

Aus der medizinischen Klinik II, Abteilung für Kardiologie und Pulmologie  
der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Benjamin Franklin

DISSERTATION

Thema:  
Die Rolle des Toll-like Rezeptor 4 beim Myokardinfarkt im Tiermodell

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Aymaru Kailli Yaulema Riß

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Tschöpe  
2. Prof. Dr. med. U. Laufs  
3. Prof. Dr. med. K.C. Wollert

Datum der Promotion: 08.04.2011

Maria Elisa und meiner Familie  
in Liebe gewidmet.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	8
<b>1.1 Der Myokardinfarkt</b> .....	8
1.1.1 Einteilung.....	8
1.1.2 Klinik.....	9
1.1.3 Diagnostik.....	9
1.1.4 Ätiologie.....	9
1.1.5 Epidemiologie.....	10
1.1.6 Pathophysiologie.....	11
1.1.7 Kardiales Remodeling.....	11
<b>1.2 Das Immunsystem</b> .....	12
1.2.1 Das adaptive Immunsystem.....	13
1.2.2 Das angeborene Immunsystem.....	13
1.2.3 Pathogen assoziierte molekulare Muster.....	14
1.2.4 Pathogen erkennende Rezeptoren.....	14
<b>1.3 Toll-like Rezeptoren</b> .....	15
1.3.1 Struktur.....	16
1.3.2 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden.....	17
1.3.3 Endogene Liganden.....	18
1.3.4 Signaltransduktion.....	19
1.3.4.1 <i>Der MyD88 abhängige Signalweg</i> .....	19
1.3.4.2 <i>Der MyD88-unabhängige TRIF Signalweg</i> .....	20
<b>1.4 Der Toll-like Rezeptor 4</b> .....	22
1.4.1 Die Rolle des TLR4 bei kardiovaskulären Erkrankungen.....	23
<b>1.5 Fragestellung der Arbeit</b> .....	25
<b>2 Material und Methoden</b> .....	26
<b>2.1 Studiendesign</b> .....	26
<b>2.2 Mausstämme</b> .....	26
<b>2.3 Versuchsaufbau</b> .....	27
<b>2.4 Versuchstierhaltung</b> .....	27
<b>2.5 Die Induktion eines Myokardinfarkts im Mausmodell</b> .....	28
2.5.1 Die Anästhesie.....	28
2.5.2 Die Infarkt-Operation.....	28

2.5.3	Die Scheinoperation .....	29
2.5.4	Die Auswahl des Modells zur Mortalitätsstudie .....	29
<b>2.6</b>	<b>Die Linksventrikuläre Herzfunktion .....</b>	<b>30</b>
2.6.1	Die Methode der Druckmessung .....	31
2.6.2	Die hämodynamischen Parameter .....	32
2.6.3	Die Versuchsgruppen .....	32
2.6.4	Der operative Eingriff zur linksventrikulären Katheterisierung .....	32
2.6.5	Die Auswahl des Zeitpunktes .....	33
<b>2.7</b>	<b>Gewebeaufarbeitung für die histologischen und immunhistologischen Analysen .....</b>	<b>33</b>
2.7.1	Herzentnahme und -präparation .....	34
2.7.2	Herstellen von Paraffinschnitten .....	34
2.7.3	Herz- und Lungengewichtsmessung .....	34
<b>2.8</b>	<b>Histologie und Immunhistologie .....</b>	<b>35</b>
2.8.1	Die Hämalaun-Eosin Färbung .....	35
2.8.1.1	<i>Färbeprotokoll der HE-Färbung</i> .....	35
2.8.1.2	<i>Messung der Myokardinfarktgröße per HE Färbung</i> .....	36
2.8.2	Die Sirius Red Färbung .....	36
2.8.2.1	<i>Färbeprotokoll der Sirius Red Färbung</i> .....	37
2.8.3	Die CD3-Färbung .....	37
2.8.3.1	<i>Die ABC-Methode</i> .....	37
2.8.3.2	<i>Färbeprotokoll der CD3 Färbung</i> .....	38
2.8.4	Die TUNEL-Färbung .....	39
2.8.4.1	<i>Färbeprotokoll der TUNEL-Färbung</i> .....	39
<b>2.9</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>Allgemeines .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2</b>	<b>Die Parameter der linksventrikulären Herzfunktion .....</b>	<b>42</b>
3.2.1	Die Herzfrequenz 6 Tage nach Myokardinfarkt .....	42
3.2.2	Der linksventrikuläre Druck (LVP) .....	43
3.2.3	Die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit .....	44
3.2.4	Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) .....	45
3.2.5	Die linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit .....	46

3.2.6	Die Lungengewichte .....	47
3.2.7	Zusammenfassung der Ergebnisse der linksventrikulären Herzfunktion..	48
<b>3.3</b>	<b>Die Mortalitätsstudie .....</b>	<b>49</b>
<b>3.4</b>	<b>Linksventrikuläres Remodeling .....</b>	<b>49</b>
3.4.1	Der Gesamtkollagengehalt im nicht-infarzierten Gewebe .....	50
3.4.2	Das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht.....	51
3.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse des linksventrikulären Remodelings	51
<b>3.5</b>	<b>Die kardiale Inflamationsreaktion .....</b>	<b>52</b>
3.5.1	CD3 positive T-Lymphozyten im infarzierten Gewebe .....	52
3.5.2	CD3 positive T-Lymphozyten in der Immunfärbung des infarzierten Gewebes .....	53
3.5.3	CD3 positive T-Lymphozyten im nicht-infarzierten Gewebe.....	54
3.5.4	CD3 positive T-Lymphozyten in der Immunfärbung des nicht-infarzierten Gewebes .....	55
3.5.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der kardialen Inflammation .....	56
<b>3.6</b>	<b>Die kardiale Apoptose .....</b>	<b>56</b>
3.6.1	TUNEL-positive apoptotische Zellen im infarzierten Gewebe .....	56
3.6.2	Die TUNEL-Färbung apoptotischer Zellen im infarzierten Gewebe .....	57
3.6.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der kardialen Apoptose.....	58
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Rolle des Immunsystems beim Myokardinfarkt.....</b>	<b>59</b>
4.1.1	Die beim Myokardinfarkt beteiligten Komponenten des Immunsystems ..	59
4.1.2	Die Rolle der Toll-like Rezeptoren beim Myokardinfarkt .....	60
<b>4.2</b>	<b>Die Studienparameter.....</b>	<b>62</b>
4.2.1	Die Rolle der Mortalitätsstudie.....	62
4.2.2	Die linksventrikuläre Herzfunktion und Prognose beim Myokardinfarkt ...	62
4.2.3	Die Rolle der kardialen Inflammation beim Myokardinfarkt .....	63
4.2.4	Die Rolle der Apoptose beim Myokardinfarkt .....	65
4.2.5	Die Rolle der kardialen Fibrose beim Myokardinfarkt.....	66
<b>4.3</b>	<b>Die Rolle einer TLR4-Defizienz beim Myokardinfarkt.....</b>	<b>67</b>
4.3.1	Die Auswirkungen der TLR4-Defizienz auf die Mortalität nach Myokardinfarkt.....	67

4.3.2	Die Auswirkungen einer TLR4-Defizienz auf die linksventrikuläre Herzfunktion nach Myokardinfarkt.....	67
4.3.3	Die Auswirkungen einer TLR4-Defizienz auf die Inflammationsreaktion nach Myokardinfarkt.....	68
4.3.4	Die Auswirkungen einer TLR4-Defizienz auf die Apoptose nach Myokardinfarkt.....	68
4.3.5	Die Auswirkungen eine TLR4-Defizienz auf das Remodeling nach Myokardinfarkt.....	69
<b>4.4</b>	<b>Die Bedeutung dieser Studie.....</b>	<b>70</b>
<b>4.5</b>	<b>Einschränkungen dieser Arbeit.....</b>	<b>70</b>
4.5.1	Methodenkritik.....	70
4.5.1.1	<i>Die operativen Verfahren.....</i>	<i>71</i>
4.5.1.2	<i>Die Anästhesie.....</i>	<i>72</i>
4.5.1.3	<i>Die transgenen Tiere.....</i>	<i>72</i>
4.5.1.4	<i>Die Färbungen.....</i>	<i>73</i>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>89</b>
7.1	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
7.2	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
7.3	<b>Wissenschaftliche Arbeiten.....</b>	<b>95</b>
7.4	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>96</b>
7.5	<b>Danksagung.....</b>	<b>97</b>
7.6	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>98</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Myokardinfarkt

Das Herz ist ein muskulöses Hohlorgan, das durch den Wechsel von Kontraktion und Dilatation wie eine Pumpe den Körperkreislauf mit Blut versorgt. Das dem Herzen selbst zugeführte Blut wird über den linken Ventrikel in den Sinus Aortae und von dort aus in die rechte und linke Herzkranzarterie zum Herzmuskel (Myokard) weitergeleitet. Kommt es zur Verengung oder gar zum Verschluss eines dieser Gefäße, bzw. einer der Abgänge, z. B. durch rupturiertes Plaquematerial oder einen Thrombus, bildet sich in dem von der betroffenen Arterie versorgten Gebiet rasch ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf aus (Ischämie). Bleibt der arterielle Verschluss innerhalb von 6 Stunden bestehen und stirbt aufgrund des Sauerstoffmangels Myokardgewebe ab, spricht man von einem akuten Myokardinfarkt. Eine neuere internationale Definition des Myokardinfarkts (MI) basiert auf dem Nachweis einer Veränderung der herzspezifischen Biomarker in Anwesenheit von Ischämie-Symptomen, sowie auf typischen Veränderungen im Elektrokardiogramm oder dem in einem bildgebenden Verfahren dargestellten Verlust von vitalem Myokardgewebe [1-5].

### 1.1.1 Einteilung

Das Myokard wird über die rechte und linke Herzkranzarterie, die aus dem Sinus Aortae hervorgehen mit Blut versorgt. Die rechte Herzkranz-/Koronararterie versorgt den rechten Vorhof, den rechten Ventrikel, den hinteren Teil des Septum interventriculare und gelegentlich Teile des linken Ventrikels. Die linke Herzkranz-/Koronararterie teilt sich in den Ramus circumflexus (RCX) und in den Ramus interventricularis anterior (RIVA, engl.: *LAD*) auf. Sie versorgt den linken Vorhof, den linken Ventrikel, den Großteil des Septum interventriculare und Anteile des rechten Ventrikels. Infarkte betreffen in den meisten Fällen die Muskulatur der linken Kammer [4,5].

Die Einteilung des MI erfolgt u. a. nach Größe und Lokalisation des Infarktes. Große Infarkte betreffen >30%, mittlere 10-30% und kleine <10% des Linken Ventrikels (LV). Lokalisiert werden können sie in der Vorder-, Seiten-, Hinter- und Unterwand des Herzens, oder in einer Kombination dieser. Weiter können sie zeitlich entsprechend den pathologischen Veränderungen eingeteilt werden: Der akute Myokardinfarkt (6h bis 7.Tag) ist geprägt durch eine Infiltration von polymorphkernigen Leukozyten

(Granulozyten), der heilende (7. bis 28.Tag) durch eine Infiltration von Fibroblasten und mononukleäre Leukozyten. Nach dem 28. Tag spricht man dann von einem abgeheilten Myokardinfarkt. Es zeigt sich ein Narbengewebe ohne jegliche zelluläre Infiltration [1,3,5].

#### 1.1.2 Klinik

Die beim MI auftretende Symptomatik ist vielfältig und kann sich u. a. in starken Brustschmerzen mit Ausstrahlung in Hals, Kiefer, linke Schulter und Arm äußern, wobei auch unspezifische Begleitsymptome wie Schwindel, Übelkeit, Erbrechen, Schweißausbrüche und Benommenheit auftreten können [1-4]. Zusätzlich kommt es noch häufig zu Blutdruckabfall, Herzrhythmusstörungen (HRST) und Symptomen einer Linksherzinsuffizienz (wie z. B.: Dyspnoe, Lungenödem, etc.). Patienten die einen MI erleiden beschreiben oft auch einen Vernichtungsschmerz, der bis zur Todesangst führt. Besonders bei Diabetikern können Infarkte aber auch unbemerkt ablaufen und werden nur durch EKG, Bildgebung und/oder herzspezifische Enzymdiagnostik erkannt [3,6,7,8].

#### 1.1.3 Diagnostik

Zum Nachweis eines akuten, sich entwickelnden oder frischen Myokardinfarktes, muss es zu einem typischen Anstieg der Herzenzyme Troponin oder CK-MB, als Zeichen der Myokardnekrose, in Verbindung entweder mit Ischämie-Symptomen (z. B. Brustschmerzen) oder EKG-Veränderungen (pathologischer Q-Wellen, ST-Hebung oder ST-Senkung) kommen. Weitere Beweiskriterien für einen MI wären auch eine vor kurzem durchgeführte Intervention an einem Herzkranzgefäß oder der Nachweis ischämischer Myokardveränderungen post mortem. Ein abgelaufener MI wiederum kann durch pathologische Q-Wellen in mehreren nacheinander durchgeführten EKG's in An- oder Abwesenheit einer durchgemachten Symptomatik und wiederum durch die erhöhten Enzymmarker festgestellt werden [1-3].

#### 1.1.4 Ätiologie

Weltweit sind immer noch Herz-Kreislaufkrankungen die häufigste Todesursache im Erwachsenenalter. Hierbei vor allem die Koronare Herzerkrankung (KHK), eine chronische Erkrankung der Herzkranzgefäße, bei der es aufgrund von Veränderungen

der Gefäße (Arteriosklerose) zu Verengungen oder Verschlüssen der Koronararterien mit Ischämien des Myokards kommen kann [2,9]. Die Pathologie der Arteriosklerose besteht darin, dass es durch verschiedene Noxen zur Schädigung der Gefäßwand von Arterien mit nachfolgender Plaquebildung kommt [10]. Als Komplikation der KHK kann es dann durch einen inflammatorischen Prozess zur Plaqueruptur kommen, woraufhin es dann umgehend zur Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Bildung eines Thrombus kommt, der akut das gesamte Gefäß verschließen kann und so zum MI führt [2]. Hauptrisikofaktoren zur Entstehung einer KHK sind Bluthochdruck, Störungen des Fett- und Zuckerstoffwechsels, Rauchen, Übergewicht, Adipositas und psychosoziale Faktoren [9]. Weitere Risikofaktoren sind körperliche Inaktivität, ungesunde Ernährung, Alkoholabusus, linksventrikuläre Hypertrophie und die Einnahme bestimmter Medikamente. Nicht beeinflussbare Faktoren sind zunehmendes Alter, das männliche Geschlecht und erbliche Faktoren [9,11-16]. Auslöser des MI können u. a. Anstrengung, kaltes Wetter und starke emotionale Aufregung sein.

#### 1.1.5 Epidemiologie

Laut einem Bericht der WHO vom Jahr 2002 führt die KHK mit 7,2 Millionen Toten weltweit die Todesursachenstatistik vor allen anderen Krankheiten an [9].

Obwohl in Deutschland die Sterblichkeit bei den Herz-Kreislauf-Erkrankungen in den letzten Jahren gesunken ist, gehören sie auch hier noch immer zu den Haupttodesursachen [17]. So verstarben im Jahr 2006 von insgesamt 821.627 Personen 358.953 (43,7%) an Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems. Speziell an der KHK erlagen im selben Jahr insgesamt 144.189 Menschen (>91% ältere Patienten über 65 Jahre). Aus dieser Gruppe verstarben insgesamt 64.796 Personen (7,9%) an einem MI. Davon waren 29.165 Frauen und 35.631 Männer [9,17,18]. Die volkswirtschaftliche Bedeutung wird deutlich wenn man die Krankheitskostenstatistik des Statistischen Bundesamtes für das Jahr 2004 betrachtet. Die Gesamt-Krankheitskosten beliefen sich insgesamt auf 224,9 Milliarden Euro, wovon die Kosten der Krankheiten des Kreislaufsystems mit 35,3 Milliarden Euro (15,6%), wie in den vergangenen Jahren, immer noch die Spitzenreiter sind. Die ischämischen Herzkrankheiten machten einen Anteil von 2,8% aus [19].

### 1.1.6 Pathophysiologie

Die Auswirkungen des MI auf die Herzfunktion sind abhängig von der Größe des Infarktes, von der Lokalisation und der Restdurchblutung des betroffenen Gebietes [20]. Das infarzierte Gewebe beteiligt sich nicht mehr an der normalen Herzfunktion, so dass sich einerseits die diastolische und systolische Herzfunktion verändert, als auch die elektrische Reizleitung unterbrochen werden kann. Die gefährlichsten Akutkomplikationen des MI sind die Herzrhythmusstörungen, die die Haupttodesursache nach MI sind [21]. Bereits im Frühgeschehen des MI können sich Frühremodeling, Linksherzinsuffizienz, Myokardwandrupturen, Aneurysmata oder ein kardiogener Schock ausbilden [20,22,23,24]. Der Organismus versucht diesen Vorgängen aber auch entgegenzusteuern, indem es etwa das neuroendokrine System und das Sympathischen Nervensystems aktiviert. Über den Frank-Starling-Mechanismus und Hypertrophie des gesunden Myokards wird versucht die verminderte Auswurfleistung zu kompensieren [22,25,26]. Schreiten die pathologischen Prozesse fort, kann es konsekutiv zur Zunahme des Remodelings, zur chronischen Herzinsuffizienz, zur Ausbildung von Lungenödemem, Arrhythmien, arteriellen Embolien, Perikarditis und Herzwandaneurysmata kommen. Die Gefahr des Herzversagens und plötzlichen Herztodes ist groß [20,22].

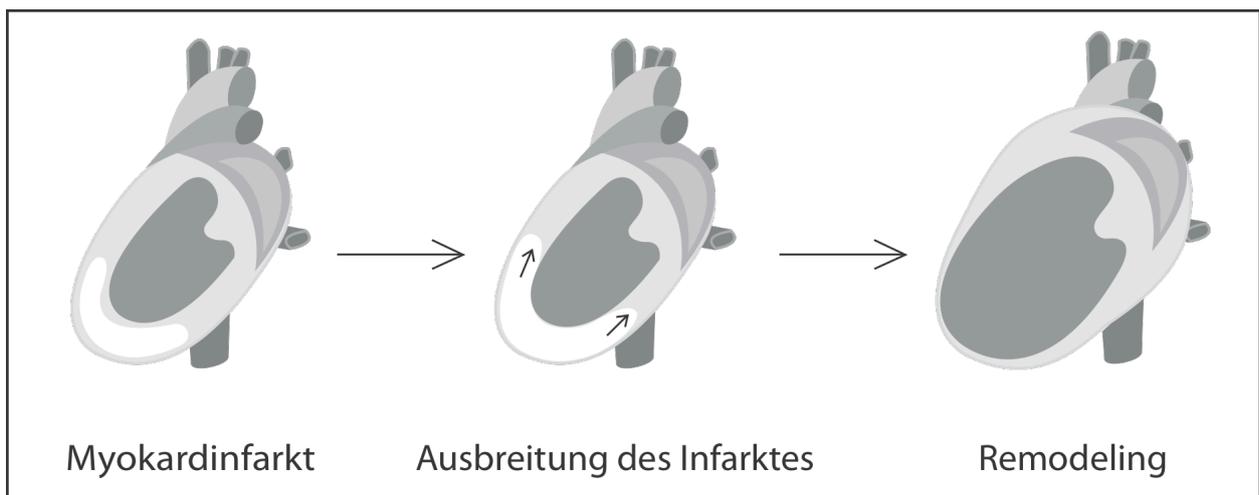
### 1.1.7 Kardiales Remodeling

Die Hauptdeterminanten die die Prognose von MI Patienten bestimmen sind Infarktgröße und Remodeling. Beim Remodeling handelt es sich um einen Prozess, bei dem Ventrikelgröße, -form und -funktion durch neuroendokrine, mechanische und genetische Faktoren reguliert werden [27]. Dieser Prozess kann sowohl im Rahmen von physiologischen Vorgängen wie z. B. Wachstumsprozessen (z. B. bei Sportlern), als auch im Rahmen von ischämischen Prozessen ablaufen. Beim letzteren handelt es sich um einen chronischen Maladaptationsprozess des infarzierten und des nicht-infarzierten Gewebes, bei dem es zur Ausdünnung und Dehnung (Ventrikeldilatation) des infarzierten und später zur Myozyten- und Myokardwandhypertrophie des nicht-infarzierten Gewebes kommen kann (Abb.1). Die weiter voranschreitende Fibrosierung, Narbenbildung und Wandversteifung des Myokards begünstigt eine Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion. Im schlimmsten Fall kann dies bis zum Herzversagen

führen, was entscheidend für die Prognose nach MI ist [28]. Betroffen vom Remodeling sind also sowohl infarziertes als auch nicht-infarziertes Gewebe [29].

Beginn des ganzen Prozesses ist die durch die Ischämie ausgelöste Nekrose von Myozyten, die über ein komplexes Zusammenspiel von Rezeptoren, Zytokinen, Zellen, Matrixbestandteilen und Apoptosevorgängen im Myokard zur Inflammationsreaktion führt, welche wiederum Voraussetzung für Infarktheilung und Remodeling ist [30,31,32]. In verschiedenen Studien an Mäusen wurden dieselben pathologischen Veränderungen nach MI registriert wie man sie von anderen Tiermodellen her oder vom Menschen kennt. Der Unterschied zum Menschen liegt darin, dass die Vorgänge zeitlich protrahiert ablaufen, was mit dem kleineren Körper und dem schneller ablaufenden Metabolismus der Mäuse zusammenhängen mag [28,33,34].

Abb.1: Über den Myokardinfarkt zum Remodeling mit Ventrikeldilatation



## 1.2 Das Immunsystem

Der Mensch besitzt zur Abwehr von Krankheitserregern wie pathogenen Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten), fremdartigen Substanzen und entarteten körpereigenen Zellen ein Immunsystem. Dieses System dient der Abwehr von Krankheitserregern durch spezifische und unspezifische Maßnahmen, die die für den Organismus gefährlichen Erreger erkennen und eliminieren. Die spezifische Immunantwort obliegt dem erworbenen, adaptiven Immunsystem, während die unspezifische Immunantwort Teil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems ist.

Beide Teile des Immunsystems sind miteinander verzahnt und bestehen aus Zellen, Rezeptoren, Zytokinen und humoralen Faktoren [35].

### 1.2.1 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive, spezifische Immunsystem erkennt und eliminiert mit hoher Präzision fremdartige oder pathogene spezifische Molekülstrukturen (Antigene). Daran beteiligt sind hoch spezifische Rezeptoren, Antikörper als humorale, sowie B- und T-Lymphozyten als zelluläre Bestandteile. Es entstand im Laufe der evolutionären Entwicklung aus dem angeborenen Immunsystem, und zeichnet sich aus durch eine hohe Anpassungsfähigkeit, eine hohe Antikörpervielfalt, einem immunologischen Gedächtnis und der Fähigkeit zwischen vielen körpereigenen und körperfremden Molekülstrukturen unterscheiden zu können [35,36].

Der Unterschied zum angeborenen Immunsystem liegt v. a. in der hohen Anpassungsfähigkeit der antigenspezifischen Rezeptoren der B- und T-Zellen und dem Besitz eines immunologischen Gedächtnisses. Bei B-Zellen bestehen die Rezeptoren aus membranständigen Immunglobulinen deren Vielfalt auf der Fähigkeit zu einem hohen Rearrangement (Umgruppierung) beruht. Die spezifischen T-Zell-Rezeptoren der T-Zellen jedoch erkennen Antigene nur nach Prozessierung und über Präsentation mit MHC-Molekülen durch antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und B-Lymphozyten) [37,38].

### 1.2.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene, unspezifische ist das entwicklungsgeschichtlich ältere Immunsystem und stellt die erste Verteidigungsbarriere des Organismus gegen eindringende pathogene Erreger dar. Es reagiert schnell gegen evolutionär hoch konservierte Strukturen der Erreger, sowie auf endogene Gefahrensignale, die bei Zellstress oder Zelltod freigesetzt werden. Zur ersten Barriere gegen eindringende Erreger gehören mechanische, physikalische und physiologische Bestandteile wie die Haut, Lysozym, kommensale Bakterien etc. Wird diese erste Barriere überwunden, stehen humorale Faktoren wie das Komplementsystem und Zytokine, sowie zelluläre Bestandteile (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und Natürliche Killerzellen), die Mediatoren freisetzen oder gar das Pathogen angreifen und phagozytieren, zur Verfügung [35].

Die Erkennung der spezifischen pathogenen Strukturen, der sogenannten pathogen assoziierten molekularen Muster (engl.: *Pathogen-associated molecular patterns, PAMP`s*), durch die zellulären Bestandteile des unspezifischen Immunsystems, erfolgt mittels spezieller Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden als Pathogen erkennende Rezeptoren (engl.: *Pathogen Recognition Receptors, PRR`s*) bezeichnet [39,40]. Erst das Zusammenspiel der beiden Immunsysteme ermöglicht eine angemessene Antwort auf die Krankheitserreger. So triggert das angeborene nach Aktivierung, das adaptive Immunsystem [35,41].

### 1.2.3 Pathogen assoziierte molekulare Muster

Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten besitzen PAMP`s, spezifische Molekülstrukturen, die essentielle Bestandteile der Mikroorganismen sind und entwicklungsgeschichtlich hoch konserviert vorliegen. D.h. dass ein Verlust dieser spezifischen Molekülmuster für den Mikroorganismus die Gefährdung des Überlebens bedeuten kann und sie deshalb einer äußerst geringen Mutationsrate unterliegen. Diese unveränderlichen Merkmale ermöglichen es dem angeborenen Immunsystem sowohl pathogene Erreger zu erkennen und eine spezifische Abwehr einzuleiten, als auch zwischen körperfremd und körpereigen zu differenzieren [36,39,40]. PAMP`s einer bestimmten Erregergruppe sind identisch, so z. B. Lipopolysaccharide (LPS), ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien. Weitere PAMP`s sind Peptidoglykane (PGN), Lipoteichonsäuren (LTA), Proteine, Lipoproteine und Lipopeptide, Nukleinsäuren, nicht methylierte CpG Muster bakterieller DNA, virale ss-RNA und Flagellin [42].

### 1.2.4 Pathogen erkennende Rezeptoren

Pathogen erkennende Rezeptoren (PRR`s) sind Proteininformationen, die Pathogene auf Grund spezifischer Molekülmuster (PAMP`s) erkennen und die Immunabwehr einleiten. Als Teil des angeborenen Immunsystems sind sie keimbahnkodiert, unterliegen keiner somatischen Rekombination, sind stetig vorhanden, unabhängig vom immunologischen Gedächtnis und erkennen Pathogene unabhängig von deren Entwicklungszyklus [39]. Sie befinden sich frei gelöst im Blut, an der Oberfläche von Immunzellen, im Zytoplasma, sowie an Endosomen- und Lysosomen-Membranen. Die verschiedenen

PRR`s reagieren jeweils mit denen für sie spezifischen PAMP`s. Einteilen kann man sie funktionell in signalweiterleitende und nicht-signalweiterleitende PRR`s.

PRR`s die keine Signalweiterleitung nach sich ziehen sind z. B. die auf Phagozyten befindlichen Transmembranproteine, die Krankheitserreger binden und zur Verdauung ins Zellinnere transportieren (Phagozytose). Ebenfalls zur Gruppe der nicht-signalweiterleitenden Rezeptoren gehören lösliche Faktoren wie die *Akute Phase Proteine* oder das *LPS-binding Protein*. Binden sie an ein Pathogen sind diese empfindlicher gegenüber Phagozytierung und dem Komplementsystem (Opsonierung).

Die Gruppe der signalweiterleitenden Rezeptoren wiederum besteht sowohl aus Transmembran- als auch aus Zytosolischen-Rezeptoren. Bindet ein Pathogen an ein signalweiterleitenden Rezeptor, werden spezifische intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert und es kommt zur Induktion von Zytokinen, die zur Immunzellaktivierung und Inflammationsreaktion, bis hin zur Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) führen kann. Im Gegensatz zu den Transmembran-Rezeptoren die mit ihrer extrazellulären Domäne z. B. Pathogene ausserhalb der Zelle identifizieren, erkennen die zytosolischen PRR`s in das Zellinnere eingedrungene Pathogene. In diese Gruppe gehören die NOD-LRR und CARD-Helikase Proteine. Sie erkennen neben bakteriellen auch virale Komponente [39,43,44]. Eine ganz bedeutsame Gruppe von signalweiterleitenden PRR`s in Säugetieren sind die Toll-like Rezeptoren (TLR`s).

Weitere PRR`s auf die hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll sind CD14, C-Typ Lektin Rezeptoren, RIG-I, Scavenger Receptor, etc. [45]. Die Tatsache das PRR`s Bestandteile des angeborenen, „unspezifischen“ Immunsystems sind, zeigt dass auch dieser Teil des Immunsystems sehr wohl über eine spezifische Komponente verfügt. Träger der PRR`s sind verschiedene immunologische Zellen, sowie nicht-immunologische Zellen [39,40,43].

### **1.3 Toll-like Rezeptoren**

Der Rezeptor „Toll“ wurde erstmals 1984 während der Forschungsarbeiten um die embryonale Entwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt und dort als einer der wesentlichen Bestandteile in der dorso-ventralen Ausrichtung des Embryos identifiziert. Sein Namen verdankt der Transmembranrezeptor der Klasse I

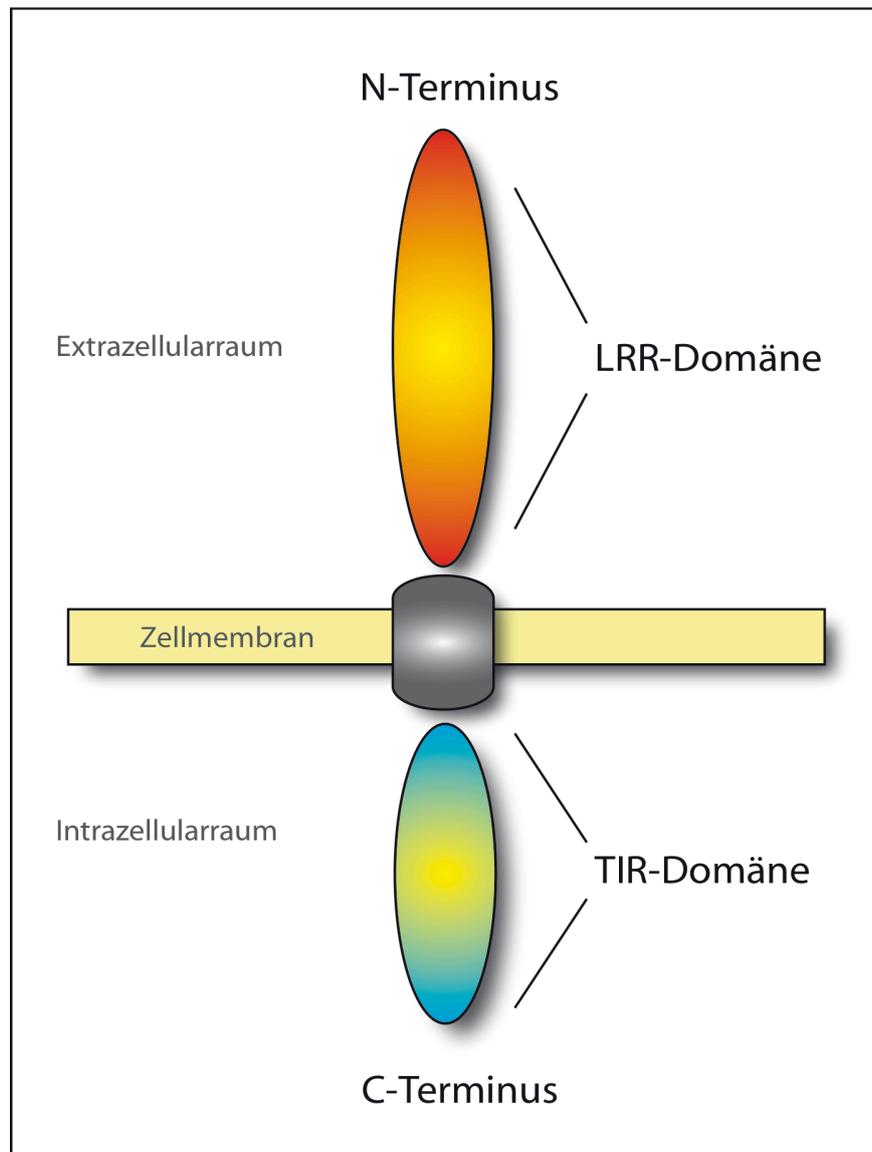
dem Ausruf „toll“ der beteiligten Forscher, als sie erstmals das für den Rezeptor kodierende Gen identifizierten [46]. Der Zusammenhang zwischen Toll-Rezeptoren und dem Immunsystem wurde erst in den neunziger Jahren entdeckt, als man erkannte das zwischen der C-terminalen Domäne des Toll Rezeptors und dem Interleukin-1 (IL-1) Rezeptor von Vertebraten eine wesentliche strukturelle Ähnlichkeit bestand. Der IL-1 Rezeptor ist der Rezeptor, der bei Inflammationsreaktionen durch das Zytokin IL-1 aktiviert wird.

Das der Toll Rezeptor mit dieser Toll-Interleukin-Rezeptor (TIR) Domäne zur Signaltransduktion nicht nur für die embryonale Entwicklung der Drosophila Fliege, sondern auch in der initialen Immunabwehr auf Infektionen eine wichtige Rolle spielt, wurde 1995 durch eine Entdeckung bestätigt, bei der er als Baustein der angeborenen Immunität zur Abwehr von Pilzen und Bakterien identifiziert wurde [47]. Im Verlauf der weiteren Genforschung entdeckten Immunologen dann korrespondierende Proteine des angeborenen Immunsystem beim Menschen, Homologe der Toll Rezeptoren [48], die seit dem als „Toll-like Rezeptoren“ bezeichnet werden [49].

### 1.3.1 Struktur

Toll Rezeptoren genauso wie auch Toll-like Rezeptoren sind transmembranäre Proteine des Typs I und bestehen aus drei Teilen (Abb.2). Der extrazelluläre Bereich besteht aus dem N-terminalen Ende mit einer leucinreichen Sequenz (engl.: *leucin rich repeat; LRR*), der für die Liganden-Erkennung zuständig ist, einer helikalen transmembranösen Struktur und dem zytoplasmatischen C-terminalen Ende, welches aufgrund seiner Homologie zur zytoplasmatischen Domäne des IL-1 Rezeptors der Vertebraten als TIR-Domäne (Toll-Interleukin I Rezeptor-Domäne) bezeichnet wird und für die Signalweiterleitung ins Zellinnere zuständig ist [50]. IL-1 Rezeptoren, Toll Rezeptoren, TLR`s und andere Proteine mit einer TIR-Domäne gehören zu einer evolutionär hoch konservierten Rezeptor-Superfamilie, die sich in Insekten, Nematoden, Pflanzen, Säugetieren und Menschen wieder finden und als PRR`s der Immunabwehr des jeweiligen Wirtes dienen [51].

Abb.2: Schematischer Aufbau des Toll-like Rezeptor; LRR-Domäne= *leucin rich repeat* Domäne; TIR-Domäne= Toll-Interleukin I Rezeptor-Domäne (modif. nach Sandor [42])



### 1.3.2 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden

Bisher konnten beim Säugetier 12 und beim Menschen 10 Toll-like Rezeptoren identifiziert werden. Sie werden auf vielen verschiedenen Geweben exprimiert (Herz, Leber, Lunge, etc.), auf Immunzellen und auf nicht Immunzellen. Besonders zahlreich findet man sie auf Antigen präsentierenden Zellen und phagozytierenden Zellen wie Makrophagen, Monozyten und Granulozyten [52,53]. Als Transmembran-Rezeptoren befinden sie sich auf der Zelloberfläche (TLR's 1, 2, 4, 5, 6, und 10) oder im Zellinnern

auf den Membranen von Endosomen und Lysosomen (TLR3, 7, 8 und 9). Teilweise formen sie zur Liganden-Erkennung Homo-, Hetero- oder auch Oligomere aus [54]. Die Einteilung kann neben der Lokalisation auch entsprechend ihrer spezifischen Antigenerkennung erfolgen. Die Oberflächenrezeptoren erkennen besonders gut Bestandteile von Mikroorganismen wie z. B.: Zellwandbestandteile von Bakterien, während die intrazellulär gelegenen TLR's u. a. bakterielle und virale Nukleinsäuren identifizieren und wahrscheinlich auch für die Unterscheidung zwischen eigener und fremd DNA zuständig sind. Allein die Rolle von TLR10 konnte bis jetzt noch nicht ausreichend geklärt werden [52,54].

### 1.3.3 Endogene Liganden

Zusätzlich zu den hoch konservierten Strukturen von Mikroorganismen (exogene Liganden) erkennen TLR's auch eine Vielzahl an endogenen Liganden. Ein Auftreten endogener Liganden kann eine für die Homöostase des Organismus bedenkliche Situation anzeigen und dem Immunsystem das Signal geben umgehend auf diese Gefahr zu reagieren. Solche Situationen könnten z. B. Gewebeschäden, Ischämien oder oxidativer Stress sein. Bei den endogenen Liganden kann es sich um Abbauprodukte von Makromolekülen, Produkte protolytischer Kaskaden, intrazellulär Bestandteile beschädigter Zellen oder Genprodukte, die bei Entzündungsreaktionen gebildet werden, handeln. Endogene Liganden haben also nicht unbedingt einen infektiösen Ursprung. Beispiele sind DNA-Immunglobulinkomplexe, endogene RNA nekrotischer Zellen, Nukleinsäuren und Hitze-Schock-Proteine (HSP). Bei Zellschäden jeglicher Art und Remodeling-Vorgängen der extrazellulär Matrix können endogene Liganden wie Hyaluronfragmente, Fibrinogen, Heparansulfat, Fibrinogen extra Domäne A, Surfactant Protein A und High-mobility group box I (HMGB I) Proteine freigesetzt werden. Sie werden hpts. von TLR4 erkannt [55,56,57]. Bindet nun ein endogener oder exogener Ligand an den für ihn spezifischen Toll-like Rezeptor, kann es zur Ausschüttung pro- oder auch anti-inflammatorischer Zytokine (Interferone, Interleukine, Koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktor), Chemokine (Lockstoffe der Immunzellen) und kostimulatorischer Moleküle kommen, die an der Elimination des Pathogens, der Wiederherstellung der Gewebe-Homöostase, der Aktivierung des adaptiven Immunsystems und der Initiierung einer Inflammationsreaktion beteiligt sind [55,57].

#### 1.3.4 Signaltransduktion

Jeder Toll-like Rezeptor aktiviert nach Ligandenbindung eine ihm eigene spezifische intrazelluläre Signalkaskade mit einer unterschiedlichen Kombination von Adaptermolekülen und unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren, die zur Induktion einer ihm eigenen spezifischen angeborenen immunologischen Antwort z. B. in Form eines charakteristischen Zytokinprofils führt. Unterschiedliche Signalkaskaden existieren aber nicht nur unter den verschiedenen TLR`s, sondern auch unter den gleichen TLR`s in verschiedenen Zelltypen und Geweben. Eine Aktivierung kann z. B. zur Reifung von dendritischen Zellen, Zytokinproduktion und konsekutiv zur Entfaltung des adaptiven, bzw. spezifischen Immunsystems führen.

Von den Adapterproteinen haben sich fünf als besonders wichtig erwiesen: MyD88, TIRAP (TIR-Domäne enthaltendes Adapterprotein, oder auch engl.: MAL=MyD88-adaptor-like), TRIF (TIR-Domäne enthaltendes IFN $\beta$ -induzierendes Adaptermolekül), TRAM (TRIF-verwandtes Adaptermolekül) und SARM (engl: sterile  $\alpha$ - and armadillo – motif-containing protein) [58]. Nach Aktivierung kann die Signalkaskade entweder über den MyD88 abhängigen oder über den MyD88 unabhängigen/ TRIF-abhängigen Signalweg verlaufen. Im Folgenden werden die Signalwege der Übersicht halber in vereinfachter Form (Abb.3) erläutert [52,54]. Nicht dargestellt sind negativ-Regulatoren wie SARM, die die Expression der TLR`s und den Ablauf der Signalkaskaden regulieren und die immunologische und inflammatorische Antwort einschränken oder beenden können [58]. Teil dieses Systems sind auch negative Feedback-Mechanismen der TLR`s. Alles in allem existiert ein komplexes Netzwerk aus Nebensignalen, die die Kaskaden positiv oder negativ beeinflussen können [59]. Es wird inzwischen angenommen, dass Störungen in diesem System zu überschüssenden Inflamationsreaktionen und Autoimmunerkrankungen führen können [60].

##### *1.3.4.1 Der MyD88 abhängige Signalweg*

Das Adaptermolekül MyD88 ist ein Universal-Adapter für inflammatorische Signalwege der von allen TLR`s außer TLR3 genutzt wird. Bindet nun ein Ligand an ein TLR des MyD88 abhängigen Signalweges, kommt es zur TIR-TIR Interaktion zwischen der TIR-Domäne des TLR`s und der des Adaptermoleküls. Es wird eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang gesetzt bei der Mitglieder der IRAK- (IL-1 Rezeptor-assozierte Kinase) und der TRAF- (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor-assoziierter Faktor)

Adapterfamilie rekrutiert werden. Über die Komplexbildung mit Ubc13 können zwei Signalwege aktiviert werden. Der eine Weg läuft über die IKK (I $\kappa$ B-Kinase Komplex) Komplexe und führt zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B in den Nukleus, was zur Expression vieler verschiedener pro-inflammatorischer Zytokin Gene führt. Der zweite Weg führt im Anschluss von Ubc13 zur Aktivierung von Mitgliedern der MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase) Familie, die den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren, der ebenfalls zur Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokin-Gene führt. Beim dritten MyD88 abhängigen Signalweg führt die Interaktion zwischen MyD88, TRAF 6 und einem IRAK-Mitglied zur Translokation von IRF5 (Interferon Regulator Faktor 5) in den Zellkern, und ebenfalls zur Produktion von Zytokinen.

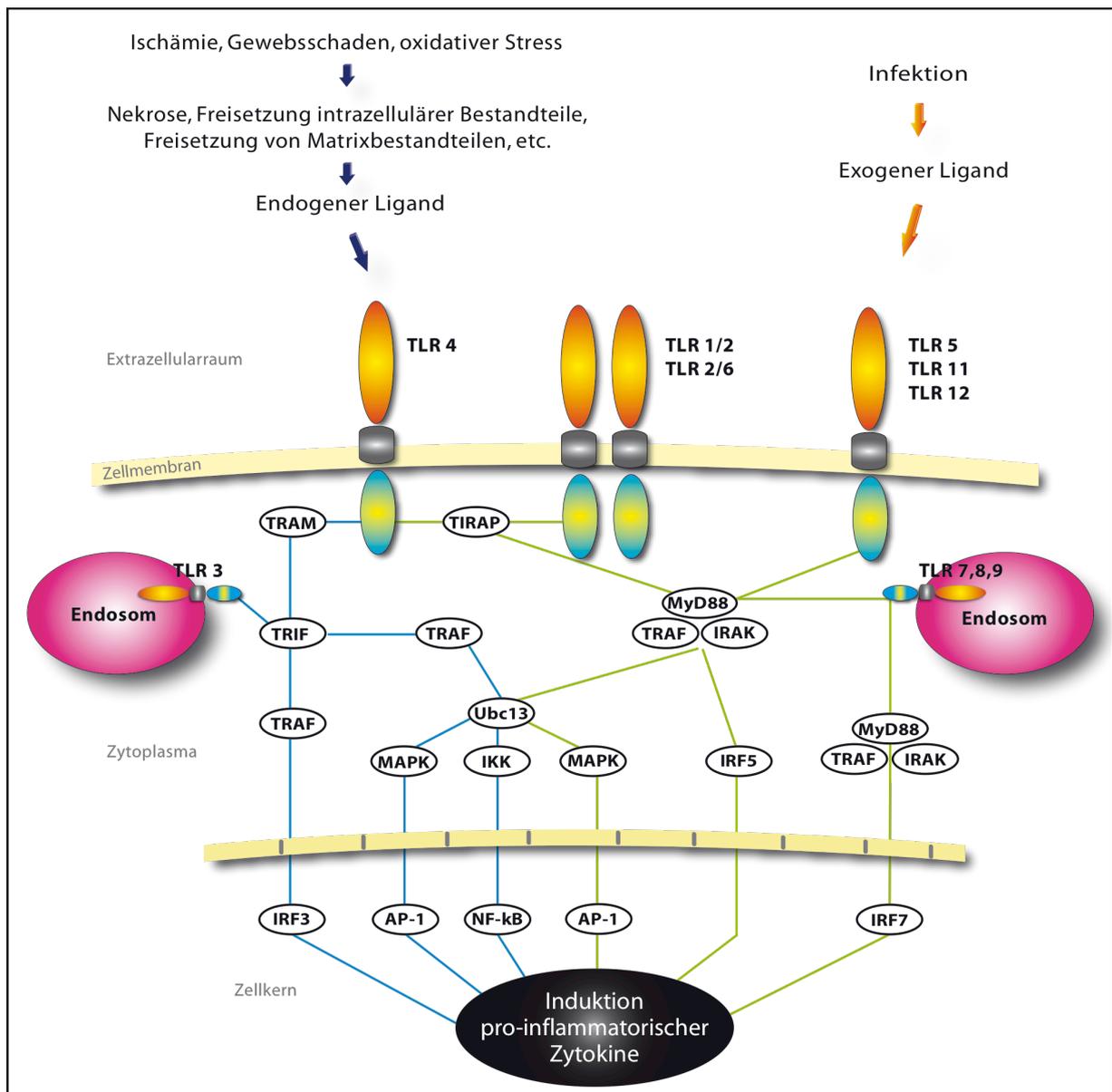
Die Toll-like Rezeptoren 4, 2, 1/2 und 2/6 aktivieren MyD88 via eines Adaptermoleküls mit dem Namen TIRAP. Der nachfolgende Signalweg ist dem gerade beschriebenen gleich. Eine Ligandenbindung an die Toll-like Rezeptoren 7, 8 und 9 führt ebenfalls zur Aktivierung von MyD88 mit seinen oben beschriebenen mannigfaltigen nachfolgenden Signalwegen oder alternativ zur Komplexbildung von MyD88 mit TRAF6, IRAK4, IRAK1 und IRF7, was zur Phosphorylierung von IRF7 führt, welches dann in den Zellkern transloziert und die Ausschüttung von Interferonen proviziert.

#### *1.3.4.2 Der MyD88-unabhängige TRIF Signalweg*

Der Signalweg von TLR3 läuft über das Adapterprotein TRIF, der unabhängig von MyD88 und dessen Signalweg zur Aktivierung und Translokation von IRF3 (Interferon Regulator Faktor 3) in den Zellkern führt. Dies führt zur erhöhten Expression von Genen die für Interferone (IFN), besonders IFN Typ I und IFN  $\beta$  kodieren. Eine Aktivierung von TRIF kann auch über einen Nebenweg zur MyD88 unabhängigen Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern führen. TLR4 hingegen kann sowohl den MyD88 abhängigen Signalweg als auch über TRAM den TRIF-Signalweg aktivieren.

### Abb.3: Die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren

Endogene und exogene Liganden binden an die TLR's und aktivieren intrazelluläre Signalkaskaden, was zur Freisetzung von Mediatoren, die vielfältigste Effekte auf den Organismus haben, führen kann. Unter anderem kann es zur Induktion pro-inflammatorischer Zytokine kommen, welche eine Inflammationsreaktion initiieren (modif. nach Kawai [52]).



#### 1.4 Der Toll-like Rezeptor 4

Der erste Toll-like Rezeptor des Säugetiers, der dem Toll-Rezeptor der Drosophila Fliege homolog ist, wurde 1997 entdeckt und später als Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) identifiziert. Die Rolle des TLR4 im angeborenen Immunsystem wurde zu allererst im Zusammenhang mit der Infektion durch LPS, einem Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien erforscht [48,61]. Man erkannte dass der TLR4 eine wichtige Rolle in der Vermittlung von Inflammationsreaktionen einnimmt.

Zur Erkennung von exogenen Liganden gebraucht der TLR4 kostimulatorische Moleküle wie MD-2, CD14 und LPS-bindendes Protein (LBP) [62]. Die bedeutsame Rolle des TLR4 in der LPS Erkennung und der Auslösung der Inflammationsreaktion wurde bereits gründlich untersucht [63]. Dabei wurde auch entdeckt dass in LPS stimulierten Makrophagen die Aktivierung von TLR4 im Sinne eines positiven Feedback Mechanismus zur Hochregulierung von TLR2 führen kann [64]. Weitere exogene Liganden von TLR4 sind neben bakteriellem LPS, Bestandteile von Pilzen (z. B. Mannan), Protozoen (z.B. Glycoinositolphospholipide) und Viren (z. B. Fusionsproteine des RS-Virus) [65]. Wie bereits erwähnt kann der TLR4 sowohl den MyD88 abhängigen als auch den MyD88-unabhängigen Signalweg aktivieren [52,58]. Je nach betroffenem Zelltyp (z. B. Myozyt, Endothelzelle oder immunologische Zelle), Ligand und Signalweg kann das Muster an freigesetzten Mediatoren und deren Wirkung äußerst vielfältig sein. Die Initialisierung einer Inflammation über TLR4 kann aber auch über endogene Liganden, die bei Gewebestress, -ischämie oder -schaden freigesetzt werden, erfolgen. Dabei werden die TLR`s durch Zellnekrose, freigesetzte Zellbestandteile, Matrix-Bruchstücke und Sekretionsprodukten gestresster Zellen aktiviert. Als endogene Liganden für TLR4 wurden inzwischen HSP 60/70, HMGB I, Fibrinogen, Heparansulfate, Hyaluronan Oligomere, Extra Domäne A Fibronectin, oxidativer Stress, Fettsäuren u. v. m. identifiziert [42,55-57,65,66]. Bisher konnte man den Toll-like Rezeptor 4 auf Mastzellen, Neutrophilen Granulozyten, Dendritischen Zellen, B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, und im kardialen Bereich auf Endothelzellen, Kardiomyozyten und Fibroblasten lokalisieren [67,68,69].

#### 1.4.1 Die Rolle des TLR4 bei kardiovaskulären Erkrankungen

Die Rolle des TLR4 wurde bereits in Zusammenhang mit verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen erforscht und dabei wichtige Ergebnisse erzielt. Durch eine Vielzahl von Forschungsarbeiten weiss man daher, dass TLR4 als Rezeptor des angeborenen Immunsystems einen entscheidenden Einfluss auf kardiale Stress- und Inflammationsreaktionen hat.

Bei bakterieller Sepsis z. B. kann es LPS-vermittelt zur Aktivierung von TLR4 kommen. Dies kann konsekutiv zum septischen Schock, zur kardiovaskulären Inflammationsreaktion, zur linksventrikulären (LV) Dysfunktion und als letzte Konsequenz zum Herzversagen führen. Hämodynamische Messungen mittels Konduktanzkatheter und Echokardiografie ergaben, dass bei TLR4-defizienten Mäusen die mit LPS behandelt wurden, im Vergleich geringere Veränderungen in den charakteristischen Parametern der kardialen Funktion entstanden [68,70]. In myokardialen Ischämie-Reperfusion (MI/R)-Modellen konnte man ebenfalls eine herausragende Rolle des TLR4 bei der Auslösung von kardialen Inflammationsreaktionen nachweisen. Die Infarktzone von TLR4-defizienten Mäusen waren kleiner, es gab eine geringere Infiltration mit polymorphkernigen Leukozyten, weniger oxidativen Stress und eine geringere Komplementaktivierung [67]. Ergebnisse aus Studien mit Eritoran, einem TLR4 Antagonisten zeigten ähnliche Ergebnisse im MI/R-Modell. Bei den mit Eritoran behandelten Tieren war die Zytokinproduktion abgeschwächt, die Inflammationsreaktion reduziert und die Infarktgröße vermindert [71]. Inzwischen weiss man das TLR2 und TLR4 auch mit der Inflammationsreaktion bei Atherosklerose im Rahmen der KHK assoziiert sind. Man entdeckte, dass beide Rezeptoren vermehrt in peripheren mononukleären Blutzellen [72] und in den atherosklerotischen Läsionen, besonders auf Endothelien und Makrophagen [73] exprimiert werden. Zudem zeigten Versuche an Mäusen, dass Tiere ohne TLR4 eine geringer ausgeprägte Atherosklerosebildung aufweisen [74]. Eine weitere Studie beschreibt, dass die in die Koronararterien infiltrierenden TLR4 tragenden Makrophagen, verantwortlich für Plaquestabilisierung und -ruptur seien [75,76].

In Versuchen mit an Coxsackie B Virus infizierten Mäusen registrierte man eine erhöhte Expression an TLR4 in Mastzellen und Makrophagen, ein erhöhtes Aufkommen an Mastzellen, sowie eine gesteigerte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen im

Herzen. Dabei zeigte sich dass diese Vorgänge mit dem Auftreten von kardialen Autoimmunerkrankungen assoziiert sind. So kann eine Aktivierung von TLR4 auch zur akuten Myokarditis führen [77]. Aortic-banding Experimente zeigten einen Zusammenhang zwischen erhöhter Druckbelastung des Herzens, TLR4, und Myokardwandhypertrophie. So scheint die Aktivierung des TLR4 einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese der Myozytenhypertrophie zu haben [78]. Bei Patienten mit kardialer Dysfunktion und Herzversagen konnten nach Aktivierung von TLR4 erhöhte Parameter an eNos, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  im Myokard gemessen werden. Für diese Marker ist ein kardio-depressiver Effekt nachweisbar [79]. Besonders TNF- $\alpha$  hat einen fördernden Einfluss auf die Herzwandhypertrophie, die Ventrikeldilatation und das Herzversagen [69,80,81,82]. In einer Forschungsarbeit von Riad et al., bei der TLR4-defizienten Mäusen das Zytostatikum Doxorubicin verabreicht wurde, kam man zu dem Ergebnis, dass die TLR4-Defizienz zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion und zu einer Abschwächung von pathophysiologischen Schlüsselmechanismen bei Doxorubicin induzierter Kardiomyopathie führt [83].

Neben den MI/R-Modellen gab es bisher jedoch nur wenige Arbeiten, die sich mit der Rolle des TLR4 bei einer chronischen Ischämie wie beim Myokardinfarkt auseinandergesetzt haben. Ein Myokardinfarkt führt zur Inflammationsreaktion und Abbau extrazellulärer Matrix, beides Schlüsselereignisse des Remodelings. Dabei wird vermutet, dass die TLR's eine entscheidende Rolle in der Triggerung des Immunsystems und der Inflammationsreaktion über die Exprimierung von Zytokinen, den Abbau der extrazellulären Matrix und die Induktion der Produktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP's) in Monozyten spielen. Die Aktivierung von TLR4 beim MI erfolgt dabei vermutlich über endogene Liganden wie HSP-60, HMGB 1, Extradomäne A des Fibrinogens, oxidativen Stress, etc. [84,85,86]. Als für die Zytokinproduktion und Inflammationsreaktion verantwortlichen Zellen beim MI wurden schon in früheren Studien TLR4 tragende Myozyten und zirkulierende Monozyten identifiziert [87]. In einer kürzlich durchgeführten Studie an Patienten mit MI und stabiler Angina pectoris fand man heraus, dass TLR4 nicht nur in zirkulierenden Monozyten, sondern auch lokal in den rupturierten Plaques verstärkt exprimiert wird. Als stimulierender Ligand wurde in dieser Studie HSP-70 identifiziert [88]. Alles in allem haben sich bisher viele Arbeiten mit der Rolle des TLR4 bei kardiovaskulären Erkrankungen befasst, aber keine mit der Rolle des TLR4 beim induzierten Myokardinfarkt im experimentellen Tiermodell.

## **1.5 Fragestellung der Arbeit**

Folgende Fragen sollten im Rahmen der Dissertation beantwortet werden:

1. Hat eine TLR4-Defizienz einen Einfluss auf die linksventrikuläre Herzfunktion nach Myokardinfarkt im Tiermodell?
2. Inwieweit ist die kardiale Inflammation durch eine TLR4-Defizienz beeinflusst?
3. Geht eine mögliche Veränderung der linksventrikulären Herzfunktion mit einer Veränderung von linksventrikulären Umbauprozessen (Remodeling) des nicht-infarzierten Gewebes einher?
4. Wirkt sich eine TLR4-Defizienz auf die Apoptoserate nach Myokardinfarkt aus?
5. Hat eine TLR4-Defizienz auch einen Einfluss auf die Mortalitätsrate nach Myokardinfarkt?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Um die Rolle des TLR4 Rezeptors beim MI zu untersuchen, wurde im experimentellen Tiermodell zuerst in einer Pilotstudie im ersten Set (n=10 Tiere) der Versuchsreihe die Grösse der induzierten Myokardinfarkte mittels digitaler Bildanalyse quantifiziert, um somit die Methode der makroskopisch ermittelten Infarktgrößen zu validieren. Zur Erfassung des Grades an Herzversagen wurde in einem zweiten Set zur Untersuchung der linksventrikulären (LV) Herzfunktion und des Ausmaßes des Lungenödems bei Mäusen mit einem intakten TLR4 Rezeptor (Wildtypmäuse; WT) und zum anderen bei Mäusen mit einem fehlendem TLR4 Rezeptor (TLR4-defiziente Mäuse; KO) durch Ligation des RIVA ein MI provoziert (WT-MI und KO-MI), und dann nach 6 Tagen eine in vivo Druckmessung des Herzens und im Anschluss daran eine feucht/ trocken Lungengewichtsmessung durchgeführt (n=8 pro Gruppe). Zur Untersuchung des linksventrikulären Remodelings und der Inflammationsreaktion wurde den Tieren des zweiten Sets dann nach Beendigung der Druckmessungen Herz und Lunge zu histologischen und immunhistologischen Analysen herauspräpariert und entsprechend aufbereitet (n=6 pro Gruppe). Zur Bestimmung des Ausmaßes des LV-Remodelings wurde in den Gruppen ermittelt: der Gesamt-Kollagengehalt im nicht-infarzierten Anteil des Myokards, das Herzgewicht und das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht (als Maß für die myokardiale Hypertrophie beim Remodeling). Das Ausmaß der Inflammationsreaktion wurde via Messung von CD3 positiven T-Lymphozyten im infarzierten und nicht-infarzierten Myokard bestimmt. Die Apoptoserate im Rahmen der Inflammationsreaktion wurde im infarzierten Myokard ermittelt. Als Kontrollgruppe dienten jeweils schein-operierte WT und KO Mäuse. Im dritten Set wurde für eine Mortalitätsstudie bei Mäusen eine Ligation des Ramus interventricularis anterior (RIVA) kurz nach Abgang aus der linken Herzkranzarterie durchgeführt und so ein MI provoziert. Im Anschluss daran wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen die Mortalitäts-/Überlebensrate in diesem Set beobachtet (n=60 pro Gruppe).

### **2.2 Mausstämme**

Für die Studie wurden zum einem männliche C57BL/10ScSn Wildtyp (WT) und zum anderem männliche TLR4-defiziente C57BL/10ScN knock-out (KO) Mäuse verwendet,

welche aus den Laboren des Max-Planck-Instituts für Immunologie (Freiburg, Deutschland) stammen. Aufgezüchtet wurden die Tiere im Forschungsinstitut für Experimentelle Medizin (Berlin, Deutschland). Die tierexperimentellen Versuche liefen entsprechend den Richtlinien der Ethikkommission der Charité-Campus Benjamin Franklin und des National Institutes of Health (Bethesda, MD) for the care and use of laboratory animals ab.

### 2.3 Versuchsaufbau

Zu Beginn der Studie wurden die Tiere in folgende Sets und Gruppen randomisiert:

#### Set 1 Pilotstudie zur Validierung der makroskopisch ermittelten Infarktgröße

1. Gruppe	n=10	WT-MI Mäuse	Wildtypmäuse mit TLR4 und MI
-----------	------	-------------	------------------------------

#### Set 2 Kardiale Druckmessung und histologische sowie immunhistologische Aufbereitungen 6 Tage nach Myokardinfarkt

1. Gruppe	n=8/ n=6	WT-MI Mäuse	Wildtypmäuse mit TLR4 und MI
2. Gruppe	n=8/ n=6	KO-MI Mäuse	TLR4-defiziente Mäuse mit MI
3. Gruppe	n=8/ n=6	WT Mäuse	Wildtypmäuse ohne MI als Kontrolle; Scheinoperation
4. Gruppe	n=8/ n=6	KO Mäuse	TLR4-defiziente Mäuse ohne MI als Kontrolle; Scheinoperation

#### Set 3 Mortalitätsstudie

1. Gruppe	n=60	WT-MI Mäuse	Wildtypmäuse mit TLR4 und MI
2. Gruppe	n=60	KO-MI Mäuse	TLR4-defiziente Mäuse mit MI

### 2.4 Versuchstierhaltung

Die Versuchstiere waren während des Ablaufs der Versuchsreihen in den Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin des Campus Benjamin Franklin der Charité Universitätsmedizin Berlin untergebracht, in dessen Räumen auch der tierexperimentelle Teil der Studie mit der Tierversuchsantrags-Nr. G 02277/05 (LaGeSo) ablief. Die Tiere wurden in Standardkäfigen à sechs Tiere gehalten und hatten jeder Zeit Zugang zu Trockenfutter und Wasser. Die Temperatur der

Überdruckräume lag konstant bei 20°C. Eine Automatik-Lichtschaltung sorgte für einen hell-dunkel Wechsel im 12 Stunden Rhythmus. Zum Zeitpunkt der Operation hatten die Tiere ein Gewicht von ca. 30 Gramm.

## **2.5 Die Induktion eines Myokardinfarkts im Mausmodell**

Zur Induktion eines Myokardinfarktes wurden die Tiere anästhetisiert, thorakotomiert und der RIVA mittels eines 7-0er Fadens (Perma-Hand Seide, nicht resorbierbar) abgebunden. Anschließend wurde der Thorax unter Berücksichtigung der anatomischen Strukturen wieder verschlossen, die Maus behutsam aus der Narkose ausgeleitet und je nach Set das entsprechende Procedere durchgeführt.

### 2.5.1 Die Anästhesie

Zur Anästhesierung wurden die Tiere zuerst vornarkotisiert, dann um die Körpertemperatur während der Operation konstant zu halten in Rückenlage auf einer Heizplatte fixiert und mittels einer blauen Venenverweilkanüle (BD Venflon® Pro, 22GA) intubiert. Der Tubus wurde dann an eine Beatmungsmaschine (MiniVent type 845; Hugo Sachs Electronics, Germany) angeschlossen und mit einem Atemzugvolumen von 300µl und einer Atemfrequenz von 250 Atemzügen pro Minute beatmet. Über den zuführenden Teil der Beatmungsmaschine wurde der Maus anhand einer Isofluranpumpe (Univentor 400 Anaesthesia Unit, Ser.-No: 2300289; Holland) kontinuierlich Isofluran (Forene®, Firma Abbott GmbH & Co. AG, Deutschland) mit einer eingestellten Fließgeschwindigkeit von 3,0 ml pro Stunde zur Aufrechterhaltung der Narkose zugeführt. Durch gleichmäßiges heben und senken des Thorax konnte die korrekte Lage des Tubus verifiziert werden. Zur Analgesie wurde dem Tier eine Aqua dest./ Temgesic Mischung (0,2 ml pro 30g Lebendgewicht einer Mischung aus 100µl Temgesic gelöst in 4 ml Aqua dest.) i.p. injiziert.

### 2.5.2 Die Infarkt-Operation

Zu Beginn der Operation wurde mit einer fein-chirurgischen Schere (Fine Science Tools, Deutschland) ein medianer Hautschnitt von kranial nach kaudal bis kurz vor das Xyphoid des Sternums durchgeführt. Behutsam wurde der Musculus (M.) pectoralis und der M. abdominalis rectus frei präpariert und einzeln aufgespannt. Unter zur Hilfenahme eines Mikroskops (Vision Engineering MANTIS) wurde der 4. Intercostalraum (ICR)

aufgesucht und mit einer Mikroschere (Fine Science Tools, Deutschland) der Thorax parallel zum Verlauf der Rippen eröffnet und mittels 6-0er Fäden (Mersilene<sup>®</sup>, nicht resorbierbar) aufgespreizt, um so einen freien Blick auf das Herz zu erlangen (Abb.4). Nach dem Eröffnen des Perikards wurde die RIVA der linken Herzkranzarterie mittels des Mikroskops und einer 8.0er Vergrößerung aufgesucht und mit einem 7-0er Faden möglichst proximal und immer auf gleicher Höhe umstochen und abgebunden. Das unmittelbar nach Zuziehen des Knotens ablassende Myokard distal der Ligatur, bestätigte den gelegten MI im Bereich des linken vorderen Ventrikels (Abb.5). Nach Verschließen des Thorax wurden der M. rectus abdominis und der M. pectoralis wieder in ihre ursprüngliche anatomische Lage gebracht und die Haut mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Als Wunddesinfektion diente jeweils Braunoderm<sup>®</sup> (Firma B. Braun Melsungen AG, Deutschland). Zur Ausleitung wurde unter Kontrolle der Atembewegungen die Atemfrequenz und das Atemvolumen gedrosselt bis das Tier anfangs wieder eigenständig zu atmen. Insgesamt hat jede OP mit Ein- und Ausleitung ca. 25 Minuten gedauert. Zur Durchführung von Operation und Narkose an den Mäusen konnte auf die in der Arbeitsgruppe von Tschöpe et al. gemachten Erfahrungen zurückgegriffen werden [89,90].

### 2.5.3 Die Scheinoperation

Bei den zur Kontrolle durchgeführten Scheinoperationen wurde exakt die selbige Operationstechnik angewandt, außer dass die Fadenligatur nicht um die RIVA sondern neben ihr ins Myokard gelegt wurde. Damit entstand keine weiße Färbung der distal der Ligatur gelegenen Myokardabschnitte, sprich es wurde kein MI ausgelöst.

### 2.5.4 Die Auswahl des Modells zur Mortalitätsstudie

Um die Rolle des TLR4 Rezeptors beim MI zu untersuchen legten wir bei WT- und KO-Mäusen (n= 60 pro Gruppe) einen Myokardinfarkt und beobachteten über einen Zeitraum von 28 Tagen die Mortalität bzw. Überlebensraten in beiden Gruppen. Der erste überlebte Tag nach der Operation galt als Tag Eins der Zählung. Im Verlauf wurde dann an jedem Tag möglichst zum selben Zeitpunkt überprüft, wie viele Tiere pro Tag verstorben sind bzw. überlebt haben. Zur bildlichen Darstellung der Ergebnisse wählten wir die Kaplan-Meier Kurve, da sie im Rahmen der Statistik für Ereigniszeitanalysen gebraucht wird. Bei diesen Analysen wird die Zeit bis zum Eintreten eines bestimmten

Ereignisses zwischen zwei oder mehr Gruppen verglichen, um zum Beispiel die Wirkung von schädlichen Faktoren abzuschätzen. Das entstehende Liniendiagramm eignet sich gut zur Darstellung von Verläufen und von Veränderungen im Zeitverlauf. Es wurde die Anzahl der überlebenden Tiere in Prozent, über die Zeit in Tagen aufgetragen. So konnte auf einfache und anschauliche Art und Weise die Überlebensrate dargestellt werden. Anhand der überschaubaren Dauer der Mortalitätsstudie und deren Reproduzierbarkeit, erwies sie sich für diese Arbeit als besonders geeignet, um den Einfluss einer TLR4-Defizienz auf das Überleben nach MI zu untersuchen.

Abb.4: Der eröffnete Mäuse-Thorax.

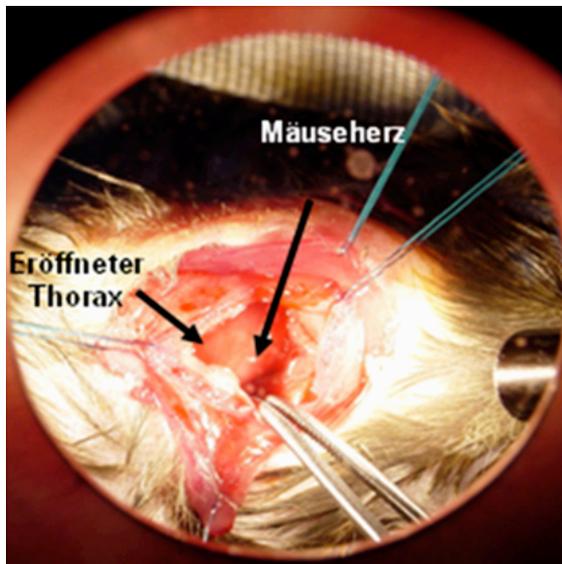
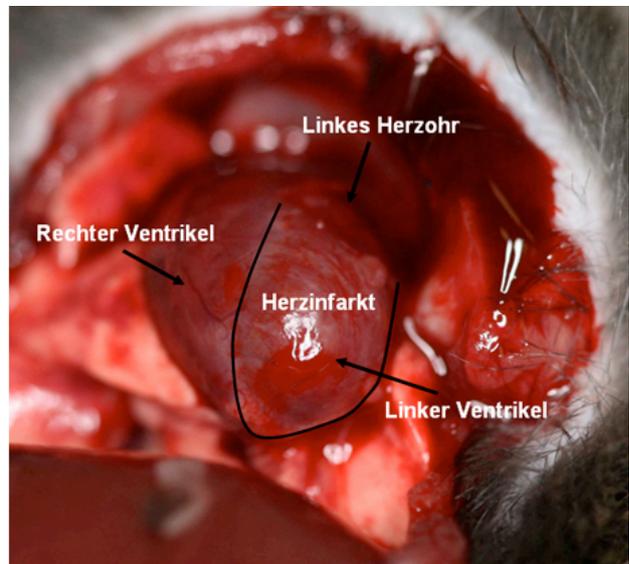


Abb.5: Aufsicht auf das Herz mit Ligatur.



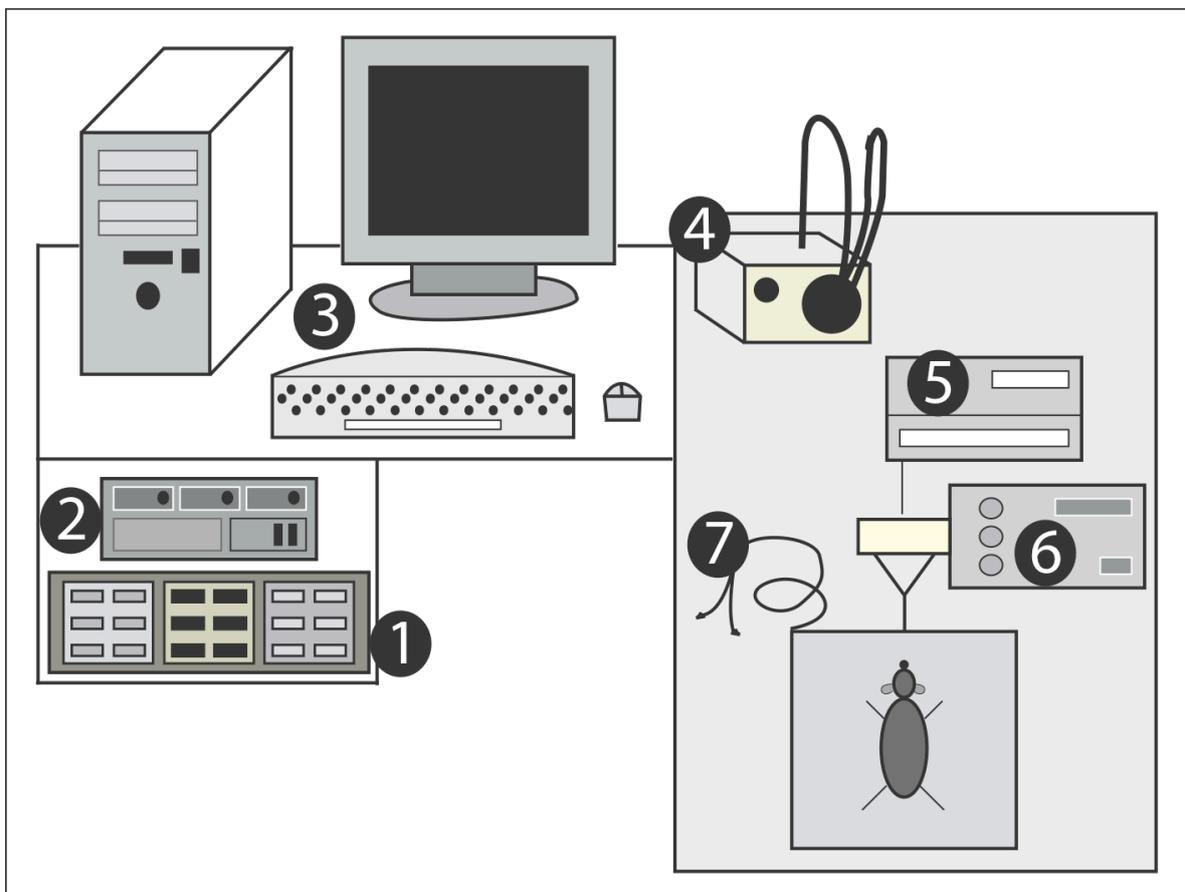
## 2.6 Die Linksventrikuläre Herzfunktion

Um die Rolle des TLR4 Rezeptors auf die LV-Herzfunktion nach MI zu untersuchen, haben wir im zweiten Set mit WT, KO, WT-MI und KO-MI Mäusen (n=8 pro Gruppe) sechs Tage nach MI im *closed-chest* Modell (bei geschlossenem Thorax) die Tiere erneut narkotisiert und mittels eines Herz-Katheters Druckkurven aus dem linken Ventrikel abgeleitet. Anhand dieser Druckkurven konnten wir verschiedene kardiologische Funktionsparameter bestimmen, die Auskunft über Veränderungen der systolischen und diastolischen linksventrikulären Herzfunktion und somit über den Grad des Herzversagens gaben [91].

### 2.6.1 Die Methode der Druckmessung

Für diese Untersuchung verwendeten wir einen Herz-Katheter (1,4 French; Millar Instruments, USA), der retrograd über die A. carotis communis in den linken Ventrikel der narkotisierten Tiere eingebracht wurde und dort Druckschwankungen registrierte. Das Messsignal wurde über einen Verstärker an einen Messwandler und schließlich an den Computer weitergeleitet (Abb.6). Eine spezielle Software speicherte und wertete die gemessenen Werte aus und errechnete dann in Abhängigkeit von der Zeit als Maß für die systolische Funktion: LVP, HF,  $dP/dt_{\max}$  und als Maß für die diastolische Funktion: LVEDP und  $dP/dt_{\min}$ . Des Weiteren ist der Herz-Katheter noch an einen Transducer angeschlossen, über den man die Kalibrierung vornimmt. Diese sollte vor jeder Messreihe durchgeführt werden, indem zuerst das Transducer-Messsignal an den Computer und dann als zweites das Messsignal des Herz-Katheters kalibriert wird.

**Abb.6:** Der Arbeitsplatz zur Druckmessung:1. Verstärkereinheit, 2. Messwandler, 3. Computer, 4. Leuchte, 5. Isofluranpumpe, 6. Beatmungsmaschine, 7. TIP-Katheter



### 2.6.2 Die hämodynamischen Parameter

Der Herzzyklus wird unterteilt in Systole und Diastole. Die Systole ist die Kontraktionsphase, bei der das Blut aus den Ventrikeln hinausbefördert wird, die Diastole ist die Relaxationsphase, bei der sich die Ventrikel mit Blut füllen. Folgende systolischen und diastolischen Parameter stellen repräsentative Parameter zur Beschreibung der LV-Funktion dar:

- LVP: Der linksventrikuläre Druck (LVP) ist der höchste gemessene Druck im linken Ventrikel und wird in mmHg angegeben.
- $dP/dt_{max}$ : Die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) beschreibt die Kontraktilität des linken Ventrikels. Die Einheit ist mmHg pro Sekunde.
- HF: Die Herzfrequenz (HF) gibt die Herzschläge pro Minute an und hat die Einheit Schläge pro Minute [Schläge/min.].
- LVEDP: Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) wird am Ende der Diastole kurz vor Beginn der systolischen Kontraktion im linken Ventrikel gemessen. Er wird in mmHg angegeben.
- $dP/dt_{min}$ : Die linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{min}$ ) ist ein Parameter der diastolischen Relaxation. Er wird in mmHg pro Sekunde angegeben.

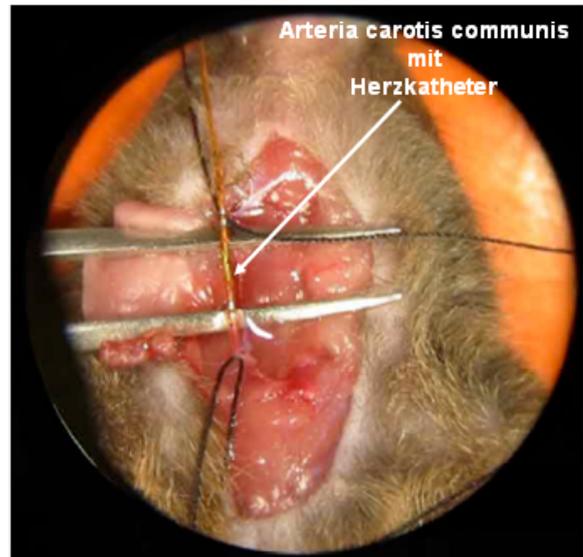
### 2.6.3 Die Versuchsgruppen

Für dieses Set wurde jeweils eine Gruppe von n=15 WT-MI und n=15 KO-MI Mäusen operiert und von diesen jeweils nur diejenigen Tiere zur Studie zugelassen, die eine gleiche MI-Größe von größer 50% hatten, so dass zwei Gruppen mit je 8 Tieren zur Druckmessung entstanden. Als Kontrolle dienten schein-operierte WT und KO Mäuse (ebenfalls n=8 pro Gruppe).

### 2.6.4 Der operative Eingriff zur linksventrikulären Katheterisierung

Die Mäuse des zweiten Sets wurden sechs Tage nach MI erneut narkotisiert und ein medianer Hautschnitt von der Fossa jugularis manubrium sterni bis knapp unterhalb des Mandibularbogens am überstreckten Kopf durchgeführt. Nach Durchtrennung der Speicheldrüsen und der Schilddrüse wurde der M. sternocleidomastoideus beidseits frei

präpariert und durch einen medianen submuskulären Zugang die A. carotis communis beidseits dargestellt. Nach Trennung der A carotis communis von der V. jugularis und dem N. vagus wurde distal und proximal der Arterie mittels Ligatur mit Seidenfäden eine Blutsperre errichtet. Mit Mikroinstrumenten (Fine Science Tools, Deutschland) wurde wie beschrieben [91-93] der Herz-Katheter in die A. carotis communis dextra eingebracht und retrograd über die Aortenklappe bis in den linken Ventrikel vorgeschoben und durch ständige Kontrolle der Druck-Kurve optimal eingebracht (Abb.7).



**Abb.7:** Einbringen des Herzkatheters in die A. carotis communis

#### 2.6.5 Die Auswahl des Zeitpunktes

Die Auswahl des 6 Tage-Zeitpunktes zur linksventrikulären Herzfunktionsmessung und anschließender Organentnahme richtete sich nach denen von uns erhaltenen Ergebnissen zur Mortalitätsstudie. An diesem Punkt der Verlaufskurve konnten wir das größte Überlebensdelta zwischen den beiden Gruppen (WT-MI und KO-MI) beobachten. Zusätzlich ergaben Ergebnisse anderer Forschungsarbeiten, dass man zu diesem Zeitpunkt nach MI bereits von signifikanten Veränderungen im Myokard ausgehen kann. In diesen Studien waren die Parameter der Inflammationsreaktion, des Remodelings, sowie der LV-Funktion am 6 Tage-Zeitpunkt bereits deutlich verändert [33,34,50].

### 2.7 Gewebeaufarbeitung für die histologischen und immunhistologischen Analysen

Nach Beendigung der *in vivo* Messungen am Sechs-Tage-Zeitpunkt des 2. Sets wurde den Tieren noch in Narkose das Herz und die Lunge entnommen, um sie zu wiegen und für histologische und immunhistologische Untersuchungen entsprechend aufzuarbeiten.

### 2.7.1 Herzentnahme und -präparation

Das Herz wurde unter Abtrennung von der Aorta behutsam aus dem Thorax herauspräpariert, mit 0,9%iger NaCl-Lösung gespült und anschließend das Herzgewicht auf einer Feinwaage bestimmt. Nach Abtrennung der Vorhöfe auf Höhe der Herzbasis, wurde der linke Ventrikel fein säuberlich vom rechten Ventrikel abgetrennt und durch horizontale Schnitte mit einer Skalpellklinge (Non-sterile Scalpel Blade #10022-00, Fine Science Tools, Deutschland) in 3 gleichgroße Teile zerlegt: Apex, infarzierte- und nicht-infarzierte Zone. Anschließend wurden die 3 Schnitte separat in Einbettkassetten gelegt und mit 4%igem Formalin fixiert. Die Fixierung verhindert das Einsetzen der physiologisch auftretenden autolytischen Prozesse und dient dem Haltbarmachen der Präparate. Das formalinfixierte Gewebe wurde zur weiteren Einbettung und Herstellung von Paraffinblöcken zu unseren Kooperationspartnern in das Pathologische Institut des Campus Benjamin Franklin der Charité geschickt.

### 2.7.2 Herstellen von Paraffinschnitten

Zur Vorbereitung sollten die Paraffinblöcke etwa 30 min. vor dem Schneiden bei -20°C gekühlt werden, um eine bessere Schneidbarkeit zu erreichen. Die an einem Mikrotom mit einer Dicke von 3µm angefertigten Serienschnitte, wurden für einige Minuten im Wasserbad bei 50°C gestreckt und dann auf SuperFrost® Plus Objektträgern (Menzel-Gläser, Deutschland) aufgezogen. Zur Trocknung wurden sie schließlich über Nacht bei 37°C inkubiert, bevor sie dann am nächsten Tag den verschiedenen histologischen und immunhistologischen Färbungen zugeführt werden konnten.

### 2.7.3 Herz- und Lungengewichtsmessung

Als weiteren Parameter zur Erfassung des Remodelings wurde nach der *in vivo* Entnahme des Herzens, noch vor der histologischen Aufbereitung, das Herzgewicht auf einer Feinwaage bestimmt. Zum Erfassen der kardialen Hypertrophie wurde dann für jedes Tier das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht ermittelt.

Um den Grad des Herzversagens zu bestimmen, wurde im selben Arbeitsschritt die Lunge mitentfernt. So konnte sechs Tage nach MI mittels Registrierung des Feucht- und anschließend nach Trocknung, des Trockengewichts der Lunge, das Ausmaß des Lungenödems bei Herzversagen bestimmt werden.

## **2.8 Histologie und Immunhistologie**

Mit den angefertigten Paraffinschnitten wurden verschiedene histologische und immunhistologische Färbungen durchgeführt. Histologische Methoden waren dabei die Hämalaun-Eosin (HE) Färbung zur exakten Bestimmung der MI-Größe und zur Validierung der makroskopisch ermittelten Infarktgrößen in der Pilotstudie des ersten Sets, sowie die Sirius Red Färbung zur Quantifizierung des Gesamtkollagengehalts bzw. der Fibrosierung als Marker des LV-Remodelings. Zu den immunhistologischen Methoden gehört die Messung der Inflammationsreaktion mittels Immunfärbung von CD3 positiven Zellen, sowie der TUNEL-Assay zur Darstellung apoptotischer Zellen im Myokard. Bei den histologischen Färbungen wird die Affinität bestimmter Gewebestrukturen zu bestimmten Farbstoffen ausgenutzt. Die Bindungskraft basiert hierbei auf der Ionenbindung. In der Immunhistologie werden Proteine durch spezifische Antikörper (Ak) und Detektionssysteme sichtbar gemacht. Diese Technik beruht auf dem Prinzip einer Antigen (Ag) – Antikörper Bindung.

### **2.8.1 Die Hämalaun-Eosin Färbung**

Die HE-Färbung ist eine Übersichtsfärbung mit der anhand von zwei Einzelfärbungen morphologische Beurteilungen von Gewebeschnitten am Mikroskop vorgenommen werden können. Der Farbstoff Hämalaun (nach Mayer, Sigma-Aldrich, Deutschland) ist ein basischer Farbstoff und färbt dabei alle sauren/ basophilen Strukturen wie die Zellkerne mit den darin enthaltenen Desoxyribonukleinsäuren (engl.: DNA) blau. Eosin (Sigma-Aldrich, Deutschland), der saure Farbstoff hingegen, färbt alle basischen/ acidophilen Strukturen wie die Zellplasmaproteine im Zytoplasma rot.

#### **2.8.1.1 Färbeprotokoll der HE-Färbung**

Die Gewebeschnitte der Herzen wurden zuerst zur Entparaffinierung in Xylol (Sigma-Aldrich, Deutschland) eingebettet, dann zur Bewässerung einer absteigenden Ethanol Reihe ausgesetzt und anschließend mit Aqua dest. gespült. Das Anfärben der Kerne erfolgte mittels Hämalaun, die Bläuung mittels Spülen mit Leitungswasser für 10 Minuten. Der nächste Schritt war das Färben des Zytoplasmas mit Eosin. Im Anschluss daran wurde in einer aufsteigenden Alkoholreihe die Schnitte wieder entwässert, mit Xylol der Alkohol wieder entfernt und schließlich mit dem xylollöslichen Eindeckmittel Corbit-Balsam (Sigma-Aldrich, Deutschland) eingedeckt.

### 2.8.1.2 Messung der Myokardinfarktgröße per HE Färbung

Nach den hämodynamischen Messungen wurde bei den *in vivo* entnommenen Herzen ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit makroskopisch die MI-Größe bestimmt und darüber semiquantitativ in zwei Gruppen eingeteilt. In die eine Gruppe Tiere mit kleinem (+) und in die andere Tiere mit großem (++) Myokardinfarkt. Um diese Methode zu validieren haben wir in einer Pilotstudie bei n=10 WT Mäusen einen MI induziert und nach der makroskopischen Bestimmung der MI-Größe die Herzen der Tiere histologisch aufbereitet, in dem wir die Herzen in Paraffin einbetteten, pro Herz dreißig 3µm dicke Schnitte angefertigt und diese dann anschließend mit einer HE-Färbung angefärbt haben. Mit der bereits von Riad et al. verwendeten Methode zur Quantifizierung der MI-Größe mittels Digitaler Bildanalyse [94], konnte die exakte Größe der Myokardinfarkte der Proben, mikroskopisch (Leica<sup>®</sup> DMDR Mikroskop, Firma LEICA, Deutschland) und mit einer speziellen Auswertungs-Software (Lucia G<sup>®</sup> 3.52ab, NIKON GmbH, Düsseldorf-Deutschland) bestimmt werden. Das Ergebnis war, dass die makroskopisch groß (++) bestimmten MI bei n= 8 Tieren, in der digitalen Bildanalyse einer MI-Größe von 52±4% entsprachen. Aufgrund der geringen Standardabweichung der Ergebnisse konnten wir somit die Methode zur makroskopischen Bestimmung der MI-Größen validieren. In die Studie wurden nur Tiere mit einer gleich großen, makroskopisch bestimmten MI-Größe von >50% aufgenommen.

### 2.8.2 Die Sirius Red Färbung

Mittels der Sirius Red Färbung ließ sich im *nicht-infarzierten* Teil des Myokards der Gesamt-Kollagengehalt als Indikator des LV-Remodelings quantifizieren. Das Prinzip der Sirius Red Färbung (Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA) zur Anfärbung von Kollagenen beruht darauf, dass Sirius Red ein anionischer Farbstoff ist. Mit seinen Sulfonsäuregruppen kann es an die basischen Gruppen in den Kollagenmolekülen binden und so das Kollagen sichtbar machen. Die Kollagenfasern färben sich bei dieser Färbung rot, Muskelfasern und Zytoplasma gelb. Wir führten die Färbung an den zuvor angefertigten Paraffinschnitten durch und stellten danach den Kollagengehalt im nicht-infarzierten Teil des LV unter zirkulär polarisierendem Licht, einer sehr sensitiven Methode in der sich das Kollagen gelb-orange bis grünlich darstellte, bei 200-facher Vergrößerung dar und quantifizierten anschließend den Kollagengehalt anhand eines digitalen Bildanalyseverfahrens (Lucia G<sup>®</sup> 3.52ab, NIKON GmbH, Düsseldorf-

Deutschland) [95]. Schließlich wurde als Ergebnis das Verhältnis zwischen Gesamtfläche des Herzgewebes zu chromogenem Sirius Red angefärbtem Gewebe ermittelt und in Prozent angegeben (Gewebe in %).

#### 2.8.2.1 Färbeprotokoll der Sirius Red Färbung

Die Schnitte werden zunächst in Xylol entparaffiniert, dann in einer absteigenden Alkoholreihe (Abs. Alkohol, 90%iger-, 70%iger-, 30%iger- Ethanol) und Aqua dest. wieder bewässert, zur Anfärbung der Kollagene 60 min. mit Sirius Red behandelt, dann kurz mit HCl differenziert, und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%iger-, 70%iger-, 90%iger-, Abs. Alkohol) wieder entwässert, mit Xylol gewaschen und als letztes zur Haltbarmachung der Schnitte mit Corbit-Balsam eingedeckt.

#### 2.8.3 Die CD3-Färbung

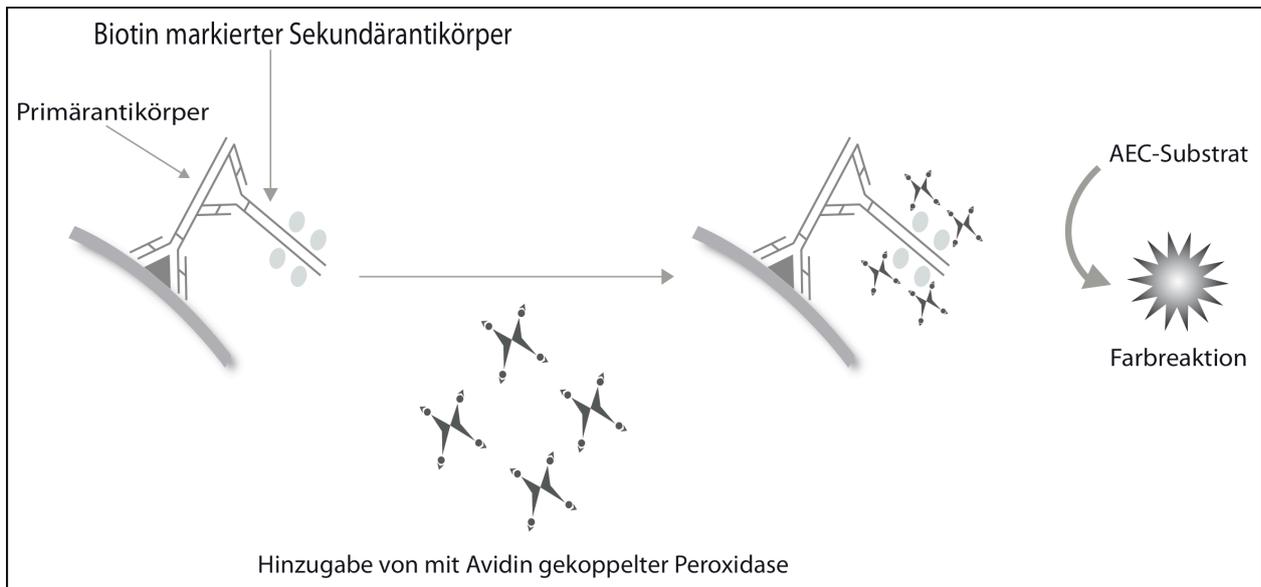
Bei der CD3-Antikörperfärbung werden anhand der ABC-Methode auf T-Lymphozyten befindliche Oberflächenmarker (engl.: *Cluster of Differentiation 3; CD3*) dargestellt [96]. T-Lymphozyten sind Bestandteile jeder Inflammationsreaktion und werden in dieser Studie als Indikator des Ausmaßes der Inflammationsreaktion nach MI in Tieren mit und ohne TLR4 Rezeptoren bestimmt. Untersucht werden sowohl der *infarzierte* als auch der *nicht-infarzierte* Anteil des Myokardgewebes. Nach Anfärbung der T-Lymphozyten erfolgte die Auswertung durch Auszählung der rot-braun angefärbten Zellen im Gewebeschnitt. Die Angaben wurden in Zellen pro mm<sup>2</sup> Herzgewebe (Zellen/mm<sup>2</sup>) gemacht.

##### 2.8.3.1 Die ABC-Methode

Die Avidin-Biotin-Komplex (engl.: *ABC*) Methode ist eine sehr sensitive Nachweismethode, die die starke Affinität von Avidin (ein Glykoprotein des Hühnereiweißes) zu dem Vitamin Biotin ausnutzt. Zuerst wird ein Primärantikörper auf den zu untersuchenden Gewebeschnitt appliziert, in unserem Fall *goat-anti CD3* (1:25, SantaCruz Biotechnology, Santa Cruz-USA) der spezifisch an das nachzuweisende Antigen (in dem Fall CD3) bindet, und als zweites ein Biotin markierter Sekundärantikörper, hier *biotinylated rabbit-anti-goat Antikörper* (EnVision<sup>®</sup>, DakoCytomation, Hamburg-Deutschland), ein Anti-Antikörper, der an den Primärantikörper bindet. Dieser Sekundärantikörper fungiert als Brückenantikörper für

das im nächsten Schritt hinzugegebene, mit dem Enzym Peroxidase gekoppelte Avidin, welches nach Applikation des 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) Substrates einen detektierbaren rot-braunen Farbnachweis erbringt (Abb.8).

Abb.8: Die ABC-Methode



### 2.8.3.2 Färbeprotokoll der CD3 Färbung

Zur Entparaffinierung und Bewässerung werden die Schnitte zu allererst mit Xylol behandelt und einer absteigenden Alkoholreihe (Abs. Alkohol, 90%-, 70%-, 30%iger Ethanol) ausgesetzt. Nach Spülung mit Aqua dest. wird zur Demaskierung bei 37°C für 10 min. Pepsin hinzugegeben und dieses dann wieder durch Spülen mit Aqua dest. entfernt. Die gebrauchsfertige gepufferte Pepsin-Lösung (DakoCytomation, Hamburg-Deutschland) dient der enzymatischen Antigen-Freilegung. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wird 0,9%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> appliziert und die Reaktion nach 15 min. durch Waschen mit 1xTBS Puffer (100ml 10xTBS [60,60g Trizma<sup>®</sup> HCL, 13,90g Trizma<sup>®</sup> Base, 87,66g NaCl, ad 1 L Aqua dest.] und 900ml Aqua dest.) gestoppt. Die folgende Spülung mit 1xTBS und 0,025%iger Tween (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) Lösung für 5 min. und die Hinzugabe einer Lösung aus 10% Normalserum (Rabbit-Serum), 1xTBS, 1%BSA (bovines Serumalbumin; Sigma-Aldrich, Deutschland) und 4 Tropfen Avidin/ ml für 30 min. bei Raumtemperatur (RT), dient der Vermeidung von unspezifischer Hintergrundfärbung und der Blockierung

des endogenen Avidins. Es folgt die Applizierung des 1. Antikörpers, in diesem Fall *goat-anti CD3*, zusammen mit 1xTBS, 1%igem BSA und 4 Tropfen Biotin/ ml. Nach 60-minütiger Inkubation wird der Schnitt mit 1xTBS und 0,025%iger Tween Lösung gewaschen und der 2. Ak, hier *biotinylated rabbit-anti-goat Antikörper* zusammen mit 1xTBS und 1%BSA auf den Objektträger (OT) aufgetragen. Nach 30 min. wird der Schnitt erneut mit 1xTBS gewaschen und für 30 min. mit dem ABC-Reagenz, zur Ausbildung der Bindung zwischen Avidin und Biotin, inkubiert. Es folgt eine Waschung mit 1xTBS für 5 min., die Behandlung mit dem Farbstoff AEC für 20 min., eine erneute Waschung mit 1xTBS und die Kernfärbung durch Behandlung mit Hämalaun für 5 sek. sowie abschließend eine Spülung mit Leitungswasser. Die Eindeckung der Schnitte erfolgt mit Glyceringelatine.

#### 2.8.4 Die TUNEL-Färbung

Die TUNEL- (Terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT] mediated d-UTP Nick-End Labeling) Färbung ist eine Standardmethode zur Darstellung von DNA Fragmenten, wie sie zum Beispiel auch in apoptotischen Zellen vorkommen. So konnte wie andernorts schon durchgeführt [83], mittels des TUNEL-Assays die Apoptoserate im infarzierten Gewebe ermittelt werden. Hierbei wurden die Paraffinschnitte gemäß dem leicht modifiziertem DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega #7130, USA)-Protokolls des Herstellers behandelt. Zentrales Element dieses Färbeverfahrens ist das Enzym TdT, eine DNA Polymerase, die Biotin markierte Nukleotide an die 3'-OH Enden der fragmentierten DNA hängt. Nach Zugabe der an Streptavidin gebundenen Peroxidase (Streptavidin-HRP) und dem Substrat Diaminobenzidin (DAB) färben sich die apoptotischen Kerne dunkel braun. Dargestellt wurden die Gewebeschnitte mittels Lichtmikroskopie unter 200facher Vergrößerung. Ausgewertet und quantifiziert wurden die apoptotischen Zellen ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit durch das farbkodierte digitale Bildanalyseverfahren Lucia G<sup>®</sup>. Die Ergebnisse wurden in Anzahl apoptotischer Zellen pro mm<sup>2</sup> Herzgewebe [Zellen/mm<sup>2</sup>] angegeben.

##### 2.8.4.1 Färbeprotokoll der TUNEL-Färbung

Alle Schritte laufen bei Raumtemperatur ab, außer die 60minütige Inkubation mit dem rTdT Mix, welche bei 37°C stattfindet. Als erstes müssen die Gewebeschnitte zur Entparaffinierung mit Xylol behandelt, dann in einer absteigenden Alkoholreihe und

mittels Aqua dest. wieder bewässert und durch eine PBS-, Formalin-, PBS-Behandlung wieder gewaschen und refixiert werden. Nach Demaskierung der Zellen und Freisetzung der Nukleinsäuren mittels Proteinase K 1:500 (in 1xPBS-Puffer), erfolgt erneut eine Behandlung mit PBS (10 min.), Formalin (15 min.), PBS (10 min.), und im Anschluss daran eine 10 min. Behandlung mit einem Equilibrationspuffer. Die nächsten Schritte sind dann die Zugabe des rTdT-Reaction-Mixes (Equilibrationspuffer, biotinylierte Nucleotide und rTdT Enzyme) für 60 min. bei 37°C, das Stoppen der Reaktion mit 20xSSC-Puffer(15 min.) und das Entfernen der ungebundenen biotinylierten Nucleotide mit 1xPBS. Nun muss zur Vermeidung von unspezifischer Hintergrundfärbung für 3-5 min. mittels 0,3%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die physiologisch im Gewebe vorkommende endogene Peroxidase blockiert werden. Nach erneutem Waschen mit 1xPBS, folgt die 30 min. Inkubation mit Streptavidin-HRP (1:500 in 1xPBS) bei der die Peroxidase über das Streptavidin an das Biotin bindet. Nach Entfernung des überschüssigen Streptavidin-HRP`s mit 1xPBS wird das Substrat-Chromogen DAB hinzugegeben, so dass es zur Farbreaktion mit der an den DNA-Fragmenten gekoppelten Peroxidase kommt. Im Anschluss an die Entfernung des überschüssigen DAB`s mit 1xPBS werden die Gewebeschnitte zur Kernfärbung der nicht-apoptotischen Zellen für 5 sek. mit Hämalaun behandelt und mit Leitungswasser gespült und im letzten Schritt mit Glycingelatine eingedeckt.

## **2.9 Statistische Auswertung**

Die Anwendung statistischer Auswertungen zur kritischen Überprüfung der erzielten Ergebnisse soll in jeder wissenschaftlichen Arbeit der Absicherung dienen. Die Auswertungen in dieser Arbeit wurden mit dem SPSS 12.0, Statistical Package for the Social Sciences, durchgeführt. Dabei erfolgte die statistische Auswertung der Gruppenunterschiede anhand des Kruskal-Wallis Tests in Verbindung mit dem Mann Whitney U Test. Die Überlebenskurven nach Myokardinfarkt wurden mittels Kaplan-Meier Methode erstellt und mit dem log-lank Test statistisch überprüft. Für die in dieser Arbeit verwendeten Tests wurde hinsichtlich der Signifikanz eine Fehlerwahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als ein signifikantes Ergebnis gewertet. Alle erhobenen Werte wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Allgemeines

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der durchgeführten Studie präsentiert. Dabei werden in den verschiedenen Versuchsreihen die Auswirkungen einer TLR4-Defizienz auf die untersuchten Parameter im experimentellen Tiermodell erfasst. Von besonderer Wichtigkeit ist hierbei der Vergleich der Parameter zwischen den Gruppen mit und denen ohne TLR4 Rezeptor. Zu Beginn werden die Ergebnisse der Versuchsreihe zur Charakterisierung der *linksventrikulären Herzfunktion* und die Messung der Lungengewichte zur Erfassung des Grades an Herzversagen dargestellt, gefolgt von der Darstellung der Ergebnisse der *Mortalitätsstudie* nach induziertem MI. Im Anschluss daran erfolgt die Auswertung des Ausmaßes des *Remodelings* mittels der Bestimmung des Gesamt-Kollagengehalts und der Herzhypertrophie. Am Ende des Kapitels stehen die Ergebnisse der Versuchsreihen mit den immunhistologischen Färbungen, der CD3- Färbung zur Bestimmung des Ausmaßes der *Inflamationsreaktion* und der TUNEL-Färbung zur Bestimmung der *kardialen Apoptose*.

### 3.2 Die Parameter der linksventrikulären Herzfunktion

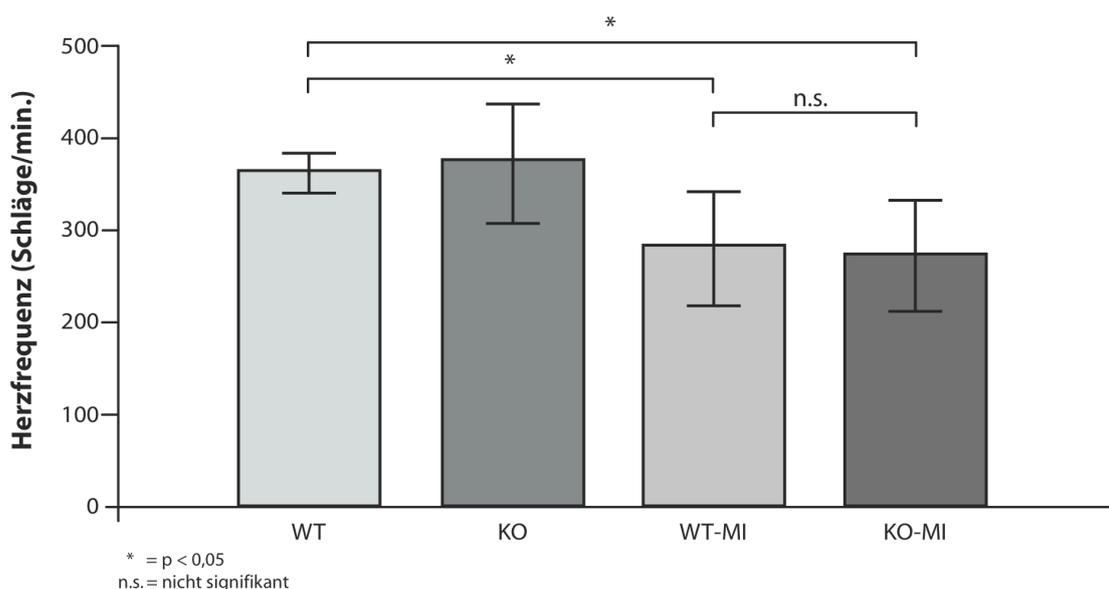
Um den Grad des Herzversagens zu bestimmen, wurde 6 Tage nach Induktion des MI, *in vivo* die LV-Funktion der Mäuse bestimmt. Im folgenden Abschnitt werden nun die Ergebnisse der gemessenen systolischen und diastolischen Parameter (*HF*, *LVP*,  $dP/dt_{max}$ , *LVEDP* und  $dP/dt_{min}$ ) vorgestellt. Zusätzlich dazu wurden zur Erfassung des Ausmaßes des Lungenödems bei Herzversagen, die Feucht- und Trockengewichte der Lungen ausgewogen und dokumentiert.

#### 3.2.1 Die Herzfrequenz 6 Tage nach Myokardinfarkt

Die gemessenen Herzfrequenzen zwischen den WT-MI und KO-MI Tieren unterschied sich nicht signifikant ( $276 \pm 33$  /min. vs.  $282 \pm 59$  /min.);  $p > 0,05$ . Im Vergleich der Ergebnisse der WT-MI und der KO-MI Mäuse zu den WT Mäusen ( $364 \pm 24$  /min.), zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied;  $p < 0,05$ .

Zur bildlichen Darstellung sind die Ergebnisse im Säulendiagramm (Abb.9) wiedergegeben. Auf der x-Achse befinden sich die einzelnen Tiergruppen (WT, KO, WT-MI, KO-MI), auf der y-Achse die Herzfrequenz in Herzschlägen/Minute. Die Daten wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben;  $n=8$  pro Gruppe.

Abb. 9: Die Herzfrequenz in Schlägen pro Minute

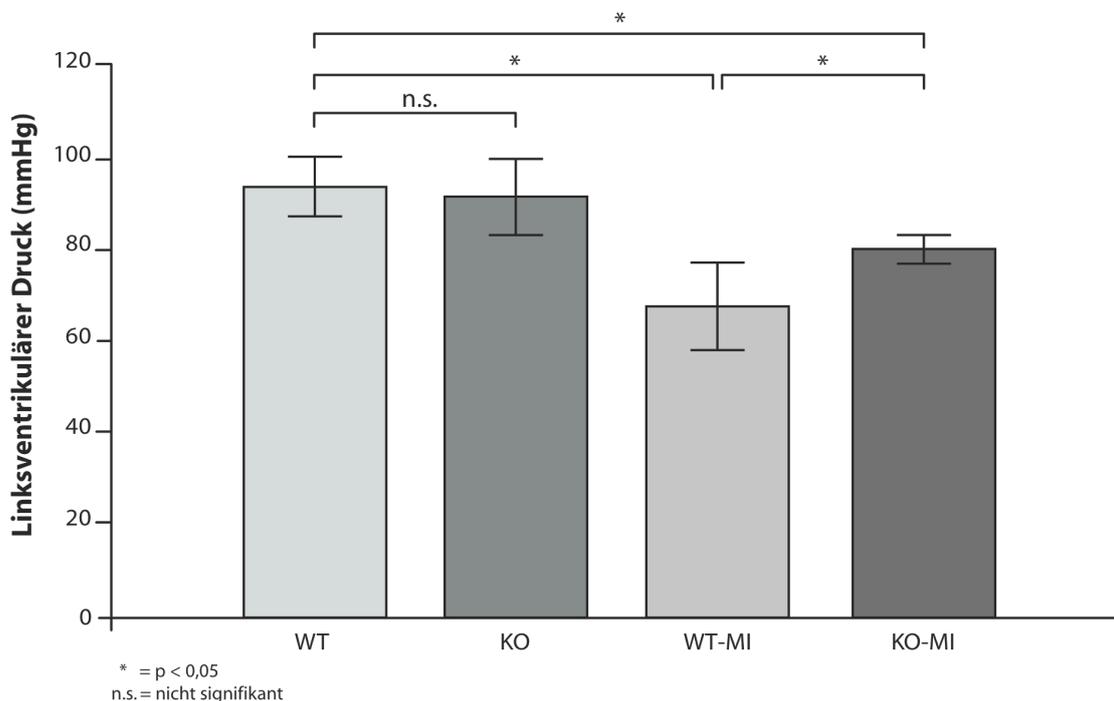


### 3.2.2 Der linksventrikuläre Druck (LVP)

Der Wert des linksventrikulären Druckes (LVP) der KO-MI ( $81 \pm 6$  mmHg) Tiere unterschied sich signifikant von denen der WT-MI ( $69 \pm 9$  mmHg) Tiere;  $p < 0,05$ . Ein weiterer signifikanter Unterschied fand sich zwischen den Druckwerten der WT-MI und der WT ( $96 \pm 6$  mmHg) Mäuse, sowie zwischen den KO-MI und den WT Mäusen;  $p < 0,05$ . Die linksventrikulären Drücke zwischen den WT und KO ( $94 \pm 7$  mmHg) Mäusen unterschieden sich nicht signifikant;  $p > 0,05$ .

Die Ergebnisse werden im Säulendiagramm (Abb.10) dargestellt. Auf der x-Achse die Tiergruppen (WT, KO, WT-MI, KO-MI), auf der y-Achse die LVP-Werte in mmHg. Die Daten wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben;  $n=8$  pro Gruppe.

Abb.10: Der linksventrikuläre Druck (LVP) in mmHg

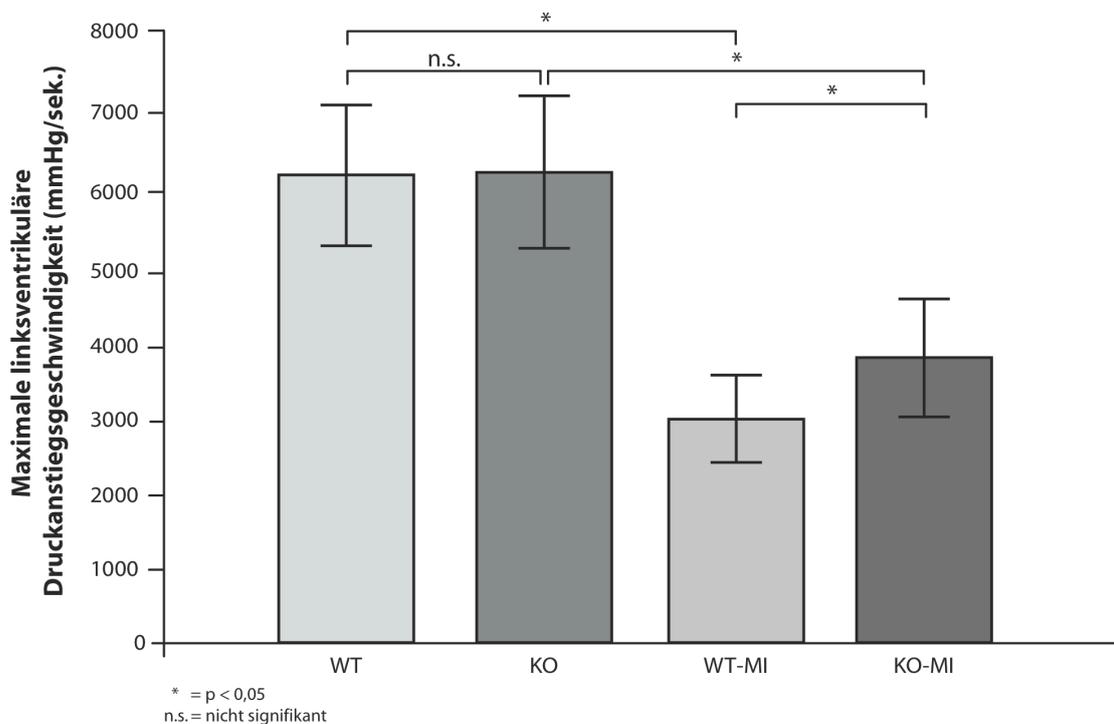


### 3.2.3 Die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit

Die maximale LV-Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ), als Parameter der LV-Kontraktilität unterschied sich signifikant zwischen den KO-MI Mäusen ( $4851 \pm 823$  mmHg/sek.) und den WT-MI Mäusen ( $3042 \pm 611$  mmHg/sek.);  $p < 0,05$ . Im Vergleich zwischen WT-MI und WT ( $6228 \pm 901$  mmHg/sek.) sowie zwischen KO ( $6256 \pm 954$  mmHg/sek.) und KO-MI Mäusen fand sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied;  $p < 0,05$ . Nicht signifikant unterschiedlich war der Vergleich der maximalen LV-Druckanstiegsgeschwindigkeiten zwischen WT und KO ( $6256 \pm 954$  mmHg/sek.) Mäusen.

Die Darstellung der Ergebnisse der  $dP/dt_{max}$ -Messung erfolgt im Säulendiagramm (Abb.11). Die x-Achse stellt die Tiergruppen (WT, KO, WT-MI, KO-MI) dar, die y-Achse die gemessenen maximalen LV-Druckanstiegsgeschwindigkeiten in mmHg pro Sekunde. Die Daten wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben;  $n=8$  pro Gruppe.

Abb.11: Die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) in mmHg/sek.

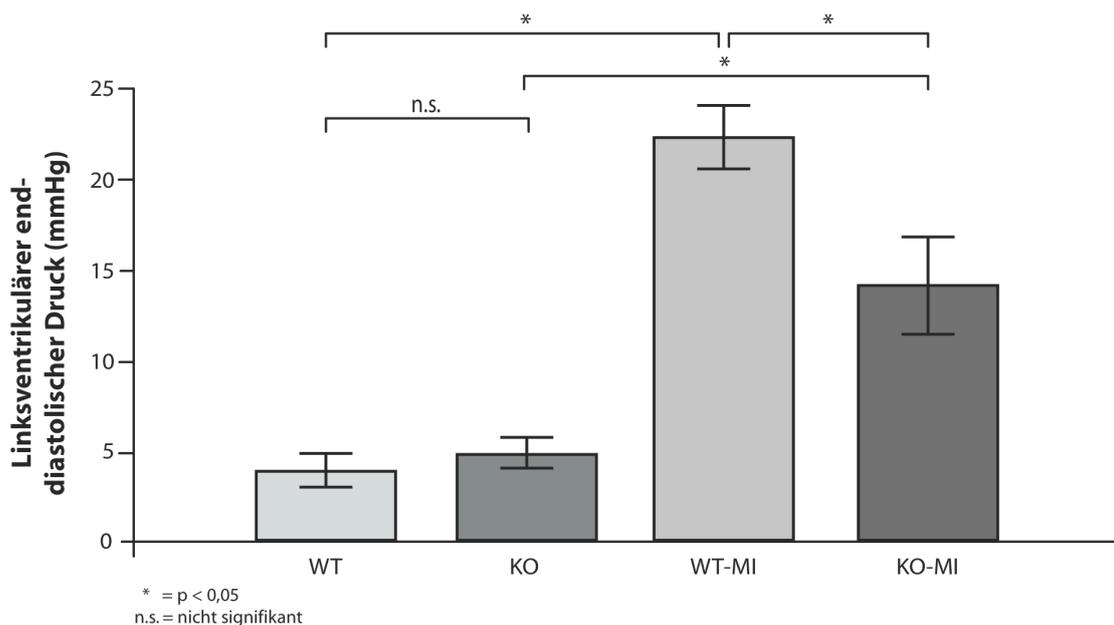


### 3.2.4 Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP)

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Werten des LVEDP zwischen den KO-MI ( $14 \pm 3$  mmHg) und den WT-MI Mäusen ( $22 \pm 2$  mmHg), sowie zwischen den WT-MI und den WT Tieren ( $4 \pm 1$  mmHg);  $p < 0,05$ . Die Druckwerte der KO ( $5 \pm 1$  mmHg) und KO-MI Mäuse unterschieden sich ebenfalls signifikant. Nicht signifikant unterschiedlich zeigten sich die Werte zwischen WT und KO Tieren.

Die Ergebnisse der linksventrikulären enddiastolischen Drücke werden im Säulendiagramm (Abb.12) dargestellt. Die x-Achse kennzeichnet die Tiergruppen (WT, KO, WT-MI, KO-MI) und die y-Achse die gemessenen Drücke in mmHg. Die Daten wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben;  $n=8$  pro Gruppe.

Abb.12: Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) in mmHg.

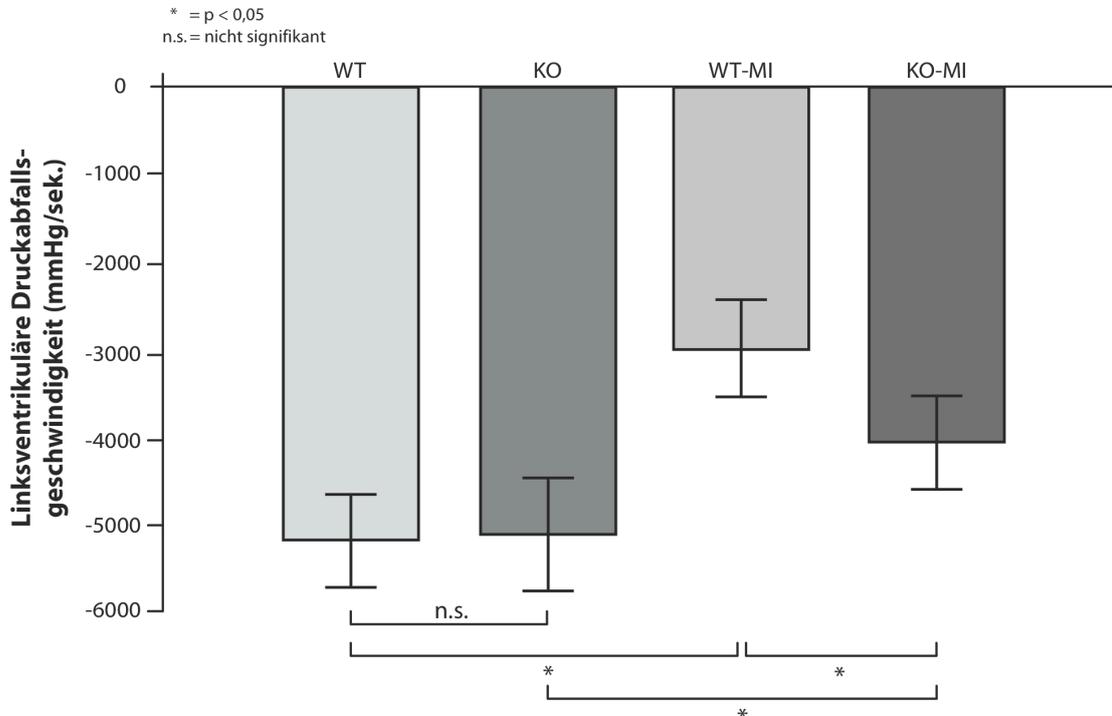


### 3.2.5 Die linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit

Die Werte der LV-Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{\min}$ ) als Parameter der diastolischen Relaxation zeigen nach MI einen signifikanten Unterschied zwischen den WT-MI ( $-2894 \pm 511$  mmHg/sek.) und den KO-MI Mäusen ( $-3962 \pm 647$  mmHg/sek.);  $p < 0,05$ . Auch im Vergleich der  $dP/dt_{\min}$  zwischen WT-MI und WT Mäusen ( $-5127 \pm 567$  mmHg/sek.) sowie zwischen KO-MI und KO ( $-5084 \pm 615$  mmHg/sek.) findet sich ein signifikanter Unterschied;  $p < 0,05$ . Nicht signifikant unterscheiden sich die Ergebnisse zwischen WT und KO Tieren.

Die Werte der linksventrikulären Druckabfallsgeschwindigkeit sind in einem Säulendiagramm (Abb.13) dargestellt. Die x-Achse zeigt die Tiergruppen (WT, KO, WT-MI, KO-MI), die y-Achse die gemessenen Druckabfallsgeschwindigkeiten in mmHg pro Sekunde. Die Daten wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben;  $n=8$  pro Gruppe.

Abb.13: Die linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{\min}$ ) in mmHg/sek.



### 3.2.6 Die Lungengewichte

Um den Grad des Herzversagens zu bestimmen wurde zusätzlich das Trocken- und Feuchtgewicht der Lungen als Parameter des Lungenödems bestimmt. In den Ergebnissen der Trockengewichte waren keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen (WT=33±4 mg, WT-MI=32±4 mg, KO=31±5 mg, KO-MI=34±6 mg) ersichtlich. Bei den Feuchtgewichten ergaben sich hingegen signifikante Unterschiede zwischen der KO-MI (154±26 mg) und der WT-MI Gruppe (198±43 mg), sowie zwischen der WT-MI und der WT Gruppe (149±19 mg);  $p < 0,05$ . Keinen signifikanten Unterschied zeigte der Vergleich der Lungen-Feuchtgewichte zwischen WT und KO (147±17 mg) Mäusen.

In Abb.14a werden die Ergebnisse der Lungen-Trockengewichte, in Abb.14b die der Lungen-Feuchtgewichte dargestellt. Die x-Achse zeigt die Tiergruppen (WT, KO, WT-MI, KO-MI), die y-Achse die Gewichte in Milligramm (mg) an. Die Daten wurden als Mittelwert (MW) ± des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben;  $n=8$  pro Gruppe.

Abb.14a: Die Lungen-Trockengewichte sechs Tage nach MI in mg.

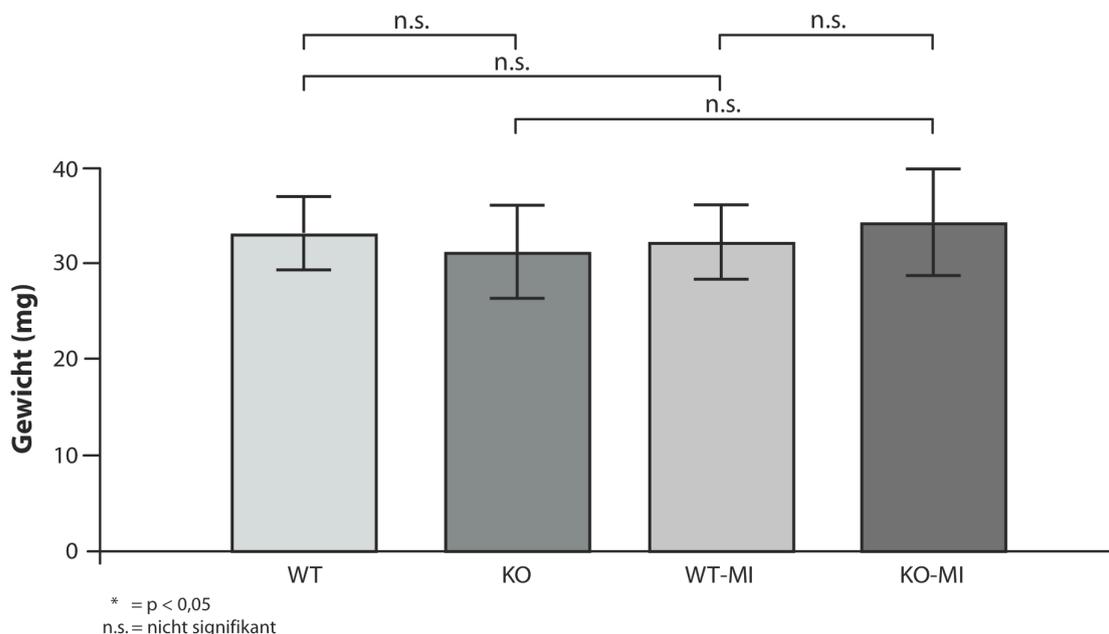
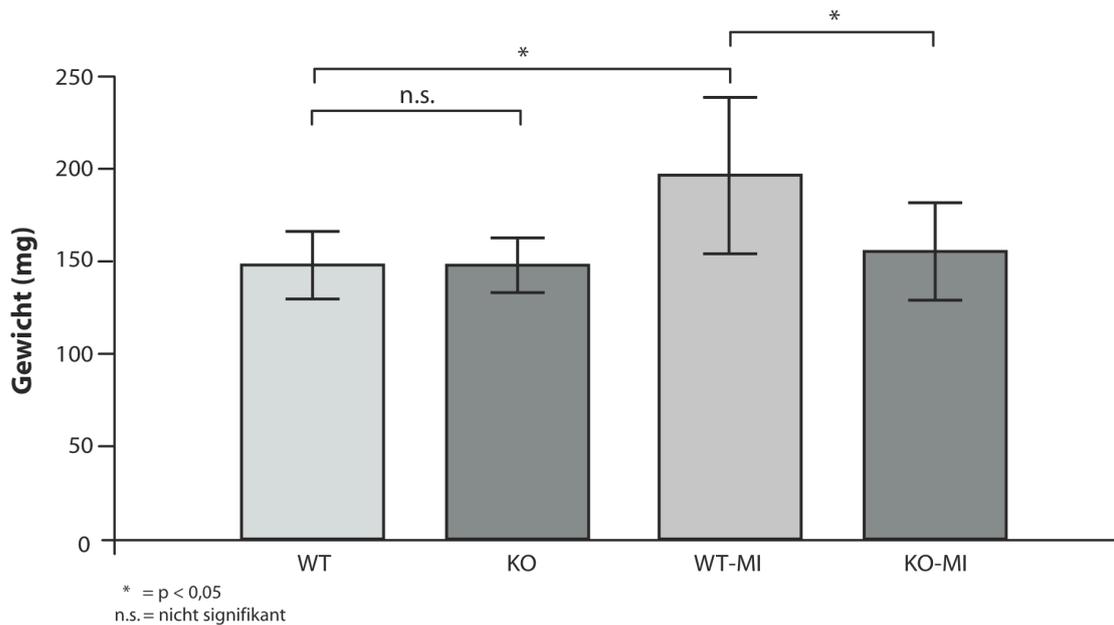


Abb.14b: Die Lungen-Feuchtgewichte sechs Tage nach MI in mg.



### 3.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse der linksventrikulären Herzfunktion

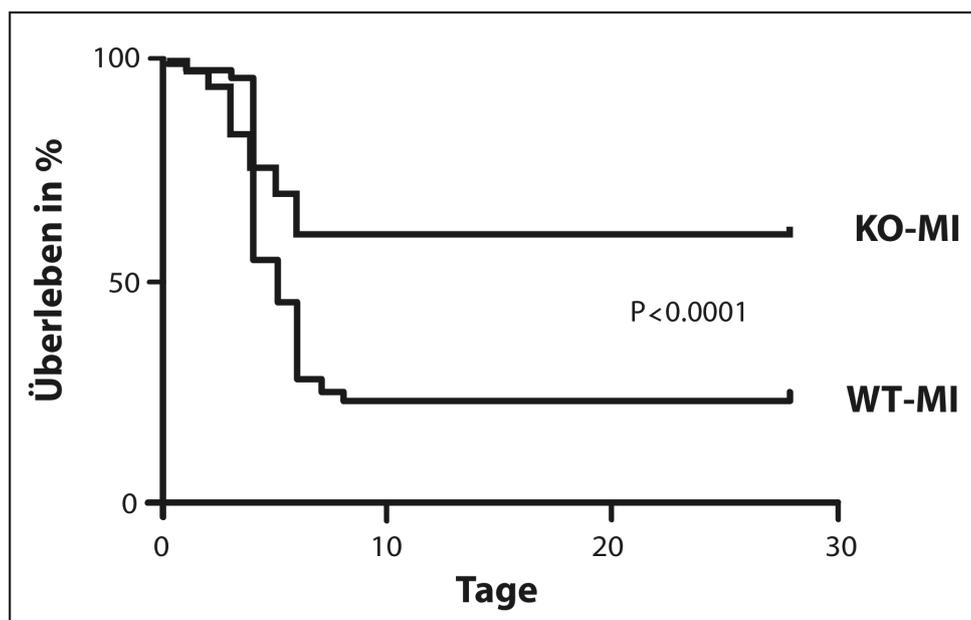
Um den Grad des Herzversagens sechs Tage nach MI zu bestimmen wurde *in vivo* die linksventrikuläre Herzfunktion und zusätzlich als Parameter des Lungenödems die Trocken- und Feuchtgewichte der Lungen bestimmt. Als Ergebnis ergab sich, dass die KO-MI Mäuse signifikant bessere Werte in den systolischen und diastolischen Parametern der LV-Funktion aufwiesen (LVP=+17%,  $dP/dt_{max}$ =+59%, LVEDP=-36%,  $dP/dt_{min}$ =+37%;  $p < 0,05$ ) als die WT-MI Tiere. Dies ging auch einher mit einem geringeren Lungen-Feuchtgewicht der KO-MI Tiere (-22%;  $p < 0,05$ ), was für ein verminderten Grad an Herzversagen sprach. Vergleicht man die WT-MI und die WT Mäuse miteinander, ließ sich auch hier ein signifikanter Unterschied in den Parametern der linksventrikulären Herzfunktion erkennen. Die WT-MI Tiere zeigten deutlich schlechtere systolische und diastolische Funktionsparameter (LVP=-28%,  $dP/dt_{max}$ =-51%, LVEDP=+450%,  $dP/dt_{min}$ =-44%, Hf=-24%;  $p < 0,05$ ) und ein erhöhtes Lungen-Feuchtgewicht (+33%;  $p < 0,05$ ) als Maß des Lungenödems im Rahmen des Herzversagens. Zwischen den schein-operierten WT und KO Mäusen ergab sich kein signifikanter Unterschied in den Parametern der linksventrikulären Funktion. Zusammenfassend kann man sagen, dass die KO-MI Tiere im Vergleich zu den WT-MI

Mäusen eine bessere LV-Funktion und ein geringeren Grad an Herzversagen nach MI aufweisen. Die TLR4-Defizienz wirkt sich also positiv auf die LV-Funktion nach MI aus.

### 3.3 Die Mortalitätsstudie

Aus den Kurven (Abb.15) lässt sich ablesen, dass die KO-MI Mäuse im Vergleich zu den WT-MI Mäusen eine höhere Überlebensrate aufweisen. Am 28. Tag nach MI lässt sich bei den KO-MI Tieren eine Überlebensrate von 62% ablesen, während die WT-MI Mäuse zum selben Zeitpunkt nur noch eine Überlebensrate von 23% zu verzeichnen haben ( $p < 0,0001$ );  $n=60$  pro Gruppe. Auf der x-Achse ist der Zeitraum in Tagen und auf der y-Achse die Überlebensrate in % angegeben.

Abb.15: Die Überlebensraten nach Myokardinfarkt



### 3.4 Linksventrikuläres Remodeling

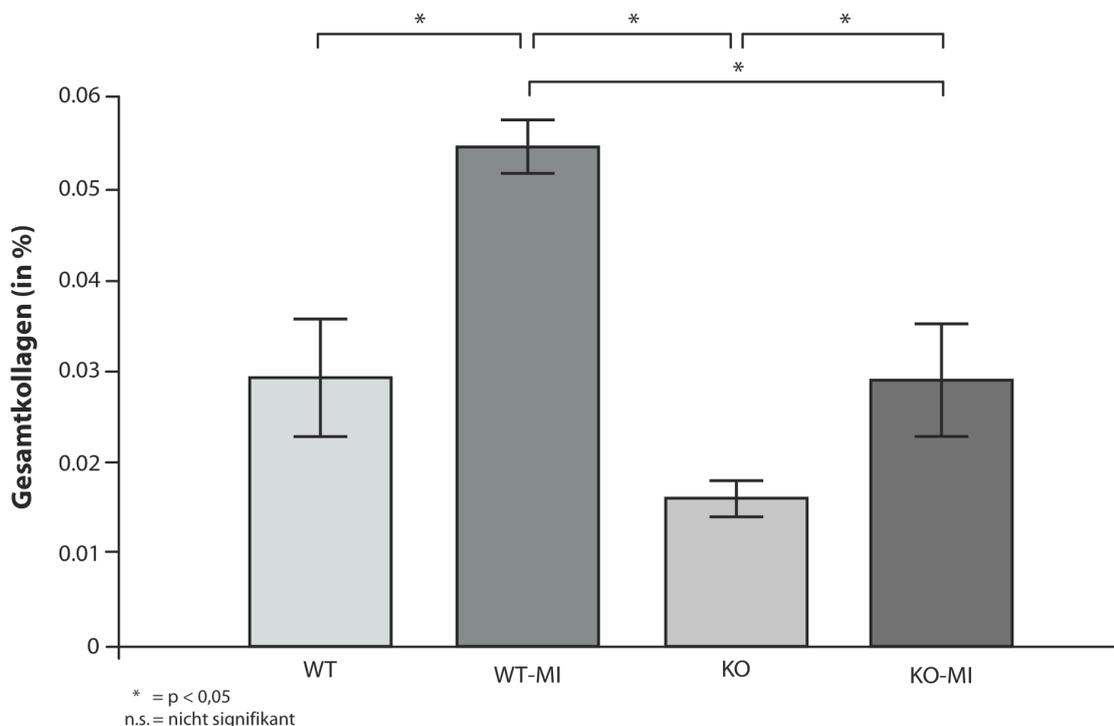
Zur Bestimmung des Ausmaßes des linksventrikulären Remodelings wurde im *nicht-infarzierten* Gewebe der WT, KO, WT-MI und KO-MI Mäuse der Gesamt-Kollagengehalt mittels Sirius Red Färbung, das Herzgewicht (nicht dargestellt) und das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht (Herz- zu Körpergewichts Ratio), welches ein Maß für die myokardiale Hypertrophie beim Remodeling ist, ermittelt. Die gewonnenen Daten

wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben; n=6 pro Gruppe. Im Säulendiagramm befinden sich auf der x-Achse die Tiergruppen (WT, KO, WT-MI und KO-MI) und auf der y-Achse der prozentuale Anteil des Gesamtkollagengehaltes im Verhältnis zur Gesamtfläche des Myokardgewebes in Prozent (%) (Abb.16). Die Herz- zu Körpergewichts-Ratio wird ebenfalls im Säulendiagramm in Gramm pro Gramm (g/g) angegeben (Abb.17).

### 3.4.1 Der Gesamtkollagengehalt im nicht-infarzierten Gewebe

Der Gesamt-Kollagengehalt im *nicht-infarzierten* Gewebe des Myokards der KO-MI Tiere ( $0,03\pm 0,005\%$ ) unterscheidet sich signifikant von denen der WT-MI Tiere ( $0,055\pm 0,004\%$ ) Tiere. Bei der KO-MI Gruppe ist der Gesamt-Kollagengehalt um -45% geringer als bei den WT-MI Mäusen ( $p < 0,05$ ). Der Gesamt-Kollagengehalt der WT-MI Mäuse zeigt sich im Vergleich mit denen der WT ( $0,03\pm 0,006\%$ ), KO ( $0,017\pm 0,002\%$ ) und KO-MI Tiere signifikant erhöht. Ein signifikanter Unterschied lässt sich ausserdem zwischen KO und KO-MI Tieren nachweisen (Abb.16). Die gewonnenen Daten wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben; n=6 pro Gruppe.

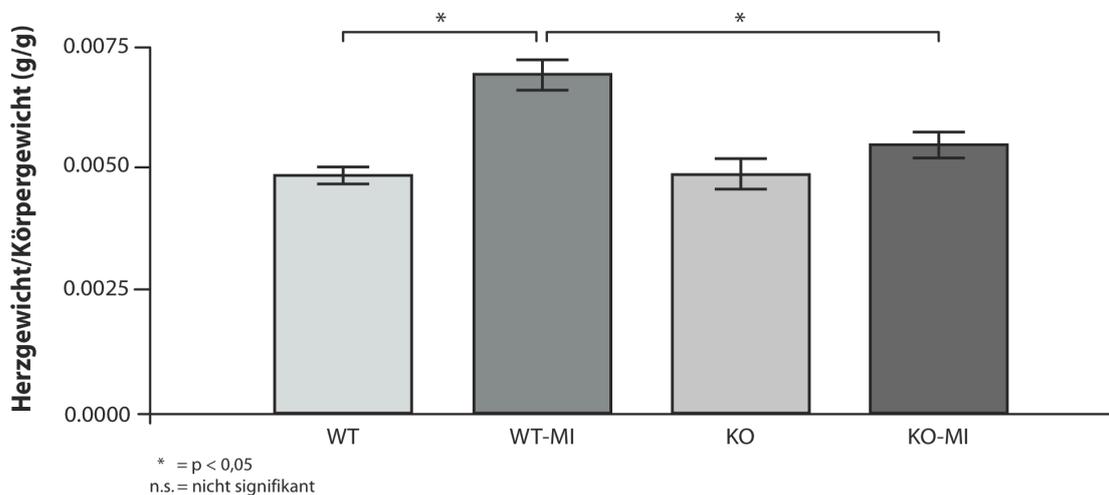
Abb.16: Der Gesamtkollagengehalt im nicht-infarzierten Gewebe in %



### 3.4.2 Das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht

Die Bestimmung der Herz- zu Körpergewichts-Ratio als Parameter der myokardialen Hypertrophie im Rahmen des Remodelings lässt sich bei den KO-MI Tieren ( $0,006 \pm 0,0003\%$ ) im Vergleich zu den WT-MI Mäusen ( $0,007 \pm 0,0004\%$ ) eine um -16% geringere Ratio erkennen. Auch zwischen WT-MI und WT ( $0,005 \pm 0,0003\%$ ) Mäusen zeigte sich ein signifikanter Unterschied (Abb.17). Die gewonnenen Daten wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben; n=6 pro Gruppe.

Abb.17: Die Herz- zu Körpergewichtsration in g/g



### 3.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse des linksventrikulären Remodelings

Die gemessenen Parameter waren in der KO-MI Gruppe gegenüber den Werten in der WT-MI Gruppe signifikant reduziert (Herzgewicht: -11%, Herz- zu Körpergewichtsration: -16%, Gesamtkollagengehalt: -45%;  $p < 0,05$ ). TLR4-Defizienz nach MI führt also im *nicht-infarzierten* Gewebe zu einem geringeres Ausmaß an linksventrikulärem Remodeling. Im Vergleich der Werte der WT-MI mit denen der WT Mäuse, ergab sich ein erhöhtes Herzgewicht von +25%, eine erhöhte Herz- zu Körpergewichtsration von +45% und ein erhöhter Gesamtkollagengehalt von +80% bei den WT-MI Mäusen;  $p < 0,05$ .

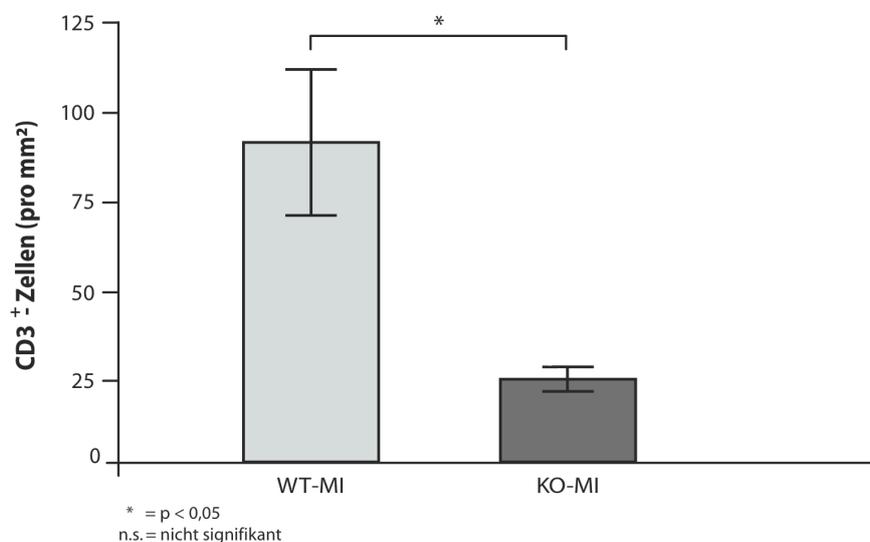
### 3.5 Die kardiale Inflammationsreaktion

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Inflammationsreaktion, wurde die Anzahl an CD3 positiven T-Lymphozyten im *infarzierten* und *nicht-infarzierten* Myokard per Immunofärbung (rot-braun) und digitaler Bildanalyse quantifiziert. Zuerst werden die Ergebnisse für das *infarzierte* Gewebe (Abb.18 a, b, c) und anschließend für das *nicht-infarzierte* Gewebe (Abb.19a, b, c) bei den Myokardinfarkt-Tieren (WT-MI, KO-MI) dargestellt. Im Säulendiagramm befinden sich auf der x-Achse die Tiergruppen (WT-MI und KO-MI) und auf der y-Achse die Anzahl der CD3 positiven Zellen pro mm<sup>2</sup> (Abb.18a und Abb.19a). Die gewonnenen Daten wurden als Mittelwert (MW) ± des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Einheit ist Zellen/mm<sup>2</sup>; n=6 pro Gruppe. Den Diagrammen nachgestellt sind die jeweiligen Bilder der immunhistologischen Färbungen (18b, c und 19b, c). Die CD3 positiven Zellen sind rot-braun gefärbt und mit einem Pfeil gekennzeichnet ( ↘ ).

#### 3.5.1 CD3 positive T-Lymphozyten im infarzierten Gewebe

Das *infarzierte* Gewebe des Myokards bei WT-MI Mäusen wies eine Zellinfiltration von 89±23 Zellen pro mm<sup>2</sup> auf. Im Vergleich zu der Gruppe der WT-MI Mäuse ist die Zellinfiltration bei den KO-MI Mäusen um 76% geringer (p<0,05). Die gewonnenen Daten wurden als Mittelwert (MW) ± des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben (Abb. 18a). Die Einheit ist Zellen/mm<sup>2</sup>; n=6 pro Gruppe.

Abb.18a: Anzahl der CD3-positiven T-Lymphozyten im infarzierten Gewebe in Zellen/mm<sup>2</sup>



3.5.2 CD3 positive T-Lymphozyten in der Immunfärbung des infarzierten Gewebes  
Man erkennt in der Immunfärbung des *infarzierten* Gewebes der WT-MI Mäuse eine erhöhte Infiltration an rot-braun gefärbten CD3-positiven Zellen im Vergleich zu den Färbungen des *infarzierten* Myokards der KO-MI Tiere (Abb. 18b und 18c).

Abb.18b: CD3 positive T-Lymphozyten im infarzierten Gewebe der WT-MI Mäuse

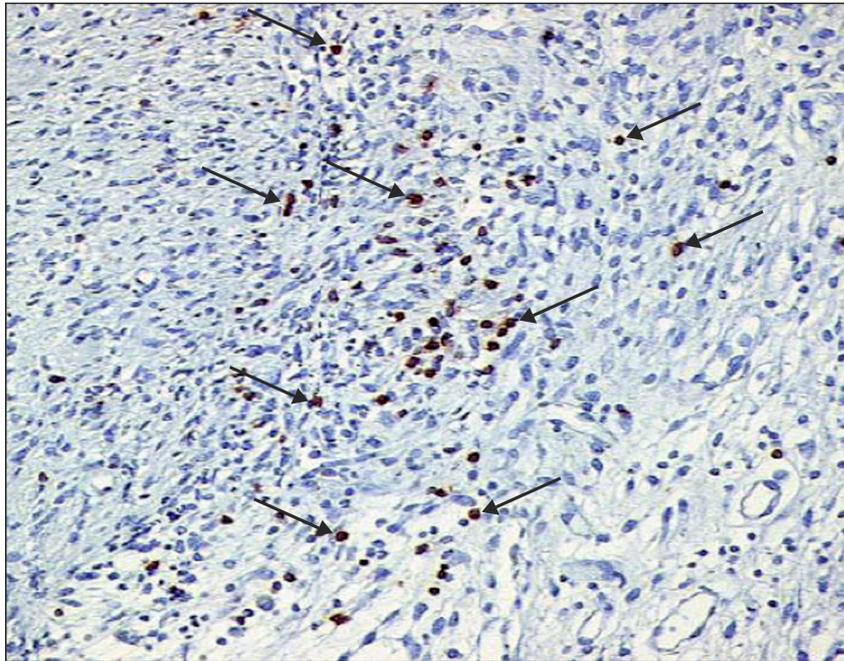
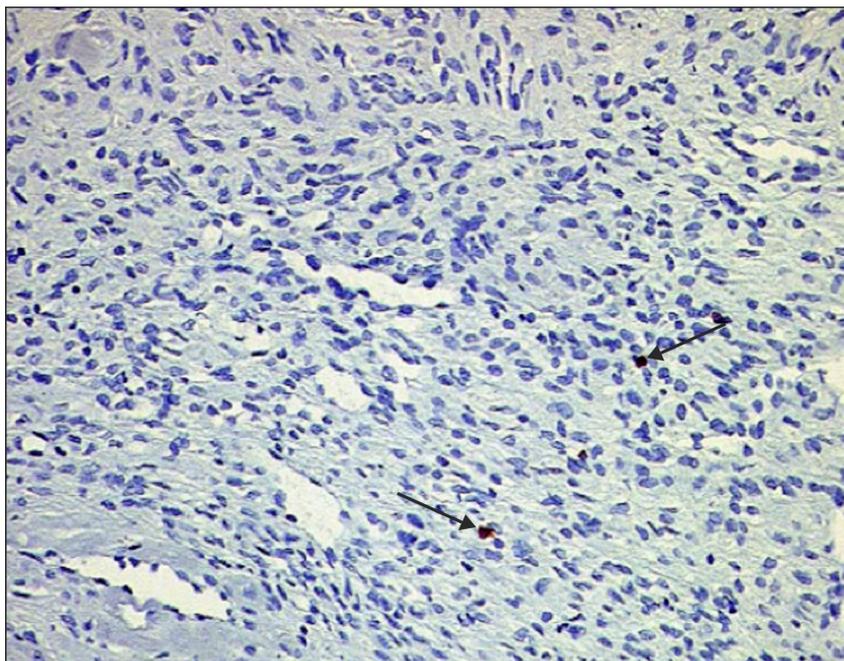


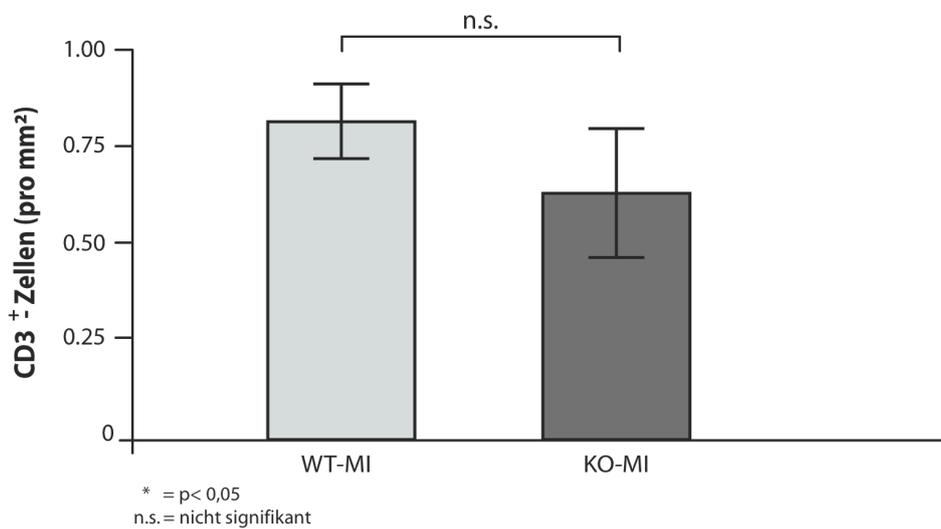
Abb.18c: CD3 positive T-Lymphozyten im infarzierten Gewebe der KO-MI Mäuse



### 3.5.3 CD3 positive T-Lymphozyten im nicht-infarzierten Gewebe

Es gab keine signifikanten Unterschiede bei der Infiltration mit CD3 positiven T-Lymphozyten im *nicht-infarzierten* Myokard zwischen den WT-MI ( $0,8 \pm 0,2$  Zellen pro  $\text{mm}^2$ ) und den KO-MI Mäusen ( $0,6 \pm 0,3$  Zellen pro  $\text{mm}^2$ ); n.s. Die gewonnenen Daten wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben (Abb.19a). Die Einheit ist Zellen/ $\text{mm}^2$ ; n=6 pro Gruppe.

Abb.19a: Anzahl der CD3-positiven T-Lymphozyten im nicht-infarzierten Gewebe in Zellen pro  $\text{mm}^2$



### 3.5.4 CD3 positive T-Lymphozyten in der Immunfärbung des nicht-infarzierten Gewebes

Man erkennt in der Immunfärbung, dass gleich wenige CD3-positive Zellen ins *nicht-infarzierten* Gewebe der WT-MI und KO-MI Tiere infiltriert sind (Abb. 19b und 19c). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Abb.19b: CD3 positive T-Lymphozyten im nicht-infarzierten Gewebe der WT-MI Mäuse

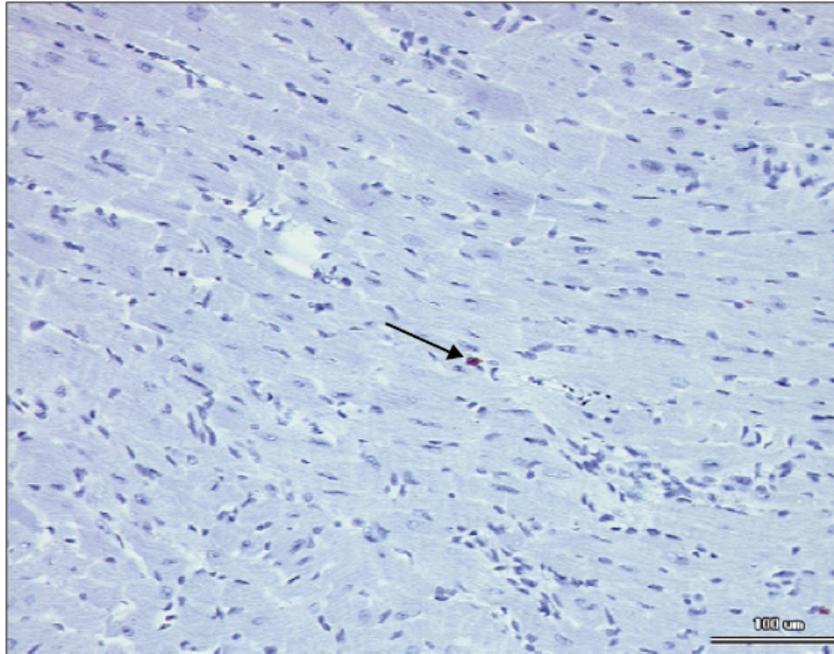
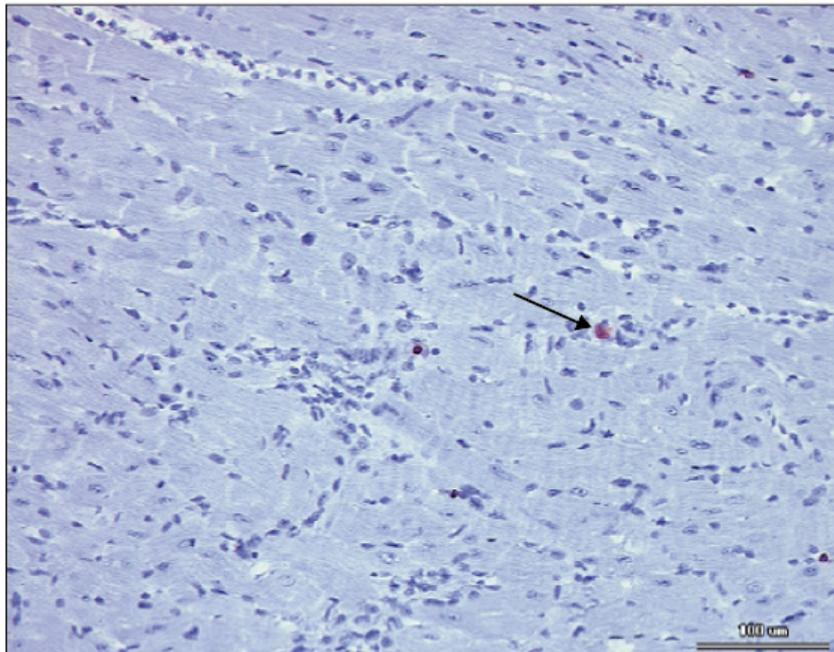


Abb.19c: CD3 positive T-Lymphozyten im nicht-infarzierten Gewebe der KO-MI Mäuse



### 3.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der kardialen Inflammation

Die Ergebnisse dieser Auswertung zeigten im *infarzierten* Gewebe des Myokards ein höheres Aufkommen an CD3 positiven Zellen bei den WT-MI als bei den KO-MI Mäusen. Die KO-MI Mäuse hatten eine um -76% geringere CD3-Zellinfiltration als die WT-MI Tiere ( $p < 0,05$ ). D.h. dass die TLR4-Defizienz mit einer geringeren Inflammationsreaktion im Infarktgebiet einhergeht. Im Vergleich des *infarzierten* Gewebes ( $89 \pm 23$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) mit dem *nicht-infarzierten* Gewebe ( $0,8 \pm 0,2$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) der WT-MI Mäuse zeigte sich ebenfalls ein deutlich erhöhter Anstieg an CD3 positiven Zellen ( $p < 0,05$ ). Im *nicht-infarzierten* Gebiet der Myokardinfarkt-Tiere zeigten jedoch die WT-MI Mäuse ( $0,8 \pm 0,2$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) im Vergleich zu den KO-MI Mäusen ( $0,6 \pm 0,3$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) keinen wesentlichen Unterschied in der Zellinfiltration mit CD3-positiven Zellen.

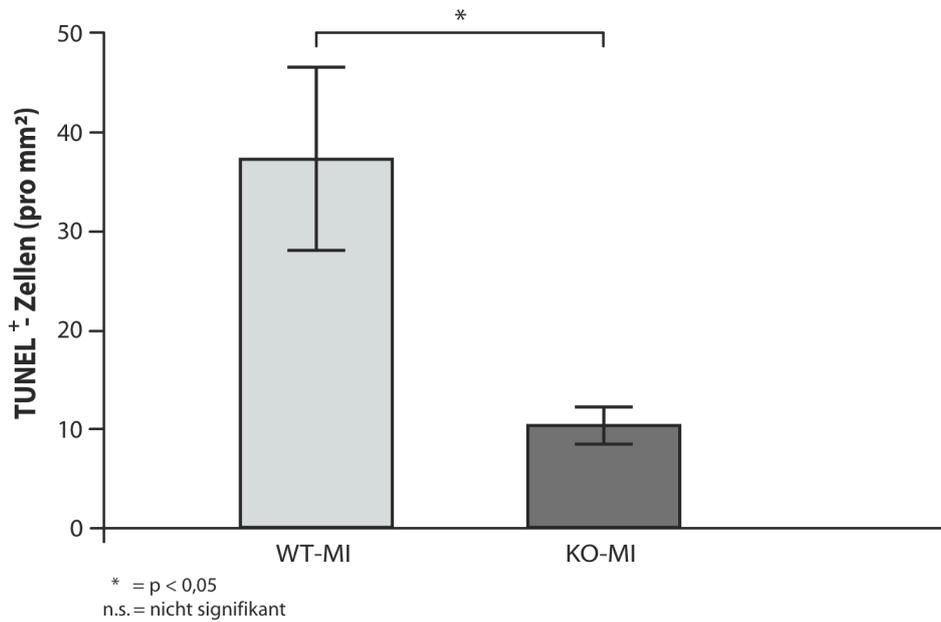
## 3.6 Die kardiale Apoptose

Im *infarzierten* Gewebe der KO-MI und WT-MI Tiere ( $n=6$  pro Gruppe) wurden anhand der TUNEL-Färbung apoptotische Zellen dargestellt (dunkel-braun) und mittels digitaler Bildanalyse quantifiziert. Die gewonnenen Daten wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Einheit ist Zellen/ $\text{mm}^2$ ; Zuerst werden die Ergebnisse für das *infarzierte* Gewebe bei den Myokardinfarkttieren (WT-MI, KO-MI) im Diagramm dargestellt. Im Säulendiagramm befinden sich dabei auf der x-Achse die Tiergruppen (WT-MI und KO-MI) und auf der y-Achse die Anzahl der Zellen pro  $\text{mm}^2$  (Abb. 20a). Es folgt die Darstellung der Bilder der immunhistologischen Färbungen (Abb. 20b und 20c). Die CD3 positiven Zellen sind dunkel-braun gefärbt und mit einem Pfeil gekennzeichnet (  ).

### 3.6.1 TUNEL-positive apoptotische Zellen im infarzierten Gewebe

Im infarzierten Gewebe des Myokards zeigte sich bei der kardialen Apoptose ein signifikanter Unterschied zwischen den WT-MI und den KO-MI Tieren. Die Zahl der apoptotischen Zellen bei den KO-MI Mäusen ist um -73% geringer ( $p < 0,05$ ). Die Daten wurden als Mittelwert (MW)  $\pm$  des Standardfehlers des Mittelwertes (SEM) angegeben (Abb. 20a). Die Einheit ist Zellen/ $\text{mm}^2$ ;  $n=6$  pro Gruppe.

Abb.20a: Anzahl der TUNEL-positiven Zellen im infarzierten Gewebe in Zellen pro mm<sup>2</sup>



### 3.6.2 Die TUNEL-Färbung apoptotischer Zellen im infarzierten Gewebe

Man erkennt in der TUNEL-Färbung der WT-MI Mäuse eine erhöhte Anzahl an dunkelbraun gefärbten TUNEL-positiven Zellen im Vergleich zu den KO-MI Tieren (Abb.20b und 20c).

Abb.20b: TUNEL-positive apoptotische Zellen im infarzierten Gewebe von WT-MI Mäusen

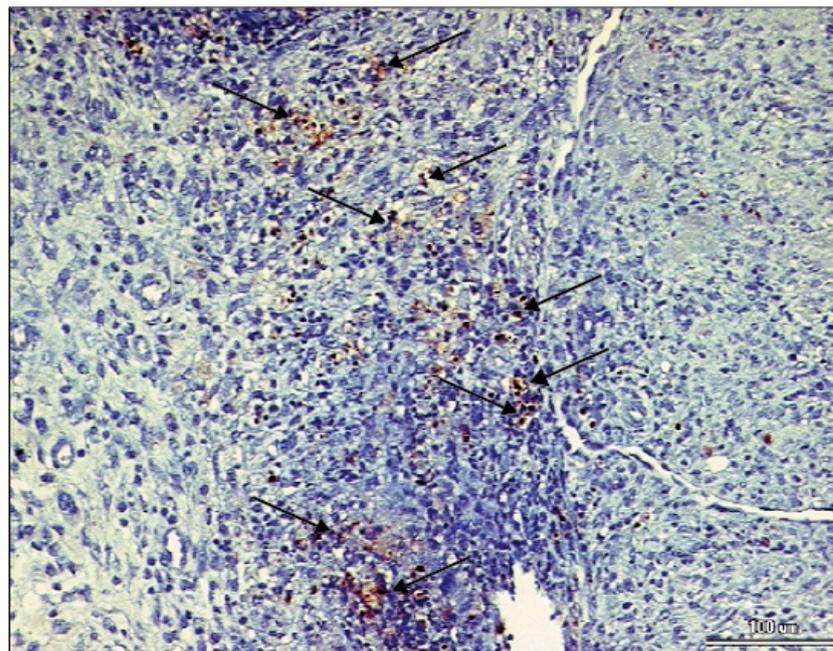
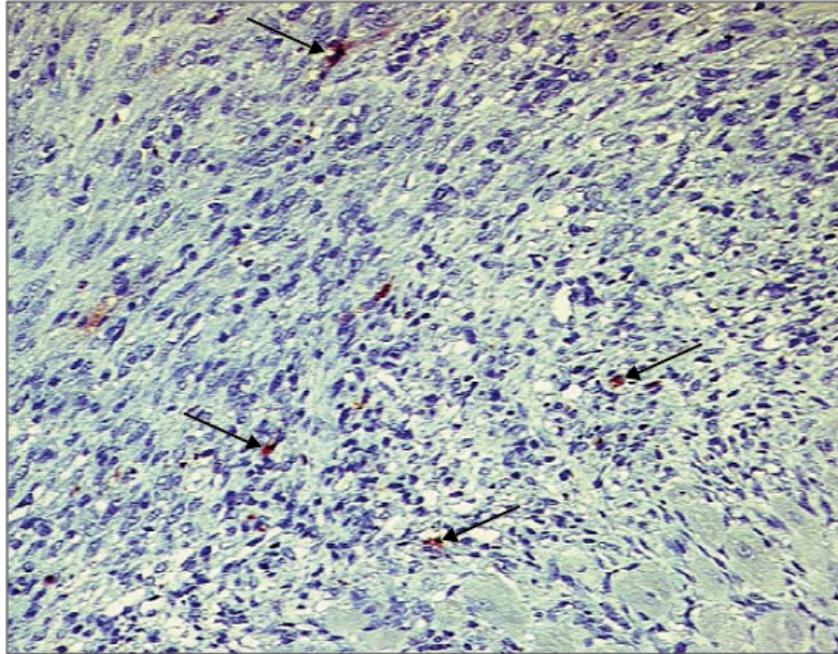


Abb.20c: TUNEL-positive apoptotische Zellen im infarzierten Gewebe von KO-MI Mäusen



### 3.6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der kardialen Apoptose

Zusätzlich zur verminderten Inflammationsreaktion war im Vergleich zwischen KO-MI ( $10 \pm 2$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) und WT-MI ( $37 \pm 8$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) Mäusen im *infarzierten* Gewebe, auch die Anzahl der apoptotischen Zellen in der KO-MI Gruppe signifikant reduziert (-73%;  $p < 0,05$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 Die Rolle des Immunsystems beim Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt ist assoziiert mit der Auslösung einer Inflammationsreaktion und der Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Initialisiert wird die Inflammationsreaktion durch Ischämie, Gewebsschaden, mechanischen und oxidativen Stress [5,20,35,63]. Durch Myozyten-Nekrose freigesetzte Zellbestandteile fungieren hierbei als endogene Liganden und triggern über die Bindung an PRR's wie den Toll-like Rezeptoren die weitere Freisetzung von Zytokinen und Mediatoren in Myozyten und Makrophagen [43,68-70]. Diese bewirken zusammen mit aktiviertem Komplement und Chemokinen die Anlockung von weiteren Leukozyten zum Ort des Geschehens. Diese verstärken wiederum die bereits in Gang gesetzte Zytokinproduktion und Inflammation [32,97,98]. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des Immunsystems und die Auslösung inflammatorischer Kaskaden im Rahmen der akuten Phase des Myokardinfarkts Voraussetzung für die Infarktheilung sind [28,32,97]. Die einwandernden Granulozyten und Makrophagen beseitigen das Infarktgebiet von toten Zellen und Matrix-Trümmern, und führen später über weitere Zytokin- und Mediatorfreisetzung zur Bildung eines Granulationsgewebes. In der folgenden Aufbau-Phase produzieren Myofibroblasten extrazelluläre Matrixproteine und Endothelzellen bilden ein Netz an neuen Gefäßen aus (Neovaskularisation). Nach Apoptose dieser Zellen kommt es letztendlich zur Ausbildung einer Kollagen-Narbe. Die dabei entstehenden architektonischen und geometrischen Veränderungen werden als Remodeling bezeichnet und haben einen entscheidenden Einfluss auf die LV-Herzfunktion [27,30-34,97,99,100]. Das Remodeling kann zu Arrhythmien und Herzversagen führen, und gilt als wichtiger Prädiktor für die Morbidität und Mortalität nach Myokardinfarkt [21-24,80,101,102].

#### 4.1.1 Die beim Myokardinfarkt beteiligten Komponenten des Immunsystems

Der Ablauf des Myokardinfarktes ist sehr komplex und läuft unter der Beteiligung vieler Zellen, Mediatoren und Rezeptoren des Immunsystems ab. Wichtige bei der Generierung der Inflammation eine herausragende Rolle spielende Mediatoren sind neben der zellulären Komponente der Leukozyten, zu denen u. a. Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten gehören, die Zytokine. Der Begriff Zytokine leitet sich aus dem Griechischen ab (*Zyto* = Zelle, *Kinese* = Bewegung)

und bedeutet soviel wie: „sich zwischen den Zellen bewegend“. Bei den Zytokinen handelt es sich um hormonähnliche Mediatoren mit regulatorischer Funktion, um einfache Polypeptide (5-100 kDa), die von vielen verschiedenen Zellen produziert werden und auf viele verschiedene Zellen wirken. Per Definitionem handelt es sich dabei um Zellen des Immunsystems [103]. Neuere Forschungsergebnisse führten zur Erkenntnis, dass Zytokine auch von vielen nicht-immunologischen Zellen und Geweben produziert werden und dass sie ihre Wirkung auch auf viele nicht-immunologische Zelltypen entfalten können [104]. Sie haben pleiotrope (multiple) Effekte und wirken autokrin, parakrin, juxtakrin und selten endokrin. Teilweise wirken sie redundant und teilweise synergistisch. Meist führt ein Stimulationsreiz an den PRR`s zur Produktion der Zytokine, die dann an den Zielzellen an hoch-affine Rezeptoren binden. Sie sind beteiligt an der Immunabwehr, der Inflammation, der Gewebereparatur, der Regulierung der Ontogenese, der Kontraktilität in Herzen und Gefäßen, der Aufrechterhaltung von Körperprozessen und am Zellsterben [104,105,106]. Zytokine können nach deren Funktion, Struktur und Rezeptorzugehörigkeit eingeteilt werden [104,105]. Die großen Zytokingruppen sind: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Tumornekrosefaktor (TNF), Koloniestimulierende Faktoren (CSF), Wachstumsfaktoren, Chemokine und Stressproteine. Im Falle des Myokardinfarktes scheint die Freisetzung der Zytokine durch die bei der Nekrose entstehenden endogenen Liganden und deren Bindung an die TLR`s getriggert zu sein [28,32,38-45,55-57,60,63,65-67,69-71,79,80,84,85,97-100,106].

#### 4.1.2 Die Rolle der Toll-like Rezeptoren beim Myokardinfarkt

Als Teil des angeborenen Immunsystems sind Toll-like Rezeptoren an einer angemessenen Immunantwort auf Infektion, Inflammation und Gewebsschaden beteiligt. So weiß man inzwischen, dass Veränderungen in den für die TLR`s kodierenden DNA Sequenzen, Auswirkungen auf die intrazelluläre Signaltransduktion und die Immunantwort haben können. DNA-Polymorphismen in verschiedenen TLR`s führen so z. B. zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Sepsis und Infektion [61]. TLR`s sind an der Entstehung von Erkrankungen der Atemwege [107], Atherosklerose [108], Tumorerkrankungen [109], inflammatorischen Darmerkrankungen [110], Autoimmunerkrankungen [111] und der Transplantatabstoßung [112] involviert. Verschiedene Forschungsarbeiten befassten sich auch bereits mit der Rolle der TLR`s

beim Myokardinfarkt. So scheint z. B. auch TLR2 in Verbindung mit der Inflamationsreaktion und dem Remodeling nach myokardialer Ischämie zu stehen. In MI-Versuchen zeigte sich die Mortalitätsrate der TLR2-defizienten Tiere verringert [113]. Ischämie-Reperfusionenversuche an TLR2-defizienten Mäusen zeigten ebenfalls, dass diese Tiere eine verminderte Inflamationsreaktion und ein vermindertes Remodeling im Vergleich zu den TLR2-gesunden Tieren aufwiesen [113,114,115]. Es sind bereits verschiedene endogene Liganden, als Aktivatoren von TLR2 identifiziert worden [55,57,60,116]. Zu klären bleibt ob es einen Zusammenhang bei der endogenen Aktivierung von TLR2 und TLR4 gibt, wie es andernorts bereits für die exogene Aktivierung beschrieben ist [62]. Es scheint sehr wahrscheinlich zu sein, dass sowohl TLR4 als auch TLR2 Einfluss auf die postinfarziären Prozesse nehmen. Ob und wie es zu einer Vernetzung der beiden Rezeptoren beim MI kommt, war nicht Teil dieser Arbeit und sollte in weiteren Forschungsarbeiten thematisiert werden. Zudem werden in Kardiomyozyten auch TLR3 und TLR6 exprimiert, die durchaus Einfluss auf Inflammation und Remodeling nach MI nehmen könnten. Bereits erläutert wurde auch die Rolle anderer TLR's bei kardiovaskulären Erkrankungen [63,67,70-88,108,117,118,119].

Frantz et al. zeigten, dass bei myokardialem Gewebsschaden vermehrt TLR4 aktiviert wird. So ermittelten sie in Patienten mit Kardiomyopathien und in Tieren mit induzierter kardialer Dysfunktion, eine vermehrte Expression an TLR4 in den Kardiomyozyten und Endothelien des Herzens. Sie folgerten daraus, dass der TLR4 beim Myokardschaden an der Aktivierung des angeborenen Immunsystems und der Inflammation beteiligt sein muss, wobei sich aber die Beteiligung anderer TLR's nicht ausschließen ließ [69]. In der weiteren Forschung um den Zusammenhang zwischen TLR4 und MI entdeckten Forscher in Patienten mit Herzversagen nach MI erhöhte Level an aktivierten TLR4 auf zirkulierenden Monozyten [87]. Eine neuere Studie befasste sich mit aktivierten TLR4 Rezeptoren auf den Monozyten von rupturierten Plaques bei Patienten mit Myokardinfarkt und gab den Anlass einen Zusammenhang mit dessen Pathogenese zu vermuten [88]. Als Aktivatoren der TLR4 bei Ischämie, Gewebeschaden und oxidativem Stress wurden endogene Liganden entdeckt. Die Signalkaskaden die dabei in Gang gesetzt werden sind Gegenstand umfangreicher Studien und schon teilweise entschlüsselt [52]. Über die Translokation von NFκB, AP-1 bzw. IRF5 in den Zellkern

kommt es zur Expression von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Mediatoren [28,80-85], die die Inflammation, Infarktheilung und das Remodeling nach MI modulieren [28,97]. Neben der Triggerung der Inflammationsreaktion scheinen die TLR4 auch am Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt zu sein, indem sie Monozyten zur Produktion von Matrix-Metallo-Proteinasen stimulieren. All diese Thesen gaben den Anstoß die Rolle der TLR4-Defizienz beim Myokardinfarkt im Tiermodell zu untersuchen. Als einer der ersten Arbeiten wurde hier beim Mausmodell ein Myokardinfarkt durch chronische Ischämie induziert und die Rolle von TLR4 auf die postinfarziären Prozesse erforscht.

## **4.2 Die Studienparameter**

Im folgenden Teil werden die Studienparameter, die der Beantwortung der in dieser Arbeit gestellten Fragen dienen, erläutert und diskutiert.

### **4.2.1 Die Rolle der Mortalitätsstudie**

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vergleich in den Mortalitätsraten nach MI zwischen Tiergruppen mit und ohne TLR4 Rezeptor durchgeführt. Dieser Vergleich erlaubt es den Einfluss einer TLR4-Defizienz auf die Mortalität zu untersuchen. Die Anzahl der Versuchstiere in der vorliegenden Arbeit betrug n=60 pro Gruppe. Deren Mortalität wurde über einen Zeitraum von 4 Wochen beobachtet. Die Kaplan–Meier Methode wurde schon in zahlreichen Studien angewandt und ist eine etablierte statistische Methode zur Bestimmung von Mortalitäts- bzw. Überlebensraten. Ungeklärt bleibt hier jedoch die Ursache des Todes bei den verstorbenen Mäusen. Als Todesursache nach Myokardinfarkt kommen verschiedene Komplikationen wie Herzversagen, Arrhythmien oder plötzlicher Herztod in Frage [20-27].

### **4.2.2 Die linksventrikuläre Herzfunktion und Prognose beim Myokardinfarkt**

Die Hauptdeterminanten die die Prognose nach Myokardinfarkt bestimmen sind die Größe des Myokardinfarktes, das Ausmaß des LV-Remodelings und die Verschlechterung der LV-Herzfunktion als Prädiktor für das Herzversagen und die Mortalität [23,24,26,101,120]. Dabei führt das durch die Inflammation ausgelöste Remodeling zur kardialen Hypertrophie, zur Ausdünnung der Ventrikelwand, zur kardialen Fibrose und konsekutiv zur Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion,

bzw. LV-Dysfunktion. Generell lässt sich die Herzfunktion sowohl durch die Echokardiografie als auch durch eine invasive Messung des Druckes im linken Ventrikel bestimmen [29,86,121]. In diesem Versuchsaufbau wurden invasiv mittels Herzkatheter Druckkurven gemessen. Anhand dieser Druckkurven konnten wir verschiedene kardiale Funktionsparameter bestimmen, die Auskunft über Veränderungen der systolischen und diastolischen linksventrikulären Herzfunktion und somit über den Grad des Herzversagens beim Myokardinfarkt gaben. Es lassen sich verschiedene Parameter der LV-Funktion ermitteln [101,120]. Hier wurden als repräsentative systolische und diastolische Parameter zur Beschreibung der LV-Funktion die LVP, HF,  $dP/dt_{max}$ , LVEDP und  $dP/dt_{min}$  bestimmt. Um den Einfluss des Blutvolumens auf die Druckmessung möglichst konstant zu halten, wurde es möglichst vermieden den Tieren bei der Katheterisierung über die A. carotis einen größeren Blutverlust zuzufügen. Um auch den Einfluss von unterschiedlichen Myokardinfarktgrößen auf die Herzfunktion zu minimieren wurden nur diejenigen Tiere zur Studie zugelassen die eine gleiche MI-Größe von >50% hatten. Auch wurden die Tiere nur bei ausreichender Sedierung katheterisiert, um stressbedingte Schwankungen in der kardialen Funktion auszuschließen. Die Methode zur LV-Druckmessung per Katheter ist eine seit langem etablierte Methode. In vielen Arbeiten wurde dieses Verfahren bereits auch bei *in vivo* Kleintiermodellen wie dem Mausmodell angewandt [33,70,89-96,122-126]. Kommt es nach Myokardinfarkt zum Linksherzversagen, kann es zur Ausbildung eines Lungenödems kommen [20-24]. Das Blut wird in der Systole nicht mehr vollständig aus dem linken Ventrikel hinausbefördert und staut sich im kleinen Kreislauf zurück. Es kommt zur Ödembildung in der Lunge, das Lungenfeuchtgewicht steigt an und kann wie in der vorliegenden Arbeit durch Auswiegen bestimmt werden. Die Bestimmung der Lungen-Trockengewichte galt dem Ausschluss unterschiedlicher Lungengewichte in den Gruppen, was die Ergebnisse verfälscht hätte. So konnte sichergestellt werden dass die erhöhten Gewichte bei den Feuchtlungen auch wirklich dem Lungenödem zuzuschreiben waren.

#### 4.2.3 Die Rolle der kardialen Inflammation beim Myokardinfarkt

In der ersten Phase des Myokardinfarktes, der Inflammationsphase (3-72 h) kommt es aufgrund der Ischämie zum nekrotischen und apoptotischen Untergang von Myozyten. Erstaunlicherweise geht dabei ein Großteil der Myozyten im Infarktgebiet, in der

Randzone und im nicht-infarzierten Gebiet besonders postinfarziell durch Apoptose zu Grunde. Zusätzlich sind in den späteren Phasen des Infarktes auch Fibroblasten, Myofibroblasten, Gefäßzellen und Abwehrzellen von Apoptose betroffen [99,100,127]. Die Myokardzellnekrose, führt über die Freisetzung intrazellulärer Bestandteile zur Aktivierung des Komplementsystems, und zur Entstehung von zytotoxischen freien Radikalen wie den sog. „Reactive Oxygen Species“ (ROS), bei denen es sich um aktivierte Sauerstoff und Sauerstoffintermediärprodukte handelt. Im Rahmen der Inflammation kommt es dann durch Komplement, Chemokine und Zytokine vermittelt zur Anlockung von Leukozyten (Neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten), welche unter Beteiligung von verschiedenen Mediatoren und Adhensionsmolekülen (Selektine, Integrine, ICAM) aus den postkapillären Venolen (Extravasation) in das betroffene Gewebe einwandern [32,97,98,100,128]. Währenddessen beginnen Neutrophile Granulozyten und Makrophagen tote Zellen, sowie Zell- und Matrixrümpfer durch Phagozytose zu beseitigen. Mastzellen, denen bei der Inflammationsreaktion im Herzen eine besondere Rolle zugesprochen wird, degranulieren und setzen weitere Mediatoren (Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren) frei. Neben den eingewanderten Leukozyten sind für die Produktion von Zytokinen zu einem geringen Anteil aber auch Myozyten und Endothelzellen v. a. von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  zuständig [28,31,32,97]. Dabei stimulieren unter anderem die Zytokine selbst durch einen positiven Feedback Mechanismus ihre Ausschüttung. Zusätzlich scheinen adhärente Neutrophile Granulozyten direkt zellschädigende und pro-inflammatorische spezifische toxische Produkte wie Proteasen und ROS freizusetzen [28,97,129]. Diese erste Phase ist überwiegend durch Entstehung und Ausbreitung der Inflammation geprägt.

In der Proliferationsphase (72h-7d) sezernieren aktivierte Makrophagen Matrixmetalloproteinasen (MMP`s), Zytokine und Wachstumsfaktoren und greifen so in den extrazellulären Matrix-Metabolismus ein. Später bewirkt dann die Freisetzung bestimmter anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$  durch Lymphozyten und Makrophagen einen Stopp der weitere Zytokinausschüttung. Im weiteren Verlauf wird die Proliferation und Reifung von Fibroblasten, die Ausdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und der Aufbau von Kollagenen eingeleitet [130]. Es entsteht ein Granulationsgewebe und von der Grenzzone des Infarktes aus kommt es zu Neovaskularisationen [28,97]. In der darauf folgenden Reparationsphase (7d-14d)

stellen Fibroblasten und Endothelzellen ihre Aktivität ein und unterliegen der Apoptose. Es bildet sich eine Kollagen-Narbe aus.

Die Arbeits-Hypothese dass TLR4 eine Rolle in der Aktivierung der inflammatorischen Reaktion, bzw. von inflammatorischen Zellen spielt [67,68,69], veranlasste uns, ihren Gehalt im infarzierten und nicht-infarzierten Myokard der Tiergruppen mit und ohne TLR4 Rezeptor zu analysieren. Erfasst wurde das Ausmaß der Inflammation anhand der CD3-Antikörperfärbung mittels der ABC-Methode, bei der auf T-Lymphozyten befindliche CD3-Antigene dargestellt werden [83]. T-Lymphozyten sind Bestandteil des spezifischen Immunsystems und sind an der Inflammationsreaktion beim MI beteiligt [28,32,97]. Methode und Analysesystem für die CD3-Färbung wurden gemäß Noutsias et al. angewandt [131]. Die Tatsache dass in dieser Arbeit im nicht-infarzierten Gebiet kaum T-Lymphozyten detektiert werden konnten, spricht eventuell für eine andere TLR4 tragende Zellart, die hier für die post-infarziären Vorgänge von Bedeutung ist. Im infarzierten Myokard hingegen liess sich als Zeichen der verstärkten Inflammation ein erhöhter Gehalt an CD3-positiven T-Lymphozyten nachweisen.

#### 4.2.4 Die Rolle der Apoptose beim Myokardinfarkt

Nach MI steigt die Apoptoserate im Myokard. Betroffen von Apoptose sind dabei neben Myozyten auch Fibroblasten, Myofibroblasten, inflammatorische und Endothelzellen [99]. Die apoptotischen Zellen sind sowohl im infarzierten, als auch im nicht-infarzierten Myokard anzutreffen [100]. Studien zeigten, dass die erhöhten Level an apoptotischen Myozyten mit Ventrikelwandverdünnung, LV-Dilatation, Remodeling und Herzversagen assoziiert sind [132]. Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, die auf externe oder auch Zell-interne Signale hin ausgelöst wird. Externe Signale können z. B. von T-Lymphozyten ausgeschütteten Zytokine wie TNF oder bei mechanischen und oxidativen Zellstress freigesetzte reaktive Sauerstoffspezies (engl.: *Reactive oxygen species; ROS*) sein, während ein zellinternes Signal z. B. eine starke Schädigung des Erbmaterials ist [133]. Neben den bereits bekannten Formen des Zelluntergangs beim MI geht man inzwischen jedoch auch vom autophagischen Zelltod der Myozyten als starken Promoter für die postinfarziären Remodelingvorgängen als weiteren Mechanismus aus [134]. Zur Anfärbung der apoptotischen Zellen wurde die TUNEL-Methode angewandt, sie ist eine Standardmethode zur Anfärbung von DNA Fragmenten, wie sie in apoptotischen Zellen vorkommen. Diese Färbemethode wurde

bereits erfolgreich in anderen Ischämie-Modellen bei Mäusen eingesetzt [83,127] und in dieser Arbeit nach dem leicht modifiziertem DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega #7130, USA) angewandt. Die Auswertung erfolgte mittels Mikroskop und dem digitalen Bildanalyseverfahren Lucia G®.

#### 4.2.5 Die Rolle der kardialen Fibrose beim Myokardinfarkt

Die komplexen Umbauvorgänge im Rahmen des Remodelings nach MI sind assoziiert mit Inflammationsreaktion, Zytokinfreisetzung und der Beteiligung vieler immunologischer und nicht-immunologischer Zellen [28,32]. So beginnen nach MI strukturelle Umbauprozesse am Myokard, die zur Narbenbildung, Fibrosierung, sowie geometrischen (Ventrikeldilatation und Myokardwandhypertrophie) und dadurch funktionellen Veränderungen am Herzen führen, welche letztendlich die Morbidität und Mortalität beeinflussen [28-32]. Neben den in dieser Arbeit untersuchten funktionellen Veränderungen nach Myokardinfarkt wurden daher auch die strukturellen Veränderungen im Rahmen des Remodelings erfasst. Zum Nachweis des LV-Remodelings wurde in den Tiergruppen die Fibrosierung über die Quantifizierung des Kollagengehaltes bestimmt und das Ausmaß der Myokardwandhypertrophie ermittelt. Die dabei verwendeten Methoden der Sirius-Red Färbung zur Bestimmung des Kollagengehaltes und die Bestimmung der Herzgewichts- zu Körpergewichtsration zur Ermittlung der Myokardwandhypertrophie sind etabliert und im Mausmodell evaluiert [33,34,78,89,91,95,122,135]. Beim Remodeling hypertrophieren sowohl beim Menschen als auch beim Tier aufgrund des vermehrten Gewebestresses Myozyten [30,121,136]. Bereits in Aortic-banding Versuchen an TLR4-defizienten Mäusen zeigte sich ein Zusammenhang zwischen TLR4-Defizienz und verminderter Myokardwandhypertrophie [78], was uns veranlasste auch hier diesen Parameter des LV-Remodelings zu untersuchen. Bisher bekannt ist, dass in Ischämie-Reperusionsmodellen TLR4-defiziente Mäuse verminderte Myokardschäden und -veränderungen von sich trugen [67,71] und dass TLR2-defiziente Mäuse nach MI einem geringeren Remodeling unterlagen [113].

### **4.3 Die Rolle einer TLR4-Defizienz beim Myokardinfarkt**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des TLR4 Rezeptors als Teil des angeborenen Immunsystems beim induzierten Myokardinfarkt im experimentellen Tiermodell untersucht. Als Ergebnis konnte ein Zusammenhang zwischen TLR4-Defizienz, verminderter kardialer Inflamationsreaktion, vermindertem Remodeling, verbesserter LV-Funktion und verminderter Mortalität, nach Induktion eines MI im Mausmodell ermittelt werden.

#### **4.3.1 Die Auswirkungen der TLR4-Defizienz auf die Mortalität nach Myokardinfarkt**

Ein Ergebnis dieser Studie ist, dass eine TLR4-Defizienz die Mortalitätsrate im experimentellen Tiermodell nach induziertem MI signifikant reduziert. Die Überlebensrate nach Myokardinfarkt ist in der Gruppe der Tiere, die keinen TLR4 Rezeptor tragen höher. Dies geht einher mit einer verbesserten LV-Funktion, einer verminderten Inflamationsreaktion und einem vermindertem Remodeling in der Gruppe ohne TLR4 Rezeptor. Es scheint also, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern und der TLR4-Defizienz gibt. Im Vergleich zu Ischämie-Reperfusionmodellen [67,71] handelt es sich bei dem vorliegenden Tiermodell um eine permanente Okklusion der RIVA mit einer chronischer Ischämie des Myokards.

#### **4.3.2 Die Auswirkungen einer TLR4-Defizienz auf die linksventrikuläre Herzfunktion nach Myokardinfarkt**

Sechs Tage nach MI wurde beim zweiten Set *in vivo* die LV-Herzfunktion gemessen. Bei den TLR4-defizienten Mäusen wurde im Vergleich zu den Tieren mit intaktem TLR4 Rezeptor bessere Parameter in der LV-Herzfunktion ermittelt. Eine TLR4-Defizienz führt also nach MI zu einer signifikant besseren kardialen Funktion. Dies ging einher mit einem geringeren Lungen-Feuchtgewicht als Zeichen eines geringeren Grades an Linksherzversagen mit Lungenödem.

In den schein-operierten Gruppen wurden kaum Unterschiede in den gemessenen Parametern festgestellt, während im Vergleich dazu, wie auch schon in anderen Ischämie-Versuchen beschrieben, bei den Myokardinfarkttieren mit intaktem TLR4 eine deutliche kardiale Funktionsverschlechterung festgestellt werden konnte [33,122,137]. Allerdings existieren auch Arbeiten mit TLR4-defizienten Mäusen, bei denen sich in

Ischämie-Reperusionsmodellen bei den TLR4-defizienten Mäusen nach MI zwar kleinere Infarktzone, aber keine verbesserte LV-Funktion im Vergleich mit den TLR4 gesunden Mäusen zeigten [138]. Die vorliegende Arbeit unterstützt die These, dass eine TLR4-Defizienz zu einer verbesserten LV-Funktion führt. Die Frage über welchen Mechanismus der TLR4 nach MI die Herzfunktion verschlechtert, konnte allerdings noch nicht geklärt werden. Es mag mit der Inflammationsreaktion und dem Remodeling zusammenhängen, doch existieren Studien die zeigen, dass u. a. eine Aktivierung des TLR4 Signalwegs direkt zur Verschlechterung der Myozytenkontraktion führt [139].

#### 4.3.3 Die Auswirkungen einer TLR4-Defizienz auf die Inflammationsreaktion nach Myokardinfarkt

Ein weiteres Ergebnis ist, dass eine TLR4-Defizienz im Vergleich zu den Tieren mit intaktem TLR4 Rezeptor, mit einem geringeren Nachweis von CD3-positiven Zellen im Infarktgebiet assoziiert ist. Das kann sowohl mit einer verminderten Infiltration an CD3-positiven Zellen im Infarktgebiet als auch mit der bei TLR4-Defizienz abgeschwächten Immunantwort zusammenhängen. Die besondere Bedeutung liegt darin, dass es nach Myokardinfarkt bei TLR4-defizienten Tieren zu einem geringeren Ausmaß an Inflammationsreaktion kommt. Im nicht-infarzierten Gebiet zeigten sich währenddessen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Insgesamt lag die Anzahl der registrierten inflammatorischen Zellen im Infarktgebiet deutlich über der im nicht-Infarktgebiet.

#### 4.3.4 Die Auswirkungen einer TLR4-Defizienz auf die Apoptose nach Myokardinfarkt

Im *infarzierten* Myokardgebiet liess sich bei den TLR4-defizienten Mäusen (KO-MI) eine geringere Apoptoserate nachweisen, als bei den Tieren mit intaktem TLR4 Rezeptor (WT-MI). Demnach führt eine TLR4-Defizienz im Infarktgebiet zu einer verminderten Apoptoserate. Zum einen weiß man bereits, dass CD3-positive T-Lymphozyten [28,97] und zum anderen, dass aktivierte TLR4 Rezeptoren direkt über den Fas-Signalweg, an der Induktion der Apoptose beteiligt sind [139]. Das Ergebnis der vorliegenden Studie unterstützt somit die Annahme, dass es einen Zusammenhang zwischen TLR4 und der Entstehung von Apoptose nach MI gibt, doch sind die Mechanismen die in diesem Modell zur verminderten Apoptoserate bei den TLR4-defizienten Mäusen führen noch unbekannt und können anhand der Ergebnisse der oben genannten Studien nur

vermutet werden. Die aktivierten Signalwege, Mediatoren- und Zytokinmuster, sowie die beteiligten Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht ermittelt. Es gilt jedoch als sehr wahrscheinlich, dass sowohl TLR4, als auch Zytokine und die aktivierten CD3-positiven T-Lymphozyten zusammen, zur erhöhten Apoptoserate im Myokard beitragen. Erstaunlicherweise zeigen Ergebnisse aus einer Forschungsarbeit in der bei TLR2-defizienten Mäusen eine kardiale Dysfunktion provoziert wurde, nach TUNEL-Färbung ebenfalls einen verminderten Gehalt an apoptotischen Kardiomyozyten, während er bei den TLR2-gesunden Mäusen erhöht war [114]. Daraus lässt sich auf einen Zusammenhang zwischen TLR4 und TLR2 bei der Entstehung von pathologischen Prozessen im erkrankten Myokard schließen.

#### 4.3.5 Die Auswirkungen eine TLR4-Defizienz auf das Remodeling nach Myokardinfarkt

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine TLR4-Defizienz nach MI zu einem verminderten Remodeling führt. Die TLR4-defizienten Tiere wiesen im *nicht-infarzierten* Gebiet nach MI einen geringeren Kollagengehalt auf als die Tiere mit intaktem TLR4 Rezeptor. Auch war bei ihnen die Myokardwandhypertrophie als Indikator des Remodelings geringer ausgeprägt. Damit konnte ein Zusammenhang zwischen TLR4-Defizienz, MI und vermindertem Remodeling festgestellt werden.

Die Frage nach der Rolle der anderen Toll-like Rezeptoren bleibt offen. So ist z.B. bekannt dass in den Kardiomyozyten neben TLR2 und 4 auch noch TLR3 und 6 exprimiert werden [53]. Auf Fibrozyten befinden sich TLR2, 4 und 7 [140]. Auch weiss man dass sich Toll-like Rezeptoren auf immunologischen Zellen befinden. Neben der Frage welchen Einfluss also die anderen Rezeptoren auf das Remodeling haben, ist auch noch offen welcher der für das Remodeling entscheidende Zelltypus ist. Teilweise sind die Signalkaskaden, die Zytokine und Mediatoren, sowie die Zellen und Enzyme, die die Inflammationsreaktion und das Remodeling im Herzen steuern schon bekannt [28,32,34,97,130,141]. Die gesamten Vorgänge des Remodelings sind jedoch zu komplex, als dass man sich hier allen Aspekten ausreichend hätte widmen können.

#### **4.4 Die Bedeutung dieser Studie**

Nachdem die TLR`s als ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems identifiziert und sein mögliches Potential für die Behandlung von Krankheiten erkannt wurde, fing man an sich intensiv mit diesem Thema zu befassen. Inzwischen existieren unzählige Forschungsarbeiten über die bereits bekannten TLR`s und über mögliche Therapieansätze an diesen [142,143,144]. Neben der Erforschung der endogenen und exogenen Liganden für TLR4, gibt es inzwischen auch Überlegungen, wie man das gewonnene Wissen therapeutisch nutzen kann. Wie bereits erwähnt können Infektionen mit LPS-tragenden Bakterien kardiovaskuläre Inflamationsreaktionen, LV-Dysfunktion und Herzversagen auslösen [70,145]. Für dieses Krankheitsbild konnten in verschiedenen Tiermodellen inzwischen zwei TLR-Antagonisten (E5564 und TAK-242) identifiziert werden, die sich für die Behandlung des LPS-vermittelten septischen Schocks qualifizierten [146,147]. Für uns wichtig sind in diesem Zusammenhang die über die ischämischen Herzerkrankungen gewonnenen Erkenntnisse. Bisher hat man in Ischämie-Reperusionsmodellen an Mäusen beweisen können, dass sich zum einen mittels Einsatz des TLR4 Antagonisten Eritoran [71] und zum anderen durch TLR4-Defizienz [67] die Inflamationsreaktion und die Infarktgröße nach Ischämie verringern lässt. Es existieren also bereits therapeutische Ansätze, die gezielt am TLR4 Rezeptor angreifen und durch Verringerung der Infarktgröße und der Inflamationsreaktion, sowohl das akute Myokardinfarktgeschehen, sowie langfristig auch das Remodeling beeinflussen. Wie schon erwähnt, sind sowohl Myokardinfarktgröße als auch Remodeling die Hauptdeterminanten für die Prognose des Myokardinfarktpatienten [28] und allem Anschein nach, wird der TLR4, der diese Größen entscheidend beeinflusst, in Zukunft ein wichtiger Angriffspunkt zur Therapie von ischämischen Herzerkrankungen sein.

#### **4.5 Einschränkungen dieser Arbeit**

##### **4.5.1 Methodenkritik**

Im Folgenden wird ein kritischer Blick auf den methodischen Teil dieser Forschungsarbeit geworfen. Dazu gehört sowohl die kritische Analyse der operativen Verfahren, der Anästhesie, der transgenen Tiere, als auch der Färbemethoden.

#### *4.5.1.1 Die operativen Verfahren*

Die hier an den Mäusen durchgeführten Experimente sind schwierig in der Durchführung, anfällig für Störfaktoren und bedürfen einen geübten Operateur. Für diese Art der Fragestellung waren diese operativen Eingriffe jedoch unumgänglich. Es existieren seit längerem detaillierte Anleitungen zur Induktion eines Myokardinfarktes [148] und zur Durchführung der Druckmessung mittels Tip-Katheter an Mäusen [33,93,122,124]. Studien an Mäusen mit Myokardinfarkt zeigten, dass strukturelle und funktionelle Veränderungen am Myokard bereits schon wenige Tage nach MI entstehen [28,33]. Die männlichen Versuchstiere waren in Käfigen zu Sechser-Gruppen untergebracht, nahmen künstliche Nahrung zu sich und lebten auf engstem Raum. In dieser Gemeinschaft sind sie einer natürlichen Rangordnung unterworfen, bei der die schwächsten Tiere mehr Stress, Kämpfen und eventuell geringerem Zugang zur Nahrung ausgesetzt sind. Es ist unmöglich den Tieren eine komplett natürliche Lebensweise zu ermöglichen, die der in der freien Wildbahn gleich kommt. Auch ist es unmöglich sämtliche Faktoren, die die Gesundheit und die Lebensgewohnheiten des Menschen beeinflussen auf das Tiermodell zu übertragen. Während die verwendeten Mäuse klinisch vollkommen gesund waren, haben Patienten die einen MI erleiden häufig noch andere Herz-Kreislaufkrankungen wie KHK, Bluthochdruck, Diabetes usw. Es gibt also de facto kein optimales Tiermodell, das man eins zu eins auf den Menschen übertragen kann. Der MI wurde in diesem Modell künstlich durch Ligation der RIVA erzeugt. Wie jeder operativer Eingriff bedeutet dies eine zusätzliche Belastung und mögliche Infektionsquelle für den Organismus des Tieres. So ist es erforderlich so steril wie möglich zu arbeiten, so atraumatisch wie möglich zu operieren und den Myokardinfarkt möglichst immer an der gleichen Stelle zu setzen um für alle Tiere die gleichen Bedingungen zu schaffen. Vorteil dieses Tiermodells ist, dass es in einem überschaubaren Zeitrahmen abläuft und jederzeit reproduzierbar ist. Das dritte Set bestand aus TLR4-defizienten und TLR4-gesunden Mäusen mit je 60 Tieren pro Gruppe. Nach Induktion eines MI wurde in beiden Gruppen die Überlebensrate beobachtet und über einen Zeitraum von 4 Wochen aufgezeichnet und miteinander verglichen. Die gewählte Anzahl an Tieren und der Beobachtungs-Zeitraum im hier gewählten Modell erbrachten hoch signifikante Ergebnisse. Das zweite Set setzte sich aus Tieren zusammen die einen MI erhielten und nach sechs Tagen einer LV-Druckmessung unterzogen wurden. Der zweite Eingriff stellte zwar einen zusätzlichen

Stressfaktor da, doch wurden die Tieren alle ausreichend sediert und exakt dem gleichen Verfahren unterworfen, so dass alle Tiere dieses Sets den gleichen Voraussetzungen bei der Druckmessung ausgesetzt waren. Im Anschluss daran wurden für die weiteren Untersuchungen sorgfältig Herz und Lunge herauspräpariert. Alles in allem sind operative Verfahren im Tierexperiment ein äußerst sensibles System, bei dem Fehler während der Operation die Ergebnisse beeinflussen können. Jedes Tier hat seine eigene körperliche Konstitution, die RIVA verläuft physiologischerweise bei jedem Tier unterschiedlich, der Operateur hat jeden Tag eine andere körperliche Verfassung und Konzentrationsfähigkeit. Diese Faktoren stellen Fehlerquellen dar, die nie vollständig ausgeschlossen werden können.

#### *4.5.1.2 Die Anästhesie*

Einen Einfluss der Isoflurannarkose auf die Versuchstiere kann man nicht sicher ausschließen. So gibt es Hinweise, dass Isofluran bei Hühnern die Apoptose in bestimmten Zelltypen triggert [149]. Bei Mäusen wiederum scheint das Inhalationsnarkotikum einen protektiven Effekt auf Ischämie-Reperfusionsschäden am Herzen zu haben [150]. Beim Menschen jedenfalls generiert die Isoflurannarkose kein erhöhtes Myokardinfarkttrisiko [151] und nimmt wie andere Inhalationsanästhetika keinen negativen Einfluss auf die kardiale Funktion [152]. Wie dem auch sei, die Isoflurannarkose wurde sowohl bei den TLR4-defizienten als auch bei den TLR4-gesunden Tieren eingesetzt, so dass der Fehler systematischer Natur wäre und in den Gruppen-Vergleichen die Ergebnisse nicht verfälschen sollte.

#### *4.5.1.3 Die transgenen Tiere*

Die C57BL/10ScN TLR4-defizienten (KO) Mäuse, die bei dieser Arbeit verwendet wurden tragen eine 74,7 kb Deletion im TLR4 Gen, so dass diese Tiere weder die TLR4 mRNA noch das TLR4 Protein produzieren konnten [61,153]. Somit haben die Ergebnisse auch nur eine konkrete Gültigkeit für diesen Mausstamm mit dieser spezifischen TLR4 Mutation. Eine Gültigkeit der Resultate auf andere TLR4 Mutationen, andere Mausstämme, andere Tierarten und letztendlich den Menschen bedarf weiterer Forschungsarbeit. Im Vergleich zum C57BL/10ScSn Wildtyp (WT) Stamm, zeigen die TLR4-defizienten Mäuse jedenfalls signifikant veränderte Parameter nach MI, so dass

man von einem entscheidenden Einfluss von TLR4 auf die postinfarziären Prozesse ausgehen kann.

#### *4.5.1.4 Die Färbungen*

Für die Experimente wurden nur Tiere zugelassen die eine Myokardinfarktgröße von >50% hatten, um eine unterschiedliche Myokardinfarktgröße in den Tieren als Störfaktor auszuschließen. Die Myokardinfarkte wurden immer vom selben Operateur an immer der gleichen Stelle gelegt und makroskopisch beurteilt. Validiert wurde die Methode der makroskopischen Beurteilung in einer Pilotstudie durch Anfärbung der Myokard-Paraffinschnitte mittels der HE-Färbung und Auswertung unter einem Mikroskop mit einem digitalen Bildanalyseverfahren (Lucia G<sup>®</sup>). Sicher sind die Begutachtungen dabei immer stark subjektiv, und sollten daher immer von derselben Person durchgeführt werden.

Die HE-, TUNEL-, Sirius Red- und CD3 Färbungen, sind etablierte Methoden die schon seit längerem bei Myokardinfarkt-Mausmodellen angewendet werden [122,154,155,156] und in der technischen Ausführung ebenso Fehlern unterworfen sein können wie die operativen Verfahren. So sind die Ergebnisse abhängig von der Erfahrung der färbenden Person und von der Anzahl der Versuchstiere. Denn sowohl für die operativen als auch für die histologischen Verfahren gilt, je größer die Anzahl der Versuchstiere, desto geringer der Einfluss von natürlichen und physiologischen Variablen auf das Ergebnis. Auch die Quantifizierung des Kollagengehalts bzw. der inflammatorischen CD3 positiven Zellen mittels Digitaler Bildanalyse, ein Verfahren, dass schon seit längerem in der Arbeitsgruppe um Tschöpe et al. angewendet wird [94,157], ist subjektiven Einflüssen unterworfen und sollte deshalb immer von derselben Person durchgeführt werden.

## 5 Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt stellt nach wie vor eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität weltweit dar. Die die Prognose nach Myokardinfarkt bestimmenden Determinanten sind die Infarktgröße und das Remodeling, welches wiederum mit Inflammation, Ventrikeldilatation, -hypertrophie, -fibrosierung und Verschlechterung der kardialen Pumpfunktion assoziiert ist. Seit einiger Zeit wurden die Toll-like Rezeptoren, eine Rezeptorgruppe des angeborenen Immunsystems als Schlüsselrezeptoren für die Initialisierung der Inflammationsreaktion und der Triggerung des spezifischen Immunsystems identifiziert. Die Familie der TLR's wird sowohl über endogene als auch über exogene Liganden aktiviert. Beim MI jedoch führt die Aktivierung der TLR's über endogene Liganden wie HSP 60 oder HMGB I zur Initialisierung von Signalkaskaden, die dann zur Inflammationsreaktion und zum Remodeling im Myokard führen. Der TLR4 gilt als einer der am besten erforschten Toll-like Rezeptoren. So ist inzwischen bekannt, dass er neben der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen und Infektionen auch an der Entstehung einer Vielzahl weiterer Erkrankungen beteiligt ist [158-162]. Die Erforschung des TLR4 führte zu einer Vielzahl von Ergebnissen, die neue Erkenntnisse über die Rolle des TLR4 im Immunsystem und den kardiovaskulären Erkrankungen [163] einbrachten. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Rolle des TLR4 bei einer induzierten chronischen Myokardischämie im experimentellen Tiermodell untersucht. Dazu wurde in einer Gruppe von TLR4-defizienten und in einer Gruppe von TLR4-gesunden Mäusen durch Ligatur der RIVA ein MI provoziert und die Auswirkungen auf die LV-Herzfunktion, Mortalität, Inflammation, Apoptose und die kardiale Fibrosierung als Parameter des Remodelings ermittelt und ausgewertet. Das Ergebnis zeigt, dass nach Myokardinfarkt eine TLR4-Defizienz im Vergleich zu den TLR4-gesunden Tieren aufgrund der verminderten Inflammationsreaktion und des verminderten Remodelings zu einer verbesserten LV-Funktion und somit zu einer verbesserten Überlebensrate führt. Die vorliegenden Ergebnisse sollten speziell für alle Patienten von Interesse sein, die an kardiovaskulären Krankheiten leiden und auch für all diejenigen, die sich mit diesem Gebiet der Forschung beschäftigen. Die weiteren Pathomechanismen dieser Vorgänge, sowie mögliche medikamentöse Behandlungsstrategien, die gezielt in diesen Mechanismus eingreifen, müssen Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Thygesen K., Alpert JS., Harvey D. White and on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. Eur Heart J. 2007 Oct;28(20):2525-38.
- 2 Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt, Themenheft 33, Herausgeber Robert Koch-Institut, Autorin Dr. med. Hannelore Löwel 2006; <http://www.gbe-bund.de/>
- 3 Alpert JS, Thygesen K, Antman E. Myocardial infarction redefined – a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol (2000); 36(3): 959 to 69
- 4 Choi KM, Kim RJ, Gubernikoff G, et al. Transmural Extent of Acute Myocardial Infarction Predicts Long-Term Improvement in Contractile Function. Circulation 2001; 104;1101-1107
- 5 Davies MJ. The pathology of myocardial ischaemia. J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol). 1977; 11: 45–52
- 6 Medalie JH, Goldbourt U. Unrecognized myocardial infarction: five-year incidence, mortality, and risk factors. Ann Intern Med 1976; 84:526–531
- 7 Davis TM, Fortun P, Mulder J, et al. Silent myocardial infarction and its prognosis in a community-based cohort of Type 2 diabetic patients: the Fremantle Diabetes Study. Diabetologia. 2004 Mar;47(3):395-9.
- 8 Stokes J 3rd, Dawber Tr. The silent coronary: the frequency and clinical characteristics of unrecognized myocardial infarction in the Framingham study. Ann Intern Med. 1959 Jun;50(6):1359-69.
- 9 World Health Organisation, The Atlas of Heart Disease and Stroke, edited by Mackay,J., Mensah,G. 2004; [http://www.who.int/ cardiovascular\\_diseases/resources/atlas/en/index.html](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/index.html)
- 10 M J Davies and A C Thomas. Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. Br Heart J. 1985 April; 53(4): 363–373
- 11 Splansky GL, Corey D, Yang Q, et al. The Third Generation Cohort of the National Heart, Lung, and Blood Institute's Framingham Heart Study: design,

- recruitment, and initial examination. *Am J Epidemiol.* 2007 Jun 1;165(11):1328-35.
- 12 Yusuf S, Hawken S, Óunpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control-study. *Lancet* 2004; 364: 937– 52
  - 13 Löwel H, Döring A, Schneider A, et al. The MONICA/KORA Augsburg Surveys – Basis for Prospective Cohort Studies. *Gesundheitswesen* 2005; 67 (S1): S13 bis S18
  - 14 Keil U, Liese AD, Hense HW., et al. Classical risk factors and their impact on incident non-fatal and fatal myocardial infarction and all-cause mortality in southern Germany. Results from the MONICA Augsburg cohort study 1984 - 1992. *Eur Heart J* 1998; 19:1197-1207
  - 15 The WHO MONICA Principal Investigators. Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease. A Major International Collaboration. *J Clin Epidemiol* 1988; 41: 105-114
  - 16 Marchioli R, Avanzini F, Barzi F, et al. Assessment of absolute risk of death after myocardial infarction by use of multiple-risk-factor assessment equations: GISSI-Prevenzione mortality risk chart. *Eur Heart J.* 2001 Nov; 22(22):2085-103.
  - 17 Statistisches Bundesamt Deutschland, Herz-/Kreislaufkrankungen weiterhin häufigste Todesursache, Pressemitteilung Nr. 385 vom 21.09.2007, [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
  - 18 Statistisches Bundesamt Deutschland, Todesursache: Herzinfarkt, Pressemitteilung Nr. 395 vom 21.09.2006, [www.destatis.de](http://www.destatis.de)
  - 19 Karin Böhm, Michael Cordes, Anja Afentakis, et al. *Gesundheit – Ausgaben, Krankheitskosten und Personal 2004*, Statistische Bundesamt Wiesbaden, <http://www.destatis.de>
  - 20 Weisman HF, Healy B. Myocardial infarct expansion, infarct extension, and reinfarction: pathophysiologic concepts. *Prog Cardiovasc Dis.* 1987 Sep-Oct; 30(2):73-110.
  - 21 R Lazzara, N El-Sherif, RR Hope and BJ Scherlag. Ventricular arrhythmias and electrophysiological consequences of myocardial ischemia and infarction. *Circ Res.* 1978 Jun; 42(6):740-9.

- 22 Ball COT, Billings FT, Furman RH, et al. The Functional Circulatory Consequences of Myocardial Infarction: A Biostatistical Analysis Following Wiggers' Schema. *Circulation* 1955; 11;749-753 *Circulation*
- 23 Weir RA, McMurray JJ, Velazquez EJ. Epidemiology of heart failure and left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction: prevalence, clinical characteristics, and prognostic importance. *Am J Cardiol.* 2006 May 22;97(10A):13F-25F
- 24 Topalian S, Ginsberg F, Parrillo JE. Cardiogenic shock. *Crit Care Med.* 2008 Jan;36(1 Suppl):S66-74.
- 25 Reeder GS. Identification and treatment of complications of myocardial infarction. *Mayo Clin Proc.* 1995 Sep;70(9):880-4
- 26 Nieminen MS, Böhm M, Cowie MR, et al. Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2005 Feb; 26(4):384-416
- 27 Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81;1161-1172
- 28 Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Nov-Dec; 8(11-12):1907-39.
- 29 Golia G, Rossi A, Anselmi M, et al. Opposite effects of the remodeling of infarcted and non-infarcted myocardium on left ventricular function early after infarction in humans. An echocardiographic study in patients examined before and after myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 1997 Jun 27;60(1):81-90.
- 30 Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation.* 2000 Jun 27;101(25):2981-8.
- 31 Rumberger JA. Ventricular dilatation and remodeling after myocardial infarction. *Mayo Clin Proc.* 1994 Jul;69(7):664-74.
- 32 Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res.* 2004 Jun 25;94(12):1543-53.
- 33 Lutgens E, Daemen M, de Muinck ED, et al. Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes. *Card. Res.* 41 (1999) 586-593

- 34 Dobaczewski M, Bujak M, Zymek P, et al. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res* (2006) 324:475-488
- 35 Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*. 2005 Oct; 125(4):629-37
- 36 Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):819-26.
- 37 Soulas-Sprauel P, Rivera-Munoz P, Malivert L, et al. V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene*. 2007 Dec 10; 26(56):7780-91.
- 38 Lundegaard C, Lund O, Kesmir C, et al. Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations. *Bioinformatics* 2007 Dec 15; 23(24):3265-75.
- 39 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):783-801.
- 40 Janeway CAJ, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197–216.
- 41 Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol*. 2004 Feb; 16(1):23-6.
- 42 Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. *Folia Biol (Praha)*. 2005;51(5):148-57.
- 43 Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews* 2000; 173 (1), 89–97
- 44 Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 May;117(5):979-87;
- 45 Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*. 2002 Dec 27; 111(7):927-30.
- 46 Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*. 1985 Oct;42(3):791-8.
- 47 Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996 Sep 20; 86(6):973-83.

- 48 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997 Jul 24;388(6640):394-7.
- 49 Rock FL, Hardiman G, Timans JC, et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 20;95(2):588-93.
- 50 Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 1991 May 30;351(6325):355-6.
- 51 Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*. 2003 Feb 25;2003(171):re3.
- 52 Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol*. 2007 Feb;19(1):24-32.
- 53 Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol*. 2002 Jan 15;168(2):554-61.
- 54 Watters TM, Kenny EF, O'Neill LA. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Imm Cell Biol*. 2007 Aug-Sep; 85(6):411-9.
- 55 Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol*. 2004 Sep; 76(3):514-9.
- 56 Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, et al. Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock*. 2006 Nov;26(5):430-7.
- 57 Zhang Z, Schluesener HJ. Mammalian toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Dec; 63(24):2901-7.
- 58 O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):353-64
- 59 O'Neill LA. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity*. 2008 Jul;29(1):12-20.Review.
- 60 Wagner H. Endogenous TLR ligands and autoimmunity. *Adv Immunol*. 2006; 91:159-73
- 61 Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science*. 1998 Dec 11; 282 (5396):2085-8.

- 62 Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ: How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* 74:479-485, 2003.
- 63 Knuefermann P, Nemoto S, Baumgarten G, et al. Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? *Chest*. 2002 Apr;121(4):1329-36.
- 64 Fan J., Li Y., Vodovotz Y., Billiar TR. and Wilson MA. Hemorrhagic shock-activated neutrophils augment TLR4 signaling-induced TLR2 upregulation in alveolar macrophages: role in hemorrhage-primed lung inflammation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2006 Apr; 290(4) L738-L746.
- 65 Gay NJ, Gangloff M. Structure and Function of Toll Receptors and their Ligands. *Annu. Rev. Biochem.* 2007. 76:141-65
- 66 Park JS, Svetkauskaite D, He Q, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 2004 Feb 27;279(9):7370-7.
- 67 Oyama J, Blais C Jr, Liu X, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation.* 2004 Feb 17;109(6):784-9.
- 68 Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, et al. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation.* 2002 Oct 8; 106(15):1985-90.
- 69 Frantz S, Kobzik L, Kim YD, et al. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest.* 1999 Aug; 104(3):271-80.
- 70 Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, et al. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation.* 2002 Nov 12; 106(20):2608-15.
- 71 Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I270-4.
- 72 Ashida K, Miyazaki K, Takayama E, et al. Characterization of the expression of TLR2 (toll-like receptor 2) and TLR4 on circulating monocytes in coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb.* 2005;12(1):53-60.

- 73 Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation*. 2002 Mar 12;105(10):1158-61.
- 74 Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, et al. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004 101, 10679-10684.
- 75 Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Arditi M. Role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *Circ Res*. 2004 Dec 10;95(12):e96-7.
- 76 Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2006 Jan;116(1):59-69.
- 77 Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Viruses as adjuvants for autoimmunity: evidence from Coxsackievirus-induced myocarditis. *Rev Med Virol*. 2005 Jan-Feb;15(1):17-27.
- 78 Ha T, Li Y, Hua F, Ma J, et al. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. *Cardiovasc Res*. 2005 Nov 1; 68(2):224-34.
- 79 Kelly RA, Smith TW. Cytokines and cardiac contractile function. *Circulation*. 1997 Feb 18;95(4):778-81.
- 80 Bryant D, Becker L, Richardson J, et al. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation*. 1998 Apr 14;97(14):1375-81
- 81 Satoh M, Nakamura M, Tamura G, et al. Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in myocardium in human dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1997 Mar 15;29(4):716-24.
- 82 Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. *J Infect Dis*. 2001 Jun 1;183(11):1617-24.
- 83 Riad A, Bien S, Gratz M, et al. Toll-like receptor-4 deficiency attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Eur J Heart Fail*. 2008 Mar; 10(3):233-43

- 84 Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol.* 2000; 164:558 –561.
- 85 Okamura Y, Watari M, Jerud ES, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 2001;276:10229 –10233.
- 86 Sundström J, Evans JC, Benjamin EJ, et al. Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2004 Jun 15; 109(23):2850-6.
- 87 Satoh M, Shimoda Y, Maesawa C, et al. Activated toll-like receptor 4 in monocytes is associated with heart failure after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2006 May 10;109(2):226-34.
- 88 Ishikawa Y, Satoh M, Itoh T, et al. Local expression of toll like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond).* 2008 Feb 19
- 89 Tschöpe C, Westermann D, Dhayat N, et al. Angiotensin AT2 receptor deficiency after myocardial infarction: its effects on cardiac function and fibrosis depend on the stimulus. *Cell Biochem Biophys.* 2005;43(1):45-52.
- 90 Tschöpe C, Spillmann F, Altmann C, et al. The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):559-69.
- 91 Westermann D, Van Linthout S, Dhayat S, et al. Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2007 Nov;102(6):500-7.
- 92 Riad A, Walther T, Yang J, et al. The cardiovascular influence of interleukin-1 beta on the expression of bradykinin B1 and B2 receptors. *Int Immunopharmacol.* 2008 Feb;8(2):222-30.
- 93 Westermann D, Rutschow S, Van Linthout S, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase attenuates left ventricular dysfunction by mediating pro-inflammatory cardiac cytokine levels in a mouse model of diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2006 Oct;49(10):2507-13.

- 94 Riad A, Unger D, Du J, Westermann D, et al. Chronic inhibition of p38MAPK improves cardiac and endothelial function in experimental diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jan 5;554(1):40-5.
- 95 Tschöpe C, Walther T, Königer J, et al. Prevention of cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in diabetic cardiomyopathy in rats by transgenic expression of the human tissue kallikrein gene. *FASEB J.* 2004 May;18(7):828-35.
- 96 Li J, Leschka S, Rutschow S, et al. Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine F myocarditis. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jan 5;554(1):60-8.
- 97 Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002 Jan; 53(1):31-47.
- 98 Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. *Experimental studies in rats. Cardiovasc Res.* 2002;55:329–340.
- 99 Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, et al. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Jun;280(6):H2726-31.
- 100 Whelan RS, Mani K, Kitsis RN. Nipping at cardiac remodeling. *J Clin Invest.* 2007 Oct;117(10):2751-3.
- 101 White HD, Norris RM, Brown MA, et al. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* 76: 44–51, 1987.
- 102 John SM, Lee D, Rouleau JL, et al. Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction. *Circulation* 107: 2577–2582, 2003.
- 103 Balkwill FR, Burke F. The cytokine network. *Immunol Today.* 1989 Sep; 10(9):299-304.
- 104 Thomson AW., Lotze MT. *The Cytokine Handbook.* 4<sup>th</sup> Edition 2003 Elsevier Ltd.
- 105 Loppnow H. Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action. *Internist (Berl).* 2001 Jan; 42(1):13-4, 17-27.
- 106 Rauchhaus M, Müller-Werdan U. Cytokines in heart diseases. *Internist (Berl).* 2001 Jan;42 (1):75-84

- 107 Hoffjan S, Stemmler S, Parwez Q, et al. Evaluation of the toll-like receptor 6 Ser249Pro polymorphism in patients with asthma, atopic dermatitis and chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Med Genet*. 2005 Sep 28;6:34.
- 108 Oude Nijhuis MM, van Keulen JK, Pasterkamp G, et al. Activation of the innate immune system in atherosclerotic disease. *Curr Pharm Des*. 2007;13(10):983-94
- 109 Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Mor G. Inflammation, cancer and chemoresistance: taking advantage of the toll-like receptor signaling pathway. *Am J Reprod Immunol*. 2007 Feb;57(2):93-107.
- 110 Pierik M, Joossens S, Van Steen K, et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006 Jan;12(1):1-8.
- 111 Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med*. 2007 May;13(5):543-51.
- 112 Palmer SM, Burch LH, Davis RD, et al. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Sep 15;168(6):628-32.
- 113 Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S, et al. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation*. 2003 Dec 9;108(23):2905-10.
- 114 Nozaki N, Shishido T, Takeishi Y, Kubota I. Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice. *Circulation*. 2004 Nov 2;110(18):2869-74.
- 115 Sakata Y, Dong JW, Vallejo JG, et al. Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Jan;292(1):H503-9.
- 116 Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2001 Feb 16;276(7):5197-203.
- 117 Garantziotis S, Hollingsworth JW, Zaas AK, Schwartz DA. The effect of toll-like receptors and toll-like receptor genetics in human disease. *Annu Rev Med*. 2008; 59:343-59.

- 118 Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2007 Aug;4(8):444-54
- 119 Tobias PS, Curtiss LK. Toll-like receptors in atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*. 2007 Dec;35(Pt 6):1453-5.
- 120 Task Force for Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of European Society of Cardiology, Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J*. 2008 Oct;29(19):2388-442.
- 121 Gao XM, Dart AM, Dewar E, et al. Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res*. 2000 Jan 14;45(2):330-8.
- 122 Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, et al. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 2):H1812-20.
- 123 Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, et al. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 1984 Nov;70(5):812-23.
- 124 Feldman MD, Mao Y, Valvano JW. Development of a multifrequency conductance catheter-based system to determine LV function in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Sep;279(3):H1411-20.
- 125 Miyamoto MI, Kim CS, Guerrero JL, Rosenzweig A, et al. Ventricular pressure and dimension measurements in mice. *Lab Anim Sci*. 1999 Jun;49(3):305-7.
- 126 Jacob R, Dierberger B, Kissling G. Functional significance of the Frank-Starling mechanism under physiological and pathophysiological conditions. *Eur Heart J*. 1992 Nov;13 Suppl E:7-14.
- 127 Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb;45(3):630-41.

- 128 Ebnet K, Vestweber D. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem Cell Biol* 1999; 1:1–23
- 129 Jaeschke H and Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 61: 647–653, 1997.
- 130 Lalu MM, Pasini E, Schulze CJ, et al. Ischaemia-reperfusion injury activates matrix metalloproteinases in the human heart. *Eur Heart J*. 2005 Jan;26(1):27-35.
- 131 Noutsias M, Pauschinger M, Ostermann K, et al. Digital image analysis system for the quantification of infiltrates and cell adhesion molecules in inflammatory cardiomyopathy. *Med Sci Monit*. 2002 May;8(5):MT59-71.
- 132 Mani K, Kitsis RN. Myocyte apoptosis: programming ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Mar 5;41(5):761-4.
- 133 Pimentel DR, Amin JK, Xiao L, et al. Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2001 Aug 31; 89(5):453-60.
- 134 Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Dec; 16(6):663-9.
- 135 Ertl G, Frantz S. Healing after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2005 Apr 1;66(1):22-32.
- 136 Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *Am J Pathol*. 1985 Mar;118(3):484-92.
- 137 Tschöpe C, Heringer-Walther S, Koch M, et al. Myocardial bradykinin B2-receptor expression at different time points after induction of myocardial infarction. *J Hypertens*. 2000 Feb;18(2):223-8.
- 138 Kim SC, Ghanem A, Stapel H, et al. Toll-like receptor 4 deficiency: smaller infarcts, but no gain in function. *BMC Physiol*. 2007 Jun 25;7:5.
- 139 Boyd JH, Mathur S, Wang Y, et al. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res*. 2006 Dec 1;72(3):384-93.
- 140 Balmelli C, Alves MP, Steiner E, et al. Responsiveness of fibrocytes to toll-like receptor danger signals. *Immunobiology*. 2007;212(9-10):693-9.

- 141 Stapel H, Kim SC, Osterkamp S, et al. Toll-like receptor 4 modulates myocardial ischaemia-reperfusion injury: Role of matrix metalloproteinases. *Eur J Heart Fail.* 2006 Nov;8(7):665-72.
- 142 Tse K, Horner AA. Update on toll-like receptor-directed therapies for human disease. *Ann Rheum Dis.* 2007 Nov;66 Suppl 3:iii77-80.
- 143 Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med.* 2007 May;13(5):552-9.
- 144 Romagne F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today.* 2007 Jan;12(1-2):80-7.
- 145 Nemoto S, Vallejo JG, Knuefermann P, et al. Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002 Jun;282(6):H2316-23.
- 146 Hawkins LD, Christ WJ, Rossignol DP. Inhibition of endotoxin response by synthetic TLR4 antagonists. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(11):1147-71.
- 147 Mullarkey M, Rose JR, Bristol J, et al. Inhibition of endotoxin response by e5564, a novel Toll-like receptor 4-directed endotoxin antagonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Mar;304(3):1093-102.
- 148 Zolotareva AG, Kogan ME. Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa.* 1978;20(4):308-14.
- 149 Wei H, Liang G, Yang H, et al. The common inhalational anesthetic isoflurane induces apoptosis via activation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Anesthesiology.* 2008 Feb;108(2):251-60.
- 150 Horikawa YT, Patel HH, Tsutsumi YM, et al. Caveolin-3 expression and caveolae are required for isoflurane-induced cardiac protection from hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 Jan;44(1):123-30.
- 151 Erol DD, Ozen I. Is general anesthesia a risk for myocardium? Effect of anesthesia on myocardial function as assessed by cardiac troponin-i in two different groups (isofluran+N2O inhalation and propofol+fentanyl iv anesthesia). *Vasc Health Risk Manag.* 2007;3(5):755-8.
- 152 De Hert SG, Cromheecke S, ten Broecke PW, et al. Effects of propofol, desflurane, and sevoflurane on recovery of myocardial function after coronary surgery in elderly high-risk patients. *Anesthesiology.* 2003 Aug;99(2):314-23.

- 153 Poltorak A, Smirnova I, Clisch R, Beutler B. Limits of a deletion spanning Tlr4 in C57BL/10ScCr mice. *J Endotoxin Res.* 2000;6(1):51-6.
- 154 Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, et al. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest.* 1997 Sep 15;100(6):1363-72.
- 155 Westermann D, Mersmann J, Melchior A, et al Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction. *Circulation.* 2008 Mar 11;117(10):1269-76.
- 156 Li J, Leschka S, Rutschow S, et al. Immunomodulation by interleukin-4 suppresses matrix metalloproteinases and improves cardiac function in murine myocarditis. *Eur J Pharmacol.* 2007 Jan 5;554(1):60-8.
- 157 Tschöpe C, Walther T, Königer J, et al. Prevention of cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in diabetic cardiomyopathy in rats by transgenic expression of the human tissue kallikrein gene. *FASEB J.* 2004 May;18(7):828-35.
- 158 Zhang X, Shan P, Jiang G, et al. Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *J. Clin. Invest.* 2006;116: 3050-3059
- 159 Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nature Med.* 2007; 13: 1324-1332
- 160 Zacharowski K Zacharowski PA, Koch A, et al. Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal response to systemic inflammatory response syndrome. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2006; 103: 6392-6397
- 161 Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 2005; 438: 364-368
- 162 Jiang D, Liang J, Fan J, et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nature Med.* 2005; 11: 1173-1179
- 163 Riad A, Jäger S, Sobirey M, et al. Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *J Immunol.* 2008 May 15;180(10):6954-61.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
á	zu
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
Abs.	Absoluter
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP-1	Activator protein 1
Aqua dest.	Aqua destillata
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CARD	Caspase recruitment domain
CBF	Campus Benjamin Franklin
CD	Cluster of differentiation
CK-MB	Creatin-Kinase Muscle-Brain
closed-chest	geschlossene Brust
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CSF	Colony stimulating factor
d	days
DAB	Diaminobenzidin
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic acid
$dP/dt_{\max}$	maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
$dP/dt_{\min}$	minimale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit
Dr.	Doctor
EKG	Elektrokardiografie
EKG	Elektrokardiogramm
engl.	englisch

eNos	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
et al.	et alii
etc.	et cetera
g	Gramm
h	hours
HCL	Chlorwasserstoff
HE	Hämalaun-Eosin
HF	Herzfrequenz
HMGB I	High-mobility group box I
hptsl.	hauptsächlich
HRP	Horse raddish peroxidase
HRST	Herzrhythmusstörungen
HSP	Hitze Schock Protein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICR	Intercostalraum
IFN	Interferon
IKK	IκB-Kinase Komplex
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRAK	IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon Regulator Faktor
kb	Kilo-Basen Paare
kDa	Kilo Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	knock-out Mäuse; ohne TLR4 und ohne Myokardinfarkt
KO-MI	knock-out Mäuse; ohne TLR4 und mit Myokardinfarkt
L	Liter
LAD	Left anterior descending coronary artery
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LBP	LPS bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäuren

LV	Linker Ventrikel; linksventrikulär
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolische Druck
LVP	Linksventrikulärer Druck
M.	Musculus
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
max	maximal
MD-2	ein Adapterprotein
med.	medicinae
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
MI	Myokardinfarkt
min.	Minuten
min	minimal
MI/R	Myokardiale Ischämie-Reperfusion
ml	Milliliter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP`s	Matrixmetalloproteinasen
modif.	modifiziert
MW	Mittelwert
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
n	Anzahl
N.	Nervus
NaCl	Natrium Chlorid
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NIH	National Institutes of Health
NOD-LRR	Nucleotid-binding oligomerization domain – leucin rich region
Nr.	Nummer
n.s.	nicht signifikant
OP	Operation
OT	Objektträger

p	p-Wert; statistische Signifikanz
PAMP`s	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate buffered saline
PGN	Peptidoglykane
PRR`s	Pathogen recognition receptors
RCX	Ramus circumflexus
RIG-I	Retinoic acid-inducible gene-I
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RS-Virus	Respiratory Syncytial Virus
RT	Raumtemperatur
rTdT	recombinant TdT
SARM	sterile $\alpha$ - and armadillo - motif-containing protein
sek.	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwerts („standard error of the mean“)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
ss	single stranded
SSC	Sodium Chlorid-Sodium Citrat Puffer
TBS	Tris buffered saline
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TGF	Transforming growth factor
TIR	Toll-Interleukin I Rezeptor
TIRAP	TIR-Domäne enthaltendes Adapterprotein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor-assoziierter Faktor
TRAM	TRIF-verwandtes Adaptermolekül
TRIF	TIR-Domäne enthaltendes IFN $\beta$ -induzierendes Adaptermolekül
TUNEL	TdT mediated d-UTP Nick-End Labeling
u.a.	unter anderem
Ubc 13	Ubiquitin-conjugating enzyme
u.v.m.	und viele mehr

usw.	und so weiter
V.	Vena
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp Mäuse mit TLR4 und ohne Myokardinfarkt
WT-MI	Wildtyp Mäuse mit TLR4 und mit Myokardinfarkt
z.B.	zum Beispiel

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb.1	Über den Myokardinfarkt zum Remodeling mit Ventrikeldilatation
Abb.2	Schematischer Aufbau des Toll-like Rezeptor. Modifiziert nach Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. I. Structure, function and their ligands. Folia Biol (Praha). 2005;51(5):148-57.
Abb.3	Die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren. Modifiziert nach Kawai T, Akira S. TLR signaling. Semin Immunol. 2007 Feb;19(1):24-32.
Abb.4	Der eröffnete Mäuse-Thorax
Abb.5	Aufsicht auf das Herz mit Ligatur
Abb.6	Der Arbeitsplatz zur Druckmessung
Abb.7	Einbringen des Herzkatheters in die A. carotis communis
Abb.8	Die ABC-Methode
Abb.9	Die Herzfrequenz in Schlägen pro Minute
Abb.10	Der linksventrikuläre Druck (LVP) in mmHg
Abb.11	Die maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) in mmHg/sek.
Abb.12	Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) in mmHg
Abb.13	Die linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{min}$ ) in mmHg/sek.
Abb.14a	Die Lungen-Trockengewichte sechs Tage nach MI in mg
Abb.14b	Die Lungen-Feuchtgewichte sechs Tage nach MI in mg
Abb.15	Die Überlebensraten nach Myokardinfarkt
Abb.16	Der Gesamtkollagengehalt im nicht-infarzierten Gewebe in %
Abb.17	Die Herz- zu Körpergewichtsration in g/g
Abb.18a	Anzahl der CD3-positiven T-Lymphozyten im infarzierten Gewebe in Zellen/mm <sup>2</sup>

- Abb.18b CD3 positive T-Lymphozyten im infarzierten Gewebe der WT-MI Mäuse
- Abb.18c CD3 positive T-Lymphozyten im infarzierten Gewebe der KO-MI Mäuse
- Abb.19a Anzahl der CD3-positiven T-Lymphozyten im nicht-infarzierten Gewebe in Zellen pro mm<sup>2</sup>
- Abb.19b CD3 positive T-Lymphozyten im nicht-infarzierten Gewebe der WT-MI Mäuse
- Abb.19c CD3 positive T-Lymphozyten im nicht-infarzierten Gewebe der KO-MI Mäuse
- Abb.20a Anzahl der TUNEL-positiven Zellen im infarzierten Gewebe in Zellen pro mm<sup>2</sup>
- Abb.20b TUNEL-positive apoptotische Zellen im infarzierten Gewebe von WT-MI Mäusen
- Abb.20c TUNEL-positive apoptotische Zellen im infarzierten Gewebe von KO-MI Mäusen

### 7.3 Wissenschaftliche Arbeiten

Publikation:

Riad A, Jäger S, Sobirey M, Escher F, **Yaulema Riß A**, Westermann D, Karatas A, Heimesaat MM, Bereswill S, Dragun D, Pauschinger M, Schultheiss HP, Tschöpe C. Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. J Immunol. 2008 May 15;180(10):6954-61.

Posterpräsentation bei der 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (2007):

A. Riad, A. Kallwellis-Opara, **A. Yaulema Riß**, M. Sobirey, S. Bereswill, H. P. Schultheiss, M. Pauschinger, C. Tschöpe. Die Beteiligung des angeborenen Immunsystems beim Post-Infarkt-Remodeling: die Rolle von Toll-like Rezeptor 4

Vortrag im Rahmen der 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (2006):

S. Spillmann, S. Van Linthout, A. Riad, D. Westermann, J. Lievens, E. Filenberg, O. Demir, **A. Yaulema Riß**, M. Egorova, B. De Geest, C. Tschöpe. Erhöhte High Density Lipoprotein Cholesterinspiegel induziert durch einen humanen Apolipoprotein A-I Gentransfer haben kardial-protective Effekte auf die linksventrikuläre Kontraktilität bei der diabetischen Kardiopathie in einem experimentellen Rattenmodell.

#### **7.4 Selbstständigkeitserklärung**

Ich, Aymaru Yaulema Riß, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des Toll-like Rezeptor 4 beim Myokardinfarkt im Tiermodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 14.02.2011

Yaulema Riß, Aymaru

## 7.5 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Carsten Tschöpe und meinem Tutor Dr. med. Alexander Riad, die mir ermöglichten in ihrer Arbeitsgruppe und an ihrem Projekt mitzuwirken. Besonders meinem Tutor Dr. med. Alexander Riad danke ich dafür, dass er meine Arbeit verantwortungsvoll betreute und leitete. Ohne seine Anregungen und ohne sein Engagement wäre diese Studie nicht zu dem geworden, was sie jetzt ist.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, hier besonders Dirk Westermann, Meike Sobirey, Sebastian Jäger, Marina Egorova, Aysun Subasigüller, Marco Meloni und allen anderen, die Teil des Teams waren. Auch sie haben mich stets unterstützt und durch ihr Wirken zu einem äußerst angenehmen Arbeitsklima beigetragen. Einen Gruß und herzlichen Dank auch an Herrn Zingler und Frau Kerstin Puhl, deren Arbeit, freundliche Hilfestellung und Engagement zu einem guten Ergebnis beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. med. Schultheiss, dem Direktor der Medizinischen Klinik II Abteilung für Kardiologie und Pulmologie des Campus Benjamin Franklin der Charité-Berlin danke ich für die hervorragenden Forschungsbedingungen an seinem Institut und dafür, dass er meine Dissertation in diesem Forschungsgebiet ermöglichte.

## **7.6 Lebenslauf**

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