

Aus dem Institut
Experimental and Clinical Research Center (ECRC)
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der
inflammations-vermittelten Kardiomyopathie**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Busch

aus Waren (Müritz)

Datum der Promotion: 01.03.2019

Vorwort

Die statistische Auswertung und Abbildung unter 7.2.1. Überlebensrate, Abbildung 18 wurde bereits publiziert in:

I. Publikation:

Huang N, Kny M, Riediger F, **Busch K**, Schmidt S, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. Intensive Care Med Exp. 2017; 5:3. doi: 10.1186/s40635-016-0115-0.

II. Publierte Abstracts:

Vortrag auf der 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. in Mannheim, 04/2017.

Kny M, **Busch K**, Huang N, Schmidt S, Klassert T, Stock M, Butter C, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced cardiac failure.

III. Weitere Arbeiten an publizierten Abstracts:

a. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. in Mannheim, 04/2017.

Kny M, Huang N, **Busch K**, Schmidt S, Butter C, Riediger F, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy.

b. Leopoldina Symposium „The Evolution of Intensive Care Medicine“, 02/2017.

Huang N, Kny M, Riediger F, **Busch K**, Schmidt S, Butter C, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy.

1. Inhaltsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Inhaltsverzeichnis | 3 |
| 2. Abkürzungsverzeichnis | 8 |
| 3. Zusammenfassung | 10 |
| 4. Abstract | 11 |
| 5. Einleitung | 12 |
| 5.1. Sepsis | 12 |
| 5.1.1. Definition der Sepsis | 12 |
| 5.1.2. Epidemiologie der Sepsis..... | 13 |
| 5.1.3. Intensive Care Unit-Acquired Weakness (ICUAW) | 13 |
| 5.1.4. Auswirkungen der Inflammation auf das Myokard..... | 15 |
| 5.2. Das NaLP3-Inflammasom | 16 |
| 5.2.1. Aufbau des NaLP3-Inflammasoms..... | 16 |
| 5.2.2. Aktivierung des NaLP3-Inflammasoms | 18 |
| 5.3. Interleukin-1 β (IL-1 β) | 19 |
| 5.4. Induktion einer polymikrobiellen Sepsis durch zökale Ligatur und Punktion (CLP-Methode)..... | 21 |
| 5.5. Herzmuskulatur | 21 |
| 5.5.1. Aufbau des Herzens..... | 21 |
| 5.5.2. Aufbau der Herzmuskulatur..... | 22 |
| 5.5.3. Kontraktionsvorgang der Herzmuskulatur | 24 |
| 5.6. Kardiomyopathien | 25 |
| 5.6.1. Primäre Kardiomyopathien..... | 25 |
| 5.6.1.1. Die hypertrophe Kardiomyopathie..... | 26 |
| 5.6.1.2. Die dilatative Kardiomyopathie..... | 26 |
| 5.6.1.3. Die inflammatorische Kardiomyopathie..... | 27 |

1. Inhaltsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.6.1.4. Die Sepsis-induzierte Kardiomyopathie | 27 |
| 5.6.2. Sekundäre Kardiomyopathien | 28 |
| 5.7. Die herzspezifischen Myosinisoformen <i>Myosin heavy chain 6 (MyH6)</i> und <i>Myosin heavy chain 7 (MyH7)</i> | 29 |
| 5.8. Herzinsuffizienzmarker ANP (<i>Nppa</i>) und BNP (<i>Nppb</i>) | 30 |
| 5.9. Schlüsselproteine des Proteinabbaus im Muskel | 31 |
| 5.9.1. Die muskelspezifische E3-Ligase <i>Muscle RING finger 1 (MuRF1)</i> | 31 |
| 5.9.2. Das muskelspezifische F-Box Protein <i>Atrogin1/muscle atrophy F-box protein (Mafbx)</i> | 32 |
| 5.10. Autophagie-vermittelter Proteinabbau im Muskel | 33 |
| 6. Material und Methoden | 36 |
| 6.1. Material | 36 |
| 6.1.1. Geräte | 36 |
| 6.1.2. Verbrauchsmaterial | 37 |
| 6.1.3. Chemikalien und Reagenzien | 38 |
| 6.1.4. Kits | 39 |
| 6.1.5. Puffer und Lösungen | 40 |
| 6.1.6. Herstellung von Gelen | 41 |
| 6.1.7. Primer für die quantitative Real-time PCR | 42 |
| 6.1.8. Primer zur Erfassung des Genotyps (WT, Wildtyp; KO, Knockout Typ) ... | 43 |
| 6.1.9. Primäre und sekundäre Antikörper zur Western Blot Analyse | 43 |
| 6.1.10. Primäre und sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz | 44 |
| 6.1.11. Zelllinien | 44 |
| 6.1.12. Maus-Stämme | 44 |
| 6.2. Methoden | 45 |
| 6.2.1. Zellbiologische Methoden | 45 |
| 6.2.1.1. Zellkulturmedien und Zellkulturbedingungen | 45 |
| 6.2.1.2. Auftauen und Einfrieren von Zellen | 45 |

1. Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 6.2.1.3. Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer | 46 |
| 6.2.1.4. Differenzierung von H9c2-Myoblasten | 46 |
| 6.2.1.5. Stimulation von H9c2-Myoblasten..... | 46 |
| 6.2.1.6. Immunzytochemische Färbung..... | 46 |
| 6.2.2. Tierexperimentelle Methoden..... | 47 |
| 6.2.2.1. Induktion einer polymikrobiellen Sepsis mittels zökaler Ligatur und Punktion (CLP)..... | 47 |
| 6.2.2.2. Genotypisierung..... | 50 |
| 6.2.3. RNA-Isolation | 51 |
| 6.2.4. Messung der RNA-Konzentration..... | 52 |
| 6.2.5. Synthese von cDNA | 52 |
| 6.2.6. Quantitative Real-time PCR | 53 |
| 6.2.7. Proteinextraktion | 55 |
| 6.2.8. Quantitative Proteinbestimmung | 55 |
| 6.2.9. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot | 56 |
| 6.2.10. RNA-Sequenzierung | 57 |
| 6.2.11. Zweidimensionale transthorakale Echokardiographie | 58 |
| 6.2.12. Histologische Aufarbeitung und Färbung von Gewebe | 59 |
| 6.2.12.1. Paraffineinbettung und Entparaffinierung von Gewebeschnitten | 59 |
| 6.2.12.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung..... | 60 |
| 6.2.12.3. Trichrom-Färbung | 60 |
| 6.2.13. Graphische Darstellung..... | 61 |
| 6.2.14. Statistische Auswertungen | 62 |
| 7. Ergebnisse | 63 |
| 7.1. Zellbiologische Ergebnisse..... | 63 |
| 7.1.1. Myogene Differenzierung von H9c2-Myoblasten..... | 63 |
| 7.1.2. Interleukin-1 β induziert Atrophie in H9c2-Myotuben..... | 65 |

1. Inhaltsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.1.2.1. Immunzytochemische Färbung von H9c2-Myotuben zeigen Strukturveränderungen von schnellem Myosin (Myosin fast) und α -Aktin | 70 |
| 7.1.2.2. Interleukin-1 β (IL-1 β) führt zu einer Reduktion des Myosingehaltes in H9c2-Myotuben..... | 74 |
| 7.1.3. Interleukin-1 β induziert nicht die <i>Trim63</i> Expression und den MuRF1 Proteingehalt in H9c2-Myotuben..... | 75 |
| 7.1.4. Interleukin-1 β steigert die <i>Fbxo32/Atrogin1</i> Expression in H9c2-Myotuben | 79 |
| 7.2. Tierexperimentelle Ergebnisse..... | 80 |
| 7.2.1. Überlebensrate..... | 81 |
| 7.2.2. Systolische und diastolische Herzfunktion in septischen <i>Nlrp3</i> WT und <i>Nlrp3</i> KO Mäusen..... | 82 |
| 7.2.3. Gewichte | 84 |
| 7.2.4. Histologie | 87 |
| 7.2.5. Die Expression von <i>Il1b</i> und <i>Il6</i> ist im Herzen septischer Mäuse gesteigert | 90 |
| 7.2.6. Die RNA Analyse durch Sequenzierung weist auf eine Aktivierung von Autophagiegengen in Herzen septischer Mäuse hin..... | 95 |
| 8. Diskussion | 98 |
| 8.1. Interleukin-1 β (IL-1 β) induziert Atrophie <i>in vitro</i> | 98 |
| 8.2. Überlebensrate der <i>Nlrp3</i> KO Mäuse gegenüber <i>Nlrp3</i> WT Mäusen nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis | 100 |
| 8.3. Sepsis-induzierte Abnahme des Körpergewichtes | 101 |
| 8.4. Abnahme der Herzgewichte unter septischen Bedingungen..... | 102 |
| 8.4.1. MuRF1 und Atrogin1 in der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie | 103 |
| 8.6. <i>Nlrp3</i> spielt eine Rolle in der inflammations-vermittelten Aktivierung der kardialen Autophagie..... | 103 |
| 8.7. Die Rolle von Interleukin-1 β in der Verschiebung der Myosinisofomen α - MHC und β -MHC..... | 105 |

1. Inhaltsverzeichnis

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 8.8. Strukturelle und funktionelle Veränderungen der Herzmuskulatur | 107 |
| 8.9. Die Regulation der kardiovaskulären Homöostase in <i>Nlrp3</i> WT und <i>Nlrp3</i> KO Mäusen | 108 |
| 9. Literaturverzeichnis..... | 110 |
| 10. Abbildungsverzeichnis | 119 |
| 11. Tabellenverzeichnis..... | 121 |
| I. Eidesstattliche Versicherung | 122 |
| II. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen | 123 |
| III. Curriculum vitae | 125 |
| IV. Publikationsliste..... | 127 |
| V. Danksagung..... | 128 |

2. Abkürzungsverzeichnis

2. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| Atg13 | Autophagy-related protein 13 (engl.) |
| Bcl2l1 | BCL2 Like 1 (engl.) |
| BNIP3 | BCL2 Interacting Protein 3 (engl.) |
| BSA | Bovine Serum Albumin; Albumin Fraktion V |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinäure |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| <i>Col1</i> | Collagen1 (Gen) |
| <i>Ctgf</i> | Collagen Tissue Growth Factor (Gen, engl.) |
| Ctsd | Cathepsin D |
| Ctsl | Cathepsin L |
| Ddit4 | DNA Damage Inducible Transcript 4 (engl.) |
| Dexa | Dexamethason |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium (engl.) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| E/A | Verhältnis zwischen der frühen (E) und der späten (A) linksventrikulären Füllung |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>Fbxo32</i> | F-box protein 32 (Gen, engl.) |
| FBS | Fetal Bovine Serum (engl.) |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| HCL | Hydrogenchlorid |
| <i>Il1b</i> | Interleukin 1 beta (Gen) |
| IL-1 β | Interleukin-1 β |
| <i>Il6</i> | Interleukin 6 (Gen) |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| IPAF | NLRC4; NLR family CARD domain-containing protein 4 (engl.) |
| KO | Knockout |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LVEDD | Linksventrikulärer end-diastolischer Durchmesser |
| LVESD | Linksventrikulärer end-systolischer Durchmesser |

2. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------|
| MF20 | Myosin fast und slow |
| mRNA | Messenger RNA |
| MuRF1 | Muscle Ring-finger protein-1 (engl.) |
| <i>MyH6</i> | Myosin heavy chain 6 (Gen, engl.) |
| <i>MyH7</i> | Myosin heavy chain 7 (Gen, engl.) |
| My32 | Myosin fast |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaLP3 | NACHT, LRR und PYD domains-containing protein 3 (engl.) |
| NF- κ B | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (engl.) |
| NLRC4 | NLR family CARD domain-containing protein 4 (engl.) |
| <i>Nlrp3</i> | NLR Family Pyrin Domain Containing 3 (Gen, engl.) |
| NLRs | NOD-like Rezeptoren |
| NOD | nucleotide-binding oligomerization domain (engl.) |
| <i>Nppa</i> | Natriuretic peptide precursor A (Gen, engl.) |
| <i>Nppb</i> | Natriuretic peptide precursor B (Gen, engl.) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| qRT-PCR | Quantitative Real-time PCR |
| RIPA | Radioimmunoprecipitation assay (engl.) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SD | Standardabweichung |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat; Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| TAE | TRIS-Acetat-EDTA |
| TBS | Tris buffered saline (engl.) |
| TGF- β 1 | Transforming growth factor- β 1 (engl.) |
| <i>Tnfa</i> | Tumornekrosefaktor- α (Gen) |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| <i>Trim63</i> | Tripartite Motif Containing 63 (Gen, engl.) |
| TRIS | Tris-aminomethan; Tromethamin; Trometamol |
| WT | Wildtyp |

3. Zusammenfassung

Sepsis ist einer der führenden Gründe für das Versterben von schwer kranken Menschen im Krankenhaus. Dabei führen erhöhte Serumspiegel von inflammatorischen Zytokinen zu einer systemischen Entzündungsreaktion mit Entwicklung einer inflammatorischen Kardiomyopathie. Die daraus resultierende Herzinsuffizienz stellt eine der Hauptursachen für das schlechte Überleben dar. Das inflammatorische Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β) ist während einer Sepsis sehr früh aktiviert; diese Aktivierung erfolgt über das NaLP3-Inflammasom. Bisher ist unklar, ob die Aktivierung von IL-1 β direkt am Auftreten der septischen Kardiomyopathie beteiligt ist und wie dieser Prozess vermittelt wird. Es ist ebenso unbekannt, ob die Hemmung von IL-1 β vor einer septischen Herzinsuffizienz schützen kann. Die hier vorliegende Arbeit zeigt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Ergebnisse einer IL-1 β abhängigen Herzmuskelatrophie. Ebenso konnte eine bessere Überlebenschance durch das Fehlen von *Nlrp3* und der damit verbundenen IL-1 β Aktivierung *in vivo* nachgewiesen werden. Um die Hypothese zu testen, dass die Aktivierung von IL-1 β an der septischen Kardiomyopathie *in vivo* beteiligt ist, wurden *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäuse einer polymikrobiellen Sepsis ausgesetzt und darunter die Herzfunktion und kardiale Stressmarker bestimmt. Dieses erfolgte mit der Methode einer zökalen Ligatur und Punktion (*cecal ligation and puncture*, CLP). Sham-operierte Tiere dienten als Vergleichsgruppe. Nach 96 Stunden zeigte sich in der Gruppe der septischen *Nlrp3* KO Mäuse eine signifikant bessere Überlebensrate als in den septischen *Nlrp3* WT Mäusen ($p \leq 0.05$). Echokardiographisch ließen sich in septischen *Nlrp3* WT, nicht aber in septischen *Nlrp3* KO Mäusen eine systolische und diastolische Dysfunktion nachweisen. Zudem hatten septische *Nlrp3* WT Mäuse ein signifikant verringertes Herzgewicht (20,2%, $p < 0.01$). Im Gegensatz dazu war das Herzgewicht der septischen *Nlrp3* KO Mäuse unverändert. Um zu testen, welche Faktoren an der septischen Kardiomyopathie und Atrophie beteiligt sind, haben wir eine Quantifizierung des kardialen Transkriptoms mittels RNA Sequenzierung durchgeführt. Unsere Daten zeigen eine starke Aktivierung von Autophagiegenen im Herzmuskel septischer *Nlrp3* WT, aber nicht von septischen *Nlrp3* KO Mäusen. Zusammenfassend zeigte sich, dass die Aktivierung von IL-1 β an der Entwicklung einer septischen Kardiomyopathie mit daraus resultierenden systolischen und diastolischen Dysfunktionen beteiligt ist.

4. Abstract

Sepsis is one of the leading causes for increased mortality of critically ill patients in the hospital. In sepsis, elevated serum levels of inflammatory cytokines lead to a systemic inflammation, with development of inflammatory cardiomyopathy. The resulting heart failure represents one of the main causes for poor survival. The inflammatory cytokine interleukin-1 β (IL-1 β) is rapidly and strongly increased during sepsis. IL-1 β activation is mediated by the NaLP3 inflammasome and has direct effects on cardiomyocytes. So far, the role of IL-1 β in the pathogenesis of septic cardiomyopathy is not well understood. It is also unknown whether the inhibition of IL-1 β protects against septic heart failure. The present work shows that IL-1 β mediates cardiac atrophy both *in vivo* and *in vitro*. To test the hypothesis that activation of IL-1 β is involved in septic cardiomyopathy *in vivo*, we exposed *Nlrp3* WT and *Nlrp3* KO mice to polymicrobial sepsis and analyzed cardiac function by echocardiography. Polymicrobial sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP) surgery. Sham operated animals were used as a control group. After 96 hours, septic *Nlrp3* KO mice showed a significantly better survival as compared to septic *Nlrp3* WT mice ($p \leq 0.05$). Analyses of echocardiographical data showed a systolic and diastolic dysfunction in septic *Nlrp3* WT, but not in septic *Nlrp3* KO mice. Septic *Nlrp3* WT mice showed reduced heart weights, whereas heart weights of septic *Nlrp3* KO mice remained unchanged (20.2%, $p < 0.01$). To identify factors involved in septic cardiomyopathy and atrophy, we performed a quantification of the cardiac transcriptome by RNA sequencing. Our data show a strong activation of autophagy genes in septic heart muscle of *Nlrp3* WT mice, but not of *Nlrp3* KO mice.

In summary, activation of IL-1 β is involved in the pathogenesis of septic cardiomyopathy with resulting systolic and diastolic dysfunction.

5. Einleitung

5.1. Sepsis

5.1.1. Definition der Sepsis

Sepsis wird als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion definiert, welche durch eine dysregulierte Reaktion des Organismus auf eine Infektion verursacht wird (Singer et al., 2016). Dabei ist die Organdysfunktion in der 2016 überarbeiteten Definition der Sepsis (Sepsis-III) die führende Komponente. Die Wirtsantwort zeigt sowohl frühe pro- als auch antiinflammatorische Reaktionen auf. Darüber hinaus ist Sepsis durch schwerwiegende nicht-immunologische Veränderungen auf kardiovaskulärer, neuronaler, autonomer, endokrinologischer und metabolischer Ebene gekennzeichnet. In den bisher vorliegenden internationalen Definitionen (Sepsis-I und Sepsis-II) wurde die überschießende Entzündungsreaktion für die Pathogenese der Sepsis verantwortlich gemacht. Die Deutsche Sepsis-Gesellschaft E.V. definierte Sepsis als generalisierte hyperinflammatorische Reaktion verschiedener Ursachen wie Infektion, Verbrennung oder Trauma mit dem klinischen Nachweis einer Infektion oder dem mikrobiologisch gesichertem Nachweis. Dabei mussten mindestens 2 der folgenden Kriterien erfüllt sein:

- Hypo- ($< 36,0^{\circ}\text{C}$) oder Hyperthermie ($> 38,0^{\circ}\text{C}$)
- Tachykardie ($> 90/\text{min}$)
- Tachypnoe ($> 20/\text{min}$) und/oder arterieller $\text{pCO}_2 < 4,3\text{kPa}$ (33 mmHg) und/oder maschinelle Beatmung
- Leukozytose $> 12.000/\mu\text{l}$ oder Leukopenie $< 4.000/\mu\text{l}$ und/oder Linksverschiebung $> 10\%$ im Differenzialblutbild

Diese Kriterien wurden in den letzten Jahren hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität hinterfragt. So wiesen in einer Studie von Kaukonen et al. Patienten mit einer lebensbedrohlichen Infektion weniger als 2 der aufgeführten Kriterien auf und wären anhand der Kriterien als nicht „septisch“ definiert worden. Ebenso zeigte sich die Mortalität 24 Stunden nach Aufnahme von intensivpflichtigen Patienten unabhängig von den aufgezählten Kriterien (Kaukonen et al., 2015). Andere Studien belegen die entscheidende Bedeutung des induzierten Gewebes Schadens sowie

5. Einleitung

dessen Ausmaß und trugen wesentlich zur Überarbeitung der Sepsis-Definition bei (Read et al., 2008; Singer et al., 2016).

Zur Beurteilung des Schweregrades der Organdysfunktion werden gemäß der Sepsis-III Definition auf einer Intensivstation die SOFA Kriterien (englisch: *Sequential Organ Failure Assessment*) herangezogen. Außerhalb der Intensivstation kann ein quick-SOFA (qSOFA) angewendet werden. Eine Sepsis liegt dann vor, wenn ≥ 2 der folgenden qSOFA Kriterien erfüllt sind:

- Systolischer Blutdruck ≤ 100 mmHg
- Atemfrequenz ≥ 22 /min
- Bewusstseinsveränderungen (GCS < 15)

Der septische Schock wird als Sepsis mit schwerer Beeinträchtigung des Kreislaufs (anhaltende Hypotonie mit Katecholaminpflichtigkeit trotz adäquater Volumentherapie) und der zellulären oder metabolischen Funktionseinschränkungen mit hoher Mortalität definiert (Singer et al., 2016).

5.1.2. Epidemiologie der Sepsis

Sepsis ist eine der Hauptursachen für das Versterben von Menschen im Krankenhaus. 2007 lag die Mortalitätsrate einer schweren Sepsis bei 55,2% in deutschen Krankenhäusern (Engel et al., 2007). Andere Studien berichten von einer 30%igen bis 50%igen Mortalitätsrate (Finfer et al., 2004; Friedman et al., 1998; Vincet et al., 2014). Die Aufnahme und die Krankenhausaufenthalte von Patienten aufgrund einer Sepsis stiegen in den letzten Jahren an. Von 2000 bis 2008 haben sich die Fälle nahezu verdoppelt (Hall et al., 2011). Die Kosten der Behandlung von Patienten mit einer Sepsis lagen in den Vereinigten Staaten von Amerika 2002 bei 5,1 Billionen Dollar, 2008 bereits bei 14,6 Billionen Dollar (Agency for Healthcare Research and Quality, 2008). Patienten, die dieses Krankheitsbild überleben, müssen mit langwierigen schweren Beeinträchtigungen ihrer Gesundheit, wie kognitiven und körperlichen Beeinträchtigungen, leben (Iwashyna et al., 2010).

5.1.3. Intensive Care Unit-Acquired Weakness (ICUAW)

Ein großes Problem stellt das Multiorganversagen während einer Sepsis dar. Hiervon ist insbesondere der Skelettmuskel betroffen, was durch einen Verlust von

5. Einleitung

Muskelmasse und dem Auftreten von „*Intensive Care Unit-Acquired Weakness*“ (ICUAW; eine auf der Intensivstation erworbene Schwäche) gekennzeichnet ist.

Der Begriff ICUAW beschreibt eine während der intensivmedizinischen Versorgung hervorgerufene Muskelschwäche und betrifft 25-65% der intensivmedizinisch versorgten Patienten (Ali et al., 2008; De Jonghe et al., 2002; Sharshar et al., 2009). ICUAW kann in die Critical-illness Polyneuropathie (CIP) und in die Critical-illness Myopathie (CIM) aufgeteilt werden. Beide können zum gleichen Zeitpunkt auftreten und sind klinisch nicht immer sicher voneinander abgrenzbar. Bei einer ICUAW können alle Muskelgruppen beteiligt sein (Ali et al., 2008). Diese kann zu sekundären Komplikationen wie einem verlängerten Aufenthalt auf einer Intensivstation mit Immobilisation oder einer verlängerten Entwöhnung vom Beatmungsgerät führen (Schefold et al., 2010).

In der Pathogenese der ICUAW spielen insbesondere metabolische und inflammatorische Interaktionen und Veränderungen eine Rolle (Friedrich, 2008). Die Mechanismen sind jedoch nicht vollständig geklärt. Die CIP ist durch eine axonale Degeneration gekennzeichnet. Inflammatorische Prozesse führen zu mikrovaskulären Veränderungen und zu einer erhöhten Permeabilität des Endoneuriums. Dadurch können Toxine in den Nerv eindringen und diesen schädigen (Fenzi et al., 2003).

Die CIM führt zu Veränderungen der muskulären Struktur und Funktion und kann bereits sehr früh während einer kritischen Erkrankung auftreten (Batt et al., 2013; Puthuchearry et al., 2013). Von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der CIM sind Faktoren wie Entzündungen, Immobilität, endokrine Stressreaktion, Ernährungsdefizite, Störungen der Mikrozirkulation und Denervierung (Batt et al., 2013; Bloch et al., 2012). Dabei werden vermehrt Muskelproteine abgebaut und die Synthese neuer Muskelproteine, vor allem die kontraktilen Proteine wie Myosinschwerkettenproteine, verringert (Derde et al., 2012; Puthuchearry et al., 2013). Von entscheidender Bedeutung für den Proteinabbau ist das Ubiquitin-Proteasom-System. Dieser Prozess ist essenziell für die „Qualitätskontrolle“ der intrazellulär synthetisierten Proteine, wobei fehlerhafte und beschädigte Proteine durch einen kaskadenartigen Prozess ubiquitiniert werden. Dabei agieren 3 Enzyme: das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1), das Ubiquitin-konjugierende (E2), welche das Protein für die Konjugation vorbereiten und die Ubiquitin-Ligase (E3), welche den Ubiquitin Transfer von E2 auf das jeweilige Protein katalysiert, zusammen, um

5. Einleitung

Zielproteine mit Ubiquitin zu konjugieren (Lecker, 2003). In diesem Prozess sind die E3-Ligasen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Zugleich sichern diese Enzyme die Spezifität dieser Reaktion. Die Spezifität der E3-Ligasen wird unter anderem durch deren spezifische Gewebeexpression, deren spezifischen Interaktionspartnern und deren subzellulärer Lokalisation vermittelt (Kandarian et al., 2006; Lecker 2003). Für quergestreifte Muskeln sind die E3-Ligase MuRF1 und Atrogin1 spezifisch (Bodine et al., 2001; Lecker, 2003). MuRF1 und das F-Box Protein Atrogin1 sind bei der Muskelatrophie und Herzmuskelhypertrophie von entscheidender Bedeutung. Zahlreiche Studien zeigten eine erhöhte Expression dieser sogenannten Atrogine und deren Bedeutung unter Atrophie bzw. Hypertrophie (Bodine et al., 2001; Lecker, 2003; Chen et al., 2012; Kedar et al., 2004; Clarke et al., 2007).

5.1.4. Auswirkungen der Inflammation auf das Myokard

Die systemische Inflammation in der Sepsis beeinflusst die Funktion des kardiovaskulären Systems. Eine der Folgen im septischen Schock ist die Schwächung des Herzmuskels. Bereits 2002 beschrieben Court et al. in einem Review die Auswirkungen der Sepsis und des septischen Schocks auf das Herz (Court et al., 2002). Die Schwächung des Myokards führt zu einer kombinierten systolischen und diastolischen Dysfunktion. Diese ist mit einer verminderten linksventrikulären Auswurffraktion sowie einem erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Volumenindex verbunden. Auch die geringere Füllung und abnorme Relaxation des linken Ventrikels in der Diastole weisen auf eine myokardiale Dysfunktion hin.

Inflammation ist ein entscheidender Faktor bei der Entwicklung von kardialer Atrophie und besitzt kardiodepressive Auswirkungen. Hierbei spielen Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) eine wichtige Rolle (Saito et al., 2003; Slimani et al., 2014). Diese Zytokine werden von Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen oder mononukleären Phagozyten gebildet und sezerniert. Nach deren Freisetzung können sie die Kontraktionsfähigkeit der Herzmuskulatur reduzieren (Kumar et al., 1996; siehe 5.6.1.4.). Gleichzeitig werden anti-inflammatorisch wirksame Mediatoren, wie Interleukin-10 (IL-10), *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β) und Interleukin-1-Rezeptorantagonist aktiviert (Court et al., 2002).

5. Einleitung

Die Initiierung der Immunantwort setzt die Erkennung von pathogenen Erregern, wie beispielsweise durch die Erkennung von sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs, Pathogen assoziierte molekulare Muster) oder *Damage-associated molecular pattern molecules* (DAMPs, Gefahr-assoziierte molekulare Muster; siehe auch 5.2.2.) voraus. Die Zellen des angeborenen Immunsystems können durch spezielle Oberflächenrezeptoren PAMPs wie Lipopolysaccharide, Flagelline oder doppelsträngige RNA erkennen und dadurch aktiviert werden. Von Bedeutung bei diesem Vorgang sind 3 Familien der *pattern recognition receptors* (PRRs, Mustererkennungsrezeptor): die Toll-like Rezeptoren (TLR), die NOD-like Rezeptoren (NLRs) und die RIG-I-like Rezeptoren (RLRs) (Creagh et al., 2006).

5.2. Das NaLP3-Inflammasom

5.2.1. Aufbau des NaLP3-Inflammasoms

Die Gruppe der *nucleotide-binding oligomerization domain receptors*, kurz NOD-like Rezeptoren (NLRs), wird phylogenetisch in 3 Subfamilien untergliedert, die NaLPs (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein*), die IPAF (*IL-1 β converting enzyme protease-activating factor*) und die NODs (*nucleotide-binding oligomerization domain*). Diese unterscheiden sich in ihrer molekularen Struktur und Funktion. Sie bestehen aus je 3 Domänen, von denen die zentral gelegene NACHT-Domäne (auch NOD oder NBD) Bestandteil aller Untergruppen ist. Darüber hinaus besitzen fast alle NOD-like Rezeptoren eine c-terminale *Leucin rich repeat* (LRR, Leucin-reiche Wiederholung) Domäne und eine variable N-terminale Interaktionsdomäne, welche aus einer *caspase recruitment domain* (CARD, Caspase-rekrutierende Domäne), einer *pyrin domain* (PYD, Pyrin Domäne), einer *acidic transactivating domain* (sauer transaktivierende Domäne) oder einer *baculovirus inhibitor repeats* (BIRs, Baculovirus-inhibierende Wiederholungen) bestehen kann (Martinon et al., 2009).

Die NaLPs stellen die größte Subfamilie der NOD-like Rezeptoren (NLRs) dar. Sie sind ein Teil des angeborenen Immunsystems. Von ihnen konnten bereits 14 Gene identifiziert werden (Martinon et al., 2009). Zu ihnen gehören unter anderem NaLP1, NaLP2 und NaLP3. Sie sind ebenfalls unter dem Begriff Inflammasom bekannt und aktivieren die Cysteinprotease Caspase1.

Das NaLP3-Inflammasom ist ein zytosolischer Proteinkomplex, der vorwiegend in Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen (Kummer et al.,

5. Einleitung

2007), aber auch in Osteoblasten vorhanden ist (McCall et al., 2008). Das Inflammasom besteht aus den Proteinen *NACHT*, *LRR* and *PYD domains-containing protein 3* (NaLP3, NACHT, LRR und PYD Domäne enthaltendes Protein), *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC, Apoptose assoziiertes Fleck-ähnliches CARD enthaltendes Protein) und Caspase1. ASC interagiert über die *pyrin-domain* (PYD, Pyrin-Domäne) mit dem NaLP-Protein und über die *caspase recruitment domain* (CARD, Caspase rekrutierende Domäne) mit der Pro-Caspase1. Die zentral gelegene NACHT-Domäne, auch *nucleotide-binding domain* (NBD, Nukleotid-bindende Domäne) bindet durch ihre Eigenschaft als ATPase ATP und aktiviert durch ATP abhängige Oligomerisation das Inflammasom (Duncan et al., 2007).

Die *leucine-rich repeats* (LRR, Leucin-reiche Wiederholung) sind Aminosäuresequenzen von etwa 20-30 Aminosäuren, welche mehrere Leucine enthalten; dabei lagern sich mehrere dieser LRR-Motive zu einer LRR-Domäne zusammen und bilden im gefalteten Zustand eine α/β -Hufeisen-Faltung. Diese ermöglicht die Detektion von PAMPs wie Lipopolysacchariden, Flagellinen oder doppelsträngiger RNA (Bella et al., 2008) (Abbildung 1).

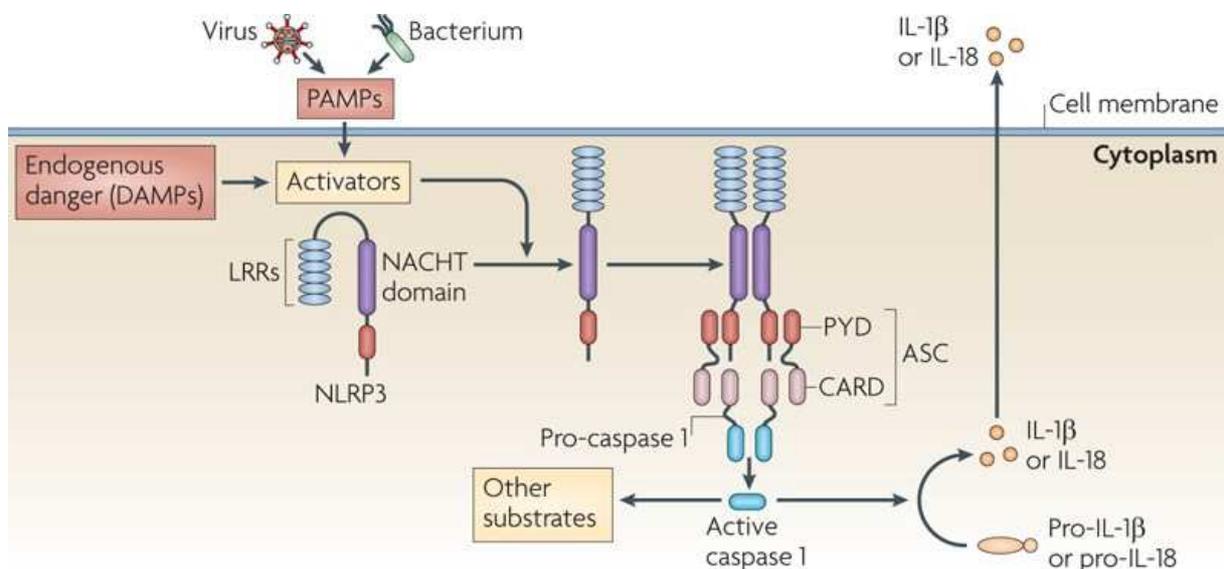


Abbildung 1: Struktureller Aufbau und Aktivierung des NaLP3-Inflammasoms

Unter physiologischen Bedingungen liegt NaLP3 frei im Zytoplasma vor und interagiert mit der NACHT-Domäne und *leucine-rich repeats* (LRRs). In Anwesenheit von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) oder *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) oligomerisiert NaLP3 und rekrutiert *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD* (ASC) sowie pro-Caspase1. Durch Proteolyse wird die inaktive pro-Caspase1 in die aktive Caspase1 umgewandelt. Die aktivierte Caspase1 schneidet die Zytokine pro-Interleukin-1β und pro-Interleukin-18 in ihre aktiven Formen, nämlich Interleukin-1β und Interleukin-18. Anschließend werden die Zytokine in den extrazellulären Raum abgegeben (mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature aus: Tschopp J, Schroder K, 2010).

5. Einleitung

5.2.2. Aktivierung des NaLP3-Inflammasoms

Das NaLP3-Inflammasom spielt eine entscheidende Rolle in der angeborenen Immunantwort. Es ist involviert in der Immunabwehr gegen Bakterien, Viren und Pilze (¹Kanneganti et al., 2006; ²Kanneganti et al., 2006). Durch seinen strukturellen Aufbau kann es PAMPs, wie doppelsträngige RNA oder das bakterielle Muramyl-Dipeptid (MDP), ein Zellwandbestandteil der meisten gram-positiven und gram-negativen Bakterien, erkennen und wird durch diese aktiviert (¹Kanneganti et al., 2006). Neben den PAMPs können auch die mikrobiellen Gifte Nigericin (*Streptomyces hygroscopicus*), Maitotoxin (*Dinoflagellatis*) oder α -Toxin (*Staphylococcus aureus*) das Inflammasom aktivieren (Mariathasan et al., 2006; McGilligan et al., 2013). Zusätzlich kann NaLP3 DAMPs wie ATP, nekrotische Zellen oder Harnsäure, die aus den Wirtszellen stammen, erkennen (Duncan et al., 2007; Mariathasan et al., 2006). Darüber hinaus wird die Aktivität des NaLP3-Inflammasoms über die intrazelluläre Kaliumkonzentrationen reguliert. Durch plötzlichen Kaliumausstrom aus der Zelle, beispielsweise durch Zellschädigung, erfolgt eine spontane Formierung des NaLP3-Proteinkomplexes. Darüber hinaus können Toxine, wie Nigericin (Antiport von Wasserstoff-Ionen und Kalium) und α -Toxin (Schädigung der Zellmembran) als Kaliumkanäle wirken und durch einen vermehrten Kaliumausstrom die Formierung des NaLP3-Proteinkomplexes weiter akzelerieren. ATP hingegen interagiert mit dem P2X7 Rezeptor an der Zelloberfläche und aktiviert den sofortigen Kaliumausstrom aus der Zelle (Pétrilli et al., 2007) (Abbildung 2).

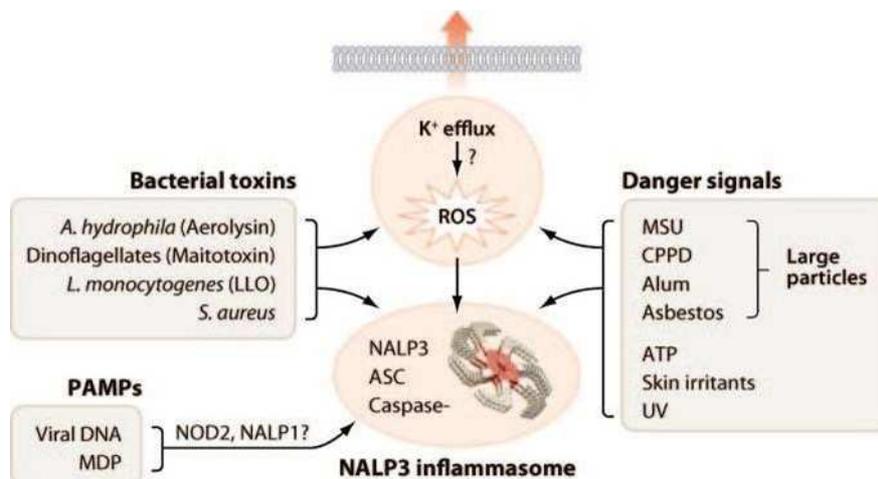


Abbildung 2: Aktivatoren des NaLP3-Inflammasoms

5. Einleitung

Die Aktivierung des NaLP3-Inflammasoms wird durch verschiedene zelluläre Signale getriggert wie beispielsweise durch Kaliumausstrom oder durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Für die Muramyl-Dipeptid (MDP) abhängige Aktivierung der Caspase1 sind ebenfalls die NOD-like Rezeptoren NOD2 und NaLP1 notwendig.

(CPPD-*calcium pyrophosphate dihydrate crystals*; MSU-*monosodium urate crystals*; PAMP-*pathogen-associated molecular pattern*; UV-*ultraviolet light*) (mit freundlicher Genehmigung durch ANNUAL REVIEWS aus: Martinon F, Mayor A, Tschopp J, 2009).

Nach der Aktivierung des Inflammasoms homodimerisieren 2 pro-Caspase1 Moleküle, was zu deren Autokatalyse führt. Dabei werden die katalytisch aktiven p20 und p10 Domänen der Caspase1 freigesetzt (Trendelenburg, 2008; Mariathasan et al., 2004). Die aktivierte Caspase1 bewirkt anschließend eine katalytische Spaltung der inaktiven Vorläuferform pro-Interleukin-1 β (pro-IL-1 β) in dessen aktive Form das Interleukin-1 β (IL-1 β) und vermittelt zusätzlich dessen Sekretion. IL-1 β ist in zahlreichen chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Gicht, Nieren- oder Herzerkrankungen involviert (Bracey et al., 2013; Martinon et al., 2006; Ortis et al., 2010; Vilaysane et al., 2010). Bracey et al. zeigten 2013, dass die Aktivierung des NaLP3-Inflammasoms eine Herzmuskelentzündung sowie eine systolische Dysfunktion durch Aktivierung von pro-Interleukin-1 β fördert. Erhöhte Interleukin-1 β Serumspiegel korrelierten mit einer reduzierten *fractional shortening* (Verkürzung des Herzmuskels während des Pumpvorganges), also einer verminderten Herzfunktion (Bracey et al., 2013).

5.3. Interleukin-1 β (IL-1 β)

Das Zytokin IL-1 β gehört zu der Interleukin-1-Familie. Es wird überwiegend in mononukleären Phagozyten, den Monozyten und Makrophagen, aber auch in Fibroblasten und Endothelzellen produziert. Das *IL-1 β* Gen wird auf dem Chromosomenabschnitt 2q14 kodiert und in seiner inaktiven Form, dem *pro-IL-1 β* , transkribiert. Die Vorläuferform liegt anschließend frei im Zytosol vor, ein geringer Anteil ist in sekretorischen Lysosomen enthalten (Andrei et al., 1999). Die Synthese von pro-IL-1 β wird unter anderem durch Toll-like-Rezeptor-Agonisten induziert. Die Toll-like Rezeptoren gehören zu der Gruppe der PRRs und dienen der Erkennung von PAMPs. Zum anderen führt die Bildung und Sekretion von IL-1 β in den extrazellulären Raum zu einem positiven Feedbackmechanismus über den Interleukin-1-Rezeptor Typ 1 (IL1R1). Dieser wird auf der Oberfläche von Zellen präsentiert, ermöglicht die Bindung von IL-1 β und aktiviert über den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) die erneute Transkription des *pro-IL-1 β* (Weber et al., 2010).

5. Einleitung

Für die Aktivierung von IL-1 β ist die Cysteinprotease Caspase1 notwendig. Diese schneidet die Vorläuferform pro-IL-1 β (31kDa) in die biologisch aktive Form, dem IL-1 β (17kDa). Caspase1 kann, wie oben beschrieben, durch das NaLP3-Inflammasom aktiviert werden. Makrophagen, die mit *Salmonella typhimurium* (Mariathasan et al., 2004; Miao et al., 2006), *Shigella flexneri* (Suzuki T et al., 2007), *Legionella pneumophila* (Amer et al., 2006) oder *Pseudomonas aeruginosa* (Franchi et al., 2007) infiziert sind, können über das NLRC4-Inflammasom (auch IPAF genannt) die Sekretion von IL-1 β stimulieren. Darüber hinaus wird die Caspase1 von *Listeria monocytogenes* infizierten Makrophagen via dem NaLP3-, NLRC4- und AIM2-Inflammasom aktiviert (Wu et al., 2010). Einige Studien haben gezeigt, dass die Proteinase3 (PR3) ebenfalls pro-IL-1 β schneidet und in die biologisch aktive Form IL-1 β überführt (Coeshott et al., 1999; Joosten et al., 2009).

IL-1 β induziert die Genexpression und Synthese der Cyclooxygenase-2 (COX-2), Phospholipase A₂ und induzierbarer Nitritoxid- (NO-) Synthase (iNOS). Diese führen über die Produktion von Prostaglandinen, plättchenaktivierender Faktor und NO zu den klassischen Zeichen einer Entzündung mit Fieber, Vasodilatation und Blutdruckabfall. Die Freisetzung von IL-1 β induziert eine Bildung von speziellen Rezeptoren, den sogenannten Selektinen, die als Bindungsstelle für in der Blutbahn zirkulierende Leukozyten dienen. Nach Bindung können diese via Diapedese in das umliegende Gewebe auswandern und initiieren die Ausschüttung von Elastasen, Proteasen und Hyaluronidasen. Diese zerstören die unter den Endothelzellen liegende Basalmembran und das umliegende Bindegewebe, um die Einwanderung weiterer Immunzellen zu ermöglichen. Es kommt zu einem typischen Anstieg der neutrophilen Granulozyten. Außerdem steuert IL-1 β die Synthese anderer Zytokine, wie IL-6, und induziert mit IL-6 die Synthese von Akute-Phase-Proteinen. Darüber hinaus aktiviert IL-1 β den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und der Apoptose einer Zelle von Bedeutung ist (Weber et al., 2010).

Bisher ist unklar, ob die Aktivierung von IL-1 β direkt am Auftreten der septischen Kardiomyopathie beteiligt ist und wie dieser Prozess vermittelt wird. Es ist ebenso unbekannt, ob die Hemmung von IL-1 β vor einer septischen Herzinsuffizienz schützen kann.

5.4. Induktion einer polymikrobiellen Sepsis durch zökale Ligatur und Punktion (CLP-Methode)

Die zökale Ligatur und Punktion (*cecal ligation and puncture*, CLP) ist eine Methode zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis im Mausmodell. Sie findet Anwendung bei experimentellen Studien zur pathophysiologischen Untersuchung der Sepsis und der inflammatorischen Antwort in einem Organismus (Dejager et al., 2011; Wichterman et al., 1980). Für die genaue Durchführung der Methode in diesem Experiment wird auf Abschnitt 6.2.2.1. verwiesen.

5.5. Herzmuskulatur

5.5.1. Aufbau des Herzens

Das Herz ist ein Hohlmuskel und wiegt bei einem erwachsenen Menschen etwa 250 g bis 300 g. Es liegt hinter dem Brustbein und ist zwischen dem linken und rechten Lungenflügel eingebettet. Das Herz wird vom Perikard, dem Herzbeutel, umschlossen und liegt mit der Herzspitze dem Zwerchfell auf. Es besteht aus 4 Höhlen, 2 Vorhöfen und 2 Kammern. Die Vorhöfe, Atria, und die Herzkammern, Ventrikel, werden durch eine Scheidewand, dem Vorhofseptum bzw. dem Kammerseptum, voneinander getrennt. Zwischen den Atria und den Ventrikeln befinden sich die Segelklappen, die einen unidirektionalen Blutfluss sicherstellen. Dabei trennt die Trikuspidalklappe das rechte Atrium vom rechten Ventrikel, die Mitralklappe trennt das linke Atrium vom linken Ventrikel. Die Trennung der Herzkammern ermöglicht die Aufrechterhaltung von 2 Blutkreislaufsystemen, dem Lungenkreislauf und dem Körperkreislauf. Bei dem Lungenkreislauf fließt das Blut aus dem rechten Ventrikel durch eine Taschenklappe, die Pulmonalklappe, in die Lungenarterie und von dort in die Lunge. Hier erfolgt unter anderem der Austausch von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid. Das Blut wird mit Sauerstoff angereichert und gibt Kohlenstoffdioxid ab. Danach fließt das sauerstoffreiche Blut über die Lungenvene in das linke Atrium zurück, wird durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel und anschließend über eine weitere Taschenklappe, die Aortenklappe, in den Körperkreislauf gepumpt. Der Körperkreislauf ermöglicht die Versorgung des Organismus mit Sauerstoff sowie den Transport von Nährstoffen, Hormonen, Wärme und Abfallprodukten. Über die obere und unter Hohlvene gelangt das Blut zurück in das rechte Atrium, wodurch sich ein geschlossener Kreislauf ergibt (Benninghoff, 2004).

5.5.2. Aufbau der Herzmuskulatur

Der Herzmuskel, das Myokard, ist ein zwischen dem Epikard und dem Endokard gelegenes Muskelgewebe. Morphologisch weist das Myokard Bestandteile der Skelettmuskulatur und der glatten Muskulatur auf. Die Herzmuskelzellen, die Kardiomyozyten, besitzen je 1 mittelständigen Zellkern, in seltenen Fällen auch 2. Sie enthalten quergestreifte Muskelfasern. Diese sind in ein System für den schnellen Calciumeinstrom in Form von Terminalzisternen des sarkoplasmatischen Retikulums und T-Tubuli der Zellmembran, auch Dyade genannt, eingebettet.

Die einzelnen Kardiomyozyten sind durch querverlaufende Glanzstreifen, Disci interscalares, miteinander verbunden. Diese bestehen aus Desmosomen, die der Verankerung der Zellen untereinander und der Stabilisierung des Zellverbundes gegenüber Scher- und Zugkräften dienen. An ihnen sind die Myofibrillen für die Zugübertragung verankert. Die auch in den Glanzstreifen gelegenen Gap Junctions sind Ansammlungen von Zell-Zell-Kanälen, die die Zellmembran benachbarter Zellen durchquert und das Zytoplasma dieser benachbarten Zellen miteinander verbindet. Sie ermöglichen die schnelle und synchrone Erregungsübertragung und -weiterleitung (Benninghoff, 2008).

Die kardiomyozytären Myofibrillen bestehen aus nebeneinander angeordneten Sarkomeren (Abbildung 3). Dabei wird ein Sarkomer durch 2 Z-Scheiben begrenzt. Innerhalb der Z-Scheiben befinden sich die für die Kontraktion benötigten Aktin- und Myosinfilamente. Die Aktinfilamente sind an den Z-Scheiben verankert und ragen in das Sarkomer hinein. Die Myosinfilamente gehen von der M-Linie aus und sind über das Verankerungsprotein Titin mit der Z-Scheibe verbunden. Im relaxierten Zustand ist die H-Zone, ein Bereich aus Myosinfilamenten, sichtbar, in deren Mitte die M-Linie verläuft. Der überlappende Bereich von Aktin- und Myosinfilamenten wird als A-Bande (A-anisotrop, doppelt lichtbrechend) bezeichnet. Die I-Bande (I-isotrop, einfach lichtbrechend) verläuft von der Z-Scheibe bis zur A-Bande und enthält nur Aktinfilamente (Abbildung 3) (Benninghoff 2008; Sonnenblick, 1968).

5. Einleitung

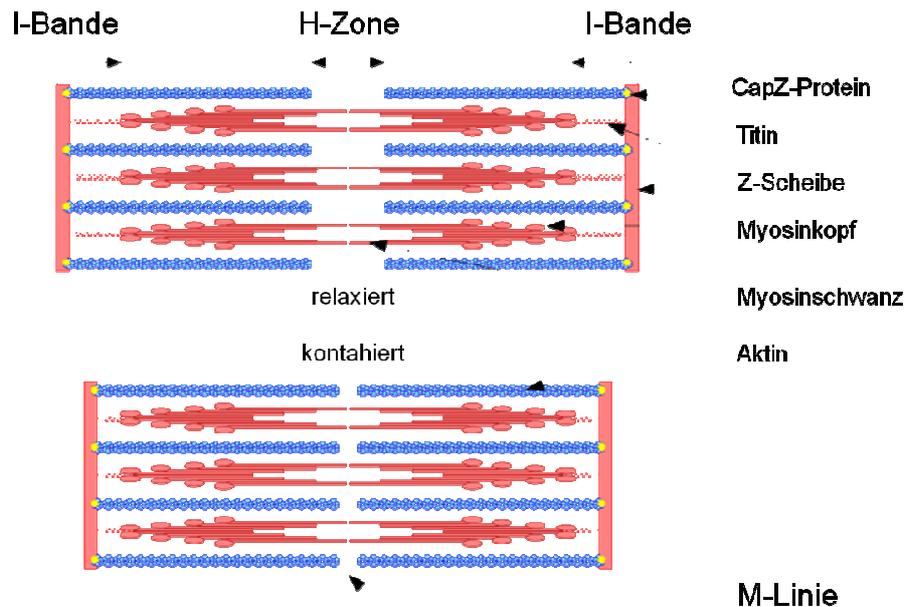


Abbildung 3: Aufbau des Sarkomers

Als Sarkomer wird der Bereich zwischen 2 Z-Scheiben einer Myofibrille bezeichnet. In der Mitte des Sarkomers befindet sich die M-Linie, die von der H-Zone (benannt nach Victor Hensen) umschlossen wird. Hier befinden sich nur Myosinfilamente. Der Bereich um die Z-Scheiben, welcher nur Aktinfilamente enthält, wird als I-Bande (I-isotrop) bezeichnet. Der Bereich zwischen 2 I-Bändern wird als A-Bande (A-anisotrop) bezeichnet (angelehnt an Richfield, David. "Medical gallery of David Richfield 2014". Wikiversity Journal of Medicine 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.009. ISSN 2002-4436. - Eigenes Werk, CC BY-SA 3.0).

Die einzelnen Aktinfilamente, auch dünne Filamente genannt, sind lineare Proteinpolymere und aus 2 Aktineinzelsträngen miteinander verwunden. Weitere Bestandteile der Aktinfilamente sind Tropomyosin, Tropomodulin und der Troponinkomplex, bestehend aus Troponin I, Troponin C und Troponin T (Abbildung 4).

Jedes Myosinfilament besteht aus etwa 300 Myosinmolekülen. Dabei besteht ein Myosinmolekül aus 2 identischen schweren Ketten. Diese können in 3 Abschnitte unterteilt werden: in einen birnenförmigen Kopfabschnitt, einen Halsabschnitt und einen Schwanzteil. Die Schwanzabschnitte lagern sich zu Myosinfilamenten zusammen, wohingegen die Kopfabschnitte mit einem Teil des Halsabschnittes senkrecht zur Filamentoberfläche abstehen und die Querbrücken zu den Aktinfilamenten bilden (Benninghoff, 2008; Klinke, 2005).

Die Querbrücken ihrerseits sind mit Leichtketten verbunden (Abbildung 4).

5. Einleitung

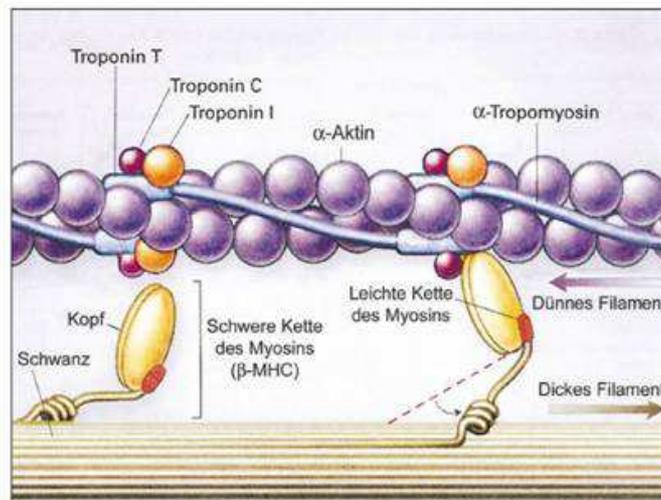


Abbildung 4: Aufbau der Aktin- und Myosinfilamente

Das Aktinfilament, auch dünnes Filament, besteht aus Aktineinzelsträngen, Tropomyosin, Troponomodulin und dem Troponinkomplex: Troponin I, Troponin C und Troponin T. Das Myosinfilament, auch dickes Filament, besteht aus dem Kopfabschnitt, einem Halsabschnitt und einem Schwanzteil. Die Schwanzabschnitte lagern sich zu Myosinfilamenten zusammen, die Kopfabschnitte stehen mit einem Teil des Halsabschnittes senkrecht zur Filamentoberfläche und bilden die Querbrücken zu den Aktinfilamenten. Die Querbrücken ihrerseits sind mit Leichtketten verbunden (mit freundlicher Genehmigung aus: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/daehmlow-steffen-2006-04-07/HTML/image002.jpg>).

5.5.3. Kontraktionsvorgang der Herzmuskulatur

Im Gegensatz zu der willkürlich innervierbaren Skelettmuskulatur, arbeitet das Myokard unwillkürlich. Die Kontraktion der Herzmuskulatur erfolgt durch eine endogen erzeugte Erregung, welche in den herzeigenen Erregungszentren, dem Sinus- oder Atrioventrikularknoten, gebildet und über das Hische Bündel und die Purkinje-Fasern auf die Kardiomyozyten übertragen wird.

Die Kontraktion der Herzmuskulatur beginnt mit der Ausbreitung der Erregung über das Myokard. Sie erfolgt auf molekularer Ebene durch die Verkürzung der einzelnen Sarkomere der Myofibrillen. Calcium aktiviert die Enzymaktivität des Myosinköpfchens, wo gebundenes ATP gespalten wird. Darüber hinaus verändert Calcium die Konfiguration des Troponin-Tropomyosin-Komplex am Aktinfilament, so dass dort die Bindungsstellen für Myosin frei werden. Sobald Myosin an Aktin bindet, wird der verbleibende Phosphatrest aus der ATP-Spaltung frei, mechanische Energie wird erzeugt und die Myosinköpfchen verlagern sich in einem sogenannten Kraftschlag in einen 45° Winkel. Dadurch werden die Aktinfilamente zueinander Richtung Z-Linie des Sarkomers geschoben; sie gleiten an den Myosinfilamenten vorbei, daher heißt dieser Mechanismus auch Gleitfilamenttheorie. Sobald sich ein

5. Einleitung

neues ATP an Myosin anlagert, löst sich das Myosinköpfchen vom Aktinfilament und kann eine neue Bindung eingehen (Benninghoff, 2004; Benninghoff, 2008; Klinker, 2005).

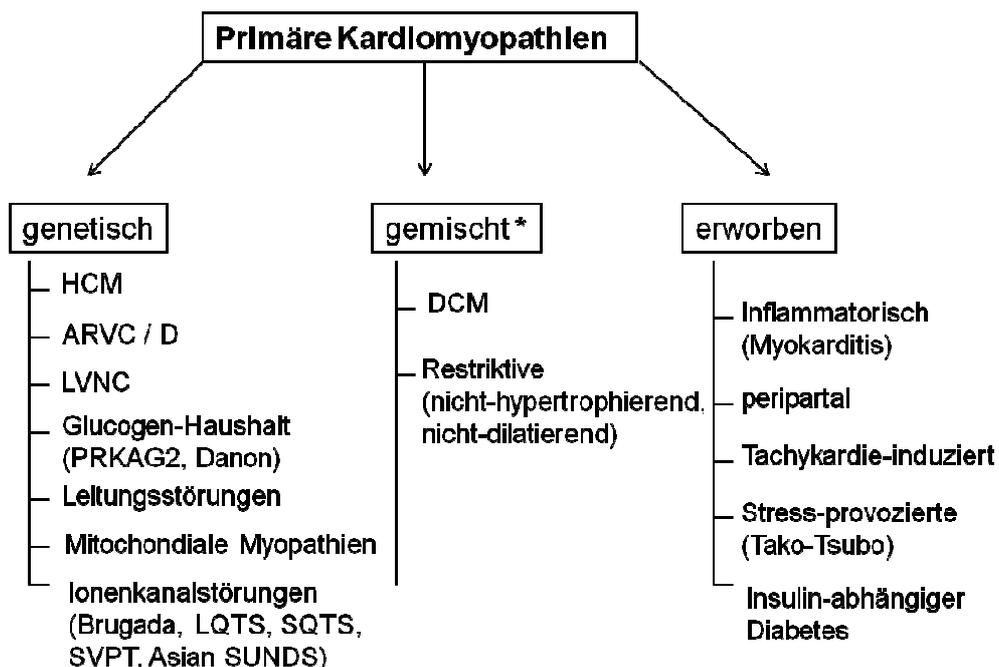
5.6. Kardiomyopathien

2006 definierte die American Heart Association (AHA) die Kardiomyopathie als eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards, welche mit elektrischen und/oder mechanischen Funktionsstörungen assoziiert sind. In der Regel weisen die Kardiomyopathien eine Hypertrophie oder Dilatation einer oder beider Herzkammern auf. Die Ursachen dafür sind vielfältig. Dabei können sich Kardiomyopathien auf das Herz begrenzen oder Teil einer allgemeinen Systemerkrankung sein. Diese führen oft zu kardiovaskulär bedingten Todesfällen oder einer fortschreitenden Herzinsuffizienz (Maron et al., 2006).

Die Kardiomyopathien werden nach Organbeteiligung in die primären und die sekundären Kardiomyopathien eingeteilt.

5.6.1. Primäre Kardiomyopathien

Primäre Kardiomyopathien beschränken sich auf die Herzmuskulatur. Zu ihnen zählen die genetisch bedingten, die genetisch und nicht genetisch (gemischt) bedingten und die erworbenen Kardiomyopathien (Abbildung 5).



5. Einleitung

Abbildung 5: Einteilung der primären Kardiomyopathien

Die primären Kardiomyopathien werden in die genetisch bedingten, gemischten (*genetisch und nicht genetisch bedingte, wobei der Anteil der nicht genetisch bedingten überwiegt; in einigen Fällen wurde von genetisch bedingten Ursachen berichtet) und erworbenen unterteilt. HCM (Hypertrophe Kardiomyopathie); ARVC/ D (Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie/ Dysplasie); LVNC (Linksventrikuläre noncompaction); PRKAG2 (Proteinkinase, AMP-aktivierte, gamma 2 nicht katalytische Untereinheit), LQTS (langes QT-Syndrom), SQTS (kurzes QT-Syndrom), CVPT (katecholaminerge ventrikuläre polymorphe Tachykardie); DCM (Dilatative Kardiomyopathie) (angelehnt an Maron et al., American Heart Association, Inc., Circulation 2006;113:1807-1816, Seite 1810)

5.6.1.1. Die hypertrophe Kardiomyopathie

Die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) stellt die am häufigsten vorkommende Kardiomyopathie dar. Sie ist eine autosomal dominant vererbte Herzerkrankung und betrifft etwa 1 von 500 Menschen in der allgemeinen Bevölkerung (Bos et al., 2009; Cardim et al., 2018; Maron et al., 1995). Sie ist definiert als asymmetrische Verdickung des linksventrikulären Myokards ohne Dilatation in Abwesenheit einer anderen System- oder Herzerkrankung (Maron et al., 2006). Die genetischen Ursachen einer hypertrophen Kardiomyopathie sind Veränderungen in Genen, welche für die Proteine der kontraktilen Einheiten der Sarkomere kodieren. Derzeit sind über 1000 verschiedene Mutationen in Genen bekannt, die für 11 Komponenten des Sarkomers kodieren. Zu den häufigsten betroffenen Proteinen zählen β -MHC, Myosinbindungsprotein C und Troponin T, welche für 60% bis 70% der HCM verantwortlich sind (Bos et al., 2009; Cardim et al., 2018; Maron et al., 2006). Dabei tritt die HCM sehr heterogen im Phänotyp und klinischen Verlauf auf und wird durch epigenetische und umweltbedingte Mechanismen in ihrer Penetranz und Expressivität beeinflusst (Olivotto et al., 2012). Die HCM kann Ursache für den plötzlichen Herztod, der Herzinsuffizienz, dem Vorhofflimmern oder eines Schlaganfalls sein (Cardim et al., 2018).

5.6.1.2. Die dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist durch eine Vergrößerung des linken und/oder rechten Ventrikels ohne Zunahme der Wanddicke des Myokards gekennzeichnet. Diese führt zu einer verminderten Auswurfleistung des Herzens, einer progredienten Herzinsuffizienz, zu supraventrikulären und ventrikulären Arrhythmien, Thromboembolien und zum plötzlichen Herztod (Maron et al., 2006). Mit einer Prävalenz von etwa 1:2500 ist die dilatative Kardiomyopathie die dritthäufigste Ursache einer Herzinsuffizienz (Maron et al., 2006).

5.6.1.3. Die inflammatorische Kardiomyopathie

Die inflammatorische Kardiomyopathie zählt zu den erworbenen Kardiomyopathien und wird in eine akute und in eine chronische Form eingeteilt. Die inflammatorische Kardiomyopathie kann durch ein breites Spektrum an infektiösen und nicht-infektiösen Faktoren hervorgerufen werden. Zu den infektiösen Ursachen gehören Bakterien (Meningokokken, Streptokokken), Viren (HIV, Parvovirus) und Pilze (Aspergillus, Candida). Nicht infektiöse Ursachen sind beispielsweise Gifte, Drogen (Kokain) und allergische Reaktionen, wie beispielsweise auf Antibiotika (Maron et al., 2006; Patel et al., 2015).

5.6.1.4. Die Sepsis-induzierte Kardiomyopathie

Die Sepsis-induzierte Kardiomyopathie zählt ebenso zu den primären, erworbenen Kardiomyopathien und nahm in den letzten Jahren an Bedeutung zu. Kardiale Dysfunktionen während einer Sepsis oder einem septischen Schock können bis zu 60% der Sepsis-Patienten betreffen (Vieillard-Baron et al., 2008). Eine retrospektive Kohortenstudie berichtet von 13,8% der septischen Patienten, die eine Sepsis-induzierte Kardiomyopathie entwickeln (Sato et al., 2016). Die Sepsis-induzierte Kardiomyopathie ist durch eine globale ventrikuläre, jedoch reversible Dysfunktion sowie durch eine Dilatation des linken Ventrikels ohne Wandbewegungsstörungen gekennzeichnet (Antonucci et al., 2014; Liu et al. 2017; Sato und Nasu, 2015). Die myokardiale Dysfunktion wird durch Pathogene, der globalen Ischämie sowie durch das „*capillary leak*“ hervorgerufen (Antonucci et al., 2014; Kakihana et al., 2016). Die ventrikuläre Dysfunktion führt dabei zu einer Abnahme der Ejektionsfraktion, das prozentuale Blutvolumen in Bezug auf das Gesamtvolumen des Ventrikels, welches bei einer Herzaktion durch den Ventrikel in den großen Körperkreislauf ausgeworfen wird.

Die Pathophysiologie der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist bekannt, dass inflammatorische Zytokine, wie TNF- α , IL-6 (Antonucci et al., 2014) und IL-1 β (Kakihana et al., 2016; Kumar et al., 1996) eine zentrale Rolle in der myokardialen Dysfunktion spielen. Kumar et al. zeigten in einer Studie anhand von Rattenkardiomyozyten die synergistische Wirkung von TNF- α und IL-1 β auf die Kontraktionsfähigkeit der Myozyten. Die Anwesenheit beider Zytokine führte zu einer verminderten Kontraktilität, wohingegen deren Eliminierung die myozytäre Kontraktilität verbesserte (Kumar et al., 1996). Eine andere Gruppe

5. Einleitung

zeigte an isolierten Rattenherzen die Reduzierung der Herzmuskelkraft nach Injektion von IL-1 in die Aorta (Hosenpud et al., 1989). Weitere Gruppen analysierten die Effekte einer Hemmung von IL-1 β . In einer randomisierten, „open-label“ und Placebo-kontrollierten Studie an 99 Patienten mit Sepsis oder septischen Schock zeigten Fisher et al., dass die Gabe von IL-1 Rezeptorantagonisten die hämodynamischen und metabolischen Folgen einer Sepsis und eines septischen Schocks reduziert (Fisher et al., 1994). Die Rolle von IL-6 in der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie wurde von Pathan et al. untersucht. Diese zeigten das Vorhandensein von IL-6 Signalwegen *in vitro* anhand von isolierten Rattenherzmyozyten und stellten einen Zusammenhang zwischen IL-6 Spiegeln und dessen negativ inotropen Effekt über den p38 MAP Kinase-Signalweg dar (Pathan et al., 2011).

Während einer Sepsis ist IL-1 β frühzeitig aktiviert; diese Aktivierung erfolgt über das NaLP3-Inflammasom. Mäuse, bei denen das *Nlrp3* Gen in der Keimbahn inaktiviert wurde (*Nlrp3* KO) weisen reduzierte IL-1 β Spiegel auf. IL-1 β wirkt direkt auf Herzmuskelzellen und kann weitere Zytokine, wie IL-6 aktivieren. Bisher ist unklar, ob die Aktivierung von IL-1 β direkt am Auftreten der septischen Kardiomyopathie beteiligt ist und wie dieser Prozess vermittelt wird. Es ist ebenso unbekannt, ob die Hemmung von IL-1 β vor einer septischen Herzinsuffizienz schützen kann. Ob und in wieweit eine Reduzierung von aktiviertem IL-1 β Auswirkungen auf die inflammationsvermittelte Kardiomyopathie hat, soll die vorliegende Studie zeigen.

5.6.2. Sekundäre Kardiomyopathien

Die sekundären Kardiomyopathien zeigen pathologische myokardiale Beteiligungen im Rahmen einer Vielzahl von systemischen Erkrankungen. Vor der Klassifikation der AHA 2006 zählten diese zu den spezifischen Kardiomyopathien oder spezifischen Herzmuskelerkrankungen (Maron et al., 2006). Die Häufigkeit und das Ausmaß der sekundären myokardialen Beteiligung zeigen sich sehr variabel und reichen von spärlich bis fulminant. Hier sollen nur einige genannt werden: Sarkoidose, Diabetes mellitus, Hyperparathyreoidismus, Phäochromozytom, Hämochromatose, Systemischer Lupus erythematosus, Dermatomyositis, Rheumatoide Arthritis, Sklerodermie.

5.7. Die herzspezifischen Myosinisoformen *Myosin heavy chain 6 (MyH6)* und *Myosin heavy chain 7 (MyH7)*

Myosin heavy chain (MHC) ist ein im Muskel synthetisiertes Protein des kontraktiven Apparates, welches wesentlich an der Kontraktionsfähigkeit und -kraft beteiligt ist. Viele verschiedene Isoformen der Myosine sind für die Herzmuskulatur als auch für die Skelettmuskulatur bekannt. Die herzspezifischen Isoformen α -*Myosin heavy chain* (α -MHC) und β -*Myosin heavy chain* (β -MHC) werden durch die Gene *MyH6* und *MyH7* kodiert.

MyH6 ist ein Gen, welches das Protein α -MHC kodiert und im Herzmuskel, überwiegend im Vorhof, zu finden ist. Es ist ein Hexamer, welches aus 2 schweren Untereinheiten, 2 leichten Untereinheiten und 2 regulatorischen Untereinheiten besteht. Während der embryonalen Entwicklung wird α -MHC sowohl im Vorhof als auch im Ventrikel gebildet. Nach der Geburt bildet der Vorhof überwiegend α -MHC und der Ventrikel β -MHC (Schiaffino und Reggiani, 1996). Dabei stellt in einem gesunden menschlichen Herzen die *MyH6* mRNA 20% bis 30% der gesamten Myosin mRNA dar, während das α -MHC Protein nur ca. 7% des gesamten MHC Proteins ausmacht. Diese werden bei Herzinsuffizienz auf 10% bzw. < 1% herunter reguliert (Lowe et al., 1997; Miyata et al., 2000). Niimura et al. zeigten 2002 in einer Patientengruppe den Zusammenhang der *MYH6* Genmutation mit einer spät auftretenden hypertrophen Kardiomyopathie. Dabei scheinen Mutationen von *MYH7* sowie *TNNT2* eher der familiären hypertrophen Kardiomyopathie zugeordnet zu werden. Diese werden viel früher durch klinische Symptome der Hypertrophie und zu einem großen Teil durch Herzrhythmusstörungen auffällig (Niimura et al., 2002). Weitere Studien konnten Mutationen in *MYH6* identifizieren, die sowohl mit hypertropher als auch dilatativer Kardiomyopathie assoziiert sind (Carniel et al., 2005). Darüber hinaus scheint *MYH6* an der Entwicklung eines Atrium-Septum-Defekts (ASD) beteiligt zu sein (Ching et al., 2005).

Das Gen *MYH7* kodiert für β -*Myosin heavy chain* (β -MHC), das sowohl im Herzmuskel als auch im Skelettmuskel, speziell in den langsamen Typ I Muskelfasern, vorkommt. Ebenso wie *MyH6* ist *MyH7* ein Hexamer aus 2 schweren Untereinheiten, 2 leichten Untereinheiten und 2 regulatorischen Untereinheiten. Dabei umhüllt β -MHC die dicken Filamente der Muskulatur und trägt zu der Muskelkontraktivität durch die enzymatische Aktivität der ATPase am Myosinkopf (wie unter 5.5.3. beschrieben) bei. Veränderungen in der relativen Häufigkeit des Proteins

5. Einleitung

korrelieren mit der kontraktile Geschwindigkeit des Herzmuskels. So zeigt sich beispielsweise bei einer hämodynamischen Überbelastung ein erhöhter Myosinproteingehalt (Moreira-Gonçalves et al., 2015). Hwang et al. zeigten 2005 in Herzen trainierter Ratten zweifach erhöhte β -MHC Werte gegenüber Herzen nicht-trainierter Ratten. Die Herzen trainierter Ratten zeigten im Vergleich zu Herzen nicht-trainierter Ratten eine erhöhte Leistungsfähigkeit und damit eine erhöhte maximal zu erzeugende Kraft (Hwang et al., 2005). Andere Studien zeigten verringerte *MyH6* und erhöhte *MyH7* Expressionen unter pathophysiologischen Bedingungen wie bei der Herzinsuffizienz oder Diabetes mellitus (Dillman, 1980; Lompré et al., 1984; Lowes et al., 1997). Des Weiteren werden einige Genmutationen in *MYH7* für Kardiomyopathien, insbesondere für die hypertrophe Kardiomyopathie, verantwortlich gemacht (Geisterfer-Lowrance et al., 1990).

Da beide Gene unter kardialen Stress-Situationen reguliert werden, wurde die *MyH6* und *MyH7* Expression zur Beurteilung der septischen Kardiomyopathie in der vorliegenden Arbeit quantifiziert.

5.8. Herzinsuffizienzmarker ANP (*Nppa*) und BNP (*Nppb*)

Das Hormon ANP (atriales natriuretisches Peptid), welches durch das Gen *Nppa* kodiert wird, ist an der Regulierung des Wasser- und Salzgehaltes im Körper und damit an der Regulierung des Blutdruckes beteiligt. Die Kardiomyozyten der Herzvorhöfe schütten bei einer Dehnung (zum Beispiel bei einer Volumenbelastung) ANP zur erhöhten Wasser- und Salzausscheidung in der Niere aus. Zusätzlich wirkt ANP an den Arteriolen vasodilatativ und hemmt im Hypothalamus das Durstgefühl (Kishimoto et al.; 1997; Nakao et al., 1996). In Folge dessen kommt es zur Verringerung des Plasmavolumens und der Blutdruck sinkt. BNP (B-natriuretisches Peptid), kodiert durch *Nppb*, wird ebenfalls von den Kardiomyozyten, überwiegend im Ventrikel, synthetisiert und durch Dehnung des Ventrikels sezerniert (Mukoyama et al., 1991). Es wirkt vasodilatierend und kann durch Relaxation der glatten Muskulatur die Vor- und Nachlast senken.

Da sich in der Herzinsuffizienz erhöhte ANP- und BNP-Spiegel zeigen, die als Marker der Herzinsuffizienz heran gezogen werden (Langennickel et al., 2000; Wei et al., 1993), wurden die Gene *Nppa* und *Nppb* in der vorliegenden Arbeit quantifiziert.

5.9. Schlüsselproteine des Proteinabbaus im Muskel

5.9.1. Die muskelspezifische E3-Ligase *Muscle RING finger 1* (MuRF1)

Die E3-Ubiquitin-Ligase *muscle RING finger 1* (MuRF1) ist ein Protein, welches in adulter Skelett- und Herzmuskulatur sowie im fötalen Herzgewebe nachgewiesen wurde. Es gehört, neben MuRF2 und MuRF3, zu einer speziellen Klasse von *RING-finger* Proteinen, welche aus einer RING-Finger Domäne, einer MFC (englisch: *MuRF family conserved*) Domäne, einer B-box und 2 unterschiedlichen Coiled-coil Domänen bestehen. Die Lokalisationen von MuRF1 innerhalb der Zelle sind sehr vielfältig. So konnte MuRF1 an der M-Linie des Sarkomers, in der Peripherie der Z-Scheiben (Centner et al., 2001) und im Zytoplasma sowie in einigen Myozyten auch im Nukleus nachgewiesen werden.

Der Abbau von Muskelproteinen ist ein wichtiger Bestandteil des Metabolismus im gesamten Organismus. Prozesse wie Sepsis, Hunger und Immobilität können zu Veränderungen des Muskelaufbaus bzw. -abbaus führen (Kandarian et al., 2006; Schefold et al., 2010). Dabei tritt ein Ungleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau mit Folge eines gesteigerten Proteinabbaus auf. Der Muskelabbau ist dabei physiologisch teilweise sinnvoll und dient der Notversorgung von lebenswichtigen Organen mit Aminosäuren, Lipiden und Glukose. Ein wichtiger Mechanismus der MuRF1-vermittelten Atrophie ist seine Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Die Ubiquitinierung von leichten und schweren Myosinketten und deren Abbau durch das Proteasom führen zur Verringerung des Gesamtproteingehalts in den Myozyten und dadurch zur Reduktion der Muskelmasse. Einige Studien zeigten die Proteasom-abhängige Ubiquitinierung und Degradierung von strukturellen Proteinen des Sarkomers, wie MHC (Clarke et al., 2007; Fielitz et al., 2007) und Troponin I (Kedar et al., 2004). 2001 identifizierten Bodine et al. anhand von 3 verschiedenen Atrophie-modellen (Immobilisierung, Denervation, Entlastung) im Skelettmuskel von Ratten die verstärkte Expression von *Trim63*/MuRF1 und zeigten den Zusammenhang der MuRF1-abhängigen Skelettmuskelatrophie. Ebenfalls konnte eine Erhöhung der *TRIM63*/MuRF1 Expression bei chronischer Herzinsuffizienz (Adams et al., 2007) und nach Implantation eines linksventrikulären Herzunterstützungssystems (LVAD, *left ventricular assist device*) (Willis et al., 2009) nachgewiesen werden.

5. Einleitung

Des Weiteren zeigte die Induktion einer Herzmuskelhypertrophie mittels TAC (TAC, *thoracic aortic constriction*) eine verstärkte Herzmuskelhypertrophie in den *Trim63* KO gegenüber den WT Tieren. Nach Entfernung der TAC und somit der Nachlasterrhöhung kam es bei den WT Mäusen innerhalb von 4 Tagen zu einer Normalisierung des Herzgewichtes, wohingegen die *Trim63* KO Mäuse auch nach 4 Wochen erhöhte Herzgewichte zeigten (Willis et al., 2007; Willis et al., 2009). MuRF1 ist daher ebenso an der pathologischen Herzmuskelhypertrophie sowie der Reversion der Herzmuskelhypertrophie, das heißt der Herzmuskelatrophie, beteiligt und wurde daher in dieser Arbeit quantifiziert (Chen et al., 2012; Willis et al., 2007; Willis et al., 2009).

5.9.2. Das muskelspezifische F-Box Protein Atrogin1/*muscle atrophy F-box protein* (Mafbx)

Atrogin1, auch bekannt unter *muscle atrophy F-box protein* (Mafbx), spielt eine zentrale Rolle bei der Vermittlung einer Proteasom-abhängigen Ubiquitinierung und Degradierung von strukturellen Proteinen mit daraus resultierender Muskelatrophie. Atrogin1 wird durch das Gen *Fbxo32* (englisch: *F-box protein 32*) kodiert und sowohl in der Skelettmuskulatur als auch in der Herzmuskulatur und der glatten Muskulatur exprimiert. Der überwiegende Anteil wird jedoch in der Skelettmuskulatur während einer katabolen Stoffwechsellage, wie zum Beispiel beim Fasten, zur Bereitstellung von Aminosäuren durch den Prozess der Glukoneogenese, induziert. In diesem Fall überwiegt die Degradationsrate und der Proteinaufbau nimmt ab. Andere Prozesse wie Immobilisierung, aber auch Herzerkrankungen weisen ebenso ein Überwiegen der Degradationsrate auf (Bloch et al., 2012; Galasso et al., 2010). Atrogin1 stellt somit neben MuRF1 einen entscheidenden Faktor bei der Proteolyse und der damit verbundenen Atrophie dar (Bodine et al., 2001; Lecker, 2003; Chen et al., 2012; Kedar et al., 2004; Clarke et al., 2007).

Ebenso wie MuRF1 geht der Verlust von Muskelmasse, die Atrophie, mit einer Erhöhung der *Fbxo32*/Atrogin1 Expression einher (Bodine et al., 2001). So weisen beispielsweise Patienten mit Immobilisierung und einer damit verbundenen Muskelatrophie eine hohe Expression von *FBXO32*/Atrogin1 auf. Neben der Immobilisierung zeigten Studien an fastenden Mäusen eine bis zu neunfach gesteigerte Atrogin1 Synthese. Dabei konnte die Erhöhung von Atrogin1 bereits vor Eintritt der Atrophie nachgewiesen werden (Gomes et al., 2001). Neben dem Fasten

5. Einleitung

oder der Immobilisierung weisen auch Erkrankungen wie die Herzinsuffizienz, der Diabetes mellitus und die Niereninsuffizienz eine erhöhte *Fbxo32/Atrogin1* Expression auf (Gomes et al., 2001). 2010 zeigten Galasso et al. an Gewebeproben herzkranker Patienten mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion eine signifikante Erhöhung der *FBXO32/Atrogin1* Expression im Vergleich zu Patienten mit erhaltener Ejektionsfraktion. Je schwerer die Herzinsuffizienz der erkrankten Patienten war, desto höher war auch die *FBXO32/Atrogin1* Expression (Galasso et al., 2010).

5.10. Autophagie-vermittelter Proteinabbau im Muskel

Autophagie beschreibt den Vorgang, bei dem Zellen eigene Bestandteile abbauen und wiederverwerten. Er stellt neben dem Ubiquitin-Proteasom-System ein Proteinabbausystem in eukaryotischen Zellen zur Kontrolle der Qualität und Quantität von zelleigenen Bestandteilen im Zytoplasma dar. Autophagie wird bei der Entwicklung eines Organismus, bei der Abwehr von Infektion, bei Hungerzuständen oder unter hypoxischen Bedingungen einer Zelle aktiviert (Glick et al., 2010; Levine et al., 2008). Dabei wird das abzubauende Material von dem Autophagosom aufgenommen, welches danach mit dem Lysosom verschmilzt und so das Autolysosom bildet. Die Enzyme der Lysosomen können so das zytosolische Material abbauen. Unter physiologischen Bedingungen ist Autophagie an der embryonalen Entwicklung wie beispielsweise der myokardialen Entwicklung oder an der Zelldifferenzierung von Lymphozyten, Erythrozyten oder Adipozyten beteiligt (Kaizuka et al., 2016; Mizushima et al., 2010). Infolge von Mangelzuständen wie Hunger wird die Selbstverdauung in einer Zelle erhöht, um nicht benötigte Bestandteile zu verdauen und so das Überleben zu sichern. Die Initiierung der Autophagie erfolgt über Proteine, zu denen einige zu der sogenannten *autophagy-specific* (Atg; Autophagie-spezifischen) Genproduktion gehören. Atg-Proteine sind für die Bildung des Autophagosoms erforderlich, welche das abzubauende Material aufnehmen und einschließen (Mercer et al., 2009). Während Hungerzuständen scheinen Atg1, Atg13 und Atg17 für die nicht-selektive Autophagie von Bedeutung zu sein (Suzuki et al., 2007). Für die myokardiale Entwicklung ist *Autophagy-related protein 13 (Atg13)* essentiell. Die Abwesenheit von *Atg13* führt zu myokardialen Entwicklungsstörungen (Kaizuka et al., 2016).

5. Einleitung

Im Rahmen von Infektionen beispielsweise in der Inflammation wird Autophagie durch unterschiedliche PAMPs und deren Rezeptoren (z.B. TLRs, NLRs, DAMPs wie ATP, Zytokinen wie TNF- α und spezifischen Signaltransduktionswegen wie NF- κ B) induziert (Lapaquette et al., 2015; Levine et al., 2011). Dabei binden Zytokine an ihren spezifischen Rezeptoren der zytoplasmatischen Membran und modulieren Autophagie. Allgemein bekannt sind dabei Induktoren wie IL-2 oder TNF- α sowie Repressoren wie IL-4, IL-6, IL-10 oder IL-13 und anti-inflammatorische Zytokine. Zytokine, die Autophagie induzieren sind im speziellen IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α und TGF- β (Lapaquette et al., 2015). Bereits bekannt ist, dass das Inflammasom während einer Entzündung Autophagie aktiviert. So sind erhöhte IL-1 β und IL-18 Spiegel maßgeblich an dem Prozess der Autophagie zur Entfernung von reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und DNA beteiligt und initiieren die Formierung des NaLP3-Inflammasoms für die erneute IL-1 β Produktion (Levine et al., 2011; Zhang et al., 2017). Andere Studien berichten von einer durch Autophagie induzierten negativen Wirkung auf das Inflammasom (Lapaquette et al., 2015). Allerdings ist unklar, wie der genaue molekulare Mechanismus der Autophagie-induzierten Regulierung des Inflammasoms erfolgt. Im Zusammenhang einer myokardialen Schädigung scheint das Protein *BCL2 Interacting Protein 3* (BNIP3, BCL2 Interaktionsprotein 3) ein Regulator für die mitochondriale Funktion sowie des Zelltods der ventrikulären Myozyten zu sein (Regula et al., 2002; Zhang et al., 2009). Die Expression und Akkumulation von BNIP3 mRNA sowie deren Protein wird unter Hypoxie für den Abbau in Kardiomyozyten von Ratten induziert. Interessanter Weise lassen sich ebenfalls erhöhte BNIP3 Werte in Rattenherzen mit chronischer Herzinsuffizienz nachweisen (Kubasiak et al., 2002; Regual et al., 2002). Für den anschließenden lysosomalen Abbau der veralteten Mitochondrien (aber auch extrazellulärer Matrix wie Kollagen I und IV oder Zellorganellen), ist Cathepsin L (Ctsl) notwendig. Diese lysosomale Endopeptidase, welche ebenfalls in pathologischen Prozessen wie der Nekrose von Myofibrillen und der myokardialen Ischämie von Bedeutung ist (Kominami et al., 1987; Tsuchida et al., 1986), ist durch ihre Abbaufähigkeit an der Aufrechterhaltung der physiologischen Herzfunktion beteiligt; ein Fehlen von Ctsl kann hingegen zu pathomorphologischen, histologischen und funktionellen Herzveränderungen, die der dilatativen Kardiomyopathie ähnelt, führen (Stypmann et al., 2002).

5. Einleitung

Zusammenfassend stellt der Autophagie-vermittelte Proteinabbau einen essentiellen Prozess in der physiologischen, pathologischen und septischen Proteinhomöostase im Herzmuskel dar und trägt wesentlich zur Entstehung einer Herzinsuffizienz bei.

Hypothese

In der hier vorliegenden Studie sollte die Hypothese getestet werden, dass ein Fehlen von *Nlrp3* vor einer Sepsis-induzierten Herzmuskelatrophie und somit vor einer septischen Kardiomyopathie schützt.

6. Material und Methoden

6.1. Material

6.1.1. Geräte

| Bezeichnung | Hersteller |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| CO ₂ -Inkubator; C200 | Labotect |
| Curix 60 Entwicklungsmaschine | Agfa-Gevaert N.V. |
| Elektrophoresekammer | Serva Electrophoresis BlueMarine™200 |
| Fluoreszenzmikroskop CTR 650 HS mit Digitalkamera DFC 425 und DFC 360 FX | Leica Microsystems GmbH |
| Gefrierschrank (-80°C) | Sanyo |
| Homogenisator | MP FastPrep®-24 |
| Isofluranpumpe, Univentor 400 | Univentor |
| Isoflurankammer | Univentor |
| Leica CM 3050s Cryostat | Leica Microsystems GmbH |
| Membranpumpe | Sera® |
| Minizentrifuge | ROTH® |
| NanoDrop™-Photometer | Thermo Scientific |
| Neubauer-Zählkammer; 0,0025mm ² | Marienfeld |
| peqSTAR 96 Universal Gradient PCR Maschine | Peqlab Biotechnology GmbH |
| Pipettierhilfe, Eppendorf Easypet® | Eppendorf AG |
| Rollenmischer; RM 5 | CAT |
| Rotlichtlampe; IL 21 | beurer |
| Spektralphotometer | BMG Labtech |
| StepOnePlus™ Real-Time PCR System | Applied Biosystems |
| Stromversorgungsgerät | Bio Rad |

6. Material und Methoden

| | |
|------------------------|------------------------------------------|
| Thermocycler | Peqlab |
| Transluminator | Phase, Lübeck, Germany |
| Wärmeplatte | Labotect |
| Wasserbad | GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH |
| Vacusaft comfort | BS integra, Biosciences |
| Vortex-Genie® 2 | ROTH® |
| Zellkultur-Arbeitsbank | Waldner Electronics |
| Zentrifugen | Thermo Scientific™ |

6.1.2. Verbrauchsmaterial

| Bezeichnung | Hersteller |
|-------------------------------------------------------|-------------------|
| Amersham™ Hybond™ ECL™ (Nitrocellulose-Membran) | GE Healthcare |
| Biosphere® Filter Tips; 0,1-10 µl; 2-100 µl | Sarstedt |
| Combitips® Multistepfer | Eppendorf |
| Eppendorf Mikroreaktionsgefäß; 1,5 ml, 2 ml | Sarstedt |
| Eppendorf Mikroreaktionsgefäß (safe-lock tube) 1,5 ml | Eppendorf |
| ETHIBOND* EXCEL 5-0 (P-3) | ETHICON |
| Falcon; 15 ml, 50 ml | Sarstedt |
| Gelkammer zum Gießen von Gelen | Bio Rad |
| Glasplatten; 7,3 cm x 10,1 cm | Biostep® |
| Homogenisationsröhrchen mit Keramikkugeln | Peqlab |
| Kämme, 15er | Bio Rad |
| Kanülen (22G) | BRAUN |
| Ligatur: Mersilene* 6-0 (P-1) | ETHICON |
| Mikrotiterplatten | BRAND® |
| PCR-Platte - 96 well | Sarstedt |
| Pipettenspitzen; 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 1250 µl | Sarstedt |
| Serologische Pipetten; 5 ml, 10 ml, 25 ml | Sarstedt |
| Zellkulturflaschen; 75 cm ² | Falcon® |

6. Material und Methoden

6-well-Zellkulturplatten

Sarstedt

6.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung

Hersteller

2-Mercaptoethanol

ROTH®

Acrylamid-Mix 30%

ROTH®

Agarose Pulver

Serva

BSA

ROTH®

Chromotrope 2R

Sigma-Aldrich®

cOmplete™ Protease Inhibitor

Roche Diagnostics AG

Dexamethason

Sigma-Aldrich®

Dithiothreitol (DTT); 0,1 M

Invitrogen™

DMEM (1000 mg Glukose/L)

Sigma-Aldrich®

DNA-Leiter; 100 bp

ROTH®

dNTPs, GeneAmp™

Applied Biosystems™

Eosin Y 1%

Waldeck GmbH & Co.
KG

Ethanol 99%

ROTH®

Ethidiumbromid

ROTH®

Fast Green FCF

AppliChem GmbH

Fetales Kälberserum

PAA Laboratories GmbH

First-strand buffer; 5x

Invitrogen™

Forene® 100% (Isofluran)

Abboth

Gelatine; 2%

Sigma-Aldrich®

Glutamin

PAA Laboratories GmbH

Glycin

ROTH®

Goat serum; Ziegenserum

Dako Deutschland
GmbH

Hämatoxylin nach Gill 2

Merck

Interleukin 1β (rekombinantes Protein)

ProSpec®

LightCycler® 480 SYBR® Green Master Mix 2x

Roche

6. Material und Methoden

| | |
|---------------------------------------------------|-------------------------------|
| Methanol | ROTH® |
| Milchpulver | ROTH® |
| Natriumchlorid 99,5% (Pulver) | ROTH® |
| Natriumchlorid 0,9% (steril) | BRAUN |
| Page Ruler™ Prestained Protein Ladder | Thermo Scientific™ |
| Penicillin/Streptomycin | PAA Laboratories GmbH |
| Phosphat | Sigma-Aldrich® |
| Phosphate Buffered Saline | Sigma-Aldrich® |
| Phosphotungstic Acid | Merck |
| Prolong®Gold antifade reagent with DAPI | Invitrogen™ |
| Proteinase K (1:5; 1:100) | Merck |
| Random-Primer | Life Technologies Corporation |
| RNaseOUT™ (Recombinant Ribonuclease Inhibitor) | Invitrogen™ |
| Superscript® II (Reverse Transcriptase; 200 U/μl) | Invitrogen™ |
| Temed | ROTH® |
| Trichlormethan/Chloroform | ROTH® |
| TRIS-base | ROTH® |
| Triton® X-100 | Sigma-Aldrich® |
| TRizol® | Ambion® |
| Trypsin-EDTA-Lösung (1x) | Sigma-Aldrich® |
| Tween® 20 | ROTH® |
| Vitro Clud® | R. Langenbrinck |

6.1.4. Kits

| | |
|-------------------------------|--------------------|
| Pierce™ BCA Protein Assay | Thermo Scientific™ |
| Super Signal® West Pico (ECL) | Thermo Scientific™ |

6. Material und Methoden

6.1.5. Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Ansätze zur Herstellung von Puffer und Lösungen

| Art | Chemikalien | Menge/Volumen |
|-----------------------------|-------------------------------------------------|---------------|
| DNA-Lysepuffer | Tris-HCl - pH 8,0, 1 M | 5 ml |
| | EDTA - pH 8,0, 0,5 M | 20 ml |
| | NaCl, 5 M | 2 ml |
| | SDS 10% | 10 ml |
| | ad 100 ml H ₂ O | |
| Genotypisierungspuffer | Tris - pH 8,5, 100 mM | 1,21g |
| | EDTA - pH 8,0, 5 mM | 0,14 g |
| | NaCl, 200 mM | 1,16 g |
| | SDS 0,2% | 0,2 ml |
| | ad 100 ml H ₂ O | |
| Gomoris Trichrom (pH 3,4) | Chromotrope 2R | 0,6 g |
| | Fast Green FCF | 0,3 g |
| | Phosphotungstic Acid | 0,6 g |
| | Glacial Acetic Acid | 1 ml |
| | ad 100ml H ₂ O | |
| Lämmli | Tris-HCL - pH 6,8, 300 mM | 4,7 g |
| | SDS 12% | 12 ml |
| | Bromphenolblau 0,1% | 0,1 ml |
| | Glycerol 50% | 50 ml |
| Laufpuffer für SDS-PAGE | 10x Tris Glycine | 100 ml |
| | SDS 10% | 10 ml |
| | ad 1l H ₂ O | |
| Phosphatpuffer zur Zelllyse | NaCl, 150 mM | 0,87 g |
| | K ₂ HPO ₄ - pH 9,3, 50 mM | 0,87 g |
| | KH ₂ PO ₄ - pH 4, 50mM | 0,68 g |
| | ad 100 ml H ₂ O | |
| RIPA-Puffer, 1x | RIPA, 10x | 1,5 ml |
| | Sodiumdeoxycholat 10% | 1,5 ml |
| | cOmplete™ Protease Inh.,50x | 300 µl |
| | Na ₃ VO ₄ , 200mM | 75 µl |
| | PMSF, 100mM | 150 µl |

6. Material und Methoden

| | | |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| | ad 15 ml H ₂ O | |
| TAE Puffer, 50x (pH 8,5) | Tris base Na ₂ EDTA Eisessig ad 1l H ₂ O | 242 g 36,4 g 57,1 g |
| TBS, 10x (pH 7,6) | Tris base NaCl ad 2 l H ₂ O | 48,4 g 160,0 g |
| TBS-T, 1x | TBS, 10x Tween® 20 ad 1l H ₂ O | 100 ml 1 ml |
| Transferpuffer | Tris Glycine, 10x Methanol ad 1l H ₂ O | 100 ml 100 ml |
| TRIS (pH 6,8) | Tris base ad 500 ml H ₂ O | 60,57 g |
| TRIS (pH 8,8) | Tris base ad 500 ml H ₂ O | 90,85 g |
| Tris-Glycine | Tris base Glycine ad 4l H ₂ O | 120 g 576 g |

6.1.6. Herstellung von Gelen

Tabelle 2: Western Blot Gel 1,5 mm

| | SDS-Gel 10% | SDS-Gel 15% | Sammelgel 5% |
|--------------------|-------------|-------------|--------------|
| ddH ₂ O | 4 ml | 2,3 ml | 2,25 ml |
| Acrylamid-Mix 30% | 3,3 ml | 5 ml | 650 µl |
| 1,5 M TRIS; pH 6,8 | - | - | 500 µl |
| 1,5 M TRIS; pH 8,8 | 2,5 ml | 2,5 ml | - |
| SDS, 10% | 100 µl | 100 µl | 40 µl |
| APS, 10% | 100 µl | 100 µl | 40 µl |
| Temed | 4 µl | 4 µl | 4 µl |

6. Material und Methoden

Tabelle 3: Agarosegel zur Genotypisierung von Mäusen

| Chemikalien | Menge/Volumen |
|----------------------|---------------|
| Agarose Serva Pulver | 1,5 g |
| TAE Puffer, 1x | 100 ml |
| Ethidiumbromid | 4 µl |

6.1.7. Primer für die quantitative Real-time PCR

Tabelle 4: Primer für die quantitative Real-time PCR

| Primer | Oligonukleotidsequenz (5' → 3') |
|-------------------------|-----------------------------------|
| Mm Fbxo32 SYBR® forward | AGT GAG GAC CGG CTA CTG TG |
| Mm Fbxo32 SYBR® reverse | GAT CAA ACG CTT GCG AAT CT |
| Mm Gapdh SYBR® forward | ATG GTG AAG GTC GGT GTG A |
| Mm Gapdh SYBR® reverse | AAT CTC CAC TTT GCC ACT GC |
| Mm Il1b SYBR® forward | AGT TGA CGG ACC CCA AAA |
| Mm Il1b SYBR® reverse | TGG ATG CTC TCA TCA GG |
| Mm Il6 SYBR® forward | GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC AGG A |
| Mm Il6 SYBR® reverse | CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GAA |
| Mm MyH6 SYBR® forward | GCC AAG ACT GTC CGG AAT GA |
| Mm MyH6 SYBR® reverse | TGG AAG ATC ACC CGG GAC TT |
| Mm MyH7 SYBR® forward | CGC ATC AAG GAG CTC ACC |
| Mm MyH7 SYBR® reverse | CTG CAG CCG CAG TAG GTT |
| Mm Nlrp3 SYBR® forward | CCC TTG GAG ACA CAG GAC TC |
| Mm Nlrp3 SYBR® reverse | GAG GCT GCA GTT GTC TAA TTC C |
| Mm Nppa SYBR® forward | GGGGGTAGGATTGACAGGAT |
| Mm Nppa SYBR® reverse | ACA CAC CAC AAG GGC TTA GG |
| Mm Nppb SYBR® forward | GCA CAA GAT AGA CCG GAT CG |
| Mm Nppb SYBR® reverse | CTT CAA AGG TGG TCC CAG AG |
| Mm Trim63 SYBR® forward | CCT GCA GAG TGA CCA AGG A |
| Mm Trim63 SYBR® reverse | GGC GTA GAG GGT GTC AAA CT |
| Rn Fbxo32 SYBR® forward | GAA GAC CGG CTA CTG TGG AA |
| Rn Fbxo32 SYBR® reverse | ATC AAT CGC TTG CGG ATC T |
| Rn Gapdh SYBR® forward | CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG |
| Rn Gapdh SYBR® reverse | GGG CCA TCC ACA GTC TTC TG |

6. Material und Methoden

| | |
|-------------------------|-----------------------------|
| Rn Il6 SYBR® forward | CCC TTC AGG AAC AGC TAT GAA |
| Rn Il6 SYBR® reverse | ACA ACA TCA GTC CCA AGA AGG |
| Rn Nlrp3 SYBR® forward | GCT GTG TGA GGC ACT CCA G |
| Rn Nlrp3 SYBR® reverse | GAA ACA GCA TTG ATG GGT CA |
| Rn Trim63 SYBR® forward | AGG ACT CCT GCC GAG TGA C |
| Rn Trim63 SYBR® reverse | TTG TGG CTC AGT TCC TCC TT |

Mm-*Mus musculus*; Rn-*Rattus norvegicus*; Gapdh-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; Il1b - Interleukin-1 β ; Il6-Interleukin 6; Trim63-MuRF1, *Muscle Ring Finger Protein 1*; MyH6-*Myosin heavy chain 6*; MyH7-*Myosin heavy chain 7*; Nppa-*natriuretic peptide A*; Nppb-*natriuretic peptide B*.

6.1.8. Primer zur Erfassung des Genotyps (WT, Wildtyp; KO, Knockout Typ)

Tabelle 5: Primer zur Erfassung des Genotyps

| Primer | Oligonukleotidsequenz (5' → 3') |
|--------------------------|---------------------------------|
| JT 6030 Ay KO reverse | AAG TCG TGC TGC TTC ATG T |
| JT 6031 Ay WT/KO forward | TCA AGC TAA GAG AAC TTT CTG |
| JT 6032 Ay WT reverse | ACA CTC GTC ATC TTC AGC A |

6.1.9. Primäre und sekundäre Antikörper zur Western Blot Analyse

Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper zur Western Blot Analyse

| Antikörper | Spezifität | Verdünnung | Hersteller |
|----------------------------------|------------|------------|----------------------------|
| Anti-chicken | Hase | 1:5000 | Abcam |
| Anti-GAPDH | Hase | 1:10000 | Millipore GmbH |
| Anti-IL-1 β | Maus | 1:1000 | Cell Signaling Technology® |
| Anti-Myosin fast und slow (MF20) | Maus | 1:2000 | Abcam |
| Anti-mouse IgG HRP-gekoppelt | Pferd | 1:2000 | Cell Signaling Technology® |
| Anti-MuRF1 | Kaninchen | 1:1000 | * |
| Anti-Myogenin | Maus | 1:2000 | Sigma-Aldrich® |
| Anti-myosin fast (My32) | Maus | 1:2000 | Sigma-Aldrich® |

*freundlicherweise von Prof. Dr. S. Labeit zur Verfügung gestellt

6.1.10. Primäre und sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Tabelle 7: Primäre und sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

| Antikörper | Spezifität | Verdünnung | Hersteller |
|---------------------------------|------------|------------|----------------|
| Anti- α -Actin | Maus | 1:2000 | Sigma-Aldrich® |
| Anti-mouse Alexa-Fluor 488® | Ziege | 1:500 | Invitrogen™ |
| Anti-MuRF1 | Kaninchen | 1:200 | * |
| Anti-myosin fast (My32) | Maus | 1:200 | Sigma-Aldrich® |
| Anti-rabbit Alexa-Fluor 488® | Ziege | 1:500 | Invitrogen™ |

*freundlicherweise von Prof. Dr. S. Labeit zur Verfügung gestellt

6.1.11. Zelllinien

| Zelllinie | Eigenschaften | Ursprungsspezies | Ursprungsgewebe | Herkunft |
|-----------|---------------|-------------------------------------|-----------------|------------------|
| H9c2 | Myoblasten | <i>Rattus norvegicus</i> , Ratte | Herzmuskel | ATCC CRL-1446 |

6.1.12. Maus-Stämme

Die verwendeten *Nlrp3* Wildtyp- und *Nlrp3* Knockout-Mäuse mit dem genetischen Hintergrund der C57BL/6J-Mauslinie stammen von der Arbeitsgruppe Fasel aus der Universität Lausanne. Sie wurden unter standardisierten Bedingungen des MDC-Berlins mit konstantem Tag/Nacht-Zyklus, Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit im keimfreien Bereich gehalten und gezüchtet und erhielten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Alle Experimente erfolgten nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) unter dem Aktenzeichen G 0207/13 genehmigt.

6.2. Methoden

6.2.1. Zellbiologische Methoden

6.2.1.1. Zellkulturmedien und Zellkulturbedingungen

Für die zellbiologischen Arbeiten wurden Rattenkardiomyoblasten (H9c2, Herkunft: ATCC CRL-1446) verwendet. Die verwendete Zelllinie wurde in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; 1000 mg Glukose/L) mit 10% FBS; 1% (5 ml) Penicillin/Streptomycin und 1% (5 ml) Glutamin kultiviert.

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (Waldner Electronics) durchgeführt. Die verwendete Zelllinie wurde in Zellkulturflaschen, in Zellkulturschalen oder in 6-well-Zellkulturplatten mit dem angegebenen Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden regelmäßig (alle 3 Tage) in einem Verhältnis von 1:4 geteilt. Dazu wurden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen. Zum Lösen wurde 3 ml Trypsin (1x) zu den Zellen gegeben und diese für 2 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zum Aufnehmen und Überführen der Zellen in 15 ml sterile Falconröhrchen wurden 7 ml Medium genutzt und die Zellsuspension bei 700 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Zellsediment wurde anschließend in dem entsprechenden Medium resuspendiert.

6.2.1.2. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Zellen, die aus flüssigem Stickstoff in Kultur genommen werden sollten, wurden in 10 ml Vollmedium (37°C) schnell aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und vom DMSO des Einfriermediums befreit. Nach erneutem Zentrifugieren wurde das Zellsediment in 3 ml Vollmedium aufgenommen und in eine mit 10 ml Vollmedium gefüllte Zellkulturflasche überführt.

Sollten Zellen in flüssigem Stickstoff für längere Zeit gelagert werden, wurden diese, wie oben beschrieben, aufgenommen und bei 700 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Vollmediums wurde das Zellsediment mit 1350 µl FBS resuspendiert und in ein mit 150 µl DMSO gefülltem Kryo-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde in einer mit 100% Isopropanol gefüllten Kryo-Box bei -80°C eingefroren und 1 Tag später in flüssigen Stickstoff überführt.

6. Material und Methoden

6.2.1.3. Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Für die geplanten Zellkulturexperimente wurde eine 10 µl Zellsuspension von kultivierten H9c2-Myoblasten (wie unter 6.2.1.1. beschrieben kultiviert) in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Suspension saugt sich durch Kapillarkraft in den Zwischenraum und wird so in einer Schicht mit genau bekannter Dicke ausgebreitet. Danach erfolgte die Auszählung der Zellzahl in den 4 Quadraten unter dem Lichtmikroskop zur Bestimmung der Anzahl je Volumeneinheit. Hierfür wurde die folgende Formel herangezogen: $\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der gezählten Zellen}/4 \times 10^4$.

6.2.1.4. Differenzierung von H9c2-Myoblasten

Vor der Differenzierung von H9c2-Myoblasten wurden diese auf 6-well-Zellkulturplatten in DMEM (1000 mg Glukose/L) mit 10% FBS; 1% (5 ml) Penicillin/Streptomycin und 1% (5 ml) Glutamin in einem Verhältnis von 100.000/well ausplattiert. Nach 2 Tagen wurde mit der Differenzierung begonnen. Dazu wurde DMEM (1000 mg Glukose/L) mit 1% FBS und 1% (5 ml) Penicillin/Streptomycin genutzt. Es erfolgte täglich ein Mediumwechsel mit 2 ml Differenzierungsmedium bis zum 6. Tag der Differenzierung.

6.2.1.5. Stimulation von H9c2-Myoblasten

Bei allen Experimenten wurden die Myotuben zwischen dem 6. und 8. Tag nach Beginn der Differenzierung stimuliert. Dazu wurde das alte Kultivierungsmedium abgesaugt und die Zellen mit 3 ml Differenzierungsmedium, das das jeweilige Stimulationsreagenz beinhaltet, versetzt. Da die jeweiligen Stimulationsreagenzien in Wasser gelöst wurden, erfolgte die Kontrolle der Experimente mithilfe von Wasser.

6.2.1.6. Immunzytochemische Färbung

Die immunzytochemische Färbung der H9c2-Myoblasten und -Myotuben wurde zur bildgebenden Detektion der Proteine herangezogen.

Hierfür wurden die H9c2-Myoblasten und -Myotuben auf mit 0,2%iger Gelatine beschichteten Deckgläsern ausplattiert und differenziert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,2% Triton X-100 in PBS für 30 Minuten bei

6. Material und Methoden

Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS erfolgte das Blockieren mit 5% Ziegenserum in PBS bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Nachfolgend wurden die Deckgläser in eine feuchte und lichtdichte Kammer überführt und mit dem primären Antikörper (Verdünnung laut Tabelle unter 6.1.10.) in Ziegenserum für 1 Stunde inkubiert. Nachdem 3 weitere Waschschriffe mit PBS für je 5 Minuten durchgeführt wurden, folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa-Fluor 488® (Verdünnung laut Tabelle unter 6.1.10.) in PBS für 1 Stunde. Dieser sekundäre Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und bindet spezifisch an den primären Antikörper. Durch die Markierung mit dem fluoreszierenden Farbstoff konnte das Protein bei einer Wellenlänge von 488 nm mit dem Fluoreszenzmikroskop (Leica Microsystems GmbH) detektiert werden. Zum Schluss wurden die Deckgläser mit den Zellen erneut dreimal mit PBS für 5 Minuten gewaschen und mit ProLong® Gold antifade reagent with DAPI, zum Anfärben der Zellkerne, eingebettet und auf einem Objektträger befestigt.

6.2.2. Tierexperimentelle Methoden

Alle Mäuse wurden nach den Richtlinien der Charité-Universitätsmedizin Berlin und dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin gehalten und versorgt. Diese folgen den Prinzipien der Pflege von Versuchstieren des *National Institutes of Health* (NIH) und den Leitlinien für die Pflege und Versorgung von Versuchstieren (NIH Publikation 86-23, verbessert 1985). Sie finden Anlehnung an die aktuelle Version der deutschen Tierschutzrichtlinien. Alle Methoden und Verfahren, die in dieser tierexperimentellen Forschung angewendet wurden, sind durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo, Berlin, Deutschland) zum Gebrauch von Versuchstieren geprüft worden (Zulassungsantrag: G 0207/13).

Für die Tierexperimente wurden erwachsene *Nlrp3* Wildtyp (WT) -Mäuse und *Nlrp3* Knockout (KO) -Mäuse im Alter von 6 bis 15 Wochen eingesetzt.

6.2.2.1. Induktion einer polymikrobiellen Sepsis mittels zökaler Ligatur und Punktion (CLP)

Die zökale Ligatur und Punktion (*cecal ligation and puncture*, CLP) ist eine Methode zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis im Mausmodell. Sie findet Anwendung bei experimentellen Studien zur pathophysiologischen Untersuchung der Sepsis und der inflammatorischen Antwort in einem Organismus. Da die induzierte Sepsis durch die

6. Material und Methoden

CLP-Methode der humanen Reaktion im Organismus sehr ähnlich ist, findet diese Anwendung bei zahlreichen Forschungsgebieten. Ein weiterer Vorteil bietet diese in ihrer einfachen Reproduzierbarkeit. Die vor mehr als 30 Jahren entwickelte Methode zählt mittlerweile zum Goldstandard bei der Erforschung der Sepsis und deren Auswirkungen (Dejager et al., 2011; Wichterman et al., 1980).

Dabei wird die Bauchhöhle durch eine mediane Laparotomie eröffnet und das Zökum aufgesucht. Danach erfolgt die Ligatur und die Punktion des Zökums distal der Ileozökalklappe. Durch die Perforation des Darmabschnittes und dem Austritt von Darminhalt in den Bauchraum wird eine bakterielle Infektion, das heißt eine Peritonitis, hervorgerufen, die zu einer inflammatorischen Antwort im Organismus führt. Durch die Größe der Punktionsnadel sowie die Anzahl von Punktionen kann das Ausmaß der Infektion beeinflusst werden (Wichterman et al., 1980).

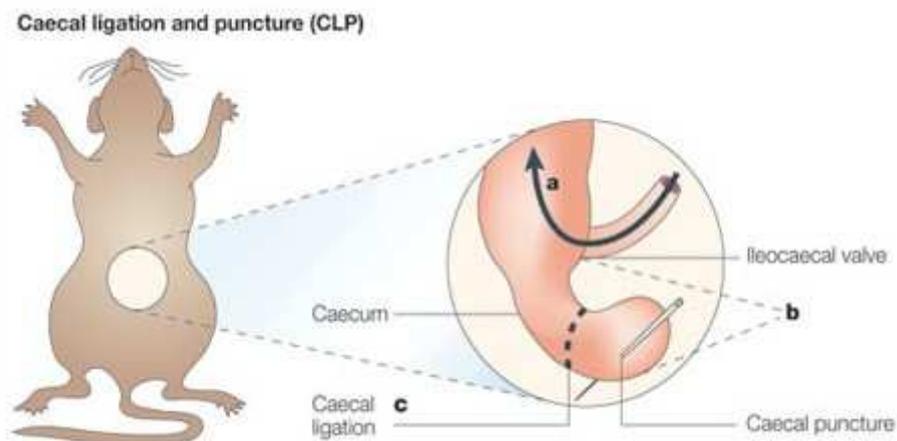


Abbildung 6: Experimentelles Sepsismodel: Zökale Ligatur und Punktion (*Caecal ligation and puncture=CLP*)

a) Stuhlpassage vom Ileum in das Kolon ascendens mit Ileozökalklappe (*Ileocaecal valve*); b) Zökum mit Ort der zökalen Ligatur und Punktion (*Caecal ligation and puncture*); c) zökale Ligatur (*caecal ligation*)

(mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature aus: Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M, 2005)

Alle chirurgischen Eingriffe wurden unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Die Geräte und Flächen wurden gesäubert und mit 70% Ethanol desinfiziert, um Infektionen mit exogenen Erregern zu vermeiden.

Zur Narkoseeinleitung und -aufrechterhaltung wurde den Mäusen das Inhalationsnarkotikum Isofluran verabreicht. Die konstante Applizierung von

6. Material und Methoden

3,5%igen Isofluran erfolgte mit einer Isofluranpumpe, welche über ein Schlauchsystem Anschluss an eine Gasmischeinheit für Raumluft besaß.

Nach Feststellung der vollständigen Narkose mittels Schmerzreiz an der Hinterpfote, wurde die Maus auf einer 37,0°C angewärmten Platte auf den Rücken gelegt und an den Extremitäten fixiert. Der ventrale Bereich wurde mit 70%igen Ethanol desinfiziert und entlang der Medianlinie 1 cm eröffnet. Die mediane Laparotomie wurde durch die anschließende Eröffnung des Peritoneums abgeschlossen.

Anschließend wurde das Zökum in der Bauchhöhle aufgesucht, mithilfe einer Pinzette heraus luxiert und auf der Bauchdecke abgelegt. Nach dem Aufsuchen des Zökalpols wurde das Zökum distal der Zökalklappe im mittleren Drittel mit einer Ligatur (Mersilene* 6-0) unterbunden. Danach wurde das Zökum distal der Ligatur mit einer Kanüle (22G) einmal punktiert und manuell eine stecknadelkopfgroße Menge an Darminhalt ausgedrückt (Abbildung 6). Nach Prüfung auf Blutfreiheit wurde der Darm samt externalisiertem Darminhalt mittels anatomischer Pinzette in die Bauchhöhle zurück verlagert und 1 ml sterile Kochsalzlösung in das Cavum appliziert. Alle sham-Tiere wurden in derselben Weise ohne Ligatur und Punktion operiert.

Der Verschluss des Peritoneums erfolgte durch Einzelknopfnähte mit Mersilene* 6-0. Die Bauchdecke wurde ebenfalls mittels Einzelknopfnähte und einem ETHIBOND* EXCEL 5-0 Faden verschlossen.

Danach wurden alle Tiere in einen sauberen Käfig gelegt und bis zum Erwachen beobachtet. Um einer Hypothermie entgegen zu wirken, erhielten die Tiere während der Aufwachphase Rotlicht. Wasser und angefeuchtetes Trockenfutter wurden ad libitum zur Verfügung gestellt.

Anschließend wurden alle Tiere dreimal täglich visitiert und beobachtet. Dabei wurde insbesondere auf Apathie, stark verminderte Futter- und Wasseraufnahme, auffällige Atembeschwerden, vermehrte Atmung, Ödeme, struppiges Haarkleid, motorische Auffälligkeiten und auf eine unphysiologische, abnormale Körperhaltung geachtet. Beim Auftreten von gravierenden Symptomen wurden die Tiere frühzeitig abgetötet.

6. Material und Methoden

6.2.2.2. Genotypisierung

Um den Genotyp der einzusetzenden Mäuse sicher zu stellen, wurde von allen Tieren eine Ohrbiopsie entnommen und genotypisiert. Dazu wurde zu jeder Probe 50 µl DNA-Lysepuffer (laut Tabelle 6.1.5.) und 1 µl Proteinkinase K (50 mg/ml) gegeben. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 55°C und 250 rpm im Thermo-Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze für 45 Minuten bei 85°C erhitzt. Danach wurden die Proben mit jeweils 450 µl H₂O verdünnt. Aus diesem Ansatz erfolgte eine weitere Verdünnung mit H₂O im Verhältnis 1:10 (Ohrstanzen). Der Ansatz für die PCR wurde wie folgt pipettiert:

Tabelle 8: Ansatz für eine PCR: Wildtyp-Mäuse

| Reagenz | Volumen in µl |
|----------------------------|---------------|
| 10 x Puffer C | 2,5 |
| dNTP's 10mM | 0,2 |
| Taq Polymerase | 0,3 |
| Primer forward: JT 6031 Ay | 0,5 |
| Primer reverse: JT 6032 Ay | 0,5 |
| H ₂ O | 19,5 |
| Lysat der Biopsie | 1,5 |
| Gesamtvolumen | 25,0 |

Tabelle 9: Ansatz für eine PCR: Knockout-Mäuse

| Reagenz | Volumen in µl |
|----------------------------|---------------|
| 10 x Puffer C | 2,5 |
| dNTP's 10mM | 0,2 |
| Taq Polymerase | 0,3 |
| Primer forward: JT 6031 Ay | 0,5 |
| Primer reverse: JT 6030 Ay | 0,5 |
| H ₂ O | 19,5 |
| Lysat vom Verdau | 1,5 |
| Gesamtvolumen | 25,0 |

Die anschließende PCR wurde mithilfe eines Thermocyclers wie folgt durchgeführt:

6. Material und Methoden

Tabelle 10: PCR-Zyklus zur Genotypisierung von Mäusen

| Temperatur in °C | Zeiteinheit |
|------------------|-------------|
| 95 | 5 Minuten |
| Wiederholung 40x | |
| 95 | 45 Sekunden |
| 55 | 30 Sekunden |
| 72 | 40 Sekunden |
| 72 | 5 Minuten |

Danach wurden 10 µl je Probe auf ein 1%igen Agarosegel aufgetragen und in einer Gelelektrophoresekammer mit TBS bei 90 Volt ihrer Größe nach aufgetrennt.

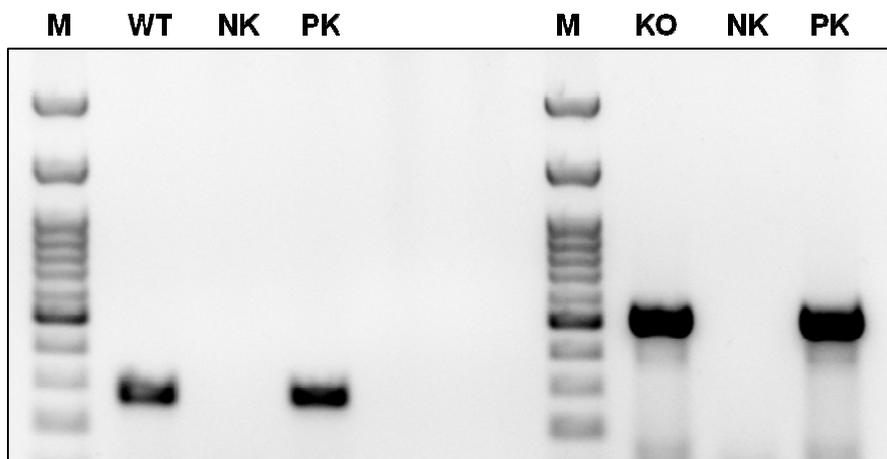


Abbildung 7: Genotypisierung von *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen

Die PCR Produkte der Genotypisierung von *Nlrp3* WT (WT) und *Nlrp3* KO (KO) Mäusen. Das Amplifikationsprodukt der WT Mäuse liegt bei 250bp, das Amplifikationsprodukt der KO Mäuse bei 500bp, weiterhin sind die Negativkontrollen (NK) und die Positivkontrollen (PK) zu sehen.

6.2.3. RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA aus Gewebe wurde dieses in ein Peqlab-Röhrchen mit jeweils 6 Homogenisationskugeln und 1 ml TRIzol® Reagenz zur Zellyse gegeben. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mithilfe eines Homogenisators (MiP) für 60 Sekunden. Der Überstand wurde in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und für mindestens 1 Minute manuell geschüttelt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Phasentrennung durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 12.000 rpm. Die obere wässrige Phase wurde zur RNA-Präzipitation in ein neues Eppendorf-Gefäß

6. Material und Methoden

mit 500 µl Isopropanol überführt. Nach Invertieren und einer Inkubationszeit von 10 Minuten erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt in derselben Weise, der Überstand wurde verworfen, das Sediment wurde in 2 Waschschritten mit 70%igen Ethanol gereinigt. Nach dem Trocknen des RNA Sediments bei Raumtemperatur, erfolgt die Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser. Das Sediment wurde mithilfe eines Heizblocks bei 50°C für 5 Minuten gelöst. Die RNA wurde anschließend bei -80°C eingefroren und so bis zu den weiteren Experimenten gelagert.

6.2.4. Messung der RNA-Konzentration

Die spektralphotometrische Messung der RNA-Konzentration erfolgt mithilfe eines Nanodrop™-Photometers. Dieses misst die optische Dichte bei $\lambda=260$ nm, das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren. Die Konzentration wurde in ng/µl angegeben.

6.2.5. Synthese von cDNA

Die cDNA oder auch komplementäre DNA ist ein einzelsträngiges DNA-Molekül, welches sich komplementär zu einem RNA-Molekül verhält. Die *in vitro*-Synthese nutzt die Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende der mRNA aus, um diese mithilfe eines Oligo-dT-Primers durch das virale Enzym reverse Transkriptase in cDNA umzuschreiben. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase und kann als Matrize sowohl RNA- als auch DNA-Einzelstränge verwenden. Die reverse Transkription wird durch eine Hybridisierung von Oligonucleotiden am Poly(A)-Ende der mRNA-Moleküle Thymin gestartet. Diese dienen dann als Primer für die weitere Synthese der cDNA. Für die vorliegende Arbeit wurde anstatt der Oligo-dT ein Random-Primer (Life Technologies Corporation) eingesetzt.

Um eine annähernd konstante Menge an cDNA aller Proben zu synthetisieren, wurde dieselbe Menge an RNA pro Probe in die RT Reaktion eingesetzt. Dazu wurden 1000 ng RNA je Probe verwendet und mit RNase-freiem Wasser versetzt, um ein einheitliches Volumen von 10 µl zu erhalten. Nach Zugabe von 2 µl je Probe (Random Primer und dNTPs), wurden diese auf 65°C für 5 Minuten erhitzt und anschließend für 3 Minuten auf Eis gekühlt. Danach wurden 8 µl von dem folgenden Ansatz (First-strand buffer, DTT, RNaseOut™ und SuperScript®II) dazu pipettiert. Die Chemikalien und Volumina für die cDNA Synthese sind in Tabelle 11 dargestellt.

6. Material und Methoden

Tabelle 11: Ansatz für eine PCR zur Herstellung von cDNA

| Chemikalien | Volumen in μl |
|--------------------------|--------------------------------------------|
| Random Primer | 1 |
| dNTPs (10mM) | 1 |
| First-strand buffer (5x) | 4 |
| DTT, 0,1 M | 2 |
| RNaseOut™ | 1 |
| SuperScript®II | 1 |

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte mithilfe eines Thermocyclers (Pqclab) laut Inkubationszyklus der Tabelle 12.

Tabelle 12: PCR-Zyklus zur Herstellung von cDNA

| Temperatur | Zeit |
|-------------------|-------------|
| 25°C | 12 Minuten |
| 42°C | 50 Minuten |
| 70°C | 15 Minuten |

6.2.6. Quantitative Real-time PCR

Die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Real-time PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Sie ermöglicht, im Gegensatz zur herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die Quantifizierung der Expression eines bestimmten Gens. Hierbei wird nach jedem abgeschlossenen PCR-Zyklus mithilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes (z.B. SYBR® Green) die Menge an DNA gemessen. Dieser Farbstoff, der ungebunden nur in geringen Mengen fluoresziert, bindet an doppelsträngige DNA (dsDNA) und gibt als gebundener Farbstoff eine bis zu 1000fach erhöhte Fluoreszenz ab. Die Intensität der Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und in Abhängigkeit von der Zyklusanzahl aufgetragen.

Für die Verdünnungsreihe wurden 5 μl cDNA aus jeder Probe entnommen und in einen Eppendorf Mikroreaktionsgefäß gemischt. Die Verdünnungsreihe wurde dann durch serielle 1:2 Verdünnungen dieser Proben-Mischung hergestellt; die Verdünnung erfolgte in 5 Schritten.

6. Material und Methoden

Die einzelnen Proben wurden in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Alle Verdünnungen wurden mit Nuklease-freiem Wasser hergestellt. Die Bestandteile für eine PCR Reaktion sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Bestandteile für eine PCR Reaktion

| Reagenz | Volumen in μl |
|------------------------------------|--------------------------|
| SYBR®Green Mastermix | 10 |
| Primer 5 $\mu\text{mol/l}$ forward | 0,8 |
| Primer 5 $\mu\text{mol/l}$ reverse | 0,8 |
| Nuklease-freies Wasser | 6,4 |
| cDNA | 2 |
| Gesamtmenge | 20 |

Anschließend wurden je 2 μl pro Stufe der Verdünnungsreihe oder je 2 μl der Proben zu 18 μl Reaktionsmix in jeweils eine Vertiefung einer 96-well Multititerplatte pipettiert. Es erfolgte die PCR Reaktion und die Analyse mithilfe des StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems. Das PCR Programm, welches genutzt wurde, ist in Tabelle 14 dargestellt. Um die Spezifität der PCR Reaktion sicher zu stellen, wurde am Ende jeder PCR Reaktion eine Schmelzkurve angefertigt. Diese dient zur Unterscheidung von Produkt und eventuell auftretenden Nebenprodukten, wie Primerdimeren. Zur Schmelzkurvenanalyse wurde das PCR Reaktionsprodukt nach 40 PCR Zyklen durch kontinuierliche Temperaturerhöhung von 50°C auf 95°C erhitzt und dadurch in 2 einzelsträngige Moleküle aufgeschmolzen. Der dadurch freiwerdende Fluoreszenzfarbstoff (SYBR® Green) wird kontinuierlich registriert. Da jedes Fragment entsprechend seiner Länge und seines GC Gehaltes eine spezifische Schmelztemperatur besitzt, kann zwischen dem spezifischen PCR Reaktionsprodukt und eventuell entstandenen Primerdimeren unterschieden werden. Die Expression der spezifischen mRNA wurde mithilfe des stabil exprimierten, sogenannten *Housekeeping gene*, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) normalisiert.

6. Material und Methoden

Tabelle 14: verwendetes Programm für die quantitative Real-time PCR

| Schritt | Zeit | Temperatur in °C |
|----------------------------|-----------------------------|------------------|
| 1 Denaturierung | 10 min | 95 |
| 2 Denaturierung | 15 s | 95 |
| 3 Anlagerung, Verlängerung | 1 min | 60 |
| 4 Zyklus | 45 x Schritt 2 und 3 | |
| 5 Schmelzkurve | Erhöhung von 0,3°C bis 95°C | |

6.2.7. Proteinextraktion

Zur Proteinisolation aus Gewebe wurde stets bei 4°C auf Eis gearbeitet. Das Gewebe wurde in mit 500 µl 1xRIPA-Puffer (RIPA=*Radioimmunoprecipitation assay*), und 6 Keramikkugeln gefüllte Homogenisationsröhrchen überführt und dreimal für 20 Sekunden bei 6.000 rpm homogenisiert. Der RIPA-Puffer diente zur Gewebelyse, dem Zerstören der Zellkernmembran und dem Herauslösen von Inhalten des Zellkerns. Anschließend erfolgte ein 30 minütiger Inkubationsschritt auf Eis. Das Lysat wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bei 14.000 rpm 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und das Sediment bei -80°C eingefroren.

6.2.8. Quantitative Proteinbestimmung

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurde die Bicinchoninsäure (BCA, Bicinchonin acid) -Methode herangezogen. Bei dieser Methode reagieren zweiwertige Kupferionen quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen. Die einwertigen Kupferionen erzeugen zusammen mit der Bicinchoninsäure einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm photometrisch gemessen werden kann.

Alle Reagenzien wurden laut Anweisungen des Herstellers (Thermo Scientific™) verwendet. Für die Standardreihe wurde eine Albuminkonzentrationsreihe (0 µg/ml, 25 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml und 2000 µg/ml) verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden in einem Verhältnis von 1:10 mit H₂O verdünnt und als Triplikate in eine 96-well Probenplatte pipettiert. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 560 nm mithilfe

6. Material und Methoden

eines Spektralphotometers (BMG Labtech). Zur Auswertung über die Standardkurve wurde das Programm FLUOstar OPTIMA verwendet.

6.2.9. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem molekularen Gewicht erfolgte mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die isolierten Proteine (20 µg) wurden mit Lämmli Puffer, versetzt mit 15%igen 2-Mercaptoethanol, gemischt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Danach wurden die Proben auf ein 10%iges Acrylamidgel aufgetragen und in einem Laufpuffer (laut Tabelle 6.1.5.) bei 160 Volt für 1 Stunde nach ihrem molekularen Gewicht getrennt. Zur Überwachung und Beurteilung der Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde ein Molekulargewichtsmarker („Page Ruler™ Prestained Protein Ladder) verwendet.

Die Übertragung der Proteine von dem Acrylamidgel auf eine Trägermembran erfolgte mit der sogenannten „Sandwich“-Methode im Nassblot-Verfahren. Hierbei wurde auf das Gel eine Nitrocellulose-Membran (Hybond® ECL™ Nitrocellulose-Membran) gelegt. Diese wurde von beiden Seiten mit je 2 in Transferpuffer getränkte „Whatman“ Filter Papieren und Schwämmen bedeckt und in 1 Mini-PROTEAN Tetra Electrophorese System gegeben. Der Transfer der Proteine erfolgte in Transferpuffer (wie unter 6.1.5. beschrieben) bei 100 Volt für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran für 1 Stunde in TBS-T mit 5%igem Milchpulver geblockt. Danach erfolgte ein Inkubationsschritt mit dem primären Antikörper auf einem Rollenmischer bei 4°C über Nacht. Der jeweilig verwendete Antikörper ist in Tabelle 6.1.9. aufgeführt. Verwendet wurde die indirekte Methode zum Nachweis der Proteine. Dabei wurde ein unmarkierter primärer Antikörper eingesetzt, der spezifisch an das zu detektierende Protein auf der Membran bindet. Nach Entfernung von unspezifisch gebundenen Antikörpern durch 3 Waschschriffe mit TBS-T für je 10 Minuten, wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper unter Bewegung bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Der sekundäre Antikörper bindet spezifisch an den primären Antikörper und ist mit dem Enzym HRP (*horseradish peroxidase*) markiert, welches durch die ECL-Methode (*Enhanced chemiluminescence*) die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von Phenol katalysiert und ein Chemolumineszenz-Signal ermöglicht. Nach 3 erneuten Waschschriffen mit TBS-T für je 10 Minuten, wurde die Membran mit 1 µl Super Signal® West Pico für 5

6. Material und Methoden

Minuten inkubiert. Zur Detektion des Chemolumineszenz-Signals wurde der Amersham™ Hypbond® ECL™ verwendet und durch eine Entwicklungsmaschine (Curix 60) entwickelt.

6.2.10. RNA-Sequenzierung

Die RNA Sequenzierung und deren statistische Auswertung erfolgte durch unsere Kooperationspartner an der Universität Jena (Prof. H. Slevogt, ZIK SEPTOMICS). Die RNA-Sequenzierung erfolgte unter Verwendung der IonTorrent Proton™ Sequenztechnologie an RNA, die aus den linken Ventrikeln von Herzen der *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Tiere isoliert wurde. Hierfür wurden für alle Gruppen (WT sham, WT CLP, KO sham, KO CLP) 3 biologische Replikate sequenziert und 3 Sequenzierungsabläufe durchgeführt, welche jeweils mit einem Replikat jedes Probenotyps gemultiplext wurden. Die Rohdaten der Sequenzierung wurden im FASTQ-Format und im *Sequence Read Archive* (SRA) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) unter der *Accession number* SRP00123 gespeichert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Anschließend erfolgte die Überprüfung der Sequenzqualität durch Anwendung von FastQC (Version 0.11.1., FastQC: eine Qualitätskontroll-Software für Hochdurchsatz-Sequenzdaten). Danach wurden alle verbliebenen Sequenzadapter und alle Lesevorgänge hinsichtlich ihrer Sequenzierungsqualität (Phred quality score <20; Phred Qualitäts-Score ist die Messung der Qualität von identifizierten Basen) getrimmt. Dabei wurden die Lesevorgänge (*reads*) für jede Probe mit dem Mausgenom (mm10) unter Verwendung der *Torrent Mapping Alignment* Software TMAP-Aligner (Version 2.9.2) und Anwendung von Standardparametereinstellungen ausgerichtet (*aligned*). Für die Analyse der Genexpression der sham-operierten gegenüber CLP-operierten Mäuse, wurden die Ergebnisse mit einer R-basierten Software errechnet. DESeq2 wurde für die Identifikation derjenigen Gene verwendet, die zwischen sham-operierten *Nlrp3* WT und CLP-operierten *Nlrp3* WT Mäusen sowie zwischen sham-operierten *Nlrp3* KO und CLP-operierten *Nlrp3* KO Mäusen unterschiedlich exprimiert werden. Unterschiedlich exprimierte Gene wurden mit der Kegg-Datenbank ausgewertet und in KEGG-Kategorien eingeteilt. Für die relevanten Gene (angereicherte Kategorien) wurden anschließend Wärmeabbildungen, sogenannte *heat maps*, erstellt.

6.2.11. Zweidimensionale transthorakale Echokardiographie

Die zweidimensionale transthorakale Echokardiographie der sham- und CLP-operierten Mäuse wurde 24 Stunden nach Operation mithilfe des VisualSonics Vevo 2100 High-Resolution Imaging System und dem Einsatz eines 38 MHz Schallkopfes durchgeführt. Die Versuchstiere wurden dafür mittels Inhalationsnarkose mit 2%igem Isofluran anästhesiert und auf eine auf 37,0°C beheizte Wärmeplatte gelegt. Die kontinuierliche Messung der Körpertemperatur durch ein Rektalthermometer und die durchgängige Aufzeichnung eines EKGs diente der Überwachung der Tiere.

Folgende Parameter wurden gemessen:

- Diameter des linken Ventrikels am Endpunkt der Systole (LVESd) und Diastole (LVEDd)
- Dicke des interventrikulären Septums (IVS) am Endpunkt der Systole (IVSs) und Diastole (IVSd)
- Dicke der linksventrikulären posterioren Wand (Pwth) am Endpunkt der Systole (Pwths) und Diastole (Pwthd)
- Herzfrequenz (Hf)
- E (Geschwindigkeit des passiven frühdiaistolischen Bluteinstroms in den linken Ventrikel aus dem linken Vorhof.)
- A (Geschwindigkeit des aktiven spätdiaistolischen Bluteinstroms aus dem linken Vorhof in den linken Ventrikel aufgrund der Kontraktion des linken Vorhofs.)

Folgende Parameter wurden errechnet:

- Verkürzungsfraction (*fractional shortening*, FS. Die FS beschreibt, wie weit sich das Herz während der Systole kontrahiert.) Formel zur Berechnung $FS = ((LVEDd - LVESd) / LVEDd) + 100$ [%].
- Ejektionsfraction (EF)
- Schlagvolumen (SV)
- Herzminutenvolumen (Das Volumen, welches je Minute vom Herzen gepumpt wird, HMV.) Formel $HMV = SV * Hf$.
- das Gewicht des linken Ventrikels
- das Verhältnis vom Herzgewicht zum Körpergewicht

6. Material und Methoden

- E/A (Verhältnis von E zu A als Maß für eine diastolische Funktionsstörung des linken Ventrikels.)

6.2.12. Histologische Aufarbeitung und Färbung von Gewebe

6.2.12.1. Paraffineinbettung und Entparaffinierung von Gewebeschnitten

Nach Entnahme des Herzens erfolgte eine Fixierung der Muskulatur mittels 4%iger kardioplegischer Kaliumchloridlösung in der Diastole für 1 Minute. Anschließend wurden die Herzen in 10 ml 4%iges Formaldehyd gelegt und für 24 Stunden mithilfe eines Rotationsmischers gedreht und dadurch fixiert. Danach erfolgte die Überführung in eine Einbettkassette, um die Entwässerungsschritte und die Paraffineinbettung durchzuführen.

Tabelle 15: Entwässerung und Einbettung von Gewebe in Paraffin

| Entwässerung/ Einbettung | Zeit in min |
|---------------------------------|--------------------|
| dH ₂ O | 10 |
| 70% Ethanol | 60 |
| 90% Ethanol | 30 |
| 96% Ethanol | 30 |
| 100% Ethanol | 3x 30 |
| Xylol | 30 |
| Paraffin bei 60°C | 60 |

Anschließend wurden die Gewebeproben für die Hämatoxylin-Eosin- und Trichrom-Färbung entparaffiniert.

Tabelle 16: Entparaffinierung von Gewebe

| Entparaffinierung | Zeit in min |
|--------------------------|--------------------|
| Xylol | 2x 5 |
| 100% Ethanol | 2x 5 |
| 90% Ethanol | 5 |
| 80% Ethanol | 5 |
| 70% Ethanol | 5 |
| 50% Ethanol | 5 |
| dH ₂ O | 5 |

6.2.12.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine histologische Übersichtsfärbung zur Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen. Durch die basischen Eigenschaften von Hämatoxylin können saure beziehungsweise basophile Strukturen, wie Zellkerne und die darin enthaltene Desoxyribonukleinsäure, blau angefärbt werden. Der saure Farbstoff Eosin hingegen färbt alle acidophilen beziehungsweise eosinophilen Gewebeanteile, wie Zellplasmaproteine, Mitochondrien, Kollagen und Keratin rot.

Tabelle 17: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

| Reagenz | Zeit |
|-----------------------------|-------------|
| 10% Formalin | 1 min |
| Leitungswasser | kurz spülen |
| Hämatoxylin nach Gill 2 | 1 min |
| Leitungswasser | kurz spülen |
| Saurer Alkohol | 2x 30 sec |
| Leitungswasser | kurz spülen |
| Gesättigtes Lithiumcarbonat | 10 dips |
| 80% Methanol | 10 dips |
| 100% Methanol | 10 dips |
| Eosin Y | 3 min |
| 100% Ethanol | 3x 10 dips |
| Xylol | 2x 5 min |
| Eindeckeln mit Vitro Clud | |

6.2.12.3. Trichrom-Färbung

Die Trichrom-Färbung ist eine Spezialfärbung und wird zur Darstellung von bindegewebigen Strukturen eingesetzt. Sie färbt Bindegewebsfasern, wie Kollagen, grün an und ermöglicht eine kontrastreiche Darstellung in Bezug zu Muskelgewebe oder Organparenchym. Die Darstellung einer Fibrosierung ist in Abbildung 8 zu sehen.

6. Material und Methoden

Tabelle 18: Trichrom-Färbung

| Reagenz | Zeit |
|--------------------------------------|------------------|
| Hämatoxylin (gefiltrert) nach Gill 2 | 5 min |
| Leitungswasser | spülen, bis klar |
| Gomoris Trichrom | 10 min |
| 0,2% Essigsäure | bis klar |
| Eindeckeln mit Vitro Clud | |

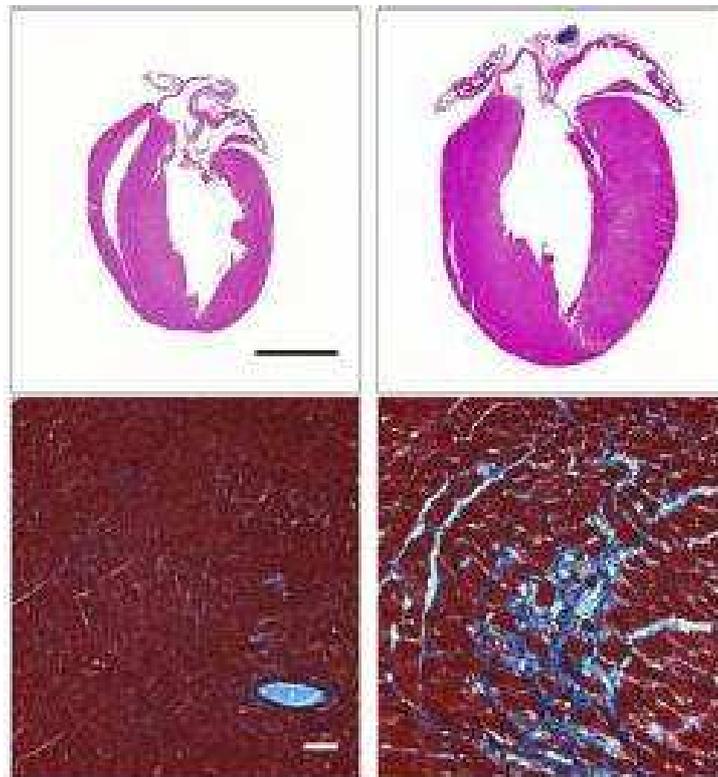


Abbildung 8: Beispiel einer Hypertrophie des Herzens und Fibrosierung in der Trichrom-Färbung

Zu sehen sind Übersichtsaufnahmen von Herzen aus WT-Mäusen in HE-Färbung. Die Hypertrophie wurde mittels TAC (transversale aortale Konstriktion) induziert. In der Trichrom-Färbung stellt sich eine deutliche Fibrosierung dar. (Fielitz et al., 2008; mit freundlicher Genehmigung von PNAS, "Copyright (2008) National Academy of Sciences, U.S.A.")

6.2.13. Graphische Darstellung

Die graphischen Darstellungen sind mithilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 5 angefertigt worden.

6. Material und Methoden

6.2.14. Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen sind mithilfe des t-Tests durchgeführt worden. Für die Überlebenskurve der Mäuse nach Operation (sham/CLP) wurde der Log-rank (Mantel Cox) Test herangezogen. Als signifikant wurden alle p-Werte unter 0.05 bewertet.

7. Ergebnisse

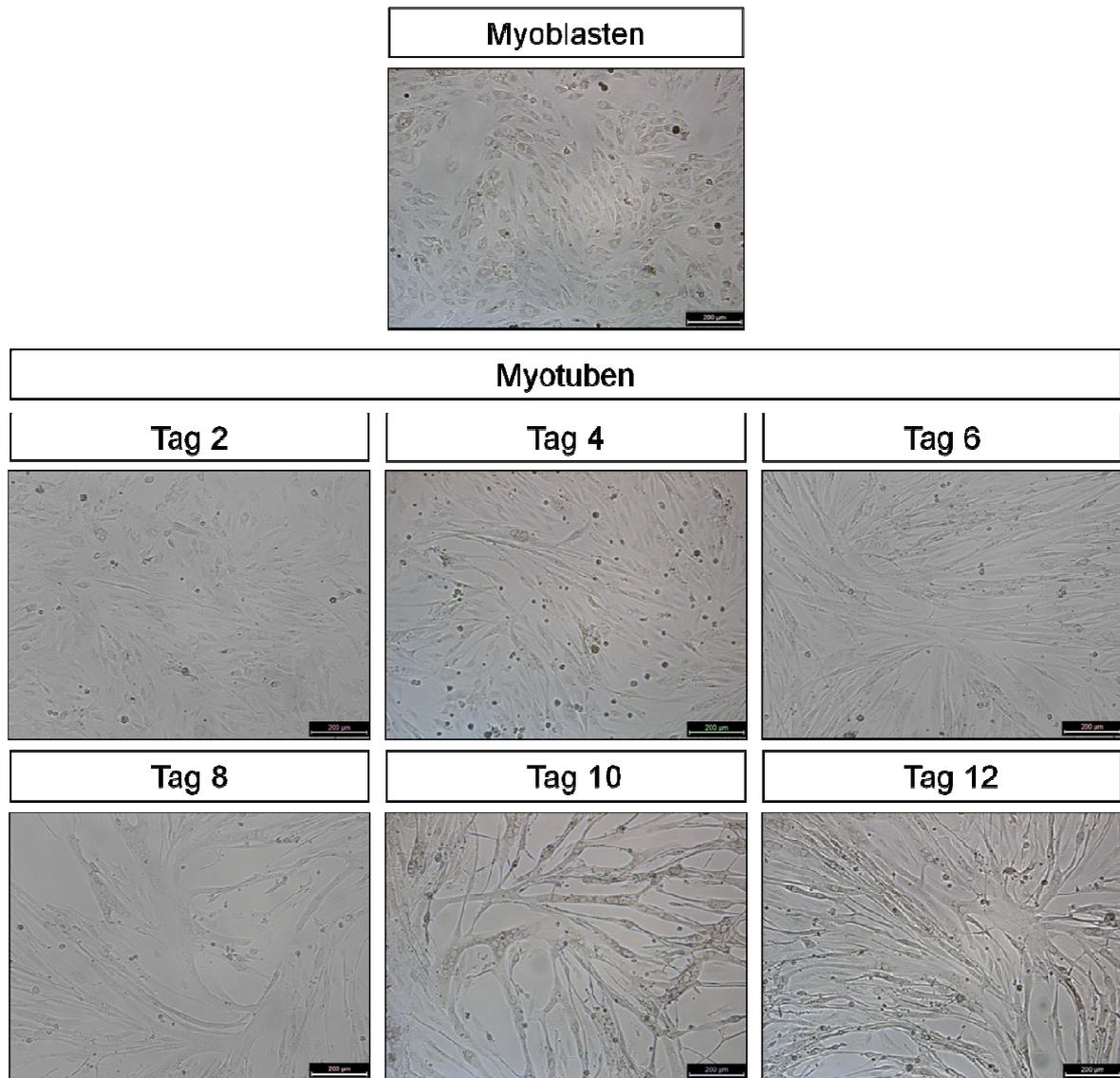
7.1. Zellbiologische Ergebnisse

7.1.1. Myogene Differenzierung von H9c2-Myoblasten

Ein Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von Interleukin-1 β (IL-1 β) auf terminal differenzierte Myozyten *in vitro* zu untersuchen. Um den optimalen Zeitpunkt für eine Behandlung der Zellen nach Differenzierung zu bestimmen, wurden H9c2-Myoblasten (Abbildung 9A, Myoblasten) bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend deren Differenzierung durch Reduktion des im Kulturmedium enthaltenen fetalen Kälberserums induziert. Die Morphologie der Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mikroskopisch analysiert (Abbildung 9A, Myotuben). Für die Analyse des Differenzierungsstatus der Zellen wurde in Myoblasten und differenzierenden Myotuben der Proteingehalt von schnellem und langsamem Myosin (Myosin fast und slow) und des Differenzierungsmarkers Myogenin mittels Western Blots ermittelt. Myogenin ist ein Transkriptionsfaktor, der die initiale myogene Differenzierung induziert (Chun et al., 2000; Pagano et al., 2004). Die gesteigerte Expression von Myosin reflektiert die Differenzierung und das Wachstum von Myotuben (Chun et al., 2000) (Abbildung 9B). Die so bestimmten Daten zeigen, dass die H9c2 Zellen nach 6 bis 7 Tagen optimal differenziert waren, so dass diese Zeitpunkte für die weiteren Versuche gewählt wurden.

7. Ergebnisse

A



B

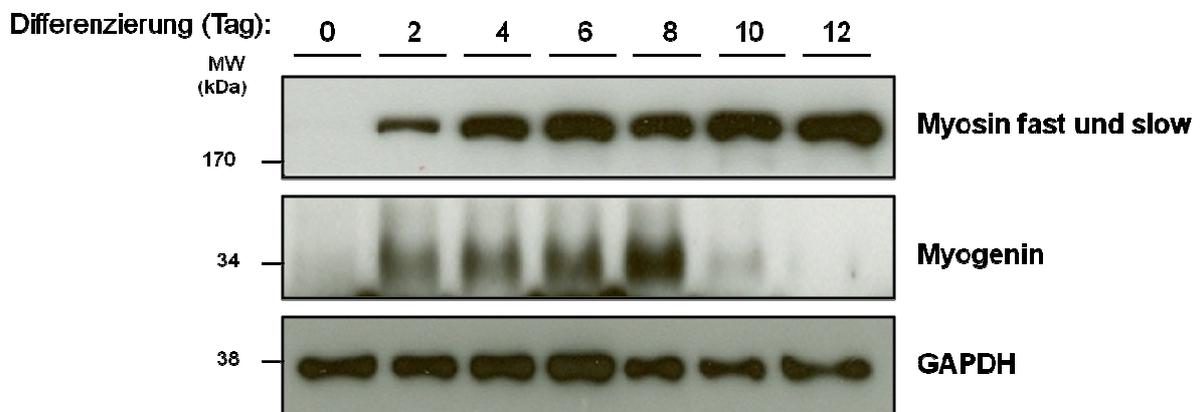


Abbildung 9: Myogene Differenzierung von H9c2-Myoblasten.

7. Ergebnisse

(A) Mikroskopische Aufnahme der H9c2-Myotuben im Verlauf von 12 Tagen der Differenzierung, der Differenzierungsgrad ist alle 2 Tage festgehalten, Größenbalken 200 μm .

(B) Western Blot aus Gesamtproteinextrakten von H9c2-Myozyten im Verlauf von 12 Tagen der Differenzierung unter Verwendung von Myosin (fast und slow), Myogenin oder GAPDH spezifischen Antikörpern. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. MW, *molecular weight*, kDa, Kilo Dalton.

7.1.2. Interleukin-1 β induziert Atrophie in H9c2-Myotuben

Für die Untersuchung der Fragestellung, ob IL-1 β die Atrophie von H9c2-Myotuben hervorruft, wurden diese am Tag 7 mit dem Zytokin inkubiert. Die IL-1 β Behandlung erfolgte über 3 Tage, wobei Zytokin-haltiges Medium alle 24 Stunden erneuert wurde; dabei betrug die IL-1 β Konzentration im Medium 10 ng/ml (Abbildung 10A), 20 ng/ml (Abbildung 10B) bzw. 50 ng/ml (Abbildung 10C). Aus vorhergehenden Analysen dieser und anderer Arbeitsgruppen war bekannt, dass Dexamethason die Atrophie von Myotuben hervorruft (Clarke et al., 2007; Huang et al., 2017). Daher wurde Dexamethason in einer Konzentration von 10 μM als Atrophiekontrolle verwendet (Abbildung 10D). Nach 72 Stunden Stimulation wurden mikroskopische Aufnahmen der H9c2-Myotuben erstellt. Anschließend wurde der Durchmesser von je 100 Myotuben gemessen, ausgewertet und graphisch dargestellt (Abbildung 10A-D).

7. Ergebnisse

A

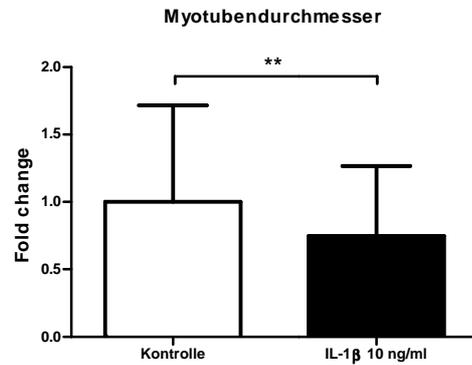
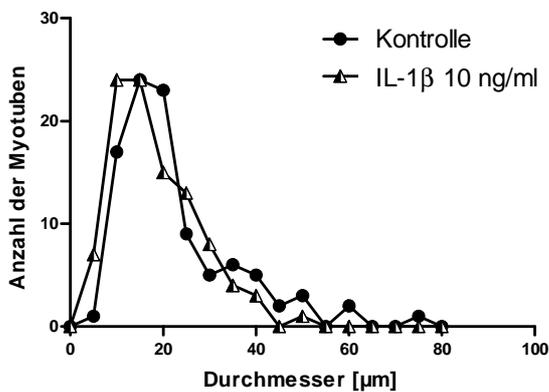
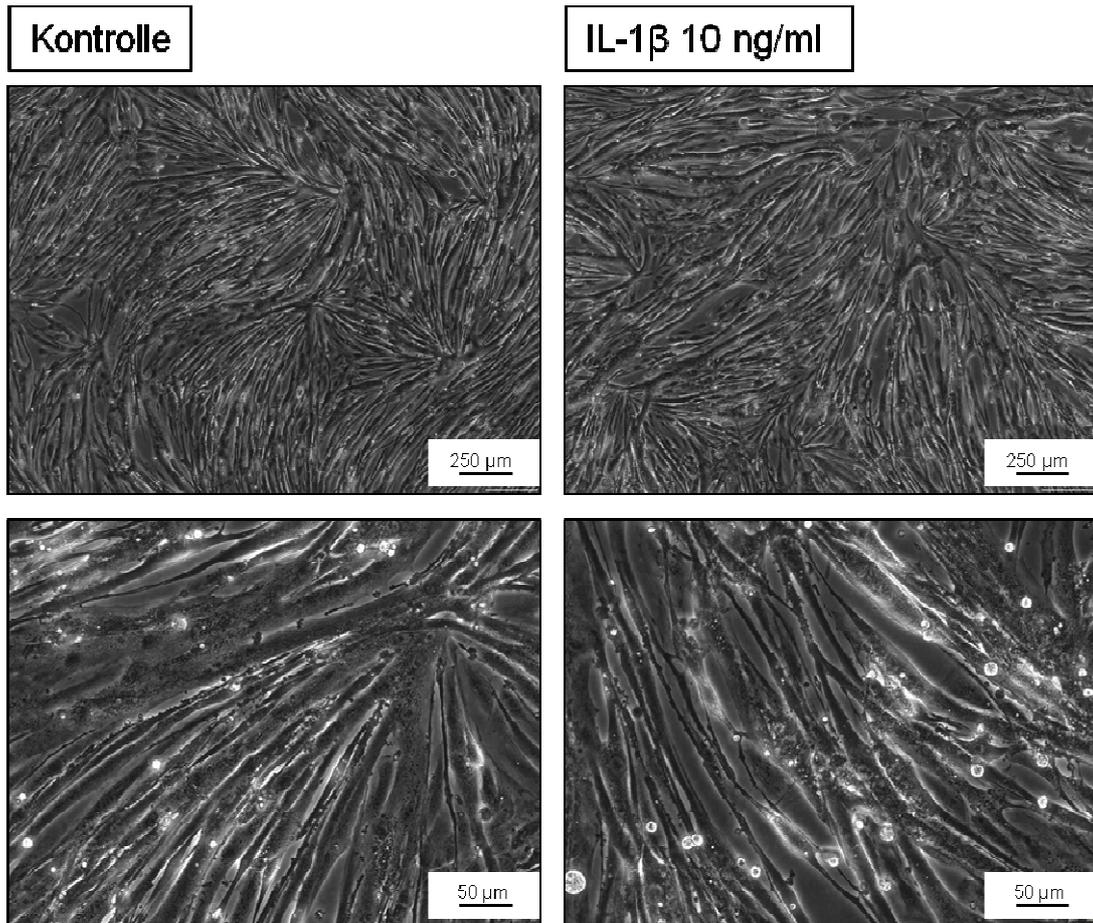


Abbildung 10A zeigt die Myotubendurchmesser mit oder ohne IL-1 β Behandlung (10 ng/ml IL-1 β). Es konnte eine Linksverschiebung der Verteilungskurve von IL-1 β -behandelten H9c2-Myotuben, und somit eine höhere Anzahl von Myotuben mit geringerem Durchmesser gegenüber der nicht-behandelten Myotuben ermittelt werden. Der mittlere Durchmesser der IL-1 β -behandelten Myotuben war gegenüber den unbehandelten Myotuben um 25% reduziert ($p < 0.01$).

7. Ergebnisse

B

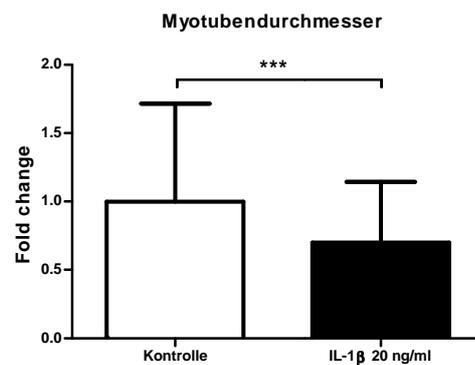
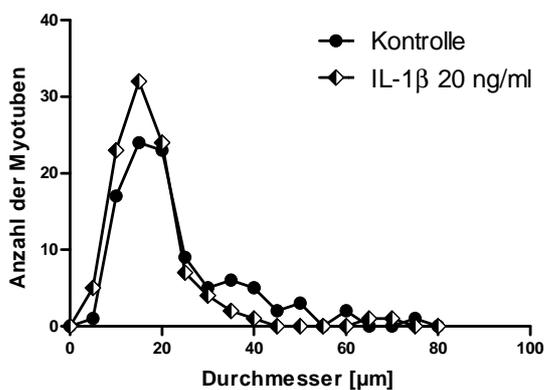
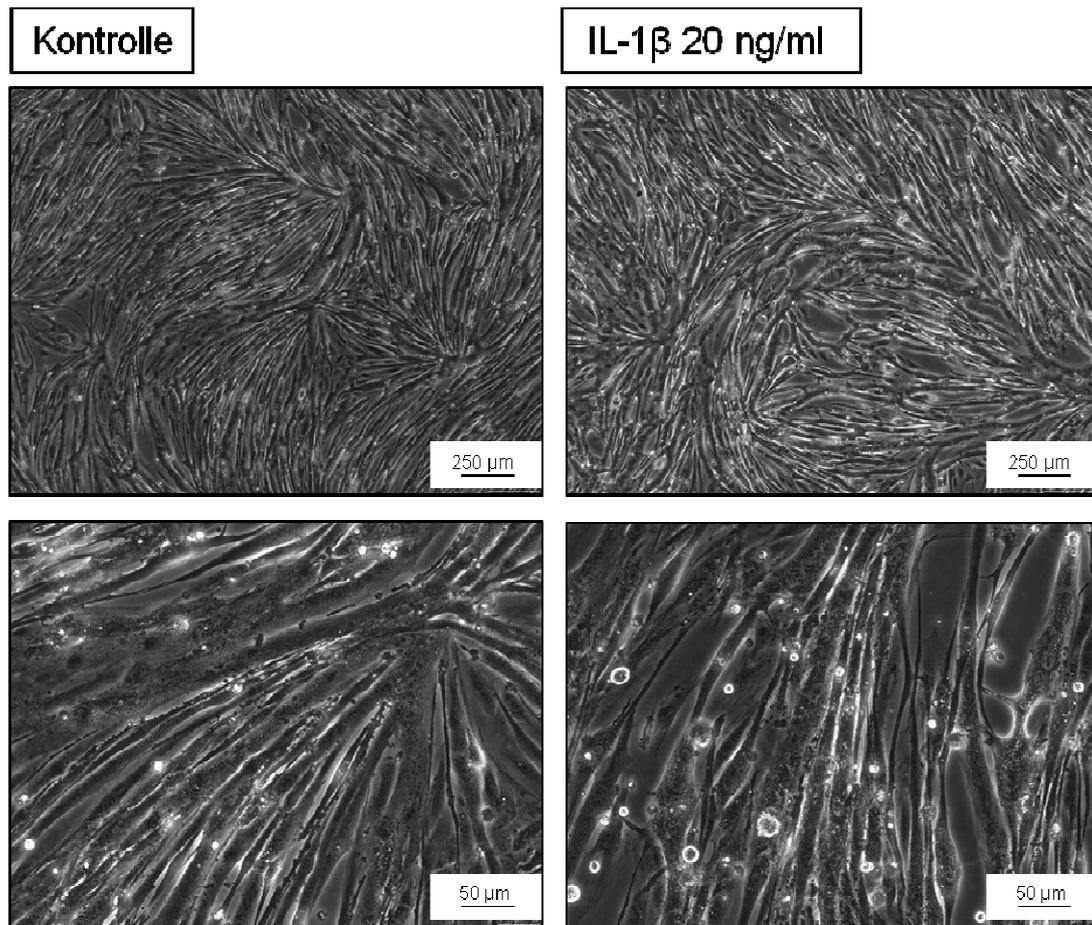


Abbildung 10B zeigt die Ergebnisse der Myotubendurchmesser mit oder ohne IL-1β Behandlung (20 ng/ml IL-1β). Die mit IL-1β-behandelten H9c2-Myotuben zeigten einen geringeren Durchmesser gegenüber den nicht-behandelten Myotuben, zu sehen anhand der Kurven-Linksverschiebung sowie am geringeren mittleren Durchmesser (35% Reduktion, $p < 0.001$).

7. Ergebnisse

C

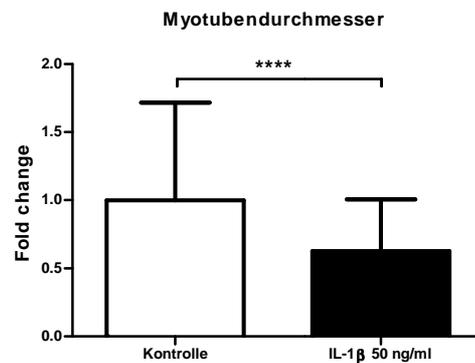
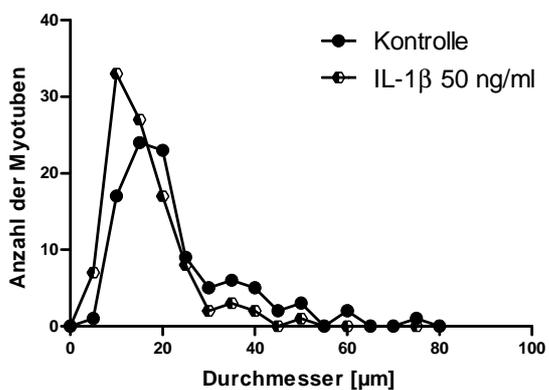
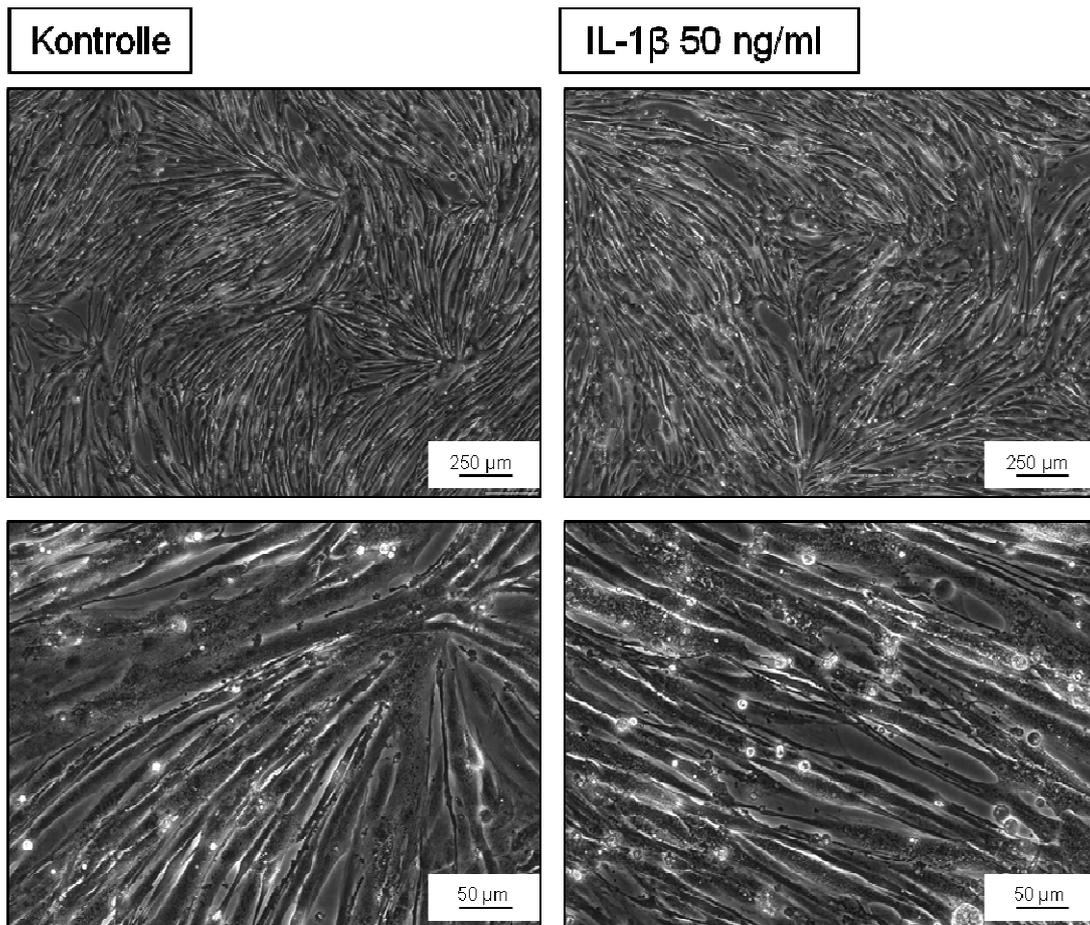


Abbildung 10C zeigt die H9c2 Myotubendurchmesser mit oder ohne IL-1 β Behandlung (50 ng/ml IL-1 β). Hier konnte die höchste Anzahl von Myotuben mit geringerem Durchmesser nach Behandlung mit IL-1 β ermittelt werden. Es ergab sich ein Unterschied zwischen den behandelten Myotuben gegenüber den unbehandelten H9c2-Myotuben von 40% ($p < 0.0001$).

7. Ergebnisse

D

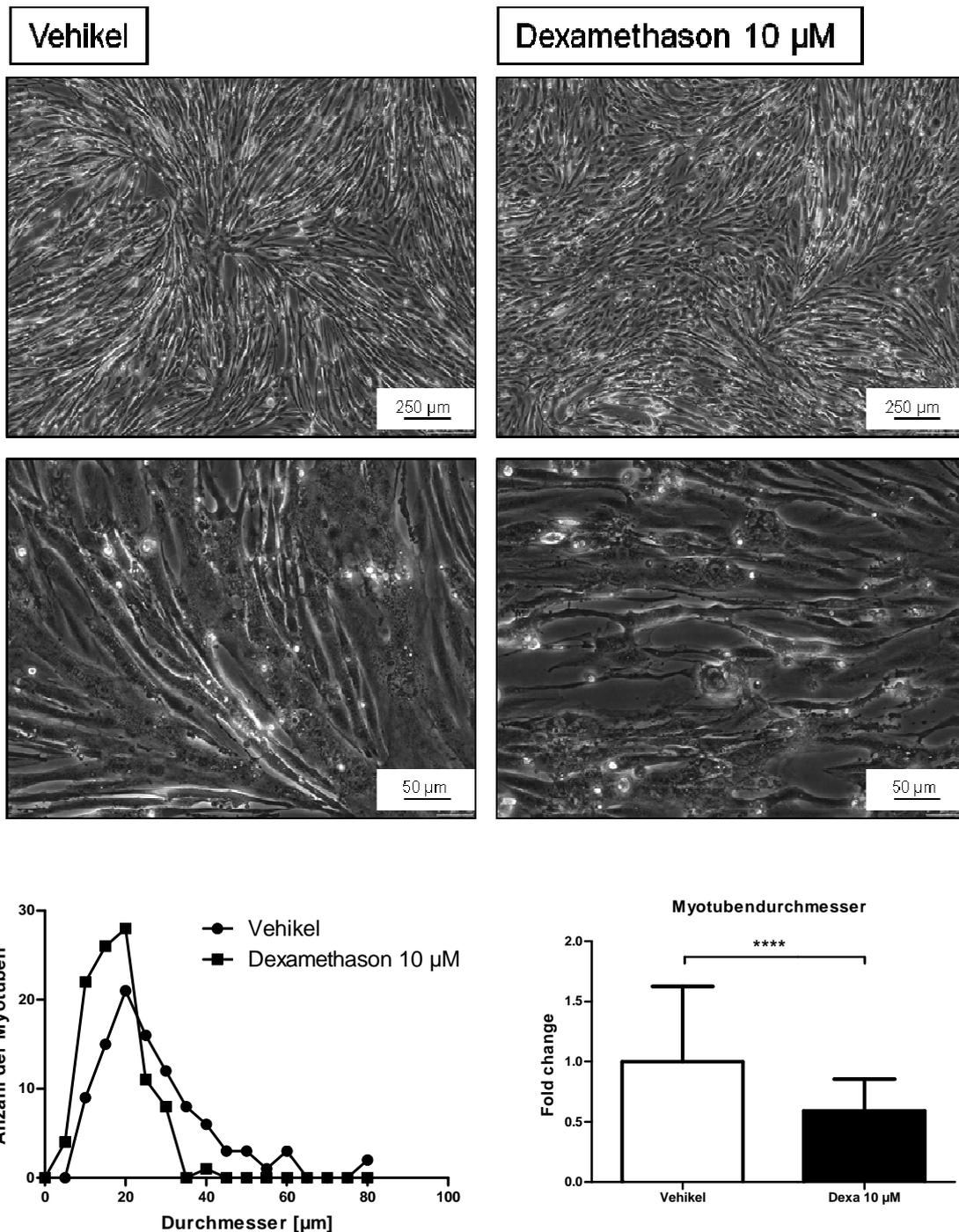


Abbildung 10: Die Stimulation von H9c2-Myotuben mit Interleukin-1 β oder Dexamethason reduziert den Myotubendurchmesser.

H9c2-Myotuben wurden am Differenzierungstag 7 mit (A) 10 ng/ml, (B) 20 ng/ml, (C) 50 ng/ml IL-1 β oder (D) 10 μM Dexamethason (Dexa) für 72h stimuliert. Als Vehikel für Dexa diente Ethanol (0,1% v/v), für die Kontrolle diente Wasser. Das Stimulationsmedium wurde alle 24h gewechselt. Die mikroskopischen Bildaufnahmen sind in 2 unterschiedlichen Auflösungen aufgenommen: Größenbalken 250 μm bzw. 50 μm .

Der mittlere Durchmesser in μm wurde an je 100 Myotuben ermittelt; Fold change bezeichnet die Mittelwerte aller Myotubendurchmesser \pm Standardabweichung, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

7. Ergebnisse

Als Atrophiekontrolle wurden 100 mit 10 μ M Dexamethason-behandelte H9c2-Myotuben bildmorphologisch ausgewertet. Als Vehikel-Kontrolle hierfür diente Ethanol (0,1% v/v). Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0.0001$); die behandelten Myotuben wiesen einen geringeren Durchmesser als die unbehandelten Myotuben auf (Abbildung 10D).

Auf Grund der erhobenen Befunde wurde für die weiteren Experimente eine Konzentration von 50 ng/ml IL-1 β verwendet.

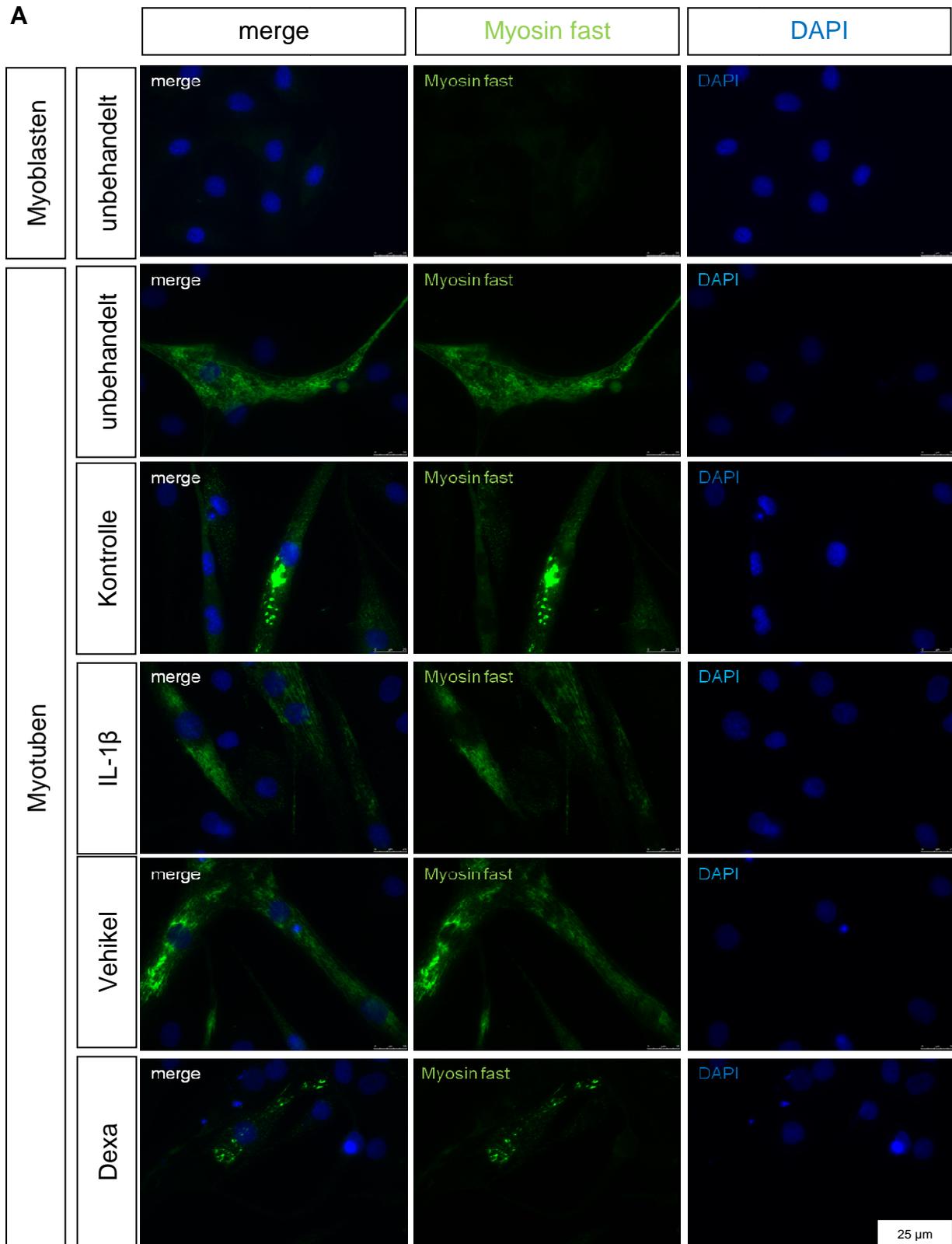
7.1.2.1. Immunzytochemische Färbung von H9c2-Myotuben zeigen Strukturveränderungen von schnellem Myosin (Myosin fast) und α -Aktin

Es wurde mithilfe einer immunzytochemischen Färbung untersucht, in wieweit eine 72 Stunden Behandlung von H9c2-Myotuben mit IL-1 β den Proteingehalt von Myosinen (Abbildung 11A), α -Aktin (Abbildung 11B) oder dem Atrogen MuRF1 (Abbildung 11C) beeinflusst. Als Kontrolle zur Induktion einer Strukturveränderung und/oder Atrophie diente die Behandlung der Zellen mit Dexamethason in einer Konzentration von 10 μ M, wie unter 6.2.1.5. und 6.2.1.6. beschrieben.

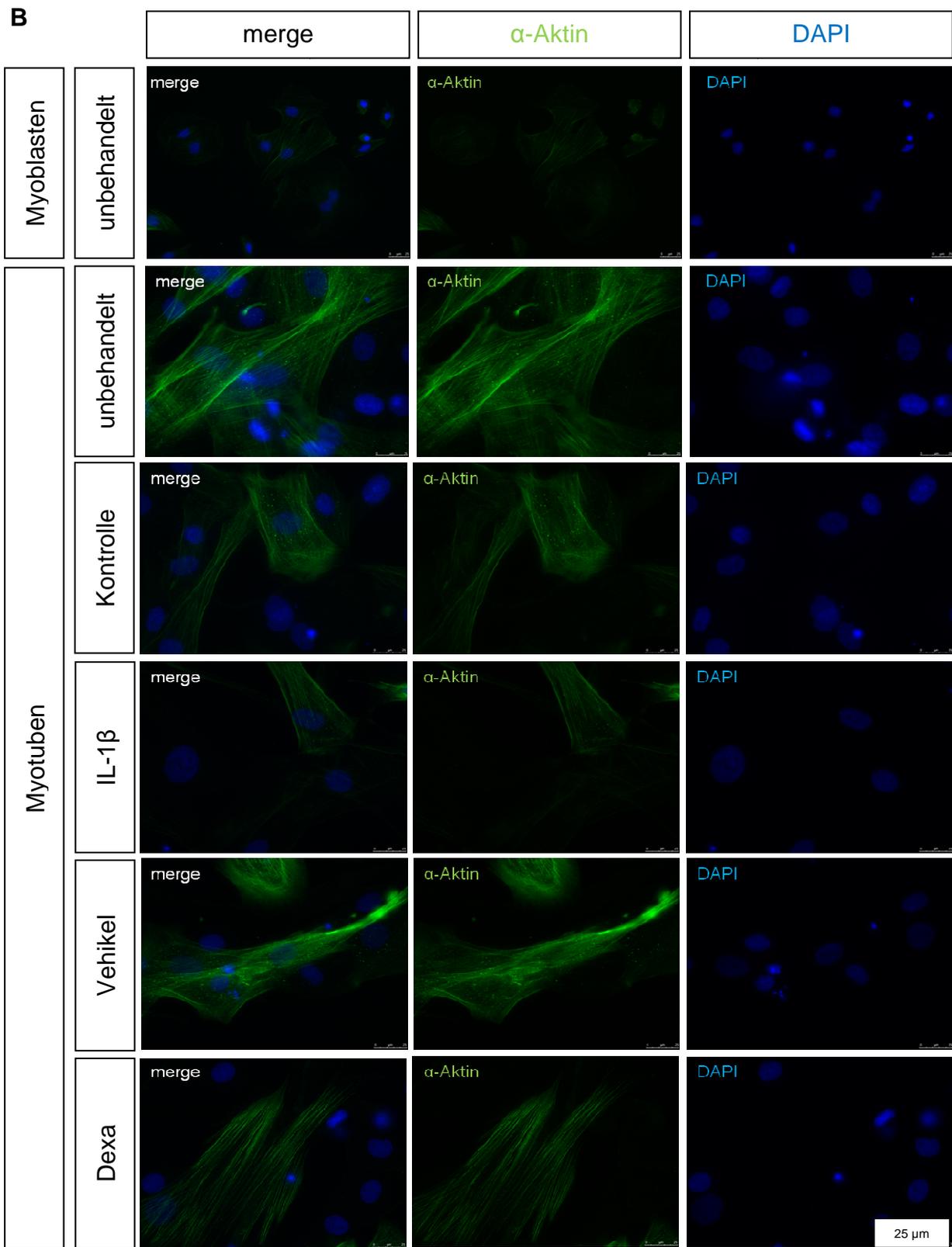
Dazu wurden entsprechend behandelte und unbehandelte H9c2-Myoblasten sowie -Myotuben mit anti-Myosin fast, anti- α -Aktin und anti-MuRF1 Antikörper und den entsprechenden sekundären Antikörpern immunzytochemisch gefärbt. Erwartungsgemäß konnte in den H9c2-Myoblasten nur ein geringer Anteil der Strukturproteine Myosin und Aktin nachgewiesen werden. In den Myoblasten war MuRF1 im Zellkern lokalisiert (Abbildung 11C). In den 7 Tage differenzierten H9c2-Myotuben (unbehandelt und Kontrolle) zeigte sich ein hoher Anteil an schnellem Myosin und α -Aktin, wodurch die Struktur der Myotuben sehr gut dargestellt werden konnte. In den differenzierten H9c2-Myotuben war weniger MuRF1 im Zellkern lokalisiert (Abbildung 11C). Die Behandlung der H9c2-Myotuben mit 50 ng/ml IL-1 β führte zu einem deutlich geringeren Signal für schnelles Myosin und α -Aktin; gleichzeitig wirkte die Struktur dieser Zellen zerstört und aufgehoben. Der Gehalt an MuRF1 wurde durch IL-1 β nicht verändert. Als Kontrolle einer Strukturveränderung oder induzierten Atrophie der H9c2-Myotuben diente Dexamethason (10 μ M). Es zeigten sich sehr geringe bis aufgehobene Myosin fast Anteile. Ebenso zeigte sich eine Strukturveränderung des α -Aktin, wobei dieser Anteil nicht geringer ausfiel. Die erwartete Erhöhung von MuRF1 in den Dexamethason-behandelten H9c2-Myotuben

7. Ergebnisse

war im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle und der anderen Myotuben eindeutig zu erkennen (Abbildung 11C).



7. Ergebnisse



7. Ergebnisse

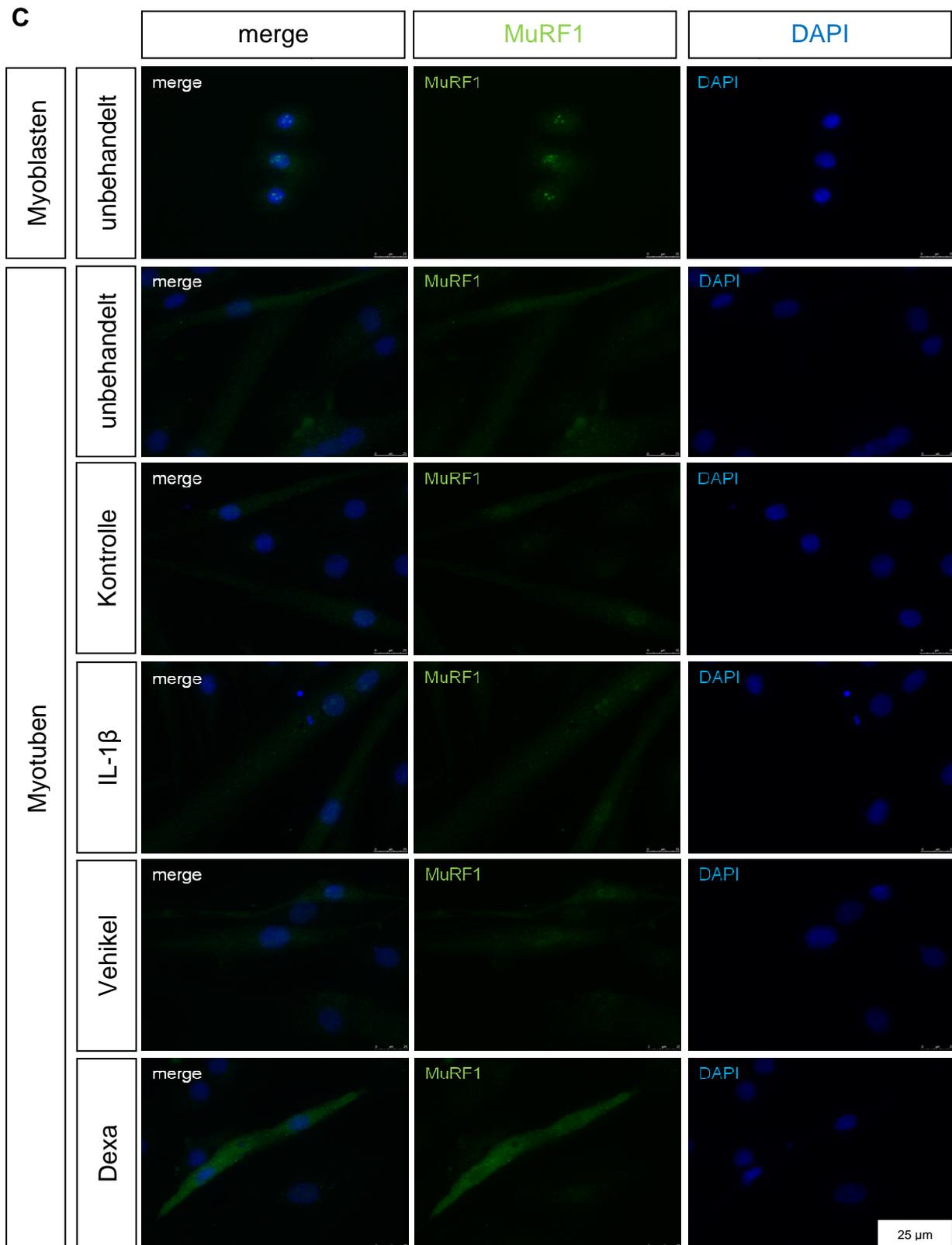


Abbildung 11: Immunzytochemische Analyse der Proteinexpression von Myosin fast, α -Aktin und MuRF1 in H9c2-Myoblasten, -Myotuben und stimulierten H9c2-Myotuben.

Immunzytochemische Färbung von Myosin fast (A), α -Aktin (B) und MuRF1 (C). Gezeigt sind H9c2-Myoblasten; H9c2-Myotuben am Differenzierungstag 7 (unbehandelt), H9c2-Myotuben am Differenzierungstag 10 (Kontrolle mit Wasser); H9c2-Myotuben, welche am Differenzierungstag 7 mit Interleukin-1 β 50 ng/ml für 72h stimuliert wurden (IL-1 β); H9c2-Myotuben, welche am

7. Ergebnisse

Differenzierungstag 7 mit dem Vehikel von Dexamethason (Ethanol 0,1% v/v) für 72h stimuliert wurden (Vehikel) und H9c2-Myotuben, welche am Differenzierungstag 7 mit 10 μ M Dexamethason für 72h stimuliert wurden (Dexa). Der spezifische Nachweis der genannten Proteine erfolgte mit entsprechenden primären Antikörpern. Als sekundärer Antikörper wurde Alexa-Fluor 488® gekoppelter anti-Maus bzw. anti-Kaninchen eingesetzt. Die Kernanfärbung erfolgte mit DAPI, der Maßstab beträgt 25 μ m.

7.1.2.2. Interleukin-1 β (IL-1 β) führt zu einer Reduktion des Myosingehaltes in H9c2-Myotuben

IL-1 β kann die Genexpression von inflammatorischen Zytokinen wie *Il6* in inflammatorischen Zellen induzieren (Weber et al., 2010). Bisher war unbekannt, ob IL-1 β einen direkten Einfluss auf Muskelzellen hat und ob IL-1 β auch die Expression inflammatorischer Zytokine in Herzmuskelzellen aktivieren kann. Um diese Frage zu klären, wurden H9c2-Myotuben am Tag 7 der Differenzierung mit 10 ng/ml IL-1 β für 72 Stunden behandelt und danach die *Nlrp3* und *Il6* Genexpression mittels qRT-PCR quantifiziert. IL-1 β induzierte sowohl die *Nlrp3* ($p < 0.05$) als auch die *Il6* ($p < 0.05$) Expression *in vitro* (Abbildung 12A und 12B). Im Gegensatz dazu hatte Dexamethason keinen Einfluss auf die *Il6* mRNA-Expression (Abbildung 12B).

Der Einfluss von IL-1 β auf den Myosinproteingehalt von Muskelzellen wurde mittels Western Blot untersucht (Abbildung 12C).

Dafür wurden H9c2-Myotuben am Tag 7 der Differenzierung mit 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml IL-1 β für 72 Stunden behandelt. Als Kontrolle der Atrophie wurden die Zellen mit Dexamethason (Dexa 10 μ M) oder dem Vehikel (Ethanol 0,1% v/v) behandelt. Das Stimulationsmedium wurde alle 24 Stunden gewechselt. Anschließend wurde mittels Western Blot der Proteingehalt von schnellem und langsamen Myosin ermittelt (Abbildung 12C). Die IL-1 β -behandelten Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle geringere Mengen an schnellem und langsamen Myosin, wobei der IL-1 β -vermittelte Myosinverlust Dosis-abhängig war (Abbildung 12C). Wie erwartet, führte auch die Dexamethasonbehandlung zu einer Verringerung der Myosinmenge. Diese Experimente zeigen, dass IL-1 β direkt auf H9c2 Zellen wirkt, die Expression von inflammatorischen Zytokinen induziert und direkt eine Atrophie dieser Zellen auslöst.

7. Ergebnisse

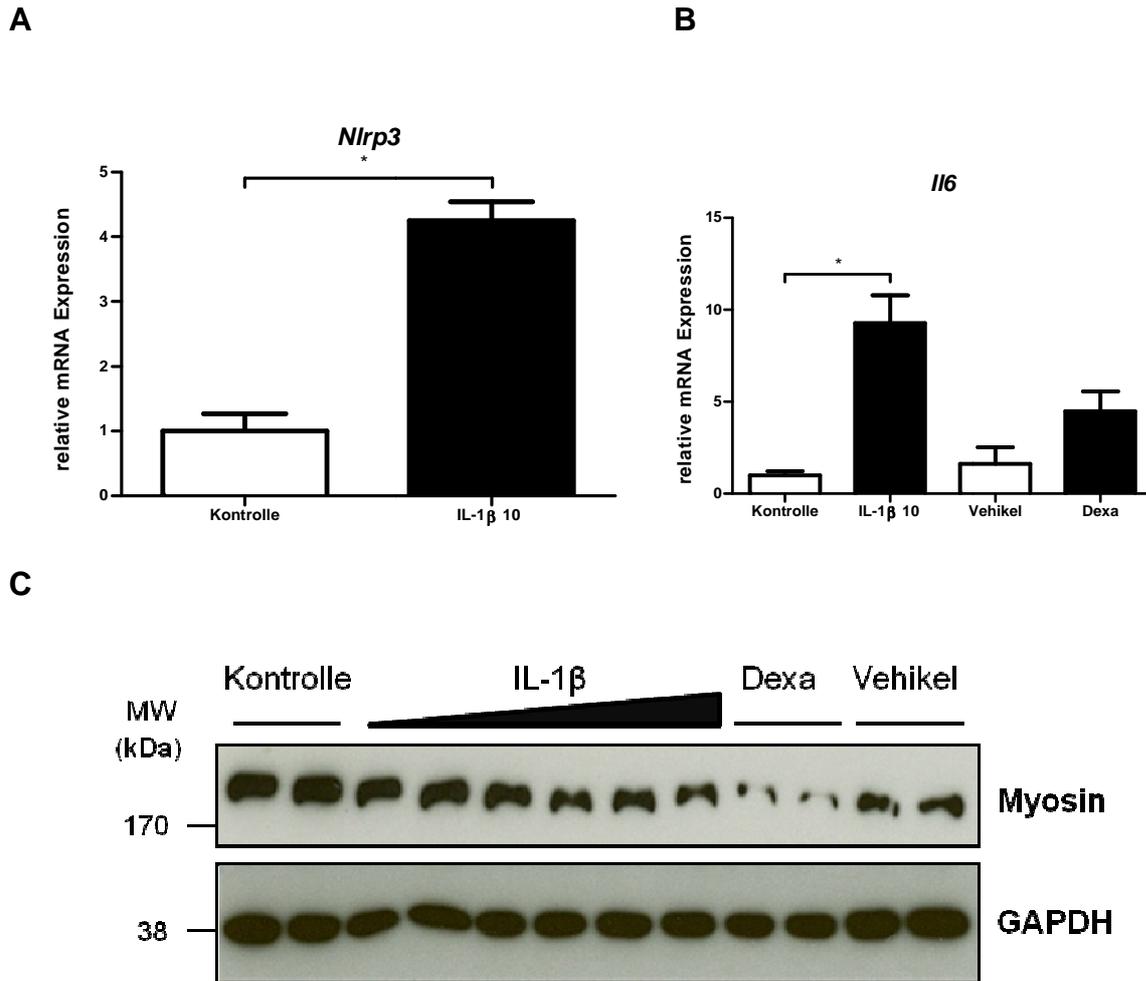


Abbildung 12: Die Stimulation von H9c2-Myotuben mit Interleukin-1 β (IL-1 β) induziert die Expression von *Nlrp3* und *Interleukin-6* (*Il6*) mRNA und reduziert die Proteinmenge von Myosin.

H9c2-Myotuben wurden mit Interleukin-1 β (10 ng/ml) (IL-1 β 10) (**A**, **B**) oder mit Interleukin-1 β (10, 20, 50 ng/ml) (**C**), dem Vehikel von Dexamethason (Ethanol 0,1% v/v) oder mit Dexamethason (10 μ M) für 72h stimuliert. Das Stimulationsmedium wurde alle 24h gewechselt. Für die Kontrolle wurde Wasser verwendet.

Die Ergebnisse der *Nlrp3* (**A**) und *Il6* (**B**) mRNA Expression wurde mithilfe der qRT-PCR ermittelt und anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert. Zu sehen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=2, * p<0.05.

(**C**) Western Blot Analyse der stimulierten H9c2-Myotuben mit Proteinmengen von Myosin fast und slow (MF20); Doppelwerte. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. MW, *molecular weight*, kDa, Kilo Dalton.

7.1.3. Interleukin-1 β induziert nicht die *Trim63* Expression und den MuRF1 Proteingehalt in H9c2-Myotuben

Das Gen *Trim63* kodiert das MuRF1-Protein. Als im Ubiquitin-Proteasom-System integrierte muskelspezifische E3-Ligase spielt MuRF1 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Muskelatrophie (Bodine et al., 2001) und Herzmuskelhypertrophie (Chen et al., 2012; Razeghi et al., 2006). Die Reduktion der Herzkammerfüllung führt zur Atrophie und reduziert die Genexpression, wohin gegen die Herzmuskelhypertrophie erhöhte *Trim63* mRNA Expression aufweist (Razeghi et

7. Ergebnisse

al., 2006). Um zu testen, ob Sepsis-relevante Stimulanzen eine Auswirkung auf die *Trim63* Expression (Abbildung 13A) und/oder den MuRF1 Proteingehalt (Abbildung 13B) haben, wurden H9c2-Myotuben mit Interleukin-1 β (IL-1 β ; 10 ng/ml), *Transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1; 2,5 ng/ml), Lipopolysaccharid (LPS; 1 μ g/ml) oder Dexamethason in 2 unterschiedlichen Konzentrationen (Dexa 1; 0,1 μ M/ Dexa 2; 10 μ M) behandelt und danach die *Trim63* Expression mittels qRT-PCR bzw. der MuRF1 Proteingehalt mittels Western Blot quantifiziert.

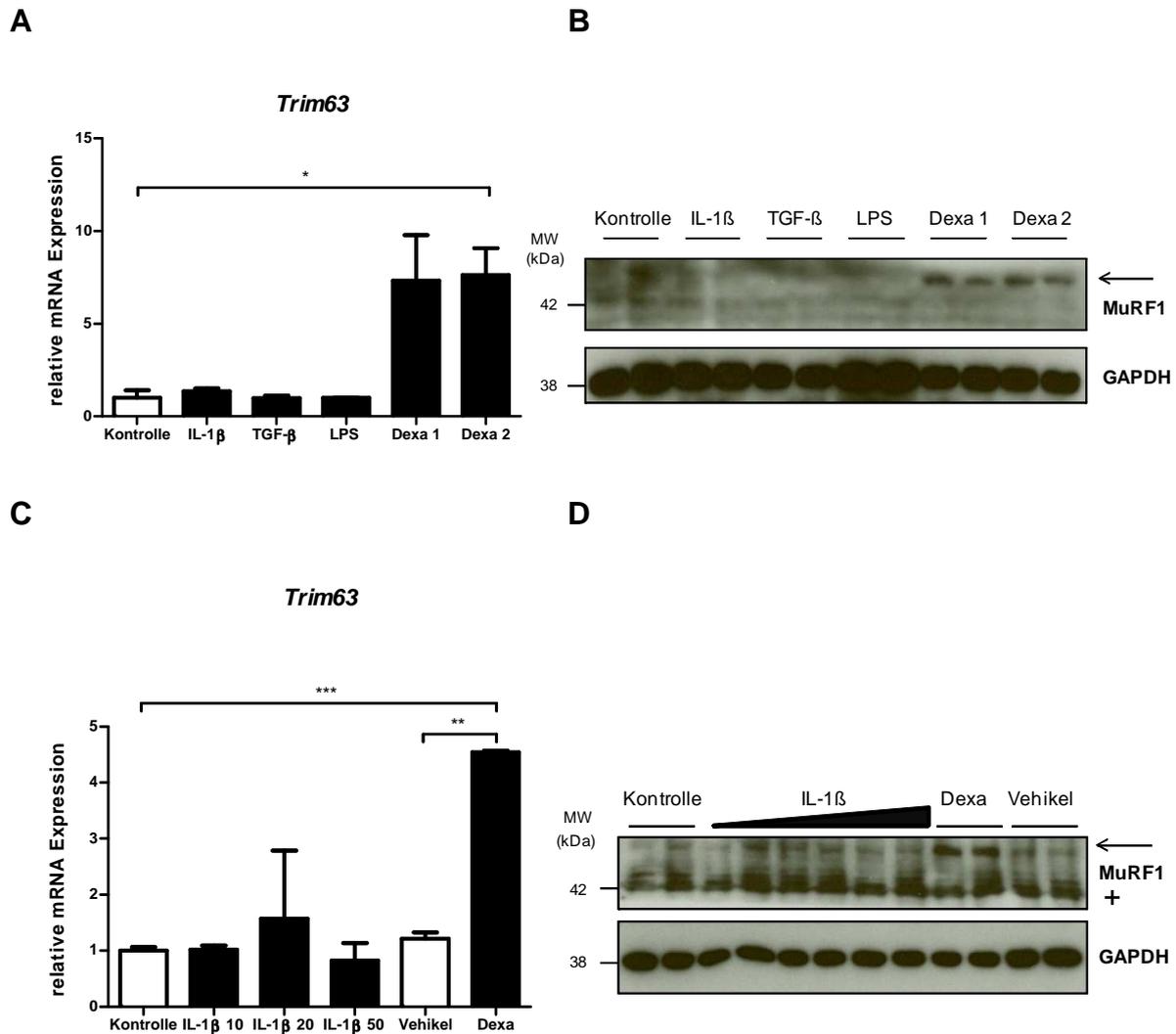


Abbildung 13: Die Stimulation von H9c2-Myotuben mit Interleukin-1 β (IL-1 β) zeigt keine veränderten mRNA Gehalte von *Trim63* und keine Veränderung der Proteinnengen von MuRF1 nach 72h.

H9c2-Myotuben wurden mit Interleukin-1 β (IL-1 β ; 10 ng/ml), *Transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1; 2,5 ng/ml), Lipopolysaccharid (LPS; 1 μ g/ml) und Dexamethason (Dexa 1; 0,1 μ M/ Dexa 2; 10 μ M) für 72h stimuliert (**A**, **B**). Für die Kontrolle wurde Wasser genutzt. Zu sehen ist die *Trim63* (**A**) mRNA Expression. Die qRT-PCR wurde für die Ermittlung der mRNA herangezogen und anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert. Zu sehen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=2, * p<0.05.

(**B**) Western Blot Analyse der stimulierten H9c2-Myotuben mit Proteinnengen von MuRF1, Doppelwerte. Die Ladekontrolle erfolgte durch *GAPDH*. MW, *molecular weight*, kDa, Kilo Dalton.

7. Ergebnisse

H9c2-Myotuben wurden mit Interleukin-1 β in aufsteigender Konzentration (10 ng/ml; 20 ng/ml; 50 ng/ml), dem Vehikel von Dexamethason (Ethanol 0,1% v/v) oder mit Dexamethason (Dexa 10 μ M) für 72h stimuliert. Das Stimulationsmedium wurde alle 24h gewechselt (**C**, **D**). Für die Kontrolle wurde Wasser genutzt. Die mRNA Expression von *Trim63* (**C**) wurde mithilfe der qRT-PCR ermittelt und anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert. Zu sehen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=2, ** p<0.01, *** p<0.001.

(**D**) Western Blot Analyse der stimulierten H9c2-Myotuben. Zu sehen sind Proteinmengen von MuRF1, Doppelwerte. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. „+“ unspezifische Banden. MW, *molecular weight*, kDa, Kilo Dalton.

Die *Trim63* mRNA Expression und der MuRF1 Proteingehalt wurden weder durch IL-1 β , noch durch TGF- β 1 oder LPS induziert. Im Gegensatz dazu induzierte Dexamethason die *Trim63* Expression (p<0.05) (Abbildung 13A) und den MuRF1 Proteingehalt (Abbildung 13B).

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob höhere IL-1 β Konzentrationen die *Trim63* mRNA Expression bzw. den MuRF1 Proteingehalt steigern. Dazu wurden differenzierte H9c2-Myotuben mit 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml IL-1 β bzw. dem Vehikel für 72 Stunden behandelt und danach die *Trim63* Expression mittels qRT-PCR bzw. der MuRF1 Proteingehalt mittels Western Blot quantifiziert. Dexamethason (Dexa 10 μ M) wurde als Positivkontrolle und dessen Vehikel (Ethanol 0,1% v/v) als Kontrolle verwendet. Auch die höheren IL-1 β Mengen steigerten nicht die *Trim63* mRNA Expression und den MuRF1 Proteingehalt. Im Gegensatz dazu induzierte Dexamethason die *Trim63* Expression (p<0.01) (Abbildung 13C) und den MuRF1 Proteingehalt (Abbildung 13D).

Da die vorherigen Versuche nach 72 Stunden erfolgten, wurde als nächstes getestet, ob IL-1 β die *Trim63* Expression zu einem früheren Zeitpunkt steigert. Hierfür wurden differenzierte H9c2-Myotuben mit 50 ng/ml IL-1 β für 1, 2 oder 3 Stunden (Abbildung 14) bzw. für 3, 6, 12, 24, 48 oder 72 Stunden behandelt (Abbildung 15). Für die Positivkontrolle wurden die Myotuben mit Dexamethason (Dexa 10 μ M) für 3 Stunden inkubiert. Ethanol 0,1% v/v diente als Vehikelkontrolle für Dexamethason. Die Behandlung mit IL-1 β führte zu keiner Veränderung hinsichtlich der *Trim63* Expression in H9c2-Myotuben (Abbildung 14-15). Wie erwartet, induzierte Dexamethason die *Trim63* Expression in behandelten H9c2-Myotuben, sowohl nach 3 Stunden (p<0.05) (Abbildung 14) als auch nach 72 Stunden (p<0.01) (Abbildung 15).

7. Ergebnisse

Diese Daten zeigen, dass IL-1 β unter den verwendeten Bedingungen keinen Einfluss auf die *Trim63* mRNA Expression bzw. den MuRF1 Proteingehalt von differenzierten H9c2-Myotuben hat.

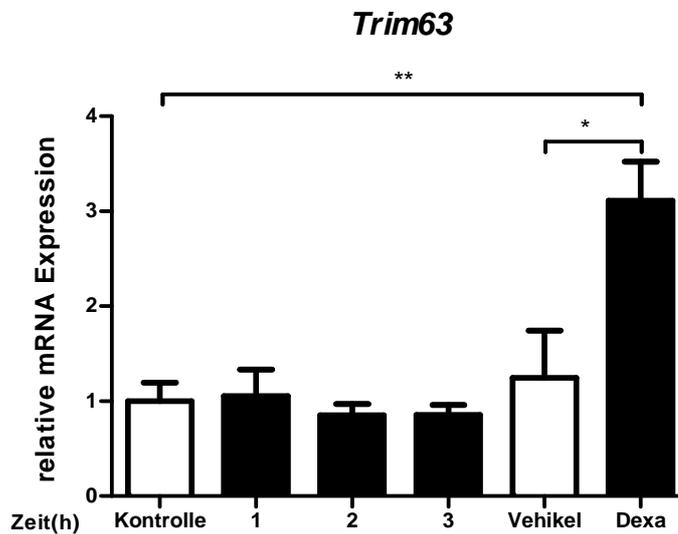


Abbildung 14: Die Behandlung von H9c2-Myotuben mit Interleukin-1 β (IL-1 β) für bis zu 3 Stunden verändert nicht die mRNA Expression von *Trim63*.

H9c2-Myotuben wurden für 1h, 2h oder 3h mit IL-1 β (50 ng/ml), für 3h mit dem Vehikel von Dexamethason (Ethanol 0,1% v/v) oder für 3h mit Dexamethason (Dexa 10 μ M) behandelt. Für die Kontrolle wurde Wasser genutzt. Die *Trim63* mRNA Expression wurde mithilfe der qRT-PCR ermittelt und anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert. Die Darstellung erfolgte als Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3, * p<0.05, ** p<0.01.

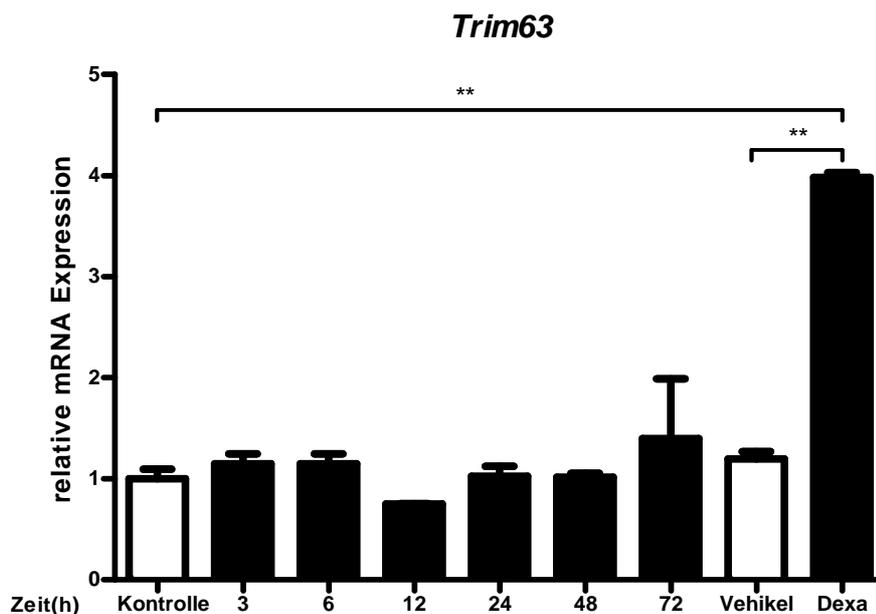


Abbildung 15: Die Interleukin-1 β (IL-1 β) Stimulation von H9c2-Myotuben für bis zu 72h verändert die mRNA Expression von *Trim63* nicht.

7. Ergebnisse

H9c2-Myotuben wurden mit IL-1 β 50 ng/ml für 3h, 6h, 12h, 24h, 48h und 72h stimuliert, mit dem Vehikel von Dexamethason (Ethanol 0,1% v/v) und mit Dexamethason (Dexa 10 μ M) für 72h stimuliert. Für die Kontrolle wurde Wasser genutzt. Die qRT-PCR wurde für die Ermittlung der *Trim63* mRNA Expression herangezogen und anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert. Zu sehen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=2, ** p<0.01.

7.1.4. Interleukin-1 β steigert die *Fbxo32*/Atrogin1 Expression in H9c2-Myotuben

Da das F-Box-Protein Atrogin1, kodiert durch das Gen *Fbxo32*, eine Rolle bei der Muskel- und Herzmuskelatrophie spielt (Razeghi et al., 2006), sollte im Weiteren analysiert werden, ob IL-1 β die *Fbxo32* mRNA Expression in H9c2-Myotuben steigert.

Dafür wurden differenzierte H9c2-Myotuben am Tag 7 mit 50 ng/ml IL-1 β für bis zu 3 Stunden behandelt und die *Fbxo32* Genexpression mittels qRT-PCR quantifiziert. Als Kontrolle wurden die Zellen für 3 Stunden mit Dexamethason (Dexa 10 μ M) behandelt. Als Vehikel von Dexamethason diente Ethanol 0,1% v/v.

IL-1 β steigerte die *Fbxo32* Expression bereits nach 1 Stunde. Nach 2 und 3 Stunden war die *Fbxo32* Expression signifikant (p<0.05) erhöht (Abbildung 16). Die Dexamethason-behandelten Myotuben wiesen ebenfalls einen signifikanten (p<0.05) Anstieg der *Fbxo32* mRNA Expression auf (Abbildung 16).

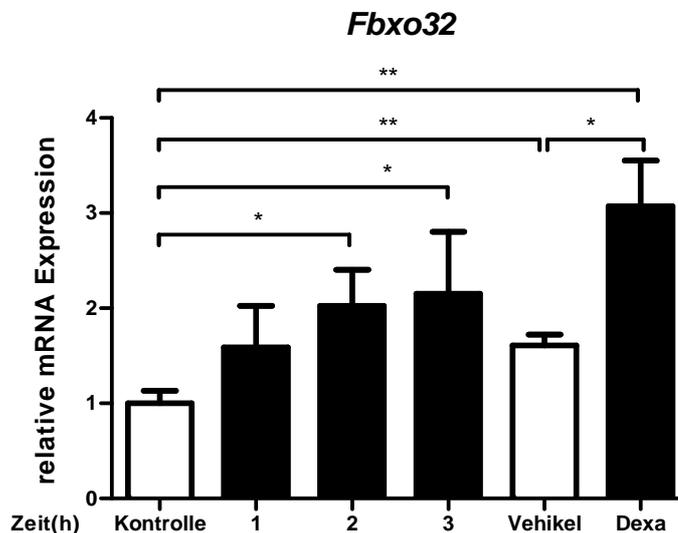


Abbildung 16: In H9c2-Myotuben induziert Interleukin-1 β (IL-1 β) die mRNA Expression von *Fbxo32* innerhalb der ersten 3h.

H9c2-Myotuben wurden für bis zu 3h mit IL-1 β (50 ng/ml), für 3h mit dem Vehikel von Dexamethason (Ethanol 0,1% v/v) oder mit Dexamethason (Dexa 10 μ M) behandelt. Für die Kontrolle wurde Wasser genutzt. Dargestellt ist die *Fbxo32* mRNA Expression, welche mithilfe der qRT-PCR ermittelt und anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert wurde. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3, * p<0.05, ** p<0.01.

7. Ergebnisse

Fbxo32

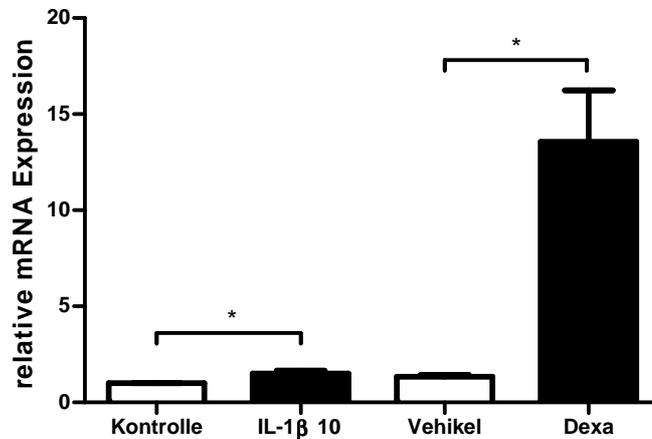


Abbildung 17: Die Stimulation von H9c2 Myotuben mit Interleukin-1 β (IL-1 β) für 72h erhöht die mRNA Expression von *Fbxo32*.

H9c2-Myotuben wurden mit IL-1 β (10 ng/ml), dem Vehikel von Dexamethason (Ethanol 0,1% v/v) oder mit Dexamethason (Dexa 10 μ M) für 72h stimuliert. Das Stimulationsmedium wurde alle 24h gewechselt. Für die Kontrolle wurde Wasser genutzt. Dargestellt ist die *Fbxo32* mRNA Expression, die anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert wurde. Für die Analyse wurde die qRT-PCR herangezogen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=2, * p<0.05.

Anschließend wurde die *Fbxo32* mRNA Expression in Myotuben quantifiziert, welche am Differenzierungstag 7 mit 10 ng/ml IL-1 β für 72 Stunden behandelt wurden. Als Atrophiekontrolle wurde Dexamethason (Dexa 10 μ M) herangezogen. Als Vehikel von Dexamethason diente Ethanol 0,1% v/v. In der qRT-PCR konnte ein signifikanter zweifacher Anstieg der *Fbxo32* mRNA Expression (p<0.05) ermittelt werden. Ebenso stieg die *Fbxo32* mRNA Expression in den Dexamethason-behandelten H9c2-Myotuben signifikant (p<0.05) an (Abbildung 17).

Zusammenfassend zeigte sich, dass IL-1 β die *Fbxo32* mRNA Expression in H9c2-Myotuben signifikant steigert.

7.2. Tierexperimentelle Ergebnisse

Um die Hypothese zu testen, dass die NaLP3-Inflammasom-abhängige IL-1 β Aktivierung einen Einfluss auf die septische Kardiomyopathie hat, wurde bei 12-15 Wochen alten und ausschließlich männlichen *Nlrp3* Wildtyp (WT) -Mäusen und *Nlrp3* Knockout (KO) -Mäusen eine polymikrobielle Sepsis durch CLP Operation induziert (Buras et al., 2005). Sham-operierte *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäuse dienten als

7. Ergebnisse

Kontrollgruppe. Die eingeschlossenen Mäuse wurden in 4 Gruppen unterteilt. Die Anzahl der operierten Tiere in den jeweiligen Gruppen waren:

- *Nlrp3* WT sham 16
- *Nlrp3* WT CLP 33
- *Nlrp3* KO sham 11
- *Nlrp3* KO CLP 27

Die nachfolgenden Ergebnisse von *Nlrp3* WT Mäusen und *Nlrp3* KO Mäusen nach sham- und CLP-Operation wurden in Teilen veröffentlicht in: Intensive Care Med Exp. 2017; 5:3. doi: 10.1186/s40635-016-0115-0 mit dem Titel: „*Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy.*“

7.2.1. Überlebensrate

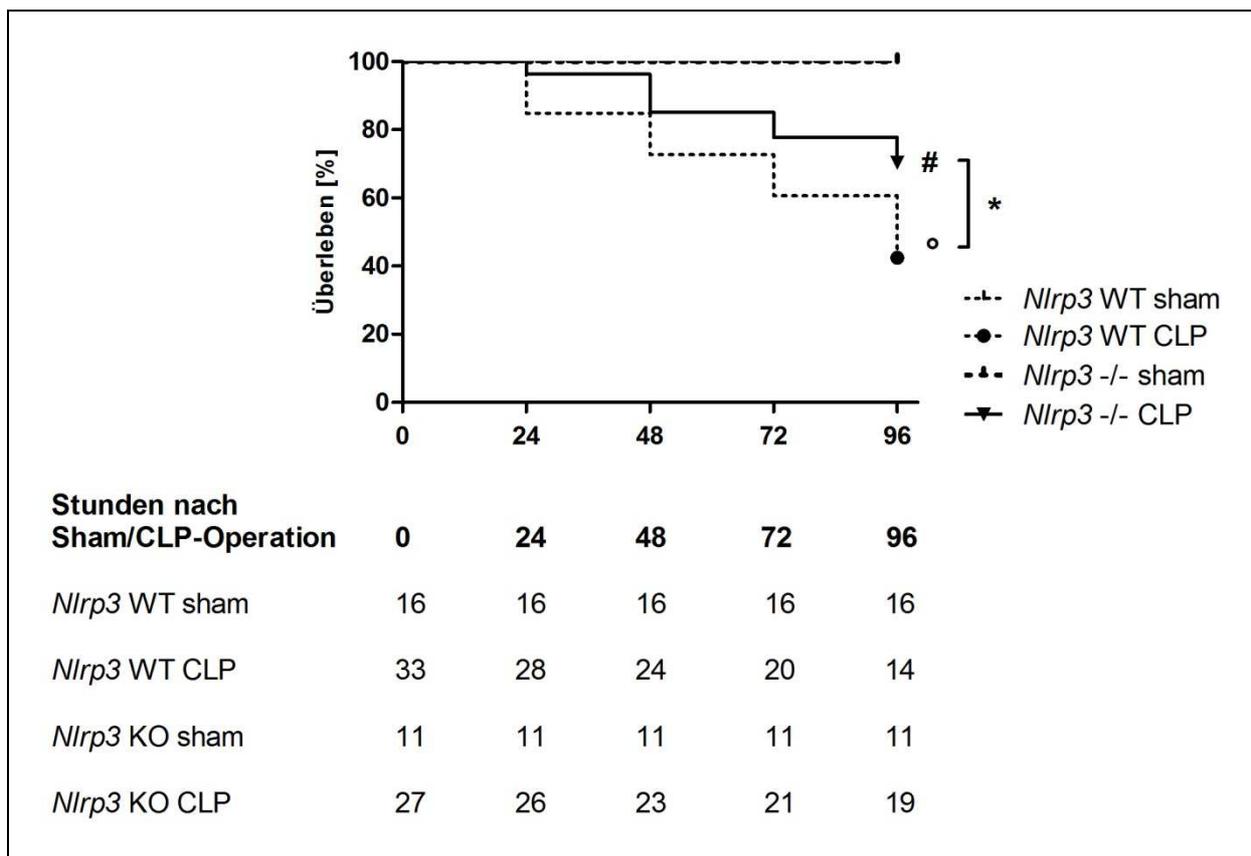


Abbildung 18: Das prozentuale Überleben von *Nlrp3* KO Mäusen nach CLP-induzierter Sepsis ist höher als das prozentuale Überleben von *Nlrp3* WT Mäusen.

Alle *Nlrp3* WT (WT) und *Nlrp3* KO (-/-) Mäuse wurden zur Stunde 0 sham- bzw. CLP-operiert und anschließend über 96h beobachtet. Die Anzahl der überlebenden Tiere wurde alle 24h aufgeführt. KO sham vs KO CLP # $p \leq 0.05$; WT sham vs WT CLP ° $p \leq 0.001$; WT CLP vs KO CLP * $p \leq 0.05$ (mit freundlicher Genehmigung durch Springer Nature aus Huang et al., 2017).

7. Ergebnisse

96 Stunden nach Operation betrug die Überlebensrate der sham-operierten Mäuse sowohl in der *Nlrp3* WT als auch in der *Nlrp3* KO Gruppe 100% (Abbildung 18).

24 Stunden nach CLP-Operation überlebten 84,8%, 48 Stunden nach Operation 72,7%, 72 Stunden nach CLP-Operation 60,6% und 96 Stunden nach Operation 42,4% der *Nlrp3* WT Mäuse (Abbildung 18). Das Überleben der CLP-operierten *Nlrp3* WT Mäuse im Vergleich zu *Nlrp3* WT sham war signifikant reduziert ($p \leq 0.001$).

Die Überlebensrate der CLP-operierten Mäuse betrug in der Gruppe der *Nlrp3* KO Mäuse 24 Stunden nach Operation 96,3%, 48 Stunden nach Operation 85,2%, 72 Stunden nach Operation 77,8% und 96 Stunden nach Operation 70,4% (Abbildung 18). Das Überleben von *Nlrp3* KO Mäusen war nach CLP-Operation signifikant verschlechtert ($p \leq 0.05$) im Vergleich zu *Nlrp3* KO sham Mäusen.

Das Überleben der CLP-operierten *Nlrp3* KO Mäuse war mit 70,4% signifikant besser als das der CLP-operierten *Nlrp3* WT Mäuse mit 42,4% ($p \leq 0.05$).

7.2.2. Systolische und diastolische Herzfunktion in septischen *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen

Die Messung der systolischen und diastolischen Herzfunktion wurde mithilfe einer zweidimensionalen transthorakalen Echokardiographie durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Herzfunktion der septischen *Nlrp3* KO Mäuse besser war, als die der septischen *Nlrp3* WT Tiere. Die Echokardiographie erfolgte sowohl in sham- als auch in CLP-operierten Mäusen. 24 Stunden nach Induktion einer Sepsis zeigten die *Nlrp3* WT Mäuse ein signifikant reduziertes Schlagvolumen gegenüber den sham-operierten *Nlrp3* WT Mäusen ($p < 0.01$). Das Schlagvolumen der septischen *Nlrp3* KO Mäuse war im Vergleich zu den sham-operierten *Nlrp3* KO Tieren unverändert (Abbildung 19). Des Weiteren wurde der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (*left ventricular end-diastolic diameter*, LVEDD) und der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser (*left ventricular end-systolic diameter*, LVESD) ermittelt. Der LVEDD war in den septischen *Nlrp3* KO Mäusen verglichen mit den sham-operierten *Nlrp3* KO Mäusen unverändert, wohingegen der LVEDD in den septischen *Nlrp3* WT Mäusen verglichen mit den sham-operierten *Nlrp3* WT Mäusen signifikant verringert war ($p < 0.005$). Der LVESD war in beiden Genotypen durch die Sepsis reduziert (Abbildung 19).

7. Ergebnisse

Zur Beurteilung der diastolischen Herzfunktion in *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen wurden die frühdiastolische passive linksventrikuläre Füllung (E) und die spätdiastolische aktive linksventrikuläre Füllung (A) gemessen und das E/A-Verhältnis aus diesen Werten errechnet. E war in den CLP-operierten *Nlrp3* WT Mäusen gegenüber den sham-operierten *Nlrp3* WT Mäusen signifikant reduziert ($p < 0.01$). Die frühdiastolische passive linksventrikuläre Füllung wurde durch die Sepsis in den *Nlrp3* KO Mäusen nicht verändert (Abbildung 19). Die spätdiastolische aktive linksventrikuläre Füllung wurde in beiden Genotypen durch die Sepsis nicht beeinflusst. Das E/A-Verhältnis war in den septischen *Nlrp3* WT Mäusen verglichen mit den sham-operierten *Nlrp3* WT Mäusen signifikant reduziert ($p < 0.01$). In den septischen *Nlrp3* KO Tieren war das E/A-Verhältnis im Vergleich zu den sham-operierten *Nlrp3* KO Tieren unverändert (Abbildung 19).

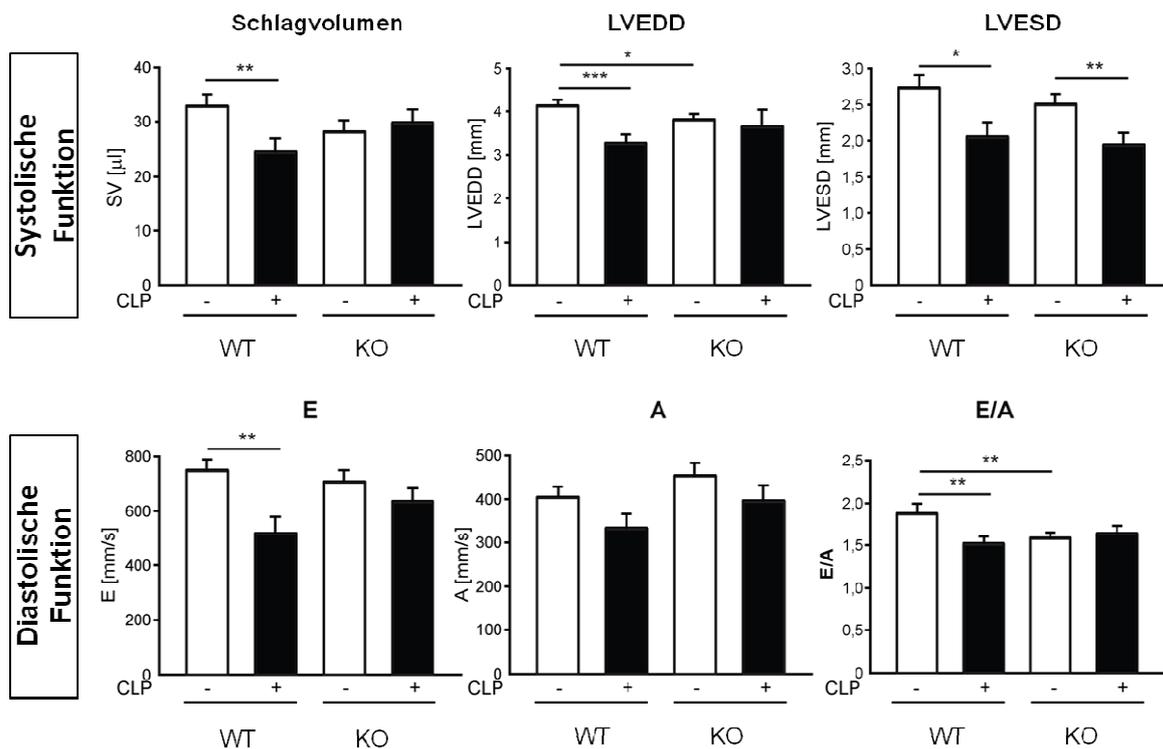


Abbildung 19: Nach Induktion einer Sepsis weisen *Nlrp3* KO Mäuse eine bessere systolische und diastolische Herzfunktion als *Nlrp3* WT Mäuse auf.

Zu sehen sind die systolischen und diastolischen Herzfunktionen 24h nach sham- bzw. CLP-Operation von *Nlrp3* WT sham (-), *Nlrp3* WT CLP (+) sowie *Nlrp3* KO sham (-) und *Nlrp3* KO CLP (+) Mäusen. Die zweidimensionale transthorakale Echokardiographie erfolgte mithilfe eines VisualSonics Vevo 2100 High-Resolution Imaging Systems und eines 38 MHz Schallkopfes. Anzahl der Versuchstiere $n=13$ *Nlrp3* WT (sham $n=5$, CLP $n=8$) und $n=13$ *Nlrp3* KO (sham $n=6$, CLP $n=7$).

Zu sehen ist das Schlagvolumen, der LVEDD (linksventrikuläre end-diastolische Durchmesser), der LVESD (linksventrikuläre end-systolische Durchmesser). Die Messungen der E- und A-

7. Ergebnisse

Geschwindigkeitswellen sowie das E/A-Verhältnis erfolgten mittels Wellendoppler aus der apikalen 4-Kammer-Ansicht. Es wurden die frühdiastrische passive linksventrikuläre Füllung (E) und die spätdiastrische aktive linksventrikuläre Füllung (A) gemessen und das E/A-Verhältnis daraus errechnet. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$.

7.2.3. Gewichte

Das mittlere Körpergewicht der CLP-operierten Tiere war 96 Stunden nach Operation in beiden Genotypen im Vergleich zu den sham-operierten Tieren signifikant verringert (Abbildung 20). In der Gruppe der *Nlrp3* WT Mäuse verringerte sich das Körpergewicht der CLP-operierten Mäuse um 19,6% signifikant ($p < 0.001$) und in der Gruppe der *Nlrp3* KO Mäuse um 8,9% signifikant ($p < 0.05$). Die CLP induzierte Reduktion des Körpergewichts war in *Nlrp3* WT Tieren signifikant stärker als in KO Tieren ($p < 0.05$).

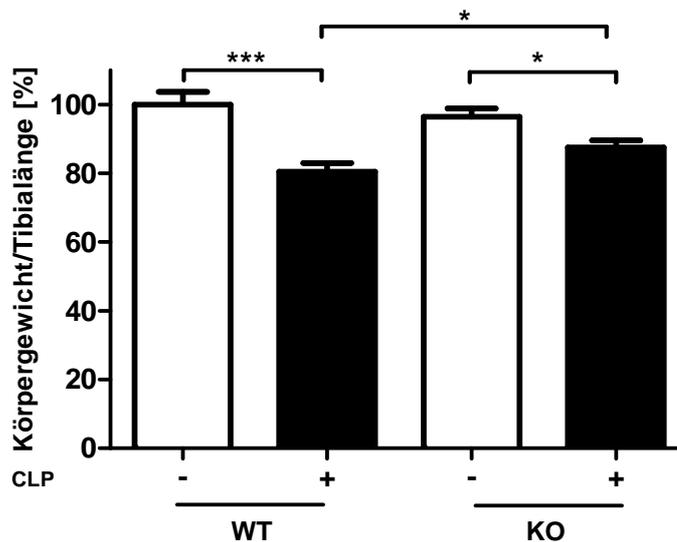


Abbildung 20: Die CLP-induzierte Sepsis führt zu einem geringeren Körpergewichtsverlust in *Nlrp3* KO im Vergleich zu *Nlrp3* WT Mäusen.

Das Körpergewicht der *Nlrp3* WT (WT) und der *Nlrp3* KO (KO) Mäuse wurde 96h nach Operation gemessen und anhand der Tibiallänge normalisiert. Zu sehen sind Gewichte der sham (-) und CLP (+) operierten Mäuse. WT sham=100%, alle weiteren Gruppen stehen im Verhältnis zur WT sham Gruppe. Alle Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Die eingeschlossene Gruppengröße beträgt für WT sham $n=13$, WT CLP $n=12$, KO sham $n=8$ und KO CLP $n=16$.

Hinsichtlich der auf die Tibialängen normalisierten Herzgewichte konnten signifikante Unterschiede in den Genotypen 96 Stunden nach CLP-Operation gefunden werden (Abbildung 21). In der Gruppe der *Nlrp3* WT Mäuse war das Herzgewicht der CLP-operierten Mäuse signifikant verringert (20,2%, $p < 0.01$). In der Gruppe der *Nlrp3* KO Mäuse wurde dagegen kein signifikanter Gewichtsverlust gefunden. Die prozentuale

7. Ergebnisse

Abnahme des Herzgewichtes der CLP-operierten Mäuse war für die *Nlrp3* WT Gruppe signifikant ($p < 0.05$) verringert gegenüber der *Nlrp3* KO Gruppe.

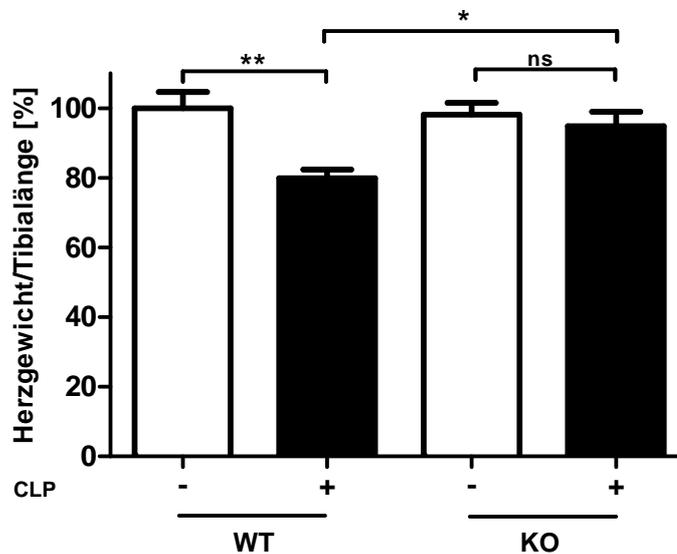


Abbildung 21: Die CLP-induzierte Sepsis führt zu einer Reduktion des Herzgewichtes in *Nlrp3* WT Mäusen, nicht jedoch in *Nlrp3* KO Mäusen.

Das Herzgewicht der *Nlrp3* WT (WT; sham (-) und CLP (+)) und der *Nlrp3* KO (KO; sham (-) und CLP (+)) Mäuse wurde 96h nach Operation gemessen und anhand der Tibialänge normalisiert. WT sham=100%, alle weiteren Gruppen stehen im Verhältnis zur WT sham Gruppe. Alle Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Die eingeschlossene Gruppengröße beträgt für WT sham $n=13$, WT CLP $n=12$, KO sham $n=8$ und KO CLP $n=15$.

Die Gewichte der Lunge (normalisiert anhand der Tibialängen) waren 96 Stunden nach CLP-Operation in der Gruppe der *Nlrp3* WT Mäuse um 11,3% ($p < 0.05$) signifikant verringert, das der *Nlrp3* KO Mäuse war nicht verändert (Abbildung 22A).

Die Lebergewichte (normalisiert anhand der Tibialängen) der überlebenden Mäuse waren 96 Stunden nach CLP-Operation in der Gruppe der *Nlrp3* WT Mäuse signifikant um 32,3% verringert ($p < 0.001$); in der Gruppe der *Nlrp3* KO Mäuse war das Lebergewicht nicht signifikant verändert. Die CLP induzierte Reduktion des Lebergewichts war in *Nlrp3* WT Tieren signifikant stärker als in *Nlrp3* KO Tieren ($p < 0.001$) (Abbildung 22B).

7. Ergebnisse

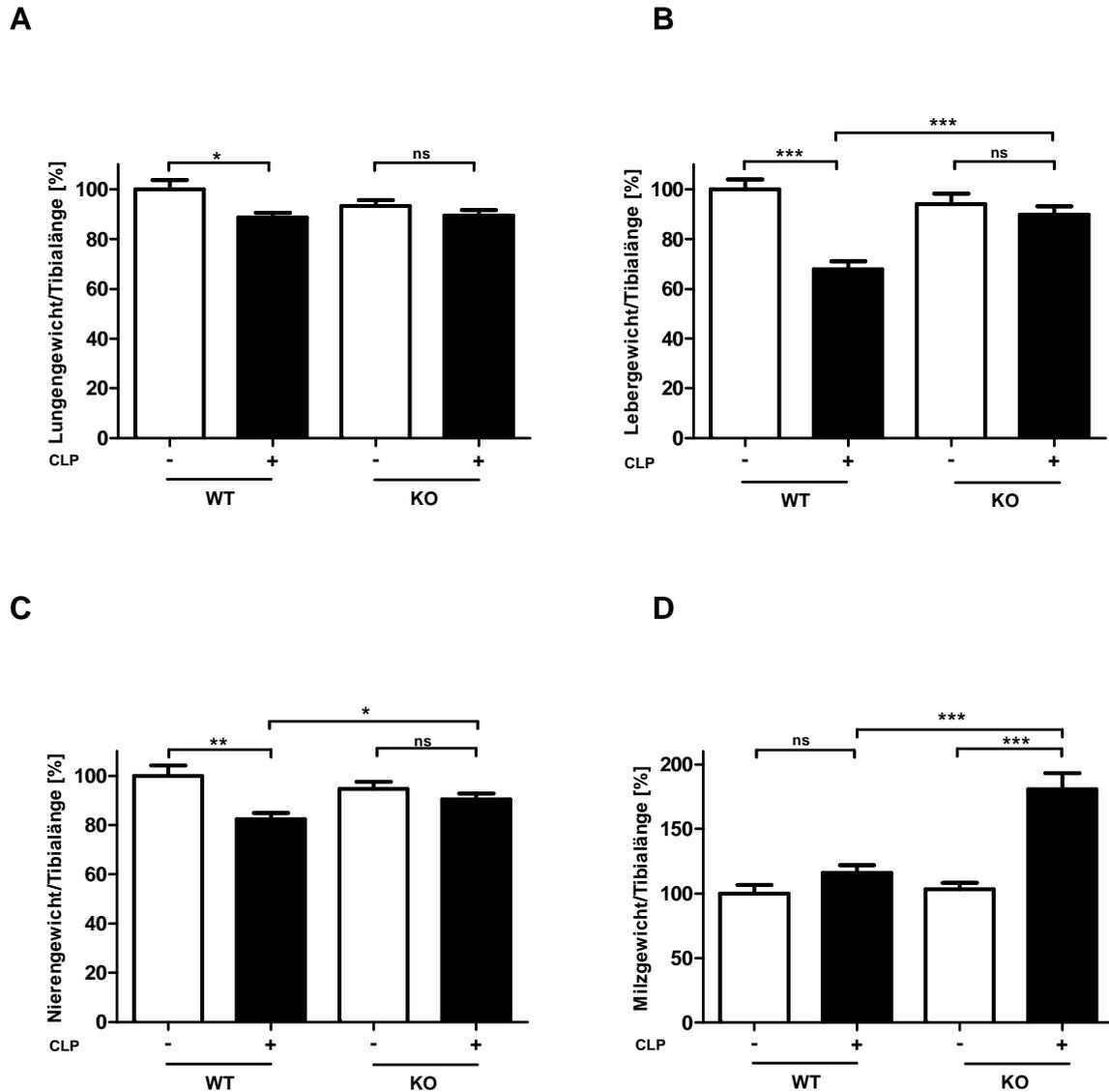


Abbildung 22: Die CLP-induzierte Sepsis führt zu einer Reduktion des Leber-, Lungen und Nierengewichts in *Nlrp3* WT, aber nicht in *Nlrp3* KO Mäusen.

Die Gewichte der *Nlrp3* WT (WT) und der *Nlrp3* KO (KO) Mäuse von Lunge (A), Leber (B), beider Nieren (C) und Milz (D) wurden 96h nach Operation gemessen und anhand der Tibialänge normalisiert. Zu sehen sind Gewichte der sham (-) und CLP (+) operierten Mäuse. WT sham=100%, alle weiteren Gruppen stehen im Verhältnis zur WT sham Gruppe. Alle Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Die eingeschlossene Gruppengröße beträgt für WT sham $n=13$ (für Milz $n=12$), WT CLP $n=12$, KO sham $n=8$ und KO CLP $n=16$ (für Nieren $n=15$).

Das auf die Tibialänge normalisierte Gewicht der Nieren von *Nlrp3* WT CLP war im Vergleich zu *Nlrp3* WT sham 96 Stunden nach Operation um 17,6% ($p < 0.01$) erniedrigt. Dieser Effekt wurde in *Nlrp3* KO Tieren nicht beobachtet (Abbildung 22C).

Es zeigte sich 96 Stunden nach Operation eine CLP-induzierte generelle Zunahme der auf die Tibialänge normalisierten Milzgewichte, die im *Nlrp3* KO Genotyp verstärkt war (Abbildung 22D). Das Milzgewicht der *Nlrp3* WT CLP-operierten Mäuse

7. Ergebnisse

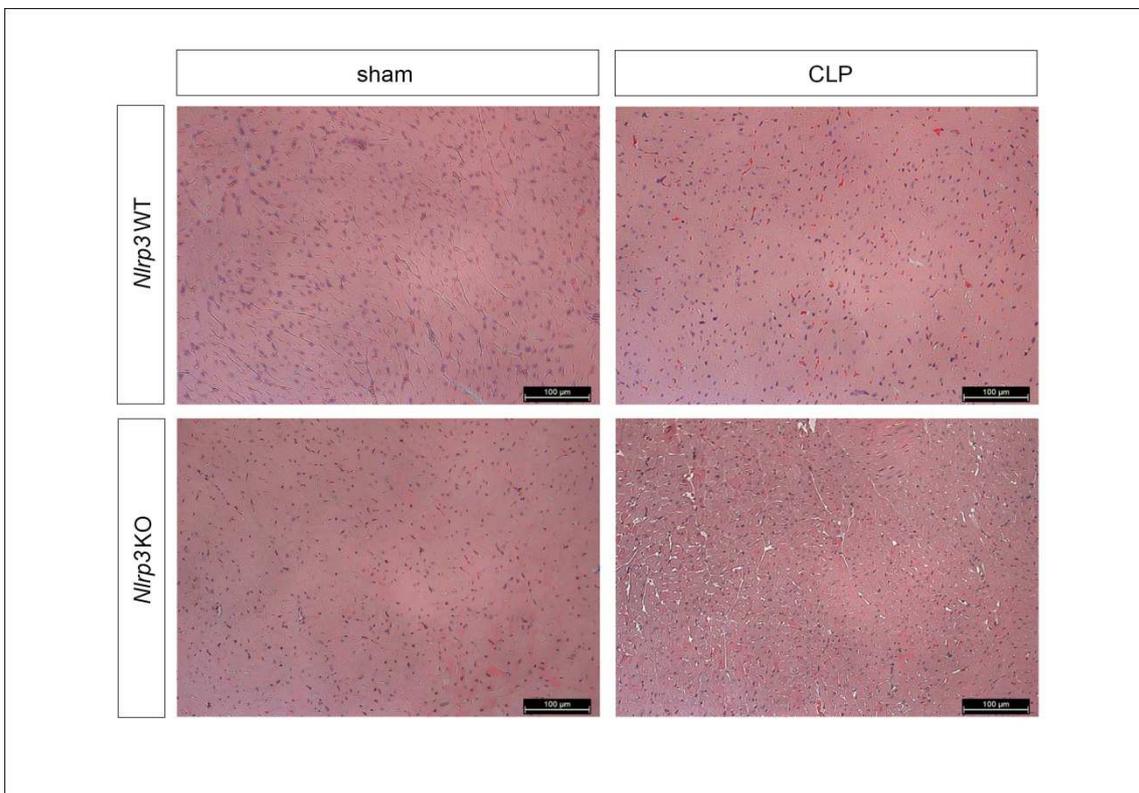
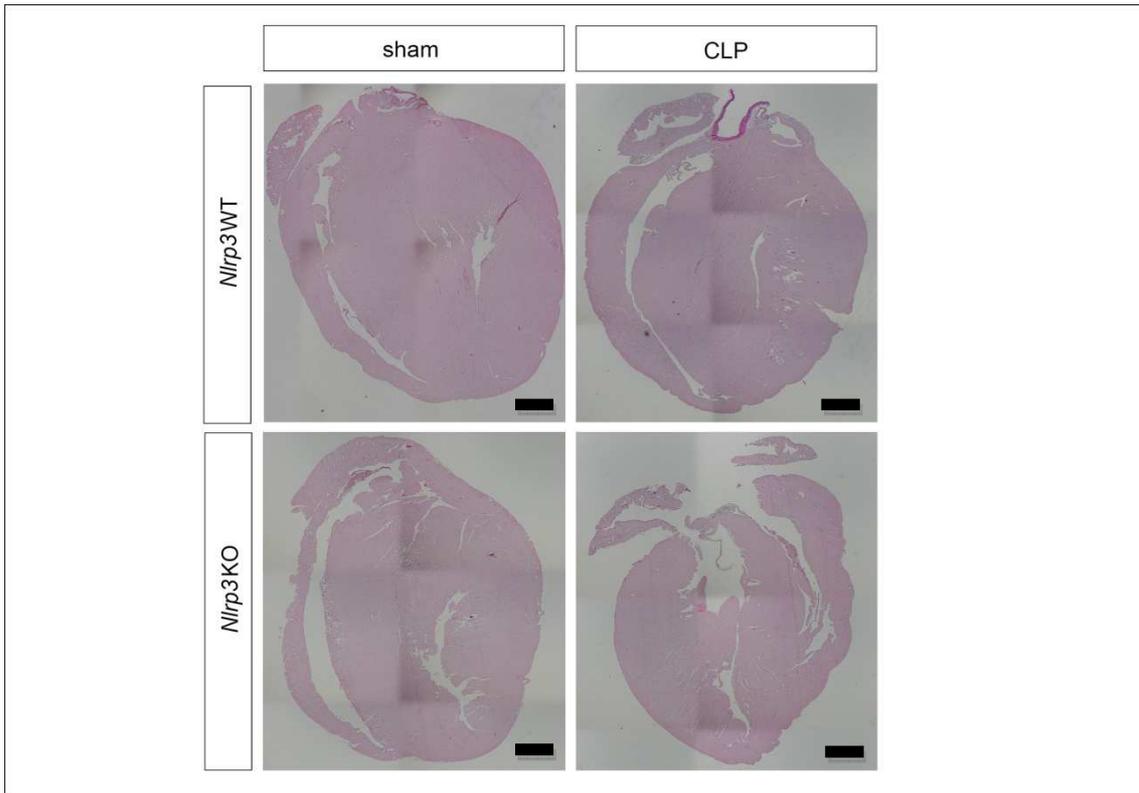
war um 15,7% gegenüber der sham-operierten Mäuse erhöht. In der Gruppe der *Nlrp3* KO Mäuse erhöhte sich das Milzgewicht der CLP-operierten Mäuse um 77,6% signifikant ($p < 0.001$). Die prozentuale Zunahme des Milzgewichtes in der Gruppe der CLP-operierten *Nlrp3* WT Mäuse war gegenüber der *Nlrp3* KO Mäuse signifikant ($p < 0.001$).

7.2.4. Histologie

In den histologischen Färbungen der Gewebeschnitte der Herzen von sham- und CLP-operierten *Nlrp3* WT oder *Nlrp3* KO Mäusen waren nach 96 Stunden keine morphologischen Auffälligkeiten und keine Unterschiede zwischen den Genotypen und den Behandlungsgruppen festzustellen. Im Speziellen zeigten die HE-Färbungen weder im 4-Kammerschnitt noch in den Übersichtsaufnahmen Nekrosen oder Entzündungen (Abbildung 23A). Mithilfe der Trichrom-Färbung wurden die Gewebeschnitte hinsichtlich einer Erhöhung von kollagenen Fasern untersucht. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede in den unterschiedlichen Genotypen. Eine durch Sepsis induzierte Fibrosierung konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 23B).

7. Ergebnisse

A



7. Ergebnisse

B

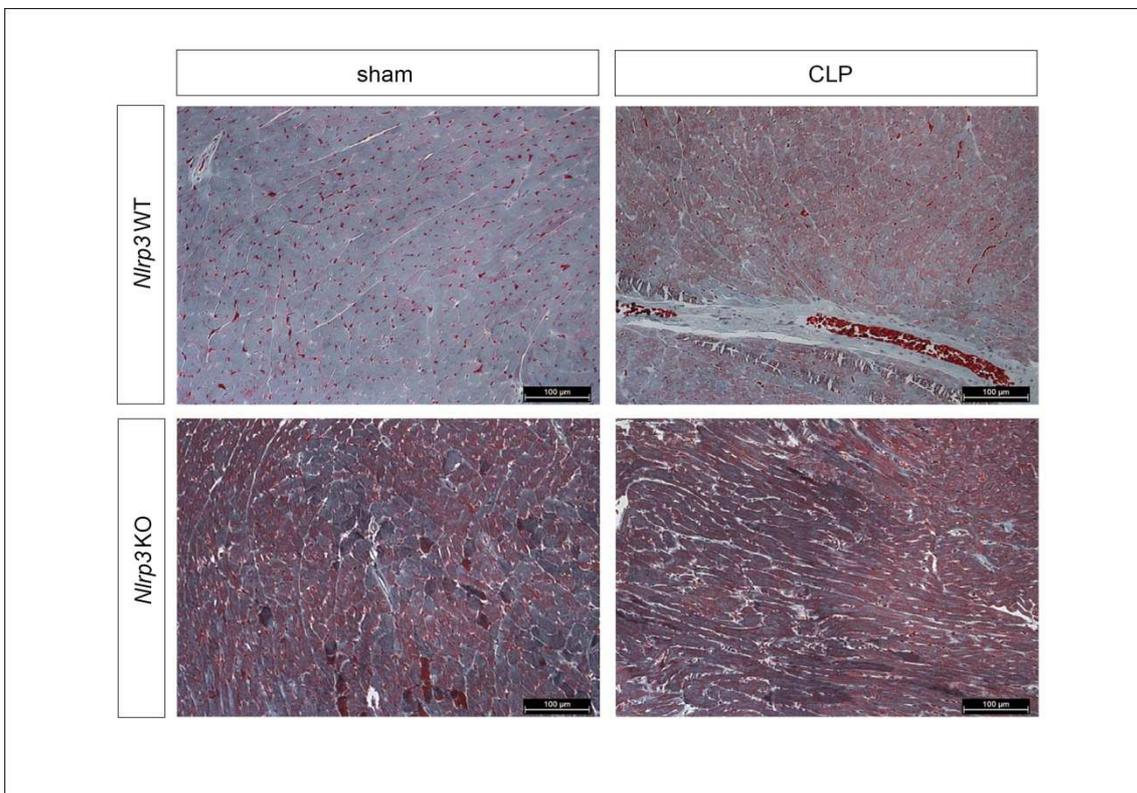
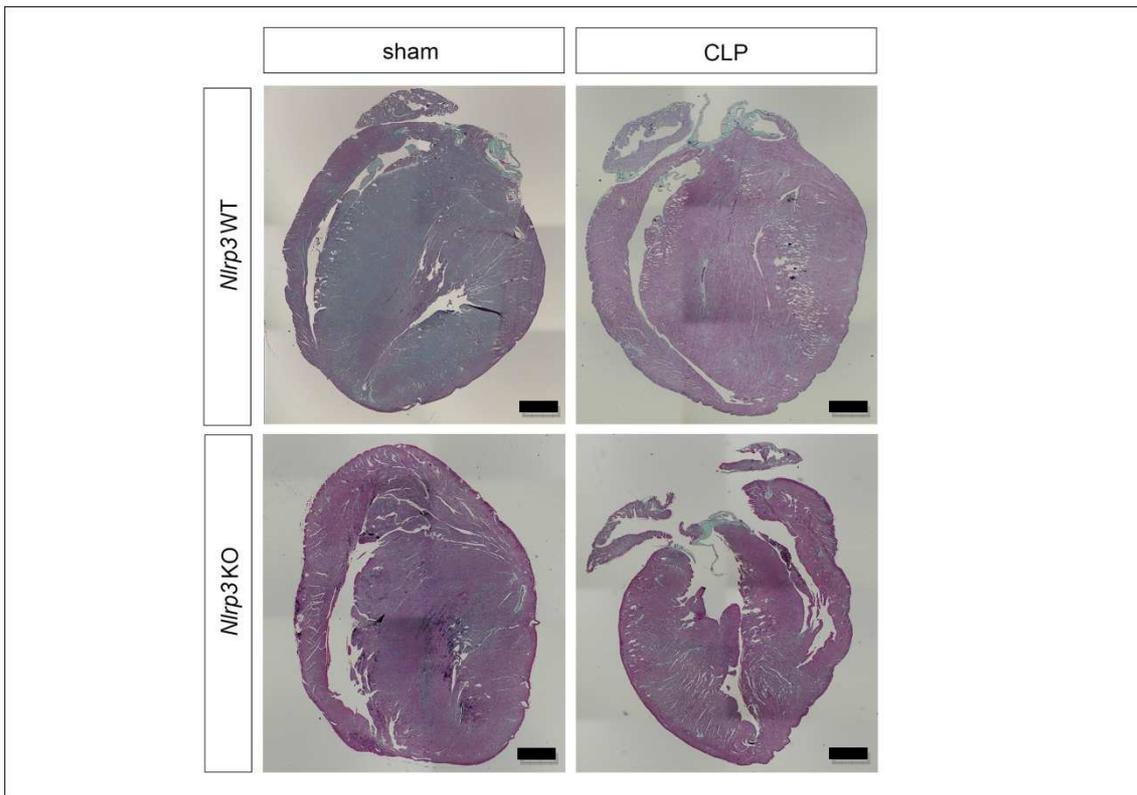


Abbildung 23: Die CLP-induzierte Sepsis zeigt 96h nach Operation (sham/CLP) keine histologischen Veränderungen des Herzgewebes in den *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen.

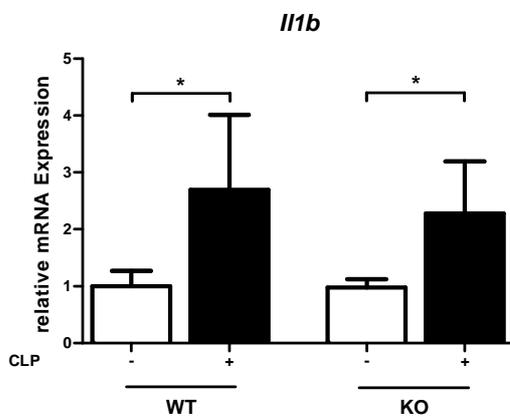
7. Ergebnisse

Hämatoxylin-Eosin- (A) und Trichrom-Färbung (B) von histologischen Schnitten der Herzen von *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen, eingebettet in Paraffin als 4-Kammerschnitt, Maßstab 300 µm, und als Übersichtsaufnahme, Maßstab 100 µm.

7.2.5. Die Expression von *Il1b* und *Il6* ist im Herzen septischer Mäuse gesteigert

Um zu untersuchen, ob die systemische Inflammation in der Sepsis auch zu einer veränderten Expression inflammatorischer Zytokine im Herzen führt, wurde die *Il1b* und *Il6* mRNA Expression mittels qRT-PCR im Herzen der Versuchstiere gemessen. Die kardiale *Il1b* mRNA Expression war bei den CLP-operierten Mäusen der *Nlrp3* WT Gruppe und der *Nlrp3* KO Gruppe je etwa zwei- bis dreifach erhöht ($p < 0.05$). Einen Unterschied in der *Il1b* Expression zwischen den CLP-operierten *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Tieren zeigte sich nicht (Abbildung 24A). Die *Il6* mRNA Expression war in der Gruppe der CLP-operierten *Nlrp3* WT Mäuse signifikant ($p < 0.05$) erhöht und in den CLP-operierten *Nlrp3* KO Mäusen unverändert. Die CLP induzierte *Il6* mRNA Expression war bei den unterschiedlichen Genotypen nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 24B).

A



B

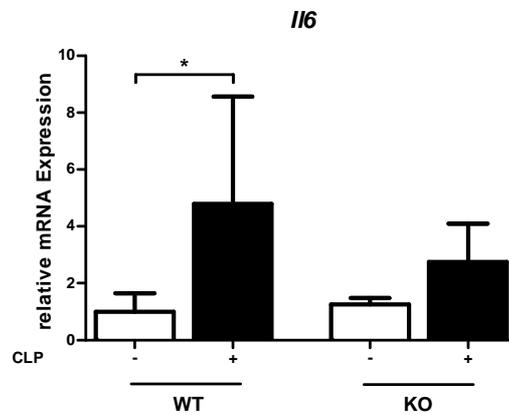


Abbildung 24: Die CLP-induzierte Sepsis führt 96h nach Operation (sham/CLP) zu einer Erhöhung der Expression von *Interleukin-1β* (*IL1b*); *Interleukin-6* (*Il6*) ist nur in *Nlrp3* WT nach CLP-Operation erhöht.

Für die Analyse der mRNA Expression im Herzmuskel der *Nlrp3* WT (WT) und der *Nlrp3* KO (KO) Mäuse, sham (-) und CLP (+), von *IL1b* (A) und *Il6* (B) wurde die qRT-PCR herangezogen und anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert. Alle Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, * $p < 0.05$. Die eingeschlossene Gruppengröße beträgt für WT sham $n=6$, WT CLP $n=6$ (*IL-6* $n=5$), KO sham $n=4$, KO CLP $n=5$.

7. Ergebnisse

Für die nähere Analyse der kardialen Stressantwort, wurde die *Nppa* und *Nppb* mRNA Expression mittels qRT-PCR quantifiziert.

Die kardiale *Nppa* mRNA Expression war in der Gruppe der CLP-operierten *Nlrp3* WT Mäuse verglichen mit den sham-operierten *Nlrp3* WT Mäusen signifikant ($p < 0.001$) reduziert. In der Gruppe der *Nlrp3* KO Mäuse gab es zwischen den CLP- und sham-operierten Mäusen keinen signifikanten Unterschied der *Nppa* mRNA Expression. Die *Nppa* mRNA Expression der CLP-operierten *Nlrp3* WT Mäuse war signifikant gegenüber den CLP-operierten *Nlrp3* KO Mäuse ($p < 0.01$) reduziert (Abbildung 25A).

Die *Nppb* Expression war in beiden experimentellen Gruppen unverändert (Abbildung 25B).

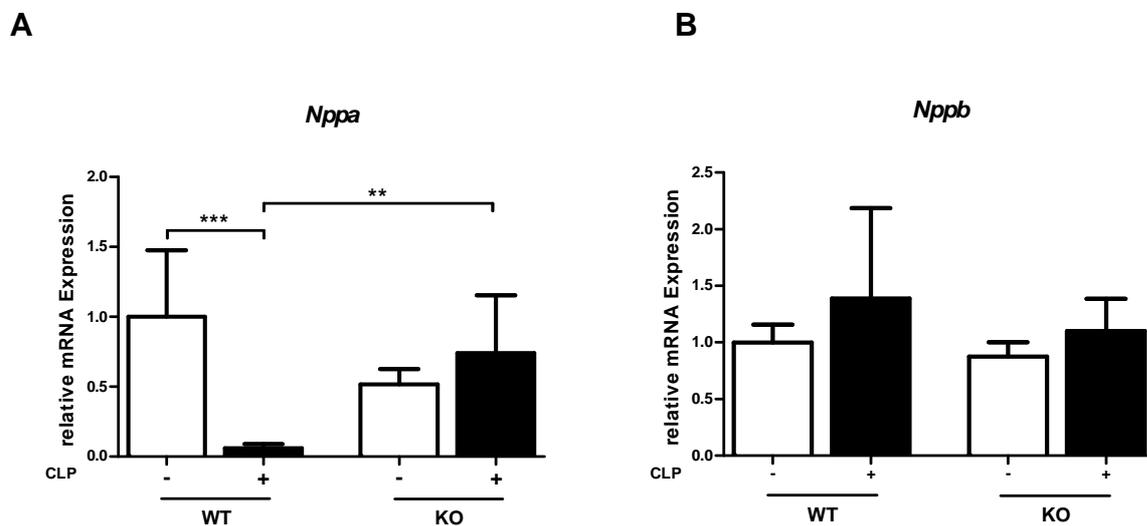


Abbildung 25: *Nppa* und *Nppb* mRNA Expression 96h nach CLP-induzierter Sepsis (sham/CLP) in *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen.

Darstellung der mRNA Expression von *Nppa* (A) und *Nppb* (B) im Herzmuskel der *Nlrp3* WT (WT) und der *Nlrp3* KO (KO) Mäuse als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Zu sehen sind sham (-) und CLP (+) operierte Mäuse. Die Analyse erfolgte mithilfe der qRT-PCR und wurde anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Die eingeschlossene Gruppengröße beträgt für WT sham $n=7$, WT CLP $n=7$, KO sham $n=4$, KO CLP $n=5$.

Die Auswirkungen der polymikrobiellen Sepsis auf die myokardiale *MyH6* und *MyH7* Expression wurde mithilfe der qRT-PCR gemessen. Die myokardiale *MyH6* Expression war in den CLP-operierten *Nlrp3* WT Mäusen gegenüber den sham-operierten *Nlrp3* WT Mäusen signifikant reduziert ($p < 0.001$) (Abbildung 26A). In den Herzen der *Nlrp3* KO Mäuse hatte die Sepsis keinen Einfluss auf die *MyH6* Expression. Die *MyH6* mRNA Expression war in den Herzen von septischen *Nlrp3*

7. Ergebnisse

KO Mäusen signifikant höher als in den septischen *Nlrp3* WT Mäusen ($p < 0.001$) (Abbildung 26A).

Die *MyH7* Expression war in den Herzen der septischen *Nlrp3* WT Mäuse im Vergleich zu den sham behandelten *Nlrp3* WT Tieren signifikant erhöht ($p < 0.001$) (Abbildung 26B). Die CLP Operation führte auch in den *Nlrp3* KO Mäusen zu einer signifikanten Steigerung der kardialen *MyH7* Expression ($p < 0.01$). Die *MyH7* Expression war in den CLP-operierten *Nlrp3* KO Mäusen höher als in den CLP-operierten *Nlrp3* WT Mäusen ($p < 0.01$) (Abbildung 26B).

Western Blot Analysen, bei denen anti-Myosin Antikörper (gegen langsames Myosin gerichtet; *MyH7*, *Myosin slow*) verwendet wurden, konnten die Expressionsdaten bestätigen (Abbildung 27A/27B). In den sham-operierten *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen konnte kein langsames Myosin nachgewiesen werden. Allerdings resultierte die CLP-Operation bei beiden Genotypen in einem starken Anstieg des langsamen Myosins in den Herzen der septischen Versuchstiere. Einen Unterschied im kardialen Myosinproteingehalt (Myosin fast) zwischen den beiden CLP-operierten Genotypen konnte nicht gemessen werden (Abbildung 27).

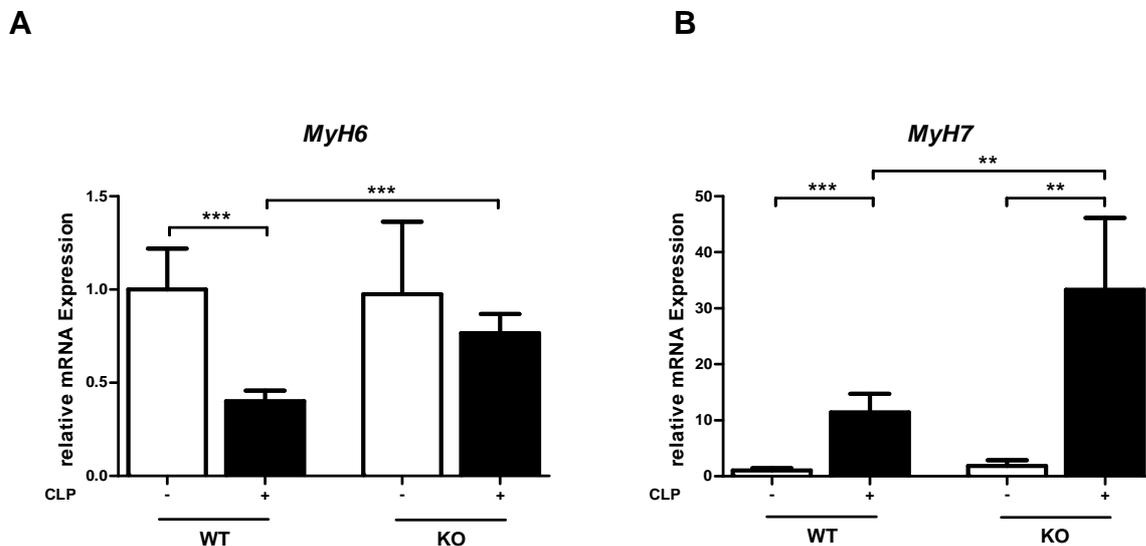
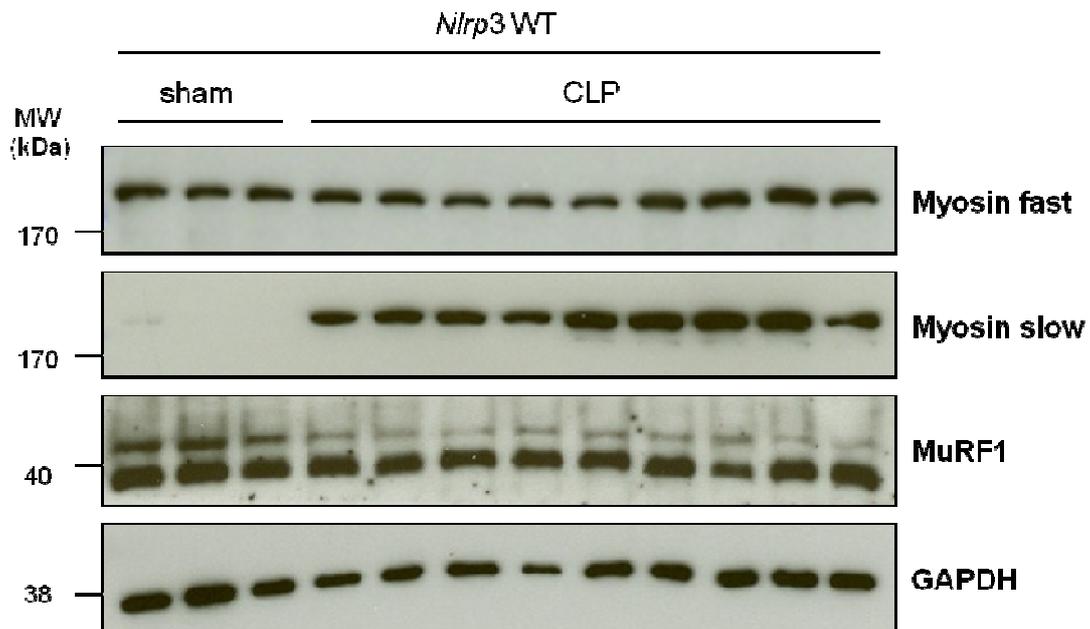


Abbildung 26: Die CLP-induzierte Sepsis führt 96h nach Operation (sham/CLP) zu einer veränderten mRNA Expression von *Myosin heavy chain 6 (MyH6)* und *Myosin heavy chain 7 (MyH7)* in *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen.

Die mRNA Expression im Herzmuskel der *Nlrp3* WT (WT, sham (-) und CLP (+)) und der *Nlrp3* KO (KO, sham (-) und CLP (+)) Mäuse von *MyH6* (A) und *MyH7* (B) wurde mithilfe der qRT-PCR ermittelt und anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert. Alle Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Die eingeschlossene Gruppengröße beträgt für WT sham $n = 7$, WT CLP $n = 7$, KO sham $n = 4$, KO CLP $n = 5$.

7. Ergebnisse

A



B

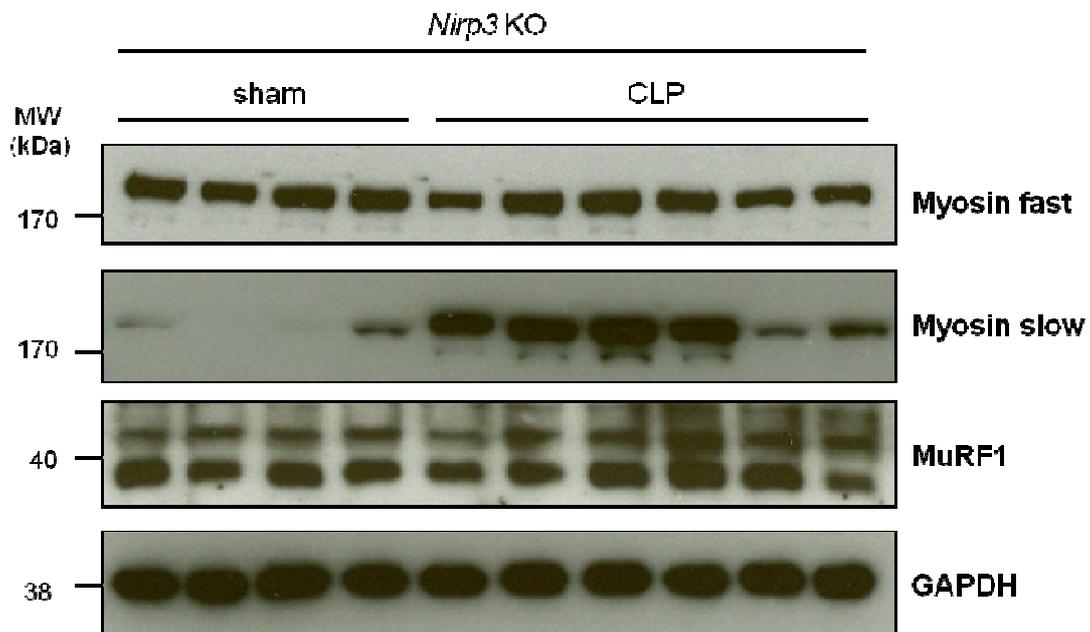
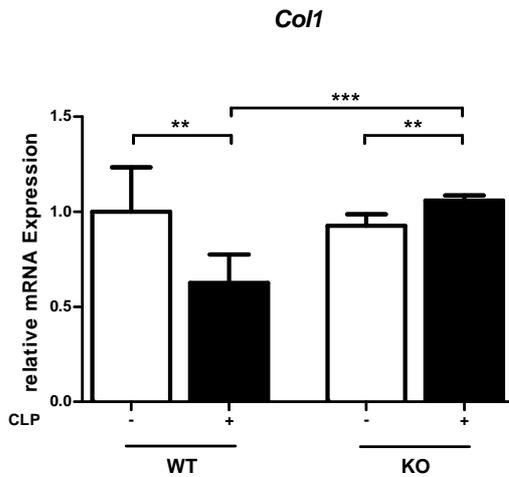


Abbildung 27: Die CLP-induzierte Sepsis führt 96h nach Operation (sham/CLP) zu erhöhten Proteinmengen von Myosin slow in den Herzen von *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen.

Western Blot der operierten (sham/CLP) *Nlrp3* WT Mäuse (A) und *Nlrp3* KO Mäuse (B). Zu sehen sind die Proteinmengen von Myosin fast, Myosin slow und MuRF1. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. MW, *molecular weight*, kDa, Kilo Dalton.

7. Ergebnisse

A



B

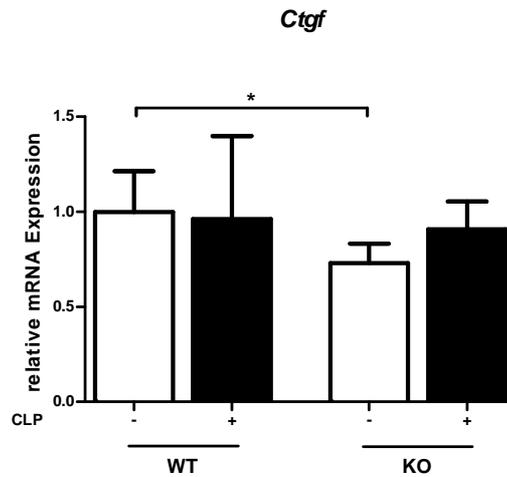


Abbildung 28: Die CLP-induzierte Sepsis verändert 96h nach Operation (sham/CLP) die mRNA Expression von *Col1* und *Ctgf* in *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen unterschiedlich.

Die Analyse der mRNA Expression im Herzmuskel der sham (-) und CLP (+) *Nlrp3* WT (WT) und der *Nlrp3* KO (KO) Mäuse von *Col1* (*Collagen1*) (**A**) und *Ctgf* (*connective tissue growth factor*) (**B**) erfolgte mithilfe der qRT-PCR. Die mRNA wurde anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert. Alle Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Die eingeschlossene Gruppengröße beträgt für WT sham $n=6$, WT CLP $n=7$, KO sham $n=4$, KO CLP $n=5$.

Für die Beurteilung myokardialer Umbauprozesse waren ebenfalls *Collagen1* (*Col1*) und *Connective Tissue Growth Factor* (*Ctgf*) von Bedeutung, deren Expression mithilfe der qRT-PCR gemessen wurde.

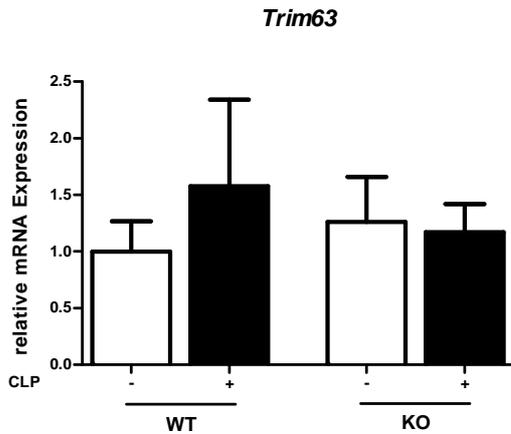
Die *Col1* Expression war in den CLP-operierten *Nlrp3* WT Mäusen verglichen mit den sham-operierten *Nlrp3* WT Mäusen signifikant verringert ($p < 0.01$). Im Gegensatz dazu führte die CLP-Operation bei den *Nlrp3* KO Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der *Col1* mRNA Expression ($p < 0.01$). Die *Col1* mRNA Expression war in den Herzen von septischen *Nlrp3* KO Mäusen signifikant höher als in den septischen *Nlrp3* WT Mäusen ($p < 0.001$) (Abbildung 28A).

Die *Ctgf* mRNA Expression war geringer in der Gruppe der sham-operierten *Nlrp3* KO Mäuse verglichen mit den sham-operierten *Nlrp3* WT Mäusen (Abbildung 28B).

Innerhalb der experimentellen Gruppen zeigte sich kein Einfluss der CLP-Operation auf die myokardiale *Ctgf* Expression (Abbildung 28B).

7. Ergebnisse

A



B

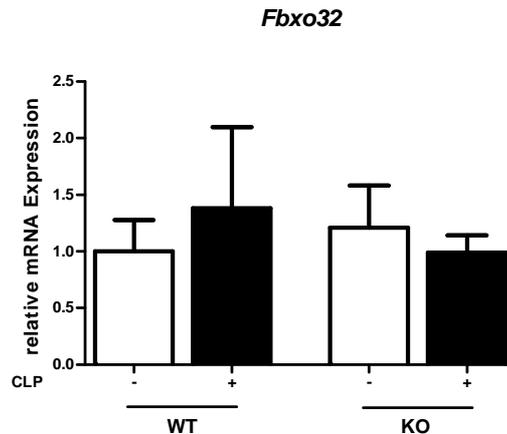


Abbildung 29: Die CLP-induzierte Sepsis führt 96h nach Operation (sham/CLP) zu keiner Veränderung der mRNA Expression von *Trim63* und *Fbxo32* in *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen.

Die mRNA Expression im Herzmuskel der sham (-) und CLP (+) *Nlrp3* WT (WT) und der *Nlrp3* KO (KO) Mäuse von *Trim63* (A) und *Fbxo32* (B) wurde mithilfe der qRT-PCR ermittelt und anhand von *GAPDH* mRNA Werten normalisiert. Alle Angaben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die eingeschlossene Gruppengröße beträgt für WT sham n=7, WT CLP n=7, KO sham n=4, KO CLP n=6.

Um zu testen, ob die kardiale Atrophie durch eine unterschiedliche *Trim63* Expression oder *Fbxo32* Expression vermittelt wurde, wurden beide Gene mittels qRT-PCR quantifiziert. Diese Analysen zeigten, dass weder der Genotyp noch die Behandlung einen Einfluss auf die kardiale *Trim63* (Abbildung 29A) oder *Fbxo32* (Abbildung 29B) Expression hatte.

Auch die Western Blot Analyse zeigte, dass der MuRF1 Proteingehalt weder durch den Genotyp noch durch die Behandlung beeinflusst wurde (Abbildung 27).

7.2.6. Die RNA Analyse durch Sequenzierung weist auf eine Aktivierung von Autophagiegengen in Herzen septischer Mäuse hin

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, welche Gene in der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie involviert sein könnten, haben wir eine RNA Sequenzierung von RNA durchgeführt, die aus den Herzen der einzelnen Versuchstiere isoliert wurde. Hierfür wurden für die Gruppen *Nlrp3* WT sham, *Nlrp3* WT CLP, *Nlrp3* KO sham und *Nlrp3* KO CLP 3 biologische Replikate sequenziert und 3 Sequenzierungsabläufe durchgeführt, welche jeweils mit einem Replikat jedes Probenotyps gemultiplext wurden. Die nähere Analyse dieser Daten zeigte eine Anreicherung von Autophagiegengen in den Herzen der septischen *Nlrp3* WT

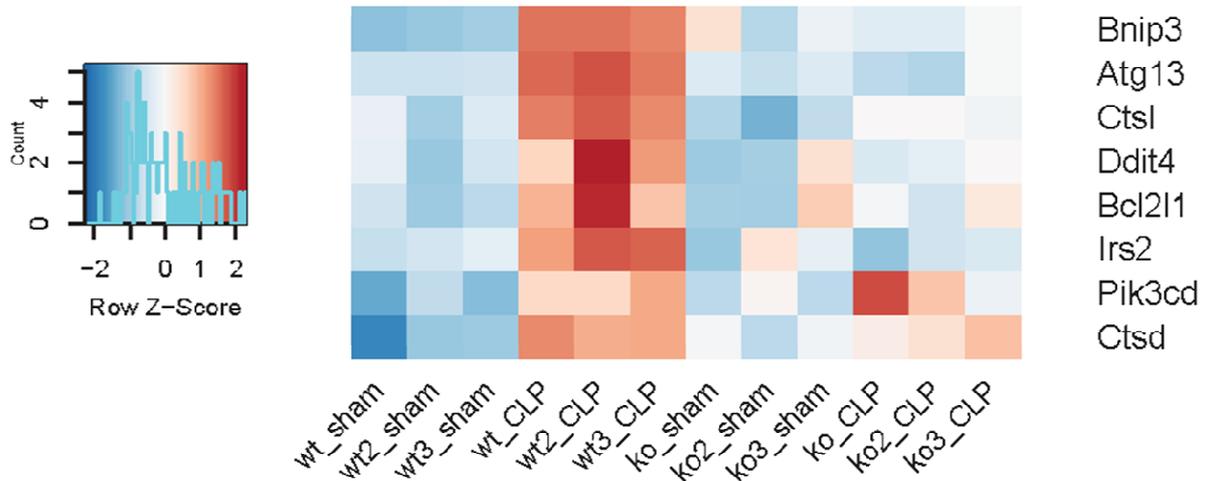
7. Ergebnisse

Mäusen, welche deutlich geringer bzw. nicht in den Herzen der septischen *Nlrp3* KO Tiere angereichert waren (Abbildung 30A).

Autophagie ist ein wichtiger intrazellulärer Prozess in eukaryotischen Zellen zur Kontrolle der Qualität und Quantität von zelleigenen Bestandteilen, welcher zum Überleben einer Zelle aktiviert wird. Infektionen oder Hypoxie sind bekannte Aktivatoren zum Abbau von fehlgefalteten Proteinen oder beschädigten Zellorganellen via Autophagie. So war beispielsweise *Bcl2 interacting protein 3* (*Bnip3*, BCL2 Interaktionsprotein 3), ein wesentlicher Regulator der mitochondrialen Funktion sowie des Zelltods von ventrikulären Myozyten, in Herzen von septischen *Nlrp3* WT Mäusen vermehrt exprimiert (Regula et al., 2002; Zhang et al., 2009). Eine vermehrte *Bnip3* Expression war in den Herzen septischer *Nlrp3* KO Mäuse nicht nachweisbar. Ebenso konnte eine erhöhte Genexpression des *Autophagy-related protein 13* (*Atg13*; Autophagie-verwandtes Protein 13), bekannt für die Bildung des Autophagosoms (Mercer et al., 2009), in den Herzen septischer *Nlrp3* WT Mäuse, jedoch nicht in denen der *Nlrp3* KO Mäuse gemessen werden. Des Weiteren wurde eine gesteigerte Cathepsin L (*Ctsl*) Expression, dass am lysosomalen Abbau, der Nekrose von Myofibrillen und an der myokardialen Ischämie beteiligt ist (Kominami et al., 1987; Tsuchida et al., 1986), in septischen *Nlrp3* WT Herzen, aber nicht in septischen *Nlrp3* KO Herzen gefunden (Abbildung 30A).

7. Ergebnisse

A



B

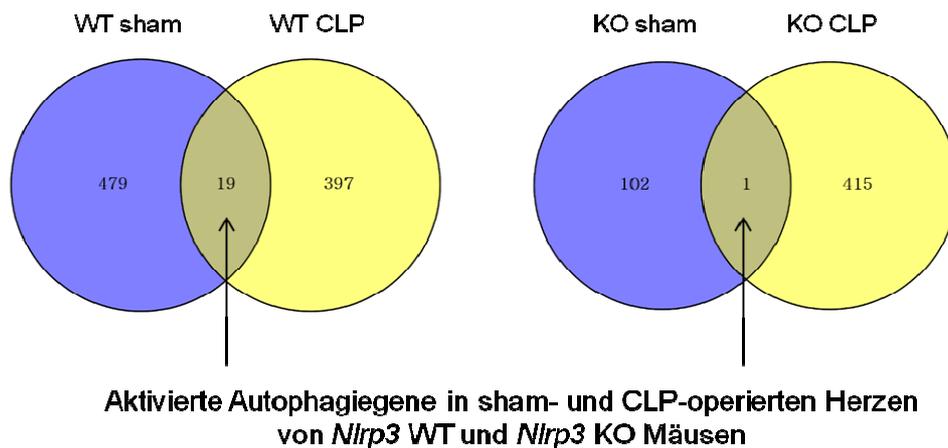


Abbildung 30: Sepsis-induzierte Autophagie ist in *Nlrp3* KO Herzen verringert.

Die RNA-Sequenzierung erfolgte mithilfe der IonTorrent Proton Sequenztechnologie. Für jede Gruppe (WT sham, WT CLP, KO sham, KO CLP) wurden 3 Replikate sequenziert.

A Heatmap der Autophagogene in Herzen nach sham- und CLP-Operation. Bnip3 (*BCL2 Interacting Protein 3*, BCL2 Interaktionsprotein 3), Atg13 (*Autophagy-related protein 13*, Autophagie-verwandtes Protein 13), Ctsl (Cathepsin L), Ddit4 (*DNA Damage Inducible Transcript 4*, DNA Schaden induzierbares Transkript), Bcl2l1 (*BCL2 Like 1*, BCL2 ähnliches 1), Irs2 (Insulin Rezeptor Substrat 2), Pik3cd (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Delta*, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat 3-Kinase katalytische Untereinheit Delta), Ctsd (Cathepsin D).

B Darstellung der aktivierten Autophagogene in Herzen von *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen. Aktiviert Autophagogene in *Nlrp3* WT sham und *Nlrp3* WT CLP Mäusen lag bei 19, die der *Nlrp3* KO sham und *Nlrp3* KO CLP Mäuse bei 1.

8. Diskussion

Die inflammatorische Kardiomyopathie stellt eine schwerwiegende Erkrankung im Rahmen einer Sepsis dar (Charpentier et al., 2004; Kakihana et al., 2016; Parrillo et al., 1990; Poelaert et al., 1997). Die globale ventrikuläre Dysfunktion sowie die Dilatation des linken Ventrikels ohne Wandbewegungsstörungen (Sato und Nasu, 2015) mit resultierender Abnahme der Ejektionsfraktion beschreiben kardiale Auswirkungen einer inflammatorischen Immunreaktion. Dabei spielt vor allem das angeborene Immunsystem mit Aktivierung des NaLP3-Inflammasoms und die dadurch hervorgerufene IL-1 β Aktivierung eine entscheidende Rolle (Bracey et al., 2013; Fisher et al., 1994; Hosenpud et al., 1989; Kumar et al., 1996). Inwieweit das Fehlen von NaLP3 und die daraus resultierende Verringerung der IL-1 β Spiegel Auswirkungen auf die myokardiale Funktion sowie den Herzmuskel hat, soll Gegenstand der Diskussion sein.

8.1. Interleukin-1 β (IL-1 β) induziert Atrophie *in vitro*

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist maßgeblich an der Regulierung einer Immunreaktion nach Erkennung von pathologischen Erregern beteiligt. Pathologische Erreger (Bakterien und Viren) mit ihren PAMPs, sowie der Wirtschaden mit Freisetzung von DAMPs (z.B. Harnsäure) initiieren eine immunologische Reaktion mit Aktivierung des NaLP3-Inflammasoms (Duncan et al., 2007; Kanneganti et al., 2006; Mariathasan et al., 2006; McGilligan et al., 2013). Durch proteolytische Spaltung via Caspase1 wird das inaktive pro-IL-1 β in das aktive IL-1 β überführt. NaLP3 ist somit für die Aktivierung von IL-1 β von essenzieller Bedeutung. Ist IL-1 β aktiviert, können weitere immunologische Antworten des Organismus, wie die Synthese anderer Zytokine (z.B. IL-6), eine erneute Aktivierung von NaLP3 oder die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der für die Regulation der Immunantwort, der Zellproliferation und der Apoptose einer Zelle von Bedeutung ist (Weber et al., 2010), erfolgen. Eine gesteigerte Expression von *Nlrp3* und *Il6* durch IL-1 β konnte hier *in vitro* nachgewiesen werden. Nach Differenzierung von H9c2 Rattenkardiomyozyten (Abbildung 9), führte die Behandlung mit IL-1 β zur gesteigerten *Nlrp3* und *Il6* Expression (Abbildung 12A/12B). Dieses Resultat zeigt, dass der IL-1 β Signalweg in H9c2 Zellen vorhanden und funktionell aktiv ist. Die Anwesenheit von IL-1 β hat negative Auswirkungen auf die Kontraktionsfähigkeit von Myozyten (Hosenpud et al.,

8. Diskussion

1989; Kumar et al., 1996). Kardiale Dysfunktionen wie die Abnahme der Ejektionsfraktion, Wandbewegungsstörungen oder die Dilatation des Ventrikels sind Folgen einer Sepsis mit erhöhten IL-1 β Werten (Kakahana et al., 2016; Sato und Nasu, 2015). Unklar ist, ob eine Herzmuskelatrophie zu diesen Funktionseinschränkungen beiträgt. Die Behandlung von H9c2 Myotuben mit IL-1 β bewirkte deren Atrophie *in vitro*. Dabei scheint die Atrophie der Kardiomyozyten dosisabhängig zu sein. In der immunzytochemischen Färbung ließen sich auch Veränderungen der Myozytenstruktur, hier durch eine veränderte Lokalisation von Myosin fast und α -actin dargestellt, nachweisen (Abbildung 11A/11B). Die hier gezeigte Atrophie in H9c2 Myotuben stimmt mit den *in vitro* Daten von C2C12 Myotuben und den *in vivo* Ergebnissen der Skelettmuskulatur in *Nlrp3* WT Mäusen unter septischen Bedingungen überein (Huang et al., 2017). Li et al. konnten 2009 in C2C12 Myotuben den IL-1 abhängigen Proteinverlust nachweisen (Li et al., 2009). Da sowohl eine Reduktion des Myotubendurchmessers in H9c2 Myotuben als auch strukturelle Veränderungen beobachtet wurden (Abbildung 10/11), stellte sich die Frage, ob das Zytokin IL-1 β die Proteinmengen von Myosinen verändern kann und ob die Menge an IL-1 β das Ausmaß der Proteinveränderungen beeinflusst. Die Western Blot Analysen der mit IL-1 β -behandelten H9c2 Myotuben zeigten die konzentrationsabhängige Abnahme der Myosin-Protein-Gehalte (Abbildung 12C).

Dieser Proteinverlust könnte durch die IL-1 abhängige Aktivierung des NF- κ B Signalwegs und die damit einhergehende erhöhte Expression von MuRF1 und Atrogin1 bedingt sein, wie bereits in C2C12 Myotuben gezeigt (Li et al., 2009). Unklar ist jedoch, ob MuRF1 ebenso an der Regulierung der kardialen Myozytengröße und Kontraktilität beteiligt ist. Bisher ist bekannt, dass der MuRF1 Proteingehalt im hypertrophen Herzmuskel erhöht ist (Willis et al., 2009). In H9c2 steigerte IL-1 β weder die *Trim63* Expression, noch den MuRF1 Proteingehalt (Abbildung 13-15). Ebenso wurde die subzelluläre Lokalisation von MuRF1 durch IL-1 β nicht beeinflusst (Abbildung 11C).

Damit ist bisher ungeklärt, wie die IL-1 β -abhängige Abnahme der Myosine und des Myotubendurchmessers in H9c2 Kardiomyozyten erfolgt. Eine Erklärung wäre, dass durch die IL-1 β -abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, Zielgene wie *Il6* oder *Tnfa*, aber auch zahlreiche andere aktiviert werden (Weber et al., 2010), die möglicher Weise eine Rolle in der Myozytenatrophie spielen. Daher sind weitere

8. Diskussion

Untersuchungen des NF- κ B Signalwegs in H9c2 Kardiomyozyten in Abhängigkeit von IL-1 β denkbar. Es wären auch Untersuchungen sinnvoll, bei denen der IL-1 β Signalweg (z.B. durch den IL-1 β Rezeptor Antagonist Anakinra) gehemmt wird. Anakinra verhindert die Bindung von IL-1 (IL- α und IL- β) an dessen Rezeptor. Sollte die durch IL-1 β induzierte Myotubenatrophie über den IL-1 Rezeptor vermittelt werden, so müsste Anakinra diesen Effekt reduzieren oder verhindern.

8.2. Überlebensrate der *Nlrp3* KO Mäuse gegenüber *Nlrp3* WT Mäusen nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis

Für die Untersuchung der inflammations-vermittelten Herzmuskelatrophie in Abhängigkeit vom NaLP3-Inflammasom *in vivo* wurde in erwachsenen *Nlrp3* WT Mäusen und *Nlrp3* KO Mäusen das Sepsismodel angewendet. Nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis wurde die Überlebensrate nach 96 Stunden in der Gruppe der *Nlrp3* WT Mäuse und in der Gruppe der *Nlrp3* KO Mäuse ermittelt. Hier zeigte sich ein besseres Überleben der CLP-operierten *Nlrp3* KO Mäuse gegenüber den *Nlrp3* WT Mäusen (Abbildung 18). Zusätzlich zeigte sich eine verringerte inflammatorische Reaktion durch verminderte IL-1 β Spiegel im Serum (hier nicht gezeigt; Huang et al., 2017) sowie eine verringerte inflammations-vermittelte Skelettmuskelatrophie (hier nicht gezeigt; Huang et al., 2017). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Fehlen der IL-1 β Produktion über das NaLP3-Inflammasom die Überlebenswahrscheinlichkeit in der Sepsis steigert. Es ist anzunehmen, dass Prozesse wie beispielsweise die Aktivierung von weiteren Zytokinen wie IL-6 (Abbildung 24B), die Produktion von Prostaglandinen oder NO reduziert werden und somit das Auftreten einer kardialen Dysfunktion verringern. Andere Studien untersuchten bereits das Auftreten einer Sepsis-induzierten kardialen Dysfunktion (Charpentier et al., 2004; Kakahana et al., 2016; Parrillo et al., 1990; Poelaert et al., 1997). Dabei sind kardiovaskuläre Dysfunktionen bei septischen Patienten mit einer 70-90%igen Mortalitätsrate verglichen mit Patienten ohne kardiovaskulären Dysfunktionen (hier besteht eine 20%ige Mortalitätsrate) assoziiert (Parrillo et al., 1990). Unter septischen Bedingungen scheint einer der wesentlichen Faktoren für die kardiale Dysfunktion die adrenerge Antwort der Kardiomyozyten mit einer verminderten Produktion von β -adrenergen Rezeptoren und der Herunterregulierung des damit verbundenen Signalwegs zu sein. Diese Veränderungen werden durch Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β , aber auch durch Stickstoffmonoxid hervorgerufen (Kumar et al. 1996; Schulz et al., 1992). Im Zusammenhang dieses Signalweges und

8. Diskussion

der gesteigerten Mortalitätsrate septischer Patienten mit kardiovaskulären Dysfunktionen gehen wir davon aus, dass ein Fehlen von *Nlrp3* und der damit verbundenen IL-1 β Aktivierung in septischen *Nlrp3* KO Tieren zu einer Aufrechterhaltung der Produktion von β -adrenergen Rezeptoren, deren kardialer Funktion und zu einer besseren Überlebensrate führt. Eine Blockierung von IL-1 β zeigt einen Vorteil bei herzinsuffizienten Patienten, einer Ischämie-induzierten Herzinsuffizienz oder bei der inflammatorisch vermittelten kardialen Dysfunktion, wie wir sie auch in den *Nlrp3* KO Tieren beobachten konnten (Bracey et al., 2013; Hwang et al., 2005; Zhang et al., 2014).

8.3. Sepsis-induzierte Abnahme des Körpergewichtes

Die Analyse des Körpergewichtes der Mäuse nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis zeigte, dass septische *Nlrp3* WT Mäuse innerhalb von 96 Stunden mehr Körpergewicht als septische *Nlrp3* KO Mäuse verlieren (Abbildung 20). Ebenso zeigten die septischen *Nlrp3* WT Mäuse signifikante Verluste der Lebergewichte, Lungengewichte, Nierengewichte (Abbildung 22A-22C) und der Skelettmuskulatur (M. gastrocnemius/ plantaris sowie M. tibialis anterior; hier nicht dargestellt; Huang et al., 2017). Dagegen wiesen septische *Nlrp3* KO Tiere keine Abnahme der Lebergewichte, Lungengewichte, Nierengewichte sowie keine signifikante Reduktion der Muskelgewichte auf (M. gastrocnemius/ plantaris sowie M. tibialis anterior; hier nicht dargestellt; Huang et al., 2017). Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Fehlen von *Nlrp3* und der damit verbundenen verminderten IL-1 β Aktivierung in Mäusen die Sepsis-induzierte Muskelatrophie sowie die Masseverluste von Organen verringert. Sepsis-induzierte Organschädigungen, wie beispielsweise die der Leber, waren zumindest histologisch/ grob morphologisch nicht nachweisbar. Bisher ist bekannt, dass die Leber während einer akuten Sepsis vor allem durch das Freisetzen von Zytokinen aus den Kupffer'schen Sternzellen unter einer Funktionsstörung leidet. Diese führt sowohl zu einer Veränderung der Gerinnung als auch zu einer Störung des Kohlenhydrat- und Eiweißstoffwechsels (Szabo et al., 2002). Weitere Untersuchungen wurden dahingehend nicht durchgeführt.

Die hier beobachtete signifikante Zunahme der Milzgewichte der septischen *Nlrp3* WT Mäuse und KO Mäuse kann Hinweise auf die Aktivierung des Immunsystems geben. Wie bereits unter 5.2.1. beschrieben, wird das Inflammasom vorwiegend in

8. Diskussion

Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert (Kummer et al., 2007). Untersuchungen hinsichtlich der NaLP3 Verteilung in Geweben wiesen mit Abstand die höchste *Nlrp3* Expression in der Milz, gefolgt von der Lunge, Leber und den Lymphknoten nach (Guarda et al., 2011). Da die Milz für die Bildung, Reifung und Speicherung der Lymphozyten verantwortlich ist, werden unter septischen Bedingungen die Lymphfollikel der Milz zur Differenzierung und Vermehrung von B- und T-Lymphozyten aktiviert und nehmen an Größe zu. Eine weitere Funktion stellt die Blutreinigung dar. Geschädigte Blutzellen, wie Erythrozyten oder Thrombozyten, aber auch Immunkomplexe werden vermehrt aussortiert, phagozytiert und von Makrophagen abgebaut. Im Vergleich der operierten Mäuse zeigten die *Nlrp3* KO Tiere eine Zunahme der Milzgewichte um 77,6%, die *Nlrp3* WT Tiere nur um 15,7% (Abbildung 22D). Ungeklärt bleibt der signifikante Unterschied zwischen den Gruppen der CLP-operierten Mäuse. Es bedarf weiterer Untersuchungen.

Des Weiteren zeigten unsere Untersuchungen der Effekte von IL-1 β auf den Skelettmuskel, dass IL-1 β zu einer Aktivierung des NF- κ B Signalweges mit einer gesteigerten *Trim63* und *Fbxo32* Expression führt (Huang et al., 2017). Verglichen mit septischen *Nlrp3* WT Mäusen wiesen *Nlrp3* KO Tiere weniger Muskelatrophie und eine geringere *Trim63* und *Fbxo32* Expression auf. Diese Ergebnisse stimmen mit den *in vitro* Experimenten von Li et al. 2009 überein, welche anhand von C2C12 Myotuben den IL-1 abhängigen Proteinverlust durch Aktivierung des NF- κ B Signalwegs und die damit einhergehende Expression von MuRF1 und Atrogin1 nachweisen konnten (Li et al., 2009). *Nlrp3* KO Mäuse sind somit vor einer Sepsis-induzierten Skelettmuskelatrophie geschützt. Unsere früheren Ergebnisse legen nahe, dass dieser Effekt durch *Trim63* und *Fbxo32* vermittelt wird (Huang et al., 2017).

8.4. Abnahme der Herzgewichte unter septischen Bedingungen

Septische *Nlrp3* WT Mäuse zeigten eine signifikante Abnahme der Herzgewichte. Dieser Effekt wurde in septischen *Nlrp3* KO Tieren nicht beobachtet (Abbildung 21). Die Ergebnisse zeigen, dass NaLP3 und die damit verbundene IL-1 β Aktivierung maßgeblich an dem Verlust von Herzmuskelmasse beteiligt ist. In wieweit diese

8. Diskussion

Herzmuskelatrophie in Zusammenhang mit MuRF1 und Atrogin1 steht, soll nachfolgend diskutiert werden.

8.4.1. MuRF1 und Atrogin1 in der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie

Die Proteinhomöostase im Herzmuskel wird durch ein Gleichgewicht von Proteinsynthese und Proteinabbau realisiert. Der Proteinabbau im Herzmuskel wird über das Ubiquitin-Proteasom-System vermittelt; für das Muskelgewebe sind die E3-Ligase MuRF1 und das F-Box Protein Atrogin1 spezifisch (Bodine et al., 2001; Lecker, 2003), welche durch die Gene *Trim63* und *Fbxo32* kodiert werden. Interessanter Weise war die Expression von *Trim63* und *Fbxo32* im Herzmuskel septischer Tiere unverändert (Abbildung 29). Auch der MuRF1 Proteingehalt war in den Herzen septischer Tiere nicht gesteigert (Abbildung 27). Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse der Skelettmuskulatur, in denen ein signifikanter Anstieg der *Trim63* und *Fbxo32* Expression sowie erhöhte MuRF1 Proteinmengen in den septischen *Nlrp3* WT, aber nicht in septischen *Nlrp3* KO Tieren nachweisbar waren (Huang et al., 2017). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die IL-1 β induzierte kardiale Atrophie in der Sepsis und deren Effekte auf Kardiomyozyten unabhängig von MuRF1 und Atrogin1 sind. In der Literatur finden sich bisher keine Studien, die sich mit der Sepsis-induzierten Kardiomyopathie und der MuRF1/Atrogin1 abhängigen Herzmuskelatrophie beschäftigen. Erste Zusammenhänge wurden durch erhöhte TNF- α Spiegel mit resultierender Troponin I Degradierung über MuRF1 und Atrogin1 bei der chronischen Herzinsuffizienz nachgewiesen (Adams et al., 2007). Zusammenfassend implizieren unsere Daten, dass die septische Kardiomyopathie unabhängig von MuRF1 und Atrogin1 ist.

8.6. *Nlrp3* spielt eine Rolle in der inflammations-vermittelten Aktivierung der kardialen Autophagie

In der Herzmuskulatur der septischen *Nlrp3* WT Mäuse zeigte sich eine starke Aktivierung von Autophagie, die in den Herzen der septischen *Nlrp3* KO Mäusen nicht in diesem Maße nachweisbar war (Abbildung 30). Im Zusammenhang mit dem Verlust an Herzmuskelmasse, der fehlenden Induktion prototypischer Autophagiegene und der verminderten Inflammation in den septischen *Nlrp3* KO Mäusen kann geschlussfolgert werden, dass die septische Herzmuskelatrophie vor allem durch Autophagie vermittelt wird und dass *Nlrp3* KO Mäuse davor geschützt sind. Allerdings ist bei dieser Interpretation Vorsicht geboten, da sich diese lediglich

8. Diskussion

auf die fehlende Induktion von 2 Atrophiegenen stützt und andere Gene des Ubiquitin-Proteasom-Systems in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

Autophagie stellt neben dem Ubiquitin-Proteasom-System einen weiteren Mechanismus der Regulation der Proteinhomöostase in einer Zelle dar (Scott et al., 2007). Autophagie ermöglicht es einer Zelle unter Hungerzuständen Aminosäuren bereitzustellen, aber auch fehlgefaltete Proteine, Fremdproteine, Bakterien oder Viren abzubauen. Die Bedeutung der Autophagie wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Autophagie besitzt sowohl schützende Eigenschaften, kann aber auch Vorläufer des Zelltodes sein (Zhang et al., 2017). Die CLP-induzierte polymikrobielle Sepsis führt in verschiedenen Organen wie Leber, Milz, Niere und auch im Herzmuskel zu einer Formierung des Autophagosoms, der erste Schritt der Autophagie (Takahashi et al., 2013). Der Mechanismus der Aktivierung von Autophagiegenen ist bei Infektionen noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint die Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems sowie der pathogeninduzierte Zelltod dabei eine Rolle zu spielen (Glick et al., 2010; Levine et al., 2008; Levine et al., 2011). Die hier gezeigten Ergebnisse deuten auf eine gesteigerte Autophagie in septischen Herzen von *Nlrp3* WT Mäusen hin, deren Folge ein Verlust an Herzmuskelmasse mit systolischer und diastolischer Funktionsstörung ist.

In den Herzen der septischen *Nlrp3* WT Mäuse waren 19 Autophagiegene vermehrt exprimiert. Im Gegensatz dazu war lediglich ein Autophagiegen in den Herzen der *Nlrp3* KO Mäuse hochreguliert (Abbildung 30B). Dieser Unterschied kann durch die reduzierte inflammatorische Immunantwort, insbesondere durch die verminderte Aktivierung von IL-1 β in den *Nlrp3* KO Mäusen erklärt werden, da IL-1 β in der Sepsis Autophagie aktiviert und die Formierung des NaLP3-Inflammasoms initiiert (Levine et al., 2011; Zhang et al., 2017). Für die Aktivierung von Autophagie sind Autophagie-spezifische Gene notwendig. *Atg13*, ein für die Bildung des Autophagosoms und der kardialen Entwicklung notwendiges Gen, welches ebenfalls bei Hungerzuständen aktiviert wird, war in den Herzen der septischen *Nlrp3* WT Mäusen vermehrt exprimiert (Abbildung 30A) (Kaizuka et al., 2016; Mercer et al., 2009; Suzuki et al., 2007). Die vermehrte Expression von *Atg13* weist auf eine gesteigerte Autophagie in Herzen von septischen *Nlrp3* WT Mäusen hin. Akkumulationen von Autophagosomen in gestressten Kardiomyozyten, auch als stress-induzierte Autophagie bekannt, wird durch Hungerprozesse hervorgerufen und geht mit dem Verlust von

8. Diskussion

Herzmuskelmasse in *Nlrp3* WT Mäusen einher (Lavandero et al., 2013). Andere Studien belegen die Beteiligung von Autophagie im Herzen während ischämischer Prozesse (Kubasiak et al., 2002; Regula et al., 2002). In der Herzmuskulatur scheint das Protein *BCL2 Interacting Protein 3* (BNIP3, BCL2 Interaktionsprotein 3) die mitochondriale Funktion und den Zelltod von ventrikulären Myozyten zu regulieren (Regula et al., 2002; Zhang et al., 2009). Diwan et al. bestätigten die Beteiligung von BNIP3 *in vivo* am Zelltod von Kardiomyozyten unter ischämischen Bedingungen. Dabei wiesen *Bnip3* KO Mäuse ein verringertes *remodeling* nach einem Herzinfarkt aufgrund einer verringerten Apoptose von Herzmuskelzellen während der Ischämie auf (Diwan et al., 2007). *Nlrp3* WT Mäuse zeigten eine stark erhöhte *Bnip3* Expression im Herzmuskel (Abbildung 30A). Welche Rolle ischämische Vorgänge bei der Entstehung der septischen Kardiomyopathie spielen, wurde hier nicht untersucht. Neben den bereits genannten Autophagieprozessen in Herzmuskelzellen sind Cathepsine mit ihren lysosomalen Eigenschaften essentiell für die Degradierung von intra- und extrazellulären Proteinen (Wu et al., 2015). In den Herzen der septischen *Nlrp3* WT aber nicht in der *Nlrp3* KO Mäuse war Cathepsin L (*Ctsl*) vermehrt exprimiert (Abbildung 30A). Diese Ergebnisse lassen auf einen gesteigerten Abbau intra- und extrazellulärer Proteine in den Kardiomyozyten septischer *Nlrp3* WT Mäuse schließen. Dabei kann die Erhöhung von *Ctsl* durch Vervollständigung des autophagischen Prozesses ebenso zu einer kardioprotektiven Wirkung in *Nlrp3* WT Mäusen führen, da ein Fehlen von *Ctsl* zu pathomorphologischen, histologischen und funktionellen Herzveränderungen, die der dilatativen Kardiomyopathie ähneln, führen kann (Stypmann et al., 2002).

Zusammenfassend scheint Autophagie nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis in *Nlrp3* WT Mäusen eine wesentliche Rolle im Abbau der Herzmuskelmasse zu spielen und somit für die Herzmuskelatrophie von entscheidender Bedeutung zu sein. Ein Verlust von Herzmuskelmasse, wie sie in septischen *Nlrp3* WT Mäusen vorkommt, konnte in *Nlrp3* KO Mäusen nicht gefunden werden. Insgesamt weisen unsere Daten darauf hin, dass die fehlende Induktion der kardialen Autophagie in *Nlrp3* KO Mäusen vor einer Herzmuskelatrophie schützt.

8.7. Die Rolle von Interleukin-1 β in der Verschiebung der Myosinisoformen α -MHC und β -MHC

Das in Myotuben synthetisierte Protein *Myosin heavy chain* (MHC) des kontraktiven Apparates, welches wesentlich an der Kontraktionsfähigkeit und -kraft beteiligt ist,

8. Diskussion

wird mit den herzspezifischen Isoformen α -MHC und β -MHC durch die Gene *MyH6* und *MyH7* kodiert. In den Herzen der septischen *Nlrp3* WT Mäusen zeigte sich eine signifikante Verringerung der *MyH6* und eine Erhöhung der *MyH7* mRNA Expression (Abbildung 26). Diese Ergebnisse konnten für den entsprechenden Proteingehalt bestätigt werden (Abbildung 27). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bereits in Rattenherzen nach Druckerhöhung in der Aorta durch eine Aortenisthmusstenose, die zu einer Gewichtszunahme des linken Ventrikels führt (Nadal-Ginard und Mahdavi, 1989). Nadal-Ginard und Mahdavi schlussfolgerten, dass eine Induktion von β -MHC durch das hypertrophe Myokard mit unterdrückten α -MHC erfolgt (Nadal-Ginard und Mahdavi, 1989). Später konnte die Verschiebung der Myosinisoformen von α -MHC zu β -MHC auch in menschlichen Herzen bei pulmonaler Hypertonie und der idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie gezeigt werden (Lowes et al., 1997). Die hier gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass unter septischen Bedingungen eine Verschiebung der kardialen Myosinisoformen vorliegt, welche maßgeblich für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz sein könnte (Jones et al., 1996). Dabei scheint die Verringerung der *MyH6* Expression aufgrund der Veränderung der dicken und dünnen Filamentverhältnisse ein wesentlicher Faktor zur Ausbildung einer kardialen Dysfunktion zu sein. Jones et al. wiesen anhand von heterozygoten *MyH6* KO Mäusen einen direkten Zusammenhang zwischen α -MHC und der Entwicklung einer kardialen Dysfunktion und einer Kardiomyopathie mit Hypertrophie und erhöhter interstitiellen Fibrose nach (Jones et al., 1996). Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der septischen *Nlrp3* KO Mäuse. Nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis wiesen die Herzen keine signifikante Verringerung der *MyH6* Genexpression auf. Interessanter Weise zeigte sich jedoch eine signifikante Erhöhung der *MyH7* mRNA Expression und des β -MHC Proteingehaltes (Abbildung 26B/27). Die hier aufgezeigte Bedeutung der *MyH6* Expression erscheint in den *Nlrp3* KO Tieren von untergeordneter Rolle zu sein. Die Erhöhung der *MyH7* Genexpression ohne wesentliche Reduktion der *MyH6* Expression könnte auf einen Kompensationsmechanismus zur Anpassung einer größeren energetischen Effizienz hinweisen. Dabei scheint ein höherer β -MHC Gehalt eine verbesserte Kontraktionsfähigkeit zu erzielen und vor einer Ischämie-induzierten Reduktion der kontraktiven Herzfunktion zu schützen (Hwang et al., 2005). Wie bereits Jones et al. den Zusammenhang von reduzierten α -MHC Werten und kardialer Dysfunktionen nachwiesen, lassen die Ergebnisse der systolischen als auch der diastolischen

8. Diskussion

Dysfunktionen mit reduziertem Schlagvolumen oder den Relaxationsstörungen in septischen *Nlrp3* WT Mäusen auf einen Zusammenhang zwischen reduzierter *MyH6* Expression und kardialer Dysfunktion schließen (Jones et al., 1996). Die reduzierte *MyH6* Expression im Herzmuskel, signifikant reduzierte Herzgewichte oder relevante echokardiographisch nachweisbare Dysfunktionen zeigten sich in CLP-operierten *Nlrp3* KO Mäusen nicht.

8.8. Strukturelle und funktionelle Veränderungen der Herzmuskulatur

Die histologischen Färbungen der Herzschnitte wiesen keine Unterschiede in den einzelnen Gruppen der *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäuse auf (Abbildung 23). Hinsichtlich der Untersuchungen auf myokardiale Fibrose konnten für die mRNA Expression von *Ctgf* (*Connective tissue growth factor*, Abbildung 28B) als auch histologisch keine Unterschiede in den einzelnen Gruppen nach CLP-Operation nachgewiesen werden (Abbildung 23B). Zusammenhängend erscheinen weniger die strukturellen Veränderungen als die funktionellen Veränderungen unter septischen Bedingungen die bessere Überlebensrate der *Nlrp3* KO Tiere zu begründen.

In Hinblick auf die funktionellen Veränderungen in septischen *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Tieren zeigten sich die in der Literatur während der Sepsis beschriebenen systolischen und diastolischen Dysfunktionen in septischen *Nlrp3* WT Mäusen, jedoch nicht in septischen *Nlrp3* KO Tieren. Die kardialen Dysfunktionen scheinen dabei nicht durch eine Hypoperfusion, sondern eher durch die inflammatorische Immunantwort hervorgerufen zu werden (Romero-Bermejo et al., 2011). Eine zunehmende Rolle wird dem NaLP3-Inflammasom sowie dessen Aktivierung von IL-1 β zugeordnet (Zhang et al., 2014). Bisherige Studien zeigten, dass die systolischen und diastolischen Dysfunktionen nach etwa 7 bis 10 Tagen nach Auftreten der Sepsis vollständig reversibel sind (Kakihana et al., 2016; Parrillo et al., 1990). Während der Sepsis überwiegen linksventrikuläre Hypokinesien, aber auch echokardiographisch nachgewiesene systolische und diastolische Dysfunktionen (Charpentier et al., 2004; Poelaert et al., 1997). Aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit von Zytokinen (8 bis 48 Stunden) und der Reversibilität der kardialen Dysfunktionen, wurden die septischen Tiere nach 24 Stunden echokardiographisch untersucht. Das reduzierte Schlagvolumen, der reduzierte LVEDD und LVESD sowie die echokardiographisch gezeigten Relaxationsstörungen der septischen *Nlrp3* WT

8. Diskussion

Mäuse verglichen mit den sham-operierten *Nlrp3* WT Mäusen (Abbildung 19) kann Ausdruck der kardiodepressiven Wirkung von IL-1 β sein (Antonucci et al., 2014; Kakihana et al., 2016; Zhang et al., 2014). Zhang et al. zeigten 2014 anhand von *in vitro* Experimenten die entscheidende Rolle des NaLP3-Inflammasoms und deren Aktivierung von IL-1 β auf die kardiale Dysfunktion und fanden heraus, dass die Hemmung des NaLP3-Inflammasoms die myokardiale Dysfunktion bei Mäusen mit LPS abschwächt (Zhang et al., 2014).

Dabei sollte jedoch nicht von einer alleinigen Wirkung von IL-1 β auf die kardiale Dysfunktion ausgegangen werden. In einer Studie von Landesberg et al. wurde bei 105 septischen Patienten der Zusammenhang von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (unter anderem IL-1 β , IL-6, TNF- α) und die kardiale Dysfunktion untersucht. Hier zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Zytokinen und der myokardialen Kontraktilität (Landesberg et al., 2015). Vielmehr geht man davon aus, dass die nachgeschaltete Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren zu den kardialen Dysfunktionen führt (Antonucci et al., 2014; Kakihana et al., 2016). Da die septischen *Nlrp3* KO Mäuse verglichen mit den sham-operierten *Nlrp3* KO Tieren hinsichtlich des Schlagvolumens und des LVEDD eine unveränderte systolische Funktion aufwiesen sowie keine Relaxationsstörungen zeigten (Abbildung 19), können diese Ergebnisse Ausdruck der reduzierten IL-1 β Spiegel mit nachgeschalteter reduzierter Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren sein. Zusammenfassend zeigte sich, dass die Aktivierung von IL-1 β durch das NaLP3-Inflammasom während einer Sepsis zu systolischen und diastolischen Dysfunktionen führt, die Reduktion der Inflammation durch das Fehlen von *Nlrp3* und den damit verminderten IL-1 β -Serumspiegeln die Herzfunktion schützt.

8.9. Die Regulation der kardiovaskulären Homöostase in *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Mäusen

Die Regulierung der kardiovaskulären Homöostase wird maßgeblich durch die natriuretischen Peptide ANP (atriales natriuretisches Peptid) und BNP (B-natriuretisches Peptid) reguliert. Bei Volumenbelastung der Vorhöfe und Ventrikel werden diese durch die Kardiomyozyten sezerniert und dienen als Regulatoren des Plasmavolumens. Die kodierenden Gene *Nppa* und *Nppb* waren in septischen *Nlrp3* KO Mäusen gegenüber den sham-operierten *Nlrp3* KO Mäusen nicht signifikant

8. Diskussion

verändert (Abbildung 25). *Nlrp3* WT Tiere wiesen eine signifikante Abnahme der *Nppa* mRNA Expression verglichen mit den sham-operierten Mäusen auf. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine gestörte Volumenhomöostase in den septischen *Nlrp3* WT Tieren vorliegt. Möglichweise könnte ein vermindertes Plasmavolumen und somit eine reduzierte Vor- und Nachlast der Herzen dieser Mäuse daran beteiligt sein. Das verminderte Plasmavolumen könnte durch eine verminderte Flüssigkeitsaufnahme der Tiere, aber auch durch das „capillary leak“ Syndrom in der Sepsis verursacht worden sein (Krüttgen et al., 2012). Das „capillary leak“ Syndrom wird nach Infektion durch die Aktivierung von Makrophagen mit Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 hervorgerufen (Feng et al., 2006; Krüttgen et al., 2012). Die Zellwandschädigung der Gefäße führt zu einem Verlust von Proteinen und Wasser in den extrazellulären Raum und damit zu einem verminderten Plasmavolumen. Durch Reduktion des Plasmavolumens erfolgt eine geringere Dehnung der Vorhöfe mit Abnahme der *Nppa* mRNA Expression und Rückhaltung der restlichen intravasalen Flüssigkeit. In Folge dessen wird die Ausscheidung von Natrium und Chlorid mit konsekutiver osmotischer Ausscheidung von Wasser in der Niere verringert.

Hinsichtlich der *Nppb* mRNA Expression konnten keine Unterschiede in den experimentellen Gruppen festgestellt werden. Die stimulierenden Reize für die Ausschüttung von BNP/ *Nppb* resultieren aus einer Volumenüberlastung der Ventrikel sowie einem erhöhten Blutdruck (Wettersten et al., 2016). Möglicherweise zeigten sich aufgrund des Volumenmangels und dem damit verbundenen Blutdruckabfall keine Veränderungen.

9. Literaturverzeichnis

1. **Adams V, Linke A, Wisloff U, Döring C, Erbs S, Kränkel N, Witt CC, Labeit S, Müller-Werdan U, Schuler G, Hambrecht R.** Myocardial expression of Murf-1 and MAFbx after induction of chronic heart failure: Effect on myocardial contractility. *Cardiovasc Res.* 2007; 73: 120-129.
2. **Agency for Healthcare Research and Quality.** HCUP facts and figures: Statistics on hospital based care in the United States, 2008; http://www.hcup-us.ahrq.gov/reports/factsandfigures/2008/TOC_2008.jsp.
3. **Ali NA, O'Brien JM Jr, Hoffmann SP, Phillips G, Garland A, Finley JC, Almoosa K, Hejal R, Wolf KM, Lemeshow S, Connors AF Jr, Marsh CB; Midwest CriticalCare Consortium.** Acquired weakness, handgrip strength, and mortality in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 178: 261-268.
4. **Amer A, Franchi L, Kanneganti TD, Body-Malapel M, Ozören N, Brady G, Meshinchi S, Jagirdar R, Gewirtz A, Akira S, Núñez G.** Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol. Chem.* 2006; 281: 35217-35223.
5. **Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A.** The Secretory Route of the Leaderless Protein Interleukin 1 β Involves Exocytosis of Endolysosome-related Vesicles. *Mol Biol Cell.* 1999; 10: 1463-1475.
6. **Antonucci E, Fiaccadori E, Donadello K, Taccone FS, Franchi F, Scolletta S.** Myocardial depression in sepsis: from pathogenesis to clinical manifestations and treatment. *J Crit Care* 2014; 29: 500-511.
7. **Batt J, dos Santos CC, Cameron JI, Herridge MS.** Intensive care unit-acquired weakness: clinical phenotypes and molecular mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 187: 238-246.
8. **Bella J, Hindle KL, McEwan PA, Lovell SC.** The leucine-rich repeat structure. *Cell Mol. Life Sci* 2008; 65: 2307-2333.
9. **Benninghoff A, Drenckhahn D.** Anatomie: makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 2, Urban & Fischer: München 2004; Kapitel 9.3..
10. **Benninghoff A, Drenckhahn D.** Anatomie: makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1, Urban & Fischer: München 2008; Kapitel 3.7..
11. **Bloch S, Polkey MI, Griffiths M, Kemp P.** Molecular mechanisms of intensive care unit-acquired weakness. *Eur Respir J.* 2012; 39: 1000-1011.
12. **Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ.** Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001; 294: 1704-1708.
13. **Bos JM, Towbin JA, Ackerman MJ.** Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 201-211.
14. **Bracey NA, Beck PL, Muruve DA, Hirota SA, Guo J, Jabagi H, Wright Jr JR, MacDonald JA, Lees-Miller JP, Roach D, Semeniuk LM, Duff HJ.** The Nlrp3 inflammasome promotes myocardial dysfunction in structural cardiomyopathy through interleukin-1 β . *Exp Physiol* 2013; 462-472.
15. **Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M.** Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature Rev. Drug Discov.* 2005; 4: 854-865. (mit Erlaubnis nachgedruckt durch Springer Nature)
16. **Cardim N, Brito D, Rocha Lopes L, Freitas A, Araújo C, Belo A, Gonçalves L, Mimoso J, Olivotto I, Elliott P, Madeira H; participating centres.** The Portuguese Registry of Hypertrophic Cardiomyopathy: Overall results. *Rev Port Cardiol.* 2018; pii: S0870-2551(17)30542-30545.

9. Literaturverzeichnis

17. **Carniel E, Taylor MR, Sinagra G, Di Lenarda A, Ku L, Fain PR, Boucek MM, Cavanaugh J, Miodic S, Slavov D, Graw SL, Feiger J, Zhu XZ, Dao D, Ferguson DA, Bristow MR, Mestroni L.** Alpha-myosin heavy chain: a sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy. *Circulation*. 2005; 112: 54-59.
18. **Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, Bang ML, Trombitas K, Granzier H, Gregorio CC, Sorimachi H, Labeit S.** Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol*. 2001; 306: 717-726.
19. **Charpentier J, Luyt CE, Fulla Y, Vinsonneau C, Cariou A, Grabar S, Dhainaut JF, Mira JP, Chiche JD.** Brain natriuretic peptide: A marker of myocardial dysfunction and prognosis during severe sepsis. *Crit Care Med*. 2004; 32: 660-665.
20. **Chen SN, Czernuszewicz G, Tan Y, Lombardi R, Jin J, Willerson JT, Marian AJ.** Human molecular genetic and functional studies identify TRIM63, encoding Muscle RING Finger Protein 1, as a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*. 2012; 111: 907-919.
21. **Ching YH, Ghosh TK, Cross SJ, Packham EA, Honeyman L, Loughna S, Robinson TE, Dearlove AM, Ribas G, Bonser AJ, Thomas NR, Scotter AJ, Caves LS, Tyrrell GP, Newbury-Ecob RA, Munnich A, Bonnet D, Brook JD.** Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect. *Nat Genet*. 2005; 37: 423-428.
22. **Chun YK, Kim J, Kwon S, Choi SH, Hong F, Moon K, Kim JM, Choi SL, Kim BS, Ha J, Kim SS.** Phosphatidylinositol 3-kinase stimulates muscle differentiation by activating p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 276: 502-507.
23. **Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E, Glass DJ.** The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab*. 2007; 6: 376-385.
24. **Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H, Leimer AH, Cheronis J.** Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 6261-6266.
25. **Court O, Kumar A, Parillo JE, Kumar A.** Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* 2002; 6: 500-508.
26. **Creagh EM, O'Neill LA.** TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*. 2006; 27: 352-357.
27. **De Jonghe B, Sharshar T, Lefaucheur JP, Authier FJ, Durand-Zaleski I, Boussarsar M, Cerf C, Renaud E, Mesrati F, Carlet J, Raphaël JC, Outin H, Bastuji-Garin S; Groupe de Réflexion et d'Etude des Neuromyopathies en Réanimation.** Paresis acquired in the intensive care unit: a prospective multicenter study. *JAMA*. 2002; 288: 2859-2867.
28. **Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C.** Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol*. 2011; 19: 198-208.
29. **Derde S, Hermans G, Derese I, Güiza F, Hedström Y, Wouters PJ, Bruyninckx F, D'Hoore A, Larsson L, Van den Berghe G, Vanhorebeek I.** Muscle atrophy and preferential loss of myosin in prolonged critically ill patients. *Crit Care Med*. 2012; 40: 79-89.
30. **Dillman WH.** Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. *Diabetes*. 1980; 29: 579-582.
31. **Diwan A, Krenz M, Syed FM, Wansapura J, Ren X, Koesters AG, Li H, Kirshenbaum LA, Hahn HS, Robbins J, Jones WK, Dorn GW.** Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. *J Clin Invest*. 2007; 117: 2825-2833.
32. **Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, Willingham SB, Ye Z, Zimmermann AG, Pan-Yun Ting J.** Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 8041-8046.

9. Literaturverzeichnis

- 33. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K.** Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* 2007; 33: 606-618.
- 34. Feng X, Ren B, Xie W, Huang Z, Liu J, Guan R, Duan M, Xu J.** Influence of hydroxyethyl starch 130/0.4 in pulmonary neutrophil recruitment and acute lung injury during polymicrobial sepsis in rats. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2006; 50: 1081-1088.
- 35. Fenzi F, Latronico N, Refatti N, Rizzuto N.** Enhanced expression of E-selectin on the vascular endothelium of peripheral nerve in critically ill patients with neuromuscular disorders. *Acta Neuropathol.* 2003; 106: 75-82.
- 36. Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Qi X, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN.** Requirement of protein kinase D1 for pathological cardiac remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105: 3059-3063. ("Copyright (2008) National Academy of Sciences, U.S.A.")
- 37. Fielitz J, van Rooij E, Spencer JA, Shelton JM, Latif S, van der Nagel R, Bezprozvannaya S, de Windt L, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN.** Loss of muscle-specific RING-finger 3 predisposes the heart to cardiac rupture after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 4377-4382.
- 38. Finfer S, Bellomo R, Lipman J, French C, Dobb G, Myburgh J.** Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med.* 2004; 30: 589-596.
- 39. Fisher CJ Jr, Slotman GJ, Opal SM, Pribble JP, Bone RC, Emmanuel G, Ng D, Bloedow DC, Catalano MA; IL-1RA Sepsis Syndrome Study Group.** Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome: a randomized, open-label, placebo-controlled multicenter trial. *Crit Care Med.* 1994; 22: 12-21.
- 40. Franchi L, Stoolman J, Kanneganti TD, Verma A, Ramphal R, Núñez G.** Critical role for Ipaf in *Pseudomonas aeruginosa*-induced caspase-1 activation. *Eur J Immunol.* 2007; 37: 3030-3039.
- 41. Friedman G, Silva E, Vincent JL.** Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med.* 1998; 26: 2078-2086.
- 42. Friedrich O.** Critical illness myopathy: sepsis-mediated failure of the peripheral nervous system. *Eur J Anaesthesiol Suppl.* 2008; 42: 73-82.
- 43. Galasso G, De Rosa R, Piscione F, Iaccarino G, Vosa C, Sorriento D, Piccolo R, Rapacciuolo A, Walsh K, Chiariello M.** Myocardial expression of FOXO3a-Atrogin-1 pathway in human heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2010; 1290-1296.
- 44. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG.** A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell.* 1990; 62: 999-1006.
- 45. Glick D, Barth S, Macleod KF.** Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010; 221: 3-12.
- 46. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL.** Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 14440-14445.
- 47. Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, Schroder K, Ferrero I, Menu P, Tardivel A, Mattmann C, Tschopp J.** Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J Immunol.* 2011; 186: 2529-2534.
- 48. Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, Golosinskiy A.** Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. *NCHS Data Brief* 2011; 62: 1-8.

9. Literaturverzeichnis

- 49. Hosenpud JD, Campbell SM, Mendelson DJ.** Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. *J Heart Transplant.* 1989; 8: 460-464.
- 50. Huang N, Kny M, Riediger F, Busch K, Schmidt S, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J.** Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. *Intensive Care Med Exp.* 2017; 5:3. doi: 10.1186/s40635-016-0115-0.
- 51. Hwang H, Reiser PJ, Billman GE.** Effects of exercise training on contractile function in myocardial trabeculae after ischemia-reperfusion. *J Appl Physiol* 2005; 99: 230-236.
- 52. Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM.** Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA.* 2010; 304: 1787-1794.
- 53. Jones WK, Grupp IL, Doetschman T, Grupp G, Osinska H, Hewett TE, Boivin G, Gulick J, Ng WA, Robbins J.** Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional defects in the heart. *J Clin Invest.* 1996; 98: 1906-1917.
- 54. Joosten LA, Netea MG, Fantuzzi G, Koenders MI, Helsen MM, Sparrer H, Pham CT, van der Meer JW, Dinarello CA, van den Berg WB.** Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 3651-3662.
- 55. Kaizuka T, Mizushima N.** Atg13 is essential for autophagy and cardiac development in mice. *Mol Cell Biol.* 2016; 36: 585-595.
- 56. Kakahana Y, Ito T, Nakahara M, Yamaguchi K, Yasuda T.** Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. *J Intensive Care* 2016;4: 22. doi: 10.1186/s40560-016-0148-1.
- 57. Kandarian SC, Jackman RW.** Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve.* 2006; 33: 155-165.
- 58. ¹Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Whitfield J, Franchi L, Taraporewala ZF, Miller D, Patton JT, Inohara N, Núñez G.** Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem.* 2006; 281: 36560-36568.
- 59. ²Kanneganti TD, Özören N, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Franchi L, Whitfield J, Barchet W, Colonna M, Vandenabeele P, Bertin J, Coyle A, Grant EP, Akira S, Núñez G.** Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* 2006; 440: 233-236.
- 60. Kaukonen KM, Bailey M, Bellomo R.** Systemic Inflammatory Response Syndrome Criteria for Severe Sepsis. *N Engl J Med.* 2015; 373: 881.
- 61. Kedar V, McDonough H, Arya R, Li HH, Rockman HA, Patterson C.** Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac Troponin I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 18135-18140.
- 62. Kishimoto I, Garbers DL.** Physiological regulation of blood pressure and kidney function by guanylyl cyclase isoforms. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1997; 6: 58-63.
- 63. Klinke, Pape, Silbernagel.** Physiologie. Thieme Verlag: Stuttgart 2005; Kapitel 6.2..
- 64. Kominami E, Kunio I, Katunuma N.** Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy. *Am J Pathol.* 1987; 127: 461-466.
- 65. Krüttgen A, Rose-John S.** Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome. *J Interferon Cytokine Res.* 2012; 32:60-65.
- 66. Kubasiak LA, Hernandez OM, Bishopric NH, Webster KA.** Hypoxia and acidosis activate cardiac myocyte death through the Bcl-2 family protein BNIP3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12825-12830.

9. Literaturverzeichnis

- 67. Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE.** Tumor necrosis factor α and interleukin-1 β are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med.* 1996; 183: 949-958.
- 68. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, van Bruggen R, Tschopp J.** Inflammasome Components Nalp 1 and 3 Show Distinct but Separate Expression Profiles in Human Tissues Suggesting a Site-Specific Role in the Inflammatory Response. *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 443-452.
- 69. Landesberg G, Levin PD, Gilon D, Goodman S, Georgieva M, Weissman C, Jaffe AS, Sprung CL, Barak V.** Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic shock: No Correlation with Inflammatory Cytokines in Real-life Clinical Setting. *Chest.* 2015; 148: 93-102.
- 70. Langenickel T, Pagel I, Höhnel K, Dietz R, Willenbrock R.** Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278: H1500-1506.
- 71. Lapaquette P, Guzzo J, Bretillon L, Bringer MA.** Cellular and Molecular Connections between Autophagy and Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:398483. doi: 10.1155/2015/398483.
- 72. Lavandero S, Troncoso R, Rothermel BA, Martinet W, Sadoshima J, Hill JA.** Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives. *Autophagy* 2013; 9: 1455-1466.
- 73. Lecker SH.** Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting: multiple parallel pathways? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003; 6: 271-275.
- 74. Levine B, Kroemer G.** Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132:27-42.
- 75. Levine B, Mizushima N, Virgin HW.** Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011; 469: 323-335.
- 76. Li W, Moylan JS, Chambers MA, Smith J, Reid MB.** Interleukin-1 stimulates catabolism in C2C12 myotubes. *AM J Physiol Cell Physiol.* 2009; 297: C706-714.
- 77. Liu YC, Yu MM, Shou ST, Chai YF.** Sepsis-Induced Cardiomyopathy: Mechanisms and Treatments. *Front Immunol.* 2017; 8: 1021.
- 78. Lompré AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V.** Expression of the cardiac ventricular alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem.* 1984; 259: 6437-6446.
- 79. Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeier TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM, Bristow MR.** Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest.* 1997; 100: 2315-2324.
- 80. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, Roose-Girma M, Erickson S, Dixit VM.** Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* 2004; 430: 213-218.
- 81. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM.** Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 2006; 440: 228-232.
- 82. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE.** Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation.* 1995; 92: 785-789.
- 83. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB; American Heart Association; Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics**

9. Literaturverzeichnis

- and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; Council on Epidemiology and Prevention.** Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006; 113: 1807-1816.
- 84. Martinon F, Mayor A, Tschopp J.** The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 229-265.
- 85. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J.** Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440: 237-241.
- 86. McCall SH, Sahraei M, Young AB, Worley CS, Duncan JA, Pan-Yun Ting J, Marriott I.** Osteoblasts Express NLRP3, a Nucleotide-Binding Domain and Leucine-Rich Repeat Region Containing Receptor Implicated in Bacterially Induced Cell Death. *J. Bone Miner. Res.* 2008; 23: 30-40.
- 87. McGilligan VE, Gregory-Ksander MS, Li D, Moore JE, Hodges RR, Gilmore MS, Moore TCB, Dartt DA.** Staphylococcus aureus Activates the NLRP3 Inflammasome in Human and Rat Conjunctival Goblet Cells. *PLoS ONE* 2013; 8: 1-13.
- 88. Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB.** Anovel, Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*. 2009; 5:649-662.
- 89. Miao EA, Alpuche-Aranda CM, Dors M, Clark AE, Bader MW, Miller SI, Aderem A.** Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol.* 2006; 7: 569-575.
- 90. Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA.** Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res.* 2000; 86: 386-390.
- 91. Mizushima N, Levine B.** Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol.* 2010; 12: 823-830.
- 92. Moreira-Gonçalves D, Henriques-Coelho T, Fonseca H, Ferreira R, Padrão AI, Santa C, Vieira S, Silva AF, Amado F, Leite-Moreira A, Duarte JA.** Intermittent cardiac overload results in adaptive hypertrophy and provides protection against left ventricular acute pressure overload insult. *J Physiol.* 2015; 593: 3885-3897.
- 93. Mukoyama M, Nakao K, Hosada K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, Shirakami G, Jougasaki M, Obata K, Yasue H, Kambayashi Y, Inouye K, and Imura H.** Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. *J Clin Invest.* 1991;87: 1402-1412.
- 94. Nadal-Ginard B, Mahdavi V.** Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J Clin Invest.* 1989; 84: 1693-1700.
- 95. Nakao K, Itoh H, Saito Y, Mukoyama M, Ogawa Y.** The natriuretic peptide family. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996; 5: 4-11.
- 96. Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, Soultis J, Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE.** Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation* 2002; 105: 446-451.
- 97. Olivetto I, Cecchi F, Poggese C, Yacoub MH.** Patterns of disease progression in hypertrophic cardiomyopathy: an individualized approach to clinical staging. *Circ Heart Fail.* 2012; 535-546.
- 98. Ortis F, Naamane N, Flamez D, Ladrière L, Moore F, Cunha DA, Colli ML, Thykjaer T, Thorsen K, Ørntoft TF, Eizirik DL.** Cytokines Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-alpha Regulate Different Transcriptional and Alternative Splicing Networks in Primary-Cells. *DIABETES* 2010; 59: 358-374.

9. Literaturverzeichnis

- 99. Pagano M, Naviglio S, Spina A, Chiosi E, Castoria G, Romano M, Sorrentino A, Illiano F, Illiano G.** Differentiation of H9c2 cardiomyoblasts: The role of adenylate cyclase system. *J Cell Physiol.* 2004; 198: 408-416.
- 100. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP.** Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med.* 1990; 113: 227-242.
- 101. Patel H, Madanieh R, Kosmas CE, Vatti SK, Vittorio TJ.** Reversible Cardiomyopathies. *Clin Med Insights Cardiol.* 2015; 9: 7-14.
- 102. Pathan N, Franklin JL, Eleftherohorinou H, Wright VJ, Hemingway CA, Waddell SJ, Griffiths M, Dennis JL, Relman DA, Harding SE, Levin M.** Myocardial depressant effects of interleukin 6 in meningococcal sepsis are regulated by p38mitogen-activated protein kinase. *Crit Care Med.* 2011; 39: 1692-1711.
- 103. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, J Tschopp J.** Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* 2007; 14: 1583-1589.
- 104. Poelaert J, Declerck C, Vogelaers D, Colardyn F, Visser CA.** Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. *Intensive Care Med.* 1997; 23: 553-560.
- 105. Puthuchery ZA, Rawal J, McPhail M, Connolly B, Ratnayake G, Chan P, Hopkinson NS, Phadke R, Dew T, Sidhu PS, Velloso C, Seymour J, Agle CC, Selby A, Limb M, Edwards LM, Smith K, Rowleron A, Rennie MJ, Moxham J, Harridge SD, Hart N, Montgomery HE.** Acute skeletal muscle wasting in critical illness. *JAMA.* 2013; 310: 1591-1600.
- 106. Razeghi P, Baskin KK, Sharma S, Young ME, Stepkowski S, Essop MF, Taegtmeyer H.** Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342: 361-364.
- 107. Read AF, Graham AL, Raberg L.** Animal defences against infectious agents: is damage control more important than pathogen control. *PLoS Biol.* 2008; 6:e4. doi: 10.1371/journal.pbio.1000004.
- 108. Regula KM, Ens K, Kirshenbaum LA.** Inducible expression of BNIP3 provokes mitochondrial defects and hypoxia-mediated cell-death of ventricular myocytes. *Circ. Res* 2002; 91:226-231.
- 109. Richfield, David.** "Medical gallery of David Richfield 2014". *Wikiversity Journal of Medicine* 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.009. ISSN 2002-4436. - Eigenes Werk, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2264027>.
- 110. Romero-Bermejo FJ, Ruiz-Bailen M, Gil-Cebrian J, Huertos-Ranchal MJ.** Sepsis-induced cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rev.* 2011; 7: 163-183.
- 111. Saito H, Sherwood ER, Varma TK, Evers BM.** Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124: 1047-1058.
- 112. Sato R, Kuriyama A, Takada T, Nasu M, Luthe SK.** Prevalence and risk factors of sepsis-induced cardiomyopathy: A retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95:e5031.
- 113. Sato R, Nasu M.** A review of sepsis-induced cardiomyopathy. *J Intensive Care.* 2015; 3: 48.
- 114. Schefold JC, Bierbrauer J, Weber-Carstens S.** Intensive care unit-acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe sepsis and septic shock. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2010; 1: 147-157.
- 115. Schulz R, Nava E, Moncada S.** Induction and potential biological relevance of a Ca(2+)-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol.* 1992; 105: 575-580.
- 116. Scott RC, Juhász G, Neufeld TP.** Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol.* 2007; 17: 1-11.

9. Literaturverzeichnis

117. **Sharshar T, Bastuji-Garin S, Stevens RD, Durand MC, Malissin I, Rodriguez P, Cerf C, Outin H, De Jonghe B; Groupe de Réflexion et d'Etude des Neuromyopathies En Réanimation.** Presence and severity of intensive care unit-acquired paresis at time of awakening are associated with increased intensive care unit and hospital mortality. *Crit Care Med.* 2009; 37: 3047-3053.
118. **Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC.** The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315: 801-810.
119. **Slimani H, Zhai Y, Yousif NG, Ao L, Zeng Q, Fullerton DA, Meng X.** Enhanced monocyte chemoattractant protein-1 production in aging mice exaggerates cardiac depression during endotoxemia. *Crit Care* 2014; 18: 527.
120. **Sonnenblick EH.** Correlation of Myocardial Ultrastructure and Function. *Circulation* 1968; 38: 29-44.
121. **Stypmann J, Gläser K, Roth W, Tobin DJ, Petermann I, Matthias R, Mönnig G, Haverkamp W, Breithardt G, Schmahl W, Peters C, Reinheckel T.** Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 6234-6239.
122. **Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y.** Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells.* 2007; 12: 209-218.
123. **Suzuki T, Franchi L, Toma C, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Inohara N, Sasakawa C, Nuñez G.** Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-infected macrophages. *PLoS pathog* 2007; 3: e111.
124. **Szabo G, Romics L, Frenzl G.** Liver in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Clin Liver Dis* 2002; 6: 1045-1066.
125. **Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yoshidome H, Swanson PE, Tokuhisa T, Oda S, Hatano M.** Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis. *Crit Care* 2013; 17: R160. doi: 10.1186/cc12839.
126. **Trendelenburg G.** Acute neurodegeneration and the inflammasome: central processor for danger signals and the inflammatory response? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2008; 28: 867-881.
127. **Tschopp J, Schroder K.** NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signaling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10: 210-215. (mit Erlaubnis nachgedruckt durch Springer Nature)
128. **Tsuchida K, Aihara H, Isoqai K, Hanada K, Shibata N.** Degradation of myocardial structural proteins in myocardial infarcted dogs is reduced by Ep459, a cysteine proteinase inhibitor. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1986; 367: 39-45.
129. **Vieillard-Baron A, Caille V, Charron C, Belliard G, Page B, Jardin F.** Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. *Crit Care Med.* 2008; 36: 1701-1706.
130. **Vilaysane A, Chun J, Seamon ME, Wang W, Chin R, Hirota S, Li Y, Clark SA, Tschopp J, Trpkov K, Hemmelgarn BR, Beck PL, Muruve DA.** The NLRP3 Inflammasome Promotes Renal Inflammation and Contributes to CKD. *J AM Soc Nephrol* 2010; 21: 1732-1744.
131. **Vincent JL, Marshall JC, Namendys-Silva SA, François B, Martin-Loeches I, Lipman J, Reinhart K, Antonelli M, Pickkers P, Njimi H, Jimenez E, Sakr Y.** Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *Lancet Respir Med.* 2014; 2: 380-386.
132. **Weber A, Wasiliew P, Kracht M.** Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci. Signal.* 2010; 3:1-6.

9. Literaturverzeichnis

- 133. Wei CM, Heublein DM, Perrella MA, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Edwards WD, Schaff HV, Burnett JC Jr.** Natriuretic peptide system in human heart failure. *Circulation*.1993; 88: 1004-1009.
- 134. Wettersten N, Maisel AS.** Biomarkers for Heart Failure: An Update for Practitioners of Internal Medicine. *Am J Med*. 2016; 129: 560-567.
- 135. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH.** Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*.1980; 29: 189-201.
- 136. Willis MS, Ike C, Li L, Wang D-Z, Glass DJ, Patterson C.** Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo. *Circ Res*. 2007; 100: 456-459.
- 137. Willis MS, Rojas M, Li L, Selzman CH, Tang RH, Stansfield WE, Rodriguez JE, Glass DJ, Patterson C.** Muscle ring finger 1 mediates cardiac atrophy in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296: H997-H1006.
- 138. Willis MS, Schisler JC, Li L, Rodríguez JE, Hilliard EG, Charles PC, Patterson C.** Cardiac muscle ring finger-1 increases susceptibility to heart failure in vivo. *Circ Res*. 2009; 105: 80-88.
- 139. Wu J, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES.** Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 Inflammasomes in Caspase-1 Activation by *Listeria monocytogenes*. *J Clin Immunol* 2010; 30: 693-702.
- 140. Wu QQ, Xu M, Yuan Y, Li FF; Yang Z, Liu Y, Zhou MQ, Bian ZY, Deng W, Gao L, Li H, Tang QZ.** Cathepsin B deficiency attenuates cardiac remodeling in response to pressure overload via TNF- α /ASK1/JNK pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015; 308: H1143-1154.
- 141. Zhang C, Syed TW, Liu R, Yu J.** Role of Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Inflammation in Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2017; doi: 10.3389/fcvm.2017.00029.
- 142. Zhang J, Ney PA.** Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ*. 2009; 16:939-946.
- 143: Zhang W, Xu X, Kao R, Mele T, Kvietys P, Martin CM, Rui T.** Cardiac Fibroblasts Contribute to Myocardial Dysfunction in Mice with Sepsis: The Role of NLRP3 Inflammasome Activation. *PLoS One*. 2014; 9:e107639. doi: 10.1371/journal.pone.0107639.

10. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Struktureller Aufbau und Aktivierung des NaLP3-Inflammasoms | 17 |
| Abbildung 2: Aktivatoren des NaLP3-Inlammasoms..... | 18 |
| Abbildung 3: Aufbau des Sarkomers | 23 |
| Abbildung 4: Aufbau der Aktin- und Myosinfilamente | 24 |
| Abbildung 5: Einteilung der primären Kardiomyopathien..... | 26 |
| Abbildung 6: Experimentelles Sepsismodel: Zökale Ligatur und Punction (<i>Caecal ligation and puncture</i> =CLP) | 48 |
| Abbildung 7: Genotypisierung von <i>Nlrp3</i> WT und <i>Nlrp3</i> KO Mäusen | 51 |
| Abbildung 8: Beispiel einer Hypertrophie des Herzens und Fibrosierung in der Trichrom-Färbung..... | 61 |
| Abbildung 9: Myogene Differenzierung von H9c2-Myoblasten. | 64 |
| Abbildung 10: Die Stimulation von H9c2-Myotuben mit Interleukin-1 β oder Dexamethason reduziert den Myotubendurchmesser. | 69 |
| Abbildung 11: Immunzytochemische Analyse der Proteinexpression von Myosin fast, α -Aktin und MuRF1 in H9c2-Myoblasten, -Myotuben und stimulierten H9c2-Myotuben..... | 73 |
| Abbildung 12: Die Stimulation von H9c2-Myotuben mit Interleukin-1 β (IL-1 β) induziert die Expression von <i>Nlrp3</i> und <i>Interleukin-6 (Il6)</i> mRNA und reduziert die Proteinmenge von Myosin. | 75 |
| Abbildung 13: Die Stimulation von H9c2-Myotuben mit Interleukin-1 β (IL-1 β) zeigt keine veränderten mRNA Gehalte von <i>Trim63</i> und keine Veränderung der Proteinmengen von MuRF1 nach 72h..... | 76 |
| Abbildung 14: Die Behandlung von H9c2-Myotuben mit Interleukin-1 β (IL-1 β) für bis zu 3 Stunden verändert nicht die mRNA Expression von <i>Trim63</i> | 78 |
| Abbildung 15: Die Interleukin-1 β (IL-1 β) Stimulation von H9c2-Myotuben für bis zu 72h verändert die mRNA Expression von <i>Trim63</i> nicht. | 78 |
| Abbildung 16: In H9c2-Myotuben induziert Interleukin-1 β (IL-1 β) die mRNA Expression von <i>Fbxo32</i> innerhalb der ersten 3h. | 79 |
| Abbildung 17: Die Stimulation von H9c2 Myotuben mit Interleukin-1 β (IL-1 β) für 72h erhöht die mRNA Expression von <i>Fbxo32</i> | 80 |
| Abbildung 18: Das prozentuale Überleben von <i>Nlrp3</i> KO Mäusen nach CLP-induzierter Sepsis ist höher als das prozentuale Überleben von <i>Nlrp3</i> WT Mäusen. 81 | |

10. Abbildungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 19: Nach Induktion einer Sepsis weisen <i>Nlrp3</i> KO Mäuse eine bessere systolische und diastolische Herzfunktion als <i>Nlrp3</i> WT Mäuse auf. | 83 |
| Abbildung 20: Die CLP-induzierte Sepsis führt zu einem geringeren Körpergewichtsverlust in <i>Nlrp3</i> KO im Vergleich zu <i>Nlrp3</i> WT Mäusen..... | 84 |
| Abbildung 21: Die CLP-induzierte Sepsis führt zu einer Reduktion des Herzgewichts in <i>Nlrp3</i> WT Mäusen, nicht jedoch in <i>Nlrp3</i> KO Mäusen..... | 85 |
| Abbildung 22: Die CLP-induzierte Sepsis führt zu einer Reduktion des Leber-, Lungen und Nierengewichts in <i>Nlrp3</i> WT, aber nicht in <i>Nlrp3</i> KO Mäusen..... | 86 |
| Abbildung 23: Die CLP-induzierte Sepsis zeigt 96h nach Operation (sham/CLP) keine histologischen Veränderungen des Herzgewebes in den <i>Nlrp3</i> WT und <i>Nlrp3</i> KO Mäusen..... | 89 |
| Abbildung 24: Die CLP-induzierte Sepsis führt 96h nach Operation (sham/CLP) zu einer Erhöhung der Expression von <i>Interleukin-1β</i> (<i>IL1b</i>); <i>Interleukin-6</i> (<i>Il6</i>) ist nur in <i>Nlrp3</i> WT nach CLP-Operation erhöht..... | 90 |
| Abbildung 25: <i>Nppa</i> und <i>Nppb</i> mRNA Expression 96h nach CLP-induzierter Sepsis (sham/CLP) in <i>Nlrp3</i> WT und <i>Nlrp3</i> KO Mäusen. | 91 |
| Abbildung 26: Die CLP-induzierte Sepsis führt 96h nach Operation (sham/CLP) zu einer veränderten mRNA Expression von <i>Myosin heavy chain 6</i> (<i>MyH6</i>) und <i>Myosin heavy chain 7</i> (<i>MyH7</i>) in <i>Nlrp3</i> WT und <i>Nlrp3</i> KO Mäusen..... | 92 |
| Abbildung 27: Die CLP-induzierte Sepsis führt 96h nach Operation (sham/CLP) zu erhöhten Proteinmengen von Myosin slow in den Herzen von <i>Nlrp3</i> WT und <i>Nlrp3</i> KO Mäusen..... | 93 |
| Abbildung 28: Die CLP-induzierte Sepsis verändert 96h nach Operation (sham/CLP) die mRNA Expression von <i>Col1</i> und <i>Ctgf</i> in <i>Nlrp3</i> WT und <i>Nlrp3</i> KO Mäusen unterschiedlich..... | 94 |
| Abbildung 29: Die CLP-induzierte Sepsis führt 96h nach Operation (sham/CLP) zu keiner Veränderung der mRNA Expression von <i>Trim63</i> und <i>Fbxo32</i> in <i>Nlrp3</i> WT und <i>Nlrp3</i> KO Mäusen. | 95 |
| Abbildung 30: Sepsis-induzierte Autophagie ist in <i>Nlrp3</i> KO Herzen verringert..... | 97 |

11. Tabellenverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1: Ansätze zur Herstellung von Puffer und Lösungen | 40 |
| Tabelle 2: Western Blot Gel 1,5 mm | 41 |
| Tabelle 3: Agarosegel zur Genotypisierung von Mäusen | 42 |
| Tabelle 4: Primer für die quantitative Real-time PCR | 42 |
| Tabelle 5: Primer zur Erfassung des Genotyps | 43 |
| Tabelle 6: Primäre und sekundäre Antikörper zur Western Blot Analyse | 43 |
| Tabelle 7: Primäre und sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz | 44 |
| Tabelle 8: Ansatz für eine PCR: Wildtyp-Mäuse | 50 |
| Tabelle 9: Ansatz für eine PCR: Knockout-Mäuse..... | 50 |
| Tabelle 10: PCR-Zyklus zur Genotypisierung von Mäusen..... | 51 |
| Tabelle 11: Ansatz für eine PCR zur Herstellung von cDNA..... | 53 |
| Tabelle 12: PCR-Zyklus zur Herstellung von cDNA | 53 |
| Tabelle 13: Bestandteile für eine PCR Reaktion..... | 54 |
| Tabelle 14: verwendetes Programm für die quantitative Real-time PCR | 55 |
| Tabelle 15: Entwässerung und Einbettung von Gewebe in Paraffin | 59 |
| Tabelle 16: Entparaffinierung von Gewebe..... | 59 |
| Tabelle 17: Hämatoxylin-Eosin-Färbung..... | 60 |
| Tabelle 18: Trichrom-Färbung | 61 |

I. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katharina Busch, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der inflammations-vermittelten Kardiomyopathie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Ort / Datum

Katharina Busch

II. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Katharina Busch hat aktiv an der praktischen experimentellen Durchführung und der theoretischen Vorbereitung des Tierversuches mitgearbeitet.

I. Publikation:

Huang N, Kny M, Riediger F, **Busch K**, Schmidt S, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of *Nlrp3* protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. *Intensive Care Med Exp.* 2017; 5:3. doi: 10.1186/s40635-016-0115-0.

Aus meiner statistischen Auswertung ist Abbildung 18 unter 7.2.1. Überlebensrate entstanden.

Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung der CLP-Operation, Versorgung und Überwachung der *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Tiere nach Operation
- Täglich mehrfache Zählung der überlebenden und gestorbenen Tiere sowie tabellarische Auflistung mit Tag und Uhrzeit
- Abtötung der überlebten *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Tiere sowie Entnahme der Skelettmuskulatur (m. gastrocnemius, m. plantaris, m. tibialis anterior)
- Genotypisierung der *Nlrp3* WT und *Nlrp3* KO Tiere
- Literaturrecherche, graphische Bearbeitung, statistische Auswertung
- Erstellen des Manuskriptes und Diskussion der Ergebnisse

II. Publierte Abstracts:

Vortrag auf der 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. in Mannheim, 04/2017.

Kny M, **Busch K**, Huang N, Schmidt S, Klassert T, Stock M, Butter C, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of *Nlrp3* protects from inflammation-induced cardiac failure.

Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung zellbiologischer Experimente
- Analyse und Auswertung der Daten
- Graphische Darstellung der Daten
- Diskussion der Ergebnisse

II. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

III. Weitere Arbeiten an publizierten Abstracts:

a. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. in Mannheim, 04/2017.

Kny M, Huang N, **Busch K**, Schmidt S, Butter C, Riediger F, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy.

Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung zellbiologischer Experimente
- Analyse und Auswertung der Daten
- Graphische Darstellung der Daten
- Diskussion der Ergebnisse

b. Leopoldina Symposium „The Evolution of Intensive Care Medicine“, 02/2017.

Huang N, Kny M, Riediger F, **Busch K**, Schmidt S, Butter C, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy.

Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung zellbiologischer Experimente
- Analyse und Auswertung der Daten
- Graphische Darstellung der Daten
- Diskussion der Ergebnisse

Ort / Datum

Katharina Busch

III. Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

III. Curriculum vitae

IV. Publikationsliste

I. Publikation:

Huang N, Kny M, Riediger F, **Busch K**, Schmidt S, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. Intensive Care Med Exp. 2017; 5:3. doi: 10.1186/s40635-016-0115-0.

II. Publikation in Bearbeitung:

Kny M, Csalyi KD, Klaeske K, **Busch K**, Dworatzek E, Fliegner D, Regitz-Zagrosek V, Luft FC, Panakova D, Fielitz J. Ninjurin1 regulates striated muscle growth and differentiation.

III. Publierte Abstracts:

Vortrag auf der 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. in Mannheim, 04/2017.

Kny M, **Busch K**, Huang N, Schmidt S, Klassert T, Stock M, Butter C, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced cardiac failure.

IV. Weitere Arbeiten an publizierten Abstracts:

a. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. in Mannheim, 04/2017.

Kny M, Csalyi KD, Klaeske K, **Busch K**, Dworatzek E, Fliegner D, Regitz-Zagrosek V, Panakova D, Fielitz J. Ninjurin1 regulates myocyte growth and differentiation.

b. 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung e.V. in Mannheim, 04/2017.

Kny M, Huang N, **Busch K**, Schmidt S, Butter C, Riediger F, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy.

c. Leopoldina Symposium „The Evolution of Intensive Care Medicine”, 02/2017.

Huang N, Kny M, Riediger F, **Busch K**, Schmidt S, Butter C, Luft FC, Slevogt H, Fielitz J. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy.

V. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Jens Fielitz, der mir die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit gegeben hat. Seine umfangreiche und hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie die ausführlichen Gespräche und Diskussionen waren essentiell für die Entstehung der Dissertation.

Frau Dr. rer. nat. Melanie Kny danke ich für die Weitergabe ihres wissenschaftlichen und labormedizinischen Wissens sowie für die stetige Möglichkeit mit Fragen zu ihr kommen zu können. Die Anregungen und Diskussionen mit ihr haben mich in der Anfertigung der Arbeit sehr voran gebracht.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Fielitz ohne deren Mitarbeit die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Jida Hamati und Frau Dr. rer. nat. Dörte Lodka für die labortechnische Unterstützung bedanken. Ebenso gilt mein Dank Sibylle Schmidt für die hervorragende technische Assistenz.

Außerdem danke ich allen Kooperationspartnern des Max-Delbrück-Centrums für molekulare Medizin, insbesondere Martin Taube für die echokardiographischen Untersuchungen. Ebenso danke ich den Kooperationspartnern an der Universität Jena, im speziellen Frau Professor Dr. med. Hortense Slevogt, für die Unterstützung bei der RNA-Sequenzierung.

Danken möchte ich auch meinem Freund Henryk Boeck sowie meinen Freunden Dajana Gliemann sowie Katja und Mario Wegmarshaus für die immerwährende mentale Unterstützung. Ohne ihre Geduld und dem stetigen Rückhalt wäre das Vorankommen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir den Weg in die Medizin geebnet hat.