu untersuchen. „Solution Hybridization Assays“, so wie RPA und „S1 Nuclease Assay“, besitzen eine höhere Sensitivität als Hybridisations-Protokolle, die auf „RNA-bound-to-a-soil“ basieren, so wie Northern Blot und Dot Blot. Außerdem bieten Northern Blot und Dot Blot nur die Möglichkeit ein Transkript zu untersuchen, während beim RPA mehrere Proben und Transkripte in einer

einzigsten Reaktion untersucht werden können, soweit sich die Größe der geschützten Transkripte signifikant voneinander unterscheidet.

Den Beginn des Versuchs stellt die Hybridisierung der RNA-haltigen Proben mit einer im Überschuss zugegebenen einzelsträngigen Antisense-mRNA-Sonde dar. Nach der Hybridisierung werden überschüssige, nicht gebundene oder nicht zu den Zielsequenzen homologe mRNA-Sonden genauso wie nicht gebundene Proben RNA-Sequenzen durch Zugabe einer einzelstrang-spezifischen Ribonuklease, gewöhnlich RNaseA, RNaseT1 oder RNase1, verdaut. Die Ribonuklease wird daraufhin inaktiviert und extrahiert, und die Sonde:Target-Hybriden werden durch denaturierende Polyacrylamid-Urea-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die Darstellung und Quantifizierung der Ergebnisse wird das Gel einem Phosphorimager-Screen und einem Röntgenfilm exponiert.

2.4.2 Durchführung des RPA

Der RPA lief in vier Schritten ab:

- a) Synthese der Antisense-mRNA-Sonden aus der cDNA
- b) Vorbereitung der RNA-Proben der Versuchstiere und Hybridisation
- c) RNase-Verdau von nicht-hybridisierten RNA-Strängen und RNA-Überhängen oder RNA-Loops
- d) Herstellung des Polyacrylamid-Urea-Gels und die Gelelektrophorese

a) Zur Synthese der Antisense-mRNA-Sonde wurde ein speziell angefertigtes „multi-probe template set“ verwendet. Es enthielt die cDNA der Zytokine IL-12p35, IL-12p40, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , LIF, IL-6 und IFN γ . Außerdem enthielt das Template die cDNA der konstitutiv exprimierten Gene L32 und GAPDH.

Die zur Transkription benötigten Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut und in der folgenden Reihenfolge in ein 1,5 ml Plastiköhrchen (Eppendorf) pipettiert: 1 μ l RNasin, 1 μ l GACU Pool, 2 μ l DTT, 4 μ l 5 X Transkriptionspuffer (In Vitro Transcription Kit, Pharmingen, San Diego, CA, USA), 1 μ l Template cDNA (customized multi-probe template set, Pharmingen), 10 μ l [α -³²P]-UTP (9,25 Mbq / 250 μ Ci[α -³²P] UTP (Amersham, Braunschweig, Deutschland) und 1 μ l T7-RNA-Polymerase (Pharmingen). Dieses Reaktionsgemisch wurde zur Transkription der Template-cDNA in radioaktiv-markierte Antisense-mRNA-Sonden für 90 Minuten auf 37°C inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf). Die Transkription wurde durch eine 30-minütige

Inkubation mit 2 µl DNase (Pharmingen) gestoppt. Danach wurden zur Enzymextraktion 26 µl 20 mM EDTA (Pharmingen), 25 µl Citrat-gepuffertes Phenol (Appllichem, Darmstadt, Deutschland), 25 µl Chloroform:Isoamylalkohol 50:1 (Merck) und 2 µl Hefe-tRNA (Pharmingen) zugegeben. Nach Zentrifugation (Biofuge pico, Heraeus instruments, Langenselbold, Deutschland) wurde der RNA-haltige klare Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut mit 50 µl Chloroform:Isoamylalkohol gewaschen.

Nach Überführung des Überstandes in ein drittes Reaktionsgefäß wurden 50 µl 4 M Ammoniumazetat (Pharmingen) und 250 µl 100%iges Ethanol (Merck) zugesetzt. In dieser Lösung wurde die Antisense-mRNA auf -80°C für mindestens 30 Minuten präzipitiert und dann zu einem Pellet zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 90%igem Ethanol (Merck) gewaschen und dann für 10 Minuten luftgetrocknet. Die Antisense-mRNA wurde in 30 µl Hybridisationspuffer (Pharmingen) gelöst. Die Überprüfung der Transkription erfolgte, indem 1 µl der RNA-Lösung in ein Reaktionsgefäß mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau - Jügesheim, Deutschland) gegeben und in einem Szintillationszähler (LS 6000 IC, Beckman, Fullerton, CA, USA) gemessen wurde. Zu erwarten war ein Maximum von 3×10^6 Cherenkov counts/µl mit einem akzeptablen Minimum von 3×10^5 counts/µl.

b) Ein Aliquot jeder RNA-Probe wurde auf Eis aufgetaut. An Hand der photometrisch bestimmten RNA-Konzentration konnte das Volumen der Probe ausgerechnet werden, das 20 ng RNA enthielt. Dieses Volumen wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, und dann zur Lyophilisierung solange in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac, Savant Instruments Inc., Holbrook, NY, USA) zentrifugiert wurden, bis die Flüssigkeit verdunstet und die RNA als Pellet sichtbar war. Die so getrockneten RNA-Proben wurden in 8 µl Hybridisationspuffer gelöst. Von der radioaktiv-markierten Antisense-mRNA-Sonde wurden 2 µl zu jeder Probe gegeben. Ein Tropfen inertes Mineralöls (Sigma, Steinheim, Deutschland) verschloss jeweils das Reaktionsgemisch. Die Proben wurden in einem Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf) für 5 Minuten auf 90°C erhitzt. Der Heizblock wurde zur Hybridisierung der Proben-RNA:Antisense-mRNA langsam um 1°C pro Minute auf 56°C abgekühlt und über Nacht auf dieser Temperatur belassen.

c) Vor der RNase-Behandlung wurden die Proben auf eine Temperatur von 30°C gebracht. In der RNase-Behandlung wurden die hybridisierten RNA-Proben mit 100 µl RNase-Cocktail bestehend

aus RNase-Puffer:RNase A + T-Mix (RPA KIT, Pharmingen) im Verhältnis 417:1 (2,5 ml RNase-Puffer und 6 µl RNase A + T-Mix für 20 Proben) für 90 Minuten auf 30°C inkubiert.

Bevor der RNase-Verdau abgeschlossen war, wurde ein Proteinase-Cocktail bestehend aus Proteinase-Puffer, Proteinase K und Hefe-tRNA (Pharmingen) im Verhältnis 13:1:1 vorbereitet (390 µl Proteinase-Puffer, 30 µl Proteinase K und 30 µl Hefe-tRNA für 20 Proben). Von diesem Gemisch wurden jeweils 18 µl in der Anzahl der Proben entsprechende neue Reaktionsgefäße aliquotiert. Der RNase-Verdau wurde unter der Ölphase herauspipettiert und mit der Proteinase K auf 37°C für 15 Minuten inkubiert, wodurch die RNase inaktiviert wurde. Mit 65 µl Citratgepuffertem Phenol und 65 µl Chloroform:Isoamylalkohol 50:1 wurden die RNase sowie die Proteinase K extrahiert. Nach Zentrifugation wurde der mRNA-haltige klare Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und die mRNA in 120 µl 4 M Ammoniumazetat und 650 µl 100% Ethanol für mindestens 30 Minuten auf -80°C präzipitiert.

Nach 15 Minuten Zentrifugation wurde das Pellet in 90%igem Ethanol gewaschen und dann für 10 Minuten luftgetrocknet. In der Zwischenzeit wurde das zuvor hergestellte Gel auf 50 W vorgewärmt (Power Supply 3000Xi, BioRad). Die getrockneten und Ethanol-freien mRNA-Doppelstrang-Proben wurden nun in 5 µl RNA-Gelelektrophoresefarbstoff (Pharmingen) gelöst und nach einer 5-minütigen Hitzedenaturierung bei 90°C auf Eis gekühlt. Ein Standard wurde aus einer 1:100-Mischung von unhybridisierter Antisense-mRNA-Sonde und Hybridisierungspuffer hergestellt. 2 µl dieses Gemisches wurden mit 3 µl RNA-Gelelektrophoresefarbstoff versehen und durchlief die Hitzedenaturierung und Abkühlung parallel zu den Proben.

d) Nach gründlichem Waschen der Glasplatten und Abspülen mit ddH₂O wurden sie mit Präzisionswischtüchern (KimWipes, KIMTECH Science, Kimberly-Clark, Reigate, England) getrocknet. Die obere (abnehmbare) Glasplatte wurde mit 1 ml Silikon (SigmaCote, Sigma, St. Louis, Mo, USA) eingerieben, um eine spätere Adhäsion des Gels an dieser Platte zu vermeiden. Danach wurde die Gelapparatur zusammgebaut und ein 0,4 mm dickes Gel zwischen die Glasplatten gegossen.

Das 5%ige Acrylamidgel wurde hergestellt aus 30 ml 6%iger Sequenziergel-Lösung (Sequenziergel-Lösung ultra pure SequaGel 6, National Diagnostics, Hessele Hull, UK), 7,5 ml Sequenziergel-Puffer (Sequenziergel-Puffer ultra pure SequaGel Complete, National Diagnostics) und 300 µl 10%iger Ammoniumpersulfat-Lösung (Bio-Rad). Dieses Gemisch wurde mit Hilfe einer Spritze in die Gelkammer gefüllt. Ein Plastikamm wurde am oberen Rand des Gels

eingbracht und sparte Mulden zum Einfüllen der RNA-Proben aus. Nach ca. 2 Stunden war das Gel auspolymerisiert. Der Kamm wurde entnommen und das Gel vertikal in die Elektrophorese-Apparatur (Sequi-Gen GT Sequencing Cell, BioRad) gestellt. Um einen elektrischen Kontakt in vertikaler Richtung über das Gel herzustellen, wurde eine hinter dem Gel befindliche Glaskammer und der Boden der Elektrophorese-Apparatur mit 0,5 X TBE-Laufpuffer (0,89 M Tris, 0,89 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,3 Merck) gefüllt. Das Gel hatte so am oberen sowie am unteren Ende Kontakt zum Laufpuffer und so zum Strom. In die Mulden des vorgewärmten Gels wurde die Lösung mit den in denaturiertem Zustand fixierten mRNA-Einzelsträngen pipettiert und unter Anlegung einer Spannung von ca. 1900 V (60 W) elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.3 Auswertung

Sobald das Gel zu Ende gelaufen war, wurde es mit Hilfe eines gleich großen Filterpapiers aus der Elektrophoresekammer genommen, mit Frischhaltefolie aus Polyvinylchlorid bedeckt, in einem Gel-Trockner (Vacuum Gel Dryer Model 583, BioRad, München, Deutschland) bei 70°C getrocknet und mit dem Filterpapier verbacken. Zunächst wurde von dem so fixierten Gel eine Autoradiographie auf Röntgenfilm gemacht (Abbildung 5). Anschließend wurde das Gel einem „Phosphorimager-Screen“ (Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) ausgesetzt. Diese speziellen Filme zur quantitativen Auswertung mussten mit einem Laserscanner (Scanner FLA 3000, Fujifilm) ausgelesen werden. Der Scanner detektiert die Anzahl der Signale, bezogen auf die Fläche des Films. Die so entstandenen Daten wurden mit dem Computerprogramm AIDA Image Analyzer Version 3.45 (Raytest GmbH, Sprockhövel, Deutschland) ausgewertet. Das Ergebnis des Scannens stellte sich als Abbildung des Gels dar, wobei die Schwärze der Banden die Anzahl der Signale pro Flächeneinheit widerspiegelte. Im Zuge der Auswertung wurden die Banden als Höhepunkte eines Graphen dargestellt, wobei die Integrale der Flächen unter den Höhenpunkten der Graphen der Anzahl der Signale pro Bande proportional waren. Die für die jeweiligen Transkripte so errechneten Werte werden nun zu den Werten von L32 normalisiert.

Konstitutionell exprimierte Gene werden als interne Standards bei Versuchen zur Quantifizierung von RNA benutzt. GAPDH, ein wichtiges Enzym der Glykolyse, und L32, ein ribosomales Protein, werden in Zellen unterschiedlichen funktionellen Zustandes annähernd konstant exprimiert und eignen sich somit zur Normalisierung (Müller et al., 2001).

Im Ergebnisteil dieser Arbeit ist außer der statistischen Auswertung in Form von Histogrammen eine repräsentative Autoradiographie der mRNA-Banden des jeweiligen Zytokins und der dazu gehörenden Banden von L32 dargestellt.

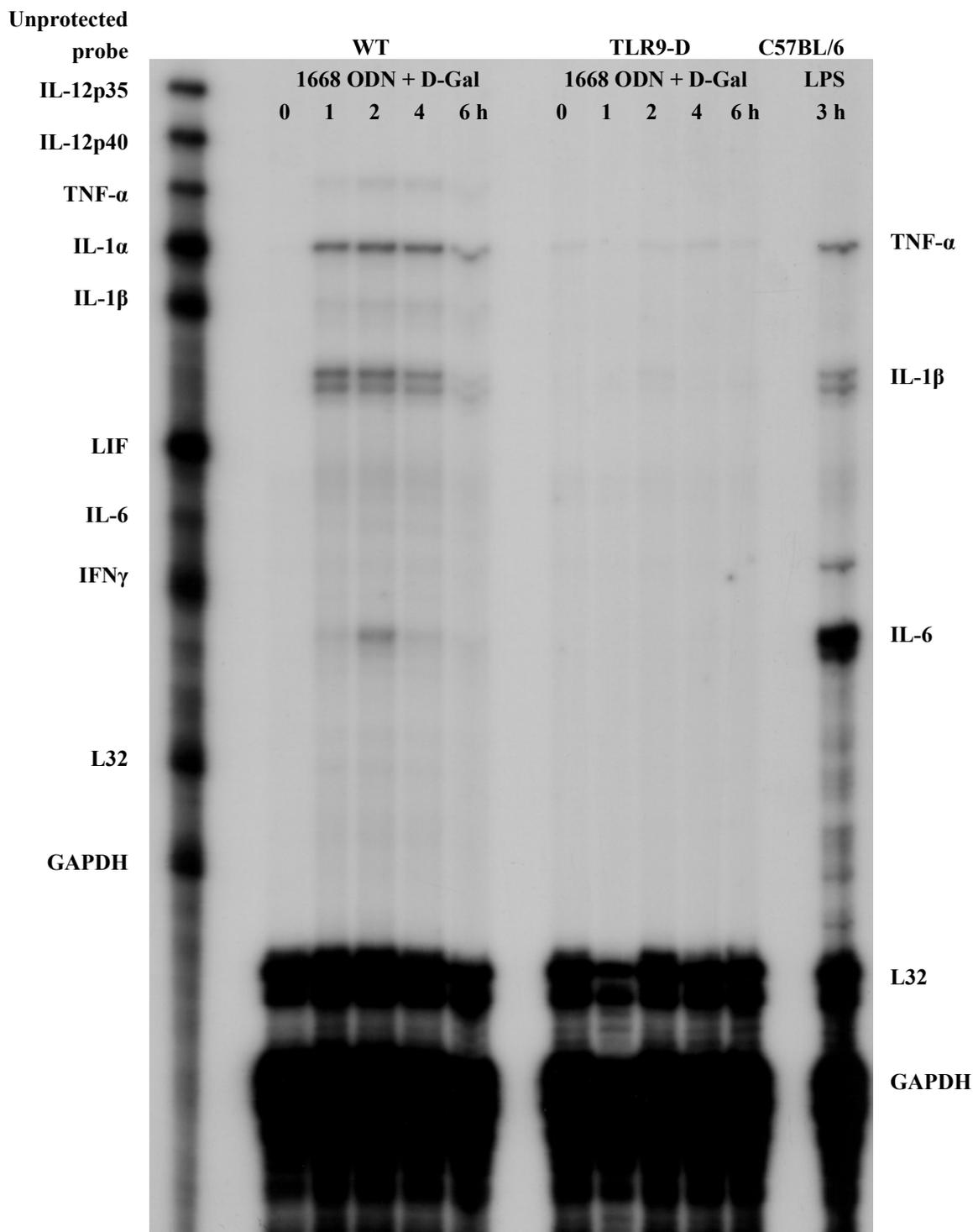


Abbildung 5: Repräsentative Autoradiographie der elektrophoretischen Auftrennung von mRNA-Proben im RPA. Aufgetragen wurde die „unprotected probe“, kardiale RNA von fünf WT, fünf TLR9-D und einer C57BL/6 Maus, die mit 1668-Thioat bzw. LPS stimuliert wurden. Die „unprotected probe“ dient als Hilfsmittel zur Identifikation der Banden. Die radioaktiv-markierte RNA der „unprotected probe“ läuft im Gel langsamer als die RNA-Proben der Herzen, weil die Fragmente der „unprotected probe“ länger sind. Die Länge der „unprotected probe“ und der Proben-RNA ist eindeutig definiert.

2.5 Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.5.1 Proteinisolation für ELISA

Zunächst wurde ein ELISA-Puffer, bestehend aus 0,4 ml Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim, Deutschland), 9,6 ml PBS (Merck), 10 µl Triton X-100 (Sigma) und 10 µl PMSF (Sigma), hergestellt. Die in flüssigem Stickstoff gefrorenen Herzen wurden einzeln in einem eiskalten Mörser (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zerkleinert. Die pulverisierten Herzen wurden mit einem in Stickstoff gekühlten Spatel in Homogenisator-Röhrchen überführt, in 1 ml eiskalten ELISA-Puffer aufgenommen und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal 20fach homogenisiert (Homogenisator RM-17, Janke & Kunkel KG, Stauffen im Breisgau, Deutschland). Dazwischen wurden sie 10 Minuten auf Eis inkubiert und der Homogenisator mit ddH₂O gereinigt. Danach wurde die Proteinsuspension in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 15 Minuten bei 16110*g (13000 U/min) und 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Der Überstand enthielt die aus den Herzen isolierten Proteine.

Um den Erfolg der Proteinisolation zu überprüfen und für die spätere Verwendung der Proben in einem ELISA, wurde die Proteinkonzentration mit einem BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) gemessen. Das Versuchsprinzip ist der Nachweis von einwertigen Kupferionen durch Bichinonsäure (BCA) (Smith et al., 1985), die bei der Reduktion von zweiwertigen Kupferionen durch Proteine in alkalischem Milieu (Biuret-Reaktion) entstehen. Das Kit enthielt die Reagenzien A und B, die im Verhältnis Reagenz A:Reagenz B = 50:1 gemischt wurden. Danach wurden 998 µl dieser Mischung mit 2 µl Proteinlösung in Plastikkuvetten (Sarstedt) pipettiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm mit einem Photometer (BioPhotometer 6131, Eppendorf) gemessen. Jede Probe wurde zweimal gemessen und mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes aus der Extinktion unter der Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Proteinkonzentration errechnet.

Zuletzt wurde das isolierte Protein auf drei neue 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt und bei -80°C konserviert.

2.5.2 Durchführung des ELISA

Mit Hilfe des Quantikine®-ELISA-Kits wurde die Proteinkonzentration von IL-6, TNF- α und IL-1 β (Katalog-Nummern M6000B, MTA00 und MLB00B R&D Systems GmbH, Wiesbaden,

Deutschland) in den Herzen von WT- und TLR9-D-Mäusen nach Stimulation mit 1668-Thioat gemessen. Bei dem benutzten Kit handelte es sich um einen sogenannten Solide-Phasen-Sandwich-ELISA. Standards, Leerwert, Positivkontrolle und Proben wurden auf eine mit monoklonalem Anti-Maus-Antikörper beschichtete 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert, wobei jeweils zwei Ansätze gemacht wurden, aus denen später der Mittelwert berechnet wurde. Die Proben zur Messung von IL-1 β wurden zusätzlich mit der mitgelieferten Kalibrierungslösung 1:4 verdünnt. In den Proben vorhandenes Zielprotein wurde von den immobilisierten Antikörpern in einer 2-stündigen Inkubationszeit gebunden, während ungebundene Restproteine im nächsten Schritt durch Waschen (5 Zyklen) (Atlantis Microplate Washer V 1.3, Asys Hitech, Eugendorf, Österreich) entfernt wurden. Anschließend wurde ein für das jeweilige Zytokin spezifischer polyklonaler Anti-Maus-Antikörper (Konjugationslösung), der fest mit dem Enzym Peroxidase verbunden war, zu jeder Probe pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift, der überschüssige Antikörper entfernte, wurde eine Substratlösung (Reagenz A:Reagenz B = 1:1) hinzugegeben. Der enzymatische Abbau des Substrates, der zu einer Blaufärbung der Proben führte, wurde nach 30 Minuten durch eine Stopp-Lösung (Gelbfärbung der Proben) beendet. Die Intensität der Farbe im Reaktionsgemisch war direkt proportional zur Menge an Zielprotein in der Probe. Die optische Dichte wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Kontrollwellenlänge von 540 nm gemessen und mit Hilfe der Standardkurve (4-Punkt-Auftragung) die Konzentration von IL-6, TNF- α und IL-1 β in den Proben mit einem ELISA-Reader (EXPERT 96 Microplate Reader, Asys Hitech) und entsprechender Software (MIKROWIN 2000 V 1.0 Asys Hitech) errechnet.

Bei der Durchführung des Versuches wurde sich streng an das vom Hersteller des ELISA-Kits vorgegebene Protokoll gehalten. Die Sensitivität des ELISA wurde vom Hersteller geprüft. Die minimale detektierbare Dosis beträgt 1,6 pg/ml. Signifikante Kreuzreaktivität mit anderen Proteinen konnte vom Hersteller ausgeschlossen werden.

2.6 Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

2.6.1 Einleitung

Der EMSA ist eine Technik zur Untersuchung der sequenzspezifischen Bindung von Proteinen an doppelsträngige DNA. Diese Methode beruht auf der Beobachtung, dass radioaktiv-markierte DNA-Moleküle in der Gelelektrophorese langsamer wandern, wenn ein Protein an sie gebunden ist. In der Autoradiographie ist die Bande des Protein/DNA-Komplexes im Vergleich zur nicht-gebundenen DNA nach oben verschoben; daher rührt die Bezeichnung „Band Shift Assay“.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dieser Methode der qualitative Nachweis auf „nukleären Faktor κB “ (NF κB) geführt. NF κB ist ein Transkriptionsfaktor, der in seiner inaktiven Form komplexiert mit seinem Inhibitor „inhibitory κB “ (I κB) im Zytoplasma vorliegt. Durch einen geeigneten Stimulus, z. B. LPS, bakterielle DNA, TNF- α , Wasserstoffperoxid oder ultraviolette Strahlung wird I κB phosphoryliert und NF κB wird freigesetzt. Gesteuert durch ein nukleäres Lokalisationssignal im NF κB wird der aktivierte Transkriptionsfaktor zielgerichtet in den Zellkern transportiert. Im Zellkern ist NF κB in der Lage an verschiedene Promotor-Sequenzen zu binden und so die Transkription verschiedener Gene zu initiieren und zu verstärken. Je nach Zelltyp wird die Expression folgender Gene durch NF κB gesteuert: Zytokine und Wachstumsfaktoren (IL-1 β , IL-6 und TNF- α), Chemokine (iNOS, Komplementfaktoren und Cyclooxygenasen) und immunregulierende Proteine (MHC-I, T-Zell-Rezeptor und leichte κ -Kette von Immunglobulinen). Dabei ist die Nukleotidsequenz, an die sich NF κB anlagert, nicht immer genau identisch. Die Konsensus-Sequenz 5'-GGG RNN YYC C -3' fasst die möglichen Bindungsstellen zusammen. In dieser allgemeingültigen Formel stehen die Buchstaben R für die Basen Adenin und Cytosin, Y für die Basen Thymin oder Cytosin und N für irgendeine Base.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Oligonukleotid mit folgender Sequenz benutzt: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' (double-stranded DNA for Gel Shift, Santa Cruz Biotechnology, Ca, USA). Dieses Oligonukleotid wurde mit γ -Phosphor³²-ATP radioaktiv markiert und mit der nukleären Fraktion der Proteine aus Mäuseherzen inkubiert. In den Proben vorhandenes NF κB lagerte sich an die spezifische Bindungsstelle an und konnte in einer Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur ein Experiment mit jeweils einer WT-Maus und einer TLR9-D-Maus zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 1,5h, 2h und 4h nach Injektion von D-GalN und 1668-Thioat durchgeführt.

2.6.2 Proteinisolation für EMSA

Das Versuchsprinzip eines EMSA, nämlich die sequenzspezifische DNA-Bindung von Proteinen, verlangt eine getrennte Isolation von zytoplasmatischen und nukleären Proteinen. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Proteinisolation aus Mäuseherzen mit dem NE-PER Nuclear-and-Cytoplasmatic-Extraction-Kit (Pierce) durchgeführt. Um die sequenzspezifische DNA-Bindung zu gewährleisten, muss die Quartärstruktur der Proteine während der Isolation erhalten bleiben. Deshalb wurde während des Versuches größtmöglicher Wert auf die Kühlung der Proben gelegt.

Zur Vorbereitung der Isolation wurden Mörser und Pistill auf -80°C gekühlt, die Proben aus dem -80°C Eisschrank in flüssigen Stickstoff überführt und die Zentrifuge (3K18, Sigma) auf 4°C gekühlt. Außerdem wurde Trockeneis benötigt, um Mörser und Pistill auch während des Versuches zu kühlen. Für jede Probe wurden drei 1,5 ml Reaktionsgefäße vorbereitet. In die Deckel der Reaktionsgefäße wurde mit einer Nadel ein kleines Loch gestochen. Dies verhinderte, dass die Reaktionsgefäße bei großen Temperaturschwankungen plötzlich aufsprangen und das Probenmaterial verloren ging.

Nachdem alle Materialien eisgekühlt waren, wurde ein Mäuseherz mit etwas flüssigem Stickstoff in den Mörser gegeben. Mit vorsichtigen Stößen wurde das Organ zunächst in kleinere Stücke zerteilt, um dann unter Zugabe von weiterem Stickstoff zu einem feinen trockenen Pulver verrieben zu werden. Dieses wurde mit einem eiskalten Spatel in ein vorgekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Im NE-PER-Kit sind die Reagenzien Cytoplasmatic-Extraction-Reagent I + II (CER I + II) und das Nuclear-Extraction-Reagent (NER) enthalten. Das benötigte Volumen richtete sich nach der Menge zerriebenen Gewebes. Auf 100 mg Gewebe wurden 500 μl CER I (1:5), 27,5 μl CER II (3,63:1) und 250 μl NER (1:2,5) benötigt. Um den Abbau von Protein durch Proteinasen zu vermeiden, wurden den Lösungen CER I und NER Proteaseinhibitoren (alle von Sigma) entsprechend folgender Tabelle zugesetzt.

Proteaseinhibitor	[CER I]	[NER]
Benzamidine	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
Aprotinin	2 $\mu\text{l/ml}$	2 $\mu\text{l/ml}$
Leupeptin	2 $\mu\text{l/ml}$	2 $\mu\text{l/ml}$
PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)	0,75 mM	2 mM

Tabelle 4: Konzentration der Proteaseinhibitoren in den Lösungen CER I und NER

Nachdem die Lösungen vorbereitet waren, wurde CER I entsprechend dem Gewicht der Probe in die Reaktionsgefäße pipettiert. Diese wurden dann mit einem Vortex-Genie auf höchster Stufe gemischt und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Als nächstes wurde das nach dem Gewicht der Probe berechnete Volumen CER II in das Reaktionsgefäß gegeben. Wiederum wurde das Reaktionsgemisch mit dem Vortex-Genie gemischt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von einer Minute wurden die Reaktionsgefäße noch einmal geschüttelt und schließlich fünf Minuten bei 15279*g (13.000 U/min) und 4°C zentrifugiert (Centrifuge 3K18, Sigma). Der resultierende Überstand entsprach der zytoplasmatischen Proteinfraction und wurde in ein neues Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gestellt. Das Sediment am Boden des ersten Reaktionsgefäßes enthielt die Kerne der lysierten Zellen. Diese wurden nun durch Zugabe des errechneten Volumens NER lysiert. Um das Sediment zu resuspendieren, musste sorgfältig mit einem Vortex-Genie in Abständen von 10 Minuten auf höchster Stufe gemischt werden. Die Inkubationszeit auf Eis betrug 40 Minuten. Danach wurden die Proben 15 Minuten bei 15279*g (13.000 U/min) und 4°C zentrifugiert. Der resultierende Überstand entsprach der nukleären Proteinfraction und wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und auf Eis gestellt. Der Erfolg der Isolation wurde durch Proteinkonzentrationsmessung mit einem BCA-Kit (Pierce) überprüft (siehe 2.5.1 Proteinisolation ELISA).

2.6.3 Durchführung des EMSA

Der EMSA lässt sich in drei Abschnitte einteilen:

- a) Markierung der NFκB-Bindungsstelle mit γP^{32} -ATP
- b) Bindungsreaktion zwischen NFκB und dem radioaktiv-markierten Oligodesoxynukleotid
- c) Gelelektrophorese und Auswertung

a) Am Beginn des EMSA steht die Synthese der „hot-probe“, d. h. die radioaktive Markierung des Konsensus-Sequenz-ODN für NFκB. Dazu wurden die benötigten Chemikalien in der folgenden Reihenfolge in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert: 12,75 µl ddH₂O, 5 µl 2,5 X „Forward-Reaction-Buffer“ (Gibco), 3,73 µl (5 pmol) NFκB-Konsensus-Sequenz-Oligonukleotid (Santa Cruz), 2,5 µl γP^{32} -ATP (10 µCi/µl, 3000 Ci/mmol, Amersham) und 1 µl (10 units) T4-Polynukleotidkinase (Gibco). Diese Reagenzien wurden sorgfältig gemischt und 20 Minuten bei 37°C in einem Heizblock (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 65°C erhöht und für weitere 15 Minuten inkubiert.

Währenddessen wurden zwei Chromatographiesäulen (Micro Bio-Spin[®] 6 Chromatography Columns, Bio-Rad) für zwei Minuten bei 4200*g (3400 U/min) zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus instruments). Dadurch wurde die Flüssigkeit in dem Reaktionsgefäß durch den Filter der Chromatographiesäule gepresst und bereitete diesen für den nächsten Schritt vor. Die Chromatographiesäule wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und das Reaktionsgemisch aus dem Reaktionsgefäß im Heizblock auf den Filter pipettiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch durch Zentrifugation mit 4200*g (3400 U/min) durch den Filter der Chromatographiesäule gepresst. Das Eluat enthielt das radioaktiv-markierte Oligonukleotid; die „hot probe“.

Um die Aktivität der „hot probe“ zu bestimmen, wurde 1 µl derselben mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, PerkinElmer) vermischt und mit einem Szintillationszähler (LS 6000 IC, Beckman) ausgemessen. Die durchschnittliche Aktivität der Probe lag bei 80.000 Cherenkov counts/µl bei einem akzeptablen Minimum von 50.000 Cherenkov counts/µl. Die „hot probe“ wurde in einem abschirmenden Plexiglasbehälter bei -20°C aufbewahrt und konnte bei ausreichender Menge und Aktivität für weitere Versuche innerhalb von 14 Tagen wiederverwendet werden.

b) Nach der Synthese der „hot probe“ folgt die Bindungsreaktion zwischen dem nukleären Proteinextrakt und dem radioaktiv-markierten Oligonukleotid. Dazu wurden zunächst die zu untersuchenden Proben langsam auf Eis aufgetaut. An Hand der photometrisch bestimmten Proteinkonzentration konnte das Volumen der Probe ausgerechnet werden, das 20 µg nukleäre Proteine enthielt. Dieses Volumen wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und mit ddH₂O zu einem Gesamtvolumen von 17 µl aufgefüllt. Zu jedem Reaktionsgefäß wurden 7 µl eines Gemisches aus Poly(dI-dC) (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) und 5 X „Binding Buffer“ (60 mM Hepes, 20 mM Tris, 300 mM KCL, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 50% Glycerol, pH 7,9) pipettiert. Das Gemisch bestand aus 1 µg/µl Poly(dI-dC) und 5 X „Binding Buffer“ im Verhältnis 2:5. Zuletzt wurde 1 µl „hot probe“ in jedes Reaktionsgefäß pipettiert, so dass das Gesamtvolumen 25 µl betrug. Zur Bindung von NFκB aus den Proben an das radioaktiv-markierte Oligonukleotid wurden die Reaktionsgefäße bei Raumtemperatur 30 Minuten inkubiert.

c) Zur Gelelektrophorese wurden am Tag vor dem eigentlichen Experiment zwei Acrylamidgele gegossen. Nach gründlichem Waschen der Glasplatten und Abspülen mit ddH₂O wurden sie mit Präzisionswischtüchern (KimWipes, KIMTECH Science) getrocknet. Die kleinere Glasplatte wurde silikonisiert (SigmaCote, Sigma). Dann wurden die Elektrophoresekammern zusammengesetzt. Um die Gelmulden beim Beladen des Gels besser zu erkennen, wurden die Mulden mit einem Filzstift nummeriert.

Das Acrylamidgel wurde hergestellt aus 2,5 ml 5 X TBE-Puffer (8,9 M Tris, 8,9 M Borsäure, 200 mM EDTA, pH 8,3 Merck), 6,76 ml 30% Acrylamid (National Diagnostics), 1,25 ml 2% BIS-Acryl (National Diagnostics) und 2,5 ml 50% Glycerol (Merck). Das Gemisch wurde mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Zuletzt wurden 150 µl Ammoniumpersulfat (300 mg/ml, Bio-Rad) und 50 µl TEMED (Bio-Rad) hinzupipettiert.

Dieses Gemisch wurde gut verrührt und mit einer großen Pipette zwischen die Glasplatten gegossen. Die fertigen Gele wurden über Nacht im Kühlraum bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Gele in der Gelelektrophorese-Apparatur aufgestellt, und die Kammern mit 1 X TBE (1,78 M Tris, 1,78 M Borsäure, 40 mM EDTA, pH 8,3 Merck) als Laufpuffer gefüllt. Bevor das Gel beladen wurde, wurde es durch ein Vorlauf von 30 Minuten bei 90 V vorgewärmt. Anschließend wurden die Proben in die Gelmulden geladen. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proben wurde zunächst für 30 Minuten eine Spannung von 100 V, dann für weitere 150 Minuten eine Spannung von 160 V angelegt. Sobald das Gel zu Ende gelaufen war, wurde es mit Hilfe eines gleich großen Filterpapiers aus der Elektrophoresekammer genommen, mit Frischhaltefolie aus Polyvinylchlorid bedeckt, in einem Gel-Trockner (Vacuum Gel Dryer Model 583, BioRad, München, Deutschland) bei 70°C getrocknet und mit dem Filterpapier verbacken. Um die radioaktiv-markierten Komplexe aus NFκB und Oligonukleotid sichtbar zumachen, wurde von dem so fixierten Gel eine Autoradiographie auf Röntgenfilm angefertigt.

2.7 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

2.7.1 Einleitung

Neben dem RPA wurde im Rahmen dieser Arbeit die RT-PCR zur Analyse von mRNA benutzt. Der Vorteil der Methode liegt in der hohen Sensitivität. Im Prinzip ist man in der Lage, ein einziges Transkript aufzuspüren, zu amplifizieren und auf einem Agarosegel sichtbar zu machen. Nachdem die RNA aus dem Gewebe oder aus der Zellkultur isoliert wurde, ist es notwendig, sie zur Amplifikation in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Hierzu benötigt man RNA-abhängige DNA-Polymerasen, die aus Retroviren isoliert werden können. Die so gewonnene cDNA kann auf herkömmliche Weise mit einer Taq-Polymerase amplifiziert werden. Eine Alternative ist die Tth-Polymerase, die sowohl RT- als auch DNA-Polymerase-Aktivität besitzt und deshalb für beide Schritte zu gebrauchen ist. Da die Tth-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* stammt, ist sie im Gegensatz zu den anderen reversen Transkriptasen hitzestabil. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 60 bis 70°C. Dies ist ein weiterer Vorteil, da die höhere Temperatur im RT-Schritt hilft, Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen und damit die Anlagerung des Primers erleichtert.

Nach 30 bis 35 Zyklen liegt normalerweise genügend PCR-Produkt zu weiteren Analyse vor. Bei sehr geringer Ausgangskonzentration werden 40 bis 50 Zyklen benötigt.

Das PCR-Produkt wird auf ein Agarosegel aufgetragen, das Ethidiumbromid enthält. Dieses bildet mit DNA durch Einlagerung in die Doppelhelixstruktur Komplexe, die unter UV-Licht als fluoreszierende Banden sichtbar werden.

2.7.2 Durchführung der RT-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurden die Herzen von vier WT- und vier TLR9-D-Mäusen vier Stunden nach Injektion von D-GalN und 1668-Thioat mittels RT-PCR auf induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS)-mRNA-Expression untersucht. Als interner Standard wurde gleichzeitig die mRNA des konstitutionell exprimierten Gens β -Aktin untersucht, um eine semiquantitative Aussage machen zu können. Da nur sehr wenig iNOS-mRNA vorhanden war, wurden 45 PCR-Zyklen benötigt.

Die RNA-Isolation, reverse Transkription und DNA-Amplifikation wurden freundlicherweise mit Unterstützung von Herrn Prof. Klaus Fink in den Räumen des pharmakologischen Institutes der Universität Bonn durchgeführt.

2.8 Statistik

Im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse kamen im Anschluss an die Experimente jeweils unterschiedliche statistische Verfahren zum Einsatz, die im Weiteren kurz im Zusammenhang erläutert werden.

a) RPA

Die Daten wurden mittels der Software AIDA Image Analyzer Version 3.45 (Raytest GmbH, Sprockhövel, Deutschland) erhoben, exportiert und nachfolgend mit Microsoft Excel 2000 sowie dem Statistikprogramm WinSTAT 3.0 einer weitergehenden Auswertung zugeführt. In Excel wurden die Daten aus allen RPAs zusammengeführt. Insgesamt gab es 10 Gruppen: WT-Mäuse zu den Zeitpunkten null, eine, zwei, vier und sechs Stunden nach Injektion von D-GalN und 1668-Thioat und entsprechende TLR9-D-Mäuse. In jeder Gruppe wurden fünf Mäuseherzen auf die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α untersucht. Mit Microsoft Excel wurden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte berechnet und die Histogramme erstellt. Mit WinSTAT 3.0 wurde eine multifaktorielle Varianzanalyse (2-Wege-Anova) mit einer Bonferoni-Post-Hoc-Analyse durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

b) ELISA

Mit einem ELISA-Reader (Asys Hitech) wurde die optische Dichte der Reaktionslösung gemessen und durch Vergleich mit der Standardkurve unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Zytokinkonzentration in pg/ml errechnet. Zur Normalisierung dieser Werte wurde durch die Gesamtproteinkonzentration aus den Mäuserherzen dividiert, so dass man die Zytokinmenge in pg pro mg Gewebe bzw. pro mg Herzmuskelprotein erhielt.

Analog zum RPA gab es 10 Gruppen mit $n = 5$. Mittels Microsoft Excel wurden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte berechnet. Mit WinSTAT 3.0 wurde eine multifaktorielle Varianzanalyse (2-Wege-Anova) mit einer Bonferoni-Post-Hoc-Analyse durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

c) EMSA

Da bei einem „Band-Shift-Assay“ kein interner Standard zur Verfügung steht, wird bei diesem Versuch in der Regel auf eine Quantifizierung verzichtet und nur eine semiquantitative Aussage getroffen. Die erhobenen Daten wurden demnach nicht statistisch ausgewertet.

d) RT-PCR

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in Kooperation mit Prof. Klaus Fink am pharmakologischen Institut der Universität Bonn. Es wurde die optische Dichte der Banden auf einem Agarosegel bestimmt. Dabei wurden die Werte von iNOS zu denen des konstitutiv exprimierten Gens β -Aktin normalisiert. Außerdem wurde der Standardfehler errechnet und die Signifikanz ($p < 0,05$) geprüft.

3. Ergebnisse

3.1 Kardiale Zytokin-mRNA-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zytokin-mRNA-Expression nach intraperitonealer Stimulation mit D-GalN und bakterieller DNA (1668-Thioat) mittels „Ribonuclease Protection Assay“ (RPA) bestimmt. Herzgewebe von Wildtyp (WT)- und TLR9-defizienten (TLR9-D)-Mäusen wurde zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 4h und 6h nach intraperitonealer Injektion untersucht. Es wurde die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 untersucht, da diese eine wichtige Rolle für die Entstehung und Progression einer septischen Kardiomyopathie spielen. Die Gruppengröße betrug zu allen Zeitpunkten n=5.

3.1.1 mRNA-Expression von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Nach Verabreichung von 1668-Thioat kam es im Myokard der WT-Tiere zu einem deutlichen Anstieg der TNF- α mRNA-Expression erkennbar an der Intensitätszunahme der Bande für TNF- α (Abbildung 6). Im Gegensatz dazu wurde zu keinem Zeitpunkt eine Zunahme der mRNA-Expression für TNF- α in der Gruppe der TLR9-D Tiere beobachtet.

Die densitometrische Auswertung zeigte, dass bei den WT-Tieren das Expressionsmaximum bereits eine Stunde nach Injektion mit $5,98\% \pm 1,32\%$ der Intensität von L32 erreicht wurde. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten nahmen die Werte sukzessive ab. Zu den Zeitpunkten 1h und 2h nach Injektion war der Unterschied zwischen den WT- und den TLR9-D Tieren hoch signifikant ($p < 0,001$). Auch zu den Zeitpunkten 4h ($p < 0,05$) und 6h ($p < 0,01$) nach Stimulation waren die Werte für TNF- α mRNA-Transkripte in den Herzen von WT-Mäusen signifikant größer als bei den TLR9-D Tieren. Innerhalb der Gruppe der WT-Tiere zeigte sich, dass signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten 0h WT und 1h WT respektive den Zeitpunkten 0h WT und 2h WT bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ vorlagen. In der abgebildeten Autoradiographie eines RPA Gels (Abbildung 6) sowie in dem Histogramm (Abbildung 7) sind der Zeitverlauf der Expression sowie die Unterschiede zwischen den WT- und den TLR9-D-Mäusen deutlich zu erkennen.

Die mRNA-Expression von TNF- α in der Gruppe der TLR9-D-Mäuse war zu allen Zeitpunkten gleich. Ebenso existiert kein Unterschied zwischen den Gruppen 0h WT und 0h TLR9-D.

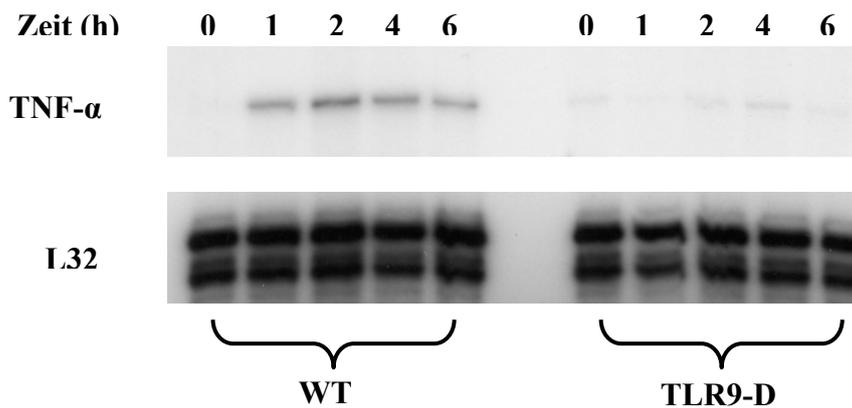


Abbildung 6: Ausschnitt aus einer Autoradiographie eines repräsentativen RPAs mit den Banden von TNF- α und L32 bei WT- und TLR9-D-Mäusen zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 4h und 6h nach Injektion von D-GalN und des CpG-ODN 1668-Thioat.

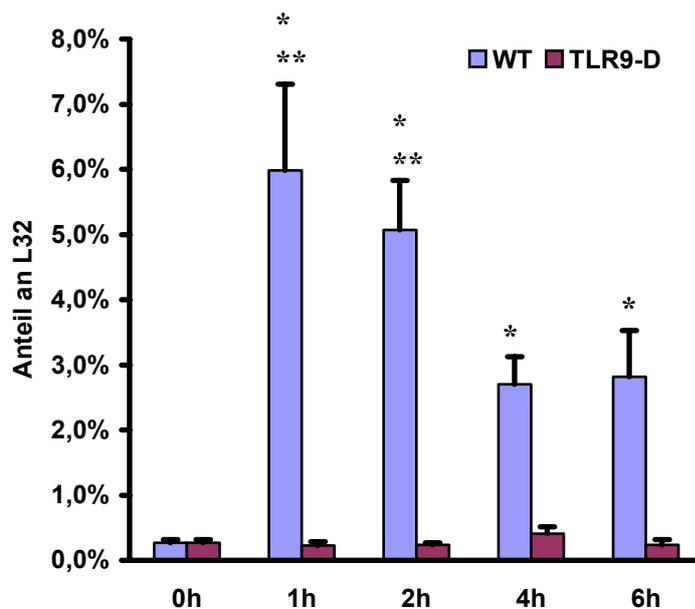


Abbildung 7: Das Histogramm zeigt die mRNA Expression von TNF- α im Myokard von WT- und TLR9-D-Mäusen zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 4h und 6h nach Stimulation mit D-GalN und dem CpG-ODN 1668-Thioat. Mittelwert \pm SEM; *=signifikant gegen TLR9-D zum gleichen Zeitpunkt; **=signifikant gegen 0 h WT.

3.1.2 mRNA Expression von Interleukin-1 β (IL-1 β)

Das mRNA-Expressionsmuster für IL-1 β im murinen Myokard nach intraperitonealer Stimulation mit D-GalN und 1668-Thioat entspricht in weiten Teilen der mRNA-Expression von

TNF- α . Der Anstieg der IL-1 β mRNA-Expression in den WT-Tieren, erkennbar an der zunehmenden Intensität der Banden für IL-1 β , ist noch stärker ausgeprägt als bei TNF- α . Vergleichbar mit den Daten zu TNF- α konnte in der Gruppe der TLR9-D Mäuse keine Zunahme der Expression von IL-1 β beobachtet werden (Abbildung 8).

Das Expressionsmaximum von IL-1 β bei den WT-Mäusen wurde ebenfalls nach einer Stunde erreicht und betrug $12,02\% \pm 3,22\%$ der Intensität von L32. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten nahm die IL-1 β Expression sukzessive ab. Hoch signifikante Unterschiede wurden zwischen den WT- und TLR9-D-Mäusen zu den Zeitpunkten 1h und 2h nach Injektion gemessen ($p < 0,001$). Innerhalb der Gruppe der WT-Mäuse fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 0h WT und 1h WT sowie zwischen den Gruppen 0h WT und 2h WT ($p < 0,05$).

Bei den Gruppen 4h WT und 6h WT erkennt man im Vergleich zu den entsprechenden TLR9-D-Mäusen in der Autoradiographie eines RPA-Gels (Abbildung 8) und im Histogramm (Abbildung 9) eine höhere mRNA-Expression, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

In den TLR9-D-Mäusen war die mRNA-Expression von IL-1 β zu jeder Zeit gleich. Weiterhin wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen 0h WT und 0h TLR9-D beobachtet.

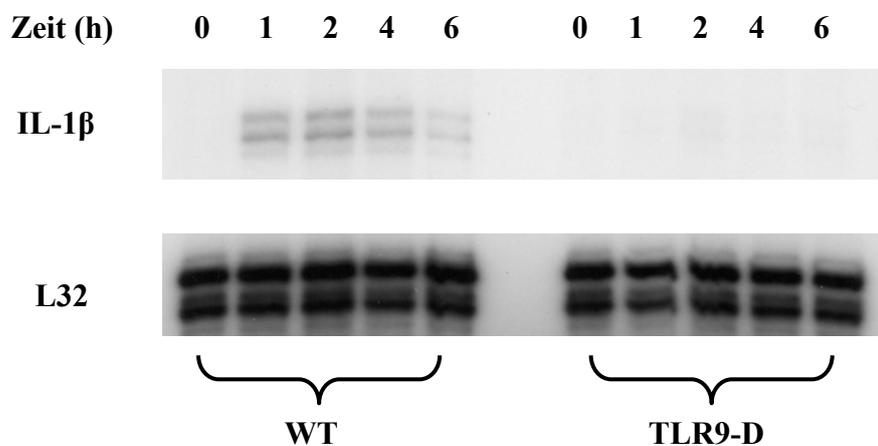


Abbildung 8: Ausschnitt aus einer Autoradiographie eines repräsentativen RPAs mit den Banden von IL-1 β und L32 bei WT- und TLR9-D-Mäusen zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 4h und 6h nach Injektion von D-GalN und des CpG-ODN 1668-Thioat.

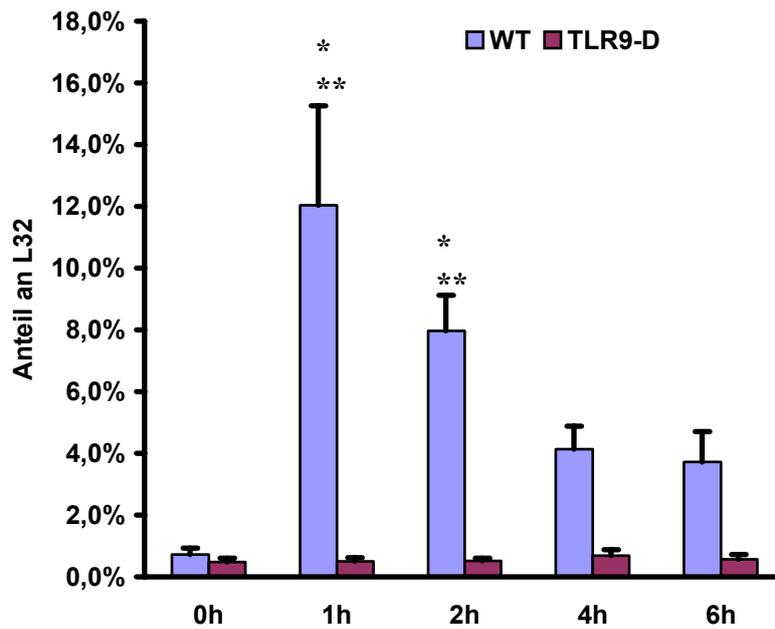


Abbildung 9: Das Histogramm zeigt die mRNA-Expression von IL-1 β im Myokard von WT- und TLR9-D-Mäusen zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 4h und 6h nach Stimulation mit D-GalN und dem CpG-ODN 1668-Thioat. Mittelwert \pm SEM; * = signifikant gegen TLR9-D zum gleichen Zeitpunkt; ** = signifikant gegen 0 h WT.

3.1.3 mRNA Expression von Interleukin-6 (IL-6)

Die Injektion von D-GalN und 1668-Thioat führte zu einem Anstieg der mRNA Expression von IL-6 bei WT-Mäusen erkennbar an einer Intensitätszunahme der Banden in der Autoradiographie eines RPA-Gels (Abbildung 10). Hingegen war die mRNA Expression bei den TLR9-D-Tieren nicht erhöht.

Das mRNA-Expressionsmaximum von IL-6 in der WT-Gruppe wird im Gegensatz zu den Zytokinen TNF- α und IL-1 β erst nach 2 Stunden mit $2,79\% \pm 0,26\%$ der Intensität von L32 erreicht. Der Unterschied zwischen den Gruppen 2h WT und 2h TLR9-D ist mit $p < 0,001$ hoch signifikant. Ebenfalls konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 1h WT und 1h TLR9-D ($p < 0,01$) sowie zwischen den Gruppen 6h WT und 6h TLR9-D ($p < 0,01$) beobachtet werden. Innerhalb der WT-Gruppe zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 0h WT und 2h WT ($p < 0,05$).

In der Autoradiographie (Abbildung 10) und dem Histogramm (Abbildung 11) erkennt man neben dem Zeitverlauf der Zytokinexpression auch in der Gruppe 4h WT eine gegenüber der

3.2 Kardiale Proteingewebespiegel von Zytokinen

Um zu überprüfen, ob die mittels RPA erhobenen mRNA-Expressionsmuster auch tatsächlich zu einer Zunahme der Zytokin-Proteinexpression führten, wurde die Zytokinexpression ebenfalls auf Proteinebene untersucht. Dazu wurden die Zytokin-Proteingewebespiegel von TNF- α , IL-1 β und IL-6 mit einem ELISA gemessen. Analog zum RPA wurden WT- und TLR9-D-Mäuse zu den Zeitpunkten eine, zwei, vier, und sechs Stunden nach Stimulation mit D-GalN und CpG-DNA untersucht. Die Gruppengröße betrug zu allen Zeitpunkten $n = 5$. Die im ELISA gemessene Proteinmenge wurde in Relation zu der insgesamt aus dem Mäuseherz isolierten Proteinmenge gesetzt, die zuvor mittels eines BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) bestimmt worden war. Zur statistischen Auswertung wurde eine multifaktorielle Varianzanalyse (2-Weg-Anova) mit anschließender Bonferroni-Post-Hoc-Analyse durchgeführt.

3.2.1 Proteingewebespiegel von TNF- α

Die kardialen Proteingewebespiegel für TNF- α waren 1 Stunde und 2 Stunden nach Injektion von D-GalN und CpG-ODN bei den WT-Mäusen deutlich größer als bei den TLR9-D-Mäusen. Statistische Signifikanz wurde zum Zeitpunkt 1h nach Stimulation erreicht ($p < 0,05$); nach 2 Stunden zeigt sich ein deutlicher Trend (Abbildung 12). Zum Zeitpunkt 1h nach Stimulation wurde auch der maximale Wert für TNF- α dokumentiert ($2,76 \text{ pg} \pm 1,06 \text{ pg pro mg}$ Gesamtprotein in der Gruppe 1h WT vs. $0,59 \text{ pg} \pm 0,4 \text{ pg}$ in der Gruppe 1h TLR9-D). Wie in Abbildung 12 zu erkennen waren die Proteingewebespiegel in der WT-Gruppe nach 4 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau gefallen.

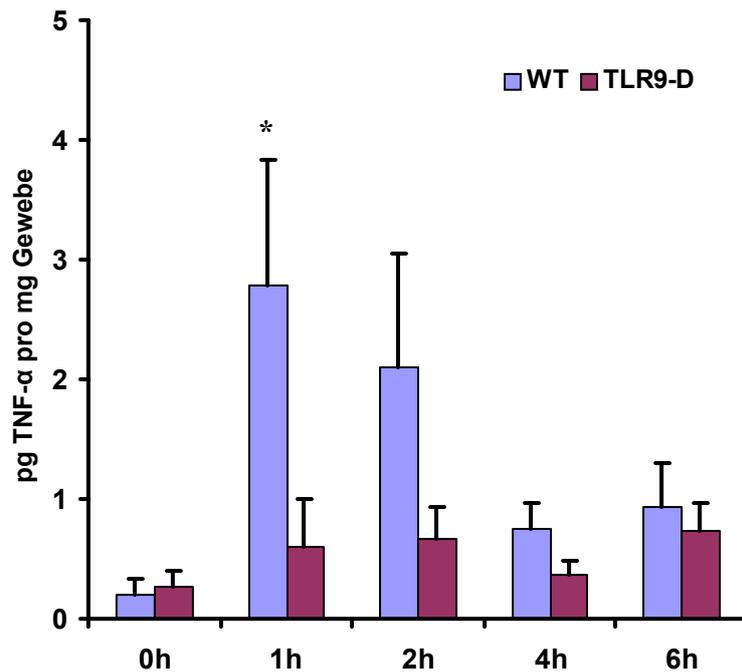


Abbildung 12: Das Histogramm zeigt die Proteinkonzentration von TNF- α im Myokard von WT- und TLR9-D-Mäusen zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 4h und 6h nach Stimulation mit D-GalN und dem CpG-ODN 1668-Thioat in Relation zur insgesamt isolierten Proteinmenge. Mittelwert \pm SEM; * = signifikant gegenüber 1h TLR9-D, $p < 0,05$.

3.2.2 Proteingewebespiegel von IL-1 β

Nach intraperitonealer Injektion von D-GalN und 1668-Thioat waren die kardialen Proteingewebespiegel von IL-1 β von WT-Mäusen nach Stimulation mit 1668-Thioat zu jedem Zeitpunkt deutlich höher als bei den entsprechenden TLR9-D-Mäusen. Das Expressionsmaximum wurde in der WT-Gruppe nach 2 Stunden mit einem Wert von $21,79 \text{ pg} \pm 3,96 \text{ pg pro mg Gesamtprotein}$ erreicht (Abbildung 13). Bereits eine Stunde nach Injektion zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen WT- und TLR9-D-Tieren ($p < 0,01$). Zum Zeitpunkt 2h war der Unterschied zwischen WT- und TLR9-D-Mäusen mit $p < 0,001$ statistisch hoch signifikant.

Bei den Gruppen 4h WT und 6h WT erkennt man im Histogramm einen deutlichen Unterschied zu den entsprechenden TLR9-D-Mäusen. Allerdings hatten die Proteingewebespiegel von IL-1 β zu diesen späteren Zeitpunkten schon wieder soweit abgenommen, dass keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

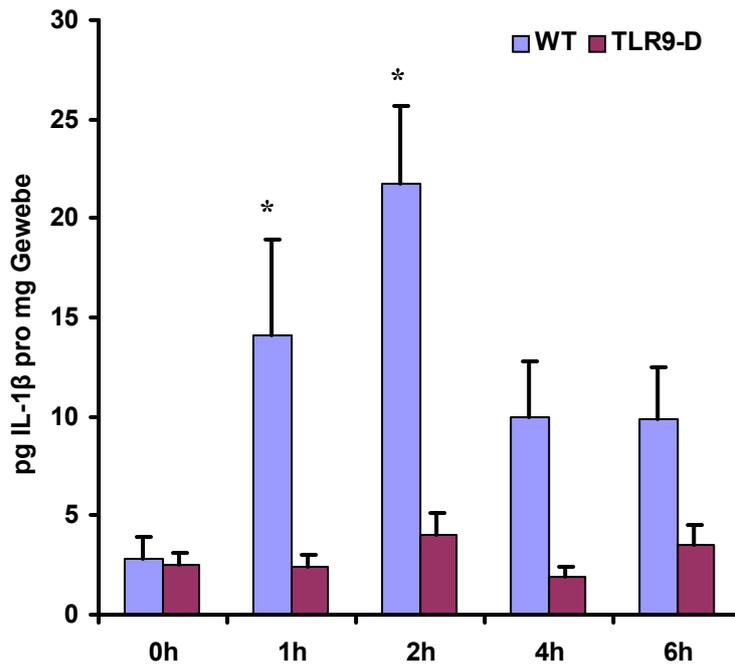


Abbildung 13: Das Histogramm zeigt die Proteinkonzentration von IL-1 β im Myokard von WT- und TLR9-D-Mäusen zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 4h und 6h nach Stimulation mit D-GalN und dem CpG-ODN 1668-Thioat in Relation zur insgesamt isolierten Proteinmenge. Mittelwert \pm SEM; * = signifikant gegenüber TLR9-D zum gleichen Zeitpunkt, $p < 0,05$.

3.2.3 Proteingewebespiegel von IL-6

Im IL-6 ELISA wurden ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen WT- und TLR9-D-Mäusen detektiert. Bereits nach einer Stunde zeigte sich eine deutliche Zunahme in der WT-Gruppe. Das Maximum der Zytokinkonzentration wurde mit $9,32 \text{ pg} \pm 2,72 \text{ pg}$ pro mg isolierten Gesamtprotein in der Gruppe 2h WT gemessen. Nach dem Expressionsmaximum gingen die Werte zu den späteren Zeitpunkten fast auf Ausgangsniveau zurück (Abbildung 14). Im Gegensatz dazu blieben die Proteingewebespiegel in der TLR9-D-Gruppe zu jedem Zeitpunkt unverändert auf einem niedrigen Ausgangsniveau.

Der Unterschied zwischen den Gruppen 2h WT und 2h TLR9-D war statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$).

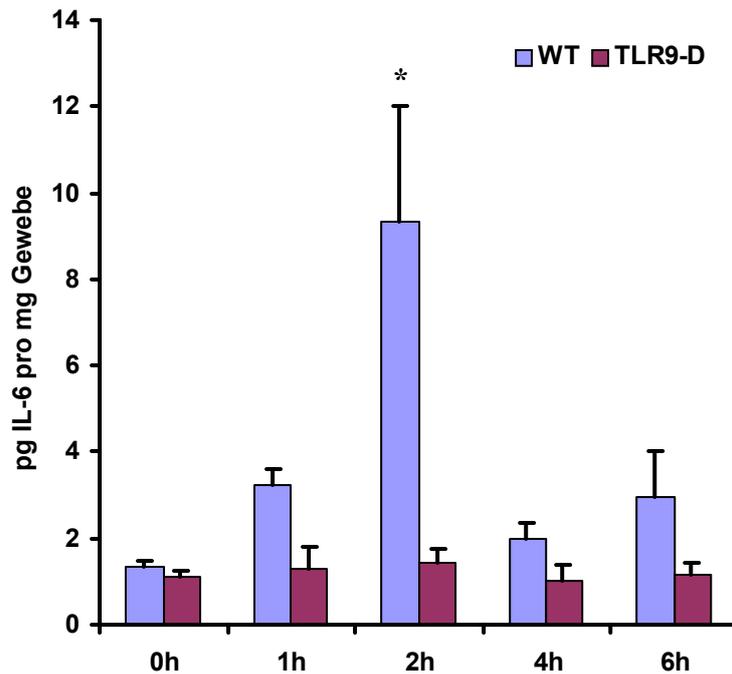


Abbildung 14: Das Histogramm zeigt die Proteinkonzentration von IL-6 im Myokard von WT- und TLR9-D-Mäusen zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h, 4h und 6h nach Stimulation mit D-GalN und dem CpG-ODN 1668-Thioat in Relation zur insgesamt isolierten Proteinmenge. Mittelwert \pm SEM; * = signifikant gegenüber 2h TLR9-D, $p < 0,05$.

3.3 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B im Herzen

Der Transkriptionsfaktor „nuclear factor kappa B“ (NF κ B) spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Expression von verschiedenen Zytokinen. Um zu untersuchen, ob NF κ B auch an der Signaltransduktion von TLR9 im Myokard beteiligt ist, wurde ein „electro mobility shift assay“ (EMSA) durchgeführt. Der aktivierte Transkriptionsfaktor NF κ B (nukleäre Proteinfraction) bindet an die radioaktiv markierte Konsensus-Sequenz und kann dadurch in einer Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Interne Standards stehen bei diesem Versuch nicht zur Verfügung, so dass nur eine semi-quantitative Aussage getroffen werden kann.

Wie in Abbildung 15 zu erkennen wurden Wildtyp (WT)- und TLR9-defiziente (TLR9-D)-Mäuse zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 1,5h, 2h und 4h nach Injektion von D-GalN und 1668-Thioat untersucht. Abweichend von den vorherigen Genexpressionsanalysen wurde bei dieser Versuchsreihe bewusst der Zeitpunkt 1,5h gewählt, da eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors zu einem früheren Zeitpunkt erfolgt als die Gen- bzw. Proteinexpression.

Abbildung 15 zeigt das Ergebnis des Versuches als Ausschnitt aus der Autoradiographie. Man erkennt eine deutlich höhere Intensität der Banden bei den WT-Mäusen mit einem Maximum bei 1,5h. Bei den TLR9-D-Mäusen erkennt man nur sehr schwache Banden, die sich weder untereinander noch von der 0h WT Kontrollmaus unterscheiden.

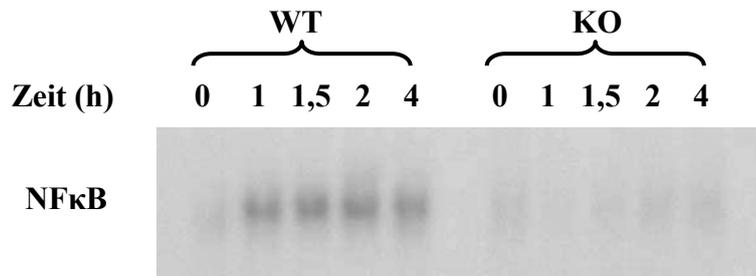


Abbildung 15: Repräsentative Autoradiographie eines EMSA für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB bei WT- und TLR9-D-Mäusen nach Stimulation mit D-GalN und dem CpG-ODN 1668-Thioat zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 1,5h, 2h und 4h.

3.4 mRNA Expression von iNOS im Myokard

Die mRNA-Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) als eigentliches Effektormolekül in der TLR9-Signalkaskade wurde mittels RT-PCR gemessen. Es ist bekannt, dass die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β die Expression von iNOS im Herzen induzieren (Stein et al., 1996). An mit diesen Zytokinen perfundierten Herzen wurde ein maximaler negativ inotroper Effekt nach 2 Stunden dokumentiert (Schulz et al., 1995). In der Annahme, dass das Maximum der iNOS Expression ca. 2 Stunden nach dem Maximum der Zytokinexpression liegt, wurden WT- und TLR9-D-Mäuse nur zu dem Zeitpunkt 4h nach Injektion von D-GalN und CpG-DNA untersucht. In der WT- und in der TLR9-D-Gruppe wurden jeweils vier Mäuse auf iNOS-mRNA untersucht.

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Ergebnisse der RT-PCR. In Abbildung 15 erkennt man die wesentlich stärker fluoreszierenden Banden bei den WT-Mäusen. Dies bestätigte sich nach Messung der optischen Dichte der Banden und Normalisierung gegen die Bande von β -Aktin in der statistischen Auswertung (Abbildung 17). Im Mittel liegt die iNOS mRNA-Expression bei WT-Mäusen nach 4 Stunden bei $16,3\% \pm 0,5\%$ und ist signifikant höher als bei den TLR9-D-Mäusen ($p < 0,05$).

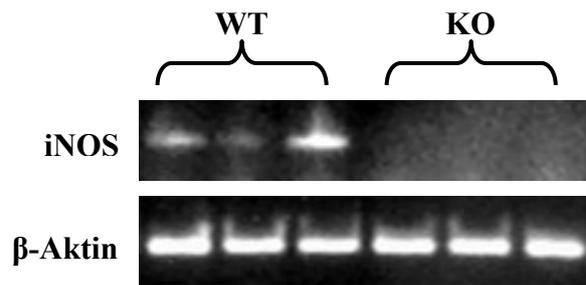


Abbildung 16: Die Photographie zeigt die im UV-Licht fluoreszierenden Banden der mRNA von iNOS und β -Aktin bei WT- und TLR9-D-Mäusen vier Stunden nach Stimulation mit D-GalN und 1668-Thioat.

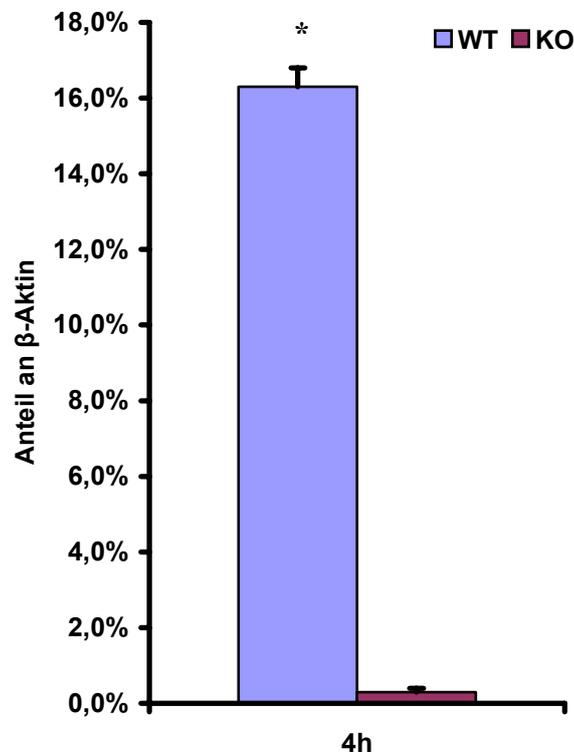


Abbildung 17: Das Histogramm zeigt die mRNA-Expression von iNOS in Relation zu dem konstitutiv exprimierten Gen β -Aktin bei WT- und TLR9-D-Mäusen ($n = 4$) vier Stunden nach Stimulation mit D-GalN und 1668-Thioat. Mittelwert \pm SEM; * = signifikant gegenüber TLR9-D-Gruppe ($p < 0,05$).

4. Diskussion

Trotz therapeutischer Fortschritte stellt die septische Kardiomyopathie ein lebensbedrohliches Krankheitsbild dar. Das Auftreten einer septischen Kardiomyopathie kann dazu führen, dass die Mortalität der Sepsis bzw. des septischen Schocks deutlich zunimmt. Wie aus Abbildung 1 ersichtlich kann beim Vorliegen einer septischen Kardiomyopathie die Gesamtmortalität auf bis zu 70% ansteigen. Im Gegensatz zu anderen Organsystemen wie Lungen und Nieren kann die septische Kardiomyopathie nicht durch differenzierte Organersatzverfahren dauerhaft ersetzt werden. Daher steht die Behandlung der Kardiomyopathie im Vordergrund der Therapie.

Pathophysiologisches Korrelat der Erkrankung ist eine Pumpfunktionsschwäche. Viele Patienten mit einem septischen Schock zeigen sowohl Zeichen einer links- als auch einer rechtsventrikulären Dysfunktion mit verminderter Auswurfraction und dilatierten Ventrikeln (Parker et al., 1984). Nach dem derzeitigen Stand der Forschung sind dafür mehrere negativ inotrope Substanzen, darunter die Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) sowie Mediatoren z.B. die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) verantwortlich.

In den meisten Fällen wird eine Sepsis durch eine bakterielle Infektion hervorgerufen. Bakterien und deren Zellwandbestandteile wurden als pathogene Liganden identifiziert, die Signaltransduktionskaskaden aktivieren und eine generalisierte Entzündungsreaktion induzieren können. Weiterhin muss man bei einer bakteriell verursachten Sepsis davon ausgehen, dass beim Zerfall von Erregern – spontan oder Antibiotika-induziert - bakterielle DNA freigesetzt wird und in die Zirkulation gelangt. Diese bakterielle DNA ist reich an CpG-Motiven und fungiert als TLR-Ligand für den Toll-like Rezeptor 9 (TLR9). Auf diesem Weg erlangt CpG-DNA immunstimulatorisches Potential. Die Bedeutung von bakterieller DNA für die Entstehung und Progression einer myokardialen Inflammation sind bisher nicht bekannt gewesen.

4.1 Das Mausmodell zur Induktion einer septischen Kardiomyopathie

Zur Untersuchung des Einflusses von bakterieller DNA auf eine Entzündungsreaktion im Herzen wurde ein in der Literatur beschriebenes Mausmodell verwendet. Cornelie und Mitarbeiter zeigten, dass in diesem Mausmodell mit synthetischen Cytosin-Phosphat-Guanosin-

Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN) behandelte Mäuse hohe TNF- α -Plasmaspiegel entwickeln und in Abhängigkeit von der Dosierung des CpG-ODN versterben (Cornelie et al., 2002). Die Wirkung der Oligonukleotidsequenz 1668-Thioat wurde bereits in vielen in vitro Versuchen zur Wirkung des TLR9 beschrieben und ist in idealer Weise geeignet das angeborene Immunsystem der Maus über diesen Rezeptor zu aktivieren (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000). Das ODN 1668 ist ein B-Klasse ODN mit durchgehendem Phosphothioat-Rückgrat. Klasse-A und Klasse-C ODN benötigen höhere Konzentrationen, um mit Klasse-B ODN vergleichbare TNF- α und „nuklear factor κ B“ (NF κ B) Produktion bzw. Aktivierung zu erreichen und sind deshalb für dieses Mausmodell weniger geeignet (Vollmer et al., 2004). Zur Induktion einer inflammatorischen Reaktion spielt die stabilisierende Wirkung des Thioat eine große Rolle, da so der Abbau durch Nukleasen inhibiert bzw. verlangsamt wird. Die vorhergehende Behandlung der Mäuse mit D-Galaktosamin (D-GalN) dient der Hemmung der Metabolisierungsrate in der Leber und führt somit zu einer Verstärkung des septischen Schocks. D-GalN wirkt leberspezifisch und bewirkt die Depletion von UTP und Veränderungen an Uracylnukleotiden, so dass die Biosynthese von Makromolekülen wie RNA und Membranglykoproteinen gestört ist. Dies bewirkt eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber TNF- α , so dass bei erhöhter TNF- α -Produktion z. B. nach Injektion von LPS oder CpG-ODN eine fulminante Hepatitis hervorgerufen werden konnte (Lehmann et al., 1987). Schließlich kommt es durch Leberzellapoptose zum Leberausfall, der durch Messung der Leberenzyme beobachtet werden kann (Sparwasser et al., 1997b). CpG-DNA alleine bewirkt nur eine Aktivierung des Immunsystems über den TLR9, führt aber nicht zu einem TNF- α vermittelten septischen Schock. Somit ist die artifizielle Provokation einer Hepatitis gerechtfertigt und notwendig, um den Einfluss von bakterieller DNA bei der septischen Kardiomyopathie zu erforschen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Gabe von 20 nmol / Maus eine subletale Dosierung des Oligonukleotids 1668-ODN gewählt (Cornelie et al., 2002).

Die Untersuchungszeitpunkte wurden in Anlehnung an andere Arbeiten zur septischen Kardiomyopathie so gewählt, dass das Maximum der Zytokinexpression in einem Zeitfenster von 6 Stunden erfasst wurde. Zum Nachweis, dass die beobachteten Effekte durch TLR9 vermittelt sind, wurden alle Versuche gleichzeitig an Wildtyp (WT)- und TLR9-defizienten (TLR9-D)-Mäusen durchgeführt. Ein Einfluss von D-GalN auf die mRNA / Protein-Expression im Myokard wurde durch die Kontrollgruppen 0h WT und 0h TLR9-D ausgeschlossen. Diesen Mäusen wurde nach alleiniger Stimulation mit D-GalN für 30 Minuten die Herzen entnommen und den

verschiedenen Untersuchungsmethoden unterzogen. Dabei zeigte sich weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene eine signifikante Steigerung der Zytokin-Expression. Da dies auch für die TLR9-D-Mäuse zu den weiteren Untersuchungszeitpunkten zutrifft, kann auch ein möglicherweise zu einem späteren Zeitpunkt aufgetretener Einfluss auf die Ergebnisse durch D-GalN ausgeschlossen werden.

4.2 Induktion von NF κ B, Zytokinen und iNOS nach Stimulation mit CpG-DNA

Zur Messung der Aktivierung des Immunsystems durch bakterielle DNA bzw. CpG-ODN gibt es verschiedene Versuchsansätze. In der vorliegenden Arbeit haben wir uns auf die Bestimmung von proinflammatorischen Mediatoren konzentriert, da diese eine Myokardinflammation widerspiegeln und bei einer septischen Kardiomyopathie im Sinne einer Kardiodepression eine wichtige Rolle spielen.

Entgegen früherer Lehrmeinungen, dass im wesentlichen eine systemische Mediatorinduktion für dieses Krankheitsbild verantwortlich ist, gehen derzeitige Vorstellungen der molekularen Mechanismen bei der Sepsis davon aus, dass Bakterien bzw. bakterielle Zellwandbestandteile insbesondere eine myokardiale Mediatorexpression (TNF- α , IL-1 β) hervorrufen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Verabreichung von Lipopolysaccharid (LPS) zu einer myokardialen Produktion von TNF- α -mRNA und -Protein *in vivo* führt (Giroir et al., 1992; Kapadia et al., 1995). Weiterführende Arbeiten konnten zeigen, dass auch Kardiomyozyten selbst verschiedene Toll-like Rezeptoren exprimieren, und diese die kardiale Funktion in der Sepsis wesentlich beeinflussen. Insbesondere wurde bisher die Wirkung von LPS über den CD14/TLR4-Rezeptorkomplex auf die kardiale Funktion untersucht. Tatsächlich haben LPS-behandelte WT-Mäuse eine schlechtere Pumpfunktion als CD14-defiziente respektive TLR4-defiziente Tiere (Knuefermann et al., 2002b; Nemoto et al., 2002). Des Weiteren konnten Baumgarten und Mitarbeiter zeigen, dass eine Inkubation mit LPS bei isolierten Kardiomyozyten zu einer verminderten Sarkomerverkürzung bzw. Kontraktionsamplitude führte (Baumgarten et al., 2006). Basierend auf diesen Voruntersuchungen sollte in der vorliegenden Arbeit die Hypothese untersucht werden, ob die relevanten kardiodepressiven Mediatoren durch bakterielle DNA über einen TLR9-abhängigen Signaltransduktionsweg induziert werden können.

Die Untersuchungen von myokardialem TNF- α zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie für andere Toll-like Rezeptor Liganden beschrieben und bestätigte richtungsweisend die Arbeitshypothese. Sowohl auf mRNA-Ebene als auch die Untersuchung des Proteins mittels ELISA ergaben signifikant höhere Werte bei den WT-Mäusen als bei den TLR9-D-Mäusen.

Da der Anstieg von TNF- α auch auf mRNA-Ebene nachzuweisen war, darf man davon ausgehen, dass das Herz selbst einen wichtigen Beitrag zur TNF- α Produktion als Antwort auf CpG-ODN leistet.

Auffällig ist ein Unterschied in der Kinetik zwischen den Werten für TNF- α mRNA und Protein. Während die Proteinsynthese nach 6 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau zurückgefallen ist, ist die mRNA-Konzentration auch 6 Stunden nach Stimulation in den Herzen von WT-Mäusen immer noch signifikant größer als in der TLR9-D-Gruppe. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf posttranskriptionelle Regulation zurückzuführen. Die Translation der TNF- α -mRNA wird über das „AU-rich element“ (ARE) gesteuert, das in einer nicht translatierten Region am 3' Ende der TNF- α -mRNA liegt. An das ARE können mRNA stabilisierende Faktoren, z. B. HuR (Dean et al., 2001), oder Translationshemmer, z. B. TIA-1 (Piecnyk et al., 2000) binden. Möglicherweise hat CpG-DNA einen Einfluss auf diese Faktoren, die den beobachteten Effekt erklären. Dies wurde auch von Cornelia et. al. vorgeschlagen, die Synergie-Effekte zwischen LPS und CpG-DNA untersuchten. Es wurde vermutet, dass die Vorbehandlung mit CpG-DNA zur Anhäufung von TNF- α -mRNA führt. Eine anschließende LPS-Gabe führte nach der Sensibilisierung mit CpG-DNA zur Translation und überschießender TNF- α Synthese (Cornelia et al., 2002). Dieser Mechanismus wurde auch schon für Interferon γ (IFN γ), als sensibilisierendes Agens vor LPS-Gabe, beschrieben (Hayes et al., 1995). Da dendritische Zellen nach Stimulation mit CpG-DNA auch IFN γ sezernieren, ist die beobachtete Stabilisierung der RNA möglicherweise auf IFN γ zurückzuführen und kein direkter Effekt von CpG-DNA. Der Einfluss von CpG-DNA auf die posttranskriptionelle Regulation kann hier nicht abschließend geklärt werden und benötigt weitere Forschung.

Die absolute Menge an TNF- α (4,41 pg/mg Gesamtprotein) entspricht von der Größenordnung den Plasmawerten, die bei Patienten mit Herzinsuffizienz NYHA-Klasse II – III gefunden wurden (Torre-Amione et al., 1996). Um experimentell eine TNF- α induzierte Kardiodepression auszulösen, sind wesentlich höhere Konzentrationen nötig. Kumar et al. konnten jedoch zeigen, dass TNF- α synergistisch mit Interleukin-1 β wirkt. In dieser Konstellation waren bereits wesentlich niedrigere Konzentrationen der Zytokine ausreichend, um die Kontraktionsfähigkeit

von Kardiomyozyten zu kompromittieren. Diese niedrigen Zytokinspiegel sind vergleichbar mit im Plasma von Patienten gemessenen Konzentrationen während eines septischen Schocks (Kumar et al., 1996).

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das Zytokin IL-1 β untersucht. Es fand sich ein ähnliches Verteilungsmuster zwischen WT- und TLR9-D-Mäusen wie bei der Untersuchung des Zytokins TNF- α . Insgesamt war die mRNA-Expression im RPA etwas stärker, was sich auch in höheren maximalen Werten bei der Proteinkonzentration bestätigte.

Die gemessenen Absolutwerte nach Stimulation mit CpG-ODN liegen geringgradig niedriger als nach einer Stimulation mit LPS. Im Modell einer gramnegativen Sepsis wurde auch der Einfluss auf die Pumpfunktion des Herzens mittels Echokardiographie untersucht. Dabei zeigte sich, dass die produzierten Mengen von kardiodepressiven Zytokinen ausreichend waren, um eine Pumpschwäche des Herzens hervorzurufen (Baumgarten et al., 2001; Knuefermann et al., 2002b). Obwohl die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Zytokinkonzentrationen nur etwa halb so groß sind wie nach Stimulation mit LPS (25 mg/kg KG), zeigen erste vorläufige funktionelle Daten, dass auch bakterielle DNA einen Einfluss auf die myokardiale Funktion hat (Schwederski et al., 2005).

Interleukin 6 (IL-6) ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches durch bakterielle DNA, bzw. durch CpG-ODN und TNF- α induziert werden kann (Cicco et al., 1990; Klinman et al., 1996; Yi et al., 1996b). Während der Sepsis wird die Plasmakonzentration von IL-6 als prognostischer Parameter benutzt (Oberholzer et al., 2005). Da auch für IL-6 eine negativ inotrope Wirkungen beschrieben ist (Finkel et al., 1992; Finkel et al., 1993), wurde auch dieses Zytokin untersucht. Wiederum wurden im Myokard von WT-Mäusen signifikant höhere Konzentrationen als bei den entsprechenden TLR9-D-Mäusen gemessen. Dies lässt den Schluss zu, dass IL-6 im Herz als Antwort auf bakterielle DNA gebildet wird und eventuell an der Ausbildung der Myokarddepression bei Sepsis beteiligt ist. Da IL-6 besonders auf Herzmuskelzellen ICAM-1 induzieren kann, ist es möglich, dass über neutrophile Granulozyten, die über CD11b/CD18 an ICAM-1 binden, zytotoxische Effekte vermittelt werden, und das Herz direkt geschädigt wird (Kukielka et al., 1995). Im Widerspruch dazu steht allerdings die Annahme, dass die septische Kardiomyopathie bei Überleben des Patienten komplett reversibel ist. IL-6 aus Kardiomyozyten könnte auch einen Beitrag zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems bei septischer Kardiomyopathie leisten, da IL-6 bei B-Lymphozyten die Produktion von Immunglobulin-M (IgM) stimuliert (Yi et al., 1996a).

Die Zytokine TNF- α und IL-1 β werden in der vorliegenden Untersuchung bereits eine Stunde nach Stimulation maximal induziert und haben eine ähnliche Kinetik. Das Maximum der IL-6 Expression folgt zeitlich etwas verzögert. Die Kinetik der Zytokinexpression unterstützt die Vorstellung, dass TNF- α und IL-1 β synergistisch wirken und IL-6 induzieren.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass bakterielle DNA eine Myokardinflammation hervorruft und wichtige, negativ inotrop wirksame Zytokine, die für die Entstehung der septischen Kardiomyopathie wesentlich sind, induziert.

NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der innerhalb der Signalkaskade über TLR9 durch CpG-ODN aktiviert wird. In inaktiver Form liegt er gebunden am inhibitorischen Transkriptionsfaktor κ B (I κ B) im Zytoplasma vor. Die Phosphorylierung von I κ B führt zur Dissoziation dieses Komplexes, wodurch das Kernlokalisierungssignal von NF κ B freigelegt wird, und das Protein in den Zellkern wandert. Die Aktivität von NF κ B führt im Nukleus u. a. zur Expression der proinflammatorischen Proteine TNF- α und IL-1 β . Um die aktivierte TLR9-Signalkaskade im Herz nachzuweisen, wurde die Translokation von NF κ B in nukleären Protein-Extrakten mittels EMSA im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen. Die qualitative Auswertung dieser Ergebnisse zeigte eindeutig, dass NF κ B und damit die TLR9-Signalkaskade als Antwort auf Stimulation mit CpG-ODN im Herz von WT-Mäusen aktiviert wird. Im Gegensatz dazu konnte in TLR9-D-Mäusen die nukleäre Translokation von NF κ B nicht nachgewiesen werden. Dies und der Nachweis von IRAK1 in Kardiomyozyten (Thomas et al., 2003) demonstriert die funktionierende TLR9-Signalkaskade im Herzen. Außerdem ist dies ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von bakterieller DNA an der Entstehung der Kardiodepression während der Sepsis, da NF κ B der entscheidende Transkriptionsfaktor bei der Ausbildung der Kontraktionsschwäche im LPS induzierten Schock ist (Haudek et al., 2001), und die Signalkaskaden von TLR4 - dem Rezeptor für eine LPS-induzierte Signalkaskade - und TLR9 über NF κ B synergistisch auf die Produktion von TNF- α wirken (Yi et al., 2001).

Da inflammatorische Zytokine ihre Wirkung auf die Kontraktilität nicht nur direkt, sondern auch indirekt vermitteln können, wurde ebenfalls die Expression der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS), einem sekundären Mediator bzw. Effektor, untersucht. Von Experimenten mit humanen und murinen Kardiomyozyten ist bekannt, dass NO direkt negativ inotrop wirkt (Brady et al., 1992; Finkel et al., 1992; Flesch et al., 1999) und durch die Zytokine TNF- α und IL-1 β induziert wird (Schulz et al., 1995; Stein et al., 1996). Der signifikante Unterschied zwischen WT- und TLR9-D-Mäusen bezüglich der mRNA-Synthese von iNOS nach Stimulation mit CpG-ODN ist

ein weiterer Hinweis dafür, dass bakterielle DNA eine wichtige Bedeutung für die Myokardfunktion in der Sepsis hat. Durch die Induktion von iNOS wird vermehrt NO produziert. Dies führt über eine cGMP-abhängige Proteinkinase zur Hemmung des L-Typ-Kalzium Kanals und damit zu einer verminderten intrazellulären Kalzium Konzentration (Kinugawa et al., 1997). Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass in isolierten Kardiomyozyten die Inkubation mit 1668-Thioat nach fünf Stunden zu einer signifikanten Abnahme der Sarkomerverkürzung führt und dass dieses Phänomen TLR9 vermittelt ist (Schwederski et al., 2005).

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass bakterielle DNA über TLR9 zur Produktion proinflammatorischer, kardiodepressiver Zytokine führt und somit eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der akuten septischen Kardiomyopathie spielt. Im Gegensatz zu LPS besitzt bakterielle DNA auch wünschenswerte Effekte, die eventuell in der Sepsis, z. B. zur Behandlung der Immunparalyse durch Verhinderung der Lymphozyten Apoptose, genutzt werden können (Hörner et al., 2004; Weighardt et al., 2000). Eine ausgeprägte IL-12 Synthese, die durch CpG-DNA ausgelöst wird, könnte zu einer verbesserten Überlebensrate in der Sepsis führen (Weighardt et al., 2002).

In der nahen Zukunft ist nicht davon auszugehen, dass etablierte Behandlungskonzepte der Sepsis durch eine adjuvante Therapie zu ersetzen sind. Weiterhin werden die kausale Therapie der Sepsis, mit chirurgischer Sanierung und Antibiose, sowie die supportive Therapie zur Aufrechterhaltung der Kreislauffunktion an erster Stelle stehen. Bei der adjuvanten immunmodulierenden Therapie werden dem schon in der Praxis eingesetzten aktivierten Protein C (Xigris®) weitere Wirkstoffe folgen, denen am ehesten eine Anti-Endotoxin-Strategie zu Grunde liegen wird. Der Stellenwert einer Behandlung mit CpG-ODN oder einer Blockade der TLR9-Signalkaskade ist Gegenstand der Forschung und kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend beurteilt werden.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen eine signifikante, TLR9-abhängige Induktion der Zytokine auf mRNA- und Protein-Ebene. Zusammen mit dem Nachweis der TLR9-abhängigen nukleären Translokation von NF κ B spricht dies für die intakte TLR9-Signalkaskade im Myokard. Außerdem ist die Induktion der Zytokine und der iNOS unter Berücksichtigung der Literatur

hinsichtlich LPS und anderer Zellwandbestandteile ein wichtiger Hinweis für die Beteiligung von bakterieller DNA bei der Entstehung der septischen Kardiomyopathie. Daraus ergibt sich neben den in klinischer Erprobung befindlichen Anti-Endotoxin-Therapien eventuell eine neue Strategie zur Behandlung der Sepsis und der septischen Kardiomyopathie.

5. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Rolle des angeborenen Immunsystems für die Entstehung einer septischen Kardiomyopathie durch bakterielle DNA. Trotz therapeutischer Fortschritte ist die septische Kardiomyopathie eine lebensbedrohliche Erkrankung und die kardiale Funktion bei septischen Patienten prognosebestimmend.

Dabei wird die linksventrikuläre Dysfunktion nicht direkt durch die zu Grunde liegende Infektion ausgelöst, sondern durch eine überschießende, selbstzerstörerische Immunreaktion, die in der Produktion proinflammatorischer, kardiodepressiver Zytokine (Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-1 β) und anderer Mediatoren (induzierbare NO-Synthetase) mündet. Nachdem lange Zeit Lipopolysaccharide (LPS) im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses als Auslöser der Mediatorexplosion standen, ist seit einiger Zeit bekannt, dass auch bakterielle DNA von gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie synthetische Cytosin-Phosphat-Guanosin-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) in der Lage sind, Zytokine zu induzieren und eine Entzündungsreaktion bis hin zum septischen Schock hervorzurufen. Dabei ist von Bedeutung, dass der Toll-like Rezeptor 9 (TLR9), der primäre Mustererkennungsrezeptor für bakterielle DNA, auch im Myokard exprimiert wird.

Vergleichende Untersuchungen an Wildtyp (WT)- und TLR9-defizienten (TLR9-D)-Mäusen konnten zeigen, dass bakterielle DNA bzw. ein synthetisches Oligonukleotid (1668-Thioat) zu einer TLR9-abhängigen Aktivierung der TLR-Signalkaskade führen. Als Bestandteil der Signalkaskade unterhalb von TLR9 wurde der Transkriptionsfaktor NF κ B in der Gruppe der WT-Mäuse aktiviert, wohingegen keine Aktivitätszunahme in den TLR9-D Mäusen nachgewiesen werden konnte. Bei den WT-Mäusen war die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine (TNF, IL-1, IL-6) sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant größer als bei den TLR9-D-Mäusen. Als Hinweis für die funktionelle Relevanz der Zytokine wurde die Expression der iNOS durch reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) gemessen.

Zusammenfassend konnten unsere Daten zeigen, dass CpG-DNA zu einer Aktivierung der TLR9-Signalkaskade führt. Die Aktivierung der verschiedenen Mediatoren und Effektormoleküle ist als Ausdruck einer kardialen Inflammation zu werten. Zukünftige Untersuchungen müssen klären, inwiefern bakterielle DNA eine funktionelle Relevanz am Herzen im Sinne einer Myokarddepression besitzt.

6. Literaturverzeichnis

- Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur.J.Immunol.* 2002; 32: 1958-1968
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001; 413: 732-738
- Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science.* 1999; 285: 736-739
- Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell.* 1985a; 42: 791-798
- Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell.* 1985b; 42: 779-789
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001; 29: 1303-1310
- Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med.* 2001; 29: S109-S116
- Ashkar AA, Rosenthal KL. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. *Curr.Mol.Med.* 2002; 2: 545-556
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 1996; 87: 13-20
- Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* 1996; 14: 649-683
- Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2001; 98: 9237-9242
- Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N, Sivasubramanian N, Mann DL, Vallejo JG. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. *J.Infect.Dis.* 2001; 183: 1617-1624
- Baumgarten G, Knuefermann P, Schuhmacher G, Vervolgyi V, von Rappard J, Dreiner U, Fink K, Djoufack C, Hoeft A, Grohe C, Knowlton AA, Meyer R. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock.* 2006; 25: 43-49
- Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 1996; 24: 1125-1128

Brady AJ, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am.J.Physiol.* 1992; 263: H1963-H1966

Brunkhorst FM. Epidemiology, Economy and Practice - Results of the German Study on Prevalence by the Competence Network Sepsis (SepNet). *Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 2006; 41: 43-44

Centers for Disease Control. From the Centers for Disease Control. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987. *JAMA.* 1990; 263: 937-938

Charpentier J, Luyt CE, Fulla Y, Vinsonneau C, Cariou A, Grabar S, Dhainaut JF, Mira JP, Chiche JD. Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis. *Crit Care Med.* 2004; 32: 660-665

Cicco NA, Lindemann A, Content J, Vandenbussche P, Lubbert M, Gauss J, Mertelsmann R, Herrmann F. Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Blood.* 1990; 75: 2049-2052

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

Cunha RE, Schaer GL, Parker MM, Natanson C, Parrillo JE. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation.* 1986; 73: 637-644

Dean JL, Wait R, Mahtani KR, Sully G, Clark AR, Saklatvala J. The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol.Cell Biol.* 2001; 21: 721-730

Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood.* 1996; 87: 2095-2147

Ferreira FL, Bota DP, Bross A, Melot C, Vincent JL. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. *JAMA.* 2001; 286: 1754-1758

Finkel MS, Hoffman RA, Shen L, Oddis CV, Simmons RL, Hattler BG. Interleukin-6 (IL-6) as a mediator of stunned myocardium. *Am.J.Cardiol.* 1993; 71: 1231-1232

Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science.* 1992; 257: 387-389

Flesch M, Kilter H, Cremers B, Laufs U, Sudkamp M, Ortmann M, Muller FU, Bohm M. Effects of endotoxin on human myocardial contractility involvement of nitric oxide and peroxynitrite. *J.Am.Coll.Cardiol.* 1999; 33: 1062-1070

Giroir BP, Johnson JH, Brown T, Allen GL, Beutler B. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J.Clin.Invest.* 1992; 90: 693-698

- 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.* 2003; 171: 1393-1400
- Hallstrom S, Koidl B, Muller U, Werdan K, Schlag G. A cardiodepressant factor isolated from blood blocks Ca²⁺ current in cardiomyocytes. *Am.J.Physiol.* 1991; 260: H869-H876
- Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 2001; 164: 396-402
- Hartmann G, Krieg AM. CpG DNA and LPS induce distinct patterns of activation in human monocytes. *Gene Ther.* 1999; 6: 893-903
- Haudek SB, Spencer E, Bryant DD, White DJ, Maass D, Horton JW, Chen ZJ, Giroir BP. Overexpression of cardiac I-kappaB α prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 2001; 280: H962-H968
- Hausfater P, Garric S, Ayed SB, Rosenheim M, Bernard M, Riou B. Usefulness of procalcitonin as a marker of systemic infection in emergency department patients: a prospective study. *Clin.Infect.Dis.* 2002; 34: 895-901
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001; 410: 1099-1103
- Hayes MP, Freeman SL, Donnelly RP. IFN-gamma priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. *Cytokine.* 1995; 7: 427-435
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000; 408: 740-745
- Hörner C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth PP, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA. Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Der Anaesthesist.* 2004; 53: 10-28
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J.Immunol.* 2002; 168: 4531-4537
- Irie T, Muta T, Takeshige K. TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett.* 2000; 467: 160-164
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J.Exp.Med.* 2001; 194: 863-869

Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J.Clin.Invest.* 1995; 96: 1042-1052

Karlin S, Doerfler W, Cardon LR. Why is CpG suppressed in the genomes of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses? *J.Virol.* 1994a; 68: 2889-2897

Karlin S, Ladunga I, Blaisdell BE. Heterogeneity of genomes: measures and values. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994b; 91: 12837-12841

Kinugawa KI, Kohmoto O, Yao A, Serizawa T, Takahashi T. Cardiac inducible nitric oxide synthase negatively modulates myocardial function in cultured rat myocytes. *Am.J.Physiol.* 1997; 272: H35-H47

Klein-Gunnewiek JM, van de Leur JJ. Elevated troponin T concentrations in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2003; 29: 2317-2322

Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996; 93: 2879-2883

Knuefermann P, Nemoto S, Baumgarten G, Misra A, Sivasubramanian N, Carabello BA, Vallejo JG. Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? *Chest.* 2002a; 121: 1329-1336

Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2002b; 106: 2608-2615

Knuefermann P, Sakata Y, Baker JS, Huang CH, Sekiguchi K, Hardarson HS, Takeuchi O, Akira S, Vallejo JG. Toll-like receptor 2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation.* 2004a; 110: 3693-3698

Knuefermann P, Vallejo J, Mann DL. The role of innate immune responses in the heart in health and disease. *Trends Cardiovasc.Med.* 2004b; 14: 1-7

Kojda G, Kottenberg K. Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovasc.Res.* 1999; 41: 514-523

Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 1995; 374: 546-549

Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, Dubin AE, Nguyen C, Harris GL, McDonough PM, Glembotski CC, Palade PT, Sabbadini RA. TNF alpha receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF alpha inhibition of L-type Ca²⁺ current and Ca²⁺ transients. *FEBS Lett.* 1995; 376: 24-30

- Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML. Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation*. 1995; 92: 1866-1875
- Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J.Exp.Med*. 1996; 183: 949-958
- Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat.Immunol*. 2004; 5: 190-198
- Lehmann V, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J.Exp.Med*. 1987; 165: 657-663
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003; 31: 1250-1256
- Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J.Biol.Chem*. 1999; 274: 33419-33425
- Marshall JC. SIRS and MODS: what is their relevance to the science and practice of intensive care? *Shock*. 2000; 14: 586-589
- Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J.Immunol*. 1991; 147: 1759-1764
- Metchnikoff E. *Immunität bei Infektionskrankheiten*. Jena: Fischer Verlag, 1902
- Müller K, Ehlers S, Solbach W, Laskay T. Novel multi-probe RNase protection assay (RPA) sets for the detection of murine chemokine gene expression. *J.Immunol.Methods*. 2001; 249: 155-165
- Müller-Werdan U. Acute septic cardiomyopathy. *Internist (Berl)*. 1998; 39: 467-478
- Müller-Werdan U, Prondzinsky R, Witthaut R, Stache N, Heinroth K, Kuhn C, Schmidt H, Busch I, Werdan K. [The heart in infection and MODS (multiple organ dysfunction syndrome)]. *Wien.Klin.Wochenschr*. 1997; 109 Suppl 1: 3-24
- Müller-Werdan U, Schuster HP. Abriss der Pathophysiologie als Grundlage der Therapie. In: Werdan K, Schuster HP, Müller-Werdan U, Hrsg. *Sepsis und MODS*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2005: 23-61
- Nemoto S, Vallejo JG, Knuefermann P, Misra A, Defreitas G, Carabello BA, Mann DL. Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*. 2002; 282: H2316-H2323
- Niemer M. *Datenbuch Intensivmedizin*. Stuttgart: Fischer, 1992

Oberholzer A, Souza SM, Tschoeke SK, Oberholzer C, Abouhamze A, Pribble JP, Moldawer LL. Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock*. 2005; 23: 488-493

Ognibene FP, Parker MM, Natanson C, Shelhamer JH, Parrillo JE. Depressed left ventricular performance. Response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. *Chest*. 1988; 93: 903-910

Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello CA. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J.Clin.Invest*. 1988; 81: 1162-1172

Oral H, Dorn GW, Mann DL. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor-alpha in the adult mammalian cardiac myocyte. *J.Biol.Chem*. 1997; 272: 4836-4842

Park Y, Lee SW, Sung YC. Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway. *J.Immunol*. 2002; 168: 5-8

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

Parrillo JE. The cardiovascular pathophysiology of sepsis. *Annu.Rev.Med*. 1989; 40: 469-485

Piecyk M, Wax S, Beck AR, Kedersha N, Gupta M, Maritim B, Chen S, Gueydan C, Kruys V, Streuli M, Anderson P. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J*. 2000; 19: 4154-4163

Poeze M, Ramsay G, Gerlach H, Rubulotta F, Levy M. An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Crit Care*. 2004; 8: R409-R413

Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*. 1995; 273: 117-123

Rau B, Steinbach G, Gansauge F, Mayer JM, Grunert A, Beger HG. The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut*. 1997; 41: 832-840

Reinhart K, Wiegand-Lohnert C, Grimminger F, Kaul M, Withington S, Treacher D, Eckart J, Willatts S, Bouza C, Krausch D, Stockenhuber F, Eiselstein J, Daum L, Kempeni J. Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody-fragment, MAK 195F, in patients with sepsis and septic shock: a multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study. *Crit Care Med*. 1996; 24: 733-742

Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, Kornbluth RS, Richman DD, Carson DA, Raz E. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat.Med.* 1997; 3: 849-854

Romberg E. *Lehrbuch der Krankheiten des Herzens u. der Blutgefäße.* Stuttgart: Enke, 1921

Rychlik R, Pfeil B. Sozioökonomische Relevanz der Sepsis in Deutschland. *Gesundh okon Qual manag.* 2002; 5: 67-72

Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snyderman DR. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *JAMA.* 1997; 278: 234-240

Schottmüller W. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verh Dt Ges Inn Med.* 1914; 31: 257

Schulz R, Panas DL, Catena R, Moncada S, Olley PM, Lopaschuk GD. The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Br.J.Pharmacol.* 1995; 114: 27-34

Schuster HP. Sepsis: Toxinwirkung, Herzschädigung, Quantifizierung, supportive Therapie mit Immunglobulinen. In: Werdan K, Schuster HP., Hrsg. Darmstadt: Steinkopff, 1989: 152-153

Schuster HP, Müller-Werdan U. *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen.* Berlin Heidelberg New York: Springer, 2000

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

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

Schwederski M, Krings P, Velten M, Grohé C, Meyer R, Baumgarten G, Knüfermann P. The role of Toll-like receptor 9 in the pathogenesis of septic cardiomyopathie. *Pflugers Arch.* 2005; 449: S137

Selberg O, Hecker H, Martin M, Klos A, Bautsch W, Kohl J. Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentrations of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med.* 2000; 28: 2793-2798

Shpaer EG, Mullins JI. Selection against CpG dinucleotides in lentiviral genes: a possible role of methylation in regulation of viral expression. *Nucleic Acids Res.* 1990; 18: 5793-5797

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal.Biochem.* 1985; 150: 76-85

Society of Critical Care Medicine. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992; 20: 864-874

Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 1998; 28: 2045-2054

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

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

Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J.Immunol.* 1996; 157: 2116-2122

Stein B, Frank P, Schmitz W, Scholz H, Thoenes M. Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1996; 28: 1631-1639

Takenaka H, Maruo S, Yamamoto N, Wysocka M, Ono S, Kobayashi M, Yagita H, Okumura K, Hamaoka T, Trinchieri G, Fujiwara H. Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4. *J.Leukoc.Biol.* 1997; 61: 80-87

Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann JA, Imler JL. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2000; 97: 10520-10525

Thomas JA, Haudek SB, Koroglu T, Tsen MF, Bryant DD, White DJ, Kusewitt DF, Horton JW, Giroir BP. IRAK1 deletion disrupts cardiac Toll/IL-1 signaling and protects against contractile dysfunction. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 2003; 285: H597-H606

Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J.Am.Coll.Cardiol.* 1996; 27: 1201-1206

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 1999; 401: 811-815

Vincent JL. Update in intensive care and emergency medicine. Berlin: Springer, 1985

Vincent JL. Dear SIRS, I'm sorry to say that I don't like you.. *Crit Care Med.* 1997; 25: 372-374

Vincent JL, Gris P, Coffernils M, Leon M, Pinsky M, Reuse C, Kahn RJ. Myocardial depression characterizes the fatal course of septic shock. *Surgery.* 1992; 111: 660-667

- Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur.J.Immunol.* 2004; 34: 251-262
- Weighardt H, Feterowski C, Veit M, Rump M, Wagner H, Holzmann B. Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J.Immunol.* 2000; 165: 4537-4543
- Weighardt H, Heidecke CD, Westerholt A, Emmanuilidis K, Maier S, Veit M, Gerauer K, Matevossian E, Ulm K, Siewert JR, Holzmann B. Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. *Ann.Surg.* 2002; 235: 560-567
- Werdan K. Prophylaxe und Therapie der akuten septischen Kardiomyopathie. In: Schuster HP, Hrsg. *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen.* Berlin Heidelberg New York: Springer, 1996: 200-248
- Williams MJ, Rodriguez A, Kimbrell DA, Eldon ED. The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J.* 1997; 16: 6120-6130
- Wu AH. Increased troponin in patients with sepsis and septic shock: myocardial necrosis or reversible myocardial depression? *Intensive Care Med.* 2001; 27: 959-961
- Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol.Immunol.* 1992; 36: 983-997
- Yi AK, Chace JH, Cowdery JS, Krieg AM. IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *J.Immunol.* 1996a; 156: 558-564
- Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J.Immunol.* 1998; 160: 5898-5906
- Yi AK, Klinman DM, Martin TL, Matson S, Krieg AM. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA. Systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant-sensitive pathway. *J.Immunol.* 1996b; 157: 5394-5402
- Yi AK, Krieg AM. Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. *J.Immunol.* 1998; 161: 4493-4497
- Yi AK, Yoon JG, Hong SC, Redford TW, Krieg AM. Lipopolysaccharide and CpG DNA synergize for tumor necrosis factor-alpha production through activation of NF-kappaB. *Int.Immunol.* 2001; 13: 1391-1404

Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J.Immunol.* 1999; 163: 1-5

Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J.Immunol.* 2002; 168: 554-561

Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science.* 2004; 303: 1522-1526

7. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. A. Hoeft danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, erste Erfahrungen in der Grundlagenforschung in einer molekularbiologisch orientierten Arbeitsgruppe zu sammeln.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Pascal Knüfermann, Herrn PD Dr. med. Christian Grohé und Herrn Dr. med. Georg Baumgarten für die Bereitstellung der Laboratorien und Untersuchungsmaterialien, die vielfältige Unterstützung zu jeder Zeit der Arbeit und die gute wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Daniel Dürr, Frau Katrin Großmann und meinen Eltern danke ich für das Korrekturlesen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Britta Ueberdiek, Herrn Patrick Effertz, Herrn Dirk Böker, Herrn Markus Schwederski, Frau Hanne Bock und allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden in den wissenschaftlichen Laboren der medizinischen Poliklinik und des physiologischen Instituts, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.