

# **Die Bedeutung von CpG-Oligonukleotiden für den myokardialen Reperfusionsschaden**

**Inaugural-Dissertation**

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

Vorgelegt von  
Lina Ulrike Gölz  
aus Bonn

2009

Angefertigt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer
2. Gutachter: PD Dr. med. Georg Baumgarten

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.05.2009

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

Meiner Familie  
und  
meiner besten Freundin Claudia



## Inhaltsverzeichnis

<b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b>	<b>10</b>
<b><u>1 Einleitung</u></b>	<b>15</b>
1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen	15
1.1.1 Pathologie des Ischämie-Reperfusionsschadens	16
1.2 Kardiales Remodelling und myokardiale Präkonditionierung	20
1.3 Angeborene Immunabwehr	23
1.4 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	25
1.5 TLR9-Aktivierung und –Signaltransduktion	26
1.6 Regulation und Funktion proinflammatorischer Zytokine	31
1.7 Labordiagnostische Ermittlung kardialer Schädigungen	32
1.7.1 Troponine	33
1.8 Ziele dieser Arbeit	34

<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>35</b>
2.1	Versuchstiere und ihre Haltung	35
2.2	Entwicklung des Projektes / Versuchsprotokoll	35
2.3	In-vivo-Eingriffe	38
2.3.1	Instrumentierung Okklusion / Reperfusion	38
2.3.2	CpG-Vorbehandlung und Gruppeneinteilung	41
2.3.3	Infarzierung / Okklusion	43
2.3.4	Blutabnahme / kardiale Troponin T (cTnT)-Bestimmung	45
2.3.5	Herzfärbung	47
2.3.6	Planimetrische Auswertung	49
2.3.7	Kardiale Funktion	50
2.3.7.1	Invasive Blutdruckmessung – Herzkatheter	50
2.3.7.2	Auswertung der hämodynamischen Daten	52
2.3.7.3	Nicht-invasives Messverfahren – Echokardiographie	53
2.3.7.4	Auswertung der Ultraschalldaten	54
2.4	In-vitro-Bestimmung	55
2.4.1	Organgewichte	55
2.4.2	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay)	55
2.5	Statistik	56
2.6	Geräte und Materialien	56
2.6.1	Materialien für die Tierhaltung	56
2.6.2	Geräte und Materialien für die In-vivo-Eingriffe	57
2.6.3	Verbrauchsmaterialien	59

2.6.4	Geräte und Materialien für die In-vitro-Eingriffe	61
2.6.5	Software	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>63</b>
3.1	Tierzahlen	63
3.2.	Etablierung des Versuchsprotokolls	65
3.2.1	CpG-Vorbehandlung mit 1668-Thioat	65
3.2.2	Tierzahlen und Mortalitätsraten	66
3.2.3	Konzentrationsabhängige myokardiale Wirkung	67
3.2.4	Erste kardiale Troponin T (cTnT)-Daten	68
3.2.5	Körpergewicht und Herzparameter	70
3.2.6	Funktionelle und hämodynamische Aspekte	70
3.2.6.1	Nicht-invasives Verfahren – Echokardiographie	71
3.2.6.2	Invasive Blutdruckmessung – Herzkatheterisierung	72
3.3	Ergebnisse des etablierten Versuchsprotokolls	73
3.3.1	Planimetrisch ermittelte Infarktgrößen	73
3.3.2	Körpergewicht und Herzparameter	74
3.4	Ergebnisse der kardialen Troponin T (cTnT)-Untersuchungen	74
3.4.1	Einfluss der Vorbehandlung auf die cTnT-Konzentration	74
3.4.2	Relation cTnT und Infarktgröße	75
3.5	Blutdruckmessungen nach zwei Wochen Reperfusion	76
3.5.1	Peripherer Blutdruck	77
3.5.2	Herzfrequenz und linksventrikulärer Druck	79

3.5.3	Maximale Druckerstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeiten	81
3.5.4	Körpergewicht und Herzparameter	82
3.6	Ergebnisse der einzelnen Tiergruppen mit unterschiedlichen CpG-Sequenzen (sog. CpG-ODNs)	83
3.6.1	Vergleich unterschiedlicher CpG-ODNs	83
3.6.2	Mortalitätsraten	85
3.6.3	Körpergewicht und Morphologie der Organe	85
3.7	ELISA-Daten	86
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>90</b>
4.1	Mausmodell, Infarktmodell und Versuchsprotokolle	90
4.2.	Einfluss von TLR9 und CpG-ODN auf die Infarktgröße	94
4.3.	Herzinfarkt Diagnostik und Einfluss von CpG-ODN auf die kardiale Troponin T (cTnT)-Konzentration	98
4.4.	Expressionsanalyse – Entzündungsmediatoren	100
4.5.	Hämodynamische und funktionelle Auswirkungen einer CpG-Stimulation	102
4.6.	Abschließende Betrachtung / Ausblick	104



<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>107</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>132</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>133</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AAR	Area-at-risk
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPs	antimikrobielle Peptide
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AP-1	Aktivatorprotein-1
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
b/min	beats per minute (Schläge pro Minute)
Bax	Bcl-xL/Bcl-2-Associated Death Promoter
Bcl-2	B-cell chronic lymphatic leukaemia/lymphoma type 2
BNP	Typ B natriuretisches Peptid
BW	Körpergewicht
C3H/HeN	Labormaus-Inzuchtlinie
C3H/HeJ	Labormaus-Inzuchtlinie
C57BL/6	Labormaus-Inzuchtlinie
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	Charge Coupled Device
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CD14	cluster of differentiation-14
CK	Kreatinkinase
CK-MB	Isoenzym der Kreatinkinase (M muscle; b brain)
CNP	Typ C natriuretisches Peptid
CoA	Coenzym A

CpG	Cytidin-Phosphorsäure-Guanosin-Motiv
cTnT	kardiales Troponin T
cTnI	kardiales Troponin I
d	day
DAP	diastolischer arterieller Blutdruck
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	double stranded DNA
dsRNA	double stranded RNA
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
eIF2 $\alpha$	eukaryotic initiation factor-2 $\alpha$
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
h	hour
HBDH	Isoenzym der Laktatdehydrogenase (H heart; b brain)
H-FABP	Herz-/Skelettmuskel-Fettsäurebindungsprotein
HSP	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
sIA	Infarktareal
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B	inhibitor of kappa B
IKK	I $\kappa$ B-Kinase
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase

i.p.	intraperitoneal
IPC	Ischämische Präkonditionierung
I/R	Ischämie/Reperfusion
IRAK	IL-1 receptor associated kinase
IRF-3	interferon regulatory factor 3
IRF-5	interferon regulatory factor 5
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
Kap.	Kapitel
kD	kilo Dalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LAD	linke anteriore deszendierende Koronararterie
LBP	LPS binding protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Rezeptor
LTA	Lipoteichonsäure
LV	Linker Ventrikel
LVW	linksventrikuläres Gewicht
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MD2	myeloid differentiation 2
MG	Molekulargewicht
MHC	major histocompatibility complex
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
mm	Millimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88

n	Anzahl
NAAR	Non-area-at-risk
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-phosphat
NFκB	nuclear transcription factor κB
NK	Natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like Rezeptoren
N.N.	nomen nominandum
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
NT-pro-BNP	N-terminales pro brain natriuretic peptide
ODN	Oligodesoxynukleotide
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
O/R	Okklusion/Reperfusion
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p38	MAPK
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PBS	phosphate buffer saline
PE	Polyethylen
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
PRR	pattern recognition receptor
RAGE	Rezeptoren der "Advanced Glycation Endproducts"
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
s	Sekunde
SAP	systolischer arterieller Blutdruck
SARM	sterile α- and armadillo-motif-containing protein
SEM	Standardfehler des Mittelwerts

SOP	Scheinoperation
ssDNA	single-stranded DNA
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
ssRNA	single-stranded RNA
STAT1	signal transducer and activator of transcription 1
Tab.	Tabelle
TAK1	transforming growth factor- $\beta$ associated kinase
TIMP	tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases
TIR	Toll/IL-1 receptor domain
TIRAP	Toll/IL-1 receptor domain containing adapter protein
TL	Tibiallänge
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	TNF-receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	Toll/IL-1R-domain containing adapter inducing IFN $\beta$
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
VEGF	vascular endothelial growth factor
Wo	Wochen
WT	Wildtyp (C57BL/6 und C3H/HeN)

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie und Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen

2007 starben in Deutschland 150.472 Männer (42%) und 208.211 Frauen (58%) an den Folgen von Herz-Kreislaufkrankungen. Mit einer Rate von 43,4% sind sie damit weiterhin Todesursache Nummer 1, noch vor dem Krebsleiden (Statistisches Bundesamt, 2008). Der vermehrte prozentuale Anteil an Frauen liegt in ihrer höheren Lebenserwartung begründet, denn die Patienten mit Herz-Kreislaufproblemen waren zu 91% über 65 Jahre alt (Statistisches Bundesamt, 2008). Aber auch andere Industrieländer haben mit den Folgen dieser Erkrankungen zu kämpfen. Die USA stehen hier an erster Stelle, gefolgt von Deutschland und dem Vereinigten Königreich (OECD, 2008). Die Kosten für die Behandlung von Herz-Kreislaufkrankungen sind darüber hinaus sehr hoch. Sie beliefen sich allein in Deutschland im Jahre 2003 auf ca. 35 Milliarden Euro, und 105 Milliarden Euro hatte das Gesundheitswesen der EU insgesamt zu tragen (Leal et al., 2006).

In der vorliegenden Studie sind die koronaren bzw. ischämischen Herzkrankheiten von Relevanz. Es handelt sich hierbei um chronische Veränderungen der Herzkranzgefäße (Koronarien), die mit einer zunehmenden Einengung der Gefäße einhergehen. Ursache dessen ist in der Regel eine Verkalkung der inneren arteriellen Gefäßschicht, der sog. Intima, allgemein auch als Arteriosklerose bekannt. Gefürchtet ist die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques, die nicht selten einen Myokardinfarkt oder Apoplex zur Folge hat. Dabei liegt ein akuter Verschluss der funktionellen Endarterien (im Falle des Herzens, der Koronarien) vor, woraus eine Minderdurchblutung resultiert. Die Sauerstoff- und Substratzufuhr (z.B. Glukose) ist stark reduziert und auch der Abtransport eventuell schädlicher Metabolite wird behindert (Verdouw et al., 1998). Dabei ist eine frühzeitige Reperfusion des Myokardgewebes entscheidend für das Ausmaß der Infarktgröße (Michael et al., 1999). Dementsprechend ist eine frühzeitige Reperfusionstherapie die Behandlung der Wahl. Interessanter Weise führt jedoch auch dieser Vorgang zu einer Schädigung des

Herzens. In der Literatur wird hier von einem „Reperfusionsschaden“ gesprochen (Gottlieb et al., 1994). Es handelt sich dabei um eine reperfusionsbedingte Entzündungsreaktion, die mit der Bildung bestimmter Mediatoren, sog. Zytokine, einhergeht (Baumgarten et al., 2000). Die genauen Vorgänge werden in Kap. 1.1.1 dargelegt.

Zahlreiche Studien konnten belegen, dass bestimmte Risikofaktoren an der Entstehung einer koronaren Herzkrankheit (KHK) bzw. eines Herzinfarktes maßgeblich beteiligt sind (Cullen und Assmann, 1999; Kannel, 2002; Keil, 2000; Llyod-Jones et al., 2001; Pasternak, 2003; Rashid et al., 2003; Talbert, 2002). Dabei scheint die Differenzierung zwischen beeinflussbaren und unbeeinflussbaren Faktoren sinnvoll zu sein. Letztere sind beispielsweise das Lebensalter und Geschlecht, die Menopause, familiäre Disposition, sowie Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus und arterielle Hypertension. Zu den beeinflussbaren Risikofaktoren gehören das Rauchen, der Bewegungsmangel und das Übergewicht bedingt durch fettreiche/cholesterinreiche, unausgewogene Ernährung. Neuere Studien evaluierten darüber hinaus den Einfluss des Immunsystems (Vink et al., 2004).

### **1.1.1 Pathologie des Ischämie-Reperfusionsschadens**

Für den Erhalt des ischämischen Myokardgewebes ist eine frühzeitige Reperfusion unabdingbar. Sie hat jedoch auch Nachteile wie bereits oben kurz erwähnt. Innerhalb kürzester Zeit führt die Minderdurchblutung des Herzens zum Verbrauch der Sauerstoffvorräte. Damit kommt u. a. die ATP-Produktion ins Stocken und Metabolite sammeln sich an. Gefäße sind jedoch in der Lage sich veränderten Sauerstoffverhältnissen in gewissem Maße anzupassen. Diese Selbstregulation wird durch eine Änderung des Gefäßwiderstandes erreicht. Dabei spielen verschiedene metabolische, neurohumorale und Endothel-vermittelte Einflussfaktoren eine wichtige Rolle. Sauerstoff wirkt beispielsweise als Vasokonstriktor, so dass bei einem Mangel die Gefäße dilatieren. Wohingegen Adenosin eine gefäßerweiternde Wirkung besitzt und durch seine negativ chrono-, dromo-



und ionotropen Einflüsse den Bedarf an Sauerstoff zusätzlich vermindert. Durch eine Behinderung der Thrombozytenaggregation hat es außerdem einen antithrombolytischen Effekt. Adenosin ist ein Purinnukleosid, das u. a. im Rahmen des Abbaus von ATP entsteht. Aber auch ATP selbst, ADP, Bradykinin, Histamin und Acetylcholin sind vasodilatatorisch wirksam. Hierzu setzen sie Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Gefäßendothel frei. Dieses diffundiert daraufhin in die glatten Muskelzellen der Gefäße, wo es die Guanylcyclase-Aktivität hoch reguliert. In der Folge entsteht vermehrt zyklisches GMP (cGMP), welches die Proteinkinase C aktiviert und schließlich eine Relaxation der Gefäßmuskulatur hervorruft (Schmidt et al., 2000). Hinsichtlich neurohumoraler Faktoren sind die Katecholamine zu nennen. Über die  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren der Epikardgefäße wirken sie vasokonstriktorisch, wohingegen sie an den  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren der subendokardialen Gefäße dilatierende Effekte ausüben (Böcker et al., 2004). Diese gefäßregulierenden Mechanismen können einen Sauerstoffmangel jedoch nur über kurze Zeit kompensieren. Einem Verschluss durch atherosklerotische Plaques haben sie wenig entgegen zu setzen. Eine weitere Auswirkung der Ischämie ist die Akkumulation von Laktat und  $H^+$ -Ionen, die zu einer intrazellulären Azidose führt. Sie ist die Folge einer Kaskade biochemischer Prozesse, die mit der Hemmung der aeroben Glykolyse sowie der vermehrten Freisetzung von Fettsäuren beginnt. Letztere werden durch Katecholamine hoch reguliert, da sie die Lipolyse fördern und die  $\beta$ -Oxidation sowie den Citratzyklus hemmen. Der Anstieg an Acetyl-CoA im Zytosol und die Hemmung des Adenin-Nukleotid-Translokators zwingen das Herz, seine Energieversorgung mit Hilfe der Glykogenolyse und der anaeroben Glykolyse aufrecht zu erhalten (Klinke et al., 2005). Hierbei kommt es zur Ansammlung der Metabolite wie Laktat, NADH und Protonen, die das saure Milieu verursachen und letztlich auch zur Inhibition der anaeroben Glykolyse führen. Die zelluläre Homöostase, welche auf einem energieabhängigen Ionenaustausch basiert, geht daraufhin verloren. Demzufolge strömen  $K^+$ - und  $Mg^{2+}$ -Ionen aus und  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  in die Zelle. Ionenkanäle der Membran und die Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) führen zum intrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration (Piper et al., 2003), wodurch bestimmte Phosphatasen aktiviert werden. Sie sind in der Lage, die Phospholipidmembran zu lysieren und tragen damit zum Verlust der Zellintegrität bei. Hinzu kommt, dass die

Veränderung der Elektrolytverteilung osmotische Vorgänge in Gang setzt, die letztlich zu Ödemen führt. Auch Störungen der Proteinsynthese und -degradation sind nachweisbar. Innerhalb von Minuten sind erste Veränderungen der Ultrastruktur elektromikroskopisch erkennbar. Nach einigen Stunden erfolgt die Zerstörung der Myofibrillen. SR, Mitochondrien und Plasmamembran rupturieren. Dabei gelangen Makromoleküle in das Interstitium und aktivieren lytische Enzyme. Der Zelluntergang löst somit im weiteren Verlauf eine inflammatorische Reaktion sowie fibrotische Prozesse aus (siehe unten). Beides sind jedoch Grundvoraussetzungen und erste Schritte des kardialen Remodellings, dessen Ausmaß von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Außerdem führt die Nekrose u. a. zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Bildung freier Radikale (aktivierter Sauerstoff und Sauerstoffintermediärprodukte: „Reaktive Oxygen Spezies“ (ROS)). Auf der einen Seite initiieren ROS die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, welche durch Entzündungszellen erkannt werden und ihre Emigration ins geschädigte Gewebe ermöglichen. Auf der anderen Seite interagieren sie mit Proteinen und können zu ihrem Funktionsverlust beitragen. Der Einfluss auf weitere Moleküle wie Phospholipide, Nukleinsäuren und Kohlenhydrate kann zur Ruptur biologischer Membranen führen und damit weitere entzündliche Reaktionen induzieren oder bereits vorliegende verstärken. Letzten Endes sind es genau diese Prozesse, die wesentlich zum reperfusionsbedingten Schaden beitragen (Li und Jackson, 2002).

Die bei der Reperfusion in den Kreislauf gelangenden Chemo- und Zytokine verstärken ihrerseits die Inflammation, rekrutieren Immunzellen, können aber auch zu einer septischen Reaktionslage führen (Cain et al., 1999). Dabei sind der Zustand des Immunsystems sowie die Quantität und Qualität der Entzündungsreaktion entscheidend.

Hinsichtlich des Zelluntergangs sind zwei Formen zu differenzieren, die Nekrose und die Apoptose. Die Nekrose ist durch den Zerfall von Zellen infolge irreversibler Schäden durch endogene (z.B. Hypoxie, Ischämie) oder exogene Einwirkungen (physikalisch, chemisch, durch Krankheitserreger u. a.) gekennzeichnet. Die ischämische Nekrose ist nur im minder durchbluteten Bezirk zu finden und geht u. a. mit der Zerstörung der lysosomalen Membran und der Plasmamembran einher. Sie basiert auf dem Ausfall der Ionenpumpen, wodurch ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration,  $[Ca^{2+}]$ , und ein vermehrter Natrium-

einstrom osmotische Prozesse in Gang setzen. Ein erhöhter Wassereinstrom lässt die Zelle anschwellen und resultiert letztlich im Verlust der Zellintegrität. Diese im Vergleich zur Apoptose unkontrollierten Vorgänge führen zur Freisetzung zellulären Inhalts und induzieren damit eine inflammatorische Reaktion.

Der apoptotische Zelltod hingegen stellt eine Art „Selbstmordprogramm“ dar. Dabei kommt es nicht zu einem Verlust der Integrität und auch die Entzündungsreaktion bleibt in der Regel aus. Molekularbiologisch laufen dabei folgende Prozesse ab: Die Zelle kontrahiert allmählich ihr Zytoskelett, indem sie insbesondere Kaliumionen nach extrazellulär befördert. Gleichzeitig wird das genetische Material mit Hilfe von sog. Endonukleasen zerkleinert. Nach und nach werden Vesikel portionsgerecht abgeschnürt und von Makrophagen sowie neutrophilen Granulozyten phagozytiert. Verschiedene Stimuli können diesen programmierten Zelluntergang aktivieren. Neben fehlenden Wachstumsfaktoren und stress-induzierten Proteinen der Bcl-2-Familie sind hier freigesetzte mitochondriale proapoptotische Faktoren wie Cytochrom c zu nennen sowie der Anstieg von Protein p53. Aber auch die veränderte Membranpermeabilität und die Ligandenbindung an Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie sowie die Aktivierung unterschiedlicher Proteolyse-induzierender Effektorcaspasen können eine Apoptose einleiten (Valen, 2003; Zorov et al., 2006).

Im Grenzbereich zwischen infarziertem und nicht-infarziertem Myokard finden sich v. a. viele apoptotische Zellen (Bialik et al., 1997; MacLellan und Schneider, 1997; Palojoki et al., 2001; Saraste et al., 1997). Beide Formen des Zelltods tragen unabhängig voneinander zur Größe des Infarktes bei (Kajstura et al., 1996). Anversa et al. konnten jedoch zeigen, dass die apoptotischen Zellen mit 86% am gesamten Zellverlust einen weitaus größeren Einfluss nahmen als die nekrotischen (Anversa et al., 1998). Zumeist laufen jedoch beide Prozesse kombiniert ab.

## 1.2 Kardiales Remodelling und myokardiale Präkonditionierung

Infolge einer myokardialen Ischämie kommt es zum Remodelling. Dabei handelt es sich um einen reaktiven Prozess, der auf genetischer, molekularer, zellulärer sowie interstitieller Ebene abläuft und zum Umbau der Herzens führt, dessen Ausmaß und Progredienz ausschlaggebend für die Prognose des Patienten ist (Pfeffer und Braunwald, 1990). Inflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$ , siehe Kap. 1.6), verschiedene Zellen (Bsp. Fibroblasten), Wachstumsfaktoren (Bsp. VEGF) und spezielle Enzyme (MMPs und TIMPs) spielen bei den Umbauvorgängen eine wichtige Rolle. Ein Ungleichgewicht kann hier zur übermäßigen Kollagenbildung und damit einhergehenden ventrikulären Dysfunktionen bis hin zum Herzversagen führen. Dagegen resultiert aus einer verminderten Kollagensynthese eine ventrikuläre Dilatation und in der Folge die Ruptur der Herzwand.

Um so wichtiger war die Entdeckung, dass eine repetitive Schädigung bzw. ein wiederholter Reiz – in der Literatur als sog. Präkonditionieren bezeichnet – eine kardioprotektive Wirkung besitzt und das kardiale Remodelling nachhaltig beeinflusst. Die letzten Jahre der medizinischen Forschung haben eine Vielzahl solcher Reize, wie Virulenzfaktoren (LPS) und verschiedene Anästhetika (Isofluran) ausfindig machen können (Cason et al., 1997; Kersten et al., 1997; Zacharowski et al., 2000). Die klassische lokale ischämische Präkonditionierung (IPC) beispielsweise verringerte die anhaltenden ventrikulären Dysfunktionen post infarctem (Vanoverschelde et al., 1993). Aber auch die systemischen Effekte einer Hypoxie, Hyperoxie, Hyper- oder Hypothermie induzierten dabei immunmodulatorische Mechanismen, die eine myokardiale Protektion zur Folge hatten (Maulik und Das, 2002; Przyklenk et al., 2003; Tahep et al., 2001; Zacharowski et al., 2000; Zhao et al., 2003).

Im Folgenden soll ein kurzer Einblick in die Mechanismen der LPS-abhängigen (Endotoxintoleranz) und der ischämischen Präkonditionierung (IPC) (ischämische Toleranz) gegeben werden, da sie eine Grundlage dieser Arbeit darstellten.

Die Erkenntnisse der IPC basieren auf den Arbeiten von Murry et al. (1986) und Guo et al. (1998), die die kardioprotektive Wirkung durch IPC in der Maus zeigten. Daraufhin folgten

weitere tierexperimentelle aber auch klinische Studien. Sie demonstrierten, dass die IPC die Infarktgröße und die Arrhythmien sowie ventrikuläre Dysfunktionen nach einem Myokardinfarkt signifikant reduzierte (Kloner und Yellon, 1994; Szmagala et al., 1998; Vanoverschelde et al., 1993). Die molekularbiologischen Grundlagen dieses Prozesses sind komplex und noch nicht abschließend geklärt. Verschiedenste Mediatoren wie proinflammatorische Zytokine und anti-apoptotische Peptide (Bcl-2 und Survivin) sind hier involviert (Belosjorow et al., 2003; Hiasa et al., 2001; Maulik et al., 1999; Maulik et al., 2000). Aber auch die Herunterregulation pro-apoptotischer Peptide wie Bax, p53 und AP-1 (Maulik et al., 1999; Maulik et al., 2000; Valen, 2003) sowie die Aktivierung der ERK-Kaskade tragen maßgeblich zur Reduktion der Infarktgröße bei (Bueno et al., 2000; Ghosh et al., 2000). Andere postulierten die Beteiligung von Adenosin, Bradykinin, Katecholaminen und Acetylcholin (Cason et al., 1995). Sie sollen durch die Bindung an entsprechenden Rezeptoren die Protein Kinase C (PKC) aktivieren, wodurch ATP-sensitive  $K^+$ -Kanäle phosphoryliert werden (Cason et al., 1995). Darüber hinaus demonstrierten verschiedene Arbeitsgruppen, dass ROS, NO und HSPs ebenfalls im Rahmen der ischämischen Toleranz eine wichtige Rolle spielen (Bolli et al., 1998; Hampton et al., 2003; Otani, 2004).

Bereits 1989 wurde die kardioprotektive Wirkung von Lipopolysaccharid (LPS) entdeckt (Brown et al., 1989). Dabei handelt es sich um einen Membranbestandteil gramnegativer Bakterien (siehe auch Kap. 1.4). Brown und Mitarbeiter konnten erstmals nachweisen, dass eine einmalige LPS-Stimulation 24 Stunden vor Myokardinfarkt eine ischämische Toleranz auslöste. Zacharowski et al. bestätigten diesen Befund im Rattenmodell (Zacharowski et al., 1999). Neben der Induktion antioxidativer Enzyme ist die Inhibition der NF- $\kappa$ B-Translokation, eine reduzierte kardiale Zytokinsynthese sowie eine verminderte TNF-Plasmakonzentration an dem protektiven Effekt beteiligt (Hiasa et al., 2001; Maulik et al., 1995; Shames et al., 1998; Ziegler-Heitbrock, 1995). Des Weiteren konnte die Aktivierung von MAPKs und die Induktion einer p38- und ERK-Suppression beobachtet werden (Geppert et al., 1994; Kraatz et al., 1999; Tominaga et al., 1999). Interessanter Weise hatte auch eine TLR4-Defizienz kardioprotektive Effekte (Chong et al., 2004; Kim et al., 2007; Stapel, 2006). Über die Hintergründe der reduzierten Zytokinsynthese gibt es verschiedene

Ansätze. Einige Arbeitsgruppen führten sie auf verminderte IRAK-Aktivierung sowie MyD88- und TLR4-Proteinexpression zurück, bei gleichzeitigem Anstieg von TLR2, MD2, CD14 und LBP (Fan und Cook, 2004). Andere hingegen bezogen sie auf Veränderungen des G-Proteingehaltes, die Reduktion der Proteinkinase C, MAPK- und I $\kappa$ B-Aktivität sowie die Expressionssteigerung der Phospholipase D und Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K) (Bowling et al., 1995; Kraatz et al., 1999a; Kraatz et al., 1999b; Makhoul et al., 1998; Medvedev et al., 2000; Tominaga et al., 1999; West et al., 1997; Yoza et al., 1998). Chao et al. wiesen nach, dass eine LPS-Vorbehandlung die Funktion und Überlebensrate der Kardiomyozyten verbesserte, die einer Hypoxie und einem Serumentzug ausgesetzt waren (Chao et al., 2005). Dabei wurden u. a. die IRAK-1 aktiviert und die Myokardkontraktilität gesteigert. Außerdem wies die Arbeitsgruppe nach, dass die anti-apoptotischen Effekte auf der Signalkaskade via PI3K/Akt, ERK1/2 und IKK $\beta$  basierten.

Darüber hinaus führte eine wiederholte Lipoteichonsäure-(LTA) Gabe zum gleichen Phänomen. LTA ist ein Membranbestandteil grampositiver Bakterien (siehe auch Kap. 1.4) (Zacharowski et al., 2000).

Eine Besonderheit der Endotoxintoleranz stellt die Kreuzreaktion dar, die sog. Cross-Toleranz. Es beschreibt das Phänomen, wonach es durch LTA oder LPS-Gabe zu einer reduzierten Zytokinexpression auf den jeweils anderen Virulenzfaktor kommt (Sato et al., 2000). Die genauen Mechanismen sind noch weitestgehend unbekannt. Möglich wäre dabei die Aktivierung bestimmter Feedback-Inhibitoren, wodurch es zur Hemmung der Signaltransduktion kommt oder aber die Reduktion der Aktivität bestimmter Adaptormoleküle, die sowohl innerhalb der TLR2- als auch der TLR4-Kaskade bedeutsam sind (Lehner et al., 2001; Medzhitov et al., 1998; Yang et al., 1998; Zhang et al., 1999). Denkbar wären auch Blockaden auf transkriptioneller oder translationeller Ebene.

Beiden Toleranzformen ist die Gliederung in zwei unterschiedliche zeitliche Phasen gemeinsam (Guo et al., 1998; Ziegler-Heitbrock, 1995). Im Rahmen der ersten Phase erfolgt nach wenigen Minuten die Induktion einer ischämischen Toleranz. Sie dauert nur zwei bis drei Stunden an. In der zweiten entwickelt sich die protektive Wirkung aufgrund einer de-novo-Proteinsynthese, die einige Stunden in Anspruch nimmt und mindestens 72 Stunden andauert (Kariko et al., 2004).

### 1.3 Angeborene Immunabwehr

Die Funktion der Immunabwehr besteht darin, den Organismus vor Krankheitserregern bzw. schädlichen Einflüssen zu schützen. Dabei werden zwei fundamentale Systeme unterschieden, wobei ihre Trennung relativ zu betrachten ist, da vielfältige Interaktionen zwischen beiden existieren.

Das adaptive Immunsystem ist phylogenetisch gesehen wesentlich jünger und wird nur den Wirbeltieren zuteil. Es entwickelte sich im Verlauf von Jahrtausenden aus dem angeborenen System und basiert u. a. auf der zellulären Immunantwort, vermittelt durch T- und B-Lymphozyten. Sie ermöglichen die enorme Anpassungsfähigkeit und Spezifität dieses Systems. Anhand von Plasmazellen bzw. B- und T-Gedächtniszellen besitzt es darüber hinaus eine Gedächtnisfunktion (Hof und Dörries, 2005).

Die angeborene Immunabwehr dagegen ist genetisch determiniert, ab dem ersten Lebenstag aktiv und die erste Instanz der Abwehr (Fearon und Locksley, 1996; Hoffmann et al., 1999). Sie verteidigt den Organismus gegen eine Vielzahl von verschiedenen Pathogenen, ohne zuvor mit diesen in Kontakt getreten zu sein. Dabei bilden die äußeren und inneren Epithelien (Epi-/Dermis, Mukosa) eine natürliche mechanische Barriere. Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten und Lymphozyten) erkennen, interagieren und beseitigen die pathogenen Faktoren und spezifische antimikrobielle Proteine (AMPs) wie z. B. Defensine unterstützen diese Aufgabe. Letztere sind zu 30% in den Granula der Neutrophilen enthalten.

Zur Erkennung verschiedener Virulenzfaktoren verfügt das angeborene Immunsystem der Säugetiere über Mustererkennungsrezeptoren („Pattern Recognition Receptors“ (PRRs)). Sie sind phylogenetisch hoch konserviert und dienen der spezifischen Diskriminierung von verschiedenen pathogenen Faktoren („Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMPs)) (Medzhitov und Janeway, Jr., 2000)

Die im Rahmen dieser Studie relevante Rezeptorfamilie, und wohl wichtigste innerhalb der angeborenen Immunabwehr, sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Bisher wurden 13 verschiedene TLRs beschrieben, 11 im Menschen und 13 in Mäusen (Tab. 1) (Takeda und





	Hyualuronsäure	Wirt
	Fibrinogen	Wirt
TLR5	Flagellin	Gram-negative Bakterien
TLR6 TLR2-Corezeptor	Diacylierte Lipopeptide	Mycobakterien
TLR7	ssRNA	Non-virale und virale ssRNA
	ssRNA	Wirt
	snRNPs	Wirt
TLR8	ssRNA	Non-virale und virale ssRNA
	ssRNA	Wirt
TLR9	CpG enthaltende DNA	Bakterien
TLR10 Co-Rezeptor?	N.N.	
TLR11		Uropathogene E. coli
TLR12	N.N.	
TLR13	N.N.	

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

## 1.4 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Die Familie der Toll-like Rezeptoren ist im Rahmen der angeborenen Immunabwehr an der Erkennung mikrobieller Strukturen beteiligt (Takeda und Akira, 2003). Der Nachweis einiger PRRs in Ganzherzpräparaten und sogar auf Kardiomyozyten machte ihre Bedeutung auch im Hinblick myokardialer Erkrankungen deutlich (Baumgarten et al., 2001; Cowan et al., 2000; Frantz et al., 2001; Haudek et al., 2001; Knuefermann et al., 2008; Tavener et al., 2004). Im Fokus der letzten Jahre standen dabei v. a. die Funktionen von TLR2 und TLR4 (Chong et al., 2004; Oyama et al., 2004; Shimamoto et al., 2006; Shishido et al., 2003). Sie sind daher auch die am besten untersuchten Toll-like Rezeptoren (Akira et al., 2006; Kawai und Akira, 2006). Die einzelnen TLRs sowie ihre spezifischen Liganden können der Tab. 1 entnommen werden.

Der innerhalb dieser Studie relevante Toll-like Rezeptor 9 ist in der Lage, sowohl die bakterielle DNA von gramnegativen als auch von grampositiven Bakterien zu erkennen (Hemmi et al., 2000). Darüber hinaus wird er durch das genetische Material von verschiedenen Viren wie Herpes simplex Virus Typ 1 und 2, Adenoviren oder Zytomegalieviren aktiviert (Krug et al., 2004a; Krug et al., 2004b; Lund et al., 2003; Zhu et

al., 2007). Dabei ist der hohe Anteil an unmethylierten 2'-deoxyriboCytidin-Phosphat-Guanosin-Motiven, die von spezifischen Sequenzen flankiert werden, für die Aktivierung des Rezeptors ausschlaggebend (Bauer et al., 2001; Barton und Medzhitov, 2002; Hemmi et al., 2000; Krieg et al., 1995, Krieg, 2002; Medzhitov, 2001). CpG-Motive sind bis zu 20fach häufiger im prokaryotischen Genom vorhanden und sind zu 98% unmethyliert (Krieg et al., 1995).

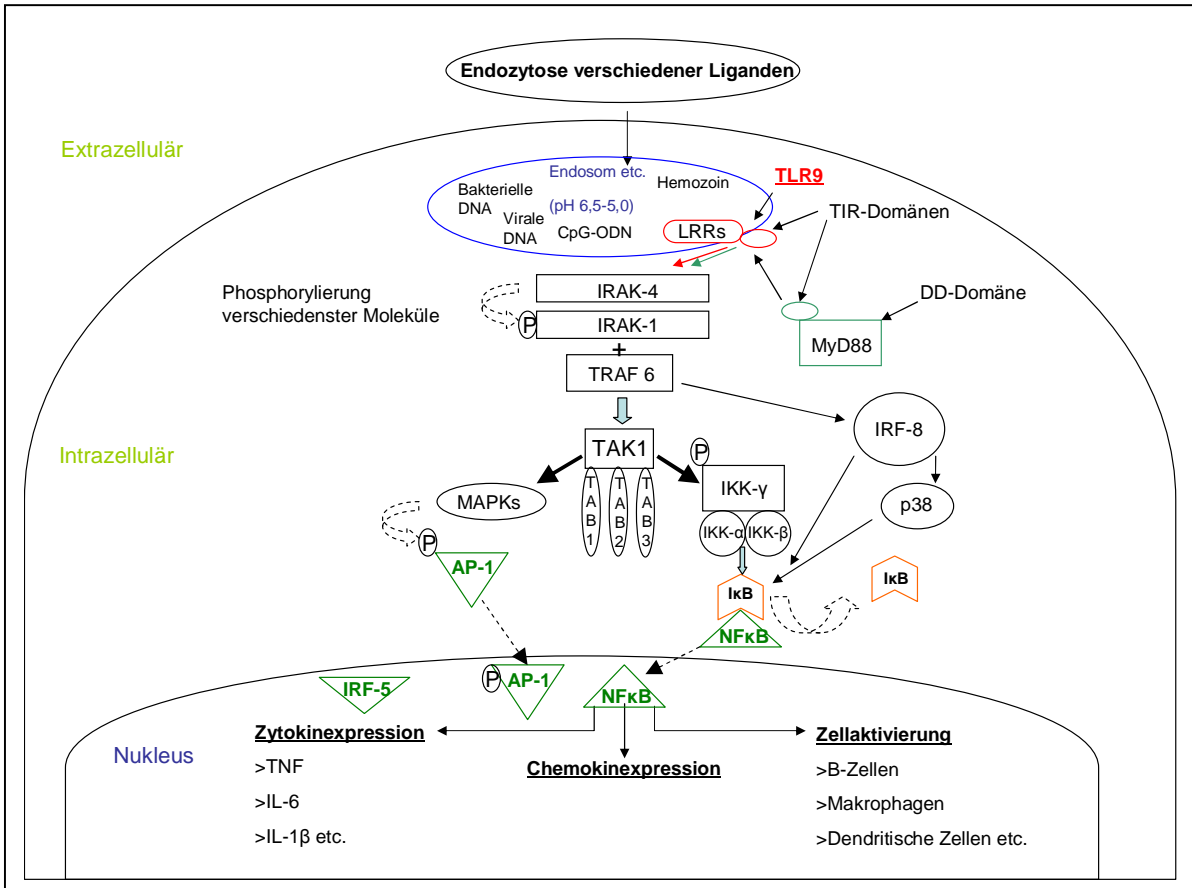
TLR7 und TLR8 werden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zur TLR9-Subfamilie gezählt (Beutler und Rehli, 2002; Chuang und Ulevitch, 2000). Sie sind in der Lage, virale sowie wirtseigene Nukleinsäuren zu detektieren, die reich an Guanosinen und Uridinen sind (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). TLR3 dagegen erkennt doppelsträngige RNA (Alexopoulou et al., 2001).

## **1.5 TLR9-Aktivierung und -Signaltransduktion**

Bisher gibt es so gut wie keine Erkenntnisse über die Bedeutung und Funktion von TLR9 im Herzen. Verschiedenste Arbeitsgruppen konnten jedoch eine konstitutive Expression dieses Rezeptors im murinen Myokard nachweisen (Boyd et al., 2006; Knuefermann et al., 2008; Rodriguez-Martinez et al., 2005).

Nach Zellaktivierung wandert der TLR9 von seinem Bildungsort, dem endoplasmatischen Retikulum, ins Endosom, wo er u. a. an die intrazelluläre Membran gekoppelt vorliegt (Ahmad-Nejad et al., 2002; Heil et al., 2003; Latz et al., 2004; Lee et al., 2003; Nishiya und Defranco, 2004). Im Gegensatz dazu liegt TLR4 zelloberflächengebunden vor. Dies entspricht der jeweiligen Erkennungsfunktion. Rezeptoren der Zelloberfläche detektieren demnach spezifisch bakterielle Produkte oder Membranbestandteile, die von Bakterien selbst oder infolge ihres Untergangs freigesetzt wurden und extrazellulär vorliegen, wohingegen TLRs, die der Erkennung viraler, bakterieller oder wirtseigener Nukleinsäuren dienen, sich intrazellulär bzw. gekoppelt an aziden Kompartimenten wie den Endosomen



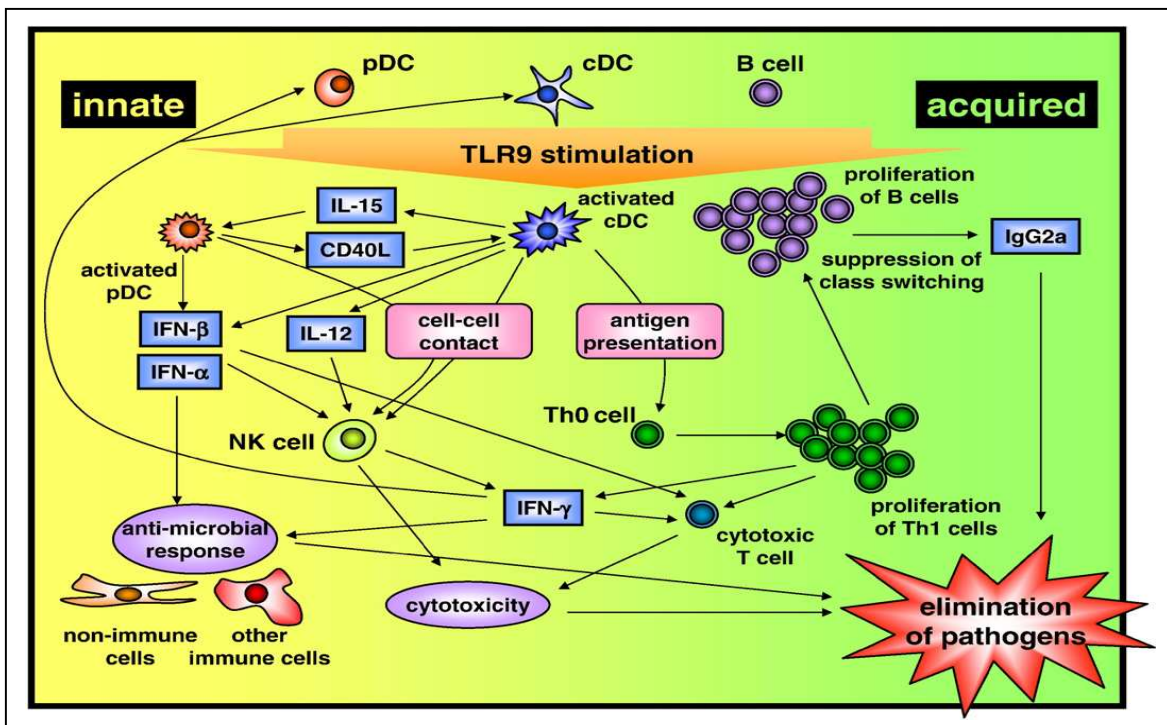


**Abb. 2: TLR9-Signaltransduktionweg basierend auf der Studie von Kumagai et al. (2008); Erklärung der Abkürzungen im Text und Abkürzungsverzeichnis.**

Anhand der Abbildung wird der Toll / Interleukin (IL)-1-Rezeptor-Signaltransduktionsweg von TLR9 verdeutlicht. Der TLR9-vermittelte Signaltransduktionsweg ist eine MyD88-abhängige Kaskade, d.h. der Myeloid-Differenzierungsfaktor 88 (MyD88) dient als Adaptorprotein. TLR9 besitzt, wie andere TLRs auch, eine Leucin-reiche (LRR) und eine Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne. Erstere beinhaltet außerdem eine kleine Cystein-reiche Domäne, die in Anzahl und Reihenfolge zwischen den verschiedenen Toll-Familien variiert (Chuang und Ulevitch, 2000). Letztere entspricht im Aufbau in etwa der IL-1 Rezeptor (IL-

1R)-Familie. Eine Ligandenbindung führt zur Aktivierung des Rezeptors, woraufhin das MyD88-Adaptorprotein aus dem Zytoplasma zur TIR-Domäne an die Endosomenmembran rekrutiert wird (Medzhitov et al., 1998). Genetische und biochemische Studien konnten zeigen, dass weitere Mitglieder der MyD88-Adaptor-Familie wie TIRAP (Toll/Interleukin-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor protein), TRIF (TIR-domain containing adaptor protein inducing interferon- $\beta$ ), TRAM (TRIF-related adaptor molecule) oder SARM (sterile  $\alpha$ - and armadillo-motif-containing protein) für die Signalkaskade via TLR9 (aber auch bei TLR7 und -8) scheinbar nicht erforderlich sind (O'Neill et al., 2003; O'Neill und Bowie, 2007). Die Mitglieder der MyD88-Adaptorfamilie besitzen ebenfalls eine TIR-Domäne, die mit der TIR-Domäne des TLR9 interagiert (Martin und Wesche, 2002; O'Neill und Bowie, 2007). Daraufhin erfolgt die Interaktion mit und Freisetzung von IRAK-1 (IL-1 receptor associated kinase) und IRAK-4. Letztere scheint für die TLR9 vermittelte Zytokinfreisetzung essenziell zu sein (Kawagoe et al., 2007) und phosphoryliert IRAK-1. Dieses wird dadurch in seiner Kinaseaktivität hoch reguliert und rekrutiert TRAF6 (TNF-receptor associated factor). Im weiteren Verlauf kommt es zur Aktivierung der TAK1 (transforming growth factor- $\beta$  associated kinase), die I $\kappa$ B des I $\kappa$ B-Komplexes (IKK) phosphoryliert, woraufhin der Nukleäre Faktor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) in den Nukleus transloziert (Wang et al., 2001). Ähnliches erfolgt nach Aktivierung der MAPK (mitogen-activated protein kinase), wodurch der Transkriptionsfaktor AP-1 phosphoryliert wird und ebenfalls in den Nukleus wandert. Beide Transkriptionsfaktoren sind für die Expression inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-12 verantwortlich. IFN-Regulationsfaktor 5 (IRF-5) scheint in dendritischen Zellen zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B erforderlich zu sein und die Produktion verschiedener Zytokine wie IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  zu regulieren (Tsujimura et al., 2004).

NF- $\kappa$ B nimmt eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von Zytokinen und Chemokinen ein. Daher weisen die Promoterregionen der meisten inflammatorischen Zytokine und Chemokine eine Bindungsstelle für dieses Protein auf (Baldassare et al., 1999; Burns et al., 1998; Cario et al., 2000; Hultmark, 1994; O'Neill und Greene, 1998; Takeuchi et al., 2000; Wesche et al., 1997; Yoshidome et al., 1999). Dies mag auch der Grund dafür sein, dass der NF $\kappa$ B-Signalweg im Mittelpunkt der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze steht (Karin et al., 2004).



**Abb. 3: Überblick über die TLR9-abhängigen Zellaktivierungen und Interaktionen (Kumagai et al., 2008); Abkürzungen im Text bzw. im Abkürzungsverzeichnis.**

Abbildung 3 verdeutlicht die interaktive Funktion von TLR9 zwischen den beiden Immunsystemen und gibt einen Einblick in die vielfältigen Effekte einer CpG-Stimulation. So führt sie beispielsweise zur Aktivierung von Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen (DC), B- und T-Lymphozyten sowie Kardiomyozyten, die daraufhin vermehrt Interleukine (IL-1, IL-6 und IL-12), Tumor-nekrose factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferone (IFN- $\alpha$  und - $\beta$ ), B7-1 und B7-2 kostimulatorische Moleküle und Major histocompatibility complex (MHC) class2-Moleküle exprimieren (Hartmann et al., 2003; Jakob et al., 1999; Knuefermann et al., 2008; Krieg und Davis, 2001; Krug et al., 2001; Stacey et al., 1996; Sparwasser et al., 1997b). Die Zytokinproduktion aktiviert wiederum die natürlichen Killerzellen (NK) und fördert so außerdem die Sekretion von Interferon- $\gamma$  (Ballas et al., 1996; Kawarada et al., 2001).

## 1.6 Regulation und Funktion proinflammatorischer Zytokine

Wie bereits in Kapitel 1.5 erwähnt induzieren die aktivierten Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B bzw. AP-1 u. a. eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Virulenzfaktoren wie LPS, bakterielle DNA bzw. CpG-DNA oder –ODNs, aber auch eine Druckbelastung des Herzens oder eine Ischämie zur kardialen Expression von TNF, IL-6 und IL-1 $\beta$  führten (Baumgarten et al., 2001; Baumgarten 2002; Belosjorow et al., 1999; Dibbs et al., 1999; Knuefermann et al., 2008; Muller-Werdan et al., 1998; Werdan und Muller-Werdan, 1996).

Der Tumornekrosefaktor (TNF) wird als eines der ersten Zytokine bei einer lokalen Entzündungsreaktion freigesetzt und zeichnet sich durch vielfältige Eigenschaften aus. So verstärkt er die Synthese von Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und reguliert die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) im Herzen. NO beeinflusst wiederum die Synthese von TNF in Kardiomyozyten (Kalra et al., 2000). Über die Koordination weiterer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und IL-6 lenkt es indirekt die Prozesse des kardialen Remodellings. TNF scheint außerdem im Hinblick auf kardiologische Erkrankungen von besonderer Relevanz zu sein (Bozkurt et al., 1998; Kubota et al., 1997; Levine et al., 1990; Torre-Amione et al., 1995; Torre-Amione et al., 1996). Studien konnten zeigen, dass sowohl TNF als auch IL-1 $\beta$  einen wesentlichen Einfluss in der Pathogenese von Sepsis und I/R induzierter Kardiodepression besitzen (Cain et al., 1999; Schulz et al., 2004). IL-1 $\beta$  ist des Weiteren in der Lage, eine Signalkaskade zu induzieren, die im Wesentlichen derjenigen der TLR4-Transduktion entspricht und ähnelt in seiner biologischen Aktivität der von TNF. Auch seine Induktion durch I/R und Endotoxine konnte in verschiedenen Studien demonstriert werden (Baumgarten et al., 2001; Nian et al., 2004). Die Funktionen beider Zytokine sind teilweise ambivalent. So können sie zum einen myokardiale Dysfunktionen bis hin zum linksventrikulären Pumpversagen auslösen und spielen auch im Rahmen der Sepsis eine entscheidende Rolle (Cain et al., 1999; Kumar et al., 1996; Parker et al., 1984; Werdan und Muller-Werdan, 1996). Zum anderen rufen sie adaptive Prozesse hervor, die letztlich zum Funktionserhalt beitragen können (Baumgarten et al., 2000). Eine Vorbehandlung mit

diesen Zytokinen selbst, hatte ebenfalls protektive Effekte zur Folge (Belosjorow et al., 1999; Hiasa et al., 2001; Shames et al., 1998). Für TNF konnte darüber hinaus ein Schutz gegen ischämische Einflüsse bei Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Eddy et al., 1992; Kurrelmeyer et al., 2000; Nakano et al., 1998). Dagegen führt eine TNF-Überexpression zu pro-apoptotischen Effekten, indem es entsprechende Gene aktiviert (Bajaj und Sharma, 2006; Chen und Tu, 2002; Kubota et al., 2001).

IL-6 dagegen beeinflusst das kardiovaskuläre System auf andere Weise. Seine Expression führt zur Bildung von ICAM-1 auf der Zelloberfläche von Myozyten. Es handelt sich hierbei um ein Adhäsionsmolekül, das es neutrophilen Granulozyten ermöglicht, ins Gewebe einzuwandern und in der Folge die Kardiomyozyten zu schädigen. Dies geschieht zum einen durch die Freisetzung freier Radikale (ROS) und die Degranulation von Enzymen wie Proteasen und Elastasen. Zum anderen kommt es zur Sekretion bestimmter Faktoren, die die Thrombozyten aktivieren sowie zur Freisetzung verschiedener Arachidonsäuremetabolite (Gwechenberger et al., 1999).

## **1.7 Labordiagnostische Ermittlung kardialer Schädigungen**

Täglich werden in Deutschland bis zu 10.000 Patienten mit Verdacht auf Herzinfarkt ins Krankenhaus eingeliefert. Davon haben letztlich nur 100 tatsächlich einen Infarkt. Im klinischen Alltag hat sich neben anamnestischen, körperlichen und non-invasiven Untersuchungsverfahren (Gibbons et al., 2004) die Verwendung labordiagnostischer Parameter etabliert. Letztere zeichnen sich durch geringere Kosten und einfache Handhabung aus. Gerade in den letzten Jahren vollzog sich in diesem Bereich ein enormer Wandel. Bis dato gängige Enzymmarker des Infarktes wie Kreatinkinase (CK), Laktatdehydrogenase (LDH), LDH-1 (=HBDH), GPT (ALAT) und GOT (ASAT) wurden durch die kardialen Troponine T und I sowie CK-MB ersetzt. Aufgrund der überlegenen Spezifität der kardialen Troponine und der CK-MB, ist die Diagnose der oben aufgeführten Enzyme und ihrer Aktivitäten überflüssig geworden (Dörner, 2006).



### 1.7.1 Troponine

Im Rahmen dieser Studie erfolgte neben der planimetrischen Vermessung der Infarktgröße die Detektion kardialer Troponinplasmakonzentrationen. Es handelt sich bei den Troponinen um Strukturproteine, die als Komplex zusammen mit Aktin, Myosin und Tropomyosin in der quergestreiften Muskulatur wie Herz- und Skelettmuskel vorliegen. Dieser Komplex besteht aus drei Untereinheiten, Troponin C, T und I. Troponin C (MG 18 kD) kommt die Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  zu, Troponin T (MG 39,7 kD) verankert den Komplex am Tropomyosin und Troponin I (MG 22,5 kD) hemmt die Kontraktion in der Ruhephase. Bei Erregung der Muskulatur kommt es zu einem intrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration. Die Bindung eines  $\text{Ca}^{2+}$  löst eine Konformationsänderung des Komplexes aus, welche die Interaktion zwischen Aktin und Myosin und somit die Muskelkontraktion ermöglicht.

Die beiden Untereinheiten Troponin T und I haben eine besondere Bedeutung in der Infarkt Diagnostik. Es existieren jeweils drei Isoformen: ein Herzmuskeltyp, ein langsamer Skelettmuskeltyp und ein schneller Skelettmuskeltyp.

Die kardialen Troponine T (cTnT) und I (cTnI) werden bei einer Schädigung des Herzens vermehrt freigesetzt und gelangen ins Blut. Dort sind sie bis zu zwei Wochen nachweisbar, da der Abbau des kontraktiven Systems (Sarkomer/Troponinkomplex) ihr diagnostisches Fenster (3 h bis 2 Wo) verlängert (Katus et al., 1991; Remppis et al., 1994). Im Vergleich hierzu besitzen Myoglobin und Kreatinkinase in den ersten drei Stunden ihren höchsten diagnostischen Wert und sind daher im Rahmen der Frühdiagnose eines akuten Myokardinfarktes sowie eines Reinfarktes relevant (Deutsche Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin). Neben dem Zeitfaktor zeichnen sich Troponinmessungen jedoch auch durch ihre hohe Spezifität und Sensitivität aus und werden v. a. beim klinisch fraglichen Myokardinfarkt herangezogen (Deutsche Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin).

## **1.8 Ziele der Arbeit**

Ziel des Projektes war es, die Bedeutung des TLR9 für den myokardialen Ischämie/Reperfusionsschaden zu evaluieren. Dazu sollten die Effekte einer CpG-ODN-Vorbehandlung im Myokard untersucht und mögliche Gemeinsamkeiten zu anderen Vorbehandlungen ermittelt werden. Hierzu wurden die Auswirkungen auf die Infarktgröße mit Hilfe histologischer Färbemethoden analysiert und eine Messung der kardialen Troponin T-Plasmakonzentration vorgenommen. Weiterhin wurde die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine gemessen und zu diesen Daten in Beziehung gesetzt, um deren Bedeutung hinsichtlich der kardialen Effekte zu erfassen.

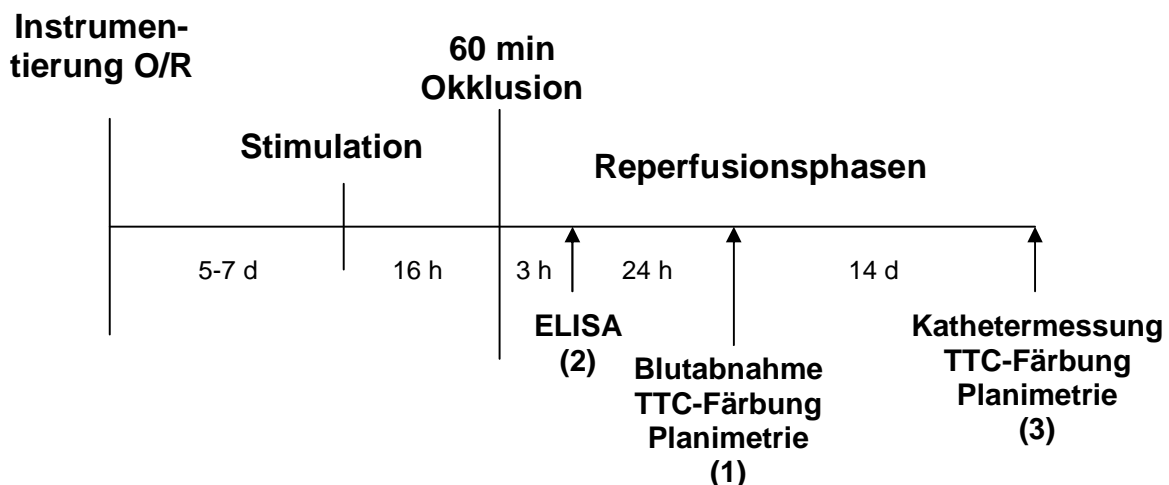
## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere und ihre Haltung

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um männliche Mäuse der Inzuchtlinie C57BL/6 aus der institutseigenen Zucht. Die artgerechte Aufzucht und Haltung erfolgte in transparenten (365 x 207 x 140 mm) großen Polycarbonat-Käfigen, bei einer Raumtemperatur von 20 bis 22°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus. Altromin-Tiereinstreu-Granulat wurde zur Käfigausstattung verwendet und sowohl Wasser als auch Futter (Altromin Standarddiät Maus und Ratte) waren ad libitum verfügbar. Mit vier Wochen wurden die Tiere abgesetzt, nach Geschlecht getrennt und in Gruppen von je fünf pro Käfig unter den beschriebenen Bedingungen aufgezogen. Die Versuche an den Mäusen waren durch die Bezirksregierung Köln genehmigt worden (Aktenzeichen 50.203.2-BN 4334/04).

Die männlichen C57BL/6 waren bei dem operativen Eingriff zwischen acht und zwölf Wochen alt und besaßen ein Körpergewicht von 20 bis 25 g.

### 2.2 Entwicklung des Projektes / Versuchsprotokolle



**Abb. 4: Versuchsprotokolle im Überblick.**

(1) Die 8-12 Wochen alten Mäuse wurden alle einem operativen Eingriff unterzogen, mit dem Ziel das Hauptversorgungsgefäß des linken Ventrikels, auch als „left anterior descending coronary artery“ bzw. linke Koronararterie (LAD) bezeichnet, temporär zu okkludieren. Hierfür gibt es zwei verschiedene Methoden. Die erste, das sog. „open-chest“-Modell, wurde 1995 von Michael et al. entwickelt (Michael et al., 1995). Dabei erfolgt Initialoperation und I/R-Protokoll kurz nacheinander, wodurch die rein I/R-bedingte Inflamationsreaktion nicht von der des operativen Traumas abgrenzbar ist. Nossuli et al. etablierten daher im Jahre 2000 das „closed-chest“-Tiermodell (Nossuli et al., 2000). Im Unterschied zu dem Modell von Michael et al. ließen sie die Tiere nach der Implantation eines Fadens um die LAD einige Tage (7-10 d) ruhen, um den Einfluss der Initialoperation zu minimieren (Nossuli et al., 2000).

In dieser Studie kam das „closed-chest“-Modell zur Anwendung. Nach der Initialoperation folgte eine Erholungsphase von 5-7 Tagen bis die Infarzierung (sprich Okklusion der LAD) durchgeführt wurde. 16 Stunden zuvor erhielten die Tiere jeweils ihre Stimulantien (siehe Gruppeneinteilung Kap. 2.3.2 und Abb. 4). Die Okklusionszeit betrug 60 Minuten, gefolgt von einer 24-stündigen Reperfusion. Dies basierte auf den Studien von Michael et al. und Guo et al., wonach die Infarktgröße proportional mit der Okklusionsdauer und der folgenden Reperfusion stieg (Guo et al., 1998; Michael et al., 1995). Des Weiteren wurden die Auswirkungen einer CpG-Vorbehandlung auf die Infarktgröße untersucht, wobei die LPS-Studien unserer Arbeitsgruppe als Grundlage dienten (Kim et al 2007; Stapel et al., 2006). In Anlehnung an die Arbeiten von Metzler et al., die bereits den engen Zusammenhang von Infarktgröße und Troponin T-Konzentration demonstrieren konnten, wurde zusätzlich die Auswirkung der CpG-Vorbehandlung und der Infarzierung auf die Troponin T-Konzentration im Blut der Tiere untersucht (Metzler et al., 2002) (Gruppeneinteilung siehe Kap 2.3.2).

(2) Im Falle der Proteinbestimmung (ELISA) wurde eine 3-stündige Reperfusionsphase gewählt. Der zeitliche Verlauf der Zytokinexpression war hier entscheidend, da er einem schnellen Anstieg und Abfall unterzogen ist (Knuefermann et al., 2008). Die Tiere erhielten

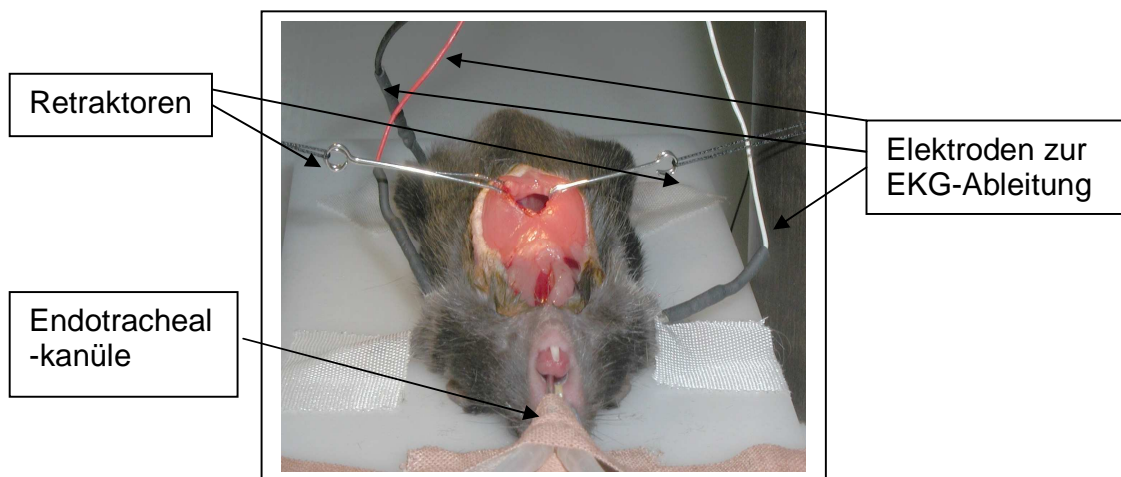
unterschiedliche CpG-ODNs (Thioate) (siehe Gruppe 1b, 3b, 6b und 7b Kap. 2.3.2) und es wurde eine „scheinoperierte“ Versuchsreihe hinzugefügt (Gruppen 8 – 11 Kap. 2.3.2).

(3) Hinsichtlich der Hämodynamik wurde versucht, die Ejektionsfraktion (EF%) mittels Echokardiographie und die invasive Blutdruckmessung mit Hilfe eines 1,4-Fr. (French)-Millar-Katheters noch vor der Blutabnahme (siehe Kap. 2.3.8 und 2.3.7) und der Herzfärbung (siehe Kap. 2.3.5) durchzuführen. Diese Mehrfachbelastung durch Anästhesie und invasive Ereignisse steigerte die Mortalität jedoch rapide, so dass nur für wenige Tiere alle Parameter erhoben werden konnten. Die Daten werden daher in dieser Arbeit nur kurz zusammengefasst (Kap. 3.2.6). Vielmehr wurde eine neue Reihe etabliert, bei der die Tiere erst zwei Wochen nach I/R mit dem Millar-Katheter hämodynamisch untersucht wurden (Kap. 3.5, vgl. Abb 4). Die Färbung des Herzens (siehe Kap. 2.3.5) konnte mühelos im Anschluss erfolgen. Eine erneute kardiale Troponin T (cTnT)-Bestimmung entfiel, da der Nachweis einer Relation zwischen Infarktgröße und cTnT bereits in der Serie 24 h nach Infarkt erhoben wurde (Kap. 3.4). Hinzu kommt, dass eine Detektion von kardialem Troponin T 14 Tage nach Myokardinfarkt fraglich ist (diagnostisches Fenster 2 h bis 14 Tage). Der Zeitpunkt von 2 Wochen sollte zusätzlich einen Einblick in die strukturellen Veränderungen nach einer 60-minütigen Ischämie aufzeigen. Wie eingangs erwähnt führt die Ischämie zu Veränderungen sowohl im infarzierten als auch im nichtinfarzierten Myokardgewebe. Das geschädigte Gebiet wird kontinuierlich durch kollagenes Gewebe ersetzt und nach ca. sechs Wochen ist das Infarktgebiet vernarbt. Das Herz, als funktionelles Synzytium, verliert somit seine Integrität. Kardiale Dysfunktionen (beispielsweise im Rahmen der kompensatorischen Hypertrophie), Arrhythmien und Dilatation bis hin zur Ruptur können die Folgen sein (siehe auch Kap. 1.1.1 bzw. 1.2).

## 2.3 In-vivo-Eingriffe

### 2.3.1 Instrumentierung Okklusion-Reperfusion

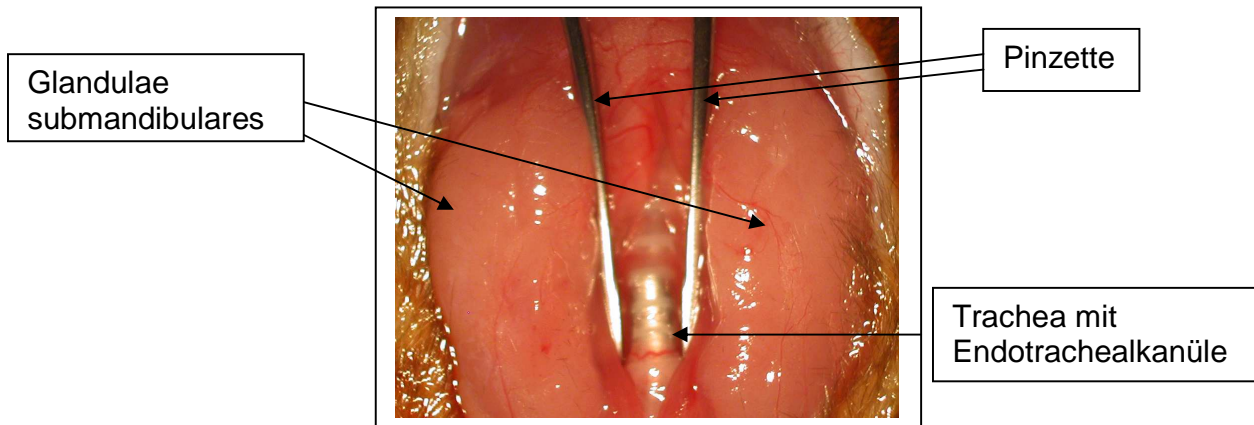
Nachdem die Maus gewogen und in eine Inhalationsbox gesetzt wurde, erfolgte die Einleitung der Narkose mit 2 Vol.% Isofluran und einem O<sub>2</sub>-Frischgasfluss von 1 l/min. Daraufhin wurde das Tier auf einem temperierten Operationstisch (37°C) in Rückenlage fixiert und bis zur Intubation mittels Nasenkonus weiter anästhesiert (siehe Abb. 5).



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

Nach einer thorakalen Rasur und der Desinfektion mit Betaisodona-Lösung wurde ein medianer Hautschnitt von submental bis auf Höhe des Xiphoids gesetzt. Zur Intubation wurden dann die beiden subkutan liegenden Speicheldrüsenlappen median stumpf getrennt und unter stereomikroskopischer Sicht (ZEISS Mikroskop; die genauen Beschreibungen der Materialien und Geräte finden sich in Kapitel 2.6) bei 6-facher Vergrößerung erfolgte die Separation der prätrachealen Muskulatur. Mittels Beatmungsgerät (MiniVent) und eingeführter Endotrachealkanüle erhielten die Tiere ein Atemzugvolumen von ca. 200 µl bei einer Atemfrequenz von ca. 110 Atemzügen pro Minute, entsprechend der physiologischen Parameter einer Maus (siehe Abb. 6).

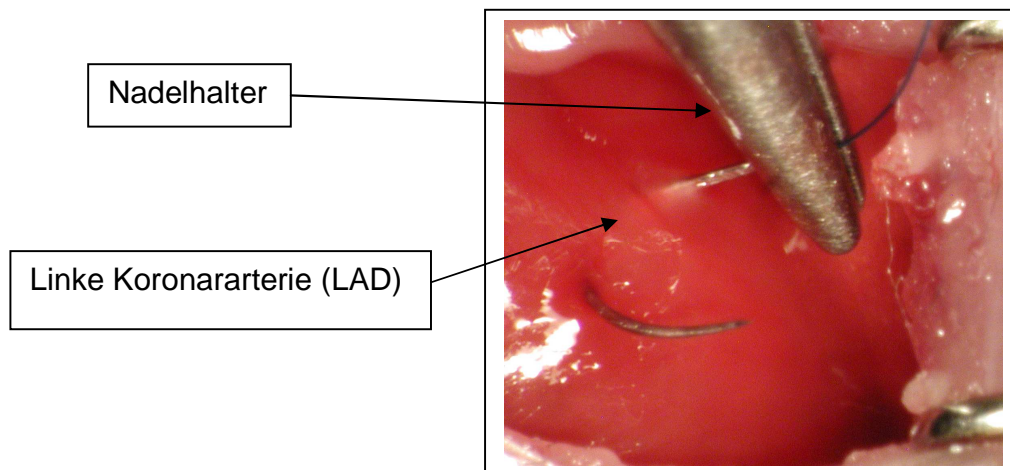
Die Endotrachealkanüle wurde am OP-Tisch fixiert, um ein Herausrutschen zu verhindern (Abb. 5).



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

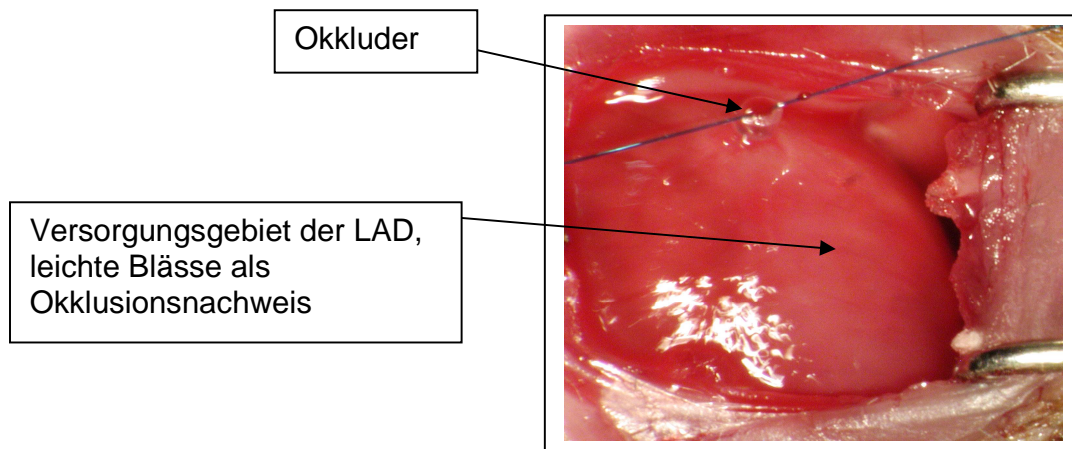
Zur Eröffnung des Thorax wurden die Rippen 3 bis 5 sowie die jeweiligen Intercostalräume links parasternal durchtrennt. Dabei musste besonders auf die Arteria mammaria Rücksicht genommen werden, da ihre Verletzung zu starken Blutungen führen kann (siehe auch Kap. 3.1 und Tab. 2 Todesfälle bei Instrumentierung). Mittels zweier Retraktoren konnten die Wundränder und, sofern vorhanden, Thymuslappen nach lateral verschoben und fixiert werden (siehe Abb. 5). Das Perikard wurde vorsichtig durchtrennt, um eine ausreichende Sicht zu erhalten. Unter 16-facher Vergrößerung wurde nun die linke Koronararterie (LAD), ca. 1-3 mm von der Spitze des linken Aurikels entfernt, mit Hilfe einer U-förmig gebogenen Nadel und eines monofilen Fadens umstoichen (Abb. 7). Die Fadenenden wurden durch ein 0,5 mm langes Stück eines PE-10 Schlauches, der als Okkluder diente, geschoben. Dieser ermöglichte eine Kompression der LAD, ohne diese zu verletzen. Zur Kontrolle der korrekten Position wurde eine kurze Okklusion provoziert, die zur sichtbaren Blässe distal des Okkluders führen sollte (Abb. 8). Nun wurde je ein Fadenende mit Hilfe einer Nadel (Kalt-Nadel, Größe 3) durch den 2. und 4. Intercostalraum nach außen verlegt. Die Enden wurden so miteinander verknotet, dass eine lockere Schlaufe entstand, die zum schnellen wieder Auffinden in einer Hauttasche deponiert wurde. Anschließend konnte der Thorax bei

6-facher Vergrößerung mit einem monofilen Faden der Stärke 6-0 durch ca. drei interkostale Situationsnähte geschlossen werden. Die Haut wurde mit einer fortlaufenden Naht der Stärke 6-0 (monofilen Prolene-Faden) verschlossen und das Tier erhielt einen Bolus von 0,1 ml Temgesic-NaCl (0,0015 mg/Tier; Temgesic®, Ampullen, Injektionslösung 0,3 mg/ml Buprenorphinhydrochlorid, Fa. Essex Pharma GmbH, München) zur postoperativen Schmerztherapie. Nach dem Wiedereinsetzen einer regelmäßigen Spontanatmung und der Schutzreflexe wurde die Maus extubiert und unter einer Wärmelampe bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose überwacht und mit reinem Sauerstoff über den Nasenkonus versorgt.



**Abb. 7: Umstechung der linken Koronararterie am Herzen einer Maus unter 16-facher Vergrößerung (Stapel, 2006).**





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

### 2.3.2. CpG-Vorbehandlung und Gruppeneinteilung

Die Tiere erhielten 16 Stunden vor der Okklusion/Infarzierung zunächst 50  $\mu$ l D-Galaktosamin (= 20 mg), um den Abbau der unmethylierten Cytosinphosphat-Guanosin-Oligonukleotide (CpG-ODN) in der Leber zu verhindern (Hemmi et al., 2000). Eine halbe Stunde später erfolgte eine weitere intraperitoneale Injektion von 100  $\mu$ l PBS (Kontrollgruppe 1) oder 100  $\mu$ l CpG-ODN (1668-Thioat, 5-TCC-ATG-ACG-TTC-CTG-ATG-CT-3', Gruppen 2-5) in unterschiedlicher Konzentration. Es handelte sich hierbei um eine Sequenz mit immunstimulatorischer Wirkung. Dagegen erhielten die Gruppen 6 und 10 eine immunsuppressive Sequenz (100  $\mu$ l à 5 nmol H154-Thioat, 5-CCT-CAA-GCT-TGA-GGG-G-3') und die Gruppen 7 und 11 ein neutrales CpG-ODN (100  $\mu$ l à 5 nmol 1612-Thioat, 5-GCT-AGA-TGT-TAG-CGT-3'). Nach Angaben der Hersteller waren die Oligonukleotide frei von Endotoxinen. Darüber hinaus konnten verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander kein Indiz für eine LPS-Kontamination finden (Bartz et al., 2006; Hacker et al., 2000; Kranzer et al., 2000).

Die Einteilung der Gruppen basierte auf der oben dargelegten Stimulation:

- **Gruppe 1:** Gabe von PBS als Kontrollgruppe, 24 h Reperfusion
- **Gruppe 2:** Gabe von 1 nmol 1668-Thioat, 24 h Reperfusion
- **Gruppe 3:** Gabe von 5 nmol 1668-Thioat, 24 h Reperfusion
- **Gruppe 4:** Gabe von 10 nmol 1668-Thioat, 24 h Reperfusion
- **Gruppe 5:** Gabe von 20 nmol 1668-Thioat, 24 h Reperfusion
  
- **Gruppe 6:** Gabe von 5 nmol 1612-Thioat, 24 h Reperfusion
- **Gruppe 7:** Gabe von 5 nmol H154-Thioat, 24 h Reperfusion

Im Rahmen der molekularbiologischen Untersuchungen (in-vitro) wurden des Weiteren vier „Sham“-Gruppen etabliert (Gruppe 8-11). Es handelte sich dabei um sogenannte „scheinoperierte“ (SOP) Tiere, die dem gleichen Versuchsprotokoll mit Initialoperation und entsprechender Vorbehandlung (siehe Kap. 2.3.1 und 2.3.2) unterlagen, mit dem Unterschied, dass keine Okklusion der linken Koronararterie stattfand, sondern lediglich eine Propofol-Narkose und die Eröffnung der Hautnaht (Abb. 9). Darüber hinaus wurden sie zusammen mit den Gruppen 1b, 3b, 6b und 7b statt 24 nur drei Stunden reperfundiert.

- **Gruppe 1b:** Gabe von PBS, 3 h Reperfusion
- **Gruppe 3b:** Gabe von 1668-Thioat (5 nmol), 3 h Reperfusion
- **Gruppe 6b:** Gabe von 1612-Thioat (5 nmol), 3 h Reperfusion
- **Gruppe 7b:** Gabe von H154-Thioat (5 nmol), 3 h Reperfusion
  
- **Gruppe 8:** Gabe von PBS, 3 h Reperfusion, schein-operiert
- **Gruppe 9:** Gabe von 1668-Thioat (5 nmol), 3 h Reperfusion, schein-operiert
- **Gruppe 10:** Gabe von H154-Thioat (5 nmol), 3 h Reperfusion, schein-operiert
- **Gruppe 11:** Gabe von 1612-Thioat (5 nmol), 3 h Reperfusion, schein-operiert

Außerdem wurde ein weiteres Protokoll mit einer Reperfusionphase von zwei Wochen angelegt, um weitere Informationen zur Hämodynamik und eventuelle Unterschiede in Bezug auf die Herzfärbung zu erhalten (siehe Kap. 2.2. und 2.3.7).

- **Gruppe 12:** Gabe von PBS, 2 Wochen Reperfusion
- **Gruppe 13:** Gabe von 1668-Thioat (5 nmol), 2 Wochen Reperfusion

### 2.3.3 Infarzierung / Okklusion

Vor Infarzierung bekamen die Tiere eine einleitende 1% Propofol-Dosis von 0,2 ml (2 mg) intraperitoneal gespritzt. Bei Bedarf wurde Propofol für die Dauer der Ischämie (60 min) wiederholt injiziert. Die Spontanatmung von Raumluft blieb dabei erhalten, so dass eine Intubation nicht nötig war. Isofluran eignete sich aufgrund seines präkonditionierenden Effektes hier nicht (Cason et al., 1997; Ludwig et al., 2004). Es fand jedoch Verwendung bei der Initialoperation, da die präkonditionierende Wirkung maximal 72 Stunden andauert und das schnelle An- und Abfluten des volativen Inhalationsnarkotikum, gerade bei der Operation, von Vorteil war. Hinzu kommt, dass keine Metabolisierung stattfand, sondern der Wirkungsverlust erfolgte allein durch die Abatmung. Propofol hingegen zeigte bisher keine eindeutigen Hinweise auf eine präkonditionierende Wirkung und hat den Vorzug mehrmals injiziert werden zu können bei gleichzeitig guter Verträglichkeit (Cope et al., 1997; Kato und Foex, 2002; Ko et al., 1997; Kokita et al., 1998).

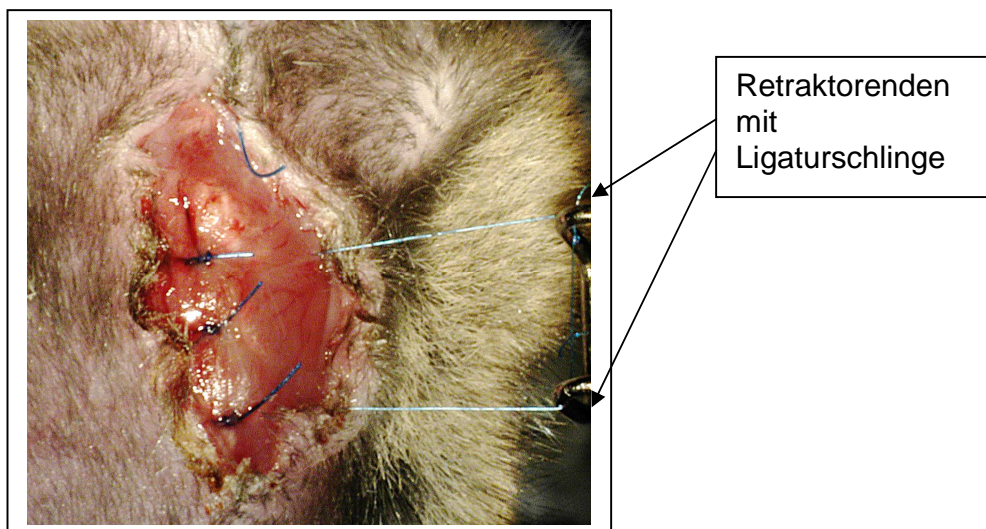
Zur bipolaren Extremitätenableitung II nach Einthoven wurden drei Elektroden subkutan in die Vorderextremitäten sowie die linke Hinterpfote positioniert (siehe Abb. 5).

Zur Konstanthaltung der Körpertemperatur auf 37°C wurde eine Temperatursonde rektal eingeführt und geerdet. Die Sonde war mit einem Temperaturregler gekoppelt, der bei Unterschreiten der Soll-Temperatur von 37°C automatisch eine Wärmelampe hinzuschaltete. Dies war insofern von Bedeutung, als dass eine Temperatursenkung

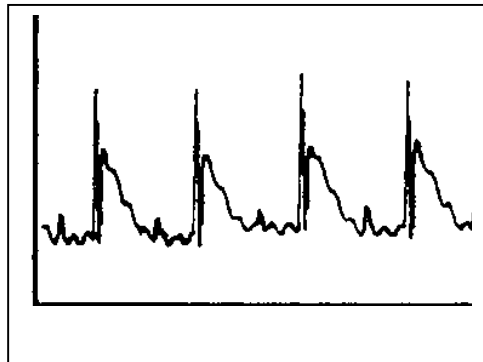
ebenfalls einen präkonditionierenden Einfluss auf die Infarktgröße hat (Chien et al., 1994; Duncker et al., 1996; Hale et al., 1997; Hale und Kloner, 1997; Khaliulin et al., 2007).

Mit Hilfe der angeschlossenen Elektroden an ein Power Lab Data Acquisition System (ADInstruments, Castle Hill, Australien) und der dazugehörigen Software (Chart for Windows 4.2) konnten die Daten elektrokardiographisch aufgezeichnet und überwacht werden.

Die Hautnaht wurde nun so weit eröffnet, dass die dort befindliche Ligatur mobilisiert und mittels eines Retraktors gespannt werden konnte, wobei schwere Metallhalter als Widerstand dienten (Abb. 9). Die dadurch hervorgerufene Okklusion der LAD war anhand einer ST-Segment-Hebung im EKG erkennbar (Abb. 10).



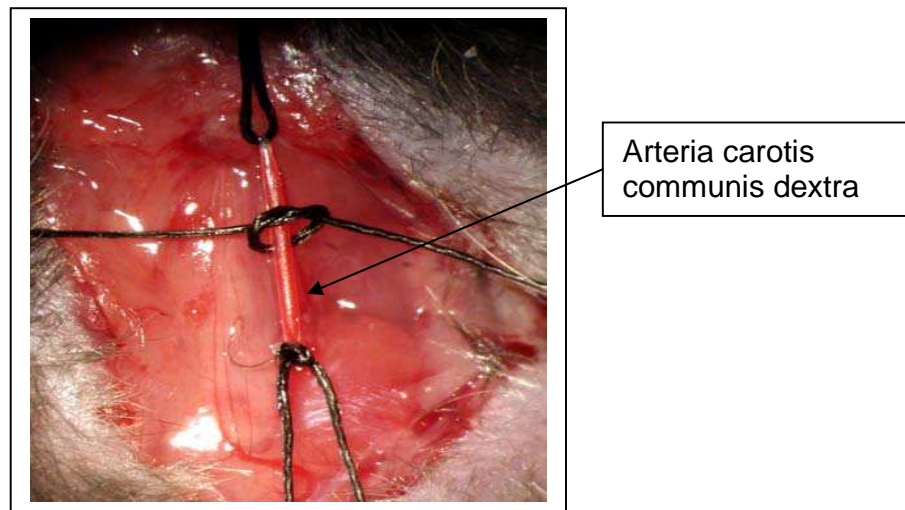
**Abb. 9: Ventralansicht im Bereich des Thorax einer Maus nach Wiedereröffnung des Hautschnitts, Zug der Ligatur zur Okklusion der LAD mittels eines Retraktors (Stapel, 2006).**



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

#### **2.3.4 Blutabnahme / kardiale Troponin T (cTnT)-Bestimmung**

Die Anästhesie und Intubation erfolgte wie unter Kap. 2.3.1 beschrieben. Nun wurden die rechte Speicheldrüse sowie der rechte Anteil der Schilddrüse stumpf freipräpariert und an der Seite mittels arretierbarer Klemme fixiert, um freien Zugang zu der Arteria carotis communis dextra zu erhalten. Bei 10-facher Vergrößerung und unter Verwendung feiner Pinzetten erfolgte die Freipräparation der Arterie aus der Gefäßscheide. Besondere Vorsicht galt hierbei dem Nervus vagus und der Vena jugularis, die parallel zur Arterie verlaufen und in der Gefäßscheide mit eingehüllt sind. Daraufhin wurden drei Seidenfäden der Stärke 5-0 mit einer Länge von ca. 7 cm um die A. carotis gelegt. Diese wurde nun im kranialen Abschnitt mit Hilfe eines Knotens des ersten Fadens ligiert und durch dessen Fixation gespannt. Der zweite Faden wurde mittig zu einer Schlaufe gelegt. Mittels Nadelhalter wurde der dritte Faden nach kaudal gespannt und führte zur Kompression der Arterie (siehe Abb. 11).



**Abb. 11: Ventralansicht auf den Halsbereich einer Maus; A. carotis communis dextra nach Präparation und Fixation mit Seidenfäden, 10-fache Vergrößerung (Bittig, 2005).**

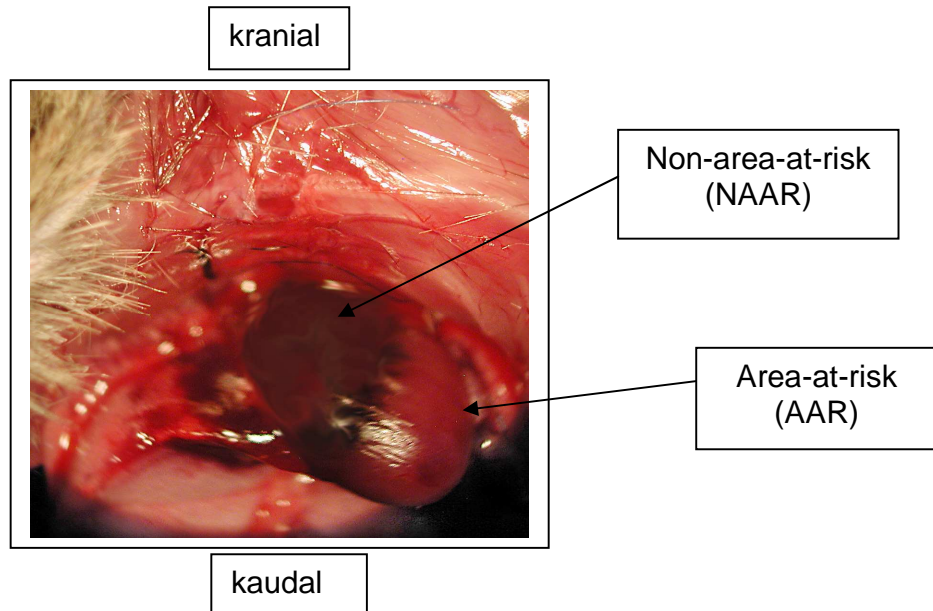
Mit einer feinen Augenschere und unter 16-facher Vergrößerung wurde daraufhin das Gefäß durch eine kleine ventrale Inzision eröffnet. Eine abgestumpfte 26-G-Kanüle auf einer mit Heparin benetzten 1-ml-Spritze wurde in die Arterie eingeführt und der kaudale Faden gelöst, um den Blutfluss wiederherzustellen. Etwa 350  $\mu$ l Blut wurden entnommen und davon 150  $\mu$ l auf einen Cardiac T-Quantitative Teststreifen appliziert. Er enthielt zwei herzspezifische monoklonale Antikörper, welche mit dem kardialen Troponin T (cTnT) einen Sandwichkomplex bildeten und sich als solcher an der Nachweiszone anlagerte. Zur Messung wurde der Streifen in den Cardiac Reader der Firma Roche eingelegt und eine Messzeit von etwa 15 Minuten abgewartet. Daraufhin war der Troponin T-Wert im Display abzulesen. Das optische System im Cardiac Reader (CCD-Kamera) erkannte dabei die auf der Nachweiszone befindlichen Striche und maß ihre Intensität. Eine integrierte Gerätesoftware rechnete diese wiederum in ein quantitatives Ergebnis um. Es stellte sich jedoch heraus, dass der Cardiac Reader nur Werte von  $< 0,1$  bis 2 ng/ml angeben konnte, ansonsten mit größer als 2 ng/ml ( $> 2$  ng/ml) arbeitete. Im klinischen Alltag ist dies durchaus ausreichend, da ab einem Wert von 2 ng/ml von einem Myokardinfarkt

ausgegangen werden kann und entsprechende Sofortmaßnahmen eingeleitet werden müssen. Zur Untersuchung der Relation Infarktgröße – kardiale Troponin T-Konzentration des Blutes waren jedoch genauere Angaben notwendig. Daher wurden Versuchsreihen gestartet. Hierzu wurde zunächst einer Spendermaus soviel Blut wie nur möglich über die A. carotis entnommen (bis zu 1,3 ml) und mit dem Blut der Versuchsm Maus vermischt. Die Verdünnungsreihen (1:0; 1:2; 1:3,5; 1:5; 1:10) wurden solange fortgesetzt, bis ein Wert kleiner als bzw. gleich 2 ng/ml im Display erschien. Da bei manchen Bestimmungen Fehler auftraten, wurde anstelle des Spenderblutes auf eine Verdünnung mit Heparin gewechselt. Auch hier erfolgte mittels Pipetten die Vermischung des Blutes mit der jeweiligen Menge an Heparin. Anschließend musste immer 150 µl dieses Gemisches auf einen Teststreifen appliziert werden. Die so erhaltenen Werte wurden daraufhin gemittelt.

### **2.3.5 Herzfärbung**

Nach erfolgter Blutabnahme wurden die in der Hauttasche befindlichen Ligaturfäden freigelegt und der Knoten durchtrennt, um sie durch den Thorax zum Herzen fädeln zu können. Anschließend wurden eine mediane Laparotomie und eine ventrale Eröffnung des Diaphragmas entlang des Rippenbogens durchgeführt. Durch die Fixation des Sternums mit Hilfe eines Fadens, war eine gute Sicht auf das Myokard möglich. Das umgebende Perikard sowie Verwachsungen mit dem Sternum mussten zunächst gelöst und die Ligaturfäden fest verknotet werden. Dadurch wurde der Blutfluss der linken Koronararterie unterbunden. Um die perfundierten Myokardareale, die sog. „Non area at risk“ (NAAR), zu markieren, wurden 0,5 ml einer 5% Phthaloblau-Lösung (Heubach Dispersionsfarbe) in den rechten Ventrikel injiziert (siehe Abb. 12). Dabei gelangte die Lösung durch die vorhandene Herzaktivität vom linken Vorhof in den linken Ventrikel und weiter in die Aorta und Koronarien. Nach ausreichender Blaufärbung wurde das Herz entnommen und in PBS gespült. Durch die Restaktivität des Herzens konnten hier Blut und Bestandteile der

Phthaloblau-Lösung entfernt werden. Unter 10-facher Vergrößerung wurden die Vorhöfe und der rechte Ventrikel reseziert.



**Abb. 12: Ventralansicht intrathorakal; Phthaloblau-Färbung in vivo bei noch schlagendem murinen Herzen (Stapel, 2006).**

Um den linken Ventrikel schneiden zu können wurde er in tiefgekühltem 2-Methylbutan (Sigma) schockgefroren (-160°C). Mittels Kardiotom wurden daraufhin ca. 5-7 ein Millimeter dicke Schnitte hergestellt, die bei 37°C für 20 min in 1,5% Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) inkubiert wurden. Dabei reduzieren die Dehydrogenasen der vitalen Zellen das farblose TTC zur roten Verbindung Triphenyl-Formazan (siehe Area-at-risk). Mittels 4%-iger Formalinlösung wurden die Schnitte innerhalb von 30 min fixiert und auf Objektträger überführt. Durch einen Mikroskop-Kameraaufsatz konnten die Schnitte einzeln und von beiden Seiten digital fotografiert werden (22,4 fache Vergrößerung).



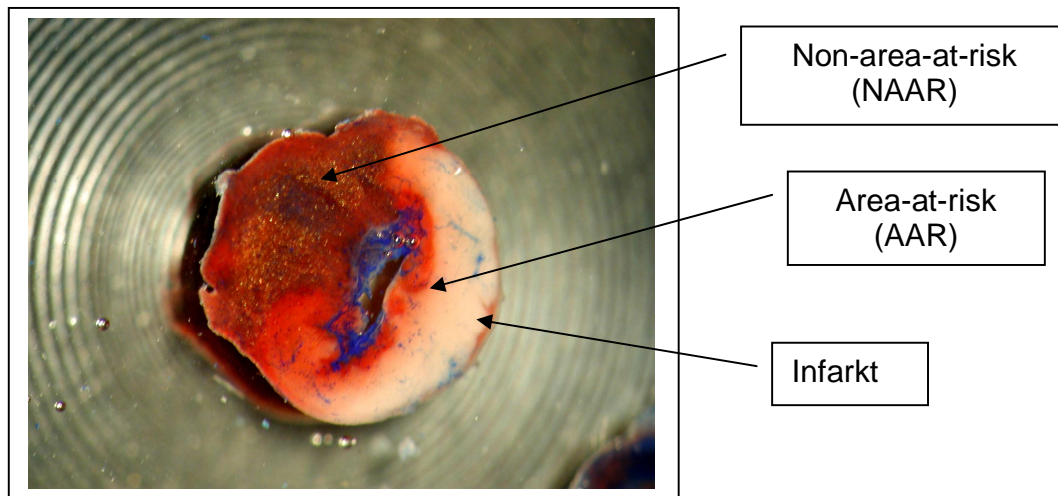
### 2.3.6 Planimetrische Auswertung

Die digitalisierten Schnitte wurden mit der Software Image J (Version 1.29, NIH, USA) planimetrisch vermessen und ausgewertet. Es flossen dabei die Daten der Vorder- und Rückseite als Mittelwert in die Auswertung mit ein, wobei das Ventrikellumen ausgespart wurde.

Die Werte von AAR, NAAR und Infarktareal (IA) wurden addiert und jeweils ins Verhältnis gesetzt. Im Rahmen dessen wurden die Quotienten von AAR zu LV und IA zu AAR bzw. LV berechnet. Bei den Werten handelte es sich um Volumenangaben bezogen auf die Muskelmasse des linken Ventrikels.

Vermessen wurden:

1. Infarktareal (IA): weißliches nekrotisches Gewebe
2. Area-at-risk (AAR): rötliches Gewebe, Myokard, welches von der LAD versorgt wird; beinhaltet neben dem Infarktareal auch vitales Gewebe
3. Non-area-at-risk (NAAR): blau gefärbtes Gewebe, welches nicht von der Ischämie betroffen war
4. Linker Ventrikel (LV): Gesamtgröße

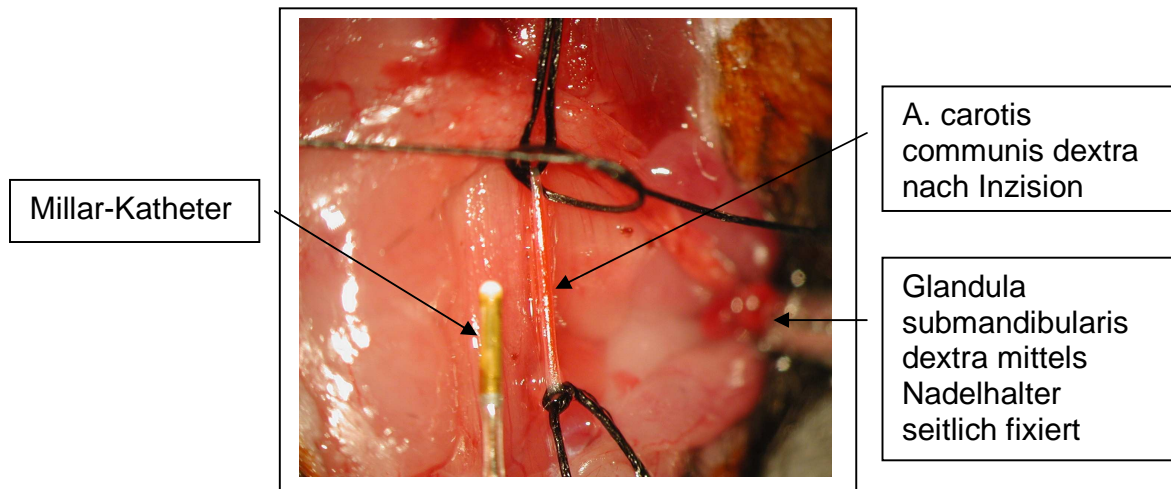


**Abb. 13: Herzschnitt einer Maus nach Phthaloblau- und TTC-Färbung, einzelne Areale mit entsprechenden Pfeilen markiert.**

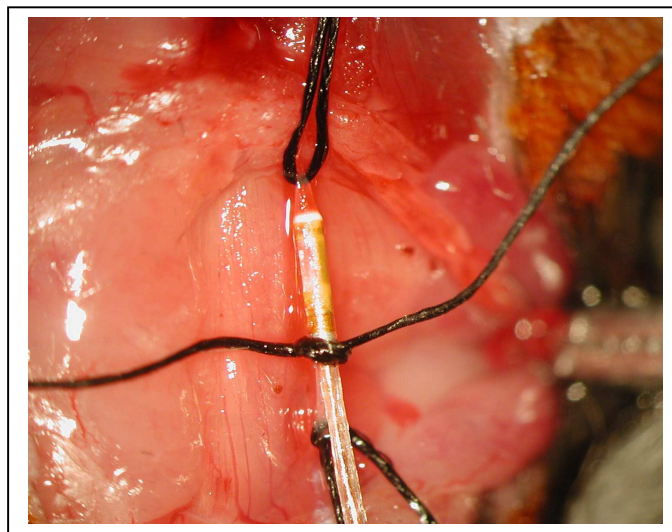
## **2.3.7 Kardiale Funktion**

### **2.3.7.1 Invasive Blutdruckmessung - Herzkatheter**

Nachdem anfängliche Bemühungen zur Ermittlung hämodynamischer Daten nach 24 Stunden durchgeführt wurden und nur schwer mit dem Versuchsprotokoll vereinbar waren (siehe Kap 2.2), wurde ein weiteres Protokoll erstellt. Hierbei erfolgte erst 2 Wochen nach der Infarzierung eine invasive Messung des Blutdrucks und der kardialen Funktion mittels eines 1,4-Fr. (French)-Millar-Katheters. Es handelte sich hierbei um eine Messmethode bei geschlossenem Thorax, die bereits mehrfach beschrieben (Doevendans et al., 1998; Lorenz und Robbins, 1997) und in unserer Arbeitsgruppe (Bittig, 2005; Vervölgyi, 2007) etabliert wurde. Dafür wurde das Tier wie in Kapitel 2.3.1 anästhesiert, auf dem Operationstisch immobilisiert und wie bei der Blutabnahme bereits beschrieben die Arteria carotis freipräpariert. Statt der abgestumpften Kanüle wurde nun der Millar-Katheter mittels feiner Pinzette eingeführt und durch den mittleren Faden fixiert (Abb. 14 und 15).



**Abb. 14: Ventralansicht im Halsbereich einer Maus nach Inzision des Gefäßes, daneben befindet sich der Millar-Katheter, 10-fache Vergrößerung (Vervölgyi, 2007).**



**Abb. 15: Ventralansicht im Halsbereich einer Maus nach Einschub des Katheters in die A. carotis, 16-fache Vergrößerung (Vervölgyi, 2007).**

Der kaudale Faden wurde nun gelockert und der Blutfluss somit wieder hergestellt. Bei geschlossenem Thorax wurde der Katheter bis vor die Aortenklappen vorgeschoben, wobei die Vibration des Katheters hier ein sicheres Zeichen war. Daraufhin wurde er ca. 2 mm zurückgezogen, um eine reproduzierbare periphere Messung zu gewährleisten. Durch Anschluss des Millar-Katheters an ein Power Lab Data Acquisition System (ADInstruments) und mit Hilfe der dazugehörigen Software erfolgte die Aufzeichnung und Auswertung der Daten. Bei 1% Isofluran und einem Frischgasfluss von 1 l/min wurde eine 10 minütige periphere Blutdruckmessung (systolischer arterieller Blutdruck: SAP; diastolischer arterieller Blutdruck: DAP), also prästenotisch, durchgeführt. Anschließend wurde der Katheter weiter vorgeschoben, bis der Drucksensor im linken Ventrikel zu liegen kam. Dabei diente der dortige akute Abfall des diastolischen Drucks als Anhaltspunkt. Hier erfolgte die Messung des linksventrikulären systolischen Drucks (LV SAP), des linksventrikulären diastolischen Drucks (LV DAP) sowie der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $+dP/dt_{max}$ ) und der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{min}$ ) für ebenfalls zehn Minuten. Nach der Registrierung der Messparameter wurde der Katheter langsam aus der Carotisarterie zurückgezogen und der kaudale Faden erneut gespannt. Auch hier wurde daraufhin der linke Ventrikel wie oben beschrieben gefärbt und planimetrisch ausgewertet.

### 2.3.7.2 Auswertung der hämodynamischen Daten

Mit Hilfe des Programms Chart 4 for Windows ® (ADInstruments, Castle Hill, Australien) wurden die Daten der Hämodynamik-Messung ausgewertet. Dabei wurde eine Minute der aufgezeichneten Blutdruckkurve markiert und das Programm errechnete daraufhin verschiedene Parameter. Hinsichtlich des peripheren Blutdrucks waren dies die Herzfrequenz, der systolische (SAP), diastolische (DAP) und mittlere (MAP) arterielle Blutdruck.

- *Herzfrequenz:* Sie errechnet sich aus dem Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden Aufstrichen in der Blutdruckkurve

- *Systolischer arterieller Blutdruck*: dieser wurde anhand der gemittelten Maxima der Blutdruckkurve berechnet
- *Diastolischer arterieller Blutdruck*: welcher sich errechnet aus den gemittelten Minima der Blutdruckkurve
- *Mittlerer arterieller Blutdruck*: dieser wurde aus der Blutdruckkurve errechnet, wobei die gemittelten Maxima zu 1/3 und die gemittelten Minima zu 2/3 in die Berechnung eingingen.

Anhand der Blutdruckkurve aus dem linken Ventrikel ließen sich die Herzfrequenz, der systolische (LV SAP) und diastolische (LV DAP) Blutdruck sowie die Druckerhöhung-/Kontraktions- ( $+dP/dt_{max}$ ) und Druckabstiegs-/Relaxierungsgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{min}$ ) errechnen.

### **2.3.7.3 Nicht-invasive Messung - Echokardiographie**

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Tiemann wurde zu Beginn dieser Studie zusätzlich eine 2D-Echokardiographie durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein gängiges Ultraschallverfahren, welches sich durch eine gute Beurteilung der Herzbewegung und entsprechender Strukturen sowie durch die Erfassung relativer Größenverhältnisse auszeichnet (Strom et al., 1998).

Ultraschall sind Schallwellen im Bereich von über 20000 Hertz (Hz). Durch einen piezoelektrischen Kristall im Schallkopf und einen elektrischen Spannungsimpuls der diesen in Schwingungen versetzt, werden die Wellen erzeugt. Aufgrund der unterschiedlichen Impedanzen verschiedener Medien, wird ein Teil der Ultraschallwellen reflektiert. Diese Reflektion („Echo“) wird vom Kristall wiederum aufgefangen und versetzt ihn in Schwingungen. Die dabei entstehende Wechsellspannung kann abgegriffen und in

ein entsprechendes Signal umgewandelt werden. Demnach ist der Schallkopf sowohl Sender als auch Empfänger. Die Herzaktivität verändert nun die Laufzeit der zurückkehrenden „Echos“. Diese Veränderungen können erfasst und als Weg-Zeit-Kurve dargestellt werden. So entsteht das sog. Echokardiogramm in M-Mode (von motion display). Das Verfahren ermöglicht die quantitative Bestimmung von Ventrikel- und Vorhofgrößen sowie Wanddicken. Durch die zusätzliche Bewegung des Schallkopfes in einer linearen oder sektorförmigen Ebene beim 2D-Verfahren ist es möglich, das Myokard in einzelnen Schichten darzustellen. Die jeweilige Ebene wird den diagnostisch wichtigen Herzstrukturen angepasst.

Bei der Durchführung wurden die Tiere 24 h post infarctem in einer Inhalationsbox mit einem Gemisch aus Sevofluran® (zur Einleitung 4%, zur Aufrechterhaltung 1,5-1,8%) in 50% Nitrooxid und 50% Sauerstoff anästhesiert. Danach wurde das Tier in Rückenlage auf einem gewärmten OP-Tisch gelagert und die Anästhesie mit Hilfe eines Nasenkonus Aufrecht erhalten. Mit einer Enthaarungscreme wurde das Fell des Thorax entfernt und Ultraschallgel appliziert. Für die Untersuchung selbst wurde ein 2D-Ultraschallgerät (Philips Ultrasound (HDI-5000)) mit einem Schallkopf von 15 MHz verwendet. Die Messungen in der langen Achse erfolgten individuell bei jedem Tier durch die Positionierung des Schallkopfes rechts- oder linksseitig parasternal.

#### **2.3.7.4 Auswertung der Ultraschalldaten**

Alle Messungen und Aufnahmen in 2D-Modus wurden zusammen mit Dr. Ghanem und mit Hilfe eines speziellen Datenverarbeitungsprogramms durchgeführt.

Gemessen wurden:

- Fläche des linken Ventrikels diastolisch, lange Achse
- Fläche des linken Ventrikels systolisch, lange Achse

Die ermittelten Daten ermöglichten sowohl die Beurteilung der Infarktgröße als auch die

Berechnung der linksventrikulären Auswurffraktion (EF) in der langen Achse. Die Ejektionsfraktion (EF) stellt dabei einen wesentlichen Parameter der kardialen Pumpkraft dar und ist definiert als der prozentuale Anteil des Schlagvolumens am enddiastolischen Füllungsvolumen.

## **2.4 In-vitro-Untersuchungen**

### **2.4.1 Organgewichte**

Das phthaloblaugefärbte Herz wurde entnommen und in PBS (Pufferlösung) gespült. Unter 10-facher-Vergrößerung erfolgte die Abtrennung der beiden Herzohren und des rechten Ventrikels. Nun wurde vorsichtig die Flüssigkeit auf Zellstoff ausgedrückt und das Gewicht des linken Ventrikels auf einer Feinwaage (Fa. Ohaus) bestimmt.

Nach Abtrennung einer der unteren Extremitäten und Freipräparation der Tibia wurde anhand einer Schieblehre (Fa. Mauser) ihre Länge ermittelt.

### **2.4.2 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent assay)**

Zur Bestimmung von TNF- $\alpha$ , IL-6- und IL-1 $\beta$ -Proteinexpressionen wurde ein ELISA durchgeführt.

Hierfür wurden tiefgefrorene Herzen der Gruppen 1b, 3b, 6b und 7b sowie der entsprechenden scheinoperierten Tiere (Sham) (Gruppen 8-11), mit 1 ml ELISA-Puffer (PBS, 1  $\mu$ l/ml Triton X-100, 1  $\mu$ l/ml PMSF (250 mM in Isopropanol), Proteaseinhibitoren) homogenisiert. Daraufhin erfolgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis, eine erneute Homogenisierung und eine 15-minütige Zentrifugation bei 16.110 x g und 4°C. Der Überstand wurde im ELISA eingesetzt.

Gemäß dem Herstellerprotokoll (R&D Systems) wurden Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatten verwendet, die das relevante Antigen binden. Mittels Enzymen, die an den

Antikörper gekoppelt sind, wurde eine Farbreaktion ausgelöst. Die Farbintensität konnte photometrisch anhand eines ELISA-Readers ermittelt werden, wobei die Stärke der Farbreaktion mit der Konzentration des untersuchten Proteins korrelierte.

## **2.5 Statistik**

Zur statistischen Auswertung wurden alle Daten als Mittelwert (MW) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM) errechnet.

Das Computerprogramm Prism 3.0 der Firma GraphPad Software, San Diego, USA, ermöglichte dabei die schnelle Ermittlung der Signifikanzen durch ein- oder zweifaktoriellen ANOVA und anschließenden Posthoc-Test nach Bonferroni bzw. mittels unpaired t-Test. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  galten als signifikant.

Die Kalkulation der Relation der kardialen Troponin T-Werte (cTnT) und entsprechender Infarktgrößen wurde mit Hilfe des Pearson Korrelationskoeffizienten  $r$  und einer linearen Regressionsanalyse durchgeführt.

Des Weiteren wurden Balkendiagramme erstellt, die den arithmetischen Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) wiedergeben.

## **2.6 Geräte und Materialien**

### **2.6.1 Materialien für die Tierhaltung**

#### Zuchttiere

Charles River Deutschland GmbH, D-Sulzfeld, Deutschland

#### Käfige

Makrolon, Typ II L, Charles River Deutschland GmbH, D-Sulzfeld, Deutschland



### Tiereinstreu

Altromin-Tiereinstreu-Granulat, Altromin GmbH und Co. KG. Lage-Lippe, Deutschland

### Futter

Altromin-Standarddiätfutter Maus und Ratte, Altromin GmbH und Co. KG, D-Lage-Lippe, Deutschland

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

### Endotrachealkanüle

Durchmesser 1,0 mm und 1,2 mm; Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten, Deutschland

### Minivent

Typ 845; Hugo Sachs Elektronik, D-March-Hugstetten

### Operationsbesteck

Augenschere, verschiedene Pinzetten, Castroviejo-Nadelhalter, Klemmen, Wund-Reraktoren, Fine Science Tools, Inc., San Francisco, USA bzw. Allgaier Instrumente, Frittlingen, Deutschland

### Operationsmikroskop

OpMi-191294, ZEISS, D-Oberkochen, Deutschland

### OP-Tisch

Eigenanfertigung der Feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Instituts mit angeschlossenem Wärmebad (42 °C); Rhema-Labortechnik, D-Hofheim

### EKG-Ableitung nach Einthoven

- Elektroden: Kalt-Nadeln, Größe 3, Fine Science Tools, Inc.
- Datenverarbeitung durch Power Lab Data Acquisition System; ADInstruments, Castle Hill, Australien; dazugehörige Software: Chart4windows

### Zentrifuge

Model 5415R; Eppendorf AG, D-Hamburg

### Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm®

Ratiopharm GmbH, D-Ulm

### Cardiac Reader

Roche Diagnostics GmbH, D-Mannheim

### Cardiac T-Quantitative Teststreifen

Roche Diagnostics GmbH, D-Mannheim

### Millar-Katheter-System

- Mikro-Tip Pressure Katheter aus Nylon mit 1,4-French-Drucksensor; Millar Instruments Inc., Houston, USA
- Datenverarbeitung durch Power Lab Data Acquisition System; ADInstruments, Castle Hill, Australien; dazugehörige Software: Chart4windows

### Echokardiographie

Ultrasound HDI-5000, Phillips

### Kardiotom

Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Instituts

Objektträger

Super Flos Frost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland

Digitalkamera

Nikon CoolPix 990

**2.6.3 Verbrauchsmaterialien**

Betaisodona Lösung<sup>®</sup>

Mundipharma GmbH, D-Limburg

Isofluran: Forene<sup>®</sup>

Abbott GmbH & Co. KG, D-Wiesbaden

Sevofluran:

Abbott GmbH & Co. KG, D-Wiesbaden

Disoprivan<sup>®</sup>, 1 % Propofol

Astra Zeneca, Wedel, Deutschland

Temgesic-Lösung<sup>®</sup>

Ampullen, Injektionslösung 0,3 mg/ml Buprenorphinhydrochlorid; Fa. Essex Pharma GmbH, München

Nahtmaterial

- Prolene-Fäden (monofil) mit atraumatischer Nadel; Johnson&Johnson, Brüssel, Belgien

6-0 Prolene® Fäden BV-1 für die Hautnähte sowie

8-0 Prolene® Fäden BV-1 für den Ligaturfaden (Polypropylen; Ethicon GmbH, D-Norderstedt)

- Seidenfäden für die Fixation der A. carotis (Fa. Serag Wiessner, D-Naila)

#### Stimulantien

- D-Galaktosamin, 1g/10 ml, D-GalN; Roth, Karlsruhe, Germany

- CpG-ODN:

1668 Thioat; 5-TCCATGACGTTCCCTGATGCT-3'; TibMolBiol, Berlin, Germany

1612 Thioat: GCTAGATGTTAGCGT (neutral) (Yamara, Ishii, Klinman, 2004)

H154 Thioat: CCTCAAGCTTGAGGGG (suppressiv) (Yamara, Ishii, Klinman, 2004)

#### PBS

Pufferlösung aus 135 mM NaCl, 1,3 mM KCl, 3,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O, 0,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und Aqua bidest., pH-Wert 7,4; Hersteller Gibco

#### 2-Methylbutan

#277258, Sigma-Aldrich

#### Phthaloblau-Lösung 5 %

mit PBS angesetzt; Heubach Dispersionsfarbe

#### TTC-Lösung 1,5 %

2,3,5-Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) mit Phosphatpuffer (pH-Wert 7,41)

#### Formalin 4 %

Verdünnt mit PBA von Merck

## **2.6.4 Geräte und Materialien für die In-vitro-Eingriffe**

### Feinwaage

Model Voyager; Ohaus, D-Giessen

### Schieblehre

Fa. Mauser, St. Denis, Frankreich

### PBS

Pufferlösung aus 135 mM NaCl, 1,3 mM KCl, 3,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O, 0,5 mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> und Aqua bidest., pH-Wert 7,4; Hersteller Gibco

### ELISA Reader, Expert

Asys HiTech, Eugendorf, Österreich

### Biophotometer

Eppendorf AG

### Chemikalien

mIL-1 $\beta$  ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, USA

mIL-6 ELISA Kit, R&D Systems

mTNF ELISAKit, R&D Systems

### Proteinisolation

Phenylmethylsulfonyl (PMSF), #P7626, 0,2M in Isopropanol

### Proteaseinhibitoren

#1836153, Roche, D-Mannheim

## **2.6.5 Software**

### Chart for Windows

ADInstruments

### Prism 3.0

GraphPad Software, San Diego, USA

### Image J

Version 1.29 u; Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Tierzahlen

Es wurden insgesamt 186 Tiere untersucht, davon flossen die Daten von 104 Tieren in die Arbeit ein. Dabei waren die Mortalitätsraten stark abhängig vom Versuchsprotokoll und der angewandten CpG-Vorbehandlung. Die Todesfälle werden im jeweiligen Kapitel besprochen (Kap. 3.2.2 und siehe auch Tab. 2).

Tabelle 2 zeigt, dass bei der Bestimmung der kardialen Troponin T (cTnT)-Plasmakonzentration 13 Ergebnisse nicht verwertbar waren. Dabei trat in vier Fällen ein Messfehler auf. Erst durch Klärung des Fehlercodes und erneute Eichung des Gerätes, waren Messungen wieder möglich, jedoch nicht mehr genügend Blut vorhanden. Bei den restlichen neun Werten lag lediglich die Angabe  $> 2$  ng/ml vor, ein ungenaues Ergebnis, das erst durch die Etablierung einer Verdünnungsreihe behoben werden konnte (siehe auch Kap. 2.3.4).

Hinzu kam, dass neun Tiere bei der Instrumentierung starben. Gründe hierfür lagen zum einen an der anfänglich langen OP-Dauer, zum anderen an der Verletzung der Arteria mammaria, wodurch es zu einem erhöhten Blutverlust kam (siehe auch Kap. 2.3.1).

Anhand der Tabelle 2 wird weiterhin deutlich, dass einige Mäuse nach der Instrumentierung aufgrund einer Atemdepression starben. Mögliche Ursachen könnten hier ein Pneumothorax, die Gabe von Temgesic® oder auch die Inhalationsnarkose (Isofluran®) selbst sein. Bei dem planimetrischen Datensatz gingen 54 von 72 Färbungen in die Studie ein. Das lag einerseits daran, dass die Färbungen missglückten, weil beispielsweise das Herz nicht mehr schlug und die Phthaloblaufärbungen nur unzureichend erfolgen konnte oder aber daran, dass die jedes Mal neu angesetzten Chemikalien (TTC) nicht die nötigen Temperaturen aufwiesen bzw. verunreinigt waren, so dass eine klare Abgrenzung der AAR nicht möglich war. Außerdem waren manche Datensätze unvollständig, so dass die Tiere nicht in die Wertung einfließen.

Darüber hinaus mussten 15 Tiere aufgrund von unzureichender ST-Hebung bzw. verfrühter Reperfusion im Rahmen drohender Apnoe aus der Studie ausgeschlossen werden.

<b>Gesamtzahl der Mäuse</b>	<b>186</b>
<b>Planimetrie</b>	
Färbungen gesamt	72
Davon in die Studie eingegangen	54
<b>Blutentnahme</b>	
Troponin T-Bestimmung gesamt	45
Davon verwertbar	32
<b>Organentnahme für Molekularbiologie</b>	<b>32</b>
<b>Todesfälle</b>	
Bei Instrumentierung	9
Nach Instrumentierung	16
Nach Temgesic-Applikation	14
Nach CpG-Stimulation	9
Während Infarzierung	16
Während Reperfusionsphase	3

**Tab. 2: Tierzahlen und Todesfälle gesamt.**



Im folgenden Kap. 3.2 werden zunächst die Ergebnisse der Vorversuche dargelegt, die zur Etablierung des Versuchsprotokolls führten. Die Daten beinhalten nur geringe Tierzahlen. Auch konnten nur selten Signifikanzen ermittelt werden. Dies war nicht erforderlich, da Tendenzen ausreichend waren, um das Versuchsprotokoll zu optimieren. Das darauf folgende Kap. 3.3 befasst sich mit den Ergebnissen des etablierten Protokolls. Hier wurden lediglich die Gruppen 1 und 3 weitergeführt. Kap 3.4 befasst sich zusätzlich mit den kardialen Troponin-T-Werten und ihrer Relation zur jeweiligen Infarktgröße, wohingegen Kap. 3.5 einen Einblick in die Hämodynamik zwei Wochen nach Infarzierung liefert und Kap. 3.6 in die molekularbiologischen Veränderungen 3 h danach. Abschließend sollte die Spezifität des Immunsystems hinsichtlich verschiedener CpG-ODNs untersucht werden (Kap. 3.7).

## **3.2 Etablierung des Versuchsprotokolls**

### **3.2.1 CpG-Vorbehandlung mit 1668-Thioat**

Bakterielle/prokaryontische DNA unterscheidet sich von eukaryontischem Genmaterial dadurch, dass sie 20-fach häufiger CpG-(Cytosin-Posphat-Guanin-) Motive enthält und zu 98% unmethyliert vorliegt. Sie wird vom angeborenen Immunsystem erkannt und führt zu dessen Aktivierung. Verantwortlich hierfür sind die erwähnten CpG-Motive (Krieg et al., 1995).

Seit vielen Jahren ermöglichen synthetisch hergestellte CpG-Oligonukleotide (CpG-ODNs), chemisch auch als Thioate bezeichnet, weitreichende Versuche. Sie sind in der Lage den immunstimulatorischen Effekt zu imitieren (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000; Krieg, 2002). So fanden sie bereits im Rahmen von Impfungen und Immuntherapien gegen Krebs und Allergien Verwendung (Krieg, 2000; Krieg, 2001).

Basierend auf einer Studie, in der die Gabe von LPS die Infarktgröße in einem sog. „second-hit-Modell“ signifikant reduziert hatte, sollte nun die Auswirkung einer CpG-

Vorbehandlung unter vergleichbaren Bedingungen untersucht werden (Stapel et al., 2006; Stapel, 2006).

Zu Beginn der Versuchsreihe mit 1668 Thioat (5-TCC-ATG-ACG-TTC-CTG-ATG-CT-3') musste eine geeignete Stimulationskonzentration ermittelt werden. Dabei erhielt die Kontrollgruppe (Gruppe 1) die äquivalente Menge D-Galaktosamin und PBS, und es wurden vier weitere Gruppen mit unterschiedlicher CpG-Stimulationskonzentrationen gebildet (siehe Kap. 2.2 Gruppeneinteilung).

Hinsichtlich des Zeitpunkts der Stimulation hatte sich in unserer Arbeitsgruppe eine Injektion 16 h vor Infarzierung bewährt (Stapel, 2006).

### 3.2.2 Tierzahlen und Mortalitätsraten

	<b>Gruppe 1 (PBS)</b>	<b>Gruppe 2 (1 nmol 1668 Thioat)</b>	<b>Gruppe 3 (5 nmol 1668 Thioat)</b>	<b>Gruppe 4 (10 nmol 1668 Thioat)</b>	<b>Gruppe 5 (20 nmol 1668 Thioat)</b>
<b>Tierzahl gesamt (n)</b>	32	7	21	15	5
<b>gestorben</b>	4	1	3	7	4
<b>Mortalitätsraten (%)</b>	12,5 %	14,3 %	14,3 %	54 %	80 %

**Tab. 3: Mortalität der einzelnen Gruppen bei unterschiedlicher Konzentration von 1668 Thioat.**

Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich ist, lag eine erhöhte Letalität in den Gruppen 4 (54%) und 5 (80%) vor. Grundlage dessen ist, dass CpG-DNA ab einer gewissen Konzentration einen septischen Schock bei Mäusen induzieren kann, die zuvor mit D-Galaktosamin sensibilisiert wurden (Sparwasser al., 1997a).

Derartige Anzeichen eines septischen Schocks sind beispielsweise die Teilnahmslosigkeit der Tiere, Diarrhoe und ein Zittern sowie struppiges Fell (Vervölgyi, 2007). Letztlich wurden

die Tiere am nächsten Morgen tot aufgefunden oder verstarben bald während der Infarzierung.

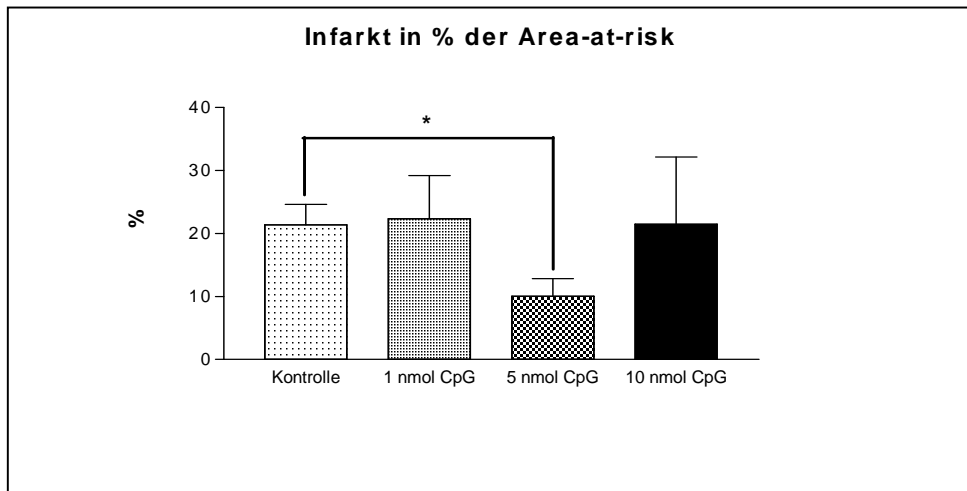
Es musste daher erst eine subletale Dosis gefunden werden. Diese lag bei weniger als 20 nmol/l CpG-ODN, so dass die Gruppe 5 in den weiteren Versuchen weggelassen wurde.

### **3.2.3 Konzentrationsabhängige myokardiale Wirkung**

Neben der unterschiedlichen Mortalität der verschiedenen Gruppen (siehe Tab. 3) wurde im Zuge der ersten Versuche deutlich, dass die Konzentration der CpG-Stimulation ebenfalls Einfluss auf die Größe des geschädigten Gewebes hat.

Die Area-at-risk (AAR) hatte durchschnittlich eine Größe von 54,05% bezogen auf den linken Ventrikel. Dabei variierten die Größen zwischen 50,12 und 60,69%. Diese Werte weichen von denen anderer Studien ab (Rodrigues et al., 2004; Stapel, 2006). Die Unterschiede lassen sich durch die Wahl des Mausstammes und des Versuchsprotokolls sowie durch die unterschiedliche Instrumentiertechnik und der zu Anfang fehlenden Übung erklären.

Die Infarktgrößen bezogen auf die AAR betragen in der ersten Gruppe  $21,36\% \pm 3,25$  (MW  $\pm$  SEM), wohingegen bei der 3. Gruppe ein signifikant kleineres IA von  $10,05\% \pm 2,80$  (MW  $\pm$  SEM) nachweisbar war ( $p < 0,05$  unpaired t test). Dabei differierten die Größen zwischen 0,41 und 46,40%. Die Gruppen 2 und 4 hingegen zeigten keine veränderten Infarktgrößen im Vergleich zur Kontrolle ( $22,33\% \pm 6,87$  bzw.  $21,43\% \pm 10,70$ ) (MW  $\pm$  SEM) (vgl. Abb. 16).



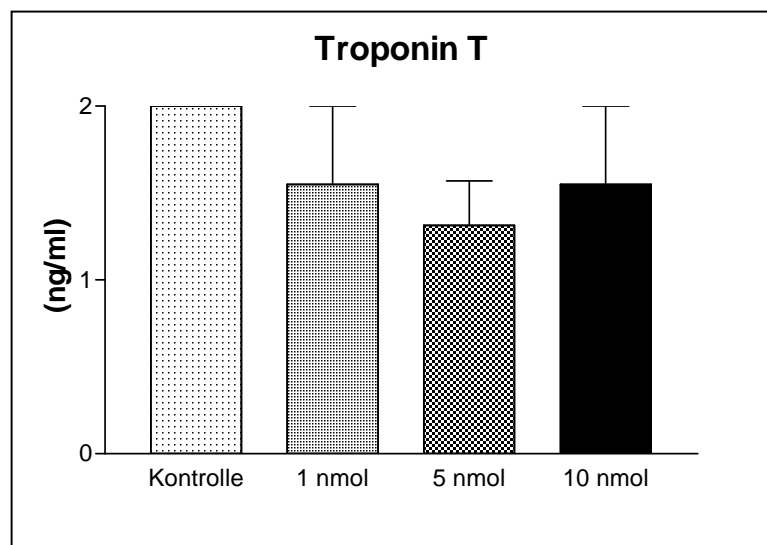
**Abb. 16: Planimetrische Vermessung der Infarktgrößen nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von 1668 Thioat (Gruppen 1-4); Gruppe 1: n = 15; Gruppe 2: n = 5; Gruppe 3: n = 9; Gruppe 4: n = 3; \* p < 0,05.**

### 3.2.4 Erste kardiale Troponin T (cTnT)-Daten

Troponin T ist ein Strukturprotein, welches in der quergestreiften Muskulatur (Herz- und Skelettmuskel) vorkommt. Als Bestandteil der muskulären Grundeinheit, dem sog. Sarkomer, trägt es wesentlich zur Muskelkontraktion bei (siehe auch Kap. 1.8). Als weiterer Parameter einer Herzschiidigung wurde in dieser Studie seine Plasmakonzentration mit Hilfe eines Cardiac Readers der Firma Roche gemessen. Dies wurde in Anlehnung an die Studie von Metzler et al. durchgeföhrt, die die Korrelation des cTnT und der InfarktgröÙe im Mausmodell untersucht hatten (Metzler et al., 2002).

Nach 60 min Okklusion der LAD und 24 h Reperfusion wurde den Tieren über die Arteria carotis Blut entnommen und davon je 150 µl auf spezielle Teststreifen der Firma Roche appliziert. Zu Beginn dieser Studie war eine Verdünnungsreihe noch nicht etabliert, so dass vermehrt „größer als“ Werte vorlagen.

Dabei hatten die Kontrolltiere (Gruppe 1) bei der Bestimmung alle  $> 2$  ng/ml Troponin T ( $n = 8$ ), dies traf auch weitgehend für die 2. Gruppe zu ( $n = 4$ ). Bei der 3. Gruppe jedoch lag ein tendenziell geringerer Wert von  $> 1,1$  ng/ml ( $n = 9$ ) vor und Gruppe 4 lag bei  $> 1,55$  ng/ml ( $n = 2$ ) (Abb. 17). Die genaue Untersuchung der Relation der Troponin T-Werte und der jeweiligen Infarktgröße erfolgte erst im Rahmen der etablierten Studie, da hier eine Verdünnungsreihe (siehe Kap. 3.4) zu genaueren Werten führte und ein Bezug hergestellt werden konnte.



**Abb. 17: Troponin T-Werte in Abhängigkeit von der CpG-Stimulation; Kontrolle:  $n = 8$ , Gruppe 2;  $n = 4$ , Gruppe 3;  $n = 9$ , Gruppe 4;  $n = 2$ ; fehlende SEM der Kontrollgruppe basiert auf den Angaben des Cardiac Readers (alle hatten  $> 2,0$  ng/ml).**

### 3.2.5 Körpergewicht und Herzparameter

Die Körpergewichte lagen bei den Versuchsgruppen zwischen 20,6 und 25,2 g, während die Gewichte des linken Ventrikels zwischen 73,4 mg und 94,66 mg differierten.

Bei der Berechnung der Herzparameter wie linksventrikuläres Gewicht (LVW) durch die Tibialänge (TL) und linksventrikuläres Gewicht (LVW) durch die Körpergewichte (BW), ergaben sich die in der Tabelle gelisteten Werte (Tab. 4). Anhand dieser ist zu entnehmen, dass die Gruppe 1 tendenziell größere Herzparameter aufwies, basierend auf der verhältnismäßig großen linksventrikulären Masse. Signifikante Unterschiede lagen jedoch nicht vor und in den weiter unten gelisteten Tabellen (Tab. 5 und 6) relativierte sich dieser Eindruck.

<b>Gruppe</b>	<b>(BW) (g)</b>	<b>LVW (mg)</b>	<b>TL (mm)</b>	<b>LVW/TL (mg/mm)</b>	<b>LVW/BW (mg/g)</b>
1	22,16 ± 0,49	94,66 ± 6,54	15,46 ± 0,92	6,17 ± 0,3	4,19 ± 0,21
2	20,6 ± 0,35	77,23 ± 5,38	15,17 ± 2,08	5,23 ± 0,5	3,74 ± 3,74
3	23,95 ± 1,0	92,75 ± 4,25	17,25 ± 0,17	5,37 ± 0,22	3,89 ± 0,18
4	21,65 ± 1,65	73,4 ± 19,2	14,4 ± 3,4	5,06 ± 0,14	3,34 ± 0,63

**Tab. 4: Herzparameter der Versuchsgruppen mit unterschiedlichen CpG-Konzentrationen; Gruppe 1: n = 10; Gruppe 2: n = 3; Gruppe 3: n = 6; Gruppe 4: n = 2; Erklärung der Abkürzung siehe Text.**

### 3.2.6 Funktionelle und hämodynamische Aspekte

Zu Beginn dieser Studie wurden zusätzlich vor der Blutabnahme zur kardialen Troponin T-Bestimmung und der Herzfärbung eine Echokardiographie in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. Tiemann erstellt, sowie eigens eine invasive Blutdruckmessung mittels Millar-Katheter durchgeführt. Die damit zusammenhängende Problematik wurde

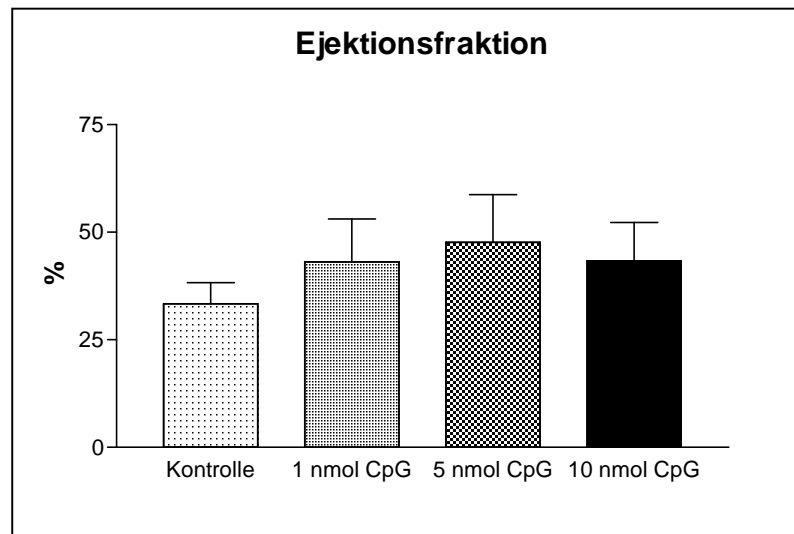
bereits im Kap. 2.2 erwähnt. Dennoch sollen die wenigen Daten hier aufgeführt werden und eventuell Anregungen zu weiteren Forschungsarbeiten liefern.

### **3.2.6.1 Nicht-invasives Verfahren - Echokardiographie**

Bei der Echokardiographie handelt es sich um eine nichtinvasive Technik, die eine wiederholte Messung ermöglicht. In den letzten Jahren hat sie sich darüber hinaus als probates Mittel zur Diagnostik eines Myokardinfarktes etabliert (Scherrer-Crosbie et al., 1999) (siehe auch Kap. 2.3.7.3).

Nach einer 24-stündigen Reperfusion wurden die Tiere unter einer Inhalationsnarkose mittels Sevofluran® und einem 2D-Ultraschallgerät (Philips Ultrasound HDI-5000) echokardiographisch untersucht. Die Messungen und Auswertungen wurden gemeinsam mit Dr. Ghanem durchgeführt, der auf diesem Gebiet über die notwendigen Erfahrungen verfügte.

Die Ejektionsfraktionen differierten zwischen 33,37 und 47,64%. Dabei stellten die Kontrolltiere (n = 4) mit  $33,37\% \pm 4,82$  (MW  $\pm$  SEM) den niedrigsten und Gruppe 3 (n = 3) mit  $47,64\% \pm 11,07$  (MW  $\pm$  SEM) tendenziell den höchsten Wert (Abb. 18). Bezogen auf die Studie von Rodrigues et al., in der die Mäuse eine durchschnittliche EF von ca. 73% hatten, liegen bei allen Tiergruppen verschlechterte Herzfunktionen vor (Rodrigues et al., 2004).



**Abb. 18: Ejektionsfraktionen der verschiedenen Versuchsgruppen nach 24 h Reperfusion; Kontrolle: n = 4; Gruppe 2: n = 3; Gruppe 3: n = 3; Gruppe 4: n = 2.**

### 3.2.6.2 Invasive Blutdruckmessung - Herzkatheterisierung

Um zusätzliche Informationen hinsichtlich funktioneller Veränderungen post infarctem zu erhalten, wurde nach 24 h Reperfusion eine invasive Blutdruckmessung mit Hilfe eines 1,4-Fr. (French)-Millar-Katheters durchgeführt. Anhand dessen konnten der systolische und diastolische Blutdruck sowie Herzfrequenz und Druckerstiegs- bzw. -abfallgeschwindigkeiten gemessen werden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. In einer weiteren Versuchsreihe wurden daher die hämodynamischen Auswirkungen der CpG-Stimulation nach zwei Wochen Reperfusion erneut untersucht (siehe Kap. 3.5).



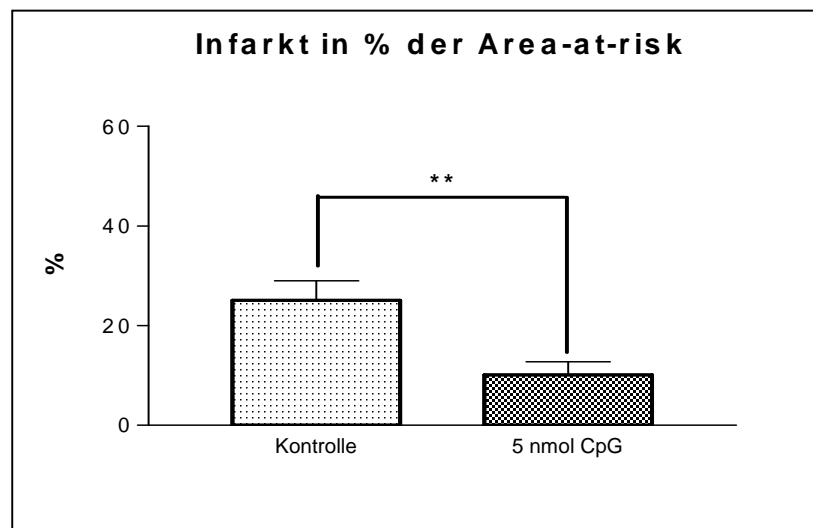
### 3.3 Ergebnisse des etablierten Versuchsprotokolls

Dieses Kapitel beschränkt sich auf die Tiergruppen 1 und 3, da die Vorversuche (siehe Kap. 3.2) hier die größten Effekte erwarten ließen.

#### 3.3.1 Planimetrisch ermittelte Infarktgrößen

Nach 60 min Okklusion der LAD und 24 h Reperfusion wurden die Infarktareale planimetrisch vermessen. Die AAR-Größe der einzelnen Gruppen, bezogen auf den linken Ventrikel (LV), differierte zwischen 53,31% und 56,60% bei einer durchschnittlichen Größe von 55,04%. Es kann von einer guten Reproduzierbarkeit der Methode ausgegangen werden.

Die Kontrollgruppe (Gruppe 1) wies mit  $25,09\% \pm 3,88$  (MW  $\pm$  SEM) einen signifikant ( $p < 0,005$ ) größeren Myokardinfarkt, bezogen auf die AAR, auf als die Versuchsgruppe mit einer 5 nmol-1668-Thioat-Stimulation (Gruppe 3) ( $10,14\% \pm 2,6$ ) (MW  $\pm$  SEM) (Abb. 19).



**Abb. 19: Planimetrische Vermessung der Infarktareale nach 60 min Ischämie und 24 h Reperfusion; Kontrolle:  $n = 11$ ; 3. Gruppe3 (5 nmol CpG:  $n = 10$ ;**

**\*\*  $p < 0,005$  (unpaired  $t$  test).**

### 3.3.2 Körpergewicht und Herzparameter

Die Tabelle 5 zeigt, dass die Werte der beiden Gruppen nur wenig voneinander abwichen. Signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

Gruppe	BW (g)	LVW (mg)	TL (mm)	LVW/TL (mg/mm)	LVW/BW (mg/g)
PBs	23,01 ± 0,52	96,05 ± 5,58	16,73 ± 0,51	5,74 ± 0,26	4,16 ± 0,19
5 nmol CpG	23,59 ± 0,63	90,19 ± 3,55	17,03 ± 0,19	5,29 ± 0,17	3,83 ± 0,13

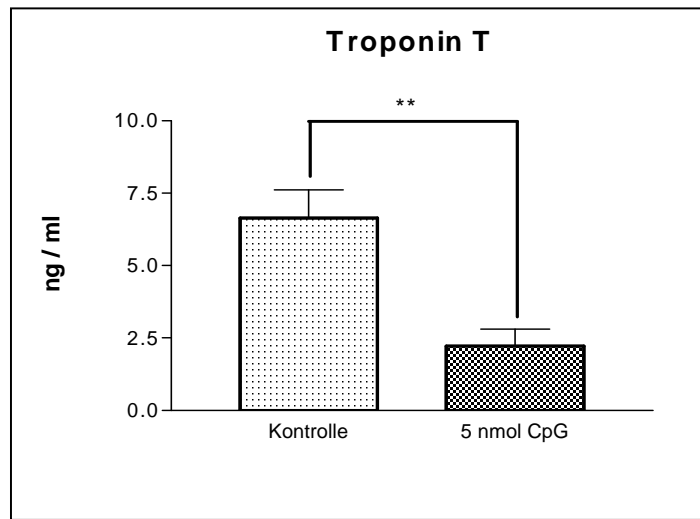
**Tab. 5: Morphologische Parameter der Gruppen 1 (n = 11) und 3 (n = 10).**

## 3.4 Ergebnisse der kardialen Troponin T (cTnT)-Untersuchungen

### 3.4.1 Einfluss der Vorbehandlung auf die cTnT-Konzentrationen

Wie bereits in Kap. 3.2.4 angedeutet, gab es anfänglich Ungenauigkeiten hinsichtlich des Troponin T-Wertes (siehe auch Kap. 2.3.4). Dies führte zur Entwicklung einer Verdünnungsreihe, welche in Kap. 2.3.4 beschrieben wurde. Ansonsten entsprach das weitere Vorgehen dem aus Kap. 3.2.4.

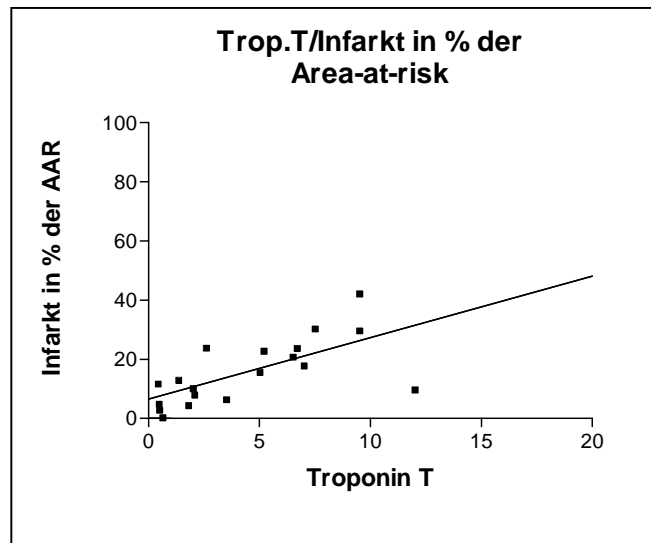
Während die Tiere mit PBS-Stimulation einen durchschnittlichen Troponin T-Wert von 6,65 ng/ml ± 0,96 (MW ± SEM; n = 11) aufwiesen, lag er bei den Tieren mit einer 5 nmol-CpG-Stimulation bei 2,22 ng/ml ± 0,58 (MW ± SEM; n = 10). Eine statistische Auswertung mit unpaired t-test ergab eine deutlich signifikante Reduktion des cTnT-Wertes bei den CpG-stimulierten Tieren (p < 0,001) (Abb. 20).



**Abb. 20: Troponin T-Konzentration nach 60 min Infarzierung und 24 h Reperfusion; Kontrolle n = 11; Gruppe 3: n = 10; \*\* p < 0,001 (unpaired t test).**

### 3.4.2 Relation cTnT und Infarktgröße

Um den Zusammenhang der Infarktgröße und der Konzentration des kardialen Troponin T im Blut darzustellen, wurden die Werte beider Gruppen gegen die Größe des Infarktes, bezogen auf die AAR, aufgetragen. Die dadurch erhaltene Steigung machte den signifikanten Bezug zueinander deutlich, welcher mit Hilfe des Statistikprogramms Prism 3 verifiziert werden konnte (siehe Abb. 21;  $p = < 0,001$ ;  $r = 0,67$ ;  $r^2 = 0,45$ ). Es besteht demnach eine enge Korrelation zwischen der Troponin T-Konzentration und der Größe des Infarktes. Diese Ergebnisse bestätigen die Studie von Metzler et al. und unterstützen die Tatsache, dass die Untersuchung des cTnT-Werts bei Verdacht auf Herzinfarkt bereits im klinischen Alltag obligat ist (Metzler et al., 2002).



**Abb. 21: Relation Troponin T-Konzentration und jeweilige Infarktgrößen in Bezug auf die AAR der Kontroll- und CpG-Gruppe,  $n = 21$ ;  $p < 0,0017$ ,  $r = 0,67$ ;  $r^2 = 0,45$ , 95 % confidence intervals: 0,31 – 0,86.**

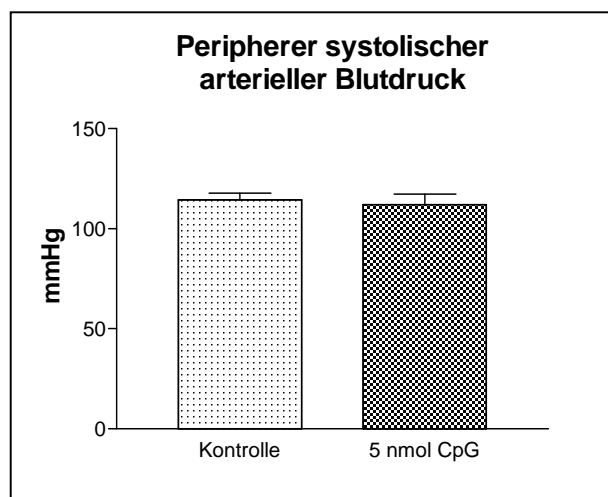
### 3.5 Blutdruckmessungen nach zwei Wochen Reperfusion

Zur erweiterten hämodynamischen Diagnostik erfolgten eine 2-wöchige Reperfusionphase und die invasive Blutdruckmessung mittels Millar-Katheter (Kap. 3.2.6.2). Im Vergleich zum non-invasiven Verfahren mit Hilfe der Echokardiographie bot sie in dieser Studie einige Vorteile (siehe auch Kap. 2.2 Punkt (3)). Denn das Ultraschallverfahren war zum einen abhängig von einem auf diesem Gebiet erfahrenen Untersucher, zum anderen erforderte es eine umfangreiche Ausrüstung. Die Messungen mit dem Herzkatheter dagegen beruhten lediglich auf den manuellen Fähigkeiten des Operateurs, wobei er diese bereits durch die Instrumentierung und Blutabnahme erlernte. Darüber hinaus sind die nötigen Instrumentarien wie Millar-Katheter und Power Lab Data Acquisition viel genutzte Geräte unserer Arbeitsgruppe. Lediglich die Invasivität des Eingriffs kann als nachteilig gewertet werden, da sie eine Wiederholung der Messungen verhindert.

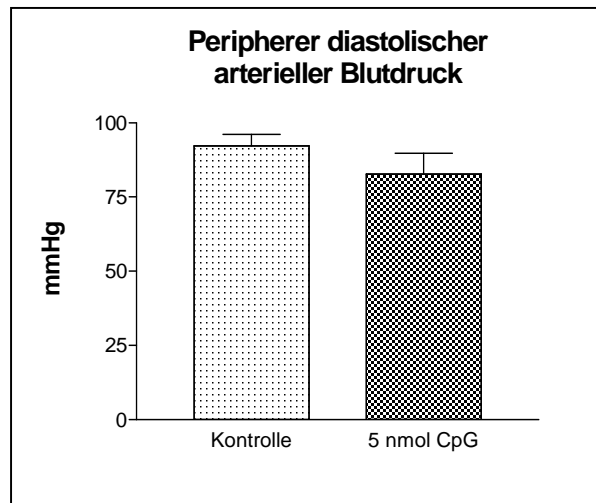
### 3.5.1 Peripherer Blutdruck

Der systolische und diastolische arterielle Blutdruck (SAP und DAP) war in beiden Gruppen (PBS und CpG) nicht signifikant unterschiedlich, ebenso wenig der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) (Abb. 22, Abb. 23 und Abb. 24).

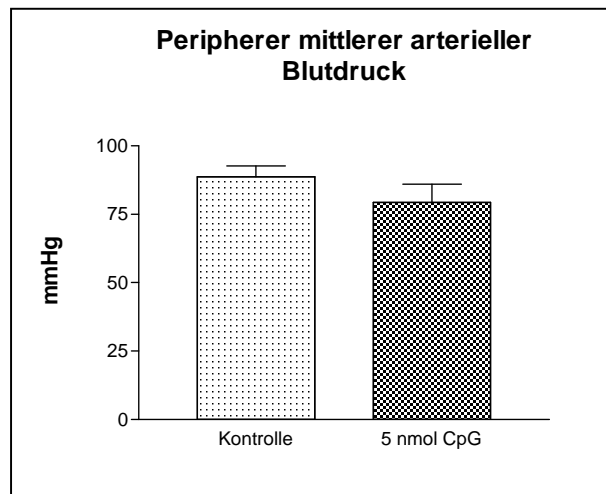
Interessanter Weise war jedoch bei den CpG-stimulierten Tieren (Gruppe 13) ein tendenziell niedrigerer diastolischer Druck festzustellen (DAP: Gruppe 12:  $92,22 \text{ mmHg} \pm 3,9$  (MW  $\pm$  SEM) bzw. Gruppe 13:  $82,80 \text{ mmHg} \pm 7,02$  (MW  $\pm$  SEM)) (Abb. 23).



**Abb. 22: Peripherer systolischer arterieller Blutdruck nach 60 min Okklusion und 14 d Reperfusion; Kontrolle:  $n = 8$ ; CpG:  $n = 5$ ;  $p > 0,05$ .**



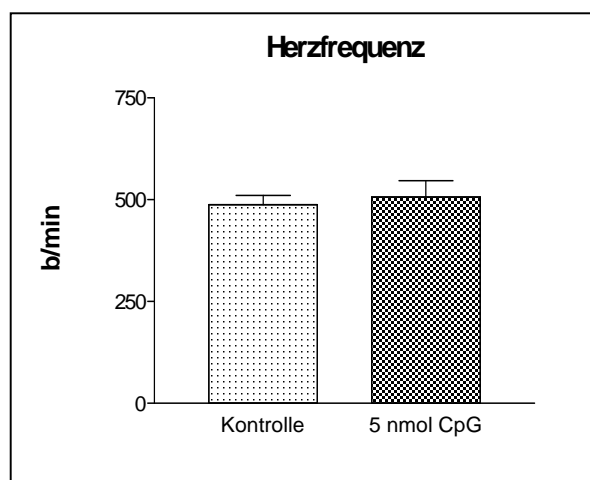
**Abb. 23.: Peripherer diastolischer arterieller Blutdruck nach 60 min Okklusion und 14 d Reperfusion, Kontrolle:  $n = 8$ ; CpG:  $n = 5$ ;  $p > 0,05$ .**



**Abb. 24.: Peripherer mittlerer arterieller Blutdruck nach 60 min Okklusion und 14 d Reperfusion, Kontrolle:  $n = 8$ ; CpG:  $n = 5$ ;  $p > 0,05$ .**

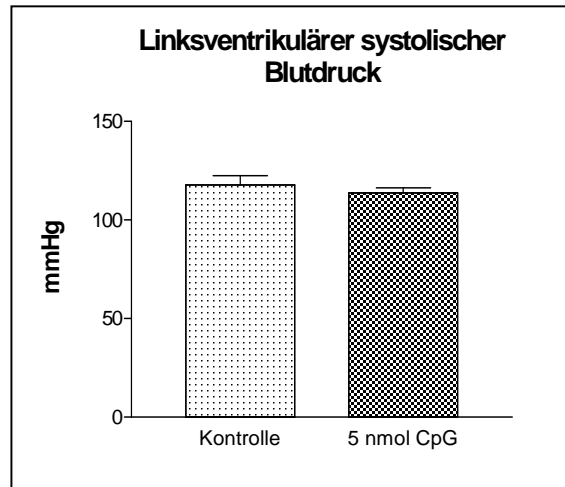
### 3.5.2 Herzfrequenz und linksventrikulärer Druck

Die Herzfrequenzen lagen bei einer Narkosetiefe von 1 Vol %-Isofluran® bei beiden Mausgruppen durchschnittlich bei 496,96 b/min. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede evaluieren (Gruppe 1: 487,5 b/min  $\pm$  22,85 (MW  $\pm$  SEM); Gruppe 3: 506,4 b/min  $\pm$  40,18 (MW  $\pm$  SEM) (Abb. 25).

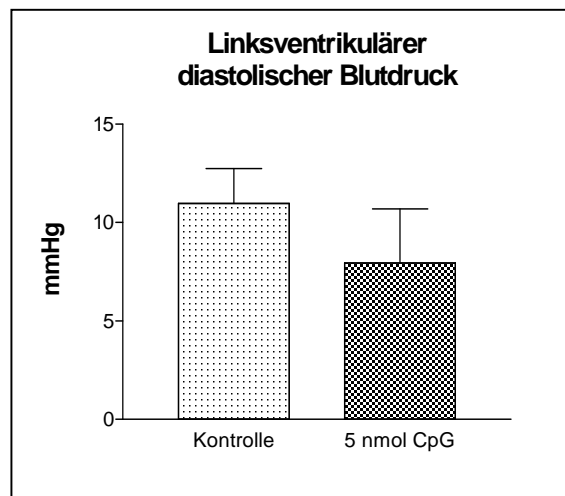


**Abb. 25: Herzfrequenzen unter 1 Vol% - Isofluran-Narkose nach 60 min Okklusion und 14 d Reperfusion; Kontrolle: n = 8; CpG: n = 5; p > 0,05.**

Die im linken Ventrikel gemessenen Blutdruckwerte unterschieden sich in den beiden Gruppen nicht signifikant (Abb. 26, Abb. 27 und Abb. 28). Von Interesse ist jedoch, dass auch hier ein tendenziell niedrigerer diastolischer Wert bei der CpG-stimulierten Gruppe 3 gefunden werden konnte (Gruppe 1: 10,96 mmHg  $\pm$  1,8 (MW  $\pm$  SEM); Gruppe 3: 7,94  $\pm$  2,76 (MW  $\pm$  SEM)) (Abb. 27).

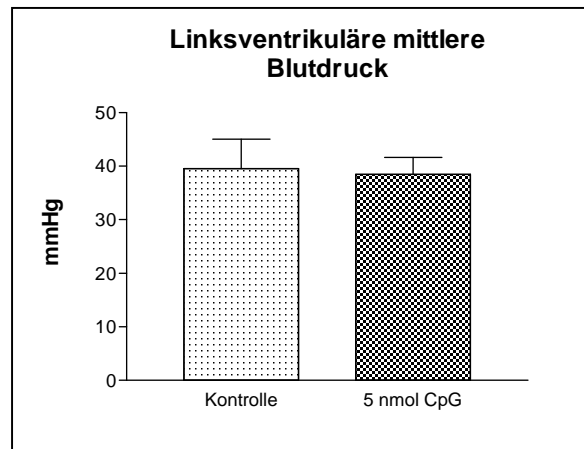


**Abb. 26: linksventrikulärer systolischer Blutdruck nach 60 min Okklusion und 14 d Reperfusion; Kontrolle:  $n = 8$ ; CpG:  $n = 5$ ;  $p > 0,05$ .**



**Abb. 27: linksventrikulärer diastolischer Blutdruck nach 60 min Okklusion und 14 d Reperfusion, Kontrolle :  $n = 8$ ; CpG:  $n = 5$ ;  $p > 0,05$ .**

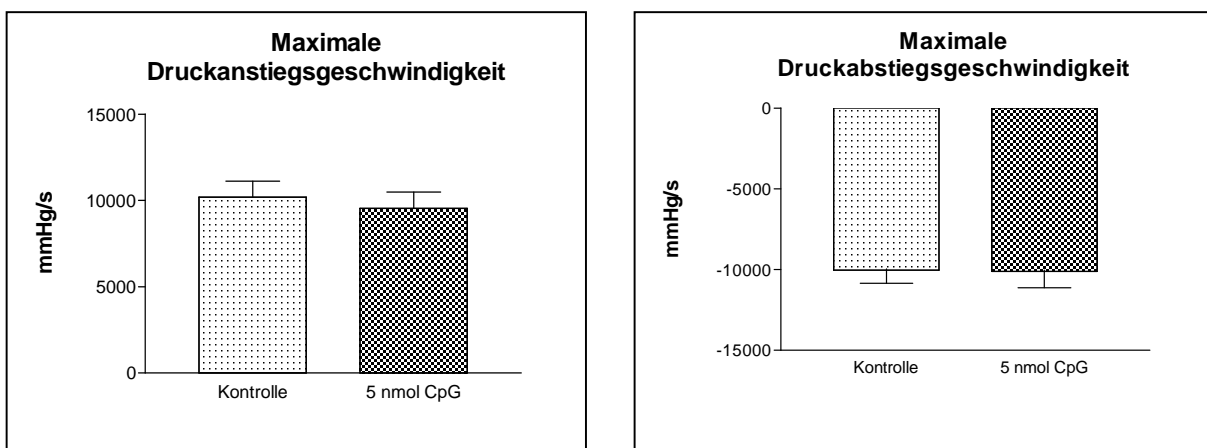




**Abb. 28:** linksventrikulärer mittlerer Blutdruck nach 60 min Okklusion und 14 d Reperfusion, Kontrolle:  $n = 8$ ; CpG:  $n = 5$ ;  $p > 0,05$ .

### 3.5.3 Maximale Druckerstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeiten

Bei dem Vergleich der maximalen Druckerstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeiten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 29). Die maximale Druckabstiegsgeschwindigkeit stellt dabei einen direkten Parameter der Relaxationsphase des Ventrikels dar.



**Abb. 29:** maximale Druckerstiegs- und- abstiegsgeschwindigkeiten nach 60 min Okklusion und 14 d Reperfusion; Kontrolle:  $n = 8$ ; CpG:  $n = 5$ ;  $p > 0,05$ .

### 3.5.4 Körpergewicht und Herzparameter

Um den Entwicklungsgrad der Tiere außer Acht lassen zu können wurden erneut die Herzparameter „linksventrikuläres Gewicht durch Tibialänge“ (LVW/TL) und „linksventrikuläres Gewicht durch Körpermasse“ (LVW/BW) ermittelt.

Gruppe	BW (g)	BW (g) (nach 2 Wo)	LVW (mg)	TL (mm)	LVW/TL (mg/mm)	LVW/BW (mg/g)
<b>Kontrolle</b>	21,98 ± 0,48	24,92 ± 0,5	97,85 ± 3,1	17,92 ± 0,09	5,46 ± 5,16	3,92 ± 0,08
<b>CpG</b>	21,72 ± 0,34	24,3 ± 0,23	90,87 ± 4,78	17,82 ± 0,09	5,09 ± 0,25	3,74 ± 0,18

**Tab. 6: Morphologische Daten nach 60 min Okklusion und 14 d Reperfusion, Kontrolle: n = 10; CpG: n = 6.**

Die Daten dokumentieren eine weitgehende Übereinstimmung beider Gruppen (Tab. 6). Signifikante Unterschiede lagen nicht vor. Die Tiere nahmen innerhalb der zwei Wochen etwa 3 g an Gewicht zu. Anzeichen einer linksventrikulären Hypertrophie post infarctem konnten zu diesem Zeitpunkt nicht diagnostiziert werden (Vgl. auch Tab. 5 und 6).

Im Übrigen bestätigten die Herzfärbungen und planimetrischen Auswertungen beider Gruppen den signifikanten Unterschied der Infarktgrößen auch nach zwei Wochen Reperfusion; die jedoch im Ausmaß durchschnittlich etwas geringer sind (Kontrollgruppe 12: 19,61% ± 4,26 (MW ± SEM); 1668-Thioat-5 nmol (Gruppe 13): 7,7% ± 1,86 (MW ± SEM)). Die AAR lag mit durchschnittlichen 64,42%, bezogen auf den linken Ventrikel, etwas höher als in den anderen Versuchen. Eine Signifikanz ließ sich hier nur für den Vergleich der AAR-Bezirke beider 1668-Thioat-Gruppen (3 und 13) evaluieren ( $p < 0,05$ ).

Die geringe Differenz der AAR-Größen (Gruppe 12: 61,88% ± 5,71 (MW ± SEM) bzw. Gruppe 13: 66,96% ± 5,08 (MW ± SEM)) deutet erneut auf eine gute Reproduzierbarkeit

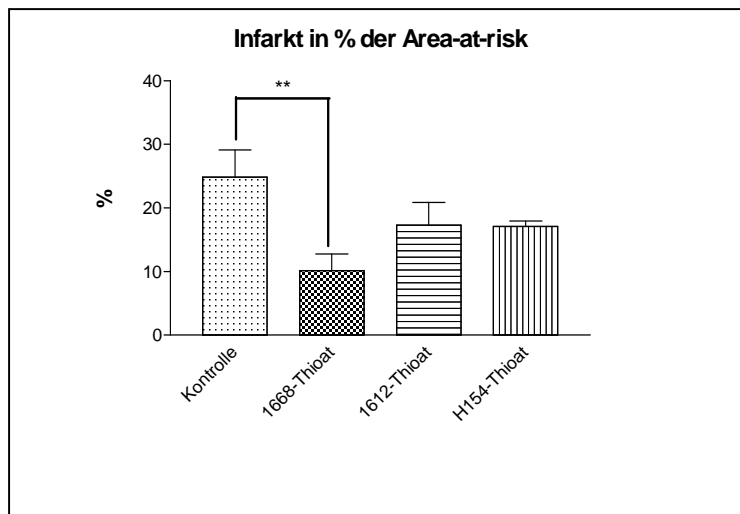
hin. Eine weitere kardiale Troponin T-Bestimmung erfolgte in diesem Versuchprotokoll nicht.

### **3.6 Ergebnisse der einzelnen Tiergruppen mit unterschiedlichen CpG-Sequenzen (sog. CpG-ODNs)**

#### **3.6.1 Vergleich unterschiedlicher CpG-ODNs**

Im Verlauf der Versuche gewann die Frage einer sequenzabhängigen myokardialen Wirkung zunehmend an Bedeutung. Bereits zuvor konnten Arbeitsgruppen den Nachweis erbringen, dass verschiedene Phosphorthioate bzw. ODNs unterschiedliche Effekte zur Folge haben (Chuang et al., 2002; Gursel et al., 2003; Knuefermann et al., 2008; Krieg, 2000; Mena et al., 2003; Yamada et al., 2004; Zheng et al., 2002).

Daher wurden weitere CpG-ODNs getestet. 1612-Thioat (5-GCT-AGA-TGT-TAG-CGT-3') mit einer neutralen und H154-Thioat (5-CCT-CAA-GCT-TGA-GGG-G-3') mit einer immunsuppressiven Sequenz wurden ausgewählt. Wieder wurde die Stimulation 16 h vor der Okklusion durchgeführt und eine 24 h Reperfusionsphase schloss sich dieser an. Herzfärbung, Aufbereitung und Herstellung der Schnitte, sowie die planimetrische Vermessung und Auswertung erfolgten wie oben bereits beschrieben.



**Abb. 30: Infarktgrößen nach Stimulation mit unterschiedlichen Thioat-Sequenzen; Kontrolle:  $n = 11$ ; 1668-Thioat:  $n = 10$ ; 1612-Thioat (Gruppe 6):  $n = 5$ ; H154-Thioat (Gruppe 7):  $n = 5$ ; \*\*  $p < 0,005$ .**

Wie in der graphischen Darstellung bereits erkennbar, liegt neben der Konzentrationsabhängigkeit (Kap. 3.2.3) auch eine Sequenzabhängigkeit vor. Die Kontrollgruppe (Gruppe 1) hatte eine Infarktgröße von  $25,09\% \pm 3,88$  (MW  $\pm$  SEM) bezogen auf die AAR, wohingegen die Tiere mit einer 5 nmolaren 1668-Thioat-Stimulation (Gruppe 3) eine signifikant geringere IA von  $10,14\% \pm 2,6$  (MW  $\pm$  SEM) aufwiesen ( $p = < 0,005$ ). Dies sind die oben aufgeführten Ergebnisse. Die Gruppen 6 (5 nmol 1612-Thioat) und 7 (5 nmol H154-Thioat) ließen jedoch mit Infarktgrößen von  $17,27\% \pm 3,6$  (MW  $\pm$  SEM) und  $17,08\% \pm 0,86$  (MW  $\pm$  SEM) keine signifikante Reduktion erkennen (Abb. 30). Die Infarktgröße der Tiere in Gruppe 6 und 7 lag genau zwischen der Kontrolle und der 1668 Gruppe. Die Vermutung liegt daher nahe, dass die myokardiale Wirkung der CpG-ODNs einer Spezifität unterliegt (siehe dazu Diskussion).

Darüber hinaus lagen die Größen der AAR bezogen auf den linken Ventrikel (LV) zwischen  $56,64\% \pm 5,4$  (MW  $\pm$  SEM) bei Gruppe 6 und  $58,89\% \pm 3,57$  (MW  $\pm$  SEM) bei Gruppe 7, womit die Reproduzierbarkeit der Daten einmal mehr demonstriert wird (vgl. Kap. 3.3.1).

### 3.6.2 Mortalitätsraten

Die Mortalitätsraten lassen keine eindeutige Aussage zu, da eine möglicherweise geringere Rate bei Gruppe 7 nur von einem Tier abhing (Tab. 7).

	Kontroll- gruppe	1668-Thioat (Gruppe 3)	1612-Thioat (Gruppe 6)	H154-Thioat (Gruppe 7)
<b>Tierzahl gesamt (n)</b>	32	13	14	13
<b>gestorben</b>	2	2	2	1
<b>Mortalität (%)</b>	12,5 %	15,4 %	14,3 %	7,7 %

**Tab. 7: Tierzahlen bei Stimulation mit unterschiedlichen Sequenzen**

### 3.6.3 Körpergewicht und Morphologie der Organe

Hier zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der 1. und 6. Gruppe hinsichtlich des Herzparameters LVW/TL (Tab. 8).

Gruppe	BW (g)	LV (mg)	TL (mm)	LVW/TL (mg/mm)	LVW/BW (mg/g)
<b>1</b>	23,01 ± 0,52	96,05 ± 5,58	16,73 ± 0,51	5,74 ± 0,26	4,16 ± 0,19
<b>3</b>	23,49 ± 0,62	90,19 ± 3,55	17,03 ± 0,19	5,29 ± 0,17	3,83 ± 0,13
<b>6</b>	21,5 ± 0,31	74,72 ± 5,52	16,90 ± 0,21	4,41 ± 0,29	3,47 ± 0,24
<b>7</b>	21,94 ± 0,24	79,36 ± 5,36	16,86 ± 0,14	4,71 ± 0,31	3,61 ± 0,22

**Tab. 8: Morphologische Parameter der Gruppen 1 (n = 11) , 3 (n = 10), 6 (n = 5) und 7 (n = 6).**

### 3.7 ELISA-Daten (Enzyme-linked Immunosorbent assay)

Die Aktivierung von TLR9 sowie eine Ischämie induzieren die Produktion proinflammatorischer Zytokine. Sie spielen darüber hinaus eine wichtige Rolle im Geschehen der I/R (Kap. 1.6). Daher wurde in dieser Studie die myokardiale Expression von IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  nach 3 h Reperfusion mittels ELISA quantifiziert (siehe Kap.2.3.2).

Die Ischämie von 60 min und 3 h Reperfusion führten in den Gruppen 1b, 3b und 6b zu einem signifikanten Anstieg der Expressionen von IL-1 $\beta$  und IL-6, wobei IL-6 generell den höchsten Anstieg aufwies (Abb. 32). Die Werte der Kontrolltiere (Gruppe 1b) beliefen sich für IL-1 $\beta$  auf  $3,16 \pm 0,66$  pg/mg Protein (n = 5) und für ihre SOP-Gruppe auf  $0,9 \pm 0,2$  pg/mg Protein (n = 4, p < 0,05). Die jeweiligen IL-6-Werte lagen dagegen bei  $8,05 \pm 2,81$  pg/mg Protein bzw. bei  $0,87 \pm 0,16$  pg/mg Protein für die Sham-Tiere. Ähnliches zeigte sich bei den anderen Vergleichen zwischen der I/R- und der jeweiligen SOP-Gruppe.

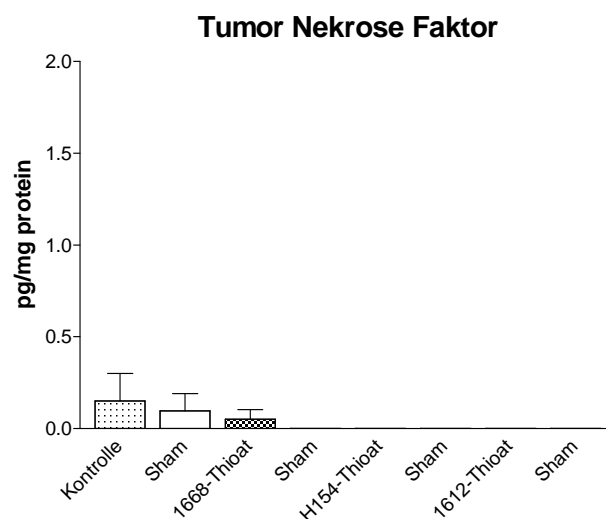
Lediglich die H154-Gruppe (n = 3) zeigte im Vergleich zu ihrer schein-operierten Gruppe (n = 2) keinen Anstieg.

Eine Ausnahme stellt die TNF-Expression dar, dessen Expression zu diesem Zeitpunkt nur bei drei Tieren in den Gruppen 1b, 3b und 8 leicht erhöht und ansonsten nicht detektierbar war (Abb. 31). Der Verdacht liegt nahe, dass es sich hierbei um einen methodischen Fehler handelte, so dass im Folgenden nicht weiter auf dieses Zytokin eingegangen werden soll.

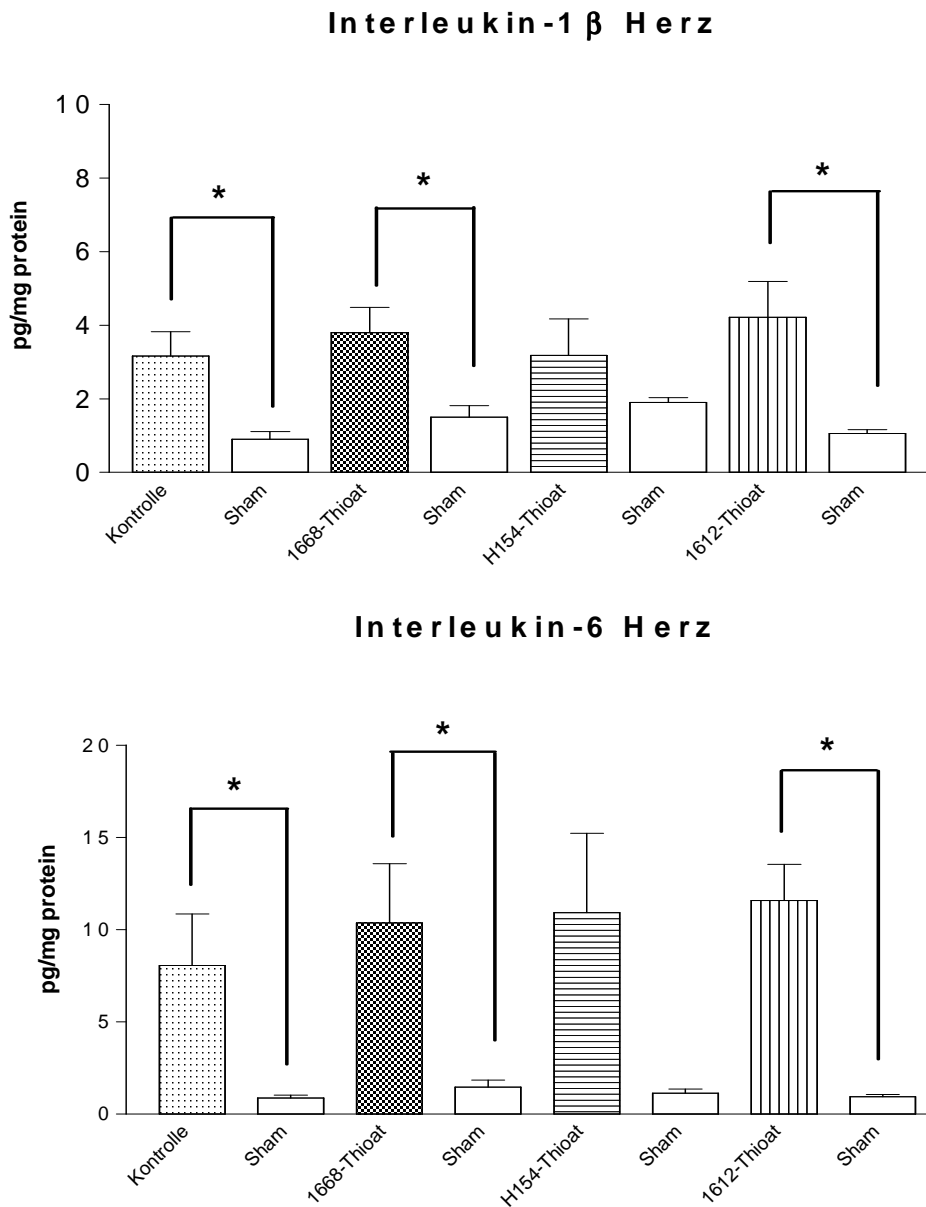
Wider Erwarten konnten bei der Kontrollgruppe (1b) und den vorbehandelten Tieren mit 1668-Thioat (Gruppe 3b) weder hinsichtlich der IL-1 $\beta$ - noch bei der IL-6-Expression signifikante Unterschiede ermittelt werden. Gleiches galt für die Verwendung der anderen Thioate. Ihr Vergleich mit der Kontrollgruppe sowie untereinander ließ interessanter Weise keine Signifikanzen erkennen.

Weiterhin waren auch zwischen den verschiedenen Sham-Gruppen mit unterschiedlicher Vorbehandlung im Bonferri Posthoc-Test keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die ermittelten Zytokine zu finden.

Bei weiteren Untersuchungen konnte jedoch eine Auffälligkeit beim Vergleich der Differenzen der jeweiligen Tiergruppen mit ihrer scheinoperierten Gruppe ermittelt werden. Diese Analyse ermöglichte es, die I/R Effekte isoliert zu eruieren unter Berücksichtigung der jeweiligen Vorbehandlung. Dabei zeigte sich, dass der Anstieg der Expressionen v. a. für IL-6, aber auch für IL-1 $\beta$  tendenziell bei den 1668 stimulierten Mäusen ( $n = 5$ ) geringer ausfiel als bei den Kontrolltieren ( $n = 5$ ) (Abb. 33). Der Zytokinanstieg der H154-behandelten Tiere ( $n = 3$ ) lag bei IL-1 $\beta$  tendenziell noch niedriger, wobei der IL-6-Anstieg dies nicht unterstützte (Abb. 33).

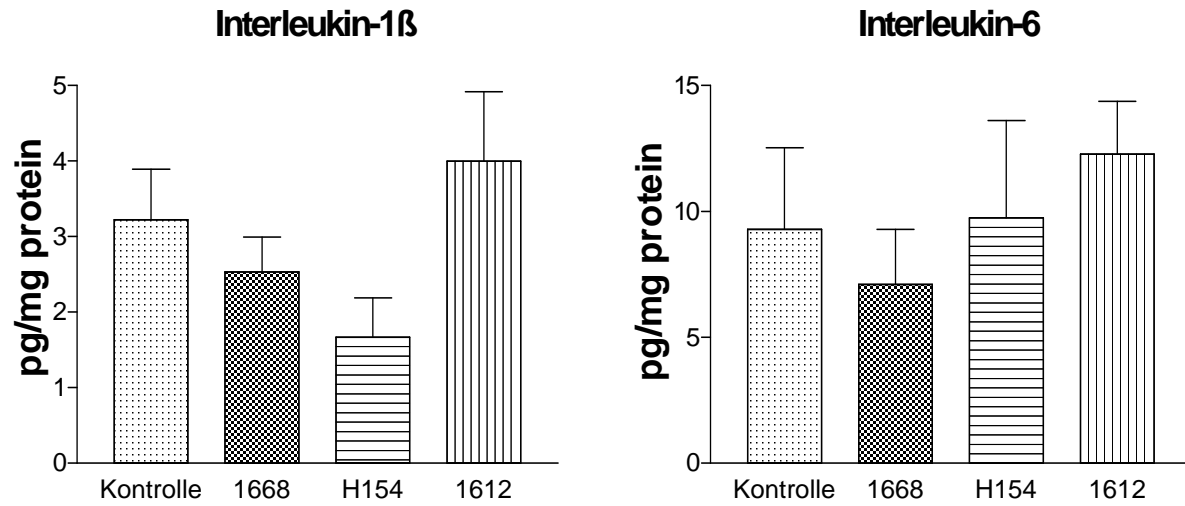


**Abb. 31: Proteinexpression des Zytokins TNF im Herzen nach 3 h Reperfusion**  
**Kontrolle (1b):  $n = 5$ ; K-Sham (8):  $n = 4$ ; 1668-T. (3b):  $n = 5$ ; 1668-Sham (9):  $n = 5$ ;**  
**H154-T. (7b):  $n = 3$ ; Sham-H154 (10):  $n = 5$ ; 1612-T. (6b):  $n = 5$ ; 1612-Sham (11):  $n = 5$ .**



**Abb. 32: Proteinexpression der Zytokine IL-6 und IL-1 $\beta$  im Herzen nach 3 h Reperfusion; Kontrolle (1b): n = 5; K-Sham (8): n = 4; 1668-T. (3b): n = 5; 1668-Sham (9): n = 5; H154-T. (7b): n = 3; Sham-H154 (10): n = 5; 1612-T. (6b): n = 5; 1612-Sham (11): n = 5; \* p < 0,05.**





**Abb. 33: Anstieg der Proteinexpression der Zytokine IL-6 und IL-1 $\beta$  im murinen Herzen nach 3 h Reperfusion: Kontrolle: n = 5; 1668-T.: n = 5; H154-T.: n = 3; 1612-T.: n = 3.**

## 4 Diskussion

Diese Arbeit untersuchte die Bedeutung von CpG-ODNs und TLR9 für den myokardialen Reperusionsversuch unter Verwendung eines sog. „closed chest“ Modells.

### 4.1 Mausmodell, Infarktmodell und Versuchsprotokolle

Das Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen und die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien des Myokardinfarktes wären ohne die Verwendung von Tiermodellen nicht möglich gewesen.

Bei der Auswahl eines geeigneten Modells spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Hierzu gehören neben dem wissenschaftlichen Hintergrund ethische und ökonomische Kriterien sowie die Reproduktivität der Ergebnisse. Darüber hinaus ist die Übertragbarkeit der Daten des Tiermodells auf den Menschen von Bedeutung. Es sei hier verdeutlicht, dass kein Modell alle pathophysiologischen Kriterien und klinischen Symptome beim Menschen darstellen kann. Das zumeist junge Alter der Tiere, die plötzliche chirurgische oder pharmakologische Intervention und die monofaktorielle Genese einer Erkrankung sind Nachteile vieler Tiermodelle (Muders und Elsner, 2000). Im Gegensatz dazu liegen beim Menschen bestimmte Erkrankungen, wie auch der Myokardinfarkt, erst im hohen Alter vor (siehe Kap. 1.1), beginnen schleichend (bezogen auf die Arteriosklerose) und sind oft mit anderen Erkrankungen vergesellschaftet (Bsp. Diabetes mellitus).

Unter den genannten Bedingungen hat sich in unserer Arbeitsgruppe das Mausmodell bewährt. Die Gründe hierfür sind bereits in der Arbeit von Frau Stapel zusammengefasst (Stapel, 2006).

Die Reproduzierbarkeit dieses Infarktmodells kann anhand der Area-at-risk (AAR) der verschiedenen Tiergruppen verdeutlicht werden (siehe 3.3.1 und 3.7.1). Sie rangierten zwischen 53,31 und 56,60% bzw. 56,64 und 58,89% bei einer durchschnittlichen Größe von insgesamt 56,36% bezogen auf den linken Ventrikel.

Vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe hatten Größen von durchschnittlich 45% bei C3H/HeN bzw. C3H/HeJ messen können (Kim et al., 2007; Stapel, 2006).

Die Varianzen lassen sich durch die individuellen Instrumentiertechniken sowie verschiedenen Mausstämmen begründen.

Wie bereits in Kap. 2.2 angesprochen, handelt es sich bei dem verwendeten Infarktmodell um ein „closed-chest“-Modell nach Nossuli, das von unserer Arbeitsgruppe übernommen und nur geringfügig verändert wurde (Nossuli et al., 2000; Osterkamp, 2006). Anhand der zeitlichen Abgrenzung der Initialoperation und des I/R-Protokolls von 5-7 Tagen, kann hier der Einfluss des operativen Traumas ausgeschlossen werden und ermöglicht die alleinige Analyse der jeweiligen Vorbehandlung bzw. I/R. Ein weiterer Vorteil dieses Modells besteht in der Verwendung unterschiedlicher Anästhetika bei den beiden Eingriffen. Denn verschiedene Arbeitsgruppen konnten unabhängig voneinander den halogenierten Anästhetika, insbesondere Isofluran®, präkonditionierende Effekte nachweisen (Belhomme et al., 1999; Cason et al., 1997; Kato und Foex, 2002; Ludwig et al., 2004). Um jedoch die alleinige Wirkung der CpG-Stimulation beurteilen zu können, wurde Isofluran nur während der Initialoperation verwendet (siehe Kap. 2.3.1). Als volatives Inhalationsnarkotikum ermöglicht es ein schnelles An- und Abfluten ohne dabei metabolisiert zu werden.

Bei der Infarzierung hingegen kam Propofol® zum Einsatz (siehe Kap. 2.3.3.). Es handelt sich hierbei um ein Injektionsanästhetikum, das gut verträglich ist, so dass eine Mehrfachgabe unproblematisch ist. Wichtig dabei war jedoch, dass im Rahmen von Infarktstudien nur ein geringer Einfluss auf die Infarktgröße diagnostiziert werden konnte (Cope et al., 1997) und erst bei sehr hohen Propofol-Dosen waren kardioprotektive Effekte *in vitro* nachweisbar, die weit über den *in vivo* messbaren Plasmakonzentrationen lagen (Kato und Foex, 2002; Ko et al., 1997; Kokita et al., 1998).

Die molekularen Grundlagen dieser positiven kardialen Effekte sind vielfältig und noch nicht abschließend geklärt. Erste Studien machen beispielsweise die Reduktion freier Radikale oder die Hemmung der Neutrophilenaktivität dafür verantwortlich (Cope et al., 1997; Kato und Foex, 2002; Zaugg et al., 2002). Im Gegensatz zu Propofol führte eine Isofluranverwendung zu denselben Mechanismen, wie sie für die ischämische Präkonditionierung beschrieben werden konnten (siehe Kap. 1.2) (Cope et al., 1997;

Ismaeil et al., 1999). Darüber hinaus implizieren verschiedene Studien, dass der kardioprotektive Einfluss auf der Inhibition verschiedener unspezifischer Rezeptoren beruht, wobei eine erhöhte Membranfluidität entscheidend sein soll (Kariko et al., 2004; Plachinta et al., 2003). Erst kürzlich erschienene Studien berichten, dass eine Isofluran-Präkonditionierung neben reduzierten Infarktgrößen einen Anstieg der HSP27-Expression, eine Reduktion des NK- $\kappa$ B sowie eine Hemmung der p38MAPK-Aktivität zur Folge hat und damit zu Veränderungen der Zytokinexpression führt (Ran et al., 2007; Ran et al., 2008). Letztlich war das „closed-chest“-Modell auch unter dem Aspekt der Messung kardialer Parameter wie beispielsweise arterieller Blutdruck und Druckanstiegsgeschwindigkeit sinnvoll. Denn Guo et al. wiesen nach, dass es durch die künstliche Beatmung im Rahmen des „open-chest“-Modells zu einem Verlust des negativen intrathorakalen und des positiven endexpiratorischen Drucks kommt, wodurch eine arterielle Hypotension hervorgerufen wird (Guo et al., 1998). Dies hätte Einfluss auf die unter Kap. 3.5 aufgeführten Daten haben können.

In der vorliegenden Studie kamen drei verschiedene Versuchsprotokolle zur Anwendung (siehe Kap. 2.2). Dies lag zum einen daran, dass das ursprüngliche Protokoll zu eng gefasst war und die Tiere, noch bevor alle Parameter gemessen werden konnten, verstarben (siehe Kap. 2.2). Zum anderen erschwerten logistische und zeitliche Rahmenbedingungen die Arbeit zusätzlich.

Darüber hinaus sollten weitere Versuchsreihen einen Einblick in die molekularbiologischen Hintergründe (Kap. 2.4) und funktionellen Veränderungen im Myokard ermöglichen (Kap. 2.3.7). Studien hatten zeigen können, dass es nach einem akuten Myokardinfarkt zu einer komplexen Strukturveränderung sowohl im nichtinfarzierten als auch im infarzierten Gebiet des Ventrikels kommt (Bolognese und Cerisano, 1999; Pfeffer und Braunwald, 1990). Letzteres zeichnet sich durch die Reparation und Separation des nekrotischen Gewebes aus sowie durch die Einwanderung von verschiedenen Zellen wie Fibroblasten. Die durch die Ischämie eingeleiteten Entzündungs- und Heilungsprozesse führen hier über die Bildung von Granulationsgewebe zur bindegewebigen Vernarbung des Myokards, histologisch als sog. Herzschwiele bezeichnet. Sie kann je nach Ausmaß eine regionale Ausdünnung und Dilatation verursachen. Dieser Prozess setzt bereits innerhalb eines

Tages post infarctem ein und ist i. d. R. nach ca. 6 Wochen abgeschlossen (Weisman et al., 1985). Im nichtinfarziertem Gebiet hingegen kommt es infolge der erhöhten mechanischen Beanspruchung und der neurohormonalen Aktivierung zu den Prozessen des Remodellings (siehe Kap. 1.2). Studien konnten zeigen, dass das linksventrikuläre Remodelling schon in den ersten Stunden nach Infarkt ein- und sich progressiv fortsetzte (Hochman und Bulkley, 1982; Korup et al., 1997). Der in dieser Studie gewählte Zeitpunkt von zwei Wochen erschien daher ausreichend, um die dargestellten Veränderungen mit Hilfe des Millar-Katheters und der TTC-Färbemethode zu eruieren.

Die Analyse der Expression kardialer Zytokine erfolgte nach 3 h Reperfusion in Anlehnung an die Studien unserer Arbeitsgruppe mit LPS-Stimulation (Stapel et al., 2006).

Bemerkenswerterweise konnten beim Vergleich der planimetrisch ermittelten Datensätze nach 24 h Reperfusion (Kap. 3.3.1) mit denen nach zwei Wochen (Kap. 3.5.4 unten) qualitativ keine Abweichungen gefunden werden. Allerdings waren die Infarktareale nach zwei Wochen durchschnittlich kleiner (Kap. 3.5.4).

Ähnliches konnte im Rahmen der LPS-Studien demonstriert werden. Während Chong et al. bereits nach zwei Stunden Reperfusion die Infarktgrößen untersuchten, wurde dies bei Oyama und Mitarbeiter sowie bei Stapel et al. erst nach 24 h durchgeführt (Chong et al., 2004; Oyama et al., 2004; Stapel et al., 2006). Qualitativ stimmten auch ihre Ergebnisse untereinander und mit denen dieser Studie nahezu überein.

Eine aktuelle Studie von Ojha und Mitarbeitern untersuchte nach 60-minütiger Ischämie und unterschiedlichen Reperfuionszeiten (1 h, 1 d, 3 d, 7 d und 14 d) die strukturellen und funktionellen Veränderungen im murinen Herzen (Ojha et al., 2008). Sie wiesen u. a. nach, dass die mit Hilfe der TTC-Färbung ermittelten Infarktareale nach drei Tagen ihre maximale Größe erreichten. Davor und danach ermittelte Infarktgrößen waren reduziert, somit auch die Werte nach zwei Wochen wie es in der vorliegenden Studie der Fall war. Damit unterstützen sie die Ergebnisse dieser Arbeit, die als valide anzusehen sind. Darüber hinaus beschreiben die Daten von Ojha et al. u. a. das Phänomen des reperfuionsbedingten Schadens (siehe auch Kap. 1.1), wonach dem eigentlichen ischämischen Schaden ein weiterer durch die induzierte Entzündungsreaktion folgt. Diese bedingte die Vergrößerung des Myokardinfarktes in den ersten Tagen. Die reduzierten Werte nach 7

bzw. 14 Tagen führten Ojha et al. auf die mit der Narbenbildung einhergehende Wundkontraktur zurück, wobei die Fibroblasten des Infarktgebietes eine entscheidende Rolle spielen (Ojha et al., 2008).

## **4.2 Einfluss von TLR9 und CpG-ODN auf die Infarktgröße**

Bisher liegen keine vergleichbaren Studien vor, die die Bedeutung und Funktion von Toll-like Rezeptor 9 und seinen Liganden im Myokard eruierten. Umso wichtiger sind die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit. Sie umfasst zum einen die Auswirkungen verschiedener CpG-ODNs auf die Größe des Infarktes. Zum anderen beschreibt sie die Effekte von 1668-Thioat auf die Funktion und Hämodynamik des Herzens sowie auf die kardiale Plasmatroponin T-Konzentration (cTnT).

Bewiesen ist die konstitutive Expression des Rezeptors im Myokard (Boyd et al., 2006; Knuefermann et al., 2008; Rodrigues-Martinez et al., 2005; Zarembek und Godowski, 2002). Hemmi und Mitarbeiter hatten zuvor zeigen können, dass sein primärer Ligand die bakterielle DNA ist (Hemmi et al., 2000). Darüber hinaus wiesen Krieg et al. nach, dass unmethylierte CpG-Dinukleotide für die immunmodulatorischen Effekte verantwortlich sind, und dass ihr synthetisches Äquivalent, sog. CpG-ODNs, potente Agonisten darstellen (Krieg et al., 1995).

In Anlehnung an vorangegangene LPS-Studien unserer Arbeitsgruppe (Stapel, 2006) wurde im vorliegenden Projekt eine CpG-Stimulation 16 h vor Infarkt durchgeführt. Die in Kapitel 3 vorgestellten Daten zeigen, dass die Kontrolltiere (Gruppe 1) nach I/R einen etwa 50% größeren Myokardinfarkt aufwiesen als die Tiere mit einer 5 nmol 1668 Thioat Stimulation (Gruppe 3). Dabei wurde das genaue Ausmaß des Infarktareals nach 24 h Reperfusion und TTC-Färbung planimetrisch vermessen. Die Arbeit erweitert damit die bisherigen Studien der myokardialen Präkonditionierung (siehe Kap. 1.2) und impliziert, dass die Infarktgröße über eine Aktivierung des Toll-like Rezeptors 9 maßgeblich beeinflusst werden kann.

Da bisher in der Literatur keine vergleichbaren Daten hinsichtlich der Auswirkung bakterieller DNA bzw. CpG-ODNs auf die Größe des Myokardinfarktes vorliegen, sollen im Folgenden andere Möglichkeiten der myokardialen Präkonditionierung diskutiert werden.

Zacharowski et al. hatten beispielsweise den präkonditionierenden Effekt einer LPS-Vorbehandlung 16 h vor Infarkt im Rattenmodell demonstrieren können (Zacharowski et al., 2000). Dabei wiesen die Tiere nach 25-minütiger Ischämie und 2 h Reperfusion ein um 65% reduziertes Infarktareal auf. Qualitativ entspricht das in etwa den vorliegenden Ergebnissen.

Während diese Studie nahe legt, dass eine LPS-Präkonditionierung zu besseren Ergebnissen führt als die der CpG-Stimulation, deutet eine Studie unserer Arbeitsgruppe auf eine ebenbürtige Wirkung hin. Sie evaluierte die Effekte einer LPS-Stimulation 16 h vor Ischämie in einem Mausmodell. Dabei zeigte sich nach 60-minütiger Ischämie und 24 h Reperfusion ein um 50% größerer Myokardinfarkt bei WT-(C3H/HeH) Mäusen mit PBS-Vorbehandlung im Vergleich zu WT-Mäusen mit LPS-Gabe (Stapel, 2006).

Die im Rahmen der IPC erzielten Effekte sind stark abhängig von den verwendeten Ischämie/Reperfusionszeiten und -zyklen sowie den verwendeten Tiermodellen (Behrends et al., 2000; Belosjorow et al., 1999; Fisher und Marber, 2002; Guo et al., 1998; Hiasa et al., 2001; Stapel, 2006). Dabei gab es Versuche ohne erkennbare präkonditionierende Wirkung und solche mit einer Infarktreaktion bis zu 75% (Guo et al., 1998; Stapel, 2006). Derartige Schwankungen traten bei der Präkonditionierung mit CpG 1668 nicht auf.

Die in der vorliegenden Studie mit einer CpG-Vorbehandlung erzielte Halbierung der Infarktgröße im Vergleich zu unbehandelten WT-Mäusen ist bisher einzigartig in der Literatur und erweitert damit die bisherigen Erkenntnisse hinsichtlich der Möglichkeiten einer myokardialen Präkonditionierung (siehe Kap. 1.2).

Darüber hinaus zeigte sich in dieser Studie, dass die myokardiale Wirkung der CpG-Behandlung konzentrationsabhängig war. Wie in Kapitel 3.2.3 dargestellt, führte eine Behandlung mit 1 nmol-Lösung (Gruppe 2) zu keinen erkennbaren Auswirkungen auf die Größe des Myokardinfarktes. Erst die Gabe von einer 5 nmol-Lösung hatte eine signifikante Reduktion zur Folge. Bei höheren Konzentrationen traten mehr und mehr die

systemischen Effekte in den Vordergrund, bei nur geringer bis keiner präkonditionierenden Wirkung. In der Tiergruppe mit einer Gabe von 20 nmolarer 1668-Thioat-Lösung trat dagegen eine Letalität von 80% auf. Die Stimulation mit 10 nmol lag mit 54% Mortalität schon niedriger, wohingegen die Gruppen mit einer 5 oder 1 nmol CpG-Dosis zusammen mit der Kontrollgruppe ohne CpG-Stimulation die geringsten Todesfälle aufwiesen (14,3 bzw. 12,5%) (siehe Tabelle 3.2).

Andere CpG-Studien beschrieben bereits zuvor die konzentrationsabhängigen Effekte. So fanden Hemmi und Mitarbeiter eine Splenozytenproliferation in Abhängigkeit von der jeweilige CpG-Dosis (Hemmi et al., 2000) und Zheng et al. demonstrierten eine dosisabhängige Induktion der Neovaskularisation in der Kornea von Mäusen (Zheng et al., 2002).

Ursache der erhöhten Mortalitätsrate stellt vermutlich die vermehrte systemische Produktion proinflammatorischer Zytokine dar (siehe dazu auch Kap. 1.6 und 4.3). Vorangegangene Studien hatten zeigen können, dass ihre Überexpression mit der Entstehung einer Sepsis sowie kardiovaskulärer Dysfunktionen vergesellschaftet war (Cain et al., 1999; Kumar et al., 1996; Parker et al., 1984; Werdan und Muller-Werdan, 1996). Weiterhin gelang es verschiedenen Arbeitsgruppen im Rahmen experimenteller Sepsismodelle erhöhte Zytokinkonzentrationen im Herzen nachzuweisen (Giroir et al., 1992; Kapadia et al., 1995). Eine aktuelle Studie unserer Arbeitsgruppe demonstrierte darüber hinaus, dass sowohl die kardiale Expression relevanter Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6) als auch ihr erhöhtes systemisches Vorliegen nach CpG-Stimulation induziert wurde (Knuefermann et al., 2008). Bereits zuvor hatten Sparwasser und Mitarbeiter nachweisen können, dass eine hohe CpG-Dosis zur sepsisähnlichen Symptomatik und meist zum Tode führte (Sparwasser et al., 1997a; Sparwasser et al., 1997b). Demnach liegt der Verdacht nahe, dass die höheren CpG-Dosierungen der vorliegenden Studie zur übermäßigen Expression sepsisrelevanter Zytokine führte und dadurch die erhöhte Sterblichkeit bedingte.

Die dargestellten Auswertungen demonstrieren auch, dass die myokardialen Effekte der CpG-ODN-Stimulation einer Sequenzspezifität unterlagen (siehe Kap. 3.7). Während eine Behandlung mit 1668-Thioat (welches sog. `CpG-Motive` beinhaltet: 5`-TCC-ATG-ACG-



TTC-CTG-ATG-CT) zur signifikanten Reduktion der Infarktgröße um 50% führte, konnten nach einer Stimulation mit zwei nicht CpG-beinhaltenen Oligonukleotiden ODN 1612 (5'-CT-AGA-TGT-TAG-CGT-5) oder ODN H152 (5'-CCT-CAA-GCT-TGA-GGG-G-3) keine prä-konditionierende Effekte ermittelt werden. Diese Thioate unterschieden sich lediglich in der Abfolge ihrer Purin- und Pyrimidinbasen. Demnach demonstriert diese Arbeit, dass auch im Herzen das Vorhandensein sog. CpG-Motive für die Aktivierung des TLR9 ausschlaggebend ist. Gleiches konnte in unserer Arbeitsgruppe auf molekularer Ebene demonstriert werden (Knuefermann et al., 2008). So führte die Stimulation mit 1668-Thioat zur Induktion der Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  sowie der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B bei C57BL/6, wohingegen eine Behandlung mit H154- bzw. 1612-Thioat keine vermehrte Freisetzung der genannten Mediatoren zur Folge hatte (Knuefermann et al., 2008). Damit unterstützen sie die Ergebnisse dieser Arbeit, die als valide einzuschätzen sind.

Die Wahl der verwendeten ODNs erfolgte in Anlehnung an eine Studie von Yamada et al. (Yamada et al., 2004). Sie hatten die supprimierende Wirkung bestimmter ODNs ohne CpG-Motive auf die CpG-induzierte Entzündungsreaktion in der Lunge von Mäusen feststellen können (Yamada et al., 2004). Ähnliches war von anderen Arbeitsgruppen demonstriert worden (Gursel et al., 2003; Gursel et al., 2002; Pisetsky und Reich, 2000; Wloch et al., 1998). Dabei scheinen supprimierende ODNs durch ihren hohen Anteil an Guanosin sog. G-Tetraden zu bilden, die eine Interaktion zwischen CpG-DNA und TLR9 stören können (Gursel et al., 2002). Die Sequenzspezifität fiel auch in verschiedenen anderen Studien auf (Chuang et al., 2002; Krieg, 2000; Zheng et al., 2002). Krieg und Mitarbeiter demonstrierten darüber hinaus eine Speziespezifität bei der Erkennung der CpG-ODNs und der folgenden Immunreaktion (Krieg, 2000). Verthelyi et al. zeigten außerdem, dass humane Zellen des Blutes unterschiedliche CpG-Motive registrieren und verschieden reagieren (Verthelyi et al., 2001).

In diesem Kontext sollten folgende Studien nicht unerwähnt bleiben. So zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, dass CpG-Sequenzen unspezifisch zellulär aufgenommen und einer endosomalen Acidifikation unterzogen wurden, bevor sie die Signaltransduktion induzieren konnten (Ahmad-Nejad et al., 2002; Hacker et al., 2000; Knuefermann et al.,

2008). Die MyD88-Rekrutierung jedoch scheint einer Sequenzabhängigkeit unterworfen zu sein und immunstimulatorische CpG-Motive zu erfordern (Ahmad-Nejad et al., 2002). Damit führt die zelluläre Aufnahme und womöglich sogar die TLR9-Bindung nicht zwangsläufig zur Aktivierung des Rezeptors (Kindrachuk et al., 2007; Kindrachuk et al., 2008). Die vorliegende Arbeit demonstriert zwar, dass das Myokard zu einer Diskriminierung der verschiedenen ODN-Sequenzen in der Lage ist, zeigt jedoch nicht auf welcher Ebene diese stattfindet.

Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit lassen folgende Arbeitshypothesen zu:

1. Eine CpG-Vorbehandlung führt zur Desensibilisierung des Myokards und verringert die Entzündungsreaktion nach I/R
2. Die reduzierte Entzündungsantwort wiederum bedingt zum einen einen kleineren Infarkt zum anderen verbessert es die ventrikuläre Funktion post infarctem
3. Dabei sind die myokardialen Effekte von der Qualität und Quantität der verwendeten CpG-ODNs abhängig

In den folgenden Kapiteln sollen die Vorgänge der CpG-Stimulation und der Entstehung eines Infarktes mit den vorgestellten Hypothesen in Einklang gebracht werden.

#### **4.3 Herzinfarkt Diagnostik und Einfluss von CpG-ODN auf die kardiale Troponin T (cTnT)-Konzentration**

Die vorgestellten Daten demonstrieren, dass die Kontrollgruppe nach I/R einen etwa 65% höheren Troponin T-Wert im Blut aufwies als die CpG-stimulierten Tiere (Gruppe 3). Dabei erfolgte die Messung der Konzentrationen nach 24 h Reperfusion und noch vor der

Herzfärbung. Reduzierte kardiale Troponin T-Plasmakonzentrationen (cTnT) weisen auf einen geringeren Myokardschaden hin (siehe Kap. 1.7). Damit demonstriert diese Arbeit erstmals, dass die CpG-vermittelte Reduktion des Myokardinfarktes mit einer reduzierten cTnT-Konzentration einhergeht. Darüber hinaus konnte in dieser Studie eine enge Korrelation ( $p < 0,0017$ ) zwischen der Infarktgröße und der cTnT-Plasmakonzentration erhoben werden (Kap. 3.4).

Eine Studie von Metzler et al. hatte in ähnlicher Weise eine solch enge synergistische Beziehung demonstrieren können (Metzler et al., 2002). Dabei wurde in einem murinen „open-chest“ Modell nach Michael et al. die Infarktgröße des linken Ventrikels in Relation zur Plasma-cTnT-Konzentration gesetzt und eine enge Übereinstimmung gefunden (Metzler et al., 2002; Michael et al., 1995). Gleiches war in einer Studie mit Beageln demonstriert worden (Remppis et al., 2000). Aartsen und Mitarbeiter hingegen fanden in einem experimentellen Mausmodell wie in dem von Metzler et al. keine Korrelation beider Parameter (Aartsen et al., 2000; Metzler et al., 2002). Dabei untersuchten sie die Plasmakonzentrationen des Herz-/Skelettmuskel-Fettsäurebindungsproteins (H-FABP) sowie die des kardialen Troponin T (cTnT) nach 4, 24 und 48 Stunden. Mögliche Ursache dieser Diskrepanz ist wahrscheinlich die zu geringe Tierzahl dieser Studie ( $n = 9$ ), die für die Berechnung eines Korrelationseffizienten unzureichend war. Aber auch der Zeitpunkt der Messung spielt eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zu Myoglobin und CK-MB sind Troponine für die Frühdiagnose eines akuten Myokardinfarktes nicht geeignet (Deutsche Gesellschaft für Laboriumsmedizin). Sie besitzen zwar ein diagnostisches Fenster von drei Stunden bis zwei Wochen, welche jedoch auch einem biphasischen Verlauf unterliegt, mit einem Maximum am 1. Tag (zytoplasmatische Pools) und am 4. Tag (Freisetzung des strukturegebundenen Pools) (Katus et al., 1991; Remppis et al., 1994). Demnach ist eine frühzeitige Untersuchung mit Ungenauigkeiten behaftet. Darüber hinaus konnten Stiegler und Mitarbeiter demonstrieren, dass die Ergebnisse vom jeweiligen Medium wie Serum oder Heparin-Plasma abhängen (Stiegler et al., 2000).

Erste klinische Studien untermauern dagegen zusätzlich die Ergebnisse dieser Studie, wonach die Höhe der kardialen Troponin T Konzentration eine Einschätzung der Myokardgröße ermöglicht (Steen et al., 2006; Steen et al., 2007). Zusammen mit den

Studien von Metzler et al. (2002) und Remppis et al. (2000) sowie der hohen Tierzahl ( $n = 21$ ) und engen Korrelation ( $p < 0,0017$ ) der vorliegenden Arbeit, kann von einem aussagekräftigen Datensatz gesprochen werden. Die Ergebnisse dieser Studie können demnach als valide angesehen werden.

Der klinische Stellenwert einer Plasma-cTnT-Konzentrationsmessung besteht zum einen darin, fragliche Myokardinfarkte auszuschließen. Zum anderen ist sie bei der Risikostratifizierung einer instabilen Angina pectoris hilfreich (Hamm, 1999; Heschen et al., 1999). Die einfache Handhabung und schnellere Laufzeit der neuen Geräte bieten zusätzliche Vorteile v. a. für kleine Krankenhäuser ohne eigenes Labor (Muller-Bardorff et al., 1999). Wichtig ist, dass diese Studie zeigte, dass anhand der Höhe der gemessenen cTnT-Plasmakonzentration indirekt ein Rückschluss auf die Größe des Infarktes erfolgen kann.

#### **4.4 Expressionsanalyse - Entzündungsmediatoren**

Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 induziert die Expression proinflammatorischer Zytokine. Unsere Arbeitsgruppe demonstrierte erst kürzlich, dass einer CpG-Stimulation innerhalb der ersten 1-2 Stunden ein schneller Anstieg der Proteinexpression von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 im myokardialen Gewebe folgte (Knuefermann et al., 2008). Entsprechend der oben dargelegten Arbeitshypothese sollte einer CpG-Präkonditionierung ein Anstieg der Zytokinexpression folgen, und bei einem zweiten Stimulus in Form der I/R ihre Reduktion nachweisbar sein.

Die in Kapitel 3.6 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass in allen Gruppen, die einer I/R unterzogen wurden, erhöhte Expressionen der Zytokine IL-6 und IL-1 $\beta$  nachweisbar waren. Jedoch hatten weder die 1668-Thioat-Vorbehandlung noch die der anderen Thioate eine signifikante Auswirkung auf die myokardiale Zytokinsynthese nach I/R im Vergleich zur PBS-Gabe. Auch bei den vorbehandelten scheinoperierten Tieren (Gruppen 8-11) war kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Dies widerspricht der dargelegten Hypothese.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass zum Zeitpunkt der Organentnahme die CpG-Stimulation bereits 20 h zurück lag, wohingegen die Ischämie 3 h zuvor stattfand und gerade die zeitlichen Aspekte hier eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. So wiesen Knuefermann und Mitarbeiter nach, dass der Zytokinanstieg im Herzen nach zwei Stunden sein Maximum erreichte, um dann zur Ausgangskonzentration zurückzukehren (Knuefermann et al., 2008).

In ähnlicher Weise war zuvor in einer Studie unserer Arbeitsgruppe aufgefallen, dass weder nach einer LPS-Vorbehandlung noch nach einer IPC eine signifikante Zytokinreduktion nach 3 h Reperfusion im Vergleich zur PBS-Behandlung nachweisbar war (Stapel, 2006). Dem gegenüber steht eine Arbeit von Hiasa et al. (Hiasa et al., 2001). Sie berichteten von einer verminderten Zytokinexpression nach myokardialer Ischämie und LPS-Vorbehandlung bzw. IPC bei Ratten (Hiasa et al., 2001).

Um den Anstieg der Zytokinexpression nach I/R unabhängig von der jeweiligen Vorbehandlung untersuchen zu können und einen Vergleich mit den Daten der Literatur zu ermöglichen (Chong et al., 2004; Stapel, 2006), wurden die I/R Werte einer Normierung auf die SOP-Daten unterzogen. Hier zeigte sich zwar, dass der Anstieg bei 1668-Thioatvorbehandelten Tieren tendenziell geringer ausfiel als bei den Kontrolltieren, jedoch nicht signifikant war (Kap. 3.6 und Abb. 32).

Bei einer Vorbehandlung mit LPS dagegen konnte eine signifikante Reduktion des Zytokinanstiegs nach I/R im Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden, wie es für die CpG-Stimulation auch zu erwarten gewesen wäre (Stapel, 2006). Inwiefern hier zeitliche Aspekte und die Anzahl der Tiere ausschlaggebend waren oder aber LPS einen potenteren Stimulus hinsichtlich der Freisetzung relevanter Zytokine darstellt, ist noch offen. Allerdings war die Reduktion der Infarktgröße nach CpG-Stimulation vergleichbar der nach LPS-Präkonditionierung (vgl. Kap. 4.2).

Darüber hinaus deuten weiterführende Projekte unserer Arbeitsgruppe auf mRNA-Ebene darauf hin, dass die genannten Zytokine durchaus nach 1668-CpG-ODN-Stimulation vermehrt induziert werden. Der Expressionsanstieg von IL-6, TNF und IL-1 $\beta$  war nach 2 h signifikant höher als bei den Kontroll- bzw. 1612- und H154-CpG-ODN-vorbehandelten Tieren.

## 4.5 Hämodynamische und funktionelle Aspekte einer CpG-Stimulation

Die in Kap. 3.5 vorgestellten Ergebnisse zur Hämodynamik hatten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den CpG-vorbehandelten Mäusen erkennen lassen. Wichtig ist jedoch, dass die Kontrolltiere nach Infarkt tendenziell höhere diastolische Blutdruckwerte aufwiesen als die CpG-vorbehandelten Mäuse der Gruppe 3. So lagen die peripheren diastolischen Blutdruckwerte der Kontrolle im Mittel um 11% höher und die des linksventrikulären diastolischen Drucks sogar um 38%. Gerade der erhöhte linksventrikuläre diastolische Druck kann als ein Zeichen einer beginnenden diastolischen Dysfunktion angesehen werden. Damit unterstützen die Ergebnisse ansatzweise die Hypothese dieser Arbeit, wonach die CpG-Präkonditionierung über eine Verminderung der Entzündungsreaktion post infarctem zur Verbesserung der Herzfunktion beitragen soll.

Darüber hinaus lagen die Ejektionsfraktionen (EF) der Kontrollgruppe tendenziell um 43% niedriger als die der Gruppe 3 (Kap. 3.2.6.1). Da es sich hierbei um einen Parameter der Herzleistung handelt, lassen die Ergebnisse vermuten, dass eine CpG-Präkonditionierung die Effizienz des postischämischen Herzens positiv beeinflusst.

Da bisher keine vergleichbaren CpG-Studien vorliegen, sollen die Ergebnisse mit entsprechender LPS-Literatur verglichen werden. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe untersuchte auf ähnliche Weise die funktionellen Folgen einer Toll-like 4 Defizienz bei Mäusen (C3H/HeJ) (Kim et al., 2007). Nach einer 60-minütigen Ischämie und 24 h Reperfusion wurden die Infarktgrößen mit Hilfe der TTC-Färbemethode planimetrisch vermessen sowie funktionelle Veränderungen anhand der Millar-Katheterisierung und Echokardiographie evaluiert. Die Tiere wiesen im Vergleich zum WT zwar geringere Zytokinexpressionen auf sowie eine reduzierte Infarktgröße, jedoch zeigte sich ein signifikanter funktioneller Unterschied nur hinsichtlich des linksventrikulären systolischen Blutdruckes (Kim et al., 2007). In Bezug auf die Infarktgröße stimmt die Studie von Kim et al. mit den vorliegenden Ergebnissen überein. Auffällig ist jedoch, dass der systolische periphere Blutdruck bei Kim et al. (2007) mit  $77,9 \pm 1$  mmHg deutlich niedriger als in der vorliegenden Studie mit  $112,68 \pm 4,74$  mmHg ist. Ursache dessen kann eine

unterschiedliche Empfindlichkeit der beiden Maussämme (C3H vs C57BL/6) für das eingesetzte Narkosemittel sein, jedoch auch eine weniger gute Narbenbildung. Umso mehr sind die tendenziell reduzierten intrakardialen diastolischen Drücke bei den hier präkonditionierten Tieren hervorzuheben.

Bezüglich der ermittelten Ejektionsfraktionen (EF %) stimmen die Ergebnisse dieser Studie mit denen von Kim und Mitarbeiter annähernd überein (Kim et al., 2007). Beide Datensätze sind nach 24 h Reperfusion erhoben worden und rangierten zwischen 37 (C3H/HeJ) bzw. 42,3% (C3H/HeN) (Kim et al., 2007) und 33,4 bzw. 47,6% in der vorliegenden Untersuchung (siehe Kap. 3.2.6.1). Anhand dessen kann von einem moderaten Infarkt ausgegangen werden. Rodrigues et al. hatten nach 30-minütiger Ischämie und 24 h Reperfusion Infarktgrößen sowohl mit Hilfe der TTC-Färbung als auch mittels Echokardiographie ermittelt (Rodrigues et al., 2004). Sie wiesen bei einer Infarktgröße von durchschnittlich 14% des linken Ventrikels eine EF von ca. 50% nach. Die geringere Dauer der Ischämie kann als Ursache für das kleinere zerstörte Areal und die verbesserten funktionellen Herzleistungen dort angesehen werden.

Aktuell werden die Befunde der vorliegenden Studie in einem neuen breiter angelegten Projekt unserer Arbeitsgruppe überprüft. Die Verringerung der Infarktgrößen nach Präkonditionierung mit CpG-ODN 1668 wurde bereits bestätigt. Die hämodynamischen Messungen sind noch nicht wiederholt worden.

## 4.6 Abschließende Betrachtung / Ausblick

Die vorliegende Arbeit demonstriert erstmals, dass eine Vorbehandlung mit synthetischen Oligonukleotiden, sog. CpG-ODNs, das Ausmaß einer kardialen Schädigung im myokardialen Reperusionsversuch beeinflusst. Tiere der Kontrollgruppe haben im Vergleich zu denen mit 5 nmolarem 1668-Thioat-stimulierten Mäusen einen 50% größeren Myokardinfarkt. Eine höhere Dosierung führt zunehmend zu systemischen Effekten und steigert in der Folge die Mortalitätsrate.

Als zusätzlicher Marker einer Herzschädigung diene die Bestimmung der kardialen Troponin T (cTnT)-Plasmakonzentration. Sie bestätigt die präkonditionierenden Effekte der 1668-CpG-Stimulation, denn die vorbehandelten Tiere haben einen um 65% reduzierten cTnT-Wert im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne CpG-Vorbehandlung. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen auch, dass die cTnT-Plasmakonzentration ein indirektes Maß für die Größe des Myokardinfarktes darstellt.

Bei den hämodynamischen Messungen hat sich bei den 1668-CpG behandelten Tieren eine Tendenz zu niedrigeren peripheren und intrakardialen diastolischen Drücken ergeben. Dies unterstützen die Daten der Echokardiographie (Kap. 3.2.6.1). Hier wurden tendenziell höhere Ejektionsfraktionen bei den vorbehandelten Mäusen gefunden. Ein Ziel weiterer Studien sollte also die Klärung der Frage sein, ob die durch 1668-CpG-Präkonditionierung verringerten Infarktgrößen auch mit einer Funktionsverbesserung einhergehen.

Als weiterer Untersuchungsparameter für funktionelle Herzveränderungen bietet sich eine NT-proBNP- bzw. BNP-Bestimmung an, um ihren Einfluss auf die Entstehung linksventrikulärer Dysfunktionen (Groenning et al., 2004; Gustafsson et al., 2005; Hystad et al., 2001; Koschack et al., 2008; Satyan et al., 2007) und das kardiale Remodelling (Igaki et al., 1998; La et al., 1998; Soeki et al., 2005) nach I/R zu untersuchen. Letzteres scheint darüber hinaus besonders für CNP zuzutreffen (Soeki et al., 2005).

In der vorliegenden Studie wurden drei CpG-ODNs verglichen, eines verkleinerte den Infarkt, die zwei anderen zeigten keine Wirkung. Das Austesten weiterer CpG-ODNs erscheint also lohnend, insbesondere konnten aktuelle Studien zeigen, dass Modifikationen



von CpG-Sequenzen veränderte Zytokinexpressionen und Zellaktivierungen bedingten (Agrawal und Kandimalla, 2003). Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung weiterer CpG-ODNs (2. Generation), die eine optimalere und spezifische Zytokininduktion ermöglichen sowie eventuelle Nebenwirkungen, wie die Induktion einer Autoimmunerkrankung oder Sepsis, reduzieren sollen (Cowdery et al., 1996; Goodnow, 2006; Means und Luster, 2005; Pisetsky, 1997; Sparwasser et al., 1997a; Sparwasser et al., 1997b). Ihre vielfältigen Effekte auf verschiedenste Zelltypen, allen voran Immunzellen, verdeutlichen ihr enormes therapeutisches Potential. Durch die Aktivierung der Th1-Zytokine wie IL-12 und IFN- $\gamma$  sind CpG-DNAs beispielsweise gegen eine Vielzahl von Infektionserkrankungen wirksam (Agrawal und Kandimalla, 2000; Dalpke et al., 2002; Klinman et al., 1996; Lewis et al., 2000). Weiterhin stärken sie das angeborene Immunsystem, indem sie in Kombinationen mit Antigenen, prophylaktischen oder therapeutischen Vakzinen Verwendung finden und somit für Asthmatiker und Allergiker von großen Nutzen sein können (Bhagat et al., 2003; Halperin et al., 2003; Jiang und Pisetsky, 2003; Kandimalla et al., 2001). Darüber hinaus implizieren die Induktionen der Interleukine 2 und 12 sowie der Interferone und erste Ergebnisse verschiedener Studien, dass sie bei der Therapie maligner Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielen (Bhagat et al., 2003; Carpentier und Delattre, 2003; Dalpke et al., 2002; Decker et al., 2002; Kandimalla et al., 2001; Okamoto und Sato, 2003; Warren und Weiner, 2002).

Die in dieser Studie eingesetzten CpG-ODNs wirken über TLR9, jedoch wurde die Beteiligung von TLR9 selbst nicht bewiesen. Dies könnte mit Hilfe von TLR9-defizienten Mäusen bewerkstelligt werden.

Gemäß der Arbeitshypothese sollte eine Stimulation mit CpG-ODN 16 h vor Infarkt die Entzündungsantwort infolge eines zweiten Reizes, der Ischämie/Reperfusion, reduzieren. Dieses Phänomen wurde als Grundlage für die Verringerung der Infarktgrößen angesehen (siehe Kap. 1.2). Wider Erwartung lagen jedoch keine signifikant reduzierten Zytokinexpressionen nach 60-minütiger Ischämie und 3 h Reperfusion bei den CpG-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe vor. Allerdings konnte ein tendenziell reduzierter Anstieg der Zytokine in der Gruppe mit einer 1668-ODN-Stimulation im Vergleich zu der PBS-Vorbehandlung gefunden werden. Daher erscheint es sinnvoll, in

weiteren Versuchen dieser Tendenz nachzugehen. Aktuelle Studien unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass mRNA-Analysen nach 2 h Reperfusion besonders aussagekräftig zu sein scheinen.

Potential für zukünftige Studien über protektive CpG-Effekte und die Rolle von TLR9 könnten darüber hinaus die Analyse weiterer Mediatoren und Zytokinrezeptoren sowie Feedbackinhibitoren der TLR9-Signaltransduktionskaskade und ihre Bedeutung im Herzen bieten (Kariko et al., 2004). Hier sei auf vorangegangene LPS- bzw. IPC-Studien unserer Arbeitsgruppe verwiesen, die als Grundlage dienen könnten (Baumgarten et al., 2006a; Baumgarten et al., 2002; Baumgarten et al., 2001; Knuefermann et al., 2002; Knuefermann et al., 2008; Stapel, 2006). Verschiedenste Studien legen den Verdacht nahe, dass einige Gemeinsamkeiten in der Präkonditionierung zwischen CpG-ODNs und LPS vorliegen. Der in Abbildung 2 vorgestellte TLR9/CpG-Signaltransduktionsweg beispielsweise ähnelt bzw. gleicht abschnittsweise dem durch eine TLR4/LPS-Stimulation ausgelösten (vgl. Abb. 1 mit Abb. 2). Darüber hinaus wiesen verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander eine synergistische Wirkung beider Virulenzfaktoren nach (Cornelie et al., 2002; Yi et al., 2001). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnten Übereinstimmungen hinsichtlich ihrer Wirkungen im Herzen gewonnen werden, dabei scheint der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) eine besondere Rolle zu zukommen (Baumgarten et al., 2001; Baumgarten et al., 2006b; Bolli et al., 1998; Dwan und Bolli, 2002; Knuefermann et al., 2008).

Möglicherweise lassen sich hieraus Erkenntnisse über Signale gewinnen, die angeregt durch unterschiedlichste Moleküle zu einer Reduktion der Infarktgröße führen. Die Kenntnis dieser Signale könnte eventuell ein Weg der Verringerung des Reperfusionsschadens auch im klinischen Einsatz werden.

## 5 Zusammenfassung

Die angeborene Immunabwehr spielt mit ihren Toll-like Rezeptoren eine wichtige Rolle in der myokardialen Ischämie und Reperfusion (I/R). TLR9 ist der primäre Rezeptor für bakterielle DNA. Sie zeichnet sich durch spezielle Sequenzen aus, sog. CpG-Motive, die zu 98% unmethyliert vorliegen. Verschiedenste Studien konnten zeigen, dass eine repetitive Schädigung (Präkonditionierung) vor myokardialer Ischämie kardioprotektive Wirkungen besitzt. In der vorgestellten Studie sollte die Bedeutung von CpG-Oligonukleotiden im Ischämie-Reperfusionsversuch eruiert und zudem die diagnostische Relevanz des kardialen Troponin T (cTNT) untersucht werden. Darüber hinaus sollten die funktionellen und hämodynamischen Aspekte einer CpG-Vorbehandlung sowie molekulare Mechanismen eingehend untersucht werden.

Während der Initaloperation (Instrumentierung) wurde die linke anteriore deszendierende Koronararterie (LAD) bei C57BL/6 Mäusen mit einem Okkluder versehen, um nach abgeschlossener Wundheilung („closed-chest“-Modell) eine 60-minütige Ischämie hervorrufen zu können. 16 Stunden vor Infarkt erfolgte die jeweilige Vorbehandlung mit einem der drei synthetischen Äquivalente der bakteriellen DNA, sog. CpG-ODNs, oder PBS (Kontrolle). Anhand der Reperfusionszeiten können drei Teilstudien unterschieden werden. Nach 3 h Reperfusion wurden die Expressionen proinflammatorischer Zytokine im Herzen bestimmt. Nach 24 h Reperfusion die Herzen histologisch untersucht, kardiale Plasmatroponin T-Werte ermittelt und erste funktionelle und hämodynamische Parameter evaluiert. Einer 2-wöchigen Reperfusionsphase schloss sich erneut die histologische Herzfärbung und planimetrische Vermessung der Infarktgrößen an sowie die Darstellung der myokardialen Funktion und Hämodynamik mit Hilfe der Echokardiographie und Herzkatheterisierung.

Mäuse, welche eine 5 nmolare 1668-ODN-Vorbehandlung erhielten, hatten kleinere Infarkte und geringere cTNT-Konzentrationen nach I/R als die Kontrolltiere mit einer äquivalenten PBS-Gabe. Andere 1668-Stimulationskonzentrationen (1, 10 und 20 nmol) hatten keinen nachweisbaren präkonditionierenden Effekt, vielmehr führte die erhöhte ODN-Gabe zum

Anstieg der Mortalitätsraten auf bis zu 80%. Tiere mit einer 1612- bzw. H154-Vorbehandlung zeigten dagegen keine signifikant reduzierten Infarktgrößen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Damit ist die Aktivierung von TLR9 durch CpD-ODNs maßgeblich für das Ausmaß der myokardialen Schädigung mitverantwortlich. Außerdem war nach einer 1668-ODN-Stimulation tendenziell eine Reduktion der inflammatorischen Antwort auf I/R in Form eines verringerten Zytokinanstiegs nachweisbar. Zusätzlich führte sie zu tendenziell verbesserten diastolischen Blutdruckwerten sowie Ejektionsfraktionen. Hier bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Die vorgestellten Ergebnisse demonstrieren erstmals, dass CpG-Oligonukleotide Mediatoren des Ischämie-Reperfusionsschadens sind. Eine TLR9-vermittelte CpG-Präkonditionierung führte konzentrations- und sequenzabhängig zur Reduktion des Myokardinfarktes sowie zur Verringerung der kardialen Troponin T-Plasmakonzentration. Demnach besitzt CpG-ODNs ein therapeutisches Potential nicht nur bei malignen Krankheiten und Infektionserkrankungen, sondern auch bei der Behandlung von Myokardinfarkt und sepsisähnlichen Erkrankungen.

## 6 Literaturverzeichnis

Aartsen WM, Pelsers MM, Hermens WT, Glatz JF, Daemen MJ, Smits JF. Heart fatty acid binding protein and cardiac troponin T plasma concentrations as markers for myocardial infarction after coronary artery ligation in mice. *Pflugers Arch* 2000; 439: 416-422.

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

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

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

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

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-738.

Anversa P, Cheng W, Liu Y, Leri A, Redaelli G, Kajstura J. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 1998; 93 Suppl 3: 8-12.

Bajaj G, Sharma RK. TNF- $\alpha$ -mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 1558-1564.

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

Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 1996; 157: 1840-1845.

Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270: 81-92.

Bartz H, Avalos NM, Baetz A, Heeg K, Dalpke AH. Involvement of suppressors of cytokine signaling in toll-like receptor-mediated block of dendritic cell differentiation. *Blood* 2006; 108: 4102-4108.

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, Kim SC, Stapel H, Vervolgyi V, Bittig A, Hoeft A, Meyer R, Grohe C, Knuefermann P. Myocardial injury modulates the innate immune system and changes myocardial sensitivity. *Basic Res Cardiol* 2006a; 101: 427-435.

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

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

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

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* 2006b; 25: 43-49.

Behrends M, Schulz R, Post H, Alexandrov A, Belosjorow S, Michel MC, Heusch G. Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol* 2000; 279: H1111-H1119.

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

Belosjorow S, Bolle I, Duschin A, Heusch G, Schulz R. TNF- $\alpha$  antibodies are as effective as ischemic preconditioning in reducing infarct size in rabbits. *Am J Physiol* 2003; 284: H927-H930.

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

Beutler B, Rehli M. (2002). Evolution of the TIR, tolls and TLRs: functional inferences from computational biology. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270: 1-21.

Bhagat L, Zhu FG, Yu D, Tang J, Wang H, Kandimalla ER, Zhang R, Agrawal S. CpG penta- and hexadeoxyribonucleotides as potent immunomodulatory agents. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 853-861.

Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, Koch CJ, Kitsis RN. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* 1997; 100: 1363-1372.

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

Bittig A. Der Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Hypertrophie nach Druckbelastung im Myokard der Maus. Dissertation im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2005.

Böcker W, Denk H, Heitz U. Pathologie. München: Elsevier - Urban & Fischer, 2004.

Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, Jones WK, Takano H, Guo Y, Zhang J. The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol* 1998; 93: 325-338.

Bolognese L, Cerisano G. Early predictors of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1999; 138: S79-S83.

Bowling WM, Hafenrichter DG, Flye MW, Callery MP. Endotoxin tolerance alters phospholipase C- $\gamma$  1 and phosphatidylinositol-3'-kinase expression in peritoneal macrophages. *J Surg Res* 1995; 58: 592-598.

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

Bozkurt B, Kribbs SB, Clubb FJ, Jr, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL. Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats. *Circulation* 1998; 97: 1382-1391.

Brown JM, Grosso MA, Terada LS, Whitman GJ, Banerjee A, White CW, Harken AH, Repine JE. Endotoxin pretreatment increases endogenous myocardial catalase activity and decreases ischemia-reperfusion injury of isolated rat hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2516-2520.

Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J* 2000, 19: 6341-6350.

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

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

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

Carpentier AF, Auf G, Delattre JY. CpG-oligonucleotides for cancer immunotherapy: review of the literature and potential applications in malignant glioma. *Front Biosci* 2003; 8: e115-e127.

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

Cason BA, Gordon HJ, Avery EG, Hickey RF. The role of ATP sensitive potassium channels in myocardial protection. *J Card Surg* 1995; 10: 441-444.

Chao W, Shen Y, Zhu X, Zhao H, Novikov M, Schmidt U, Rosenzweig A. Lipopolysaccharide improves cardiomyocyte survival and function after serum deprivation. *J Biol Chem* 2005; 280: 21997-22005.

Chen QM, Tu VC. Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications. *Am J Cardiovasc Drugs* 2002; 2: 43-57.

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

Chong AJ, Shimamoto A, Hampton CR, Takayama H, Spring DJ, Rothnie CL, Yada M, Pohlman TH, Verrier ED. Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 128: 170-179.

Chuang TH, Lee J, Kline L, Mathison JC, Ulevitch RJ. Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 538-544.

Chuang TH, Ulevitch RJ. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* 2000; 11: 372-378.

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

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

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



- Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, Krieg AM. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN- $\gamma$  in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 1996; 156: 4570-4575.
- Cullen P, Assmann G. High risk strategies for atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 1999; 286: 31-45.
- Dalpke A, Zimmermann S, Heeg K. CpG DNA in the prevention and treatment of infections. *BioDrugs* 2002; 16: 419-431.
- Dawn B, Bolli R. Role of nitric oxide in myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 962: 18-41.
- Decker T, Hipp S, Kreitman RJ, Pastan I, Peschel C, Licht T. Sensitization of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells to recombinant immunotoxin by immunostimulatory phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Blood* 2002; 99: 1320-1326.
- Dibbs Z, Kurrelmeyer K, Kalra D, Seta Y, Wang F, Bozkurt B, Baumgarten G, Sivasubramanian N, Mann DL. Cytokines in heart failure: pathogenetic mechanisms and potential treatment. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; 111: 423-428.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004; 303: 1529-1531.
- Doevendans PA, Daemen MJ, de Muinck ED, Smits JF. Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 34-49.
- Dörner K. Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie. Stuttgart - New York: Thieme, 2006.
- Duncker DJ, Klassen CL, Ishibashi Y, Herrlinger SH, Pavek TJ, Bache RJ. Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol* 1996; 270: H1189-H1199.
- Eddy LJ, Goeddel DV, Wong GH. Tumor necrosis factor- $\alpha$  pretreatment is protective in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys. Res Commun* 1992; 184: 1056-1059.
- Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* 2004; 10: 71-84.
- Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996, 272. 50-53.
- Ferrero E, Jiao D, Tsuberi BZ, Tesio L, Rong GW, Haziot A, Goyert SM. Transgenic mice expressing human CD14 are hypersensitive to lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 2380-2384.

Fisher SG, Marber MS. An in vivo model of ischaemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the mouse heart. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2002; 48: 161-169.

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

Geppert TD, Whitehurst CE, Thompson P, Beutler B. Lipopolysaccharide signals activation of tumor necrosis factor biosynthesis through the ras/raf-1/MEK/MAPK pathway. *Mol Med* 1994; 1: 93-103.

Ghosh S, Ng LL, Talwar S, Squire IB, Galinanes M. Cardiotrophin-1 protects the human myocardium from ischemic injury. Comparison with the first and second window of protection by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2000; 48: 440-447.

Gibbons R J, Valeti US, Araoz PA, Jaffe AS. The quantification of infarct size. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1533-1542.

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.

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

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

Groenning BA, Raymond I, Hildebrandt PR, Nilsson JC, Baumann M, Pedersen F. Diagnostic and prognostic evaluation of left ventricular systolic heart failure by plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide concentrations in a large sample of the general population. *Heart* 2004; 90: 297-303.

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

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.

Gursel M, Verthelyi D, Gursel I, Ishii KJ, Klinman DM. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 813-820.

Gustafsson F, Steensgaard-Hansen F, Badskjaer J, Poulsen AH, Corell P, Hildebrandt P. Diagnostic and prognostic performance of N-terminal ProBNP in primary care patients with suspected heart failure. *J Card Fail* 2005; 11: S15-S20.

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

Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 2000; 192: 595-600.

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

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

Halperin SA, Van NG, Smith B, Abtahi S, Whiley H, Eiden JJ. A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine* 2003; 21: 2461-2467.

Hamm CW. Risk stratifying acute coronary syndromes: gradient of risk and benefit. *Am Heart J* 1999; 138: S6-11.

Hampton CR, Shimamoto A, Rothnie CL, Griscavage-Ennis J, Chong A, Dix DJ, Verrier ED, Pohlman TH. HSP70.1 and -70.3 are required for late-phase protection induced by ischemic preconditioning of mouse hearts. *Am J Physiol* 2003; 285: H866-H874.

Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, Rothenfusser S, Endres S. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- $\alpha$  induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33: 1633-1641.

Haudek SB, Spencer E, Bryant DD, White DJ, Maass D, Horton JW, Chen ZJ, Giroir BP. Overexpression of cardiac I- $\kappa$ B $\alpha$  prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H962-H968.

Heeschen C, Hamm CW, Goldmann B, Deu A, Langenbrink L, White HD. Troponin concentrations for stratification of patients with acute coronary syndromes in relation to therapeutic efficacy of tirofiban. PRISM Study Investigators. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management. *Lancet* 1999; 354: 1757-1762.

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

Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific

stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2987-2997.

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

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

Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation* 1982; 65: 1446-1450.

Hof H, Dörries R. *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart - New York: Thieme, 2005

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

Hsu LC, Park JM, Zhang K, Luo JL, Maeda S, Kaufman RJ, Eckmann L, Guiney DG, Karin M. The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature* 2004; 428: 341-345.

Hultmark D. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199: 144-146.

Hystad ME, Geiran OR, Attramadal H, Spurkland A, Vege A, Simonsen S, Hall C. Regional cardiac expression and concentration of natriuretic peptides in patients with severe chronic heart failure. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 395-403.

Igaki T, Itoh H, Suga SI, Hama N, Ogawa Y, Komatsu Y, Yamashita J, Doi K, Chun TH, Nakao K. Effects of intravenously administered C-type natriuretic peptide in humans: comparison with atrial natriuretic peptide. *Hypertens Res* 1998; 21: 7-13.

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

Ismaeil MS, Tkachenko I, Gamperl AK, Hickey RF, Cason BA. Mechanisms of isoflurane-induced myocardial preconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 1999; 90: 812-821.

Jakob T, Walker PS, Krieg AM, von SE, Udey MC, Vogel JC. Bacterial DNA and CpG-containing oligodeoxynucleotides activate cutaneous dendritic cells and induce IL-12 production: implications for the augmentation of Th1 responses. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 118: 457-461.

Jiang W, Pisetsky DS. Enhancing immunogenicity by CpG DNA. *Curr Opin Mol Ther* 2003; 5: 180-185.

Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74: 86-107.

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

Kandimalla ER, Yu D, Zhao Q, Agrawal S. Effect of chemical modifications of cytosine and guanine in a CpG-motif of oligonucleotides: structure-immunostimulatory activity relationships. *Bioorg Med Chem* 2001; 9: 807-813.

Kannel WB. The Framingham Study: historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women. *J Gend Specif Med* 2002; 5: 27-37.

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.

Kariko K, Weissman D, Welsh FA. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling—a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24: 1288-1304.

Karin M, Yamamoto Y, Wang QM. The IKK NF- $\kappa$  B system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 17-26.

Kato R, Foex P. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists. *Can J Anaesth* 2002; 49: 777-791.

Katus HA, Remppis A, Scheffold T, Diederich KW, Kuebler W. Intracellular compartmentation of cardiac troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991; 67: 1360-1367.

Kawagoe T, Sato S, Jung A, Yamamoto M, Matsui K, Kato H, Uematsu S, Takeuchi O, Akira S. Essential role of IRAK-4 protein and its kinase activity in Toll-like receptor-mediated immune responses but not in TCR signaling. *J Exp Med* 2007; 204: 1013-1024.

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

Kawarada Y, Ganss R, Garbi N, Sacher T, Arnold B, Hammerling GJ. NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2001; 167: 5247-5253.

Keil U. Coronary artery disease: the role of lipids, hypertension and smoking. *Basic Res Cardiol* 2000; 95 Suppl 1: I52-I58.

Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology* 1997; 87: 361-370.

Khaliulin I, Clarke SJ, Lin H, Parker J, Suleiman MS, Halestrap AP. Temperature preconditioning of isolated rat hearts-a potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Physiol* 2007; 581: 1147-1161.

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

Kindrachuk J, Potter J, Wilson HL, Griebel P, Babiuk LA, Napper S. Activation and regulation of toll-like receptor 9: CpGs and beyond. *Mini Rev Med Chem* 2008; 8: 590-600.

Kindrachuk J, Potter JE, Brownlie R, Ficzyz AD, Griebel PJ, Mookherjee N, Mutwiri GK, Babiuk LA, Napper S. Nucleic acids exert a sequence-independent cooperative effect on sequence-dependent activation of Toll-like receptor 9. *J Biol Chem* 2007; 282: 13944-13953.

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.

Klinke R, Pape HC, Silbernagl S. *Physiologie*. Stuttgart - New York: Thieme, 2005.

Kloner RA, Yellon D. Does ischemic preconditioning occur in patients? *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1133-1142.

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* 2002; 106: 2608-2615.

Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Ehrentraut H, Rudiger M, Boehm O, Fink K, Dreiner U, Grohe C, Hoeft A, Baumgarten G, Koch A, Zacharowski K, Meyer R. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 26-35.

Ko SH, Yu CW, Lee SK, Choe H, Chung MJ, Kwak YG, Chae SW, Song HS. Propofol attenuates ischemia-reperfusion injury in the isolated rat heart. *Anesth Analg* 1997; 85: 719-724.

Kokita N, Hara A, Abiko Y, Arakawa J, Hashizume H, Namiki A. Propofol improves functional and metabolic recovery in ischemic reperfused isolated rat hearts. *Anesth Analg* 1998; 86: 252-258.

Korup E, Dalsgaard D, Nyvad O, Jensen TM, Toft E, Berning J. Comparison of degrees of left ventricular dilation within three hours and up to six days after onset of first acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1997; 80: 449-453.

Koschack J, Scherer M, Luers C, Kochen MM, Wetzell D, Kleita S, Pouwels C, Wachter R, Herrmann-Lingen C, Pieske B, Binder L. Natriuretic peptide vs. clinical information for diagnosis of left ventricular systolic dysfunction in primary care. *BMC Fam Pract* 2008; 9: 14.

Kraatz J, Clair L, Rodriguez JL, West MA. In vitro macrophage endotoxin tolerance: defective in vitro macrophage map kinase signal transduction after LPS pretreatment is not present in macrophages from C3H/HeJ endotoxin resistant mice. *Shock* 1999a; 11: 58-63.

Kraatz J, Clair L, Rodriguez JL, West MA. Macrophage TNF secretion in endotoxin tolerance: role of SAPK, p38, and MAPK. *J Surg Res* 1999b; 83: 158-164.

Kranzer K, Bauer M, Lipford GB, Heeg K, Wagner H, Lang R. CpG-oligodeoxynucleotides enhance T-cell receptor-triggered interferon- $\gamma$  production and up-regulation of CD69 via induction of antigen-presenting cell-derived interferon type I and interleukin-12. *Immunology* 2000; 99: 170-178.

Krieg AM. From bugs to drugs: therapeutic immunomodulation with oligodeoxynucleotides containing CpG sequences from bacterial DNA. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001; 11: 181-188.

Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-760.

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

Krieg AM, Davis HL. Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3: 15-24.

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

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

- Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004b; 103: 1433-1437.
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- $\alpha/\beta$  in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001a; 31: 2154-2163.
- Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001b; 31: 3026-3037.
- Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circ Res* 1997; 81: 627-635.
- Kubota T, Miyagishima M, Frye CS, Alber SM, Bounoutas GS, Kadokami T, Watkins SC, McTiernan CF, Feldman AM. Overexpression of tumor necrosis factor-  $\alpha$  activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1331-1344.
- Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 795-804.
- Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin  $1\beta$  are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183: 949-958.
- Kurrelmeyer KM, Michael LH, Baumgarten G, Taffet GE, Peschon JJ, Sivasubramanian N, Entman ML, Mann DL. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5456-5461.
- La VG, Mannelli M, Lazzeri C, Vecchiarino S, de Feo ML, Tosti GC, Bandinelli R, Foschi M, Franchi F. Different effects of atrial and C-type natriuretic peptide on the urinary excretion of endothelin-1 in man. *Clin Sci (Lond)* 1998; 95: 595-602.
- 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.
- Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A, Petersen S, Rayne M. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J* 2006; 27: 1610-1619.



Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6646-6651.

Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001; 166: 5161-5167.

Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990; 323: 236-241.

Lewis EJ, Agrawal S, Bishop J, Chadwick J, Cristensen ND, Cuthill S, Dunford P, Field AK, Francis J, Gibson V, Greenham AK, Kelly F, Kilkushie R, Kreider JW, Mills JS, Mulqueen M, Roberts NA, Roberts P, Szymkowski DE. Non-specific antiviral activity of antisense molecules targeted to the E1 region of human papillomavirus. *Antiviral Res* 2000; 48: 187-196.

Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol* 2002; 282: C227-C241.

Lloyd-Jones DM, O'Donnell CJ, D'Agostino RB, Massaro J, Silbershatz H, Wilson PW. Applicability of cholesterol-lowering primary prevention trials to a general population: the framingham heart study. *Arch Intern Med* 2001; 161: 949-954.

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

Ludwig LM, Tanaka K, Eells JT, Weihrauch D, Pagel PS, Kersten JR, Warltier DC. Preconditioning by isoflurane is mediated by reactive oxygen species generated from mitochondrial electron transport chain complex III. *Anesth Analg* 2004; 99: 1308-1315.

Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003; 198: 513-520.

MacLellan WR, Schneider MD. Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 1997; 81: 137-144.

Makhlouf M, Zingarelli B, Halushka PV, Cook JA. Endotoxin tolerance alters macrophage membrane regulatory G proteins. *Prog Clin Biol Res* 1998; 397: 217-226.

Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1592: 265-280.

Maulik N, Das DK. Potentiation of angiogenic response by ischemic and hypoxic preconditioning of the heart. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 13-24.

Maulik N, Goswami S, Galang N, Das DK. Differential regulation of Bcl-2, AP-1 and NF- $\kappa$ B on cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemic stress adaptation. *FEBS Lett* 1999; 443: 331-336.

Maulik N, Sasaki H, Addya S, Das DK. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors. *FEBS Lett* 2000; 485: 7-12.

Maulik N, Watanabe M, Engelman D, Engelman RM, Kagan VE, Kisin E, Tyurin V, Cordis GA, Das DK. Myocardial adaptation to ischemia by oxidative stress induced by endotoxin. *Am J Physiol* 1995; 269: C907-C916.

Means TK, Luster AD. Toll-like receptor activation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1062: 242-251.

Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000; 164: 5564-5574.

Medzhitov R. CpG DNA: security code for host defense. *Nat Immunol* 2001; 2: 15-16.

Medzhitov R, Janeway CA., Jr. How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol* 2000; 12: 185-188.

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

Mena A, Nichani AK, Popowych Y, Godson DL, Dent D, Townsend HG, Mutwiri GK., Hecker R, Babiuk LA, Griebel P. Innate immune responses induced by CpG oligodeoxyribonucleotide stimulation of ovine blood mononuclear cells. *Immunology* 2003; 110: 250-257.

Metzler B, Hammerer-Lercher A, Jehle J, Dietrich H, Pachinger O, Xu Q, Mair J. Plasma cardiac troponin T closely correlates with infarct size in a mouse model of acute myocardial infarction. *Clin Chim Acta* 2002; 325: 87-90.

Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, Hartley CJ, Pham TT, Daniel SL, Funk E, Entman ML. Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 277: H660-H668.

Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, Youker KA, Zhu J, Hall SR, Hawkins HK, Berens K, Ballantyne CM. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995; 269: H2147-H2154.

Muders F, Elsner D. Animal models of chronic heart failure. *Pharmacol Res* 2000; 41: 605-612.

Muller-Bardorff M, Rauscher T, Kampmann M, Schoolmann S, Laufenberg F, Mangold D, Zerback R, Remppis A., Katus HA. Quantitative bedside assay for cardiac troponin T: a complementary method to centralized laboratory testing. *Clin Chem* 1999; 45: 1002-1008.

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

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.

Nakano M, Knowlton AA, Dibbs Z, Mann DL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  confers resistance to hypoxic injury in the adult mammalian cardiac myocyte. *Circulation* 1998; 97: 1392-1400.

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

Nishiya T, Defranco AL. Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. *J Biol Chem* 2004; 279: 19008-19017.

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

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

O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 2003; 24: 286-290.

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

OECD. OECD Health Data 2008; Indikatoren des Gesundheitswesens; Sterbefälle, 2008.

Ojha N, Roy S, Radtke J, Simonetti O, Gnyawali S, Zweier JL, Kuppusamy P, Sen CK. Characterization of the structural and functional changes in the myocardium following focal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H2435-H2443.

Okamoto M, Sato M. Toll-like receptor signaling in anti-cancer immunity. *J Med Invest* 2003; 50: 9-24.

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

Otani H. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 449-469.

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

Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, Tikkanen I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol* 2001; 280: H2726-H2731.

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.

Pasternak RC. Report of the Adult Treatment Panel III: the 2001 National Cholesterol Education Program guidelines on the detection, evaluation and treatment of elevated cholesterol in adults. *Cardiol Clin* 2003; 21: 393-398.

Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: 1161-1172.

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

Pisetsky DS. Immunostimulatory DNA: a clear and present danger? *Nat Med* 1997; 3: 829-831.

Pisetsky DS, Reich CF. Inhibition of murine macrophage IL-12 production by natural and synthetic DNA. *Clin Immunol* 2000; 96: 198-204.

Plachinta RV, Hayes JK, Cerilli LA, Rich GF. Isoflurane pretreatment inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Anesthesiology* 2003; 98: 89-95.

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

Ran K, Duan KM, Zou DQ, Li ZJ, Jin LY, Chang YT. [Effect of isoflurane delayed preconditioning on myocardial ischemia reperfusion injury in rabbits]. *Zhong. Nan. Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban.* 2008; 33 146-150.

Ran K, Zhu R, Lu XH, Zou DQ, Li H, Chang YT. [Protective effect of heat-shock protein 27 on myocardium with isoflurane preconditioning in myocardial ischemia/reperfusion injury of myocardium in rabbit]. *Zhongguo Wei Zhong. Bing. Ji. Jiu. Yi. Xue.* 2007; 19: 683-686.

Rashid MN, Fuentes F, Touchon RC, Wehner PS. Obesity and the risk for cardiovascular disease. *Prev Cardiol* 2003; 6: 42-47.

Remppis A, Ehlermann P, Giannitsis E, Greten T, Most P, Muller-Bardorff M, Katus HA. Cardiac troponin T levels at 96 hours reflect myocardial infarct size: a pathoanatomical study. *Cardiology* 2000; 93: 249-253.

Remppis A, Scheffold T, Karrer O, Zehelein J, Hamm C, Grunig E, Bode C, Kubler W, Katus HA. Assessment of reperfusion of the infarct zone after acute myocardial infarction by serial cardiac troponin T measurements in serum. *Br Heart J* 1994; 71: 242-248.

Rodrigues AC, Hataishi R, Ichinose F, Bloch KD, Derumeaux G, Picard MH, Scherrer-Crosbie M. Relationship of systolic dysfunction to area at risk and infarction size after ischemia-reperfusion in mice. *J Am Soc Echocardiogr* 2004; 17: 948-953.

Rodriguez-Martinez S, Cancino-Diaz ME, Jimenez-Zamudio L, Garcia-Latorre E, Cancino-Diaz JC. TLRs and NODs mRNA expression pattern in healthy mouse eye. *Br J Ophthalmol* 2005; 89: 904-910.

Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lupp P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2541-2550.

Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95: 320-323.

Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K, Akira S. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 2000, 165: 7096-7101.

Satyan S, Light RP, Agarwal R. Relationships of N-terminal pro-B-natriuretic peptide and cardiac troponin T to left ventricular mass and function and mortality in asymptomatic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2007; 50: 1009-1019.

Scherrer-Crosbie M, Steudel W, Ullrich R, Hunziker PR., Liel-Cohen N, Newell J, Zaroff J, Zapol WM, Picard MH. Echocardiographic determination of risk area size in a murine model of myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1999; 277: H986-H992.

Schmidt RF, Thews G, Lang F. Physiologie des Menschen. Berlin Heidelberg New York: Springer, 2000

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

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

Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, Shomura S, Takayama H, Fleisig AJ, Agnew, M.L., Hampton CR, Rothnie CL, Spring DJ, Pohlman TH, Shimpo H, Verrier ED. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2006; 114: I270-I274.

Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, Shibata Y, Nitobe J, Miyamoto T, Takahashi H, Arimoto T, Maeda K, Yamakawa M, Takeuchi O, Akira S, Takeishi Y, Kubota I. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 2003; 108: 2905-2910.

Soeki T, Kishimoto I, Okumura H, Tokudome T, Horio T, Mori K, Kangawa K. C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 608-616.

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.

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

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

Statistisches Bundesamt. Todesursache in Deutschland 2007. Pressemitteilung Nr. 303, 2008.

Steen H, Futterer S, Merten C, Junger C, Katus HA, Giannitsis E. Relative role of NT-pro BNP and cardiac troponin T at 96 hours for estimation of infarct size and left ventricular function after acute myocardial infarction. *J Cardiovasc Magn Reson* 2007; 9: 749-758.

Steen H, Giannitsis E, Futterer S, Merten C, Juenger C, Katus HA. Cardiac troponin T at 96 hours after acute myocardial infarction correlates with infarct size and cardiac function. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 2192-2194.

Stiegler H, Fischer Y, Vazquez-Jimenez JF, Graf J, Filzmaier K, Fausten B, Janssens U, Gressner AM, Kunz D. Lower cardiac troponin T and I results in heparin-plasma than in serum. *Clin Chem* 2000; 46: 1338-1344.

Strom C, Kilger E, von SW, Peter K. [The role of echocardiography in preoperative diagnosis of cardiac risk in patients before non-cardiac surgical interventions]. *Anaesthesist* 1998; 47: 903-911.

Szmagala P, Morawski W, Krejca M, Gburek T, Bochenek A. Evaluation of perioperative myocardial tissue damage in ischemically preconditioned human heart during aorto coronary bypass surgery. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1998; 39: 791-795.

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

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

Takeda K, Akira S. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 2003; 5: 143-153.

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

Talbert RL. New therapeutic options in the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III. *Am J Manag Care* 2002; 8: S301-S307.

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

Tominaga K, Saito S, Matsuura M, Nakano M. Lipopolysaccharide tolerance in murine peritoneal macrophages induces downregulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway through mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B cascades, but not lipopolysaccharide-incorporation steps. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450: 130-144.

- 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.
- Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL. Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation* 1995; 92: 1487-1493.
- Tsujimura H, Tamura T, Kong HJ, Nishiyama A, Ishii KJ, Klinman DM, Ozato K. Toll-like receptor 9 signaling activates NF- $\kappa$ B through IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein in dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172: 6820-6827.
- Valen G. The basic biology of apoptosis and its implications for cardiac function and viability. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: S656-S660.
- Vanoverschelde JL, Wijns W, Depre C, Essamri B, Heyndrickx GR, Borgers M, Bol A, Melin JA. Mechanisms of chronic regional postischemic dysfunction in humans. New insights from the study of noninfarcted collateral-dependent myocardium. *Circulation* 1993; 87: 1513-1523.
- Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 121-135.
- Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol* 2001; 166: 2372-2377.
- Vervölgyi, V. Die Wirkung der bakteriellen Sepsis auf die elektromechanische Kopplung und die Hypertrophieentwicklung des Herzens. Dissertation im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, 2007.
- Vink A, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Functional role for toll-like receptors in atherosclerosis and arterial remodeling. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 515-521.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001; 412: 346-351.
- Warren TL, Weiner GJ. Synergism between cytosine-guanine oligodeoxynucleotides and monoclonal antibody in the treatment of lymphoma. *Semin Oncol* 2002; 29: 93-97.
- Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Bulkley BH. Global cardiac remodeling after acute myocardial infarction: a study in the rat model. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5: 1355-1362.
- Werdan K, Muller-Werdan U. Elucidating molecular mechanisms of septic cardiomyopathy-the cardiomyocyte model. *Mol Cell Biochem* 1996; 163-164, 291-303.



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

West MA, LeMieur T, Clair L, Bellingham J, Rodriguez JL. Protein kinase C regulates macrophage tumor necrosis factor secretion: direct protein kinase C activation restores tumor necrosis factor production in endotoxin tolerance. *Surgery* 1997; 122: 204-211.

Wloch MK, Pasquini S, Ertl HC, Pisetsky DS. The influence of DNA sequence on the immunostimulatory properties of plasmid DNA vectors. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 1439-1447.

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

Yamamoto S, Yamamoto T, Tokunaga T. The discovery of immunostimulatory DNA sequence. *Springer Semin Immunopathol* 2000; 22: 11-19.

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

Yi AK, Yoon JG, Hong SC, Redford TW, Krieg AM. Lipopolysaccharide and CpG DNA synergize for tumor necrosis factor- $\alpha$  production through activation of NF- $\kappa$ B. *Int Immunol* 2001; 13: 1391-1404.

Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. (1999). Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor  $\kappa$ B. *Hepatology* 1999; 30: 203-208.

Yoza B, LaRue K, McCall C. Molecular mechanisms responsible for endotoxin tolerance. *Prog Clin Biol Res* 1998; 397: 209-215.

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

Zacharowski K, Otto M, Hafner G, Chatterjee PK, Thiemermann C. Endotoxin induces a second window of protection in the rat heart as determined by using p-nitro-blue tetrazolium staining, cardiac troponin T release, and histology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2276-2280.

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.

- Zaugg M, Lucchinetti E, Spahn DR, Pasch T, Garcia C, Schaub MC. Differential effects of anesthetics on mitochondrial K(ATP) channel activity and cardiomyocyte protection. *Anesthesiology* 2002; 97: 15-23.
- 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.
- Zhang FX, Kirschning CJ, Mancinelli R, Xu XP, Jin Y, Faure E, Mantovani A, Rothe M, Muzio M, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide activates nuclear factor- $\kappa$ B through interleukin-1 signaling mediators in cultured human dermal endothelial cells and mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 1999; 274: 7611-7614.
- Zhao Q, Temsamani J, Zhou RZ, Agrawal S. Pattern and kinetics of cytokine production following administration of phosphorothioate oligonucleotides in mice. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997; 7: 495-502.
- Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 2003; 285: H579-H588.
- Zheng M, Klinman DM, Gierynska M, Rouse BT. DNA containing CpG motifs induces angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8944-8949.
- Zhu J, Huang X, Yang Y. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *J Virol* 2007; 81: 3170-3180.
- Ziegler-Heitbrock HW. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J Inflamm* 1995; 45: 13-26.
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757: 509-517.

## 7 Veröffentlichungen

### Abstracts (Poster):

Knuefermann P, **Gözl L**, Kim SC, Stapel H, Grohé C, Meyer R, Hoeft A, Baumgarten G. Preconditioning with bacterial DNA reduces the size of an ischemia/reperfusion injury in the heart. Eur. J. Anaesth. 2006, Respiration p. 66, Vol. 23, Suppl. 37

Knuefermann P, **Gözl L**, Stapel H, Kim SC, Velten M, Grohé C, Hoeft A, Meyer R, Baumgarten G. Eine Präkonditionierung mit bakterieller DNA (CpG-DNA) vermindert die Infarktgröße bei einem Ischämie-Reperfusionsschaden, Deutscher Anästhesie Kongress, 2006

Markowski P, **Gözl L**, Stapel H, Grohé C, Baumgarten G, Knuefermann P, Meyer R. Toll-like receptor 9 stimulation protects the heart against ischemia/reperfusion injury. Acta Physiologica 2007, p. 128, Vol.189, Suppl. 653

## 8 Danksagung

Den Menschen, die mich während dieser Promotion unterstützt haben, möchte ich von Herzen danken. Ganz besonders:

- Herrn Prof. Dr. Rainer Meyer (Institut für Physiologie 2) für das stetige Interesse an dieser Arbeit. Seine freundliche Unterstützung und Betreuung ermöglichte erst die Fertigstellung. Auch seinem Team am Institut für Physiologie in Bonn möchte ich auf diesem Wege danken.
- Herrn Dr. med. Pascal Knuefermann (Klinik für Anästhesiologie) für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Überlassung der Thematik und ihm sowie Herrn Dr. med. Georg Baumgarten und Prof. Dr. Christian Grohé für die Unterstützung, freundliche Betreuung und Ansprechbarkeit.
- Dr. Heidi Ehrentraut für ihre fortwährende Beratung und Unterstützung aus der sich eine wunderbare Freundschaft entwickelte. Darüber hinaus danke ich ihr für die konstruktive und kritische Korrektur dieser Arbeit.
- Dr. med. Se-Chan Kim für die Vermittlung in diese Arbeitsgruppe und Einarbeitung in die OP-Methodik
- Dr. Ghanem für die Zusammenarbeit bei der Echokardiographie
- Markus Schwedersky für die Unterstützung bei der Durchführung der ELISAs
- Den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe für die wunderschöne gemeinsame Zeit

Der Cardiac Reader war eine Leihgabe der Firma Roche Diagnostics.