

**DIE WIRKUNG DER BAKTERIELLEN SEPSIS
AUF DIE ELEKTROMECHANISCHE
KOPPELUNG UND DIE HYPERTROPHIE-
ENTWICKLUNG DES HERZENS**



VOLKER VERVÖLGYI

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth
und
dem Physiologischen Institut 2 der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Betreuer: Prof. Dr. Rainer Meyer

Die Wirkung der bakteriellen Sepsis auf die elektromechanische Koppelung und die Hypertrophieentwicklung des Herzens

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Volker Vervölgyi
Tierarzt aus Kempen

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Roth
2. Prof. Dr. R. Meyer

Tag der Disputation: 12. Januar 2007

Meiner lieben Elke

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	5
1.1. Die Bedeutung der angeborenen Immunabwehr bei der Erkennung einer bakteriellen Sepsis.....	5
1.2. Die elektromechanische Koppelung in der Herzmuskulatur	10
1.3. Die Herzhypertrophie und deren Auswirkung auf Morphologie und Funktion des Herzens.....	14
1.4. Ziele dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden	18
2.1. Versuchstiere und deren Haltungsbedingungen	18
2.2. In vitro-Versuche	19
2.2.1. Übersicht und Gruppeneinteilung	19
2.2.2. Isolation der ventrikulären Kardiomyozyten.....	19
2.2.3. Inkubation der Kulturzellen.....	24
2.2.4. Messung der Sarkomerlängenverkürzung.....	25
2.2.5. Simultane Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration	30
2.2.6. Auswertung der Daten.....	36
2.2.7. Stimulantien.....	40
2.3. In vivo-Versuche.....	43
2.3.1. Gruppeneinteilung	43
2.3.2. Anästhesie.....	43
2.3.3. Transversale Aortale Konstriktion und Schein-Operation	44
2.3.4. Stimulation der Tiere	48
2.3.5. Messung der Hämodynamik.....	48
2.3.6. Blutentnahme	50
2.3.7. Organentnahme	50
2.3.8. Geräte, Materialien und Stimulantien	51
2.3.9. Auswertung der Daten.....	52
3. Ergebnisse.....	55

3.1.	Tierzahlen	55
3.2.	Wirkung von E5564 auf die Sarkomerverkürzung LPS-stimulierter Kardiomyozyten	56
3.2.1.	Originalregistrierungen	57
3.2.2.	Zeitkonstante	61
3.2.3.	Vergleich der Wirkung verschiedener LPS- und E5564-Konzentrationen auf die Sarkomerverkürzungsamplitude	63
3.2.4.	Ruhesarkomerlänge	67
3.2.5.	Verkürzungsgeschwindigkeit	68
3.2.6.	Relaxationsgeschwindigkeit	69
3.2.7.	Verkürzungsdauer	70
3.3.	Simultane Aufzeichnung von Kalziumtransiente und Sarkomerverkürzungen isolierter, ventrikulärer Kardiomyozyten nach Stimulation mit LPS.....	71
3.3.1.	Originalregistrierungen	71
3.3.2.	Ruhesarkomerlänge und Ruhekalziumkonzentration	74
3.3.3.	Sarkomerverkürzungsamplitude und Amplitude der relativen $[Ca^{2+}]_i$	78
3.3.4.	Maxima der $[Ca^{2+}]_i$ während einer Verkürzung	82
3.3.5.	Geschwindigkeiten der Sarkomerverkürzung und der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$	83
3.3.6.	Dauer der Sarkomerverkürzung und der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$	89
3.3.7.	Bildung von Verhältnissen	92
3.3.8.	Auswirkung von LPS auf die Kontraktur isolierter Kardiomyozyten mittels Natrium-Extraktionskontraktur.....	95
3.4.	Auswirkung von Zellwandbestandteilen gram-positiver Bakterien auf die Sarkomerverkürzung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten.....	99
3.4.1.	Vergleich der Wirkung von Lipoteichonsäuren verschiedener Herkunft auf die Sarkomerverkürzungsamplitude	99
3.4.2.	Ruhesarkomerlänge	102
3.4.3.	Verkürzungsgeschwindigkeit	103
3.4.4.	Relaxationsgeschwindigkeit	104
3.4.5.	Verkürzungsdauer	105

3.5.	Auswirkung einer peritonealen, gram-negativen Sepsis auf Mäuse mit induzierter hämodynamischer Drucküberbelastung in vivo.....	106
3.5.1.	Mortalitätsraten.....	106
3.5.2.	Klinisches Erscheinungsbild.....	107
3.5.3.	Morphologische Parameter.....	107
3.5.4.	Hämodynamik.....	110
3.5.5.	Elektrokardiogramm.....	117
4.	Diskussion.....	121
4.1.	Validität der angewandten in vitro Methoden.....	121
4.2.	Frequenzabhängigkeit der Sarkomerverkürzung unter Kontrollbedingungen.....	125
4.3.	Auswirkungen von LPS auf die Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyozyten, deren Abhängigkeit von TLR4 und deren Beeinflussung durch E5564.....	128
4.4.	Abhängigkeit des LPS-Signalweges in isolierten Kardio-myozyten von iNOS.....	134
4.5.	Subzelluläre Mechanismen der LPS-abhängigen reduzierten Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten.....	137
4.6.	Einfluss von Zellwandbestandteilen gram-positiver Bakterien auf die kardiale Kontraktilität.....	144
4.7.	Validität der angewandten in vivo-Methoden.....	146
4.8.	Auswirkungen der peritonealen, gram-negativen Sepsis auf Morphologie und Funktion des drucküberlasteten Herzens.....	148
5.	Zusammenfassung.....	153
6.	Summary.....	155
	Literaturverzeichnis.....	157
	Tabellenanhang:.....	174

Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Kalziumkonzentration
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer = 10 ⁻⁶ m
µM	mikromolar = mikromol/l
A.	Arterie (Arteria)
Abb.	Abbildung
AP	Aktionspotential
BAPTA	Bis-(o-aminophenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
BM	Körpermasse
BP	Blutdruck
BSA	bovines Serum Albumin
C3H/HeN	Labormaus-Inzuchtlinie
C57BL/6	Labormaus-Inzuchtlinie
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter = 10 ⁻² m
cNOS	konstitutive Stickstoffmonoxidsynthase
cps	counts per seconds
cTnl	kardiales Troponin I
d	Tag(e)
DAP	diastolischer arterieller Blutdruck
D-MEM	Dulbecco's mean eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E. coli	Escherichia coli
EDLVP	enddiastolischer linksventrikulärer Blutdruck
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminomethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
et al.	et alii
EU	Endotoxin unit
Fa.	Firma

Abkürzungsverzeichnis

FCS	fetales Kälberserum
Fr.	French; Maßeinheit für die Dicke von Kathetern 1 Fr. entspricht einem äußeren Durchmesser von 0,33 mm
g	Gramm
G	Gauge; Einheit für den Durchmesser von Kanülen 27 G = 0,4 mm
h	Stunde(n)
HEPES	Hydroxyethylpiperazinyl-ethansulfonsäure
HM	Herzmasse
HR	Herzfrequenz
Hz	Hertz = min^{-1}
i.p.	intraperitoneal
$I_{\text{Ca,L}}$	L-Typ Kalziumstrom
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
iNOS	Cytokin-induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
l	Liter
LM	Lungenmasse
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
LV	linker Ventrikel (Herz)
LVM	linksventrikuläre Masse
Mal	MyD88-adaptor like protein
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
max.	maximal
MEM	minimum essential medium
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
mm	Millimeter = 10^{-3} m
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule; Maßeinheit für Druck
mmol	Millimol

Abkürzungsverzeichnis

mmWS	Millimeter Wassersäule
MRSA	Methoxilin-resistente Staphylococcus aureus
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
ng	Nanogramm
nm	Nanometer = 10 ⁻⁹ m
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on; Hemmstoff für die lösliche Guanylatcyclase
ONOO ⁻	Peroxynitrit
OP	Operation
P _i	freies Phosphat
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PGN	Peptidoglykan
pH	potentia Hydrogenii - „Stärke des Wasserstoffs“ (negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration)
PKG	cGMP-abhängige Phosphokinase
PLB	Phospholamban
PMT	photo multiplier tube
pN	Piconewton, 10 ⁻¹² Newton
PRR	pathogen recognition receptor
ROI	region of interest
RSLA	Rhodobacter sphaeroides Lipid A
s	Sekunde
S.	Staphylococcus
SAP	systolischer arterieller Blutdruck
SD	standard deviation; Standardabweichung

Abkürzungsverzeichnis

SEM	standard error of the mean; Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	sarkoplasmatische Kalzium-ATPase
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SLVP	systolischer linksventrikulärer Blutdruck
SMT	S-Methylisothiurea
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
ssTnI	slow skeletal Troponin I
Tab.	Tabelle
TAC	transversale aortale Konstriktion
TL	Tibiallänge
TLR	Toll-like Rezeptor
TnC	Troponin C
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TnT	Troponin T
U/min	Umdrehungen pro Minute
USP	United States Pharmacopeia ; Einheit für die Stärke von chirurgischen Fäden
UV	ultraviolett
V	Volt; Maßeinheit für elektrische Spannung
vs.	versus
W	Watt; Maßeinheit für Leistung
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1. Die Bedeutung der angeborenen Immunabwehr bei der Erkennung einer bakteriellen Sepsis

Der Begriff „Sepsis“ wurde bereits vom griechischen Arzt Hippokrates (ca. 470 bis 380 v. Chr.) geprägt und leitet sich aus dem griechischen Wort *σηπω* („faul machen“) ab. Eine moderne Definition der Sepsis wurde 1989 von Bone veröffentlicht: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion.“ Auf einer Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine wurde diese Definition ausgebaut und Sepsis als eine durch eine Infektion hervorgerufene generalisierte hyperinflammatorische Reaktion (systemic inflammatory response syndrom, SIRS) definiert (Bone et al., 1992). Dabei rufen Erreger bzw. deren Bestandteile eine Abwehrreaktion hervor, die außer Kontrolle gerät und nicht nur die Pathogene angreift, sondern auch zu einer Schädigung körpereigener Zellsysteme führen kann. Klinisch zeigt die Sepsis ein eher unbestimmtes Bild: Es können Hypo- oder Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe und auch eine Leukozytose oder Leukopenie auftreten.

Sepsis ist nach wie vor die häufigste Todesursache in Intensivstationen in den USA. Bei einer Inzidenz von >750.000 Sepsis-Fällen pro Jahr gibt es ca. 215.000 jährliche Todesfälle. In Deutschland werden nach den Daten des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet) auf Intensivstationen jährlich ca. 150.000 Patienten mit Sepsissymptomen behandelt, wovon ca. 75.000 eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock zeigen (Bach et al., 2006). Laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes, einer Einrichtung des Robert-Koch-Institutes und des Statistischen Bundesamtes, lag im Jahre 2004 die Mortalitätsrate für Sepsis in Deutschland bei 7,4 je 100.000 Einwohner. Das ergab eine absolute Anzahl von ca. 6.100 an Sepsis gestorbenen Personen in diesem Jahr (www.gbe-bund.de).

Besonders schwerwiegend ist dabei die septische Kardiomyopathie, die mit einer Pumpfunktionsstörung des Myokards einhergeht. Es wurde berichtet, dass 40% der Sepsispatienten eine myokardiale Dysfunktion entwickeln, wobei die Mortalität dieser Patienten von 20% auf 70% ansteigt (Parrillo et al., 1990). Die kardiale Funktion ist bei septischen Patienten prognosebestimmend, da sich die meisten anderen

Organsysteme durch technische Maßnahmen unterstützen lassen. Diese Dysfunktion des Herzens führt zu einer Minderperfusion der Organe, wodurch es zu Multiorganversagen und zum Tod kommen kann.

Der Erforschung der Schädigung des Herzens während einer Sepsis kommt somit eine hohe klinische Bedeutung zu.

Wie oben erwähnt, liegt der Sepsis eine Infektion zugrunde. Der angeborenen Immunabwehr kommt bei der Erkennung der bakteriellen Infektion eine große Bedeutung zu. Die adaptive Immunabwehr, bestehend aus B- und T-Lymphozyten, bildet zwar durch klonale Selektion ein hochspezifisches Abwehrsystem, das mit bis zu 10^{18} verschiedenen monoklonalen Antikörpern respektive T-Zell-Rezeptoren in der Lage ist, gezielt auf Infektionserreger zu reagieren. Die Expression gezielter Rezeptoren bzw. Antikörper dauert jedoch drei bis fünf Tage, also genügend Zeit für pathogene Mikroorganismen, um dem Wirtsorganismus zu schaden. Ein weiterer Nachteil ist, dass das rein von somatischen Zellen gebildete „immunologische Gedächtnis“ nicht an die nächste Generation weitergegeben werden kann (Medzhitov und Janeway, 2000).

Die phylogenetisch ältere angeborene Immunabwehr hingegen hat mit voraussichtlich nur einigen hundert verschiedenen Rezeptoren nur eine begrenzte Anzahl zur Verfügung. Sie ist jedoch in der Lage, Strukturen zu erkennen, die relativ unabhängig von genetischer Variabilität sind, also ein konserviertes Muster aufweisen. Diese Strukturen nennen sich pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Die sie erkennenden Rezeptoren heißen daher pattern-recognition receptors (PRRs). Die PAMPs haben drei gemeinsame Eigenschaften: erstens, sie werden nur von Mikroorganismen produziert und nicht vom Wirtsorganismus; zweitens, sie sind unveränderlich innerhalb einer gewissen Klasse von Mikroorganismen, dadurch genügt eine relativ geringe Anzahl von PRRs, um auf eine Vielzahl von Erregern zu reagieren; drittens, die PAMPs sind notwendig für das Überleben der Erreger (Medzhitov, 2001). Die PRRs sind konstitutiv und werden daher an die nächste Generation vererbt.

Zu den PAMPs gehören unter anderem auch Zellwandbestandteile von sowohl gram-negativen als auch gram-positiven Bakterien. Der Aufbau der Zellwände beider Arten von Bakterien ist sehr verschieden und gleichzeitig auch das maßgebliche Unterscheidungskriterium. Gram-positive Bakterien zeichnen sich durch eine

Zellwand aus, die zum größten Teil aus den die Phospholipiddoppelschicht umgebenden Peptidoglykanen (PGN, Murein) besteht. Dies sind Polysaccharidketten, die durch Oligopeptide quervernetzt sind. Bei gram-positiven Bakterien ist diese Schicht 15 – 80 nm und bis zu 40 Schichten dick. In die Zellwand dieser Mikroorganismen sind verschiedene Moleküle, u.a. Lipoteichonsäuren (LTA), eingelagert. Im Gegensatz dazu haben gram-negative Bakterien mit 2 nm eine sehr dünne PGN-Schicht. Kennzeichnend ist hier vor allem die zweite, äußere Zellmembran, die über sog. outer membrane proteins und Murein-Lipoprotein mit der Mureinschicht verbunden ist. In ihr sind auch Lipopolysaccharide (LPS) eingelagert (Kayser et al., 1999).

Bei ca. 30 – 50 % der Sepsisfälle liegt eine Infektion mit gram-negativen Bakterien zugrunde (Rensing, 2003). Ein mögliches PAMP dieser Bakterien stellt das LPS (auch Endotoxin genannt) dar. Es hat einen großen Anteil an systemischen Entzündungsreaktionen (Medzhitov, 2001; Pålsson-McDermott und O’Neill, 2004). LPS besteht aus einem außen liegenden Polysaccharid und einem Phospholipid. Ersteres ist noch mal aufgeteilt in eine O-spezifische Kette, die je nach Bakterienstamm aus bis zu 50 Wiederholungen von Zuckerketten aufgebaut ist und zur Serotypisierung der Bakterien herangezogen wird. Weiterhin besteht sie aus einer äußeren und inneren Kernregion, die in der Mitte des LPS gelegen ist. Ganz innen befindet sich das Phospholipid (Lipid A), das den Hauptanteil der immunstimulatorischen, toxischen Eigenschaft des LPS ausmacht (Alexander und Rietschel et al., 2001; Lien et al., 2000; Medzhitov, 2001; Rensing, 2003; Schletter et al., 1995). Das LPS ist über den Lipid-A-Anteil in der äußeren Membran der Bakterien verankert. Lipid A macht dabei ca. 75% der äußeren Schicht aus (Alexander und Rietschel, 2001). Beim Zerfall der Bakterien durch verschiedene Einflüsse wie antibiotische Therapie oder Lyse durch Immunzellen wird LPS freigesetzt.

Wie bereits oben erwähnt geschieht die Erkennung der PAMPs, somit auch des LPS, über PRRs. Eine Gruppe dieser PRR, zu denen auch der LPS-Rezeptor gehört, sind die Toll-like Rezeptoren (TLR) (Medzhitov, 2001; Mukhopadhyay et al., 2004; Pålsson-McDermott und O’Neill 2004). Diese wurden zunächst bei Fliegen der Gattung *Drosophila* beschrieben, wo sie essentiell für die Embryonalentwicklung aber auch für die Bekämpfung von Pilzinfektionen sind (Medzhitov, 2001). Sie bestehen aus einer extrazellulären Leucin-reichen Region und einer intrazellulären Toll/IL-1-

Domäne (TIR). Der transmembranäre Aufbau erlaubt es, Signale in das Zellinnere weiterzuleiten (Medzhitov, 2001). Der erste beim Menschen gefundene TLR war TLR4, der zunächst human Toll (hToll) genannt wurde (Medzhitov et al., 1997). Mittlerweile sind bereits eine Reihe von TLRs bekannt. So konnten beim Menschen bislang 10, bei Mäusen sogar 13 verschiedene TLRs beschrieben werden (Lakhani und Bogue, 2003; Mukhopadhyay et al., 2004; Pålsson-McDermott und O'Neill 2004).

Der Rezeptor, der für die Erkennung von LPS verantwortlich ist, ist TLR4. Das erste Protein aber bei der Erkennung von LPS ist das in der Leber produzierte und frei im Blut zirkulierende LPS-binding protein (LBP), das mit hoher Affinität an die Lipid A Untereinheit des LPS bindet (Schuhman et al., 1990). LBP dient dabei als akzessorisches Protein, das die Bindung an das Oberflächenmolekül CD14 unterstützt. Durch die Verbindung dieser drei Moleküle kann LPS nun an den LPS-Rezeptorkomplex andocken, bestehend aus dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) und MD-2 (Pålsson-McDermott und O'Neill, 2004). Das Glykoprotein MD-2 ist ein Adaptorprotein, das einen notwendigen Faktor im LPS-Signalweg darstellt. Im Gegensatz zu CD14 ist MD-2 beständig an TLR4 gebunden. Der sich auf der Zellmembran befindliche LPS-Erkennungskomplex besteht also aus drei Komponenten: CD14, TLR4 und MD-2 (Schromm et al., 2001, Shimazu et al., 1999, Nagai et al., 2002). Visintin et al. (2002) konnten sogar zeigen, dass LPS in Wirklichkeit an MD-2 bindet, das somit die TLR4-Signaltransduktion induziert. Aber die Anwesenheit von CD14 ist ebenfalls notwendig. So zeigte sich, dass CD14-defiziente Mäuse hyporesponsiv gegenüber LPS sind. Umgekehrt zeigte sich, dass CD14-überexprimierende Mäuse hypersensitiv auf LPS reagieren (Ferrero et al., 1993). Da CD14 jedoch keine transmembranäre Domäne hat, war es sehr unwahrscheinlich, dass es alleine für die Weiterleitung des LPS-Signals ins Zellinnere verantwortlich ist (Pålsson-McDermott und O'Neill, 2004) Als wirklicher Rezeptor für LPS wurde schließlich der TLR4 entdeckt (Poltorak et al., 1998). Dennoch zeigt LPS eine signifikante Wirkung auf CD14-Knockout-Mäuse, was andeutet, dass es einen CD14-unabhängigen Mechanismus der LPS-Erkennung gibt (Haziot et al., 1998).

Durch die Bindung von LPS an den TLR4-Rezeptorkomplex und die Weiterleitung dieses Signals ins Zellinnere kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der im Zellkern die Transkription und dadurch die Bildung von

proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 1 β (IL-1 β) und IL6, IFN γ anregt. Weiterhin kommt es zur Bildung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS).

Durch Infektion mit gram-positiven Bakterien oder durch Stimulation mit LTA und PGN kommt es zu einer ähnlichen Produktion von Zytokinen (Pålsson-McDermott und O'Neill 2004). Die Produktion und Freisetzung dieser Zytokine können dazu führen, dass es zu einer verminderten Kontraktionsfähigkeit des Herzmuskels kommt, wie es in der Sepsis zu beobachten ist (Kapadia et al., 1995; Muller-Werdan et al., 1998; Pagani et al., 1992).

Während Infektionen mit gram-negativen Bakterien noch vor ca. 40 Jahren eine dominierende Rolle gespielt haben, hat sich die Zahl der Infektionen durch gram-positive Bakterien jedoch mittlerweile stark erhöht und macht nun ca. die Hälfte der Fälle von schwerer Sepsis aus (Bochud et al., 2001). Es ist sogar wahrscheinlich, dass die Inzidenz der gram-positiven Sepsis weiter ansteigen wird und dann in den nächsten Jahren zur vorherrschenden, zumindest nosokomialen Sepsisform werden wird (Kengatharan et al., 1998).

Wie bereits oben erwähnt, sind PAMPs von gram-positiven Bakterien LTA und PGN. LTA ist ein makroamphiphiles Molekül, dessen chemische Eigenschaften zu denen von LPS in gram-negativen Bakterien ähnlich sind. Es besteht dabei aus ca. 25 Poly-1,3-Glycerinphosphaten, die lang genug sind, die Mureinschicht zu durchdringen. Diese Kette ist mit einem Diacylglycerolipid-Anker verbunden, der in die Zellmembran eingelagert ist. Die unterschiedlichen LTAs haben verschiedene physiologische Funktionen in der Bakterienzelle. Sie konzentrieren Kationen an der Zellwandoberfläche und sind beteiligt an den Vorgängen der Zellteilung sowie an der Regulation der Autolyse des PGN (Fournier und Philpott, 2005).

In mehreren Experimenten wurde gezeigt, dass Stimulation mit Zellwandbestandteilen gram-positiver Bakterien ebenfalls zur Produktion proinflammatorischer Zytokine führt (Cleveland et al., 1996; Gupta et al., 1996; Hattori et al., 1997) und ebenfalls eine, wenn auch nur moderate, systemische inflammatorische Reaktion hervorrufen (Kengatharan et al., 1998). Bei Vergleichen zwischen der Reaktion auf LPS und der auf LTA rief LTA nämlich eine geringere Produktion an Zytokinen hervor (Kasanoki et al., 1995, von Aulock et al., 2004).

Als zugehöriger PRR, der für die Erkennung der Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien und der Weiterleitung des Signals ins Zellinnere verantwortlich ist, ist der TLR2 beschrieben (Schwandner et al., 1999; Fournier und Philpott, 2005).

Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass die PRR (CD14, TLR4, TLR2) auf humanen und murinen Kardiomyozyten exprimiert werden (Haziot et al., 1996; Frantz et al., 1999; Frantz et al., 2000; Cowan et al., 2000). Deshalb liegt die Frage nahe, ob es auch über Bindung von PAMPs an diese kardialen Rezeptoren zur Produktion von Zytokinen kommen kann. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die PRRs auf den Kardiomyozyten selbst für die verminderte kardiale Kontraktilität verantwortlich sind. Dies wird kontrovers diskutiert. Während Tavener et al. (2004) die Notwendigkeit des Immunsystems nach Stimulation mit LPS postulieren, konnte in unserer Arbeitsgruppe diese Notwendigkeit widerlegt werden (Baumgarten et al., 2006a). Weiterhin sind die weiteren Abläufe, die in isolierten Kardiomyozyten in Reaktion auf LPS zu einer verminderten Kontraktilität führen, noch unklar.

1.2. Die elektromechanische Koppelung in der Herzmuskulatur

Um die pathophysiologischen Abläufe im Herzen und in isolierten Herzmuskelzellen, die während einer bakteriellen Sepsis eine Rolle spielen, entsprechend beurteilen zu können, ist es notwendig, sich über Aufbau des Herzmuskels und die physiologischen Mechanismen vom elektrischen Reiz bis zur Kontraktion im Klaren zu sein.

Der Herzmuskel gehört genauso wie die Skelettmuskulatur zur so genannten quergestreiften Muskulatur, mit der er auch einige wichtige Gemeinsamkeiten hat. Dennoch weist er im Vergleich zu dieser auch deutliche morphologische und funktionelle Unterschiede auf. Während die Skelettmuskelzellen bei einem Durchmesser von 10 – 100 μm 5 bis 12 cm lang werden können, haben humane Kardiomyozyten eine Länge von 40 bis 100 μm bei einem Durchmesser von 10 bis 20 μm (Thews et al., 1989; Drenckhahn und Zenker, 1994). Das Myokard ist aus einem Netzwerk verzweigter Zellen aufgebaut, deren Grenzen durch die so genannten Glanzstreifen markiert werden, die quer zur Faserrichtung verlaufen (Thews et al., 1989). In ihnen sind gap-junctions zur Zell-Zell-Kommunikation eingelagert. Über sie ist die Erregungsweiterleitung im Herzen geregelt. Das heißt

auch, dass die Erregung irgendeiner Stelle der Herzmuskulatur zur vollständigen Erregung des gesamten Myokards führt. Deshalb wird die Herzmuskulatur auch als ein funktionelles Synzytium bezeichnet (Schrader, 1996).

Herzmuskelzellen weisen im lichtmikroskopischen Bild ebenso wie die Skelettmuskulatur ein quergestreiftes Aussehen in Form von hellen und dunklen Bändern auf. Dies ist bedingt durch die regelmäßige Anordnung der Proteine, die den kontraktilem Apparat ausmachen. Das Sarkomer ist dabei die kleinste kontraktile Einheit eines quergestreiften Muskels, wobei sich die Kontraktion der gesamten Zelle aus der Summe der Kontraktionen aller Sarkomere zusammensetzt.

Bei Betrachtung unter einem Lichtmikroskop sieht man, dass ein Sarkomer aus mehreren Banden besteht. In der Mitte liegen die im polarisierten Licht doppelbrechenden (anisotropen) A-Banden. Diese enthalten die 1,6 μm langen, dicken Myosinfilamente und erscheinen deshalb dunkel. Angrenzend daran liegen die nur dünne Filamente enthaltenden isotropen I-Banden, die bis zu den Z-Scheiben reichen, die die äußere Begrenzung des Sarkomers ausmachen (Rüegg, 2000).

Es gibt zwei Arten von Myofilamenten: das dicke und das dünne Filament. Ersteres besteht aus Myosin, wobei ca. 500 Myosinmoleküle ein Filament bilden. Diese sind jeweils aufgebaut aus zwei identischen schweren Ketten, die sich am einen Ende mit anderen Myosinmolekülen zusammenlagern und so das Filament bilden. Das andere Ende, die Kopfregion, enthält neben vier leichten Ketten die Myosin-ATPase. Im Ruhezustand des Muskels steht der Myosinkopf senkrecht zum Filament. Jeder Myosinkopf ist in der Lage, als Querbrücke eine Verbindung zwischen Aktin- und Myosinfilament herzustellen, was eine Voraussetzung für die Kontraktion darstellt (Rüegg, 2000).

Hauptbestandteil des dünnen Filamentes ist das Aktin (F-Aktin). Es ist ca. 1 μm lang und 5-7 nm dick und ist aus zwei spiralig umeinander gewickelten Ketten aufgebaut, die durch Polymerisation aus den globulären Aktinuntereinheiten (G-Aktin) entstanden sind. In den Längsrillen zwischen diesen Ketten liegt das fadenförmige Tropomyosin, das sich über sieben Aktinmonomere erstreckt und bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen die Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin blockiert (Löffler, 1999). Im Abstand von jeweils ca. 40 nm binden Troponinkomplexe an das Tropomyosin (Solaro, 1991). Dieser Komplex besteht aus drei Untereinheiten, dem Troponin T (TnT, an Tropomyosin bindend), dem Troponin C (TnC, Ca^{2+} bindend) und dem Troponin I (TnI). Dies ist ein Inhibitor der Aktin-Myosin-Verbindung, der

zwischen der Bindung an Aktin und der Bindung an das Ca^{2+} -gebundene TnC wechselt (Solaro und Rarick, 1998). Es kommt in einer für das Herz spezifischen Form vor, dem cardialen TnI (cTnI) (Fentzke et al., 1999). Sechs dieser dünnen Filamente sind hexaedrisch um ein Myosinfilament angeordnet.

Parallel zu den Myofibrillen einer Herzmuskelzelle verläuft das sarkoplasmatische Retikulum (SR) oder longitudinale System, das endständige Bläschen, die so genannten Terminalzisternen, aufweist (Rüegg, 2000b). Diese Enden befinden sich eng an den transversalen Tubuli, schlauchartigen Einstülpungen der Zellmembran. Die Terminalzisternen und die L-Tubuli dienen der Zelle als intrazellulärer Kalziumspeicher (Hasselbach und Makinose, 1963; MacLennan und Holland, 1975). In den L-Tubuli werden die Ca^{2+} -Ionen an ein Protein, das Calsequestrin, gebunden (Yano und Zarain-Herzberg, 1994).

Damit es in einer Muskelzelle, unabhängig ob Skelett- oder Herzmuskel, zur Sarkomerverkürzung und damit zur Kontraktion kommen kann, muss es zur elektrischen Erregung der Zelle kommen. Diese elektrische Erregung erfolgt in Form eines Aktionspotentials (AP). Während diese bei Skelettmuskeln von Motoneuronen ausgehen, die ursprünglich von Nervenzellen im Gehirn angeregt wurden, erfolgt die Erregung im Herzen autonom über so genannte Schrittmacherzellen, spezialisierte Herzmuskelzellen, die im Sinusknoten liegen. Von hier aus werden die AP über muskuläre Leitungsbahnen über den Atrioventrikularknoten, das His-Bündel und die Purkinje-Fasern bis an das Arbeitsmyokard weitergeleitet, wobei die Weiterleitung von Zelle zu Zelle über die gap-junctions läuft. Die verschiedenen Zentren sind dabei hierarchisch geordnet, wobei die weiter oben gelegenen die AP mit einer höheren Frequenz auslösen. Fällt ein übergeordnetes Zentrum aus, kann das nächste die Schrittmacherfunktion übernehmen. Ein weiterer Unterschied ist die relativ lange Dauer des APs von Herzmuskelzellen mit 300 – 450 ms (Schrader, 1996).

Bevor ein AP eine Herzmuskelzelle erreicht, herrscht in ihr ein von K^+ -Ionen aufrechterhaltenes Ruhemembranpotential von -80 mV. Die Na^+/K^+ -ATPase hält das Milieu der Ionenkonzentrationen konstant. Kommt ein AP an, so wird die Zelle depolarisiert. Erreicht diese Depolarisation einen Schwellenwert von -40 mV, so werden schnelle Na^+ -Kanäle geöffnet, sodass es zum schnellen Na^+ -Einstrom (I_{Na}) in die Zelle kommt, der die Spannung an der Zellmembran auf Werte bis +40 mV erhöht. Dies ist in der Kurve des AP als Aufstrichphase gekennzeichnet. Die Inaktivierung der Na^+ -Kanäle erfolgt selbständig. Durch sie ist die Refraktärzeit der

Herzmuskelzellen bedingt. (Stühmer, 1991). Zusätzlich zum I_{Na} kommt es verzögert über die Aktivierung langsamer L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle zum Ca^{2+} -Einstrom ($I_{Ca,L}$) (Miller, 1992), der auch langsam wieder abklingt und so beim AP für die so genannte Plateauphase sorgt. Für diese ist charakteristisch, dass sich der depolarisierende langsame Ca^{2+} -Einstrom und der repolarisierende K^+ -Ausstrom durch verminderte K^+ -Leitfähigkeit der Zellmembran die Waage halten (Rüegg, 2000; Thews et al., 1989). Durch das Öffnen weiterer K^+ -Kanäle und der Abnahme der Ca^{2+} -Leitfähigkeit kommt es zur abschließenden Repolarisation der Zelle auf das Ruhemembranpotential (Rüegg, 2000).

Ca^{2+} -Ionen spielen also eine wichtige Rolle im Ablauf des AP von Herzmuskelzellen. Ebenso haben sie auch eine tragende Funktion bei der Kontraktion der Zelle. Erreicht nämlich ein AP eine Herzmuskelzelle, so breitet es sich schnell über die transversalen Tubuli bis ins Innere der Zelle aus. Hier kommt es dann über den L-Typ-Kanal, einen spannungsaktivierten, langsamen Ca^{2+} -Kanal, zum beschriebenen Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Die hierüber einwärts strömenden Ca^{2+} -Ionen machen aber nur einen geringen Teil des für die Kontraktion benötigten Ca^{2+} aus. An den in unmittelbarer Nähe der T-Tubuli liegenden Terminalzisternen des SR befinden sich die Ryanodinrezeptoren, Ca^{2+} -aktivierte Ca^{2+} -Kanäle, die Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern entlassen. Es kommt zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ von 100 nM auf über 1 μ M. Durch diese Erhöhung kommt es zur Bindung von Ca^{2+} an Troponin C was die Kontraktion einleitet (siehe unten). Dieser Prozess wird elektromechanische Koppelung genannt (Rüegg, 2000).

Die elektromechanische Koppelung ist also abhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dem Troponin-Komplex kommt eine wichtige Aufgabe in der Ca^{2+} -abhängigen Regulation der kontraktilen Proteine zu (Solaro und Rarick, 1998). Durch Bindung des Ca^{2+} an die C-Untereinheit des Troponins (TnC) kommt es zur Konformationsänderung des Proteins. Dadurch werden die Tropomyosinfäden so verschoben, dass die Myosinbindungsstellen am Aktin frei werden und die Myosinköpfe an Aktin binden können und somit der Kontraktionsvorgang ausgelöst werden kann (Lehmann et al., 1994). Der Myosinkopf, der Adenosindiphosphat ADP und Phosphat (P_i) gebunden hat, heftet sich schwach an die Bindungsstelle des Aktin an. Im nächsten Schritt wird P_i abgespalten und der Myosinkopf nun fest an Aktin gebunden. Es kommt zum so genannten Ruderschlag. Der Myosinkopf, der im 90° Winkel zum Myosinfilament steht, kippt mit der Energie aus dem ATP in einen 45°

Winkel. Das ADP wird nun freigesetzt. Die Lösung des Myosinkopfes vom Aktin geschieht nur bei erneuter Bindung von ATP und anschließender Spaltung desselben zu ADP und P_i . Dabei kippt der Myosinkopf in seine Ausgangslage zurück. Damit ist ein Querbrückenzyklus komplett (Rüegg, 2000).

Durch das Abkippen der Myosinköpfe eines Sarkomers kommt es zum Ineinanderschieben der Filamente, das Sarkomer wird kürzer, die Z-Scheiben werden aufeinander zugeschoben, die I-Bande wird schmaler. Ein Ruderschlag eines Myosinkopfes bewirkt dabei eine Verkürzung von etwa 10 – 20 nm (Irving et al., 1992) bei einer maximalen Kraftentwicklung von etwa 0,8 pN (Huxley, 1990). Der gesamte Herzmuskel kann sich durch die Summe der Verkürzungen aller Sarkomere um ein Drittel seiner ursprünglichen Länge kontrahieren.

Damit es nach der Kontraktion zur Relaxation kommen kann, muss die $[Ca^{2+}]_i$ wieder sinken. Diese Elimination des Ca^{2+} aus dem Cytosol geschieht über vier verschiedene Wege: Zunächst die in der Membran des SR gelegene sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA), durch die Ca^{2+} in das SR gepumpt wird. Zweitens der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX), der bei der Relaxation drei Na^+ -Ionen in die Zelle schleust und im Gegenzug ein Ca^{2+} -Ion aus der Zelle befördert; drittens eine sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase (Carafoli, 1987); zuletzt gibt es noch einen mitochondrialen Ca^{2+} -Uniporter. Die Wichtigkeit und die relative Menge des transportierten Ca^{2+} variiert speziesspezifisch (Bers, 2001).

Diese Mechanismen der kardialen Kontraktion können von äußeren Einflüssen beeinträchtigt werden. In der vorliegenden Arbeit sollen die Wirkungen der bakteriellen Sepsis auf diese Mechanismen untersucht werden.

1.3. Die Herzhypertrophie und deren Auswirkung auf Morphologie und Funktion des Herzens

Die Hypertrophie ist eine Reaktion des Herzens auf verschiedene Stimuli zur Kompensation einer chronischen Mehrbelastung. Es kommt zu strukturellen Veränderungen mit einer Vermehrung der Muskelmasse. Mögliche pathologische Ursachen können Krankheiten wie Hypertonie, Herzklappenerkrankungen, Aortenstenose und ischämische Herzerkrankungen sein (Hellige et al., 1991).

Die Herzhypertrophie ist ähnlich wie die Trainingshypertrophie des Skelettmuskels ein langsamer Prozess, der stark von der Art und dem Ort der Belastung abhängt. So

vermehrten druckbelastete Herzkammern ihre Muskelmasse konzentrisch, d.h. in Form einer Wandverdickung bei weitgehend konstantem Blutvolumen der Kammern (Druckhypertrophie). Hier kommt es zu einer Zunahme des Verhältnisses von Kammerwanddicke zu Kammerdurchmesser. Einen exzentrisch hypertrophierten Ventrikel, der also mit einer Vergrößerung des Kammervolumens einhergeht, sieht man bei volumenbelasteten Herzen (Volumenhypertrophie). Die Proportionen von Wanddicke und –durchmesser bleiben weitgehend gleich.

Auf zellulärer Ebene liegt der Vermehrung der kardialen Muskelmasse eine zelluläre Hypertrophie zugrunde. Die zellulären Veränderungen gleichen dabei tendenziell den makroskopischen. Während Kardiomyozyten bei einer Druckhypertrophie eine deutliche Vermehrung des Faserdurchmessers zeigen, führt eine chronische Volumenbelastung zur Zunahme von Länge und Durchmesser (Hunter et al., 1999). Die Sarkomerlänge bleibt bei diesen Veränderungen jedoch im Normbereich. Die Zunahme des Zellvolumens ist begleitet von einer gleichzeitigen Vermehrung der kontraktilen Filamente.

Bei erhöhter Druckbelastung dient die Hypertrophie des Myokards dazu, den vermehrten Druck auszugleichen, indem die Dicke der Kammerwand bei nahezu unverändertem Kammerradius zunimmt. Dadurch soll die myokardiale Wandspannung im Normbereich gehalten werden (kompensierte Druckhypertrophie). Bei einer durch eine pathologische Drucküberlastung induzierten Hypertrophie haben die Kardiomyozyten zwar die Fähigkeit, eine hohe Spannung aufzubauen, jedoch kommt es zu einer verminderten maximalen Verkürzungsgeschwindigkeit der Zellen. Erklärungen dafür liegen zum einen in einer verminderten sarkoplasmatischen Pumpfunktion sowie in der Ausbildung einer Myokardfibrose.

Mit zunehmender Dauer der Drucküberlastung und höhergradiger Hypertrophie kommt es immer mehr zu kontraktilen Funktionseinbußen. Daran sind energetische, strukturelle und biochemische Veränderungen beteiligt. Funktionell sind ein Absinken der Ejektionsfraktion, ein Anstieg des enddiastolischen Ventrikeldruckes und eine exzessive Belastungstachykardie zu erkennen. Durch die zunehmende Muskelmasse kommt es zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf.

Bei zunehmender Einschränkung der Leistungsbreite, d.h. sich manifestierender Herzinsuffizienz, beobachtet man unabhängig von der primären Belastungsform charakteristische Veränderungen der Ventrikelgeometrie. Diese wird als Dilatation bezeichnet und tritt bei Eintreten eines kritischen Herzgewichts auf, das beim

Menschen bei ca. 500 g liegt. Sie ist gekennzeichnet durch eine starke Zunahme des Füllungsvolumens bei Stagnation oder sogar Abnahme der Wandstärke, die mit einer verminderten Zahl der parallel geschalteten Muskelschichten einhergeht. Zellulär kommt es zu Glanzstreifendehiszenzen und disseminierten Herzmuskelzellnekrosen, die zu einer Störung der Koordination der Muskelzellverbände führen.

Als Folge liegt bei bereits normalen Druckwerten eine stark erhöhte Spannungsbelastung vor. Bereits geringe Drucksteigerungen können das Herz überlasten und ein akutes Herzversagen auslösen (Hellige et al., 1991).

In der vorliegenden Arbeit sollen die Auswirkungen einer gram-negativen Sepsis auf die Morphologie und Funktion des drucküberlasteten Herzens durch hämodynamische und elektrokardiographische Untersuchungen näher bestimmt werden.

1.4. Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung der bakteriellen Sepsis, hier vornehmlich durch gram-negative Bakterien verursacht, auf die Funktion des Herzens sowohl auf zellulärer Ebene als auch systemisch näher untersucht werden.

Entsprechend ist die Arbeit in einen in-vitro und einen in-vivo Teil gegliedert. In dem in vitro Teil soll die Wirkung von LPS auf die Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyozyten verfolgt werden. Es soll versucht werden, den Einfluss von LPS auf die kardiale Kontraktilität mit einem kompetitiven TLR4-Antagonisten, E5564, zu unterdrücken. Durch die Ergebnisse dieser Experimente soll es zu einem Hinweis auf einen möglichen Therapieansatz kommen, mit dem zumindest die septische Kardiomyopathie bekämpft werden kann, die nach wie vor den limitierenden Faktor bei der Sepsisbehandlung darstellt. Bei diesen Experimenten wird versucht, den LPS-Signalweg am Anfang zu beeinflussen.

Im nächsten Teil der Untersuchung soll der terminale Teil der LPS-Signalübertragung beschrieben werden, und es soll versucht werden, hier Einfluss zu nehmen. Es soll im Besonderen auf den intrazellulären Kalziumhaushalt sowie die Beeinflussung dessen durch Blockierung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) eingegangen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen zum tieferen Verständnis der zellulären Mechanismen und auch des Signaltransduktionswegs des TLR4 beitragen, über die es letztendlich zur verminderten Kontraktionsfähigkeit des Herzens im Zuge einer Sepsis kommt. Da allerdings derartige Untersuchungen im

Labor des Physiologischen Institutes 2 noch nicht etabliert waren, mussten zunächst methodische Vorversuche durchgeführt werden.

Vergleichend sollte noch untersucht werden, ob und inwieweit eine Sepsis verursacht durch gram-positive Bakterien eine Auswirkung auf die elektromechanische Koppelung und Kontraktionsfähigkeit isolierter Herzmuskelzellen zeigt. Dies ist ebenfalls von hohem klinischen Interesse, da die meisten nosokomialen Erreger, z. B. MRSA, gram-positiv sind.

Im in vivo Teil der Studie sollte der Einfluss von LPS auf das intakte Herz und das Herz-/Kreislaufsystem beschrieben werden. Darüber hinaus sollte die Wirkung von LPS auf ein durch Druckbelastung vorgeschädigtes Herz untersucht werden. Die Druckbelastung sollte durch eine Aortenstenose hervorgerufen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und deren Haltungsbedingungen

Die für die Studien verwendeten Versuchstiere waren weibliche oder männliche Mäuse, die, je nach Versuch, aus den Inzuchtlinien C57BL/6 bzw. C3H/HeN stammten. Die Herkunft dieser Tiere war dabei zum Einen sowohl direkt die Charles River Deutschland GmbH (D-Sulzfeld) als auch die institutseigene Zucht, wobei deren Stammeltern ebenfalls von Charles River stammten. Ebenso wurden Tiere verwendet, deren Toll-like-Rezeptor 4 ausgeschaltet wurde (TLR4^{-/-}). Ihr genetischer Hintergrund war C57BL/6.

Die Haltung erfolgte unter Beachtung tierschutzrechtlicher, hygienischer und qualitativer Gesichtspunkte in durchsichtigen 365 x 207 x 140 mm großen, mit Altromin Tiereinstreu Granulat (Altromin GmbH und Co. KG, D-Lage-Lippe) eingestreuten Polycarbonatkäfigen unter gleichmäßigen Umweltbedingungen (20-22°C, 50% relative Luftfeuchtigkeit und ein 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus). Die Käfige waren in ein Regalsystem eingeschoben, welches jeden einzelnen mit Zu- und Abluft versorgte. Damit waren optimale hygienische Bedingungen gewährleistet. Futter (Altromin Standard Diät Maus und Ratte) und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Die Jungtiere aus institutseigener Zucht wurden im Alter von 4 Wochen von ihren Eltern getrennt und nach Geschlechtern sortiert.

2.2. *In vitro*-Versuche

2.2.1. Übersicht und Gruppeneinteilung

Für die *in vitro*-Untersuchungen wurden ventrikuläre Kardiomyozyten aus Herzen von männlichen oder weiblichen C3H/HeN-, C57BL/6- und TLR4^{-/-}-Mäusen isoliert und optisch deren Sarkomerverkürzung unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss verschiedener Stimulantien (siehe 2.2.7) zur Erzeugung einer künstlichen Sepsis untersucht. In weiteren Experimenten wurde simultan dazu der intrazelluläre, zytosolische Kalziumhaushalt verglichen.

In allen Versuchen wurden drei Gruppen untersucht. Zur Kontrolle wurden die Messungen an frisch isolierten Zellen durchgeführt, die in Messtyrode gelagert waren. Die anderen Zellen wurden in einem Kurzzeit-Kulturmedium inkubiert und, je nach Versuch, zusätzlich mit einem oder mehreren Stimulantien versetzt.

2.2.2. Isolation der ventrikulären Kardiomyozyten

Die Isolation der ventrikulären Kardiomyozyten erfolgte enzymatisch mit Hilfe einer modifizierten Langendorff-Perfusionsanlage und retrograder Perfusion des Herzens. Nach Betäubung mit Diethylether in einem Exsikkator wurde die Maus per Genickbruch getötet, auf einer Unterlage fixiert und eröffnet. Sorgfältig wurde das Herz möglichst zeitnah entnommen und in eine Petri-Schale mit EGTA-Tyrode überführt. Diese Lösung diente dazu, extrazelluläres Kalzium abzufangen, die Kalziumkonzentration wurde auf unter 10^{-4} M gesenkt, wodurch weitere Kontraktionen des Herzens verhindert wurden. Die Zusammensetzung der Perfusionslösungen ist in den Tabellen 2.1 und 2.2 zusammengestellt. Die Reihenfolge der Lösungen entspricht der nach Tiemann et al. (2002).

Unter einer Stereo-Lupe wurde das am Vorkammerbereich befindliche Bindegewebe sowie verbleibende Perikardreste mittels einer Augenschere entfernt und der Aortenstumpf freipräpariert. Dieser wurde mit zwei spitzen Pinzetten gefasst und auf die Spitze einer an der Petri-Schale befestigten Glaskanüle gezogen, sodass die Spitze der Kanüle in das Lumen des linken Ventrikels reichte, und mit einem Seidenfaden fixiert (Abbildung. 2.1). Die Glaskanüle wurde aus der Befestigung

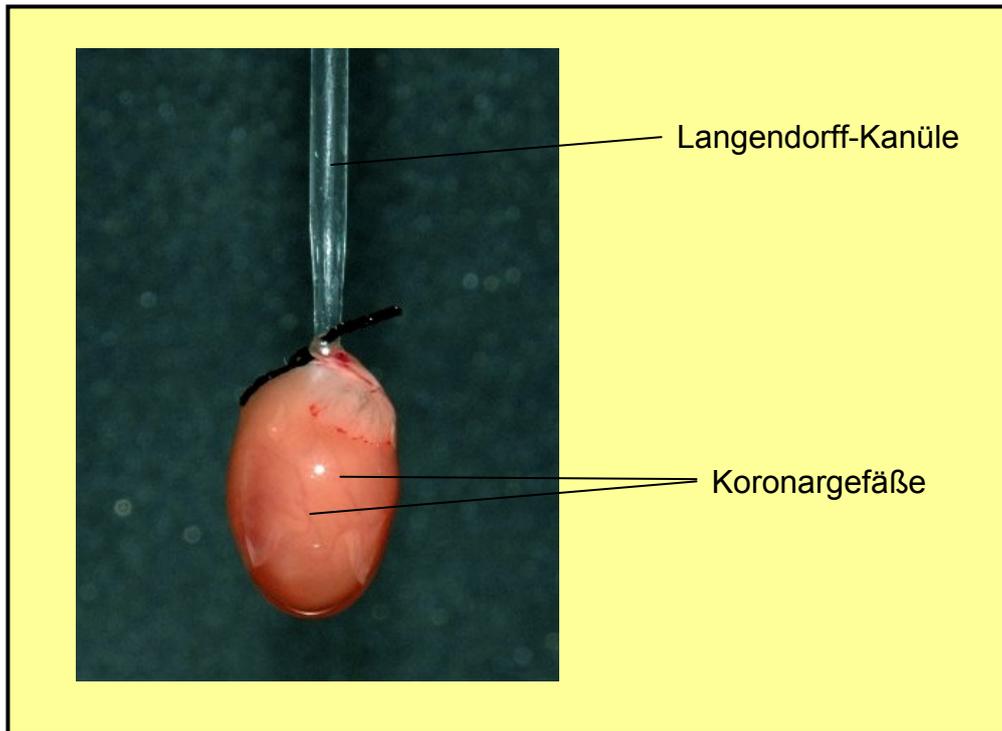


Abbildung 2.1: Auf eine Langendorff-Kanüle aufgezo- genes Mäuseherz während der Perfusion. Die Koronargefäße sind erkennbar blutleer.

genommen und luftblasenfrei mit dem Ende der Langendorff-Perfusionsanlage (Abbildung 2.2) verbunden. Diese diente dazu, die Perfusionslösungen mit Sauerstoff anzureichern, sie auf 36 °C zu erwärmen und den nötigen Perfusionsdruck von ca. 100-200 mmWS zu erzeugen. Sie bestand aus einem Einfülltrichter, der mit einer Begasungsfritte versehen war, um die verwendeten Lösungen mit Sauerstoff anzureichern. Er führte in einen Überdruckkolben, in dem sich die jeweils zu perfundierende Lösung befand. Über ein Schlauchsystem, das durch einen Wärmeaustauscher führte, der über ein externes Wärmebad versorgt wurde, war er mit der Langendorff-Kanüle verbunden. Zum System gehörten zwei Schreibtischlampen, die ebenfalls der Aufrechterhaltung der Temperatur dienten. Nachdem das Herz mit dem System verbunden war, wurde der Druck aufgebaut, der durch Sauerstoff aufrechterhalten wurde. Zunächst wurde ein relativ hoher Druck gewählt, um das in den Ventrikeln und den Koronargefäßen befindliche Blut aus dem Herzen zu entfernen und somit eine gleichmäßige Perfusion des gesamten Herzens

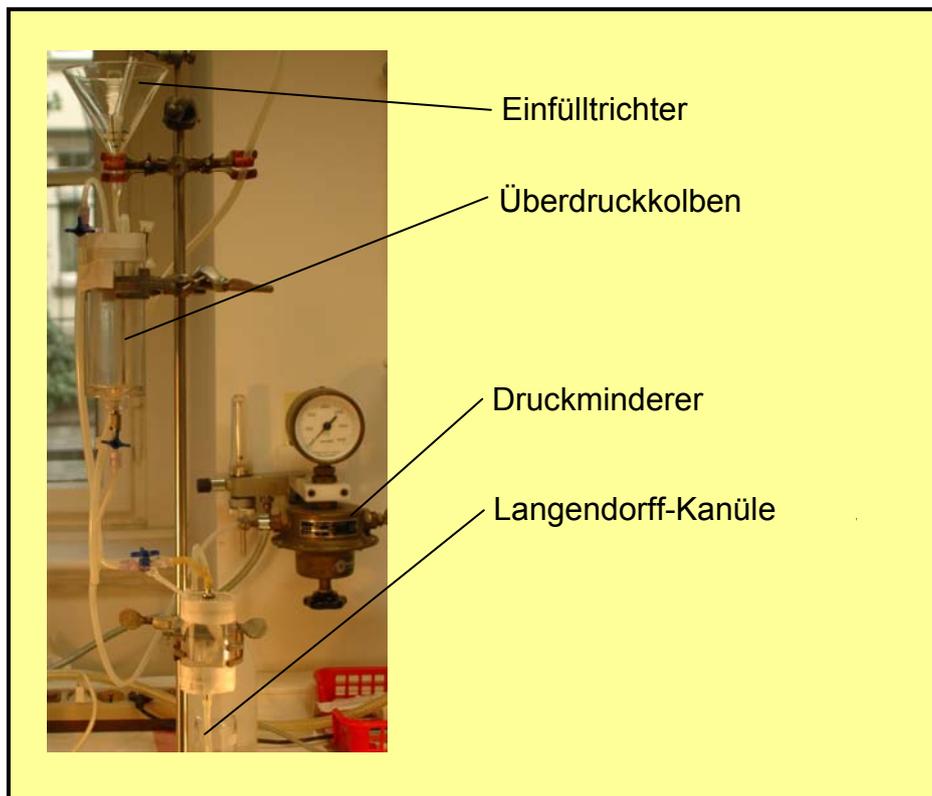


Abbildung 2.2: Modifizierte Langendorff-Perfusionsanlage

zu gewährleisten. Nach den ersten Sekunden der Perfusion wurde er in Bezug auf die Tropfgeschwindigkeit angepasst.

Während der laufenden Perfusion wurden regelmäßig Tropfgeschwindigkeit und Temperatur kontrolliert, um eine Überhitzung des Herzens zu vermeiden. Durch Regelung des Sauerstoffdruckes war es möglich, die Temperatur relativ konstant auf einem Wert von 34–36°C zu halten, was sich positiv auf die Zellausbeute auswirkte. Zum anderen konnte die Temperatur durch die Entfernung der Lampen zum Herzen beeinflusst werden.

Zunächst wurde das Herz für fünf Minuten mit EGTA-Tyrode perfundiert, weiterhin zur Reduktion des Kalziums, das durch den in der Lösung enthaltenen Chelator EGTA abgefangen wurde.

Nach fünf Minuten wurde die Lösung gewechselt. Zum Wechsel der Lösungen wurde der Druck abgestellt und die verbleibende Lösung abgelassen. Erst dann wurde die neue Lösung vom Trichter in den Überdruckkolben gegeben. Zirka 30 Sekunden vor

einem Lösungswechsel wurde die nächste Lösung in den Trichter gegeben, um eine ausreichende Sauerstoff-Begasung zu erreichen.

Als zweite Lösung wurde die Hochkaliumlösung verwendet. Diese führte über Steigerung des extrazellulären Kaliums zu einer erhöhten Membranleitfähigkeit für Kalium-Ionen. Dadurch kam es zu einer Depolarisierung der Zellmembran auf 0 mV. Das wiederum bewirkte eine Inaktivierung der schnellen Na⁺- und der Ca²⁺-Kanäle, deren Schwellenwert bei -35 mV liegt. Der Herzmuskel wird unfähig zur Kontraktion, was den Energieverbrauch der Zellen minimiert und so zu einer Steigerung der Überlebensfähigkeit führt. Das Herz wurde fünf Minuten mit dieser Lösung perfundiert.

Substanz	EGTA-Tyrode	Messtyrode
KCl (Merck)	4 mM	4 mM
NaCl (Merck)	135 mM	135 mM
CaCl ₂ (Merck)	-	1,8 mM
MgCl ₂ (Merck)	1 mM	1 mM
HEPES (Merck)	2 mM	2 mM
BSA (Sigma)	-	1 mg/ml
Trypsininhibitor (Sigma)	-	0,017 mg/ml
Glucose (Merck)	-	9 mM
EGTA (Serva)	2,6 mM	-
pH-Wert (NaOH)	7,4	7,4

***Tabelle 2.1:** Zusammensetzung der Präparations- und Perfusionslösung EGTA-Tyrode sowie der Messtyrode.*

Mit den folgenden Lösungen kam es erst zur eigentlichen enzymatischen Aufspaltung der Zell-Zell-Verbindungen. Zunächst wurde das Herz für zehn Minuten mit Trypsinlösung perfundiert. Diese hatte die gleiche Zusammensetzung wie die Hochkaliumlösung mit Ausnahme des Zusatzes von 0,4 mg/ml des Enzyms Trypsin (Roche, Mannheim), das aus Rinderpankreas gewonnen wird. Trypsin spaltet spezifisch Peptidbindungen auf der Carboxylseite von Arginin- oder Lysinverbindungen. Unter Trypsineinfluss nahm die Tropfgeschwindigkeit deutlich ab und wurde die aus dem Herzen austretende Flüssigkeit hochviskös. Nach weiteren

2. Material und Methoden

Substanz	Hochkalium-Lösung	Trypsin-Lösung	Collagenase-Lösung
KCl (Merck)	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl (Merck)	4 mM	4 mM	4 mM
CaCl ₂ (Merck)	0,02 mM	0,02 mM	0,02 mM
MgCl ₂ (Merck)	1 mM	1 mM	1 mM
HEPES (Merck)	4 mM	4 mM	4 mM
Glucose (Merck)	9 mM	9 mM	9 mM
Kalium-Glutamat (Fluka)	130 mM	130 mM	130 mM
Trypsin (Roche)	-	0,4 mg/ml	-
Kollagenase Typ L (Sigma)	-	-	0,375 mg/ml
Polymyxin B (Sigma)	-	-	100 U/ml
pH-Wert (KOH)	7,4	7,4	7,4

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Hochkaliumlösung, sowie unter Zusatz der Enzyme Trypsin oder Kollagenase.

zwei bis drei Minuten Perfusion mit reiner Hochkalium-Lösung wurde das Herz nun für 10 – 12 Minuten mit einer Hochkalium-Lösung unter Zusatz von Collagenase Typ L (Sigma-Aldrich, Steinheim; 0,375 mg/ml) perfundiert. Dieses Enzym wird aus dem gram-negativen Bakterium *Clostridium histolyticum* gewonnen. Sie spaltet sehr spezifisch Peptide mit der Aminosäuresequenz GLY-PRO-X-GLY-PRO, die im sehr prolinhaltigen Kollagen häufig anzutreffen ist. Das X steht für eine variable Aminosäure. Da die Collagenase Typ L von einem gram-negativen Bakterium gewonnen wurde, war zu befürchten, dass es in der collagenasehaltigen Perfusionslösung Rückstände von LPS geben könnte. Um diese eventuellen Rückstände aufzufangen, wurde der Lösung Polymyxin B (Sigma-Aldrich, Steinheim) in einer Konzentration 100 U/ml zugesetzt. Bei Polymyxin B handelt es sich um ein Peptid-Antibiotikum, welches aus 11 Aminosäuren besteht. Es hat eine große Affinität zu LPS und ist somit in der Lage, freies LPS abzufangen (Warner et al., 1985). Während der Perfusion mit Collagenase-Lösung stieg die Tropfgeschwindigkeit zum Ende wieder stark an, was auf eine Auflösung des Zellverbandes schließen ließ.

Nach dem Ende der Perfusion wurde das Herz eingeschnitten, um restliche Flüssigkeit abzulassen, von der Kanüle genommen und in ein Becherglas mit auf 36°C temperierte Messtyrode gegeben und anschließend mit einer Schere

mechanisch zerkleinert. Die so entstandene Suspension aus Gewebetrümmern und einzelnen Zellen wurde durch einen Gaze-Filter in drei Zentrifugenröhrchen, entsprechend der jeweils drei Versuchsgruppen, gegossen. Nach einer kurzen Zentrifugation hatten sich Pellets abgesetzt, die optimalerweise von bräunlicher Farbe waren. Der Überstand wurde abgegossen und, je nach Versuchsgruppe, mit Tyrode oder mit Kulturmedium aufgewirbelt. Nach einer Sedimentation von zehn Minuten, die Farbe der Pellets sollte nun gelblich sein, wurde der entstandene Überstand mit einer Pasteur-Pipette abgenommen. Den Zellen der Gruppe 1 wurde Tyrode zugegeben und die Suspension in einen auf 36°C temperierten Erlenmeyerkolben gegeben. Dieser wurde mit Sauerstoff begast und mit einem Deckel verschlossen.

2.2.3. Inkubation der Kulturzellen

Die Zellen der übrigen Gruppen wurden erneut mit jeweils 2 ml Kulturmedium, eventuell mit Stimulantien versetzt, aufgewirbelt und die Zellsuspension in Kulturschälchen von 5 cm Durchmesser gegeben. Diese wurden in einem Wärmeschrank bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert.

Bei dem Medium handelt sich um ein Kurzzeit-Kultur-Medium, in dem die Zellen ca. 12 h überleben. Die Bestandteile sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Substanz	Herkunft	Anteil
Fetales Kälberserum	Gibco, Grand Island, NY, USA	10%
Minimal essential medium	Gibco, Grand Island, NY, USA	5%
Gentamicin	Gibco, Grand Island, NY, USA	50 µg/ml
Dulbecco's mean eagle medium	Gibco, Grand Island, NY, USA	ad 100 %

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Kurzzeit-Kulturmediums für die ventrikulären Kardiomyozyten.

2.2.4. Messung der Sarkomerlängenverkürzung

2.2.4.1. Übersicht über die Messapparaturen

Die Apparaturen, die zur Messung der Sarkomerlängenverkürzung benötigt werden, lassen sich dadurch einteilen, dass sie zur Erfüllung einer der drei folgenden Aufgaben dienen:

1. *Schaffung geeigneter Umgebungsbedingungen für die Zellen:* Dazu dient die Versuchskammer, die die Zellen enthält. Die Schaffung einer konstanten Temperatur erfolgt über ein Wasserbad und einem in der Kammer angebrachten Temperaturfühler. Um einen Verbrauch der Nährstoffe in der Zellsuspension zu verhindern, wurde eine kontinuierliche Perfusion verwendet.
2. *Erzeugung und Steuerung der externen elektrischen Reize:* Das vom Computer und dem Programm Clampex (Axon Instruments, Union City, CA, USA) erzeugte Reizmuster wird über einen Analog/Digital-Wandler auf ein Reizgerät geleitet, das Spannung und Dauer der Reize festlegt. Das Reizgerät ist direkt mit der in der Messkammer gelegenen Reizelektrode verbunden.
3. *Erfassung und Verarbeitung der Sarkomerlängenverkürzung:* Die Messkammer liegt auf dem Objektisch eines inversen Mikroskops. Das Bild wird von einer am Mikroskop montierten Kamera erfasst und über eine Steuerungseinheit an einen Computer gesendet und mithilfe des Programms IonWizard (IonOptix, Milton, MA, USA) aufgenommen und gespeichert.

2.2.4.2. Versuchsstand

Um Messstörungen durch Erschütterungen von außen zu minimieren, stand das Mikroskop mit Versuchskammer auf einem schwingungsgedämpften Tisch, das aus einem Metallgestell mit einer mechanisch entkoppelten, quarzsandgefüllten Edelstahlwanne und einer darauf liegenden 3 cm starken Granitplatte bestand.



Abbildung 2.3: Versuchsstand

- 1 Mikroskop Axiovert 100 TV
- 2 IonOptix MyoCam
- 3 Perfusionssystem
- 4 Julabo F10 Wärmebad
- 5 HyoFlo Absaugpumpe
- 6 IonOptix HyperSwitch
- 7 Transformator für die Xenonlampe
- 8 IonOptix Fluorescence System Interface
- 9 IonOptix Kamerasteuerungselement
- 10 Verstärker
- 11 Kontrollmonitor für die Datenerfassung
- 12 Grass SD 9 Reizgerät
- 13 Transformator für die Hellfeldlampe
- 14 Kontrollmonitor für Steuerung des Reizmusters

2.2.4.3. Versuchskammer

Die Versuchskammer wurde von der feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Institutes 2 aus Acrylglas hergestellt (Abbildung 2.4). Sie war rund mit einem Außendurchmesser von 50 mm. Sie wurde auf dem Gleittisch des inversen Mikroskops fixiert. Um das Kammerlumen war ein Wasserdurchlauf gefräst, durch den das vom Wärmebad (Julabo F10; Julabo Inc., Allentown, PA, USA) erhitzte Wasser geleitet wurde. Mittels des im Kammerlumen angebrachten Temperaturfühlers konnte die in der Kammer herrschende Temperatur ständig kontrolliert werden und durch Regelung des Wasserbades konstant gehalten werden. Während der Messung wurde eine Temperatur von 36°C angestrebt. Den Boden der nach oben offenen Kammer bildete ein mit Zweikomponentenklebstoff befestigtes Deckglas der Stärke Null. In der Nähe des Kammerbodens lag der Zulauf der kontinuierlichen Perfusion. Die Absaugung erfolgte über eine auf der entgegengesetzten Seite angebrachte Glaskapillare von oben. Somit wurde die Kammer gleichmäßig und vollständig durchspült.

Durch diese Vorrichtungen konnten die Umweltbedingungen der Kardiomyozyten konstant gehalten werden, sodass sie auch nach einiger Zeit (ca. 30 min) in der Versuchskammer noch messbar waren.

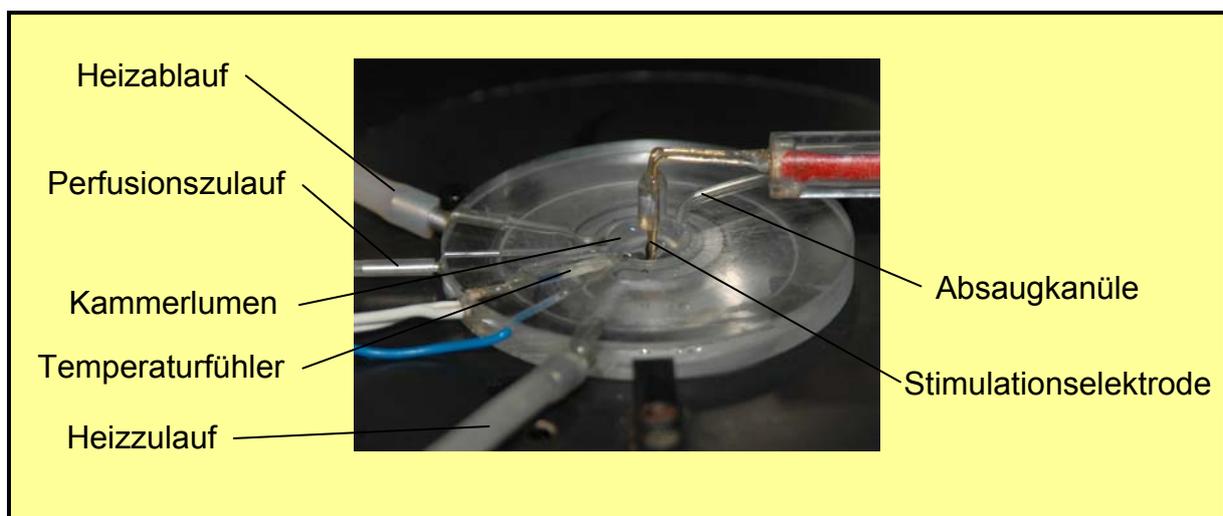


Abbildung 2.4: Versuchskammer

2.2.4.4. Beschichtung der Versuchskammer mit den Kardiomyozyten

Durch den Druck der kontinuierlichen Perfusion wären die Zellen weggeschwemmt worden. Um dieses zu verhindern, wurden die Zellen mit Laminin (Sigma-Aldrich, Steinheim), einem Protein der Basalmembran am Boden der Versuchskammer fixiert. Das Laminin wurde in einer Konzentration von 8 µg/ml in Messtyrode angesetzt. Es wurden zunächst für sechs Minuten drei Tropfen des gelösten Laminins in die Kammer gegeben. Anschließend wurde die Lösung mit einer Pasteur-Pipette wieder abgesaugt und nun die Zellsuspension in die Kammer gegeben. Nach weiteren sechs Minuten waren die Zellen hinreichend an den Kammerboden geheftet, sodass die Perfusion gestartet werden konnte. Während der Zeit der Beschichtung wurde das Wasserbad der Kammer ausgeschaltet, da es ansonsten durch die erhöhte Temperatur zur Zellschädigung gekommen wäre.

2.2.4.5. Die Perfusion

Um zuverlässige, reproduzierbare Messergebnisse zu erzielen, musste die Perfusion mehrere Voraussetzungen erfüllen. Sie durfte nicht zu schnell laufen, um die Zellen nicht wegzuschwemmen und andererseits nicht zu langsam, um einen ausreichend schnellen Flüssigkeitsaustausch für die Zellen in der Messkammer zu ermöglichen. Sie musste gleichmäßig fließen, damit die Zellen während der Messung ruhig liegen blieben, was für eine gute Messung notwendig war.

Als Reservoir für die Perfusionslösung diente der Kolben einer 50 ml Perfusorspritze, die ca. 30 cm über der Messkammer in einer Lochleiste befestigt war. Somit wurde der Perfusionsdruck allein über den hydrostatischen Druck der Lösung erbracht. Die Perfusionsgeschwindigkeit wurde geregelt über einen Tropfenzähler (Exadrop[®], Braun, Melsungen), der in die Leitung zur Messkammer geschaltet war. Er wurde konstant auf 70 Tropfen pro Minute gestellt. Bevor die Leitung auf die Messkammer traf, erfolgte eine Erwärmung auf 36°C über einen Wärmeaustauscher, der von demselben Wärmebad wie die Versuchskammer versorgt wurde.

Die Absaugung der Lösung aus der Messkammer erfolgte über eine Absaugpumpe (HyoFlo, Herts, UK), die an eine Auffangflasche angeschlossen war und in dieser einen Unterdruck erzeugte. Über einen Schlauch war diese Flasche mit der Absaugkapillare verbunden.

2.2.4.6. Die externe, elektrische Stimulation

Um eine kontrollierte Kontraktion der Kardiomyozyten unter einheitlichen Bedingungen zu erreichen, wurde eine von außen erzeugte elektrische Spannung angelegt und so ein Aktionspotential ausgelöst. Wie oben beschrieben erfolgte diese elektrische Stimulation über eine Reizelektrode, die aus zwei parallel angeordneten 0,8 mm starken Golddrähten bestand. Diese war an einem Mikromanipulator befestigt, sodass sie in der Kammer beweglich war. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Drähte in die Kammer eingetaucht und so verschoben, dass sich die zu messende Zelle zwischen ihnen befand. Die Reizelektrode war mit einem Reizgerät (Grass SD 9, Quincy, USA) verbunden, das die angelegte Spannung erzeugte. Sie betrug für jeden einzelnen Reiz 30 V mit einer Dauer von 0,4 ms. Die Zellen wurden mit verschiedenen Frequenzen gereizt, wobei in jeder Frequenz 20 Reize gesetzt wurden und auf jeden Stimulationszyklus eine 30-sekündige Pause folgte. Die Reihenfolge der Frequenzen war 0,5, 10, 1, 8, 2, 6, und 4 Hz. Die Steuerung dieses Protokolls wurde von einem Computer und dem Programm Clampex übernommen, der über einen Analog/Digital-Wandler mit dem Reizgerät verbunden war.

2.2.4.7. Prinzip der optischen Sarkomerlängenmessung

Wie in der Skelettmuskulatur sind die Myofilamente Aktin und Myosin bei Herzmuskelzellen charakteristisch angeordnet. Dadurch ergibt sich im lichtmikroskopischen Bild eine Querstreifung mit alternierenden hellen und dunkleren Streifen, wobei der Abstand zwischen zwei dunklen Streifen die Länge eines Sarkomers angibt.

Durch die am inversen Mikroskop (Zeiss Axiovert 100 TV, Carl Zeiss, Oberkochen) montierte Kamera (Myocam, IonOptix, Milton, MA, USA) konnten diese Hell-Dunkel-Unterschiede erfasst, auf dem Bildschirm abgebildet und von der zugehörigen Software weiterverarbeitet werden. Aus ihnen wurde eine Schwingungskurve gebildet, die im Idealfall sinusförmig war. Eine Periode dieser Kurve entsprach der Länge eines Sarkomers. Da jedoch aufgrund von biologischen Schwankungen die Kurve einer gewissen Streuung unterworfen war, errechnete das Programm mittels Fast-Fourier-Transformation ein „Powerspektrum“, wobei das Produkt der

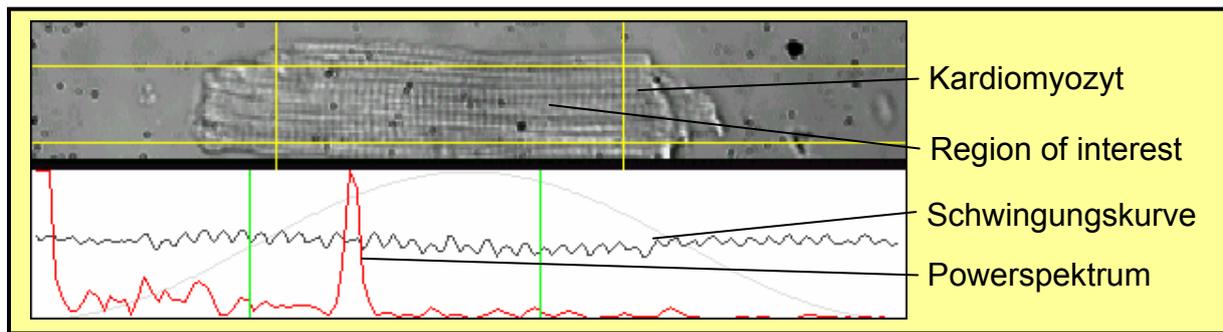


Abbildung 2.5: Videobild eines Kardiomyozyten inklusive der Errechnung eines Powerspektrums

Grundschiwingung mit seiner Amplitude aufgetragen wurde. Die Lage dessen Maximums war stellvertretend für die absolute Sarkomerlänge.

Durch eine Sarkomerverkürzung kam es zu einer Verschiebung des Maximums des Powerspektrums. Die Kamera arbeitete mit einer Frequenz von 240 Hz, somit waren auch die sehr schnellen Veränderungen der Sarkomerlänge während einer Kontraktion messbar.

Zu Beginn einer Messung wurde die Kammer nach möglichst brauchbaren Zellen durchsucht. Dazu wurde vor allem darauf geachtet, dass die Zellen ihre physiologische, rechteckige Form erhalten hatten. Daraufhin wurde die Zelle so positioniert, dass sie ganz im Videobild zu sehen war und dort die Sarkomerstruktur senkrecht erschien. Nur so konnte die Sarkomerverkürzung bei der ausgelösten orthograden, isotonen Kontraktion optimal und rauscharm gemessen werden. Nun wurde eine „region of interest“ (ROI) festgelegt, in der ein Teil der Zelle eingefasst wurde, in dem die Sarkomere gut strukturiert und kontrastreich waren. Erst jetzt konnte ein Experiment gestartet werden.

2.2.5. Simultane Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration

Zur Untersuchung des intrazellulären Kalziumhaushaltes unter LPS-Einfluss wurde simultan zu den oben beschriebenen Sarkomerverkürzungsmessungen die intrazelluläre Kalziumkonzentration, $[Ca^{2+}]_i$, mittels eines Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes bestimmt.

2.2.5.1. Der Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM

Die Untersuchung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erfolgte über eine Fluoreszenzmessung. Dazu wurde der Farbstoff Fura-2 ((1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-methylphenoxy)-ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure), Molecular Probes, Leiden, Niederlande) (Abbildung 2.6 A) verwendet. Dies ist ein mit Ca^{2+} Chelatkomplexe bildendes Molekül, das von Tsien et al. (1980) aus dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA entwickelt wurde. Es weist im Vergleich zu Magnesium und anderen Kationen eine hohe Selektivität für Kalzium auf. Fura-2 fluoresziert bei Anregung mit ultraviolettem Licht. Bei der Messung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ macht man sich zunutze, dass es bei Bindung von Kalzium zu einer Verschiebung des Anregungsspektrums zu kürzeren Wellenlängen hin kommt (Abbildung 2.6 B). In kalziumfreier Lösung liegt das Absorptionsmaximum bei ca. 365 nm. In Ca^{2+} -sättigender Lösung ist das Absorptionsmaximum des vorliegenden Ca^{2+} -Fura-2-Komplexes zu 340 nm verschoben. Der isosbestische Punkt liegt bei 360 nm, bei dieser Wellenlänge ist die Anregung unabhängig von der Kalziumkonzentration. Das Maximum des Emissionsspektrums für Ca^{2+} -freies und Ca^{2+} -gesättigtes Fura-2 liegt bei 510 nm. Während der Experimente wurden die Zellen mit 340 und 380 nm angeregt. Bei 340 nm fluoresziert sowohl freies Fura-2 als auch der Ca^{2+} -Fura-2-Komplex, wobei dieser mehr zur Fluoreszenz beiträgt, bei 380 nm überwiegt deutlich die Fluoreszenz des freien Fura-2.

In den Experimenten wurde das Fura-2 als Acetoxymethylester (Fura-2/AM) verwendet. Es hat die Eigenschaft, dass es, solange es in Esterform vorliegt, ungeladen, lipophil und somit membrangängig ist. Der Fluoreszenzfarbstoff gelangt also per Diffusion in das Zelllumen, wo er von zelleigenen, unspezifischen Esterasen gespalten wird. Dadurch verliert er seine Lipophilie, was zur Folge hat, dass er im Zellinnern eingeschlossen ist („dye-trapping“). Damit kann man mit relativ niedrigen, von außen zugegebenen Fura-2/AM-Konzentrationen eine Anreicherung im Cytoplasma erreichen, sodass die intrazelluläre Konzentration bei ca. 50 μM liegt. Ein weiterer Vorteil ist, dass der Farbstoff seine Ca^{2+} -Sensitivität erst nach vollständiger Deesterifizierung erlangt.

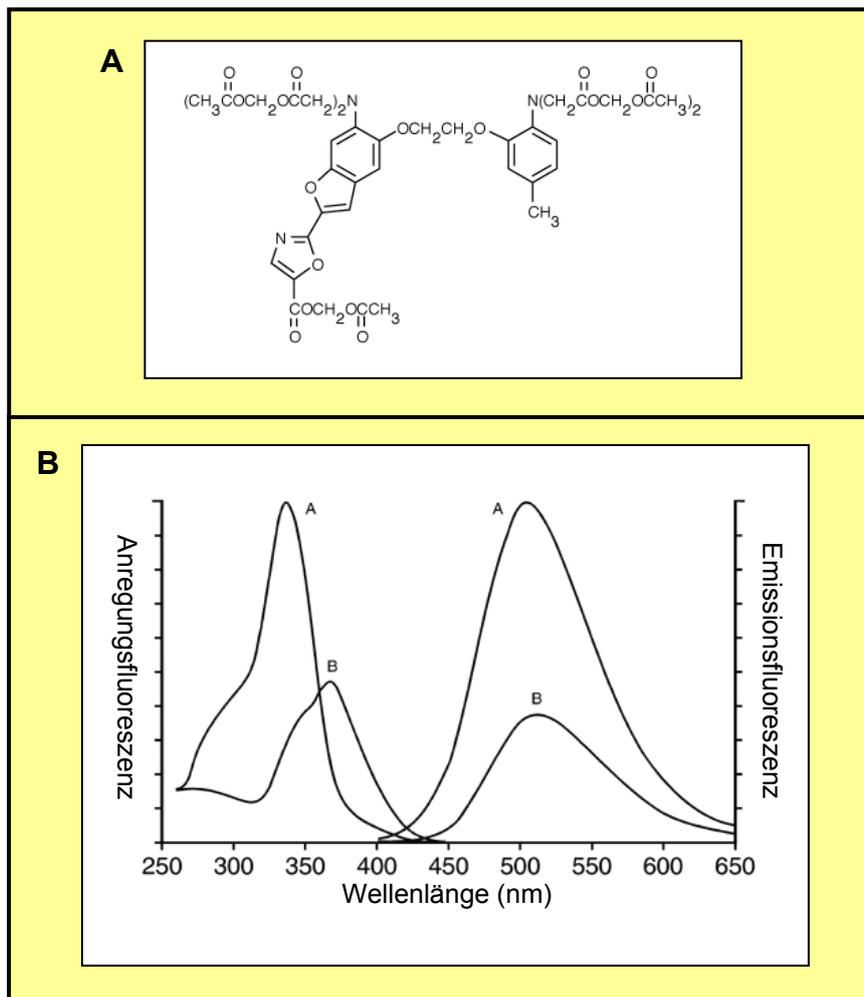


Abbildung 2.6:

A: Strukturformel von Fura-2/AM

B: Fluoreszenzspektrum von Ca²⁺-gesättigtem (A) und -freiem (B) Fura-2 (aus probes.invitrogen.com)

2.2.5.2. Modifikationen am Versuchsstand

Um mit dem oben beschriebenen Versuchsstand die Fluoreszenzmessungen vornehmen zu können, waren eine Reihe von Anpassungen nötig. Zur Erzeugung des Anregungslichtes wurde eine 75 W Xenon Bogenlampe (Cairn, Faversham, UK) verwendet. Diese war an ein IonOptix HyperSwitch Dual Excitation Light Source (IonOptix, Milton, MS, USA) (Abbildung 2.7) angeschlossen. Das von dem in der

Xenon Lampe befindlichen parabolischen Reflektor ausgehende konvergierende

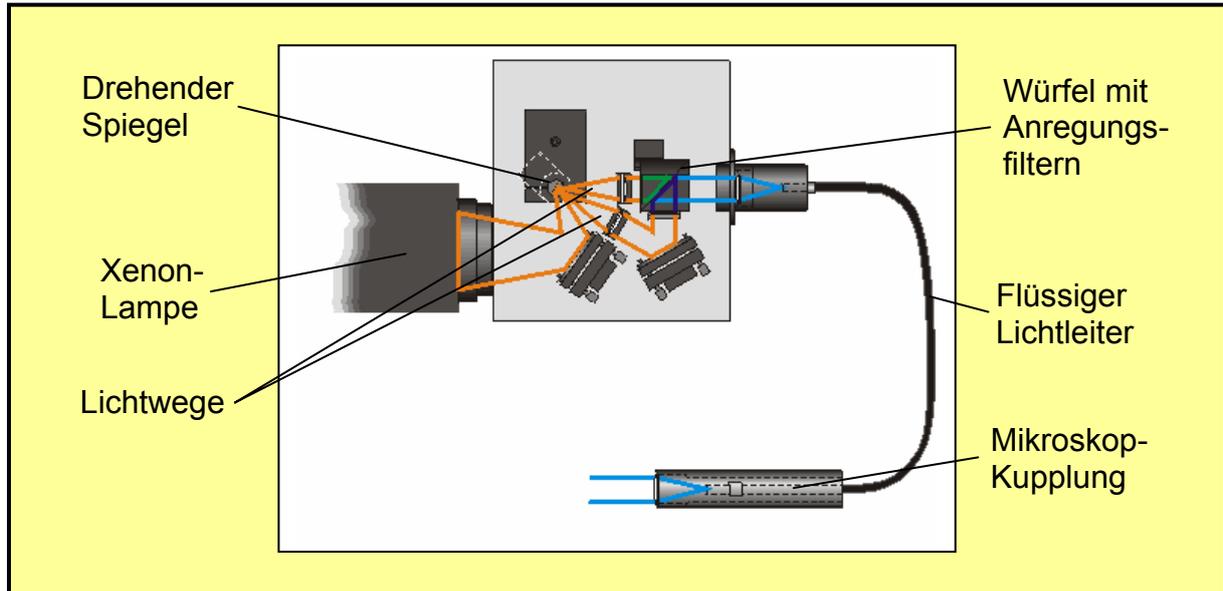


Abbildung 2.7: Schema des IonOptix Hyperswitch zur Erzeugung des Anregungslichtes mit Filtern der zwei Wellenlängen 340 und 380 nm (aus www.ionoptix.com)

Licht wurde im HyperSwitch durch einen Spiegel abgelenkt und auf einen sich mit sehr hoher Geschwindigkeit drehenden Spiegel fokussiert. Dieser lenkte den nun divergierenden Lichtstrahl abwechselnd auf eine von zwei Sammellinsen, die ihn jeweils zu einem Parallelstrahl sammelten. Hinter jeder dieser Sammellinsen war je ein Filter angebracht (340 und 380 nm). Der Spiegel drehte sich mit so hoher Geschwindigkeit, dass das Licht jeden Filter 250-mal pro Sekunde passierte. Anschließend führte der Lichtweg über ein flüssigkeitsgefülltes Lichtkabel auf die Mikroskopkupplung. Im Mikroskop befand sich ein im 45° Winkel zum Lichtstrahl angebrachter dichroischer Spiegel, der Licht von Wellenlängen unter 430 nm reflektierte und dieses so durch das UV-Licht durchlässige 40-fach Fluar-Objektiv leitete, sodass es auf die gefärbten Zellen in der Messkammer treffen konnte. Das vom Fura-2 ausgehende Emissionslicht der Zellen wurde durch den dichroischen Spiegel durchgelassen und traf einen 510 nm Sperrfilter, der Licht unerwünschter Wellenlängen abhielt. Dieser Filter war vor einer Photomultiplier-Röhre (PMT) positioniert, die ankommende Photonen in elektrischen Strom umwandelte. Sie wurde über das Fluorescence System Interface gesteuert.

Weiterhin wurde die Hellfeldlampe des Mikroskops mit einem Rotfilter von 665 nm versehen, um erstens ein Bleichen des Farbstoffes Fura-2/AM zu vermeiden und zweitens mögliches Störlicht für die PMT zu minimieren. Ebenfalls zu diesem Zweck wurde der Versuchsstand durch einen blickdichten, schwarzen Vorhang verdeckt.

2.2.5.3. Beladung der Kardiomyozyten mit Fura-2/AM

Die Kardiomyozyten wurden in Messtyrode oder im Kulturmedium mit 1 μM Fura-2/AM beladen. Die Beladungszeit war 15 min, wobei darauf geachtet wurde, dass die Zellen während dieser Zeit bei Raumtemperatur gelagert wurden, um eine Kompartimentierung in Zellorganellen und somit falsche Messergebnisse zu verhindern (Rigby et al., 1998; Zhong et al., 1997). Zur Beladung wurden 500 μl Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Nach 8 Minuten wurden sie in die Messkammer, die bereits Laminin präpariert war, überführt, wo sie die restliche Zeit beladen wurden.

2.2.5.4. Messung der relativen $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Zu Beginn jeder Messung wurde durch ein 20-faches Objektiv eine möglichst gut erscheinende Zelle ausgewählt und durch ein bis zwei Reize auf ihre Kontraktionsfähigkeit überprüft. War dies der Fall, wurde auf das 40-fache Fluor-Objektiv gewechselt und die Zelle wie unter 2.2.4.7 beschrieben durch Drehen der Kamera eingestellt und eine ROI festgelegt. Um sicher zu gehen, dass das von der PMT aufgefangene Licht nur von der zu messenden Zelle stammte, wurden nun über Stellschrauben regelbare Blenden so eingestellt, dass auf dem Videobild lediglich die zu messende Zelle sichtbar war. Danach wurde die Messung gestartet.

Die Fluoreszenzintensität der mit Licht von 340 nm und 380 nm angeregten Kardiomyozyten wurde von der PMT einzeln registriert, über das FSI weitergegeben und vom IonWizard-Programm aufgenommen. So entstand ein zeitabhängiger Verlauf der Intensität des Emissionslichts für beide Anregungswellenlängen. Diese wurden jeweils in counts per second (cps) angegeben. Nun errechnete das Programm den Quotienten (ratio) aus den beiden Intensitäten, der als relatives Maß für die intrazelluläre Kalziumkonzentration angesehen werden konnte.

Um bei Fluoreszenzmessungen ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erhalten, ist es notwendig, die Hintergrundfluoreszenz zu subtrahieren. Dazu wurde zum Ende jeder Messung die Zelle aus dem sichtbaren Bereich geschoben, um einige Sekunden lang die Fluoreszenz eines zellfreien Gebietes zu erfassen. Die hier bei 340 und 380 nm gemessenen Werte wurden von den während der Messung ermittelten abgezogen.

2.2.5.5. Natrium-Entzugs-Kontraktur

Zum Nachweis der direkten Abhängigkeit der Sarkomerlänge von der $[Ca^{2+}]_i$ wurde diese Reihe von Experimenten durchgeführt. Ziel war es, für die Zellen jeder Gruppe einer bestimmten $[Ca^{2+}]_i$ eine genaue Sarkomerlänge zuzuordnen zu können.

Dabei sollten die Zellen nicht extern, elektrisch stimuliert werden, sondern es sollte eine gleichmäßige Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ erzielt werden.

Nach Beladung der Zellen mit Fura-2/AM (siehe 2.2.5.4) und Anheftung an die Messkammer mit Laminin (siehe 2.2.3.4) musste zunächst das sarkoplasmatische Retikulum (SR), der Hauptspeicher der Kardiomyozyten für Kalzium, entleert werden. Dazu wurde die Messkammer mit einer Coffein (10 mM; Fa. Sigma, D-Steinheim) und Thapsigargin (5 μ M; Fa. Sigma, D-Steinheim) enthaltenden Tyrodelösung (Tabelle 2.1) perfundiert. Durch Coffein wird das SR entleert. Thapsigargin blockiert die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und verhindert so eine Wiederaufnahme des Ca^{2+} in das SR.

Nach diesem Schritt wurde eine Tyrodelösung eingewaschen, die nur noch 10% der ursprünglichen Na^+ -Konzentration enthielt. Zum Ausgleich der Osmolarität durch das fehlende Na^+ wurde der Lösung aequimolar Cholin zugesetzt, wie es bereits von Kawata et al. (1990) beschrieben wurde. Weiterhin enthielt diese Lösung die gleichen Konzentrationen an Coffein und Thapsigargin.

Nun wurde die Messung gestartet. Durch die geringe äußere Na^+ -Konzentration wurde die Funktion des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers (NCX) in der Zellmembran der Kardiomyozyten umgekehrt, sodass dieser jetzt drei Na^+ -Ionen nach außen und im Gegenzug ein Ca^{2+} -Ion ins Zellinnere abgab. Dadurch stieg die $[Ca^{2+}]_i$ langsam an, was durch eine Steigung der Ratio-Datenspur und einem Abfall der Sarkomerlänge erkennbar war.

2.2.6. Auswertung der Daten

Die Signale sowohl der reinen Sarkomerverkürzungsmessungen als auch der simultanen Messung der $[Ca^{2+}]_i$ wurden mit Hilfe des Programms IonWizard sarcomere length and PMT acquisition software (IonOptix, Milton, MA, USA) aufgezeichnet und auch mit diesem weiterverarbeitet.

2.2.6.1. Auswertung der Daten der Sarkomerverkürzungsmessungen

Die gemessene und berechnete Sarkomerlänge wurde als Funktion der Zeit dargestellt, sodass je nach Stimulationsfrequenz ein typisches Bild entstand. Die letzten fünf Verkürzungen eines jeden Stimulationszyklus, bei denen ein Gleichgewicht eingetreten war, wurden manuell markiert und vom Programm gemittelt. Damit ein Stimulationszyklus in die Auswertung übernommen werden konnte, wurde darauf geachtet, dass jeder der 20 Reize zu einer einwandfreien Sarkomerverkürzung ohne Zwischenzuckung geführt hatte und dass nicht unmittelbar vor und nach dem Zyklus Spontankontraktionen der Zellen stattgefunden hatten.

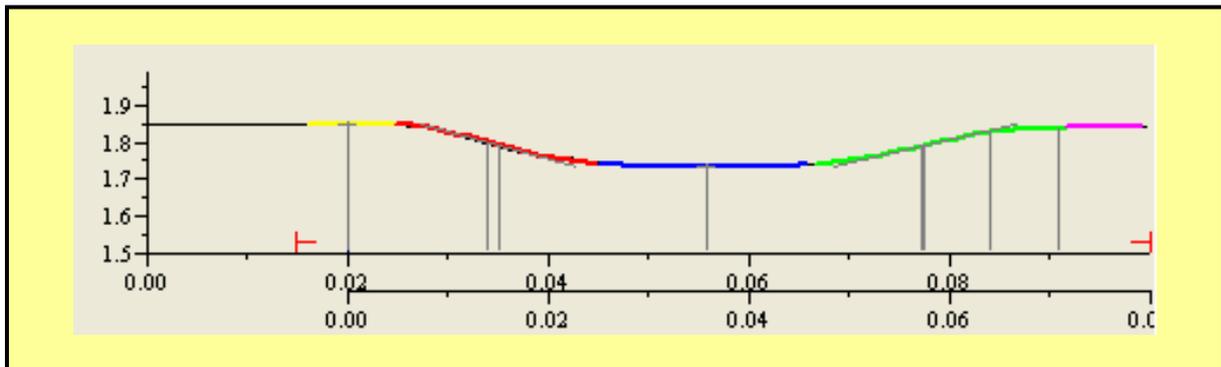


Abbildung 2.8: Gemittelte Sarkomerverkürzung aus den letzten 5 Verkürzungen einer Stimulationsserie. Die x-Achse entspricht dabei der Zeit, die y-Achse gibt die Sarkomerlänge an.

An der gemittelten Sarkomerverkürzung errechnete das Programm fünf verschiedene Parameter, die nachher statistisch ausgewertet wurden: Die Ruhesarkomerlänge, die Verkürzungsamplitude, die Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit sowie die Verkürzungsdauer.

- *Ruhsarkomerlänge:* Die Ruhsarkomerlänge wurde direkt durch das Programm ermittelt. Die aus den letzten fünf Verkürzungen errechnete Ruhsarkomerlänge entsprach bei den niedrigen Frequenzen (< 6 Hz) derjenigen, die manuell vor Beginn einer Reizserie festgestellt werden konnte. Bei den hohen Frequenzen (≥ 6 Hz) allerdings hatte die Zelle nach einer Sarkomerverkürzung nicht genügend Zeit, ihre Sarkomere in den Bereich der Ruhsarkomerlänge zu relaxieren. Deshalb ermittelte das Programm eine kürzere Ruhsarkomerlänge. Diesem Umstand musste bei der Auswertung dieses Parameters Rechnung getragen werden.
- *Verkürzungsamplitude:* Die Verkürzungsamplitude wird von der IonWizard Software errechnet. Dabei wird die Differenz gebildet zwischen der Ruhsarkomerlänge und dem Wert am Minimum einer Verkürzungszacke. Aufgrund der oben erläuterten Verschiebung der Ruhsarkomerlänge bei den hohen Frequenzen (≥ 6 Hz) werden bei diesen nicht die wirklichen Verkürzungsamplituden angegeben. Deshalb wurde hier die Differenz zwischen der vom Programm errechneten Ruhsarkomerlänge und der manuell ermittelten vor Beginn eines Stimulationszyklus zu den Werten addiert.
- *Minimale Sarkomerlänge während der Verkürzung*
- *Verkürzungsgeschwindigkeit:* Die Verkürzungsgeschwindigkeit wurde vom Programm errechnet als die größte Steigung des absteigenden Schenkels der Verkürzungszacke.
- *Relaxationsgeschwindigkeit:* Diese wurde analog zur Verkürzungsgeschwindigkeit durch die Steigung des aufsteigenden Schenkels der Verkürzungszacke errechnet.
- *Verkürzungsdauer:* Diese wurde vom Programm errechnet als die Zeit vom Beginn der Verkürzung bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Sarkomerlänge wieder 90 % der Ruhsarkomerlänge erreicht hat.

Diese von IonWizard erfassten Daten wurden mit Microsoft Excel nach Parametern und Gruppen sortiert und zusammengefasst, Mittelwert und Standardabweichung ermittelt und zur weiteren Auswertung und graphischen Darstellung auf GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) übertragen.

2.2.6.1.1. Ermittlung der Zeitkonstanten τ_1 und τ_2

Die aus den zwanzig externen Reizen, mit denen die Zellen in jeder Frequenz stimuliert wurden, resultierenden Verkürzungen führten zu einem für jede Stimulationsfrequenz typischen Bild. Bei den niedrigen Frequenzen (< 6 Hz) nahm die Sarkomerverkürzung bei jedem Reiz sukzessive ab, sodass sich eine so genannte „negative Herzterappe“ zeigte (s. a. Abbildung 3.1). Bei den Frequenzen ≥ 6 Hz zeigte sich eine positive Herzterappe (siehe Abbildung 3.3). Gegen Ende einer jeden Reizserie war zu erkennen, dass die Verkürzungen ein Gleichgewicht erreicht hatten, d.h., dass die nachfolgenden Verkürzungen sich nicht mehr maßgeblich in der Amplitude änderten.

Die Zeit bis zum Erreichen dieses Gleichgewichts kann durch eine Zeitkonstante bestimmt werden. Deshalb wurde eine Regressionskurve durch die Minima einer jeden Herzterappe errechnet. Die Berechnung dieser Kurven und der dazugehörigen Zeitkonstanten erfolgte mit der Formel 2.1.

$$y = (ss_1 - (ss_1 - \text{postrest}))^{-x/\tau_1} + (ss_1 - ss_2)^{-x/\tau_2} - (ss_1 - ss_2)$$

Formel 2.1: Formel zur Berechnung der Zeitkonstanten, dabei bedeuten

postrest: Sarkomerlänge bei maximaler erster Verkürzung

ss₁: Sarkomerlänge bei maximaler zweiter Verkürzung

ss₂: Sarkomerlänge im Gleichgewicht (bei maximaler zwanzigster Verkürzung)

2.2.6.2. Auswertung der Daten der Messung der $[Ca^{2+}]_i$

Analog zu der Auswertung der Daten der Messungen der Sarkomerverkürzung wurde die Auswertung der Daten der Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Aufgrund von soft- oder hardwarebedingten Artefakten wurden hier 30 statt 20 Reize gesetzt und fünf Ausschläge aus den Reizen 15 bis 30 entnommen, die frei von Artefakten waren, um vergleichbare Werte zu erhalten. Diese fünf wurden von der IonWizard Software zusammengefasst und gemittelt. Aus diesem resultierenden Ausschlag wurden verschiedene Parameter ermittelt, wovon einige in die statistische Auswertung aufgenommen wurden. Dazu gehörten die Ruhekalziumkonzentration, die Amplitude und die Geschwindigkeiten der Konzentrationsveränderungen.

- *Ruhekalziumkonzentration*: Die Ruhekalziumkonzentration wurde direkt als Quotient der Fluoreszenz bei 340 und 380 nm ermittelt.
- *Amplitude der Konzentrationsveränderung*: Diese stellt das Ausmaß der Konzentrationsveränderung dar und ist die Differenz aus der Ruhekonzentration und dem Maximum der Kalziumkonzentration nach einem gesetzten Reiz.
- *Geschwindigkeiten der Konzentrationsveränderung*: Diese werden vom Programm errechnet aus der maximalen Steigung des auf- und absteigenden Schenkels der Ausschläge.
- *Dauer der Konzentrationsveränderung*: Diese wurde berechnet als die Zeit von Beginn des Reizes bis zum Wiederabsenken der $[Ca^{2+}]_i$ auf 90% der Ruhekalziumkonzentration.

2.2.6.3. Auswertung der Daten der Natrium-Extraktionskontraktur

Für die Auswertung dieser Daten wurde im Programm IonWizard von jeder Zelle zu ausgewählten Zeitpunkten der Wert der Sarkomerlänge und der 340/380-Ratio abgelesen, sodass sich für jede Zelle 3 - 11 Wertepaare ergaben. Die Werte der Sarkomerlänge wurden in Abhängigkeit von der $[Ca^{2+}]_i$ in ein Diagramm übertragen. Mittels linearer Regression mit dem Programm GraphPad Prism 3.0 wurde durch die Punkte eine Regressionsgerade errechnet. Da sich die Sarkomerlänge nicht genau einstellen ließ, waren die Geraden nicht unerheblich entlang der y-Achse verschoben. Deshalb wurden lediglich die Steigungen der Regressionsgeraden in die Auswertung übernommen.

2.2.6.4. Statistik

Zunächst wurden aus den erhobenen Daten mithilfe des Programms Microsoft Excel das arithmetische Mittel und die Standardabweichung ermittelt und diese mit dem Programm GraphPad Prism 3.0 statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Zur Testung der Gruppenunterschiede bezüglich der einzelnen Parameter wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit nachfolgendem Newman-Keuls post hoc test gerechnet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 5%.

Die Daten wurden graphisch in X-Y-Plots oder Balkendiagrammen als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

2.2.7. Stimulantien

2.2.7.1. Lipopolysaccharide

Um ein Modell einer Sepsis, ausgelöst durch gram-negative Bakterien, zu erzeugen, wurden die Zellen mit 10, 5 oder 1 μg LPS vom Escherichia coli-Serotyp O111:B4 pro ml Kulturmedium stimuliert. LPS ist ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, bestehend aus einer Lipid A Domäne und einer Polysaccharidkette, wobei das Lipid A der pathogene Anteil ist. LPS wurde zu 1mg/ml Aqua bidest. angesetzt und anschließend bei 4 °C gelagert.

2.2.7.2. E5564 (Eritoran)

E5564 (Eritoran, Eisai Co. Inc., Wilmington, MA, USA) ist ein kompetitiver Antagonist am Toll-like-Rezeptor 4. Diese Eigenschaft kommt aufgrund der Strukturanalogie zur Lipid A Domäne des LPS zustande (Abbildung 2.9). Zur Verhinderung der Einflüsse von LPS auf die Sarkomerverkürzung wurde E5564 in einer Konzentration von 10 und 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kulturmedium den Zellen zugegeben. Wie von Rossignol et al. (2002) gezeigt wurde, weist der Stoff eine sehr kurze in-vitro-Halbwertszeit (< 1 h) auf. Deshalb wurde er während der Inkubation alle zwei Stunden frisch in gleicher Menge nachgegeben.

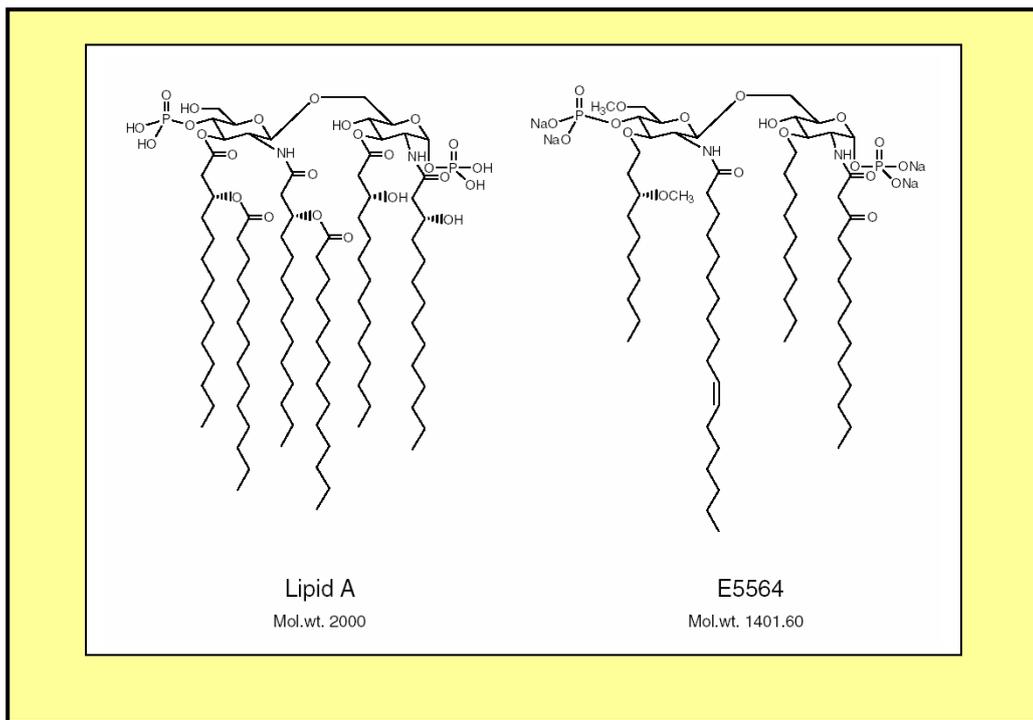


Abbildung 2.9: Strukturformeln der Lipid A-Domäne des LPS und von E5564 (aus Wong et al., 2003)

2.2.7.3. S-Methylisothioharnstoff

Zur Verhinderung der Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wurde in einer Reihe von Experimenten S-Methylisothioharnstoff (SMT), ein spezifischer Hemmstoff der iNOS, eingesetzt. SMT ist ein 10 – 30fach potenterer Hemmstoff der iNOS als andere bekannte NOS-Inhibitoren (z. B. N-methyl-L-arginin) (Szabo et al., 1994). Dieser Stoff gilt als kompetitiver Hemmstoff an der L-Arginin Bindungsstelle des Enzyms, der dosisabhängig die Aktivität blockiert (Southan et al., 1995). SMT wurde in einer Konzentration vom 100 µg/ml Kulturmedium eingesetzt. Der Stoff wurde dem Kulturmedium 30 min vor Ende der Inkubationszeit zugegeben.

2.2.7.4. Lipoteichonsäure und Peptidoglykan

Zur Auslösung einer artifiziellen, gram-positiven Sepsis wurde dem Kulturmedium jeweils 10 µg/ml Peptidoglykan und Lipoteichonsäure (LTA) beigegeben.

Peptidoglykane sind die Bestandteile der Mureinschicht in der Zellwand von Bakterien. Sie bestehen aus Polysaccharidketten (N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin), die über Peptidketten quervernetzt sind. Bei gram-positiven Bakterien kann das Mureinnetz bis zu 40 Schichten (15 – 80 nm) dick sein und damit 30 % der Trockenmasse der Zellwand ausmachen.

Lipoteichonsäuren sind in der Zellmembran verankerte Moleküle, deren genaue Funktion für das Bakterium noch nicht genau geklärt ist. Es wird vermutet, dass sie als Regulatoren von Autolysinen bei Wachstum und Querteilung fungieren (Kayser et al., 1999).

Für die Experimente wurde LTA von *Staphylokokkus aureus* verwendet. Sie wurde von zwei verschiedenen Quellen bezogen. Zum einen kommerziell erhältliche LTA Firma Sigma-Aldrich (Steinheim). Bei Untersuchung einer Probe dieser LTA im Mikrobiologischen Labor von Dr. Balfans und Dr. Lohmeyer (Münster) mithilfe eines *Limulus amoebocyte lysate assay* wurde eine LPS-Kontaminierung in Höhe von 29 EU (endotoxin units) festgestellt. Um LPS-Kontaminationen zu minimieren, wurde in weiteren Versuchen hochgereinigte LTA eingesetzt, die uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Hartung aus dem Institut für Biochemische Pharmakologie der Universität Konstanz bereitgestellt wurde.

2.3. In vivo-Versuche

2.3.1. Gruppeneinteilung

Für die in vivo-Versuche wurden ausschließlich männliche Mäuse der Linie C57BL/6 mit einem Alter von 10-12 Wochen verwendet und wie folgt eingeteilt:

Gruppe 1: Transversale aortale Konstriktion, mit LPS stimuliert

Gruppe 2: Scheinoperiert, mit LPS stimuliert

Gruppe 3: Transversale aortale Konstriktion, mit PBS stimuliert

Gruppe 4: Scheinoperiert, mit PBS stimuliert

Vor ihrer Verwendung wurden die Tiere zunächst adspektorisch auf ihren Gesundheitszustand untersucht. An den Mäusen der Gruppen 1 und 3 wurde zur Erzeugung einer erhöhten Druckbelastung im linken Herzen eine transversale aortikale Konstriktion (TAC) durchgeführt, während die der Gruppen 2 und 4 lediglich scheinoperiert (Sham) wurden. Drei Tage post operationem wurden die Tiere durch Injektion von entweder 20 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS) i.p., gelöst in „Phosphate buffered saline“ (PBS; Pufferlösung), oder einer vergleichbaren Menge PBS (Kontrolle) stimuliert. Sechs Stunden nach der Stimulation erfolgten das Schreiben eines Elektrokardiogramms sowie eine hämodynamische Untersuchung sowohl arteriell als auch linksventrikulär.

2.3.2. Anästhesie

Zur Einleitung der Narkose wurden die Mäuse nach Ermittlung der Körpermasse in eine Inhalationsbox bei 2% Isofluran (Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) und einem Sauerstoff-Flow von 2,5 l/min gegeben. Bei ausreichender Narkosetiefe wurden die Tiere auf dem Rücken auf einem durch ein Wasserbad (42°C) beheizten Operationstisch fixiert, wobei die weitere Narkose bis zur Intubation über einen Nasenkonus gewährleistet wurde.

Zur Intubation wurde die Maus vom Kinn bis auf Höhe des Schaufelknorpels rasiert, der OP-Bereich mit Polyvidon-Jod-Lösung desinfiziert (Betaisodona, Mundipharma GmbH, D-Limburg) und ein Hautschnitt gesetzt, der vom Kinn bis zur Höhe des dritten Interkostalraumes reichte. Die unter der Haut gelegenen Speicheldrüsen und

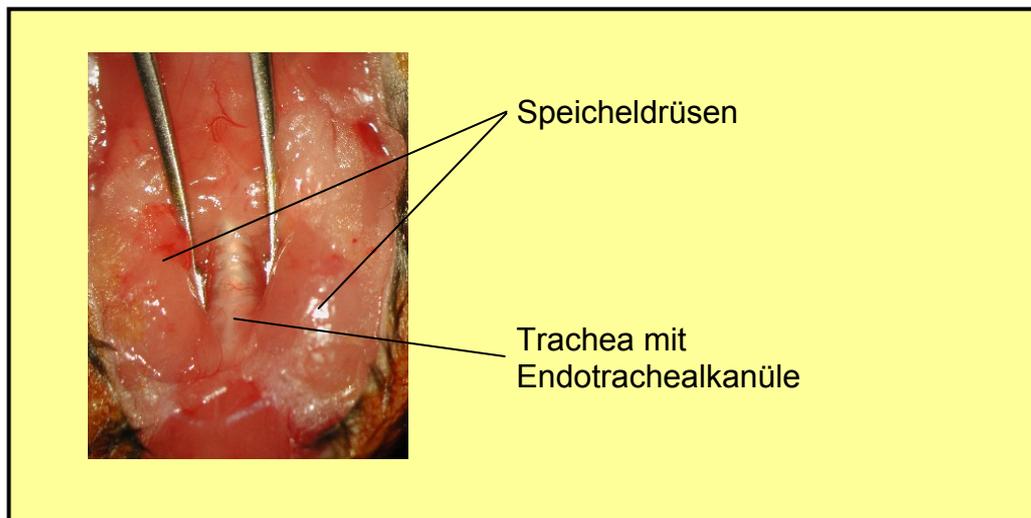


Abbildung 2.10: Intubationsmethode, Halsbereich der Maus, Ventralansicht nach Hautschnitt und Präparation der Trachea.

die ventrale Trachealmuskulatur wurden stumpf gespreizt, sodass die Trachea sichtbar wurde. Nun wurde unter Sichtkontrolle bei sechsfacher Vergrößerung unter einem Operationsmikroskop der Endotrachealtubus eingeführt (Abbildung 2.10). Die Narkoseerhaltung erfolgte bei 2% Isofluran und einem Sauerstoff-Flow von 1 l/min. Das Tier wurde weiterhin durch ein Beatmungsgerät konstant mit 110 Atemzügen pro Minute und 200 µl/Atemzug beatmet.

2.3.3. Transversale Aortale Konstriktion und Schein-Operation

Die TAC wurde durchgeführt, um im Herzen eine erhöhte Druckbelastung zu induzieren. Dazu wurde die Methode von Rockman et al. (1991) übernommen und leicht modifiziert. Die Schein-Operation diente lediglich der Kontrolle. Beide Operationsformen erfolgten unter einem Stereomikroskop bei 6- bis 10-facher Vergrößerung.

Nach erfolgreich eingeleiteter Narkose, wurde das Tier wie oben beschrieben auf dem Operationstisch fixiert und intubiert. Danach wurde der Thorax mit einem Scherenschnitt paramedian bis hinter die zweite Rippe, möglichst unter Schonung der Pleurahöhle, eröffnet und mit zwei Wundretractoren zu beiden Seiten gespreizt. Die nun sichtbar gewordenen Lappen des Thymus wurden vorsichtig stumpf

voneinander getrennt und unter den Retraktoren fixiert. Der Blick fiel nun auf den Aortenbogen und die von ihm ausgehenden Abgänge der Arteria carotis communis dexter auf der rechten Seite und des Truncus brachiocephalicus links (Abb. 2.11, 2.12). Der zwischen beiden Abgängen befindliche Teil der Aorta wurde vorsichtig stumpf von dem ihn umgebenden Bindegewebe getrennt und freipräpariert.

Im Falle der TAC-Operation wurde daraufhin ein 2/0-Seidenfaden unter den freipräparierten Gefäßabschnitt durchgeführt und zwei übereinander liegende, gegenläufige Knoten vorbereitet. Um eine konstante Verringerung des Aortenlumens zu erreichen, wurde ein ca. 4 mm langes Stück einer 27G-Kanüle mit einem

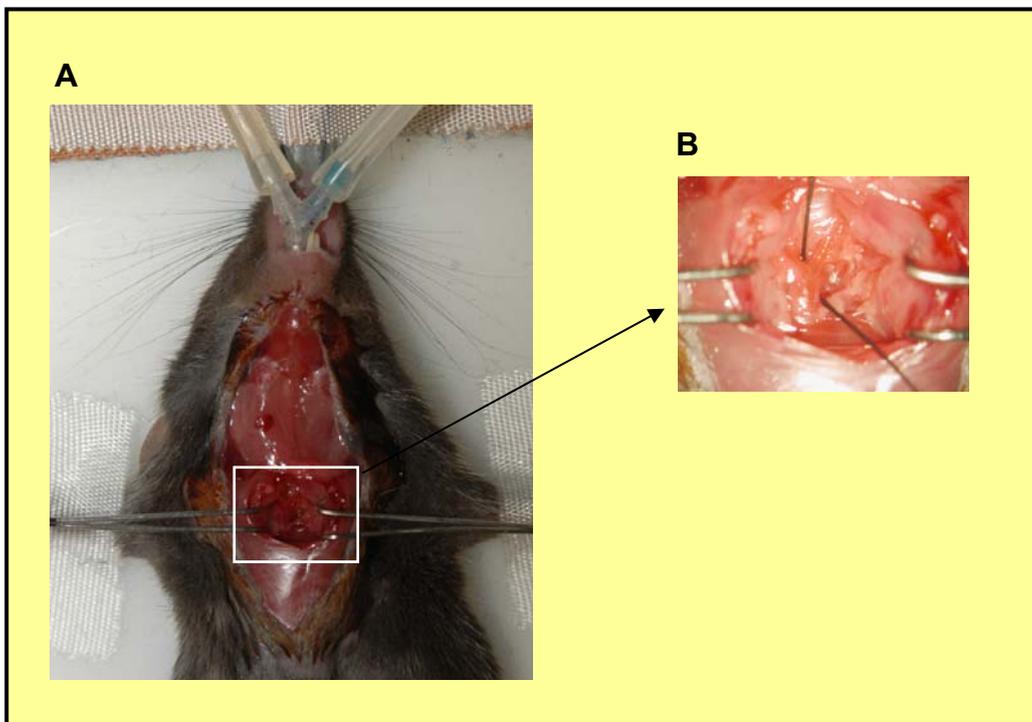


Abbildung 2.11: Darstellung des Aortenbogens zur Transversalen Aortalen Konstriktion

A Übersichtsaufnahme nach Thorakotomie: Maus mit eingeführter Endotrachealkanüle

B Detailansicht: Präparierter Aortenbogen mit bereits durchgeführtem Ligaturfaden, 16-fache Vergrößerung

Außendurchmesser von 0,4 mm an das Gefäß gelegt, beide Knoten nacheinander festgezogen, das Kanülenstück wieder entfernt und die Fadenenden abgeschnitten.

Bei den Sham-operierten Tieren wurde lediglich der Aortenbogen freipräpariert, sodass eine Pinzette darunter durchgeführt werden konnte, da hier keine Erhöhung der Belastung des Herzens erreicht werden sollte.

In beiden Operationsformen wurden die Wundretraktoren nun wieder entfernt und die Thymuslappen reponiert. Die Naht des Thorax erfolgte in ein bis zwei Einzelheften mit einem monofilen, nicht resorbierbaren Pronova[®]-Faden (Ethicon, Norderstedt) der Größe 6/0 USP. Nach erneuter Desinfektion des Wundgebietes wurde die Haut fortlaufend mit einem ebenfalls monofilen, nicht resorbierbaren Polypropylenfaden (Prolene, Ethicon, Norderstedt) der Stärke 5/0 USP verschlossen. Bei Erreichen einer regelmäßigen Spontanatmung und wiederkehrenden Reflexen wurden die Mäuse extubiert und bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose unter Rotlicht und mit O₂-Begasung überwacht.

Zur postoperativen Analgesie wurde den Tieren initial unmittelbar nach dem Eingriff intraperitoneal (i.p.) 0,075 mg/Tier Buprenorphin (Temgesic[®], gelöst in 0,1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung) verabreicht. Die weitere Versorgung wurde mit einer oralen Gabe von 0,01 mg Buprenorphin zweimal täglich für zwei Tage bewerkstelligt.

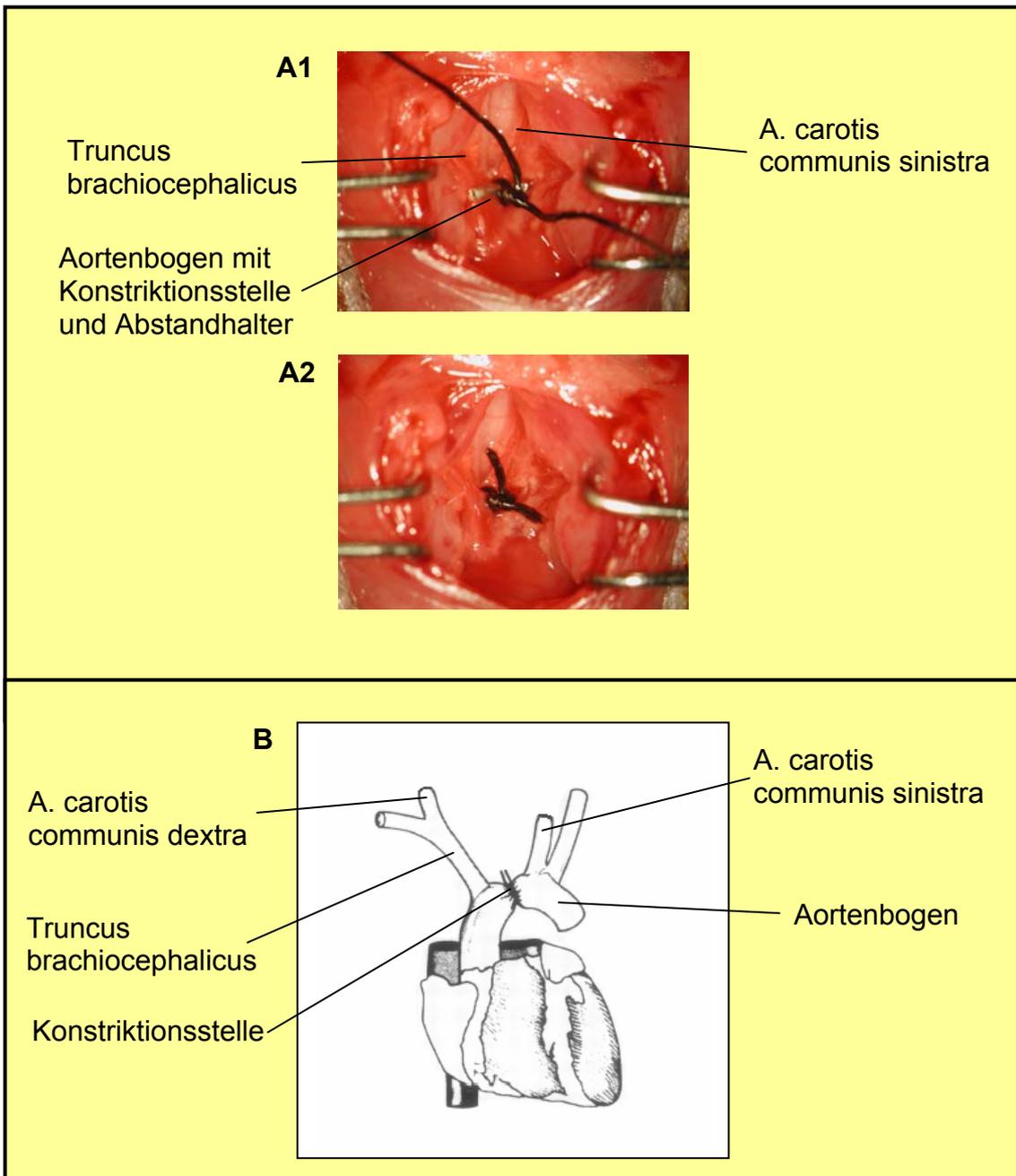


Abbildung 2.12: Durchführung der Transversalen Aortalen Konstriktion

A präparierter Aortenbogen mit den Gefäßabgängen vom Truncus brachiocephalicus und der A. carotis communis sinistra,

1: chirurgische Knoten mit Abstandhalter

2: fertige Konstriktion

B Schemadarstellung der Gefäßstrukturen und der TAC modifiziert nach Rockman et al., 1991.

2.3.4. Stimulation der Tiere

72 Stunden nach der TAC- bzw. Sham-Operation wurde der Allgemeinzustand der Tiere begutachtet und die Körpermasse ermittelt. Um eine artifizielle peritoneale, gramnegative Sepsis zu erzeugen, wurden die Tiere mit einer gewichtsnormierten Menge LPS stimuliert. Dazu wurde LPS in einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS angesetzt und den Mäusen zu 0,02 ml/g KM i.p. verabreicht. Die injizierte Dosis war damit 20 mg/kg KM. Den TAC- bzw. Sham-operierten Kontrolltieren wurde PBS in einer Dosierung von 0,02 ml/g KM i.p. injiziert.

2.3.5. Messung der Hämodynamik

Nach weiteren sechs Stunden erfolgte an den Mäusen noch einmal eine Kontrolle des Allgemeinzustandes und anschließend die Aufzeichnung des Elektrokardiogramms (EKG) sowie die invasive Messung sowohl des peripheren Blutdrucks in der A. carotis communis, also prästenotisch, als auch des linksventrikulären Blutdrucks mithilfe eines 1,4 French Millar-Katheters (siehe 2.2.8). Diese Messmethode bei geschlossenem Thorax wurde bereits mehrfach beschrieben (Lorenz et al., 1997; Doevendans et al., 1998).

Dazu wurden die Mäuse wie oben beschrieben narkotisiert und auf dem Operationstisch fixiert. Zunächst wurde für zehn Minuten ein EKG mittels einer Extremitätenableitung geschrieben. Danach wurde das Tier zur Präparation der A. carotis communis dexter median von submental bis zum Thorax eröffnet. Die rechte Speicheldrüse und der rechte Anteil der Schilddrüse wurden stumpf freipräpariert und mit einer Arterienklemme zur Seite gehalten. Daraufhin wurde das Gefäß als pulsierende Struktur zwischen zwei Muskelbäuchen sichtbar.

Nach Trennung der Arterie von der parallel laufenden Vena jugularis und dem Nervus vagus wurden drei Seidenfäden von ca. 5-7 cm Länge unter dem Gefäß durchgezogen. Mit dem kranial gelegenen Faden wurde die Arterie ligiert und nach kranial gespannt. Der zweite, kaudal gelegene Faden wurde mit einem Nadelhalter gefasst und nach kaudal gezogen, sodass die Blutzufuhr unterbunden war. Der dritte Faden diente dazu, einen Knoten vorzubereiten, der nicht zugezogen an das kaudale Ende des Gefäßabschnittes gelegt wurde (Abbildung 2.13 A). Mithilfe einer

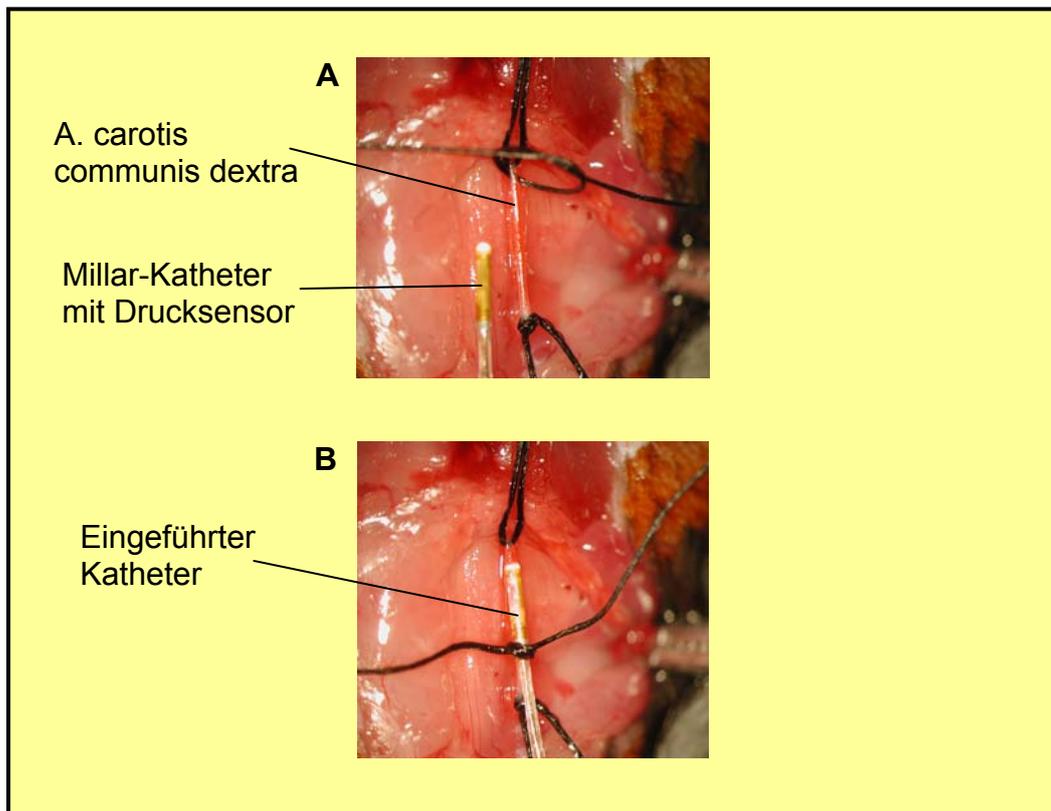


Abbildung 2.13: Hämodynamische Messung mithilfe eines Mikrotip-Druckkatheters

A Freipräparierte A. carotis communis dextra, mit Seidenfäden fixiert

B Eingeführter Druckkatheter

Augenschere wurde bei 16-facher Vergrößerung möglichst weit kranial ein Schnitt quer zum Gefäß gesetzt, der etwa ein Drittel des Umfanges umfasste. Durch das entstandene Loch wurde der Millar-Katheter eingeführt und mit dem dritten Faden fixiert (Abbildung 2.13 B). Der kaudale Faden wurde nun wieder gelöst, um den Blutzufluss wiederherzustellen.

Der Katheter wurde intravasal bis vor die Aortenklappen vorgeschoben. Dies war erkennbar durch ein Zittern des Katheters. Nun wurde er direkt wieder zwei bis drei Millimeter zurückgezogen, um sicherzustellen, dass die Messung des peripheren Blutdrucks bei jedem Tier an der gleichen Stelle stattfand.

Der Millar-Katheter war über ein Power lab data acquisition system (ADInstruments) an einen Computer angeschlossen. Mithilfe der Software Chart 4 for Windows[®] wurde die Blutdruckkurve aufgezeichnet. Nach Beendigung der Aufzeichnung des

peripheren Blutdrucks nach zehn Minuten wurde der Katheter weiter in den linken Ventrikel vorgeschoben. Dass die Katheterspitze an der richtigen Stelle lag, war durch den plötzlich abfallenden diastolischen Druck zu erkennen. Der linksventrikuläre Druck wurde für weitere 10 min gemessen. Nach Beendigung dieser Aufzeichnung wurde der Katheter wieder aus dem Gefäß entfernt.

Die Präparation des Gefäßes und das Einführen des Katheters erfolgten bei 2 %Vol. Isofluran und 2,5 l/min O₂-Fluss, die Aufnahme des EKG und der Hämodynamik bei 1 %Vol. Isofluran und 1 l/min O₂-Fluss.

2.3.6. Blutentnahme

Nach erfolgreicher Messung wurde der Katheter aus der Maus entfernt und diese durch Entbluten getötet. Das aus der A. carotis communis dextra entweichende Blut wurde mit einer 1 ml fassenden Spritze aufgefangen und anschließend in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bei 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Serum-Überstand wurde entnommen und für weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.3.7. Organentnahme

Die Maus wurde nun eröffnet und sowohl die Lunge als auch das Herz entnommen und in einer Petrischale mit PBS (Pufferlösung) von umliegendem Bindegewebe und eventuell verbleibendem Perikard befreit. Vom Herzen wurden die Vorhöfe und anhängende Gefäßreste entfernt und der rechte vom linken Ventrikel getrennt. Nach vorsichtigem Ausdrücken auf saugfähigem Zellstoff wurde die Trockenmasse der Organe auf einer Feinwaage (Fa. Ohaus, Pinebrook, NJ, USA) ermittelt. Anschließend wurden sie in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gegeben und ebenfalls für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Tibia wurde herauspräpariert und ihre Länge mit Hilfe eines Messschiebers (Fa. Mauser, St. Denis, Frankreich) erfasst.

2.3.8. Geräte, Materialien und Stimulantien

2.3.8.1. Operationsbesteck und Verbrauchsmaterialien

- Operationsbesteck: Verschiedene Pinzetten, Scheren, Klemmen, Wund-Reraktoren und ein Nadelhalter (Fine Science Tools Inc., San Francisco, CA, USA)
- Betaisodona[®] Lösung (Mundipharma GmbH, Limburg)
- Alkohol vergällt
- Isofluran: Forene (Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden)
- Nahtmaterial: 6-0 Prolene[®] (Polypropylen; Ethicon, Norderstedt) für die Thoraxhefte und 6-0 Pronova[®] (Ethicon, Norderstedt) für die Hautnähte, beide monophil und nicht resorbierbar

2.3.8.2. Geräte für die in vivo-Eingriffe

- Endotrachealkanüle
- Millar-Katheter: Mikro-Tip Pressure Katheter aus Nylon mit 1,4 French Drucksensor (Millar Instruments Inc., Houston, TX, USA)
Datenverarbeitung durch Power Lab data aquisition System (ADInstruments, Castle Hill, Australien) dazu gehörige Software: Chart 4 for Windows, zur Auswertung der EKG-Daten: Chart 4 for Macintosh (ADInstruments)
- Beatmungsgerät: MiniVent, Typ 845, (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten)
- Operationsmikroskop: OpMi-191294 (ZEISS, Oberkochen)
- OP-Tisch: Eigenanfertigung der feinmechanischen Werkstatt des Physiologischen Instituts 2 mit angeschlossenem Wärmebad (Rhema-Labortechnik, Hofheim)

2.3.8.3. Phosphate buffered saline (PBS)

Bei PBS handelt es sich um eine Pufferlösung aus NaCl, KCl, Na₂HPO₄·xH₂O, KH₂PO₄ und Aqua bidest., der pH-Wert liegt bei 7.5. Zur Injektion wurde das PBS steril abgefüllt und bei 4°C gelagert.

2.3.8.4. Lipopolysaccharide

Als Modell zur Erzeugung einer artifiziellen, gram-negativen Sepsis wurden Lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich, Steinheim, L-3024) vom *Escherichia coli*-Serotyp O111:B4 verwendet. LPS sind Zellwandbestandteile gram-negativer Bakterien und bestehen aus einer Lipid A-Komponente und einer Polysaccharidkette, wobei das Lipid A der pathogene Anteil ist. Das lyophilisierte Pulver wurde zu 1 mg/ml in PBS angesetzt und anschließend bei 4°C gelagert.

2.3.9. Auswertung der Daten

2.3.9.1. Auswertung der Daten der Hämodynamik-Messung

Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Programms Software Chart 4 for Windows®. In der aufgezeichneten Blutdruckkurve wurde eine Minute markiert. Nun errechnete das Programm verschiedene Parameter, von denen einige zur weiteren Auswertung verwendet wurden. Für den peripheren Blutdruck waren diese die Herzfrequenz, der systolische (SAP), enddiastolische (DAP) und mittlere (MAP) arterielle Blutdruck.

- *Herzfrequenz*: Die Herzfrequenz errechnete sich aus dem Abstand zwischen zwei aufeinander folgenden Aufstrichen in der Blutdruckkurve.
- *Systolischer arterieller Blutdruck*: Dies wurde errechnet als die gemittelten Maxima der Blutdruckkurve.
- *Diastolischer arterieller Blutdruck*: Dieser wurde errechnet als die gemittelten Minima der Blutdruckkurve.
- *Mittlerer arterieller Blutdruck*: Dieser wurde aus der Blutdruckkurve errechnet, indem die gemittelten Maxima zu 1/3 und die gemittelten Minima zu 2/3 zählten.

Aus der im linken Ventrikel gemessenen Blutdruckkurve errechnete sich die Herzfrequenz, der systolische (SHP) und enddiastolische (DHP) Blutdruck sowie die Kontraktions- (dP/dt_{max}) und Relaxationsgeschwindigkeit ($-dP/dt_{min}$).

2.3.9.2. Auswertung der EKG-Daten

Zur Auswertung der EKG-Daten wurde das Programm Chart 4 for Macintosh verwendet. Aus dem aufgezeichneten EKG eines Tieres wurden 50 aufeinander folgende Komplexe gemittelt und die verschiedenen Parameter errechnet, wobei das Programm die R-Zacke zur Synchronisation verwendete. In den gemittelten Komplexen wurde manuell der Beginn der P-Welle, die Q-Zacke und das Ende der T-Welle eingestellt. Anschließend errechnete das Programm selbständig verschiedene Parameter, Längen und Amplituden, aus den EKG-Komplexen, wie sie in Abbildung 2.14 dargestellt sind. Die Definitionen der verschiedenen Parameter entsprechen denen, wie sie von Korte et al. (2005) vorgeschlagen wurden. Neben den in Abbildung 2.14 gezeigten zeitlichen Intervallen wurden noch zwei verschiedene Amplituden ausgewertet, die der P-Welle und die des QRS-Komplexes. Die Amplitude der P-Welle war die Differenz zwischen dem Spannungswert, der am Maximum der P-Welle ermittelt wurde, und der isoelektrischen Linie. Die Differenz der Spannungen von der R- und der S-Zacke wurde als Amplitude des QRS-Komplexes wiedergegeben.

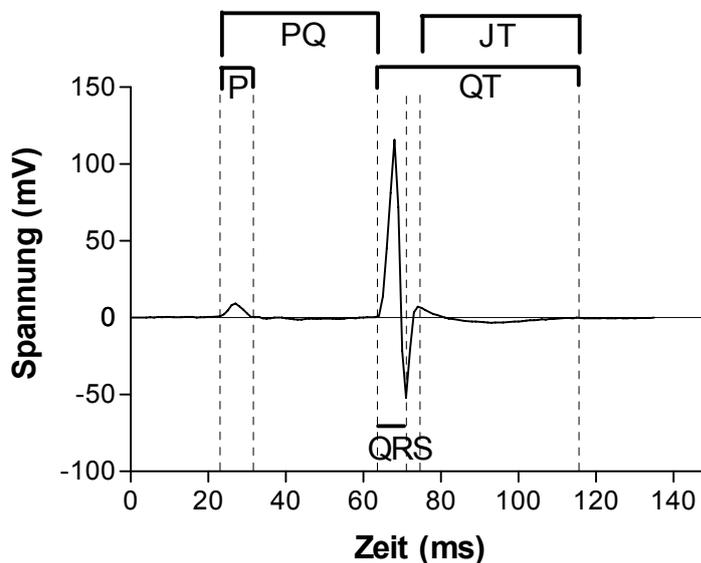


Abbildung 2.14: Darstellung der Definitionen der Dauer verschiedener Strukturen aus den EKG-Komplexen, die in die statistische Auswertung eingingen.

2.3.9.3. Statistik

Die erhobenen Daten wurden mithilfe des Programms GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Zur Testung der Gruppenunterschiede bezüglich der einzelnen Parameter wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit nachfolgendem Newman-Keuls post hoc test gerechnet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit betrug 5%.

Die Daten wurden graphisch in einem Balkendiagramm als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Tierzahlen

Für die Gewinnung der Daten der in vitro-Experimente wurden insgesamt 121 Tiere verwendet. Daten der Kardiomyozyten von 49 Tieren gingen insgesamt in die Auswertung mit ein. Gründe für das Ausscheiden von Mäusen waren folgende. Zum einen war die Präparation der Herzen nicht immer erfolgreich, weil die Aorta bei der Exzision zu kurz war und sich somit nicht mehr an der Kanüle befestigen ließ oder weil es nicht möglich war, die Aorta über die Spitze der Kanüle zu ziehen. Diese handwerklichen Fehler wurden aber mit zunehmender Erfahrung und damit Sicherheit und Geschwindigkeit in der Präparation immer seltener. Zum anderen gab es eine Reihe von Zellisolationen, bei denen ein sehr geringer Anteil an lebenden Zellen gewonnen wurde, obwohl keine offensichtlichen Fehler aufgetreten waren. Das mag zum Teil an der Zusammensetzung der Lösungen und zum Teil an der jeweiligen Maus gelegen haben, eine genaue Ursache konnte allerdings nicht gefunden werden. Ein Großteil der Tiere war jedoch für die Etablierung der Messapparatur für das intrazelluläre Kalzium erforderlich, eine Phase in der keine biologisch relevanten Ergebnisse erzielt werden konnten.

Für die in vivo-Untersuchungen wurden insgesamt 89 Mäuse verwendet. Dabei gingen Daten von 52 Tieren in die Arbeit ein. Die Gründe für Mortalitätsraten der Tiere der einzelnen Gruppen der in vivo Experimente werden in Abschnitt 3.5.1 erläutert.

3.2. Wirkung von E5564 auf die Sarkomerverkürzung LPS-stimulierter Kardiomyozyten

Die Ergebnisse der Experimente, die in diesem Abschnitt dargestellt werden, wurden mit isolierten Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen im Alter von 12 – 14 Wochen gewonnen. Es gingen Daten von 18 Tieren in die Auswertung mit ein. Es sollte die Sarkomerverkürzung von isolierten, mit LPS stimulierten Kardiomyozyten untersucht werden, denen ebenfalls der kompetitive TLR4-Antagonist E5564 zugesetzt wurde, sowohl über die gesamte Zeit von 20 externen Reizen als auch im Gleichgewicht. Dazu wurden die jeweils 5 letzten Verkürzungen einer Reizserie von 20 Stimuli bei jeder Frequenz zusammengefasst und gemittelt.

Die Zahlenwerte aller Daten dieses Abschnitts sind im Anhang angegeben.

3.2.1. Originalregistrierungen

Die Originalregistrierungen dieser Untersuchungsreihe zeigen die Sarkomerlänge jeweils während einer Stimulationsserie in Abhängigkeit von der Zeit bei den untersuchten Frequenzen von Zellen der verschiedenen Gruppen. Pro Frequenz und Gruppe wurden die Datenspur von 5 – 10 Zellen zusammengefasst und gemittelt. Schon an Hand der Originalregistrierungen ist zu erkennen, dass die Ruhesarkomerlänge bei den in Kultur genommenen Zellen deutlich unter der lediglich in Tyrode gelagerten Zellen liegt mit einem Unterschied von ca. 0,1 – 0,2 μm . Auch fiel bereits hier auf, dass die Sarkomerverkürzungsamplitude der Zellen der Gruppe Kultur + LPS niedriger war als die der anderen Zellen.

Nach der 30-sekündigen Stimulationspause war die erste Sarkomerverkürzung, die „post rest“ Verkürzung, bei allen Gruppen und Frequenzen am größten. Bei den Frequenzen 0,5 bis einschließlich 4 Hz zeigten die Zellen eine negative Herztreppe. Dies bedeutet, dass die einzelnen Verkürzungen bis zum „Steady state“ sukzessiv an Größe abnahmen. Ab 6 Hz zeigten die Zellen der Gruppen Tyrode und Kultur + LPS + E5564 mit erhöhter „post rest“ Verkürzung eine positive Herztreppe. Dieser Wechsel von negativer zu positiver Herztreppe bei höheren Frequenzen wurde zuerst von Tiemann et al. (2002) beschrieben. Durch Stimulation mit LPS zeigten die Zellen diesen Wechsel nicht. Hier war auch bei 6 – 10 Hz eine negative Herztreppe zu beobachten. Die Abbildung 3.1 – Abbildung 3.3 zeigen die Originalregistrierungen der drei Gruppen bei den beispielhaften Frequenzen 0,5, 6 und 10 Hz. Ebenso zeigen sie die Regressionskurven, die nach der Formel 2.1 (Seite 38) berechnet wurden.

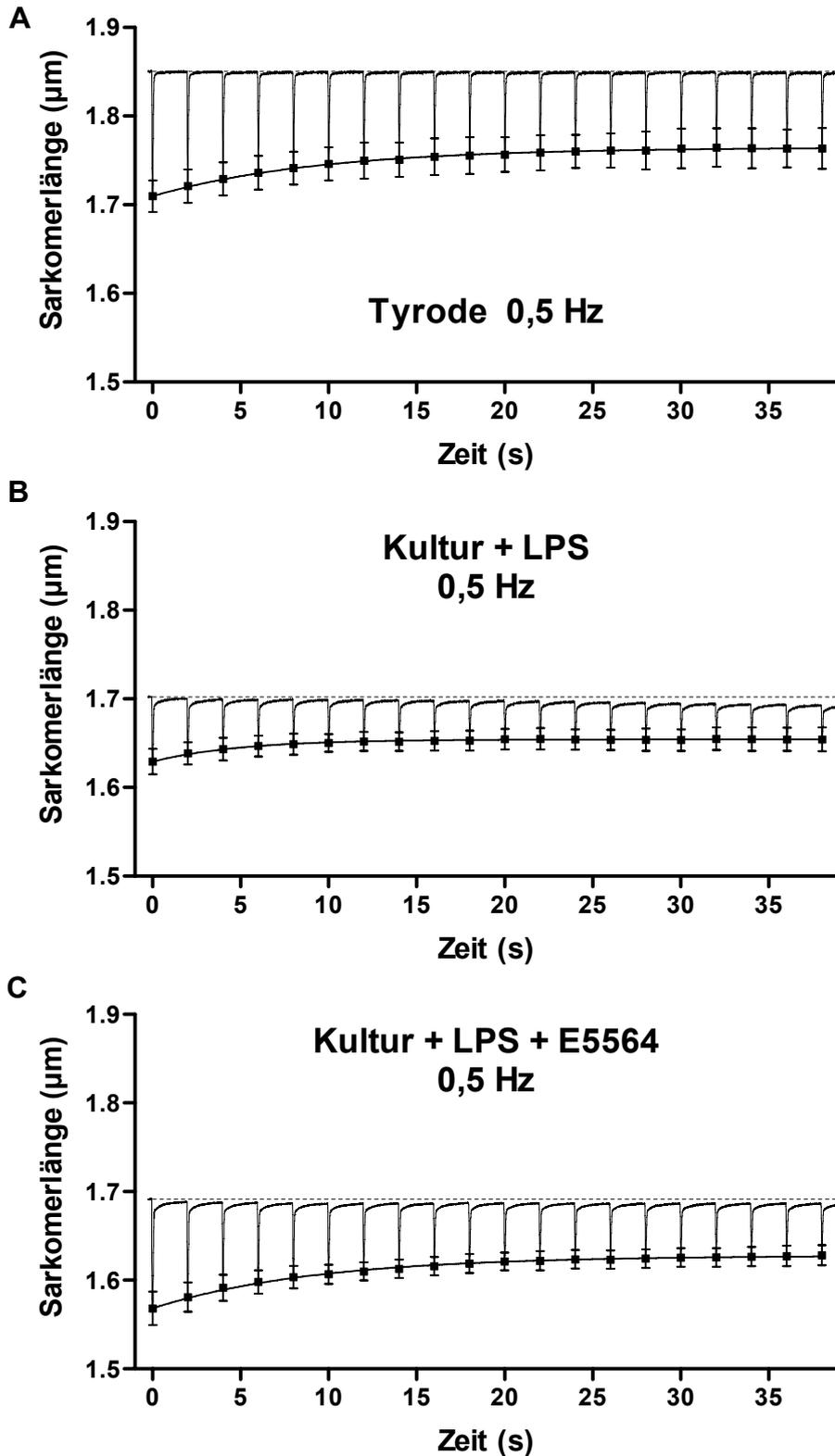


Abbildung 3.1: Originalregistrierungen der Sarkomerlänge isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen während 20 externen Stimulationen mit 30 V für 0,4 ms bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz und unterschiedlichen Vorbehandlungen. Die Angaben der Minima der Sarkomerverkürzung sind $MW \pm SEM$. Die Regressionskurven wurden nach Formel 2.1 errechnet.

3. Ergebnisse

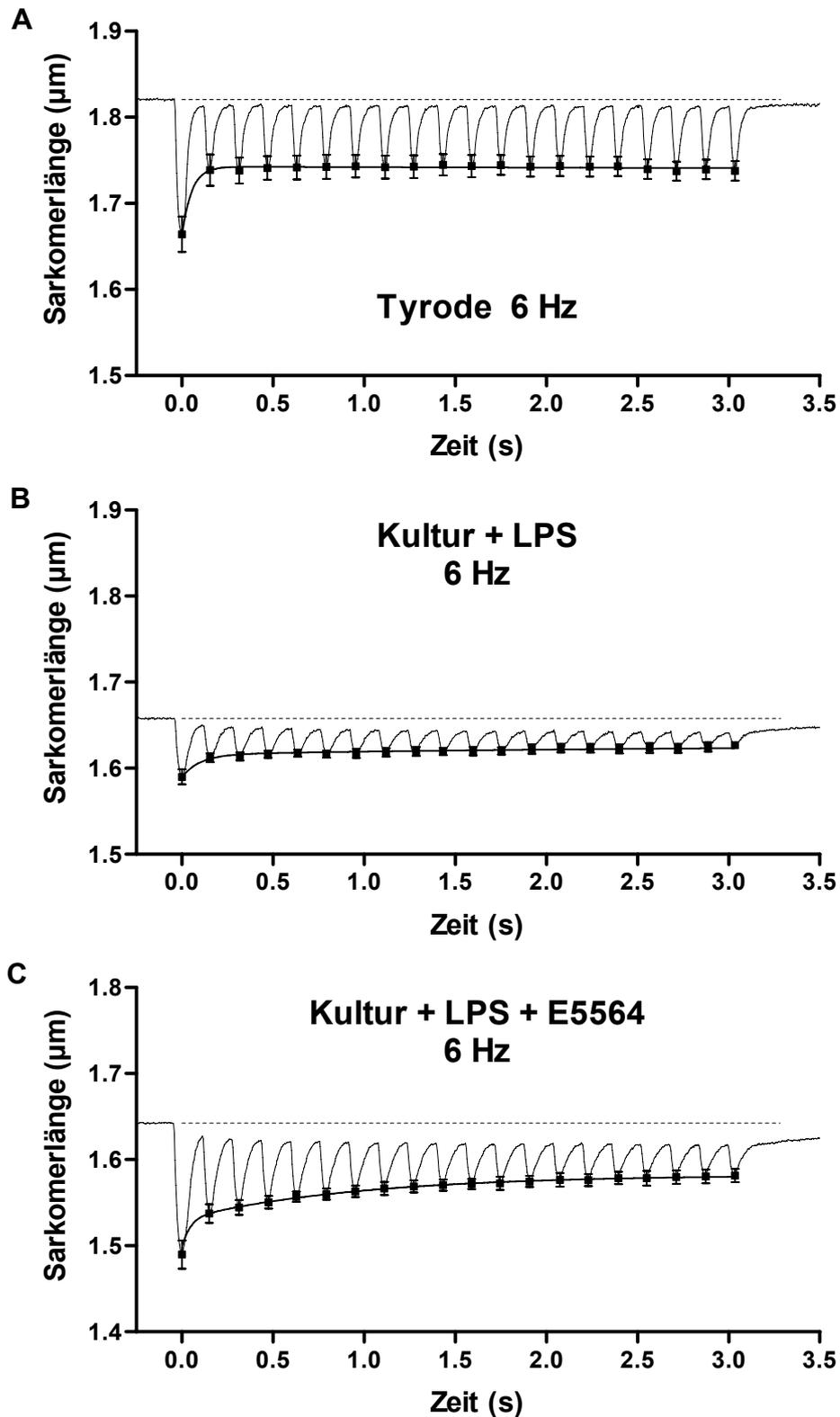


Abbildung 3.2: Originalregistrierungen der Sarkomerlänge isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen während 20 externen Stimulationen mit 30 V für 0,4 ms bei einer Stimulationsfrequenz von 6 Hz und unterschiedlichen Vorbehandlungen. Die Angaben der Minima der Sarkomerverkürzung sind $MW \pm SEM$. Die Regressionskurven wurden nach Formel 2.1 errechnet. Man beachte die veränderte Skala der y-Achse bei C.

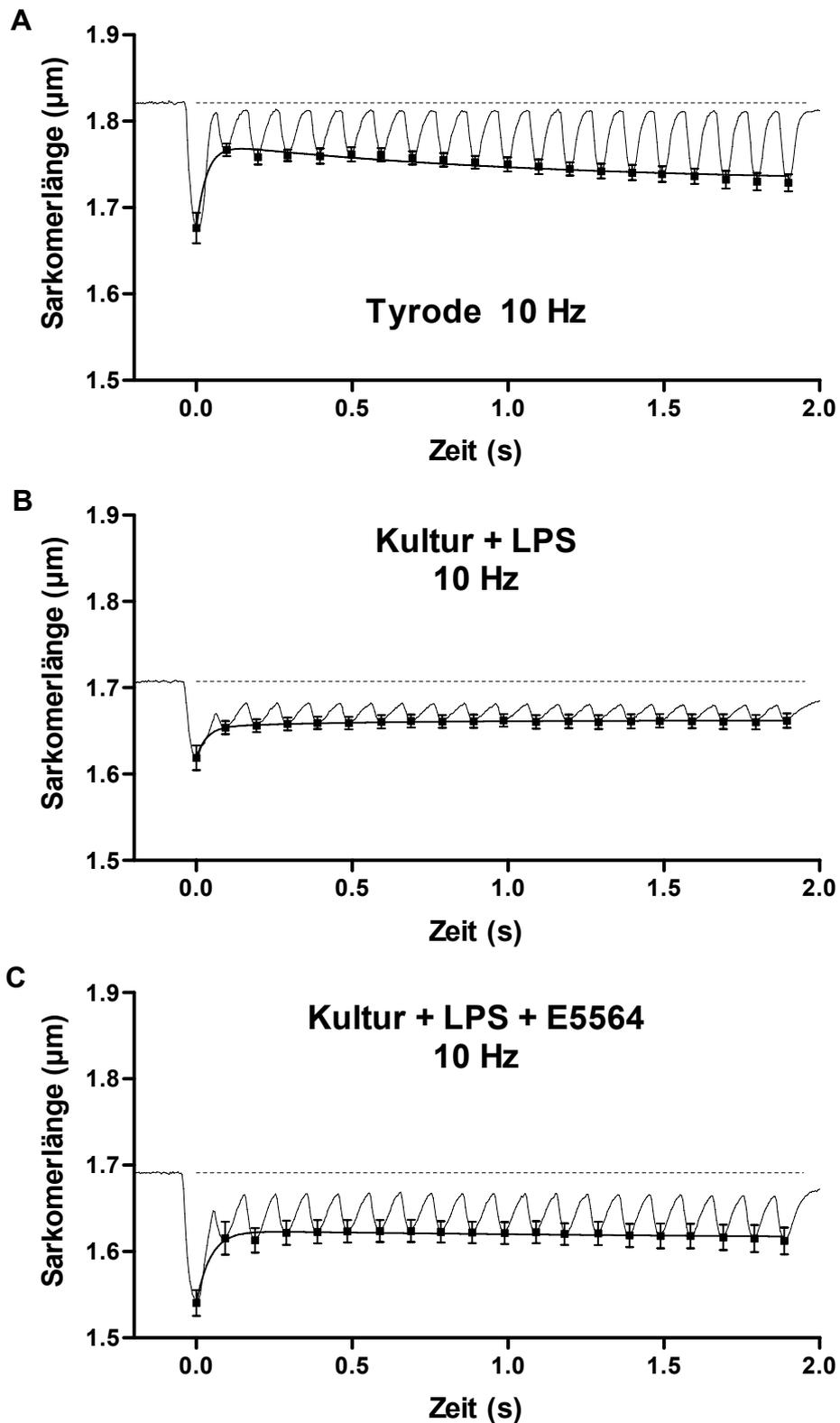


Abbildung 3.3: Originalregistrierungen der Sarkomerlänge isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen während 20 externen Stimulationen mit 30 V für 0,4 ms bei einer Stimulationsfrequenz von 10 Hz und unterschiedlichen Vorbehandlungen. Die Angaben der Minima der Sarkomerverkürzung sind $MW \pm SEM$. Die Regressionskurven wurden nach Formel 2.1 errechnet.

3.2.2. Zeitkonstante

Durch die Minima aller Sarkomerverkürzungen einer Reizserie wurde Mithilfe der unter 2.3.6.2 angegebenen Funktion eine Regressionskurve ermittelt. Aus dieser Näherungsfunktion wurden Zeitkonstanten ermittelt. Bei Stimulationsfrequenzen < 6 Hz wurde ein monotoner Abfall der Verkürzungsamplitude beobachtet, sodass sich in diesen Fällen lediglich eine Zeitkonstante τ_1 ergab. Bei Frequenzen ab 6 Hz nahm die Sarkomerverkürzungsamplitude zunächst ab, um danach in eine positive Herzterappe über zu gehen. Dadurch ergab sich für diese Frequenzen eine zweite Zeitkonstante τ_2 .

Die Zeitkonstante τ_1 zeigte in der Frequenzabhängigkeit einen negativen exponentiellen Verlauf. Bei 0,5 Hz verging die meiste Zeit bis zum Erreichen eines Gleichgewichts der Verkürzungsamplitude. Zu hohen Frequenzen hin fiel sie deutlich ab, bis sie sich ab 6 Hz auf einen relativ konstanten Wert einpendelte (Abbildung 3.4).

Die Kurven der Zeitkonstante τ_1 der Gruppen Tyrode und LPS + E5564 sind bei allen Frequenzen relativ identisch und unterscheiden sich bei keiner Frequenz signifikant voneinander. Die Kurve der Gruppe LPS hat insgesamt einen flacheren Verlauf. Die Werte bei 0,5 und 1 Hz unterscheiden sich signifikant von den anderen beiden Gruppen.

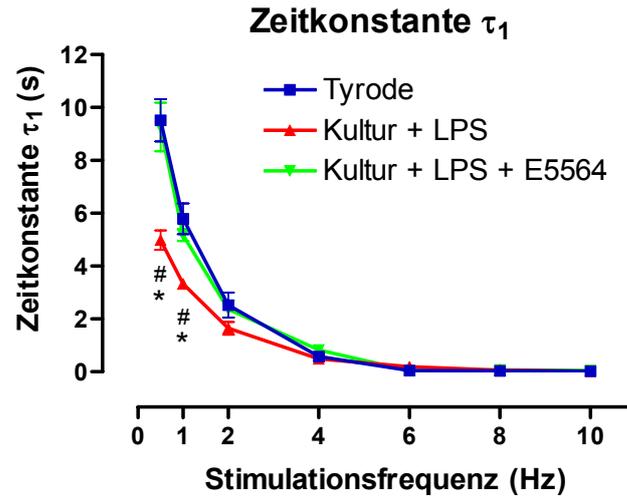


Abbildung 3.4: Frequenzabhängige Darstellung der Zeitkonstante τ_1 isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW \pm SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LPS $p < 0,05$, # Kultur + LPS + E5564 vs. Kultur + LPS $p < 0,05$.

Da es bei den hohen Frequenzen (≥ 6 Hz) bei den Zellen der Gruppe LPS zu keiner positiven Herzterppe kam (siehe 3.3.1), ergaben sich bei dieser Gruppe auch keine Konstante τ_2 . Eine Auswertung dieses Parameters hatte sich somit erübrigt.

3.2.3. Vergleich der Wirkung verschiedener LPS- und E5564-Konzentrationen auf die Sarkomerverkürzungsamplitude

Um die Auswirkung verschiedener LPS-Konzentrationen auf die Sarkomerverkürzung zu zeigen, wurde die Sarkomerverkürzungsamplitude von mit jeweils 10, 5 oder 1 µg/ml LPS stimulierten Zellen und, zur Kontrolle, in Tyrode gelagerte Zellen miteinander verglichen.

In Abbildung 3.5 ist die Sarkomerverkürzungsamplitude in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz aufgetragen. Die Kurve der in Tyrode gelagerten Zellen zeigt einen biphasischen Verlauf mit einem lokalen Minimum bei 2 Hz und lokalen Maxima jeweils bei 0,5 und 8 Hz.

Zwischen den Kurven der LPS-stimulierten Zellen besteht kein signifikanter Unterschied, wobei sie sich signifikant zur Kontrollgruppe (Tyrode) unterscheiden. Bezogen auf die einzelnen Frequenzen zeigte sich dasselbe Ergebnis bei 0,5, 1, 2, und 6 Hz. Bei 4 Hz war ein signifikanter Unterschied zwischen Tyrode und 1 µg/ml LPS, bei 10 Hz zwischen Tyrode und 10 µg/ml LPS.

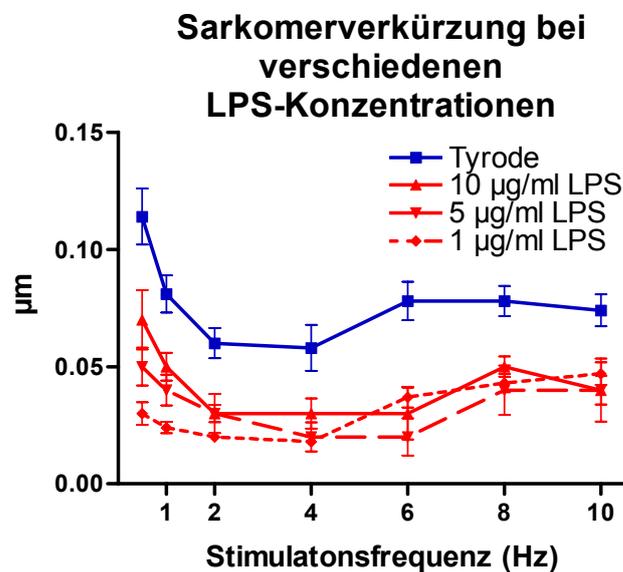


Abbildung 3.5: Frequenzabhängige Darstellung der Sarkomerverkürzungsamplitude isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen unter Kontrollbedingungen und stimuliert mit drei verschiedenen LPS-Konzentrationen, Angaben: MW ± SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

Die verschiedenen LPS-Konzentrationen wurden im Beisein von unterschiedlichen E5564-Konzentrationen angewendet. Abbildung 3.6 zeigt die frequenzabhängige Sarkomerverkürzung von in Tyrode gelagerten Zellen kurz nach der Isolierung sowie kultivierte Zellen, die mit 10 µg/ml LPS stimuliert wurden. Einer Gruppe von kultivierten Zellen wurde zusätzlich 10 µg/ml E5564 zugegeben. Der typische zweiphasige Verlauf ist bei allen drei Gruppen zu erkennen mit dem Minimum bei 2 Hz. Die Maxima liegen bei 0,5 und 8 Hz. Bei 0,5, 1, 4 und 8 Hz bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Bei 2 und 6 Hz unterschieden sich lediglich die in Tyrode gelagerten und die nur mit LPS stimulierten Zellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kultur + LPS und den anderen beiden Gruppen war bei 10 Hz zu erkennen.

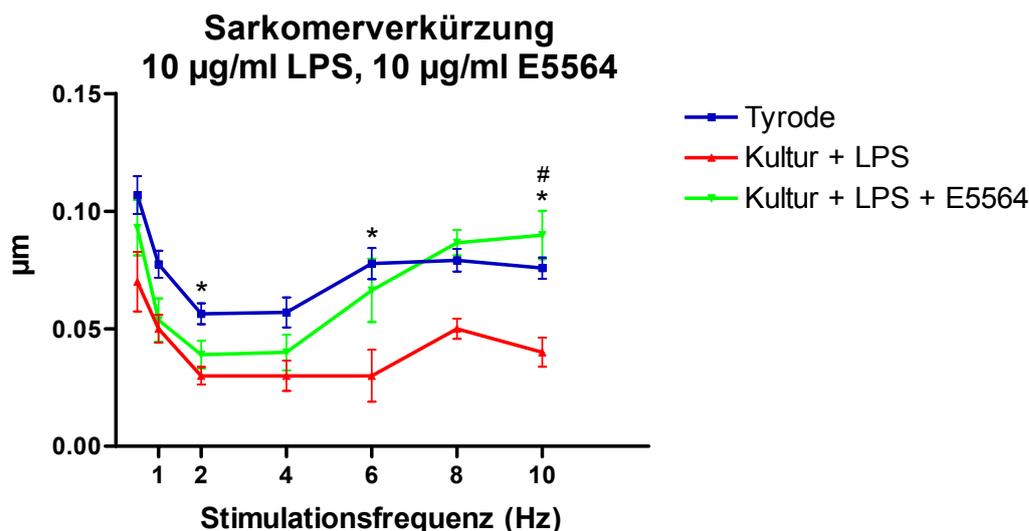


Abbildung 3.6: Frequenzabhängige Darstellung der Sarkomerverkürzungsamplitude isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW ± SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LPS $p < 0,05$, # Kultur + LPS + E5564 vs. Kultur + LPS $p < 0,05$.

Da unter diesen Bedingungen keine vollständige Unterdrückung des LPS Effektes eingetreten war, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Konzentration von LPS auf 5 µg/ml Kulturmedium halbiert und die von E5564 belassen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Hier ist bei 0,5 und 6 Hz ein signifikanter

3. Ergebnisse

Unterschied zwischen Tyrode und Kultur + LPS eingetreten. Bei allen anderen Frequenzen bestand zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied.

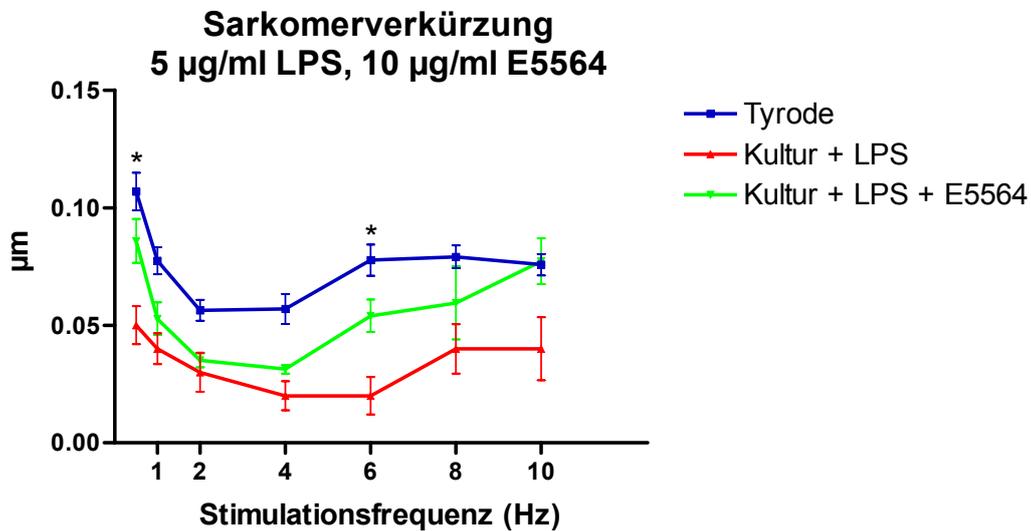


Abbildung 3.7: Frequenzabhängige Darstellung der Sarkomerverkürzungsamplitude isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW ± SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LPS $p < 0,05$

Da auch unter diesen Bedingungen noch keine vollständige Aufhebung der LPS-Wirkung eintrat, wurden weitere Überlegungen vorgenommen. Wie Lynn und Rossignol (2002) gezeigt hatten, weist E5564 eine sehr kurze in vitro Halbwertszeit von unter einer Stunde auf, also viel kürzer als die Zeit der Zellen im Kulturmedium. Deshalb konnte man vermuten, dass LPS nach dem Zerfall von E5564 in der Lage war, wieder an TLR4 zu binden und die Signalkaskade auszulösen und somit die Kardiomyozyten zur Zytokinproduktion zu stimulieren. Aus diesem Grund wurde im nächsten Versuchsprotokoll die Konzentration von LPS auf 1 µg/ml und die von E5564 auf 2 µg/ml gesenkt. Um der kurzen Halbwertszeit von E5564 Rechnung zu tragen, wurde der Stoff zu den Zeitpunkten 2, 4, 6 und 8 Stunden frisch in voller Konzentration nachgegeben.

Die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes sind in Abbildung 3.8 dargestellt. Alle drei Kurven zeigen wieder den zweigipfligen Verlauf mit lokalem Minimum bei 2 Hz bei

Tyrode und Kultur + LPS + E5564. Kultur + LPS zeigt dieses bei 4 Hz. Das vordere Maximum liegt bei allen Gruppen bei 0,5 Hz. Die Gruppe Tyrode zeigt das hintere Maximum bei 6 Hz, die anderen beiden bei 10 Hz. Die Gruppe Kultur + LPS liegt bei allen Frequenzen signifikant niedriger als Tyrode und Kultur + LPS + E5564. Diese beiden Gruppen zeigen hingegen in keiner Frequenz einen signifikanten Unterschied.

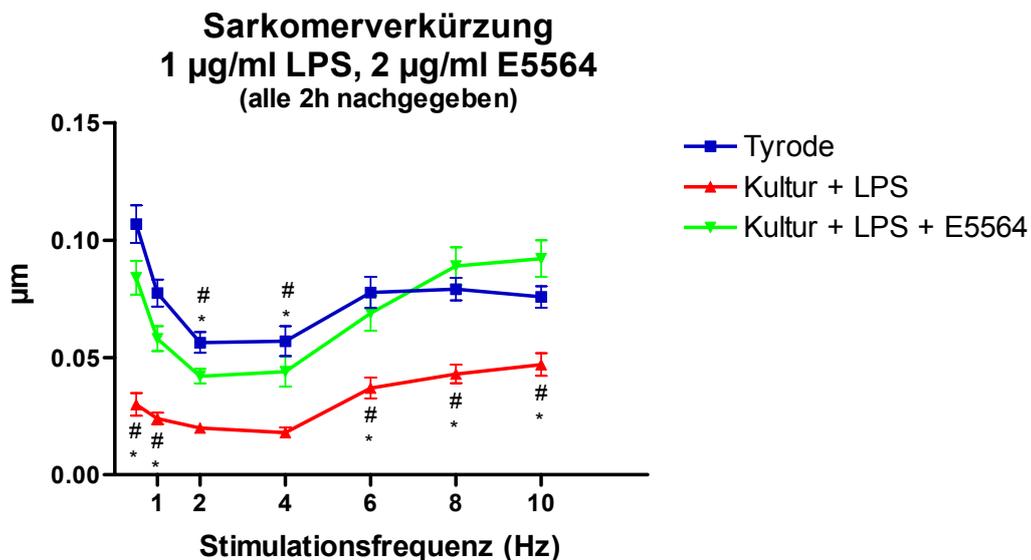


Abbildung 3.8: Frequenzabhängige Darstellung der Sarkomerverkürzungsamplitude isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW ± SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LPS $p < 0,05$, # Kultur + LPS + E5564 vs. Kultur + LPS $p < 0,05$.

In den weiteren Absätzen dieses Abschnitts werden lediglich die Daten der Gruppen Tyrode, Kultur + LPS (1 µg/ml) sowie Kultur + LPS (1 µg/ml) + E5564 (2 µg/ml, alle zwei Stunden frisch nachgegeben) gezeigt. Die Zellen dieser Ergebnisse entsprechen somit denen der in Abbildung 3.8 gezeigten.

3.2.4. Ruhesarkomerlänge

Die Ruhesarkomerlänge wurde direkt mit dem Programm IonWizard berechnet. Bei keiner der untersuchten Gruppen war eine Frequenzabhängigkeit zu erkennen. Jedoch war die Ruhesarkomerlänge der in Kulturmedium inkubierten Zellen bei jeder Frequenz signifikant niedriger als bei den nur in Tyrode gelagerten Zellen. Die Gruppen LPS und LPS + E5564 unterscheiden sich bei allen Frequenzen hingegen nicht signifikant voneinander (Abbildung 3.9).

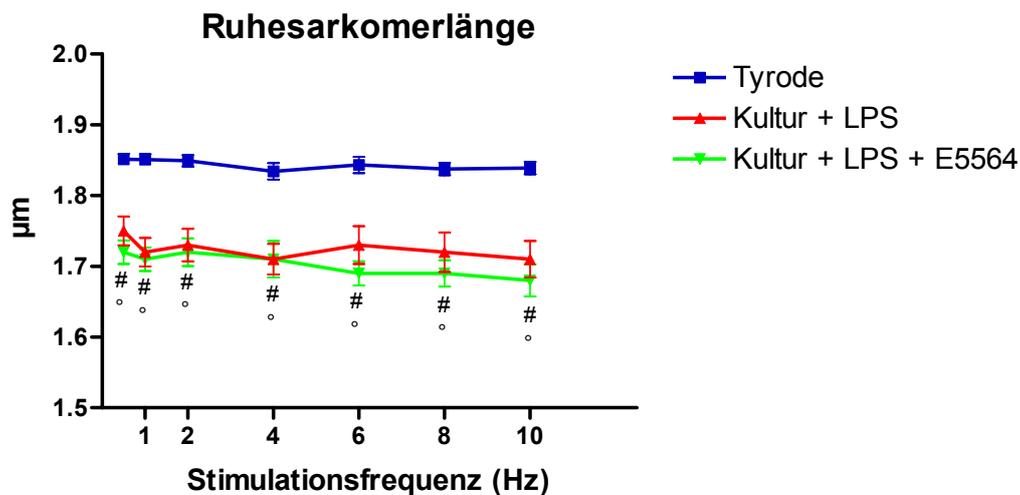


Abbildung 3.9: Frequenzabhängige Darstellung der Ruhesarkomerlänge isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW ± SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post test durchgeführt. # Kultur + LPS + E5564 vs. Kultur + LPS $p < 0,05$, ° Tyrode vs. Kultur + LPS + E5564 $p < 0,05$.

3.2.5. Verkürzungsgeschwindigkeit

Die maximale Steigung des abfallenden Schenkels einer Sarkomerverkürzungszacke gibt die Verkürzungsgeschwindigkeit der Zellen wieder.

Ähnlich der Sarkomerverkürzungsamplitude zeigt die Kurve der Verkürzungsgeschwindigkeit bei der Gruppe Tyrode einen biphasischen Verlauf, der ein lokales Maximum bei 0,5 Hz und eines bei 6 Hz aufweist (Abbildung 3.10). Bei 2 Hz ist sie am kleinsten. Nach Stimulation mit LPS zeigte die Kurve einen ähnlichen, wenn auch deutlich flacheren Verlauf. Das Minimum liegt hier bei 4 Hz und das hintere Maximum ist nach 8 Hz verschoben. Durch die zusätzliche Gabe von E5564 ist der flache Verlauf teilweise aufgehoben, wobei die Maxima bei 0,5 und 8 Hz und das Minimum bei 4 Hz liegen.

Bei 0,5 bis 2 Hz ist die Verkürzungsgeschwindigkeit in allen Gruppen signifikant unterschiedlich voneinander. Bei 4 und 6 Hz unterscheidet sich die Gruppe Tyrode signifikant von den beiden anderen, die zueinander keinen signifikanten Unterschied zeigen. Die Gruppen Tyrode und LPS + E5564 unterscheiden sich bei 8 und 10 Hz signifikant von der Gruppe LPS.

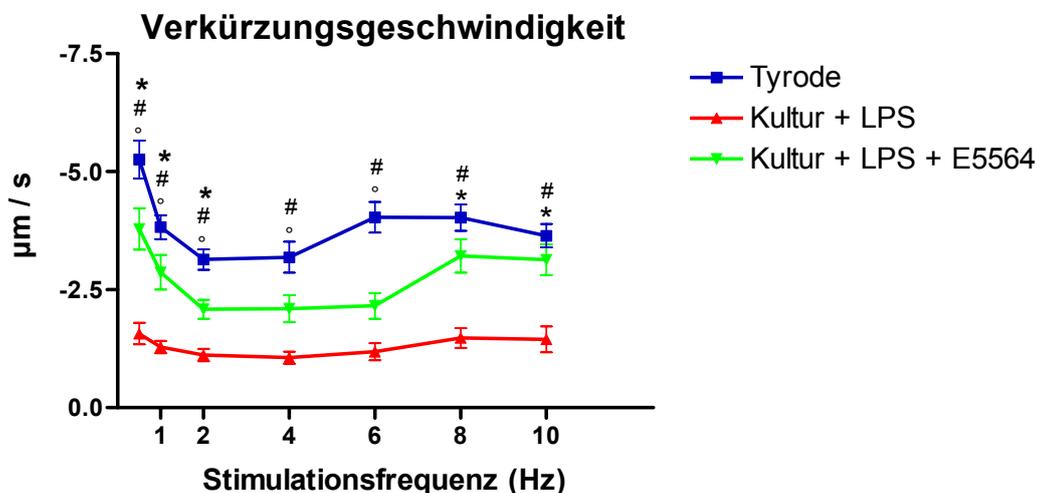


Abbildung 3.10: Frequenzabhängige Darstellung der Verkürzungsgeschwindigkeit isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW ± SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LPS $p < 0,05$, # Kultur + LPS + E5564 vs. Kultur + LPS $p < 0,05$, ° Tyrode vs. Kultur + LPS + E5564 $p < 0,05$.

3.2.6. Relaxationsgeschwindigkeit

Die Relaxationsgeschwindigkeit wurde mit dem IonWizard-Programm aus der maximalen Steigung des aufsteigenden Schenkel der Verkürzungszacken berechnet. Es war auch hier ein biphasischer Verlauf zu erkennen mit Maxima bei 0,5 und 8 – 10 Hz. Das Minimum lag, je nach Gruppe, bei 2 – 4 Hz. Stimulation mit LPS bewirkte einen insgesamt flacheren und von den absoluten Zahlen her niedrigeren Verlauf. Durch gleichzeitige Gabe von E5564 hob sich die Kurve wieder an, wobei die Mittelwerte der Relaxationsgeschwindigkeit über alle Frequenzen niedriger war als bei der Gruppe Tyrode (Abbildung 3.11).

Die kultivierten mit LPS behandelten Zellen zeigten bei allen Frequenzen eine signifikant niedrigere Relaxationsgeschwindigkeit als die Kontrollzellen. Wurde dem LPS E5564 zugesetzt, dann ergab sich bei keiner Stimulationsfrequenz ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den behandelten Zellen. Da die Relaxationsgeschwindigkeit der mit LPS + E5564 behandelten Zellen bei 2, 4 und 6 Hz unter der der Kontrollzellen lag (nicht signifikant), ergab sich hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe Kultur LPS und Gruppe Kultur + LPS + E5564.

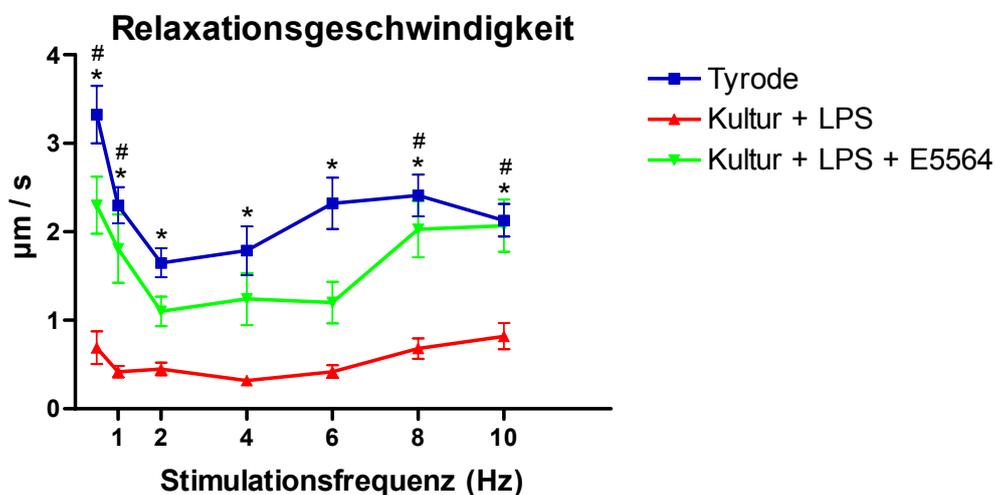


Abbildung 3.11: Frequenzabhängige Darstellung der Relaxationsgeschwindigkeit isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW ± SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LPS $p < 0,05$, # Kultur + LPS + E5564 vs. Kultur + LPS $p < 0,05$

3.2.7. Verkürzungsdauer

Die Verkürzungsdauer wurde aus der Verkürzungszacke berechnet und gibt die Zeit an zwischen Beginn der Verkürzung und dem Zeitpunkt, an dem die Sarkomere sich bis auf 90% der Ruhesarkomerlänge relaxiert haben. Abbildung 3.12 zeigt die Verkürzungsdauer in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz. Es ist zu sehen, dass sie zu hohen Frequenzen hin bei jeder Gruppe abnimmt. Bei der Gruppe Tyrode ist der Verlauf am flachsten, wobei die Verkürzungsdauer bis 2 Hz konstant bei 0,11 s liegt und dann bis 10 Hz auf 0,079 s abfällt. Durch LPS-Stimulation kam es zu einem Anstieg der Verkürzungsdauer, vor allem bei den niedrigen Frequenzen. Durch Zugabe des LPS-Antagonisten E5564 wurde der Effekt teilweise wieder aufgehoben, die Verkürzungsdauer ging bei den niedrigen Frequenzen deutlich zurück, wobei sie immer noch über der der Gruppe Tyrode lag. Zu größeren Frequenzen hin näherten sich die Verläufe immer mehr an.

Bei 0,5, 1 und 4 Hz ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Tyrode und LPS sowie zwischen LPS und LPS + E5564. Bei 2 Hz unterschieden sich alle Gruppen signifikant voneinander, bei 6 und 10 Hz zeigte sich ein signifikanter Unterschied nur zwischen Tyrode und LPS.

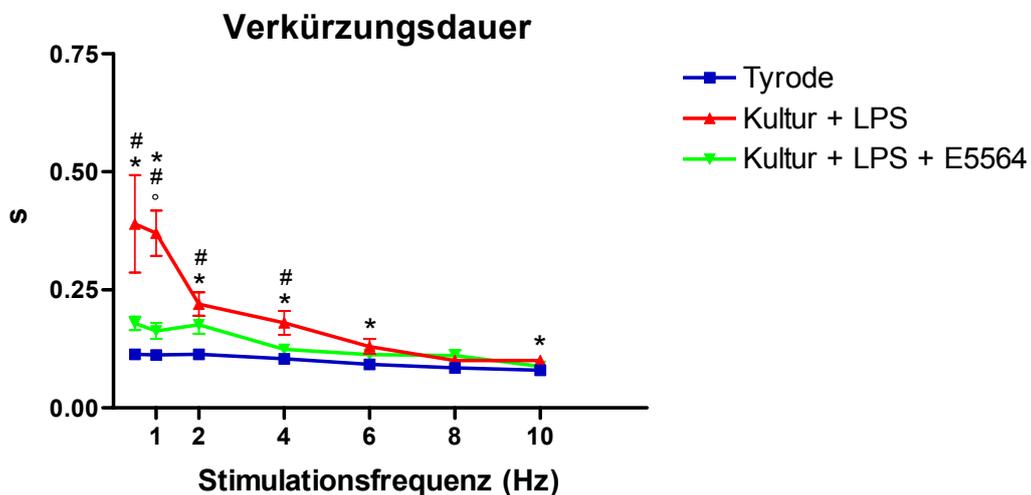


Abbildung 3.12: Frequenzabhängige Darstellung der Verkürzungsdauer isolierter Kardiomyozyten von C3H/HeN Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW \pm SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LPS $p < 0,05$, # Kultur + LPS + E5564 vs. Kultur + LPS $p < 0,05$, ° Tyrode vs. Kultur + LPS + E5564 $p < 0,05$.

3.3. Simultane Aufzeichnung von Kalziumtransiente und Sarkomerverkürzungen isolierter, ventrikulärer Kardiomyozyten nach Stimulation mit LPS

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der simultanen Messung der Sarkomerverkürzung und der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) unter LPS-Einfluss und unter Kontrollbedingungen dargestellt. Für die Experimente wurden weibliche C57BL/6 (Wildtyp, WT) sowie TLR4-defiziente (TLR4^{-/-}) Mäuse im Alter von 12-15 Wochen verwendet. Es gingen Daten von insgesamt 18 Tieren in die Auswertung mit ein.

Die absoluten Zahlenwerte der Daten dieses Abschnitts sind im Anhang angegeben.

3.3.1. Originalregistrierungen

Die Originalregistrierungen dieser Versuchsreihe zeigen die Sarkomerverkürzung nach den ersten zwanzig externen Stimulationen bei 4 Hz. Gleichzeitig wurde die $[Ca^{2+}]_i$ aufgenommen, die als Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 340 und 380 nm Anregungslicht dargestellt wird.

Für die Darstellung der Datenspuren der $[Ca^{2+}]_i$ wurden sie mittels Sawitzky-Golay-Filter geglättet. Des Weiteren wurden die in 2.2.6.2 erwähnten, softwarebedingten Artefakte herausgerechnet. Da es sich jeweils um einzelne, extrem nach oben oder unten abweichende Punkte handelte, konnten diese leicht erkannt werden. Diese Punkte wurden entfernt und die entstandenen leeren Zwischenräume interpoliert.

Die erste Sarkomerverkürzung (post-rest Verkürzung), die stets die größte und breiteste war, war bei dieser Studie nicht von einer größeren Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ begleitet. Diese waren zwar bei allen Gruppen breiter als die darauf folgenden, die Amplitude war jedoch nicht signifikant höher. Eine Herzterppe des Verlaufes der $[Ca^{2+}]_i$ konnte nur bei einzelnen Zellen angedeutet beobachtet werden.

Bereits an den Originalregistrierungen ist deutlich zu sehen, dass die Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ bei kultivierten Zellen niedriger ist als bei in Tyrode gelagerten.

3. Ergebnisse

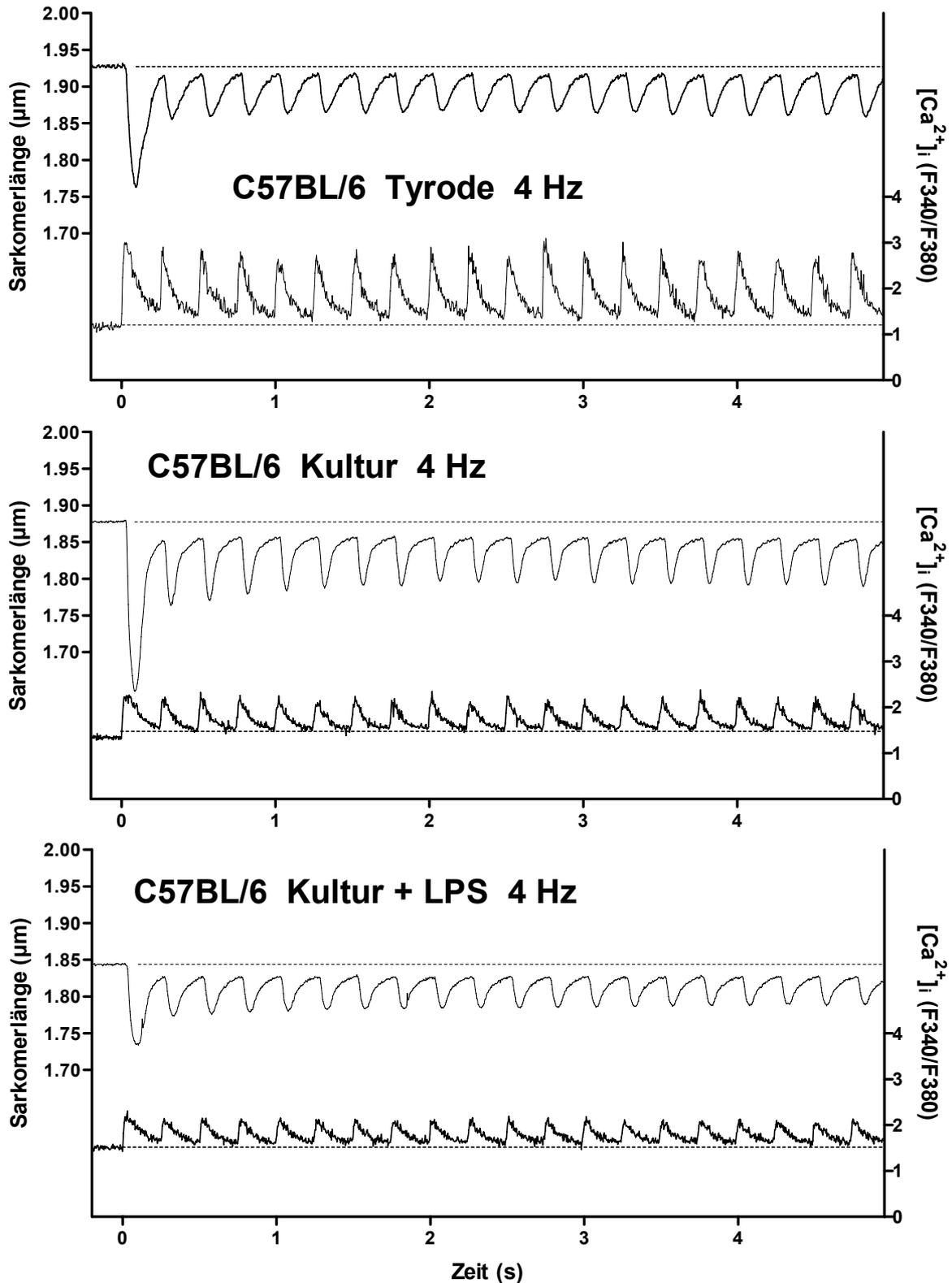


Abbildung 3.13: Originalregistrierungen der Sarkomerlänge und der simultan aufgenommenen $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen während der ersten 20 externen Stimulationen mit 30 V für 1,2 ms bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz und unterschiedlichen Vorbehandlungen. Die Datenspuren von 8 – 10 Zellen wurden zeitlich normiert und gemittelt.

3. Ergebnisse

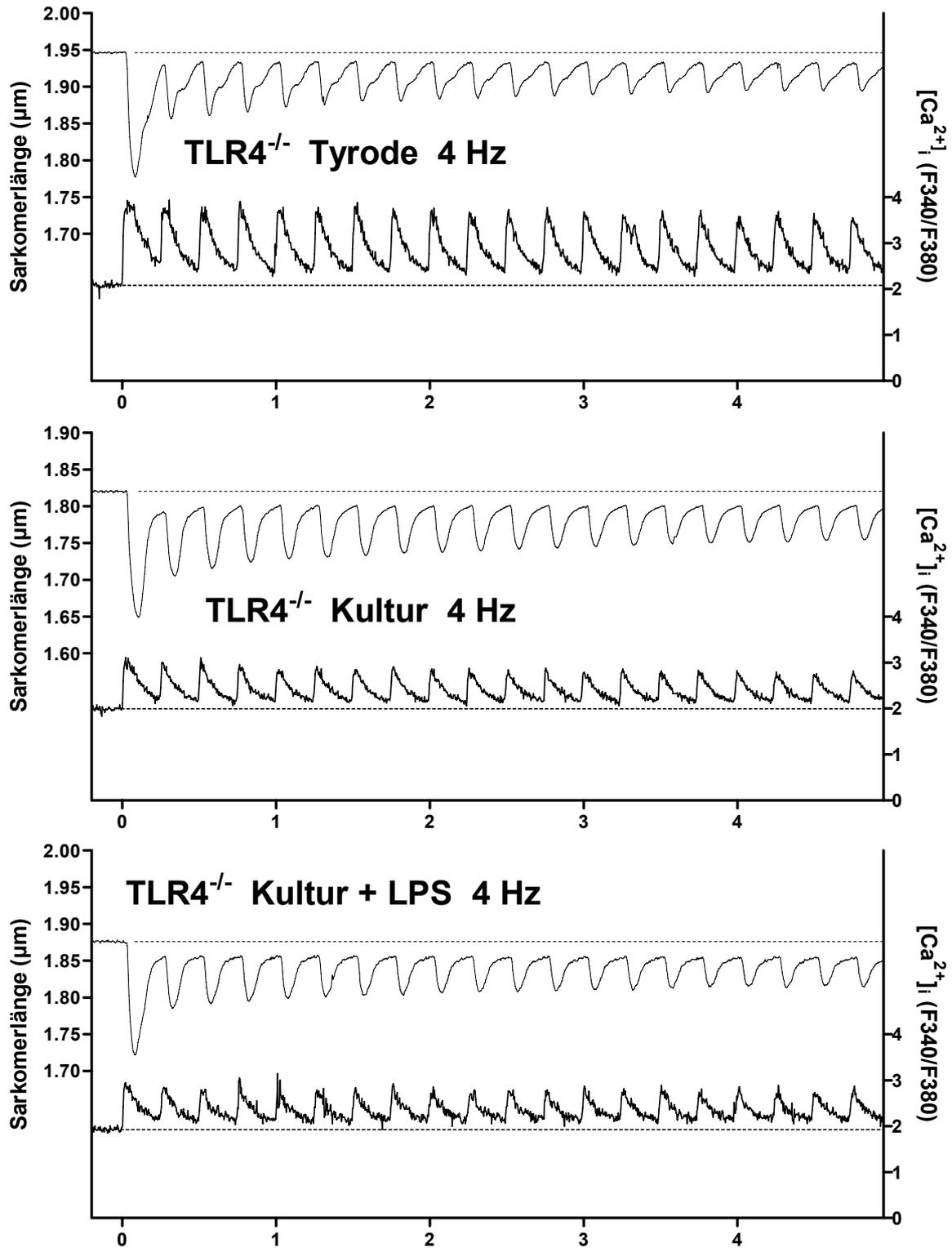


Abbildung 3.14: Originalregistrierungen der Sarkomerlänge und der simultan aufgenommenen $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit von der Zeit isolierter Kardiomyozyten von TLR4^{-/-} Mäusen während der ersten 20 externen Stimulationen mit 30 V für 1,2 ms bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz und unterschiedlichen Vorbehandlungen. Die Datenspuren von 8 – 10 Zellen wurden zeitlich normiert und gemittelt.

Einen zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Sarkomerverkürzung und der $[Ca^{2+}]_i$ am Beispiel einer in Tyrode gelagerten Zelle einer C57BL/6 Maus zeigt Abbildung 3.15. Es ist zu erkennen, dass die Kurven der Sarkomerverkürzung und der $[Ca^{2+}]_i$ zeitlich versetzt zueinander verlaufen. Erst bei Erreichen der maximalen $[Ca^{2+}]_i$ beginnen die Sarkomere, sich zu verkürzen. Zum Zeitpunkt der minimalen Sarkomerlänge ist die $[Ca^{2+}]_i$ bereits wieder bis auf ca. 130 % der Ruhekonzentration abgefallen.

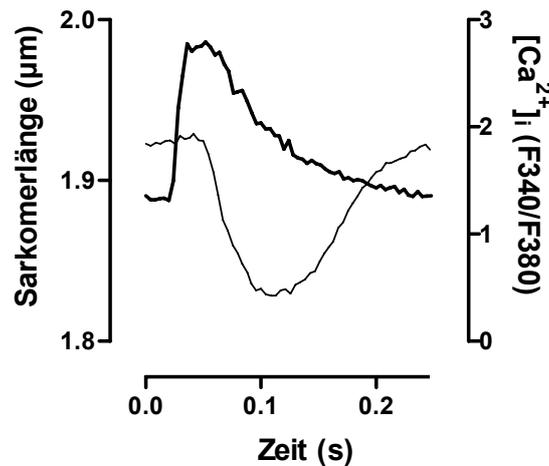


Abbildung 3.15: Zeitlicher Zusammenhang zwischen der $[Ca^{2+}]_i$ und der Sarkomerverkürzung am Beispiel einer in Tyrode gelagerten Zelle einer WT Maus. Fünf Kontraktionen wurden zusammengefasst und gemittelt. Die fett gezeichnete Spur entspricht dem Verlauf der $[Ca^{2+}]_i$.

3.3.2. Ruhesarkomerlänge und Ruhekalziumkonzentration

Die Ruhesarkomerlänge wurde direkt mit dem Programm IonWizard bestimmt und repräsentiert die Sarkomerlänge vor Beginn der Verkürzung.

Abbildung 3.16 zeigt die Ruhesarkomerlänge isolierter Kardiomyozyten von C57BL/6 Mäusen nach verschiedenen Vorbehandlungen. Die Ergebnisse zeigen einen signifikanten Unterschied in der Ruhesarkomerlänge zwischen den Gruppen der kultivierten Zellen und denen der Gruppe Tyrode. Innerhalb der Gruppen mit kultivierten Zellen bestanden keine signifikanten Unterschiede. Ähnliche Zusammenhänge bestanden bei Kardiomyozyten von TLR4-defizienten Mäusen,

denn auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe Tyrode und den Gruppen mit in Kulturmedium inkubierten Zellen (Abbildung 3.17).

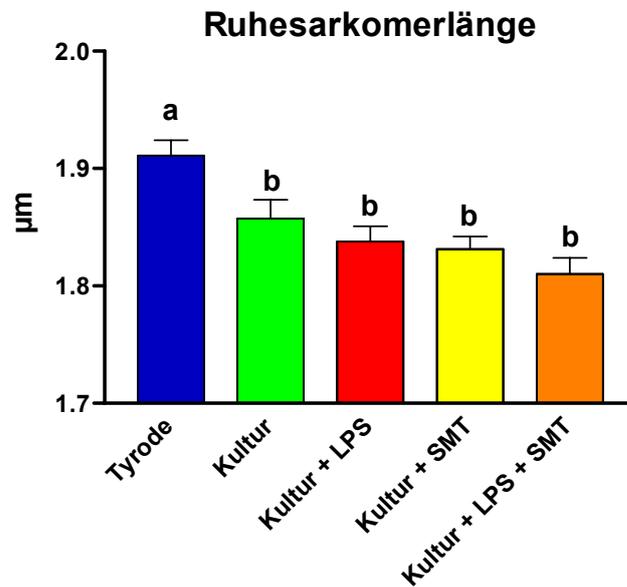


Abbildung 3.16: Ruhesarkomerlänge isolierter Kardiomyozyten von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW ± SEM

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen 5 Gruppen wurde mit einfaktorierter Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

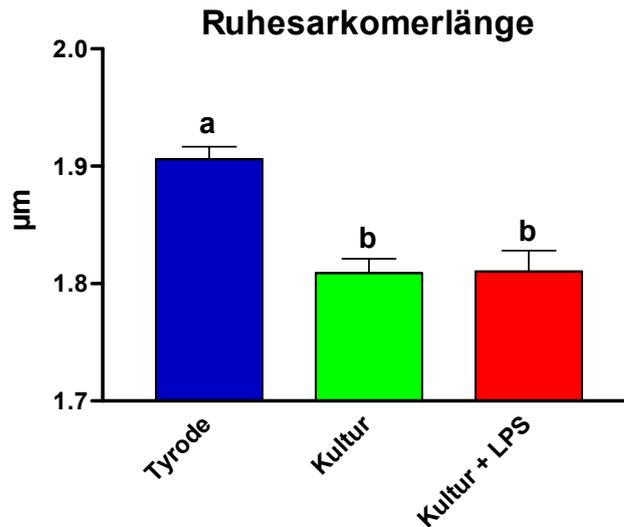


Abbildung 3.17: Ruhesarkomerlänge isolierter Kardiomyozyten von $TLR4^{-/-}$ Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: $MW \pm SEM$

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen 3 Gruppen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

Simultan zur Ruhesarkomerlänge wurde die Ruhekalziumkonzentration bestimmt. Diese wurde als Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 340 und 380 nm angegeben und stellt somit ein indirektes Maß für die $[Ca^{2+}]_i$ in Ruhe dar. Aufgrund technischer Probleme in der Zeit der Erstellung der Daten dieses Abschnittes musste die Grundkonfiguration der Software für die Erfassung der $[Ca^{2+}]_i$ geändert werden. Das hatte zur Folge, dass sich der Bereich zwischen der Ratio F340/F380 für Ca^{2+} -freies und Ca^{2+} -gesättigtes Fura-2 verschoben hatte. Dies hatte Auswirkungen auf verschiedene Parameter, die zu diesen Experimenten ausgewertet wurden. Dazu gehörten neben der Ruhekalziumkonzentration auch das Maximum der $[Ca^{2+}]_i$ nach einer Stimulation sowie die Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$, die in starkem Maße abhängig sind von der eingestellten Spanne in der Ratio zwischen Ca^{2+} -freiem und Ca^{2+} -gesättigtem Fura-2. Um für diese Parameter dennoch vergleichbare Werte zu erhalten, wurden die Werte normiert, indem sie durch die Ruhekalziumkonzentration (F_0) derselben Zelle geteilt wurden. Die entstandene neue Einheit ist F/F_0 . Auch die Werte für die $TLR4^{-/-}$ Tiere wurden normiert, damit sie mit denen der WT vergleichbar sind.

Abbildung 3.18 zeigt die Ruhekalziumkonzentration isolierter Kardiomyozyten von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen. Alle ausgefüllten Balken

3. Ergebnisse

beziehen sich auf die Softwareeinstellungen vor der Änderung, die karierten auf die nach der Änderung. Sowohl Tyrode 1 zu Tyrode 2 als auch Kultur + LPS 1 zu Kultur zu LPS 2 waren zeigten signifikante Unterschiede. Tyrode 2 und Kultur + LPS 2 sind signifikant höher als alle anderen Gruppen.

In der ersten Einstellung unterscheiden sich die Gruppen untereinander nicht signifikant. Bei der zweiten Einstellung unterschieden sich Kultur + SMT und Kultur + LPS + SMT im Vergleich zu Tyrode 2 und Kultur + LPS 2.

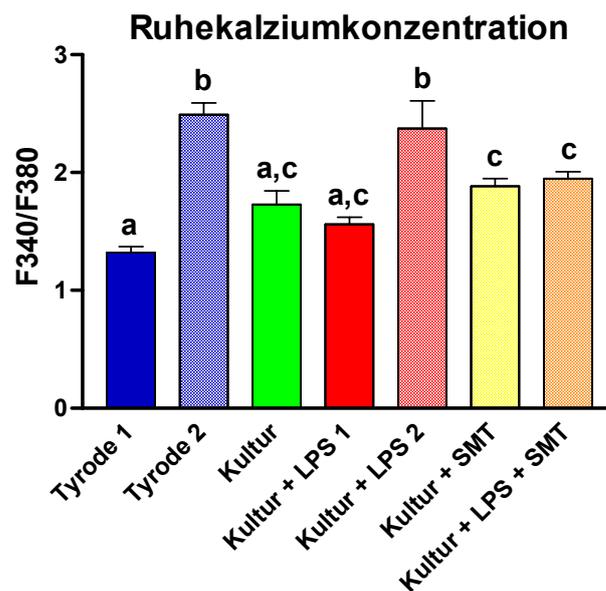


Abbildung 3.18: Ruhekalziumkonzentration isolierter Kardiomyozyten von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW ± SEM

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

Die verschiedenen Gruppen der TLR4^{-/-} Tiere zeigten in Bezug auf die Ruhekalziumkonzentration keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 3.19).

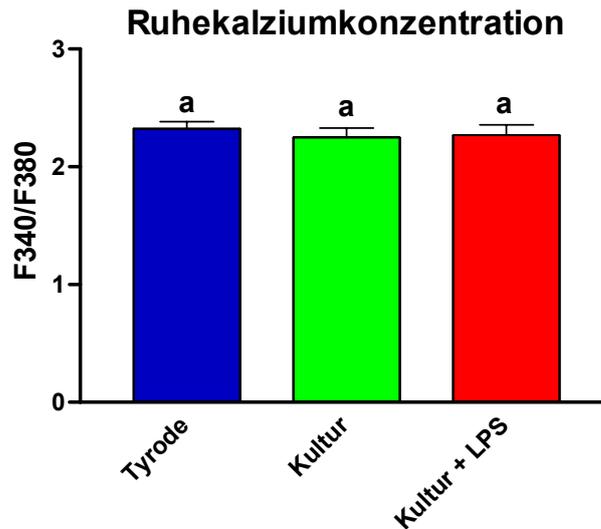


Abbildung 3.19: Ruhekalziumkonzentration isolierter Kardiomyozyten von TLR4^{-/-} Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

3.3.3. Sarkomerverkürzungsamplitude und Amplitude der relativen $[Ca^{2+}]_i$

Abbildung 3.20 zeigt die Sarkomerverkürzungsamplitude bei 4 Hz von isolierten Kardiomyozyten von C57BL/6 Mäusen unter den untersuchten Bedingungen. Die alleinige Zugabe vom SMT wirkte sich im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht signifikant auf die Amplitude aus. Durch Stimulation mit LPS kam es zu einer signifikanten Erniedrigung der Amplitude. Der Zusatz von SMT zu mit LPS stimulierten Zellen hob diesen Effekt wieder auf, sodass sich die Verkürzung dieser Zellen nicht signifikant zur Kontrolle unterschied.

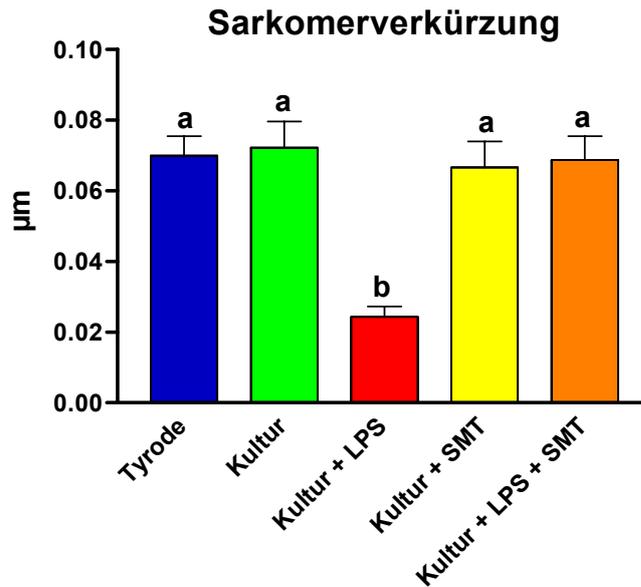


Abbildung 3.20: Sarkomerverkürzungsamplitude isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

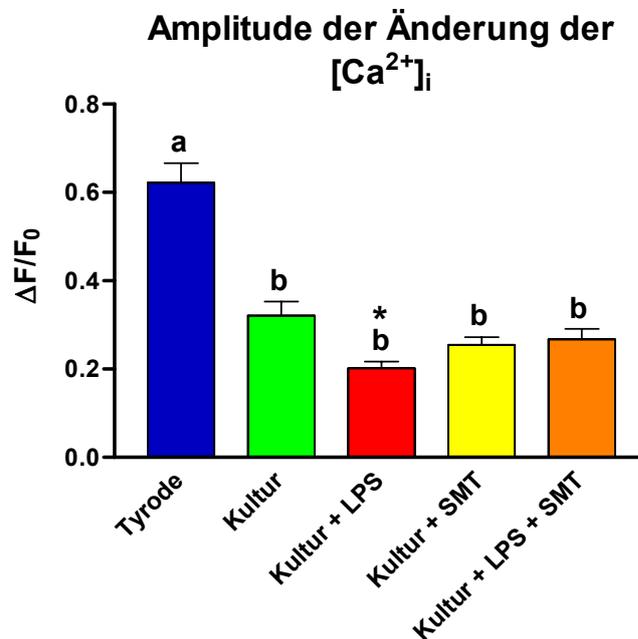


Abbildung 3.21: Normierte Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). * bedeutet, dass bei der statistischen Auswertung der relevanten Gruppen (Kultur, Kultur + LPS, Kultur + LPS + SMT) ein signifikanter Unterschied vorliegt. One-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test.

Vergleicht man die simultan mit den Verkürzungen gemessenen $[Ca^{2+}]_i$ -Amplituden mit den Verkürzungsamplituden, dann ergeben sich offensichtliche Unterschiede (Abbildung 3.21). Die höchsten $[Ca^{2+}]_i$ -Amplituden entwickelten die frisch isolierten Zellen, die nur in Tyrode gehalten worden waren. Die kultivierten Zellen hatten generell niedrigere $[Ca^{2+}]_i$ -Transienten, die sich in den verschiedenen Behandlungsgruppen nicht voneinander unterscheiden. Bei einer separaten Auswertung der für die Fragestellung relevanten Gruppen Kultur, Kultur + LPS und Kultur + LPS + SMT ergibt sich eine signifikant erniedrigte $[Ca^{2+}]_i$ -Amplitude in der Gruppe Kultur + LPS. Vergleicht man die Zellen aus der Tyrode Gruppe mit den kultivierten Zellen (Gruppe Kultur), dann sieht man, dass in der Tyrode Gruppe eine größere $[Ca^{2+}]_i$ -Transiente für die gleiche Sarkomerverkürzung erforderlich ist als in den kultivierten Zellen. Beim Vergleich der kultivierten Zellen mit und ohne LPS zeigt sich, dass unter LPS eine unveränderte $[Ca^{2+}]_i$ -Amplitude eine signifikant niedrigere Verkürzungsamplitude (um ca. 66%) auslöst.

Bei $TLR4^{-/-}$ Tieren trat bezüglich der Sarkomerverkürzung kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen auf (Abbildung 3.22). Allerdings waren die Amplituden bereits unter Kontrollbedingungen niedriger als bei Kardiomyozyten aus C57BL/6 Mäusen. Bei den $[Ca^{2+}]_i$ -Amplituden der Zellen $TLR4$ -defizienter Tiere zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den Wildtyp-Tieren, wo es bei kultivierten Zellen im Vergleich zu in Tyrode gelagerten Zellen zu einer signifikanten Erniedrigung der Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ kam (Abbildung 3.23). Zwischen den Zellen der kultivierten Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Somit ist erkennbar, dass die erniedrigte Sarkomerverkürzungsamplitude unter LPS-Einfluss von einer nicht erniedrigten Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ begleitet war. Bei Betrachtung der für die Fragestellung maßgeblichen Gruppen Kultur, Kultur+LPS und Kultur+LPS+SMT zeigte sich jedoch, dass die $[Ca^{2+}]_i$ -Amplitude der Zellen der Gruppe Kultur+LPS in einer ANOVA signifikant niedriger war als bei den anderen Gruppen.

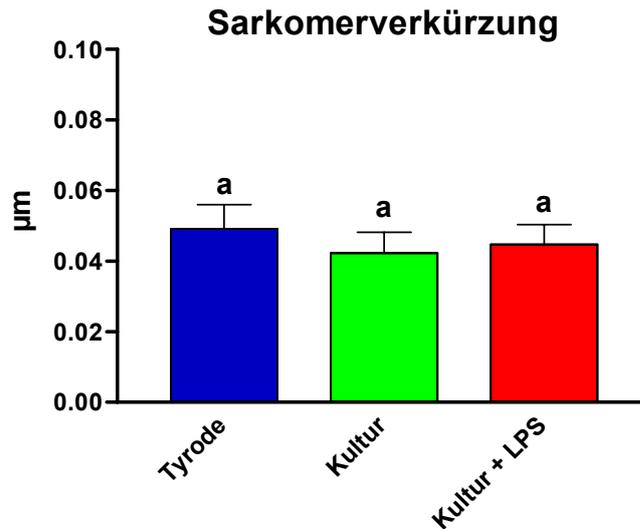


Abbildung 3.22: Sarkomerverkürzungsamplitude isolierter Kardiomyozyten von TLR4-defizienten Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

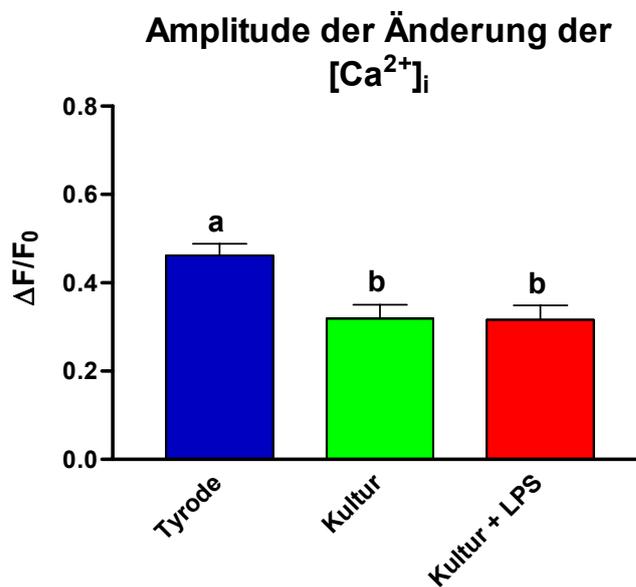


Abbildung 3.23: Normierte Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von TLR4-defizienten Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

3.3.4. Maxima der $[Ca^{2+}]_i$ während einer Verkürzung

Der maximale Wert der $[Ca^{2+}]_i$ nach einer Stimulation wurde direkt mit dem Programm IonWizard bestimmt. Aber aufgrund der unter 3.4.2 erwähnten Unterschiede der Grundeinstellung der Aufnahmesoftware für die $[Ca^{2+}]_i$ wurden die Maxima der $[Ca^{2+}]_i$ durch Division durch die Ruhekonzentration normiert, sodass die Einheit F/F_0 lautet. Die Gruppen Tyrode 1 und Tyrode 2 sowie Kultur + LPS 1 und Kultur + LPS 2 wurden jeweils zusammengefasst.

Bei WT Tieren ist das Maximum der $[Ca^{2+}]_i$ in der Gruppe Tyrode signifikant höher als bei den übrigen Gruppen (Abbildung 3.24). Zwischen den Gruppen Kultur und Kultur + LPS besteht ebenfalls ein signifikanter Unterschied. Abbildung 3.25 zeigt diesen Parameter bei $TLR4^{-/-}$ Mäusen. Hier trat ein signifikanter Unterschied zwischen kultivierten und in Tyrode gelagerten Zellen auf.

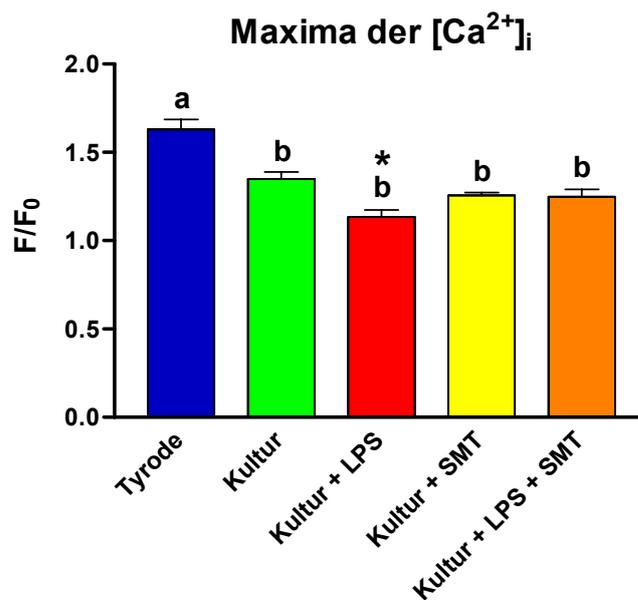


Abbildung 3.24: Normierte Maxima der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW \pm SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). * bedeutet, dass bei der statistischen Auswertung der relevanten Gruppen (Kultur, Kultur + LPS, Kultur + LPS + SMT) ein signifikanter Unterschied vorliegt. One-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test.

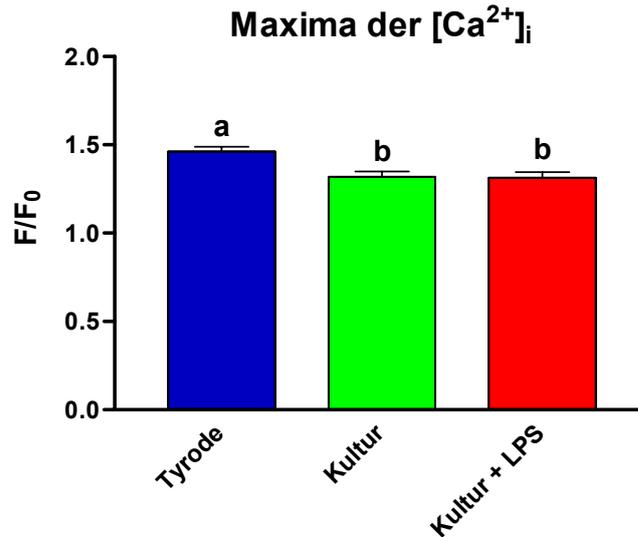


Abbildung 3.25: Normierte Maxima der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von TLR4-defizienten Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW \pm SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

3.3.5. Geschwindigkeiten der Sarkomerverkürzung und der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$

Die Verkürzungsgeschwindigkeit wird als die maximale Steigung des abfallenden Schenkels der Verkürzungszacke berechnet.

Abbildung 3.26 zeigt die Verkürzungsgeschwindigkeit von ventrikulären Kardiomyozyten, die aus C57BL/6 Mäusen isoliert worden waren, bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz. Die Zugabe des iNOS-Blockers SMT zu Kontrollzellen bewirkte keine signifikante Veränderung. Durch Stimulation mit LPS kam es zu einer signifikanten Erniedrigung der Geschwindigkeit im Vergleich zu den Kontrollzellen. Durch Addition von SMT zu LPS-stimulierten Zellen wurde der Effekt von LPS signifikant wieder aufgehoben.

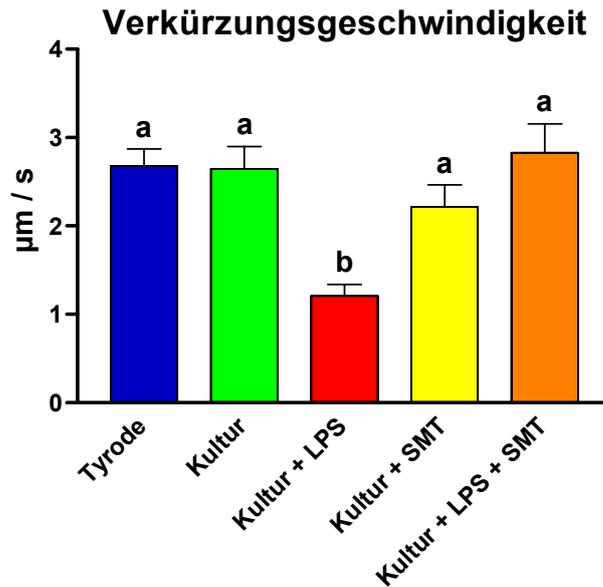


Abbildung 3.26: Verkürzungsgeschwindigkeit isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

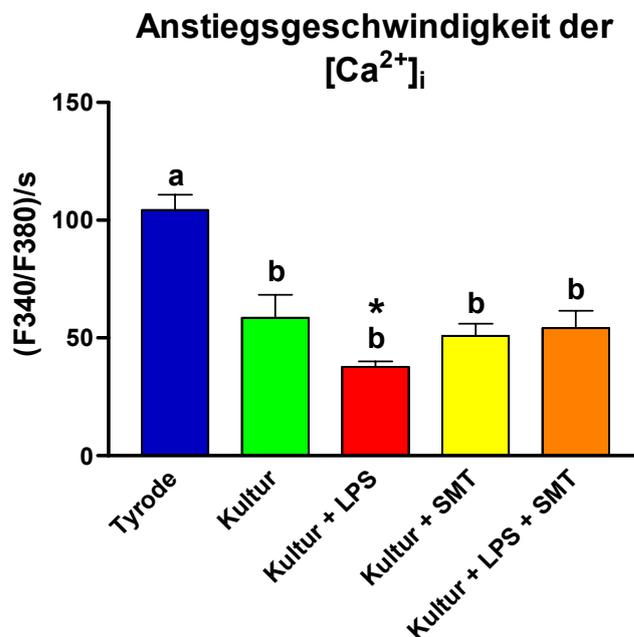


Abbildung 3.27: Anstiegsgeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). * bedeutet, dass bei der statistischen Auswertung der relevanten Gruppen (Kultur, Kultur + LPS, Kultur + LPS + SMT) ein signifikanter Unterschied vorliegt. One-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test.

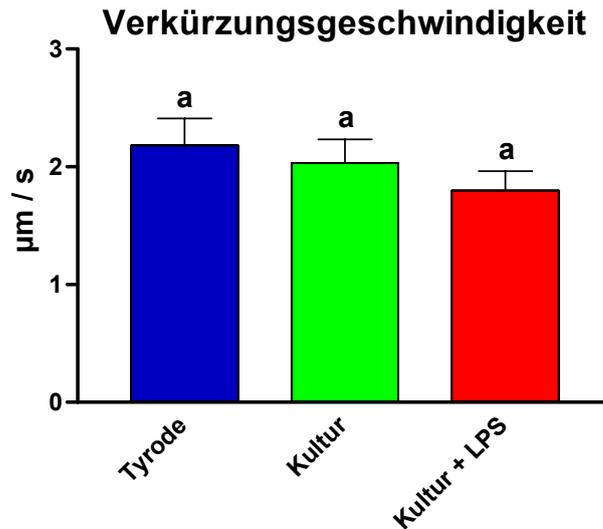


Abbildung 3.28: Verkürzungsgeschwindigkeit isolierter Kardiomyozyten von TLR4-defizienten Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

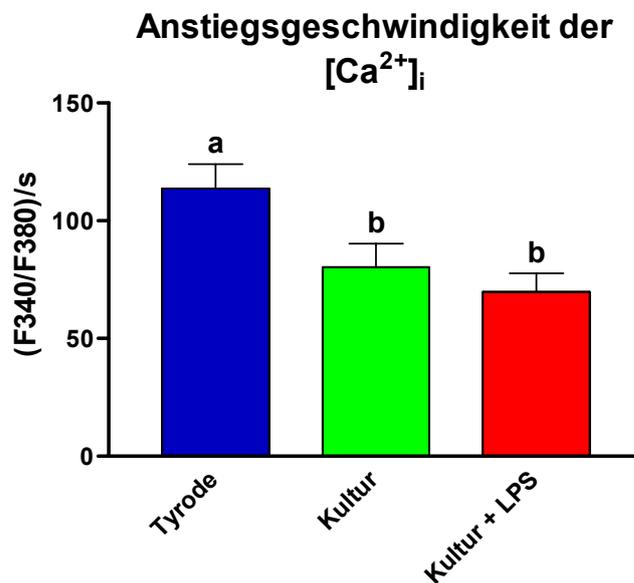


Abbildung 3.29: Anstiegsgeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von TLR4^{-/-} Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

Die Anstiegsgeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ bei WT Tieren war innerhalb der in Kulturmedium inkubierten Zellen nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 3.27).

Die Gruppe Tyrode unterschied sich gegenüber den anderen Gruppen signifikant und war um ca. 100 % erhöht. Auch bei der Anstiegsgeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ zeigte ein statistischer Vergleich allein der Gruppen Kultur, Kultur + LPS, Kultur + LPS+SMT mittels einfaktorieller ANOVA und Newman-Keuls post hoc Test, dass die Zugabe von LPS dazu führt, dass die $[Ca^{2+}]_i$ nach einem Reiz mit geringerer Geschwindigkeit ansteigt.

Bezüglich der Sarkomerverkürzung trat bei TLR4^{-/-} Tieren kein Unterschied zwischen den Gruppen auf (Abbildung 3.28). Die Ergebnisse der $[Ca^{2+}]_i$ waren bei TLR4 defizienten Mäusen ähnlich. Auch hier war die Anstiegsgeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ bei kultivierten Zellen signifikant niedriger als bei den in Tyrode gelagerten Zellen (Abbildung 3.29). Die Zellen der Gruppen Kultur und Kultur + LPS unterschieden sich nicht signifikant.

Die maximale Steigung des aufsteigenden Schenkels der Verkürzungszacke wurde als Relaxationsgeschwindigkeit mit dem Programm IonWizard errechnet.

Wie bei der Verkürzungsgeschwindigkeit kam es bei WT Tieren auch hier einzig zu bei der Gruppe Kultur + LPS zu einer signifikanten Verringerung (Abbildung 3.30). Diese konnte durch Zusatz von SMT wieder aufgehoben werden. Bezüglich der Abnahmegeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ traten zwischen den Gruppen mit kultivierten Zellen von C57BL/6 Tieren keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 3.31). Betrachtet man allerdings nur die Gruppen Kultur, Kultur + LPS und Kultur + LPS + SMT, zeigen die Zellen der Gruppe Kultur + LPS eine signifikant erniedrigte Abnahmegeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$. Bei TLR4^{-/-} Tieren traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf, weder bezüglich der Relaxationsgeschwindigkeit noch bezüglich der Abnahme der $[Ca^{2+}]_i$ (Abbildung 3.32 und Abbildung 3.33).

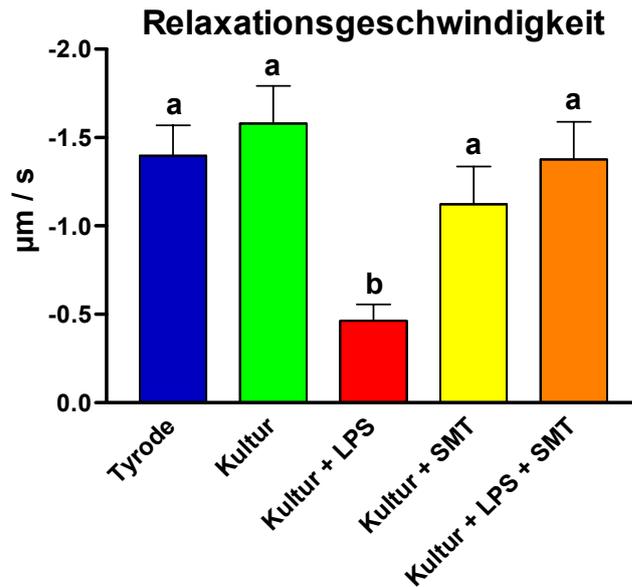


Abbildung 3.30: Relaxationsgeschwindigkeit isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

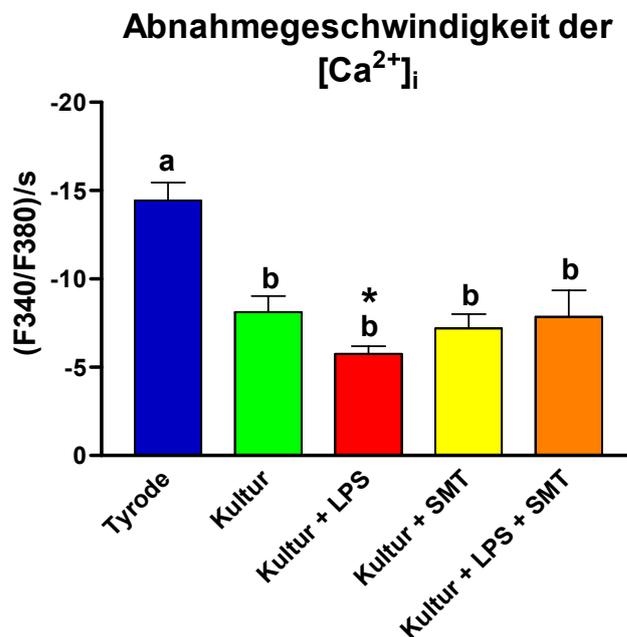


Abbildung 3.31: Abnahmegeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). * bedeutet, dass bei der statistischen Auswertung der relevanten Gruppen (Kultur, Kultur + LPS, Kultur + LPS + SMT) ein signifikanter Unterschied vorliegt. One-way ANOVA und Newman-Keuls post test.

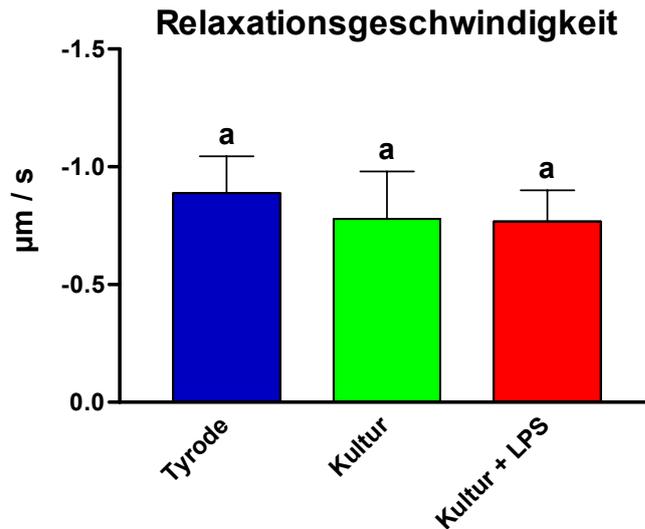


Abbildung 3.32: Relaxationsgeschwindigkeit isolierter Kardiomyozyten von $TLR4^{-/-}$ Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW \pm SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

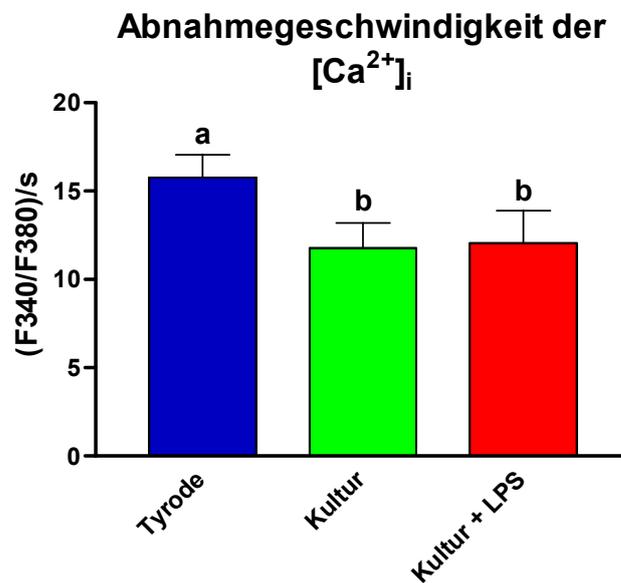


Abbildung 3.33: Abnahmegeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von $TLR4^{-/-}$ Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW \pm SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

3.3.6. Dauer der Sarkomerverkürzung und der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$

Die Dauer der Sarkomerverkürzung ist die Zeit vom Beginn der Verkürzung bis zum Wiedererreichen eines Niveaus, das 90 % der Ruhesarkomerlänge entspricht. In Abbildung 3.34 wird die Verkürzungsdauer von WT Tieren bei einer Stimulationsfrequenz von 4 Hz gezeigt. Zwischen keiner der untersuchten Gruppen traten signifikante Unterschiede auf. Ebenso unterschieden sich die Gruppen bei TLR4-defizienten Tieren nicht signifikant (Abbildung 3.36).

Die Dauer der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ wurde mit dem Programm IonWizard berechnet als die Zeit vom Beginn des Anstiegs der intrazellulären Kalziumkonzentration bis zum Wiedererreichen von 110 % der Ruhekalziumkonzentration. Auch hier kam es weder bei C57BL/6 noch bei TLR4^{-/-} Tieren zu signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen (Abbildung 3.35 und Abbildung 3.37).

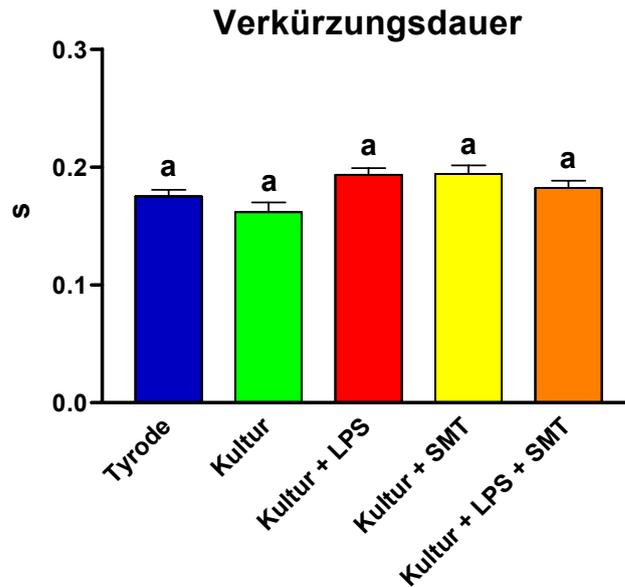


Abbildung 3.34: Verkürzungsdauer isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

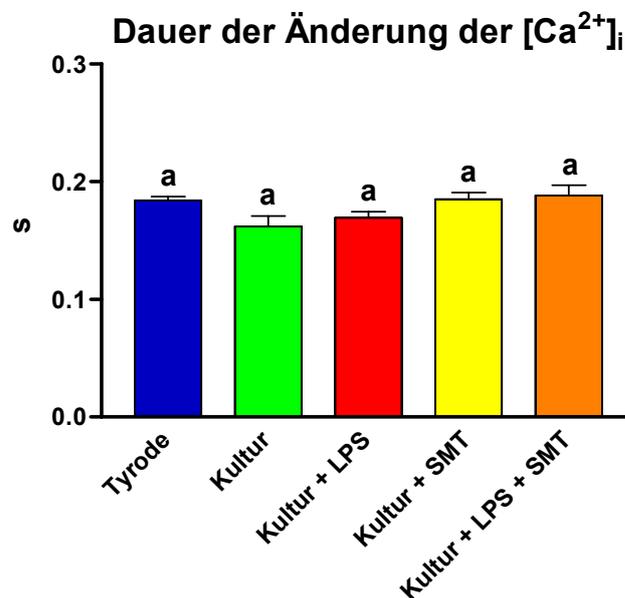


Abbildung 3.35: Dauer der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: MW ± SEM.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

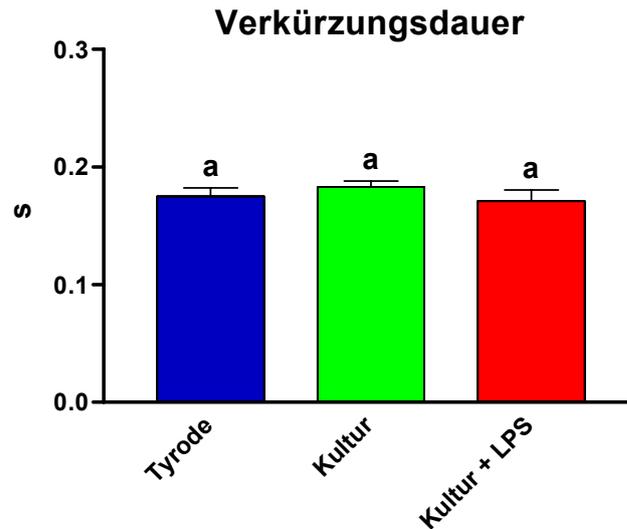


Abbildung 3.36: Verkürzungsdauer isolierter Kardiomyozyten von $TLR4^{-/-}$ Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: $MW \pm SEM$.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

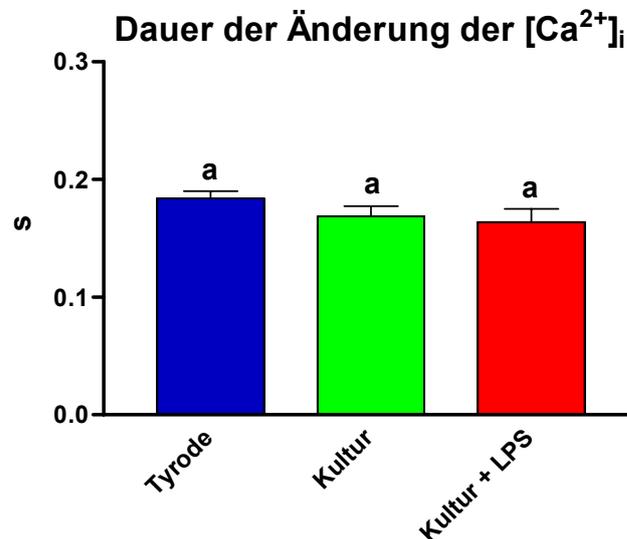


Abbildung 3.37: Dauer der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von $TLR4^{-/-}$ Mäusen unter verschiedenen Bedingungen im Gleichgewicht bei 4 Hz, Angaben: $MW \pm SEM$.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

3.3.7. Bildung von Verhältnissen

Um einen besseren Überblick über die Aussage der Daten dieses Abschnittes zu bieten, wurden verschiedene Quotienten aus bestimmten ausgewerteten Parametern gebildet, die hier dargestellt sind. Ziel der Bildung dieser Quotienten war es, Aussagen über die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente treffen zu können.

Abbildung 3.38 zeigt den Quotienten aus der Sarkomerverkürzungsamplitude und der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von WT Tieren. Die Stimulation mit LPS bewirkte, dass es zu einer signifikant niedrigeren Verkürzung pro Einheit $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Zellen kam, d.h. dass die Zellen sich pro verfügbarem intrazellulärem Kalzium weniger verkürzen. Die Zugabe des iNOS-Blockers SMT hob diesen Effekt wieder auf, sodass es hier auch zu keinem signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle kam. Die alleinige Zugabe von SMT bewirkte keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle. Bei TLR4^{-/-} Tieren traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abbildung 3.39)

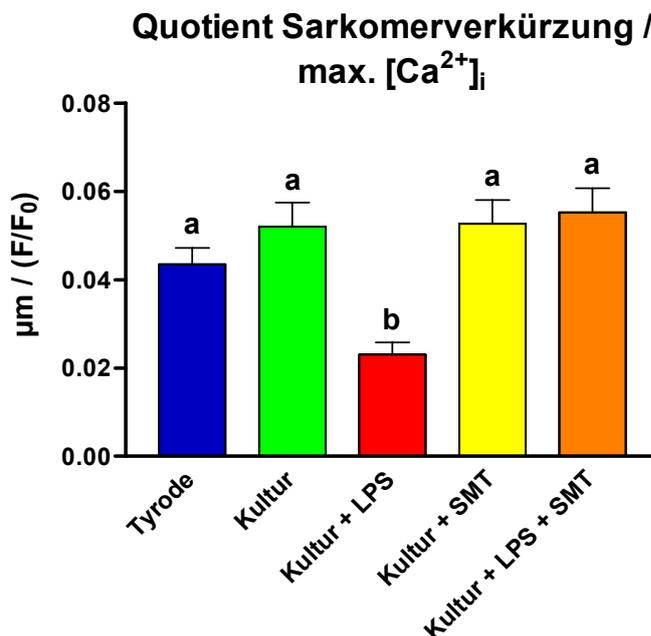


Abbildung 3.38: Quotient aus Sarkomerverkürzungsamplitude und maximaler $[\text{Ca}^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW \pm SEM

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

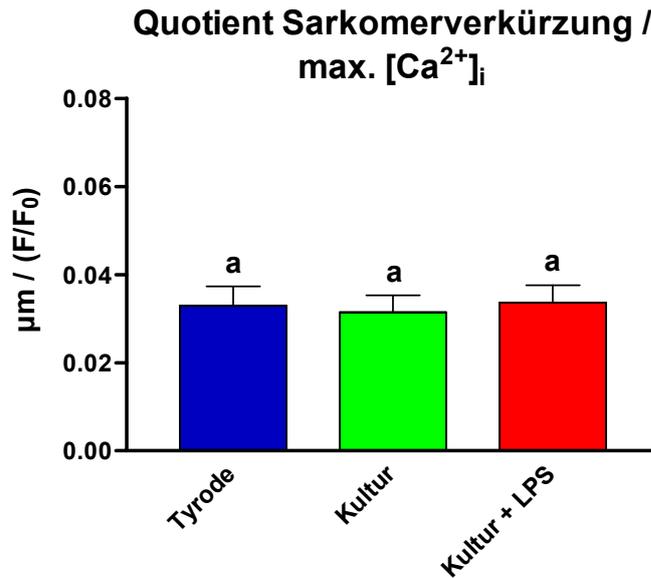


Abbildung 3.39: Quotient aus Sarkomerverkürzungsamplitude und maximaler $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von $TLR4^{-/-}$ Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW \pm SEM

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

Als zweiter Parameter wurde ein Quotient aus der Sarkomerverkürzungsamplitude und der Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ gebildet. Er gibt ab, um wie viel μm sich die Sarkomere der Zellen pro Einheit in die Zelle einströmenden Kalziums verkürzen. Bei WT Tieren bewirkte die Inkubation in Kulturmedium eine signifikante Erhöhung dieses Parameters im Vergleich zu in Tyrode gelagerten Zellen (Abbildung 3.40). Zugabe von SMT hatte im Vergleich zur Gruppe Kultur keinen signifikanten Einfluss. Die Stimulation mit LPS führt wieder zu einer signifikanten Erniedrigung. Dieser Effekt wurde durch Zugabe von SMT zu LPS-stimulierten Zellen aufgehoben.

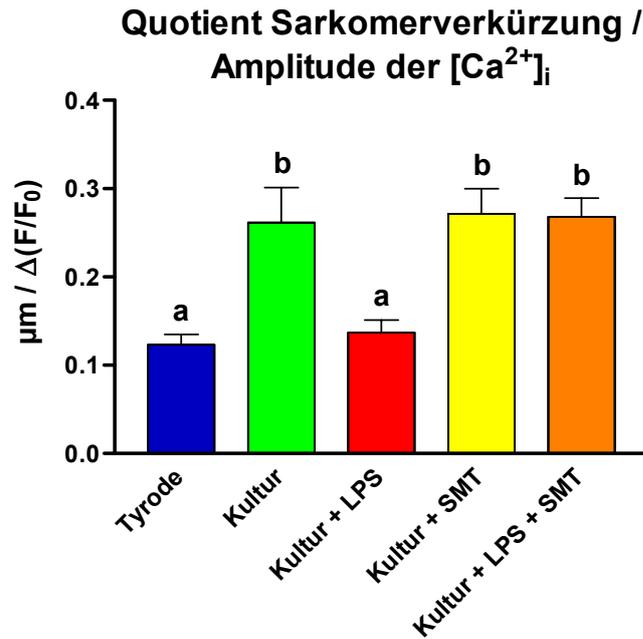


Abbildung 3.40: Quotient aus Sarkomerverkürzungsamplitude und Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von WT Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: $MW \pm SEM$

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

Kardiomyozyten von $TLR4^{-/-}$ Mäusen zeigen in Bezug auf diesen Parameter ebenfalls eine signifikante Erhöhung, wenn sie in Kulturmedium inkubiert waren (Abbildung 3.41). Die Stimulation mit LPS zeigte keinen signifikanten Einfluss im Vergleich zur Gruppe Kultur.

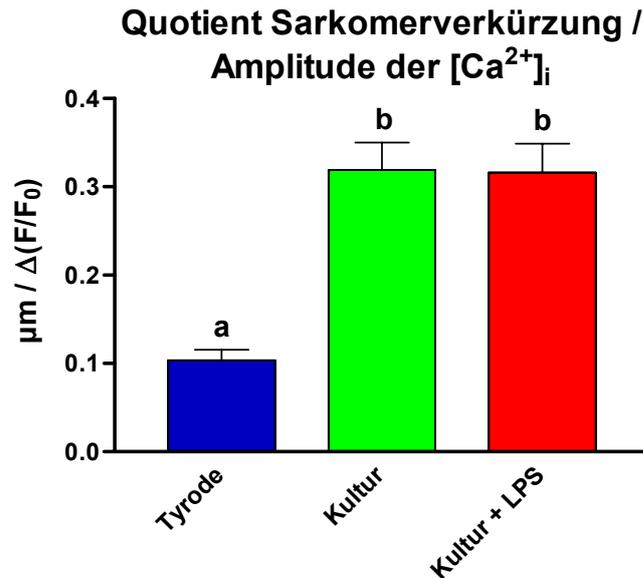


Abbildung 3.41: Quotient aus Sarkomerverkürzungsamplitude und Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Kardiomyozyten von $TLR4^{-/-}$ Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: $MW \pm SEM$

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einfaktorierter Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

Der letzte Parameter deutet an, dass Zellen, die lediglich in Tyrode gelagert worden waren und kultivierte Zellen in Bezug auf die $[Ca^{2+}]_i$ nicht direkt miteinander vergleichbar sind.

Verschiedene Gründe hierfür sind vorstellbar: Zum einen ist die Fura-2-Aufnahme anders, wenn die Zellen in Tyrode lagern, sei es durch unterschiedliche pH-Werte oder durch unterschiedliche Osmolarität der Tyrode im Vergleich zum Kulturmedium. Ein anderer Grund wäre eine tatsächliche Verminderung der Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente der Zellen in Tyrode.

3.3.8. Auswirkung von LPS auf die Kontraktur isolierter Kardiomyozyten mittels Natrium-Extraktionskontraktur

3.3.8.1. Originalregistrierungen

Um einen direkten Zusammenhang zwischen der Sarkomerlänge und der intrazellulären Kalziumkonzentration aufzeigen zu können, wurden Fura-2-beladene

Zellen mit einer Lösung durchspült, deren Na⁺-Konzentration lediglich 10% der physiologischen war, und simultan die Sarkomerlänge und die [Ca²⁺]_i aufgezeichnet. Die Kontraktur einer Zelle war bei diesen Experimenten ein sehr langsamer Prozess. Daher dauerte die Aufzeichnung des Verhaltens einer Zelle bis zu 500 Sekunden. Aufgrund der zeitlich hochauflösenden Messungen entstanden daraus Datenspuren mit einem hohen Speicheraufkommen, die es nicht möglich machen, diese sinnvoll darzustellen, weshalb hier auf eine Abbildung verzichtet wird.

3.3.8.2. Regressionsgeraden

Zunächst wurde für jede Gruppe von Zellen eine Punktwolke ermittelt und über alle Punkte eine Regressionsgerade errechnet. Es stellte sich jedoch heraus, dass das Bestimmtheitsmaß r^2 der linearen Regression sehr niedrige Werte angenommen hatte (Tabelle3.1). So war zum Beispiel in der Gruppe Kultur + LPS nur 10,2% der Varianz in den Werten der Sarkomerlänge durch die [Ca²⁺]_i zu erklären.

Gruppe	Tyrode	Kultur	Kultur + LPS
Bestimmtheitsmaß (r^2)	0,6633	0,1044	0,1020

Tabelle3.1: Bestimmtheitsmaß der Regressionsgeraden über alle Wertepaare für die einzelnen Gruppen

Bei der graphischen Beurteilung der Daten fiel auf, dass eine Zusammenfassung der Werte aller Zellen nicht sinnvoll war. Aus diesem Grund wurde für jede Zelle eine eigene Regressionsgerade berechnet. Bei der Betrachtung der Regressionsgeraden einer Gruppe war zu sehen, dass die Wertepaare jeweils einer Zelle in hohem Maße linear korrelieren, die Geraden aber mehr oder weniger parallel zueinander verschoben waren (Abbildung 3.42) Die Bestimmtheitsmaße r^2 nahmen nun Werte von 0,79 bis 0,999 an. Aufgrund dieser parallelen Verschiebung wurde die Überlegung angestellt, die Steigungen der Regressionsgeraden einer jeden Gruppe zu mitteln und die Gruppen miteinander zu vergleichen.

3. Ergebnisse

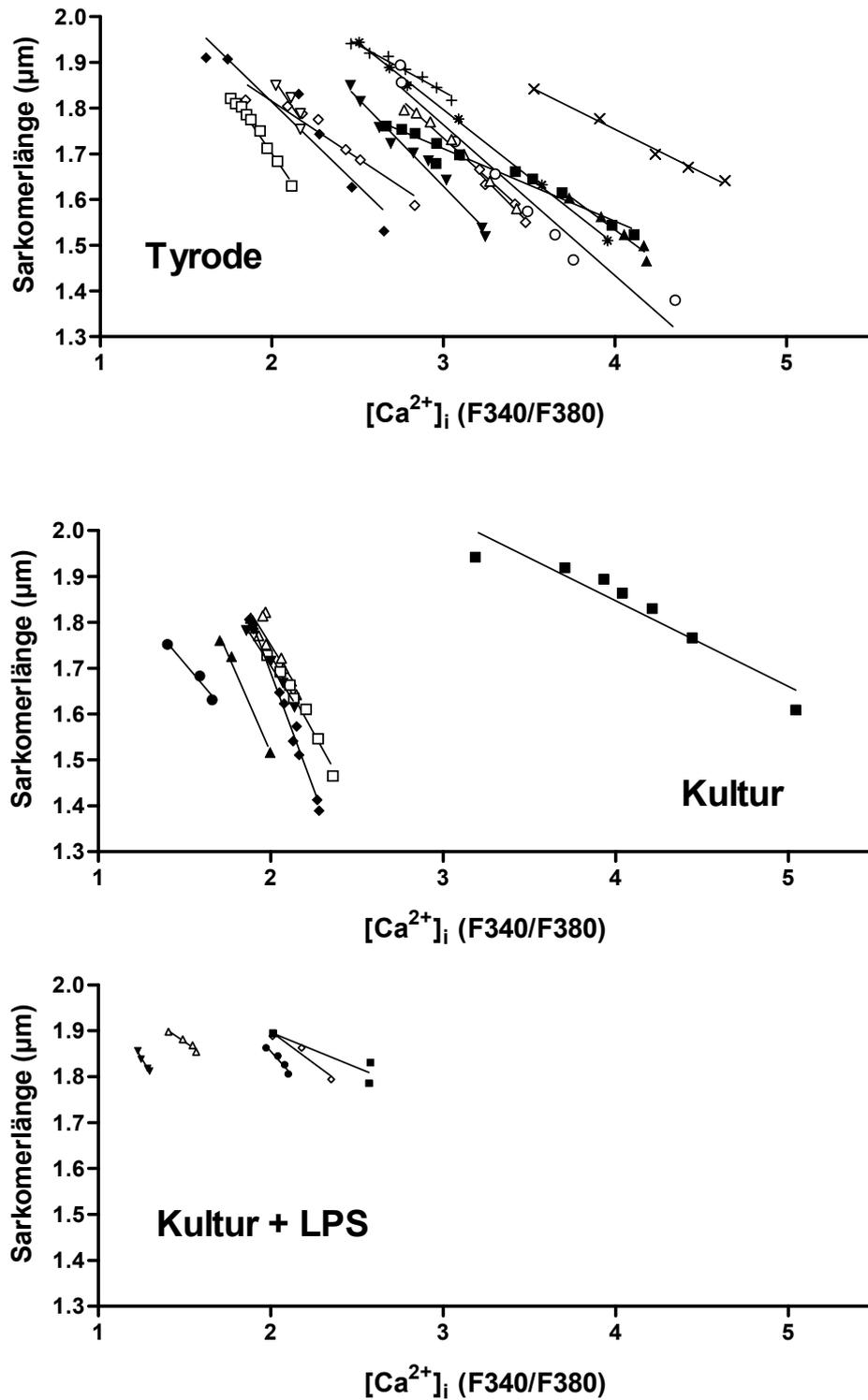


Abbildung 3.42: Darstellung der Sarkomerlänge in Abhängigkeit von der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von isolierten, mit Fura-2 beladenen Kardiomyozyten von WT Mäusen in den verschiedenen Gruppen. Unterschiedliche Symbole gehören zu verschiedenen Zellen. Der lineare Zusammenhang der jeweiligen Wertepaare einer Zelle ist durch eine errechnete Regressionsgerade aufgezeigt.

3. Ergebnisse

Das Ergebnis dieses Vergleiches ist in Abbildung 3.43 dargestellt. Die Inkubation in das Kurzzeit-Kulturmedium führte zu einer signifikanten Erhöhung der Steigung der Regressionsgeraden. Das heißt für die Zellen der Gruppe Kultur, dass sie eine geringere Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ benötigen, um eine gewisse Strecke an Sarkomerverkürzung zu erzielen. Durch Zugabe von LPS zum Kulturmedium kam es zu einer signifikanten Verringerung der Steigung der Regressionsgeraden.

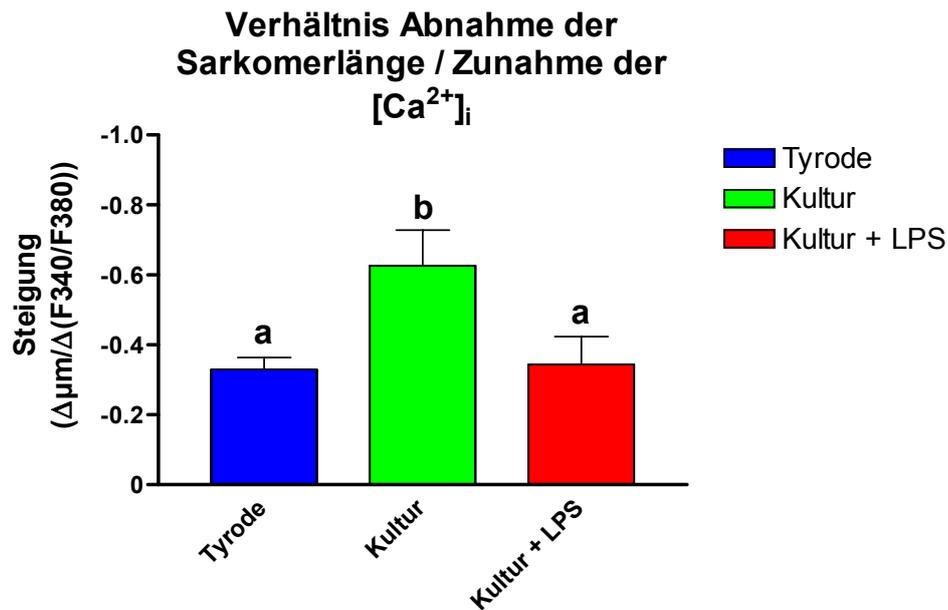


Abbildung 3.43: Vergleich der Verhältnisse der Abnahme der Sarkomerlänge in Abhängigkeit von der Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ bei Kardiomyozyten während einer Natrium-Extraktionskontraktur

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

3.4. Auswirkung von Zellwandbestandteilen gram-positiver Bakterien auf die Sarkomerverkürzung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten

Nach der Untersuchung von LPS, einem Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, und dessen Effekt auf die kardiale Kontraktilität wurden in weiteren Experimenten isolierte Kardiomyozyten mit Zellwandbestandteilen von gram-positiven Bakterien stimuliert, um zu sehen, wie diese sich auf die Sarkomerverkürzung auswirkten. Dazu wurden isolierte Kardiomyozyten von insgesamt 17 C57BL/6 Mäusen im Alter von 12 – 14 Wochen mit 10 µg/ml Lipoteichonsäure (LTA) und 10 µg/ml Peptidoglykan (PGN) stimuliert und ihre Sarkomerverkürzung gemessen.

Die absoluten Zahlen der Ergebnisse, die in diesem Abschnitt dargestellt werden, sind im Anhang angegeben.

3.4.1. Vergleich der Wirkung von Lipoteichonsäuren verschiedener Herkunft auf die Sarkomerverkürzungsamplitude

Der erste Ansatz dieser Versuchreihe wurde mit LTA der Firma Sigma (Steinheim) durchgeführt (LTA_{sigma}). Abbildung 3.44 zeigt die frequenzabhängige Sarkomerverkürzungsamplitude von mit LTA und PGN stimulierten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. Der typische biphasische Verlauf, der unter 3.3.3 bereits für C3H/HeN Mäuse beschrieben ist, findet sich hier bei den C57BL/6 Kontrollzellen wieder. Die Maxima liegen bei 0,5 und 6 – 8 Hz, das Minimum bei 2 Hz. Dies entspricht somit den Beobachtungen bei C3H/HeN. Die Sarkomerverkürzungsamplitude liegt hier allerdings bei allen Frequenzen höher. Unter dem Einfluss der gram-positiven Zellwandbestandteile verringert sich die Sarkomerverkürzung insgesamt signifikant gegenüber den beiden Kontrollgruppen. Hier war zwar ein zweigipfliger Verlauf angedeutet mit Maxima bei 0,5 und 10 Hz und dem Minimum bei 1 Hz, doch verlief die Kurve doch deutlich flacher.

Bei 0,5, 1, 2, 6 und 8 Hz war die Verkürzungsamplitude der mit LTA und PGN stimulierten Zellen signifikant geringer als in den Kontrollzellen. Bei 4 und 10 Hz zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

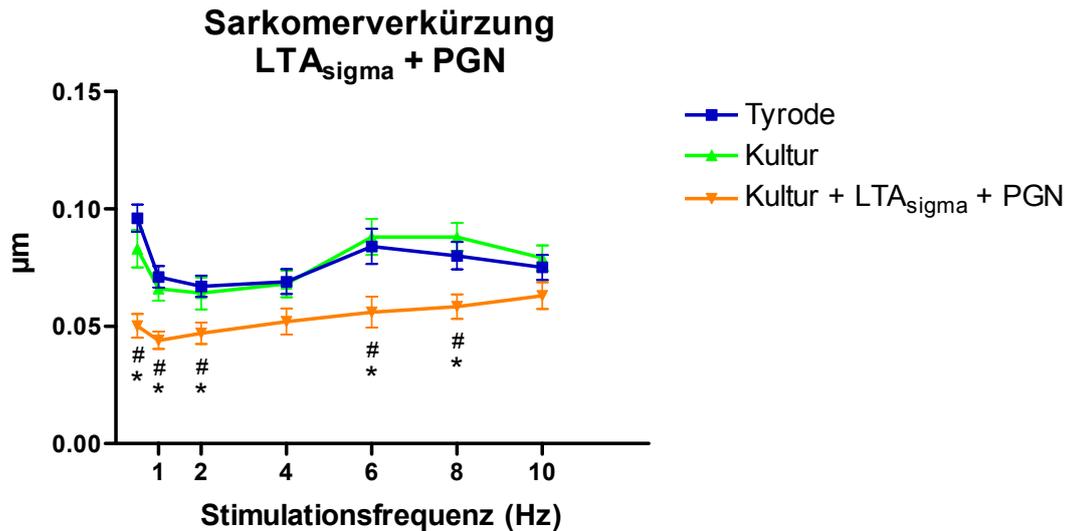


Abbildung 3.44: Sarkomerverkürzungsamplitude isolierter Kardiomyozyten von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz, Angaben: $MW \pm SEM$

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LTA + PGN $p < 0,05$, # Kultur vs. Kultur + LTA + PGN $p < 0,05$.

Da sich herausgestellt hatte, dass die LTA der Firma Sigma mit LPS von gram-negativen Bakterien kontaminiert war, wurde in einem neuen Versuchsansatz hochgereinigte LTA verwendet, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Hartung aus dem Institut für Biochemische Pharmakologie der Universität Konstanz bereitgestellt wurde. Die weiteren Ergebnisse dieses Abschnittes beziehen sich auf die Zellen, die mit hochgereinigter LTA (LTA_{hp}) stimuliert wurden.

Die Kurve der mit LTA und PGN stimulierten Zellen zeigt wieder einen flachen Verlauf, bei dem die zweiphasige Frequenzabhängigkeit nur andeutungsweise zu sehen ist (Abbildung 3.45). Ein vorderes Maximum war bei 0,5 Hz zu sehen, doch nahm die Verkürzungsamplitude zum Minimum bei 2 – 4 Hz nur geringfügig ab. Danach kam es zu einem vergleichsweise steilen Anstieg zum Maximum bei 10 Hz. Insgesamt war diese Kurve signifikant niedriger als die der beiden Kontrollgruppen. Dies zeigte sich auch bei den einzelnen Frequenzen. Bei 0,5 – 8 Hz war die Sarkomerverkürzungsamplitude bei den stimulierten Zellen signifikant geringer als bei den Kontrollzellen. Bei 10 Hz zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

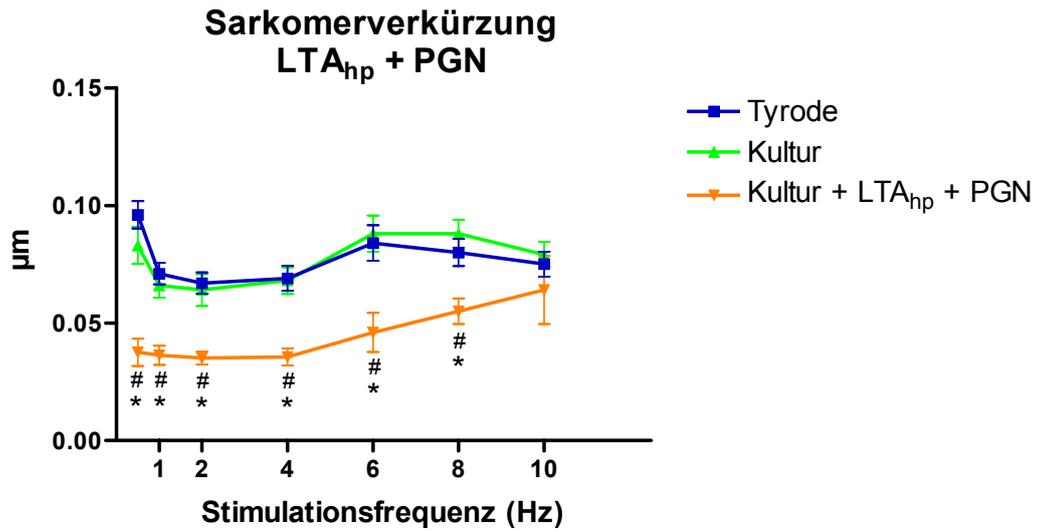


Abbildung 3.45: Sarkomerverkürzungsamplitude isolierter Kardiomyozyten von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz, Angaben: $MW \pm SEM$

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LTA + PGN $p < 0,05$, # Kultur vs. Kultur + LTA + PGN $p < 0,05$.

3.4.2. Ruhesarkomerlänge

Die Ruhesarkomerlänge wurde mit dem Programm IonWizard als die Sarkomerlänge vor Einsetzen einer Sarkomerverkürzung direkt ermittelt.

Abbildung 3.46 zeigt die Ruhesarkomerlänge von isolierten Kardiomyozyten über verschiedene Frequenzen aufgetragen. Bei keiner Gruppe war eine Frequenzabhängigkeit zu erkennen. Die Ruhesarkomerlänge blieb von niedrigen zu hohen Frequenzen annähernd auf einem Niveau. Bei den Gruppen Kultur und LTA + PGN war die Ruhesarkomerlänge dabei ca. 0,1 μm niedriger als bei den Zellen der Gruppe Tyrode. Dieser Unterschied war bei allen Frequenzen signifikant.

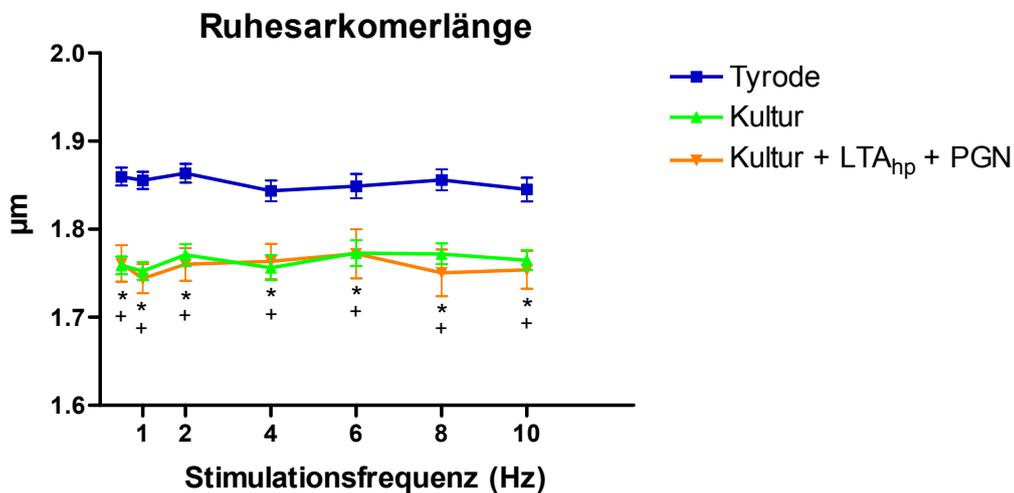


Abbildung 3.46: Ruhesarkomerlänge isolierter Kardiomyozyten von C57BL6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz, Angaben: MW \pm SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LTA + PGN $p < 0,05$, + Tyrode vs. Kultur $p < 0,05$.

3.4.3. Verkürzungsgeschwindigkeit

Aus der größten Steigung des abfallenden Schenkels einer Verkürzungszacke wurde mit dem Programm IonWizard die Verkürzungsgeschwindigkeit der Zelle errechnet. Abbildung 3.47 zeigt die Verkürzungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz von mit LTA und PGN stimulierten isolierten Kardiomyozyten im Vergleich zu Kontrollzellen.

Wie bei der Verkürzungsamplitude war hier bei den Kontrollzellen ein eindeutig zweiphasiger Verlauf zu erkennen. Die Maxima lagen bei 0,5 und 6 – 8 Hz, das Minimum bei 1 – 2 Hz. Durch Stimulation der Zellen mit den Zellwandbestandteilen gram-positiver Bakterien war eine eindeutige Frequenzabhängigkeit nicht mehr zu erkennen. Es zeigt sich ein Maximum bei 4 Hz mit einem anschließenden Abfall der Verkürzungsgeschwindigkeit nach 10 Hz hin. Die Kurve der Gruppe LTA + PGN war signifikant niedriger als die der Kontrollgruppen.

Bezogen auf die einzelnen Frequenzen war die Verkürzungsgeschwindigkeit der mit LTA + PGN behandelten Zellen über alle Frequenzen signifikant niedriger als die Kontrollzellen.

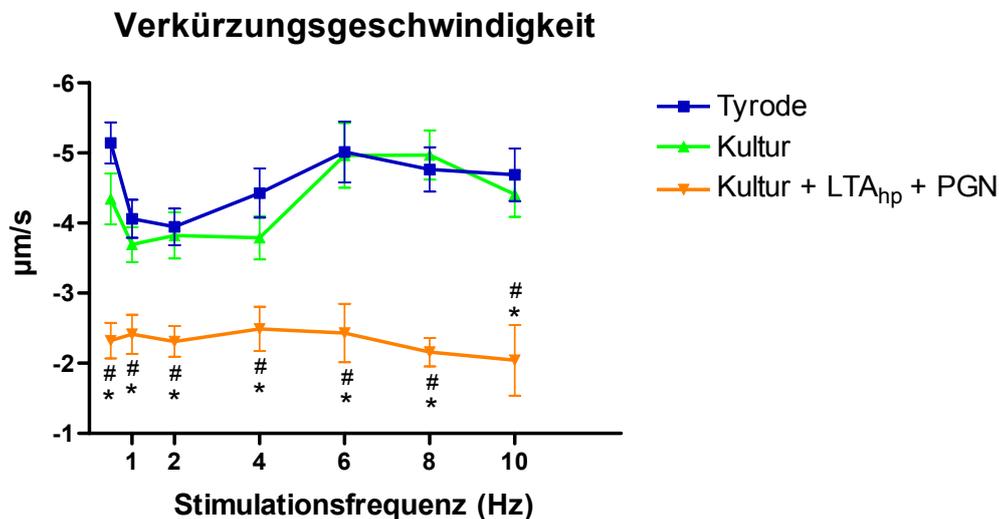


Abbildung 3.47: Verkürzungsgeschwindigkeit isolierter Kardiomyozyten von C57BL6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz, Angaben: MW ± SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorierter Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LTA + PGN $p < 0,05$, # Kultur vs. Kultur + LTA + PGN $p < 0,05$.

3.4.4. Relaxationsgeschwindigkeit

Auch bei der Relaxationsgeschwindigkeit zeigt sich wieder ein biphasischer Verlauf bei den Kontrollgruppen mit dem Minimum bei 2 – 4 Hz und den Maxima bei 0,5 und 6 Hz (Abbildung 3.48). Die Stimulation mit LTA und PGN wirkte sich dadurch aus, dass ein frequenzabhängiger Verlauf nicht mehr erkennbar war. Die Relaxationsgeschwindigkeit bleibt über die Frequenzen auf einem ähnlichen Niveau von ca. 1,1 bis 1,3 $\mu\text{m/s}$. Diese Kurve war insgesamt signifikant niedriger als die der Kontrollgruppen.

Die einzelnen Frequenzen betrachtend war die Relaxationsgeschwindigkeit bei der Gruppe LTA + PGN bei allen Frequenzen signifikant niedriger als bei den Kontrollgruppen.

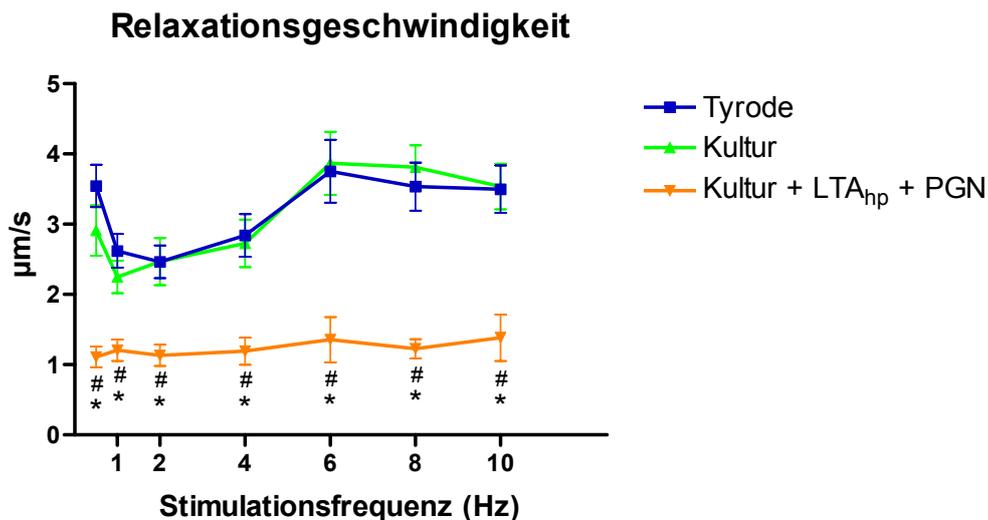


Abbildung 3.48: Relaxationsgeschwindigkeit isolierter Kardiomyozyten von C57BL6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz, Angaben: $MW \pm SEM$

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LTA + PGN $p < 0,05$, # Kultur vs. Kultur + LTA + PGN $p < 0,05$, + Tyrode vs. Kultur $p < 0,05$.

3.4.5. Verkürzungsdauer

Die Verkürzungsdauer ist die Zeit vom Beginn der Sarkomerverkürzung bis zum Wiedererreichen einer Sarkomerlänge, die 90% der Ruhesarkomerlänge entspricht. In Abbildung 3.49 ist die Verkürzungsdauer in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz aufgetragen. Bei allen Gruppen war eine geringfügige Frequenzabhängigkeit zu erkennen, insofern, als dass die Verkürzungsdauer zu den hohen Frequenzen hin abnimmt. Dies geschah bei allen Gruppen im gleichen Maße. Die Kurven der drei Gruppen waren nicht signifikant verschieden. Bezogen auf die einzelnen Frequenzen waren die Verkürzungsdauern bei 0,5 Hz von Kultur und LTA + PGN signifikant unterschiedlich zu der Gruppe Tyrode.

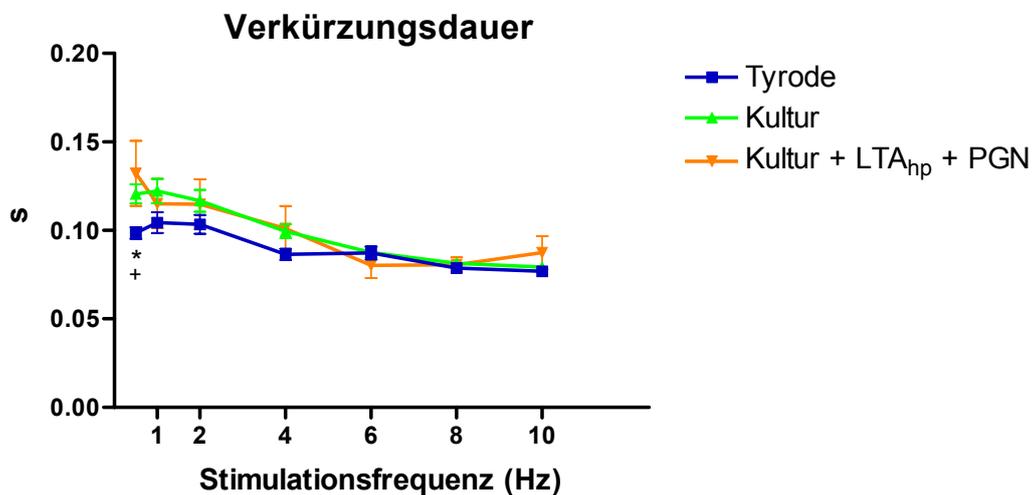


Abbildung 3.49: Verkürzungsdauer isolierter Kardiomyozyten von C57BL6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz, Angaben: MW \pm SEM

Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen bei den einzelnen Frequenzen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt. * Tyrode vs. Kultur + LTA + PGN $p < 0,05$, + Tyrode vs. Kultur $p < 0,05$.

3.5. Auswirkung einer peritonealen, gram-negativen Sepsis auf Mäuse mit induzierter hämodynamischer Drucküberbelastung *in vivo*

3.5.1. Mortalitätsraten

Die Gründe für Mortalitäten in dieser Versuchsreihe lagen in den verschiedenen Phasen der Experimente. Tabelle 3.2 zeigt die Mortalitätsraten in den einzelnen Phasen. Dass die Tiere während oder unmittelbar nach dem Eingriff gestorben waren, hatte zumeist handwerkliche Gründe, was mit steigendem Operationsgeschick kompensiert wurde. Es gab auch eine Reihe von Todesfällen, für die es keine offensichtlichen Gründe gab. Während der 72-stündigen Wartezeit lag die Sterblichkeit hauptsächlich bei den TAC-operierten Tieren, was auf eine Wirkung durch den Eingriff schließen lässt. Todesfälle zwischen Stimulation und Messung kamen nur bei TAC-operierten und mit LPS stimulierten Tieren vor. Der Zeitpunkt, zu dem Tiere während der Messung starben, war in den meisten Fällen der des Vorschubens des Katheters in den linken Ventrikel. Hier war dann ein plötzlicher, steiler Abfall des systolischen Blutdrucks zu beobachten.

	Anzahl gestorbener Tiere (%)			
	durch die Operation	innerhalb 72h	während der Stimulation	während der Messung
Sham PBS	4 (11,76)	1 (3,3)	0 (0)	1 (8,3)
Sham LPS			0 (0)	2 (20)
TAC PBS	8 (14,55)	7 (14,89)	0 (0)	3 (25)
TAC LPS			6 (24)	11 (68,75)
Summe	12 (12,36)	8 (10,39)	8,70	17 (34,00)

Tabelle 3.2: Mortalitätsraten Sham- und TAC-operierter Mäuse durch verschiedene Manipulationen oder Stimulationen. Angaben absolut und in % der Tiere, die bis zu dieser Phase überlebt hatten.

3.5.2. Klinisches Erscheinungsbild

Sowohl TAC- als auch Sham-operierte Tiere wurden während der 72 Stunden auf äußerliche klinische Symptome einer Infektion untersucht. Nach den zusätzlichen 6 Stunden der i.p. Stimulation mit LPS oder PBS zeigten die LPS-behandelten Mäuse schockähnliche Symptome. Diese äußerten sich in Teilnahmslosigkeit, struppigem Fell, aufgekrümmtem Leib und Zittern, wobei die mit PBS behandelten Tiere frei von solchen Symptomen waren und für Labormäuse physiologische Verhaltensmuster zeigten.

3.5.3. Morphologische Parameter

3.5.3.1. Vergleich der Zunahme der linksventrikulären Masse 3 und 14 Tage nach TAC-Operation

Um einen groben zeitlichen Zusammenhang der kardialen Hypertrophie nach der TAC-Operation darzustellen, wurde die linksventrikuläre Masse von männlichen C57BL/6 Mäusen 3 Tage und 14 Tage nach TAC- bzw. Sham-Operation bestimmt. Die prozentuale Zunahme der Masse wurde errechnet, indem die jeweiligen Kontrollen als 100% angesehen wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.50 dargestellt. Die linksventrikuläre Masse nahm innerhalb von 3 Tagen um 38 % zu. Nach 14 Tagen ergab sich eine Zunahme von 47%. Es ist somit zu sehen, dass der wesentliche Teil der Zunahme der Masse des linken Ventrikels in den ersten Tagen erfolgt.

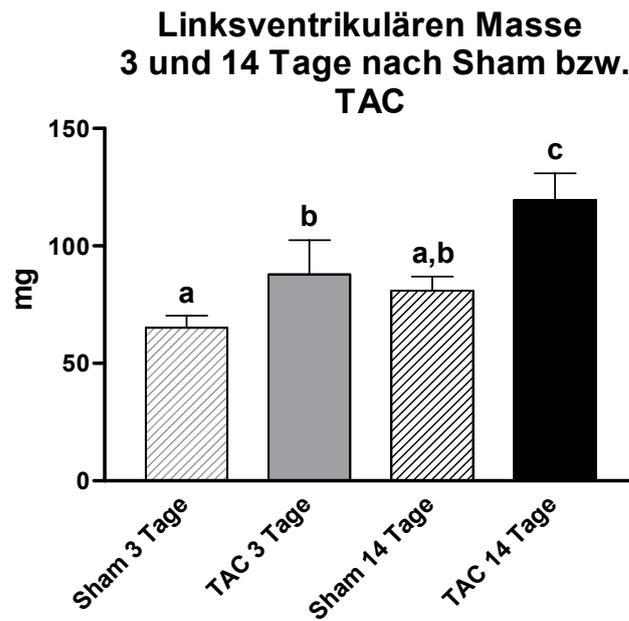


Abbildung 3.50: Linksventrikuläre Masse von C57BL/6 Tieren, 3 und 14 Tage nach Sham bzw. TAC-Operation, Angaben: MW \pm SEM

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

3.5.3.2. Zunahme der Masse von Herz und Lunge

Die Masse des Herzens (HM) und auch die des linken Ventrikels (LVM) war bei den TAC-operierten Tieren signifikant höher als bei den Sham-operierten. Die Lungenmasse (LM) war bei der Gruppe TAC LPS gegenüber den anderen Gruppen signifikant erhöht (Tabelle 3.3).

	LVM (mg)	HM (mg)	LM (mg)
Sham PBS	65,2 ± 5,1 a	82,3 ± 7,2 a	104,2 ± 6,3 a
Sham LPS	62,4 ± 7,5 a	80,2 ± 9,8 a	120,7 ± 17,2 a
TAC PBS	87,9 ± 14,5 b	106,0 ± 14,7 b	118,2 ± 19,7 a
TAC LPS	86,6 ± 12,5 b	105,4 ± 14,8 b	154,7 ± 52,3 b

Tabelle 3.3: LVM, HM und LM von C57BL/6 Mäusen nach verschiedenen Vorbehandlungen, Angaben MW ± SD.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich der jeweiligen Parameter zwischen den 4 Gruppen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt

Die Herzparameter linksventrikuläre Masse geteilt durch die Tibiallänge (LVM/TL) und linksventrikuläre Masse durch Körpermasse (LVM/BM), die den Einfluss des Entwicklungsgrades der Tiere vernachlässigen ließen, ergaben bei den TAC-Tieren signifikant höhere Werte als bei den Kontrollen (Tabelle 3.4).

	LVM/TL (mg/mm)	LVM/BM (mg/g)
Sham PBS	3,7 ± 0,3 a	3,2 ± 0,2 a
Sham LPS	3,6 ± 0,4 a	3,1 ± 0,3 a
TAC PBS	5,0 ± 0,8 b	4,1 ± 0,7 b
TAC LPS	5,0 ± 0,5 b	3,9 ± 0,4 b

Tabelle 3.4: Die Herzparameter LVM/TL und LVM/BM von C57BL/6 Mäusen nach verschiedenen Vorbehandlungen, Angaben MW ± SD.

Ungleiche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich der jeweiligen Parameter zwischen den 4 Gruppen wurde mit einfaktorieller Varianzanalyse und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt

3.5.4. Hämodynamik

3.5.4.1. Arterieller, prästenotischer Blutdruck

3.5.4.1.1. Originalregistrierungen

Um die Auswirkungen der TAC-Operation auf den arteriellen, prästenotischen Blutdruck zu veranschaulichen, werden beispielhafte Blutdruckkurven eines Sham- und eines TAC-operierten Tieres gegenübergestellt. Die Druckamplitude ist deutlich höher bei der TAC-operierten Maus. Die Inzisierung, die den Schluss der Aortenklappen anzeigt, ist nicht mehr erkennbar. (Abbildung 3.51)

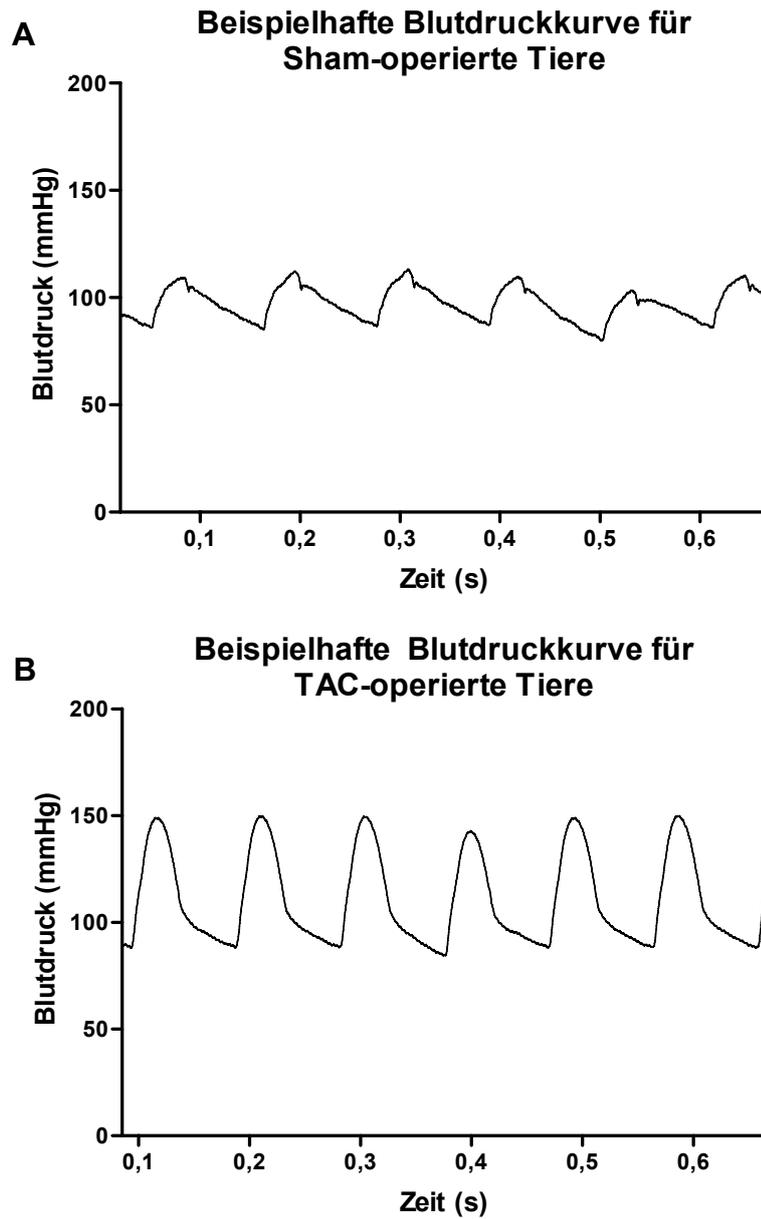


Abbildung 3.51: Zeitabhängige Darstellung des in der *A. carotis communis* gemessenen Blutdruckes beispielhafter C57BL/6 Mäuse nach Sham- (A) bzw. TAC-Operation (B).

3.5.4.1.2. Blutdruckergebnisse

Die Messungen ergaben bei allen TAC-operierten Tieren einen signifikant höheren systolischen Blutdruck (SAP) als bei Sham-operierten. Jeweils innerhalb der TAC- bzw. Sham-Tiere kam es bei den mit LPS stimulierten Tieren zu einer signifikanten Erniedrigung des SAP, bei Sham-Tieren um 20,1 % und bei TAC-Tieren um 13,59 % (Abbildung 3.52).

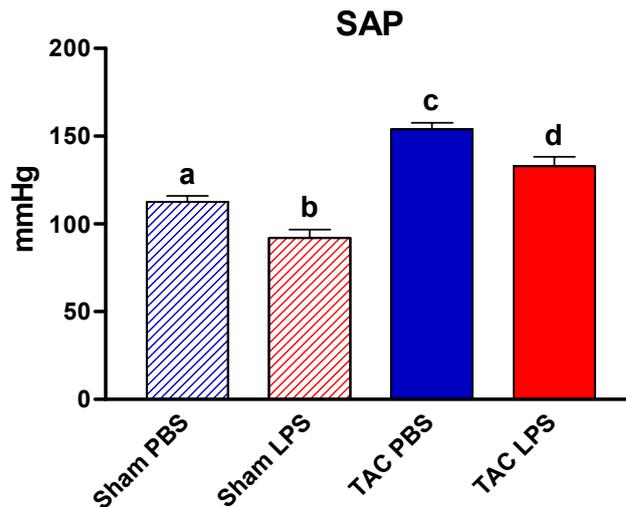


Abbildung 3.52: Systolischer arterieller Blutdruck von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW \pm SEM

Unterschiedliche Buchstaben bedeuten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

Der diastolische Blutdruck (DAP) war bei der Gruppe Sham LPS signifikant erniedrigt. Die anderen Gruppen weisen keine Unterschiede auf (Abbildung 3.53).

Der mittlere, arterielle Blutdruck (MAP), der sich zu 2/3 aus dem systolischen und zu 1/3 aus dem diastolischen Blutdruck errechnete, war ebenfalls bei Sham LPS signifikant erniedrigt, wobei sich die anderen Gruppen nicht signifikant unterschieden (Abbildung 3.54).

Die Zahlenwerte aller Hämodynamik-Messungen sind im Anhang angegeben.

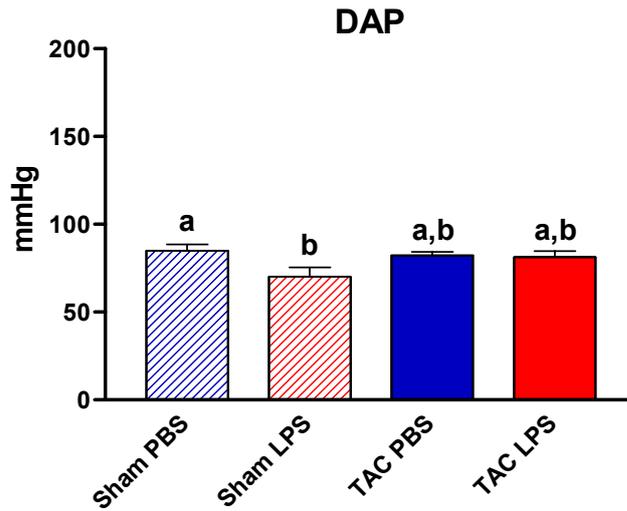


Abbildung 3.53: DAP von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: $MW \pm SEM$

Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich wurde zwischen den verschiedenen Gruppen mit one-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

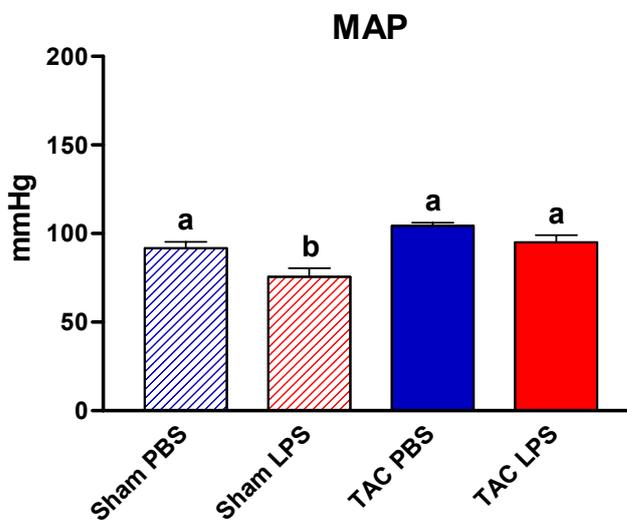


Abbildung 3.54: MAP von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: $MW \pm SEM$

Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

3.5.4.2. Herzfrequenz und linksventrikulärer Blutdruck

Durch Stimulation mit LPS kam es bei Sham- und TAC-Tieren zu einer signifikanten Erhöhung der Herzfrequenz. Die Herzfrequenz von TAC PBS war im Vergleich zu Sham PBS ebenfalls signifikant erhöht. Der durch die TAC-Operation hervorgerufene Herzfrequenzanstieg entsprach dem, der an Sham-operierten Tieren durch LPS erreicht wurde (Abbildung 3.55). Diese Ergebnisse entstanden bei gleicher Narkosetiefe (1 Vol. % Isofluran).

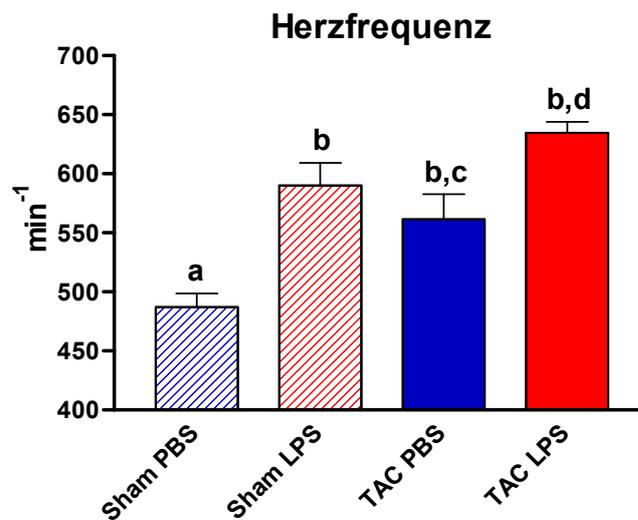


Abbildung 3.55: Herzfrequenz von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: $MW \pm SEM$

Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

TAC führte zu einem signifikant erhöhten systolischen, linksventrikulären Blutdruck (LVSP) im Vergleich zu Sham. LPS-Stimulation hatte sowohl bei TAC als auch bei Sham eine signifikante Erniedrigung des LVSP zur Folge. Diese betrug bei Sham 23,61 %, bei TAC 13,71 % (Abbildung 3.56).

Die Messung des enddiastolischen, linksventrikulären Blutdrucks (LVEDP) erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen (Abbildung 3.57).

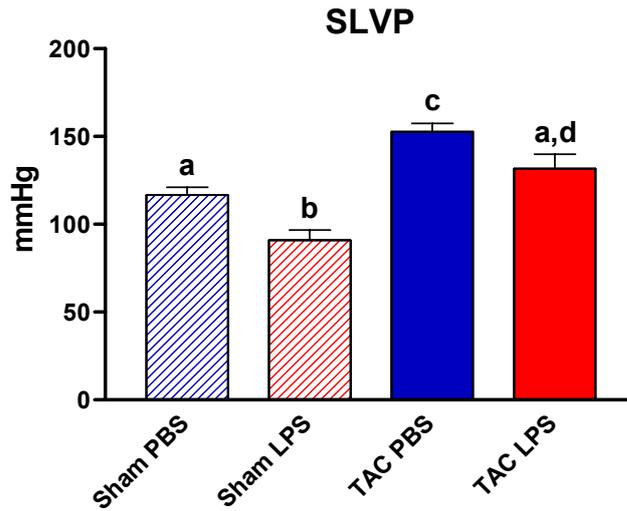


Abbildung 3.56: SLVP von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW \pm SEM

Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

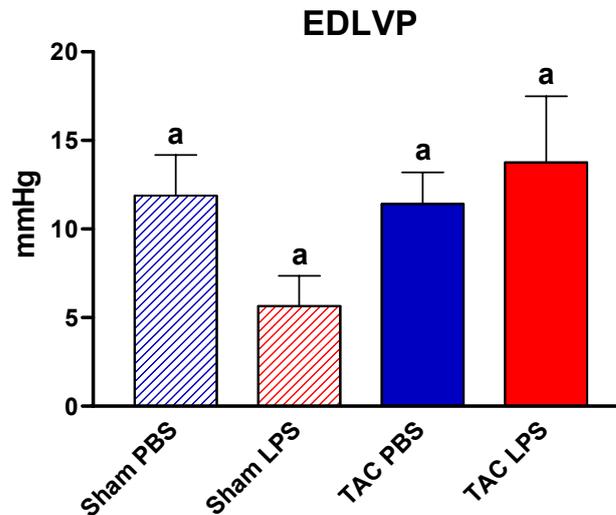


Abbildung 3.57: EDLVP von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: MW \pm SEM

Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

3.5.4.3. Maximale Druckanstiegs- und Druckabfallsgeschwindigkeit

Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (Kontraktionsgeschwindigkeit; $+dP/dt_{max}$) war bei den LPS stimulierten Tieren sowohl bei Sham als auch TAC signifikant erniedrigt. Bei TAC LPS war sie im Vergleich zu Sham LPS signifikant erhöht. Sham PBS und TAC PBS zeigen keinen Unterschied (Abbildung 3.58)

Im Bezug auf die maximale Druckabfallsgeschwindigkeit (Relaxationsgeschwindigkeit; $-dP/dt_{min}$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 3.59).

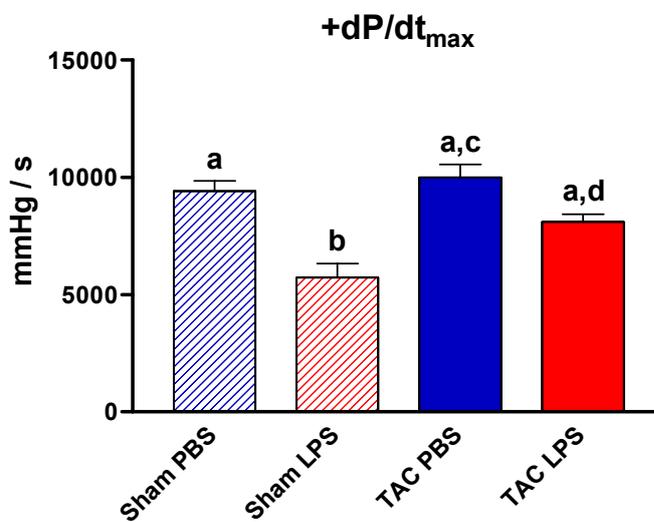


Abbildung 3.58: $+dP/dt_{max}$ von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: $MW \pm SEM$

Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

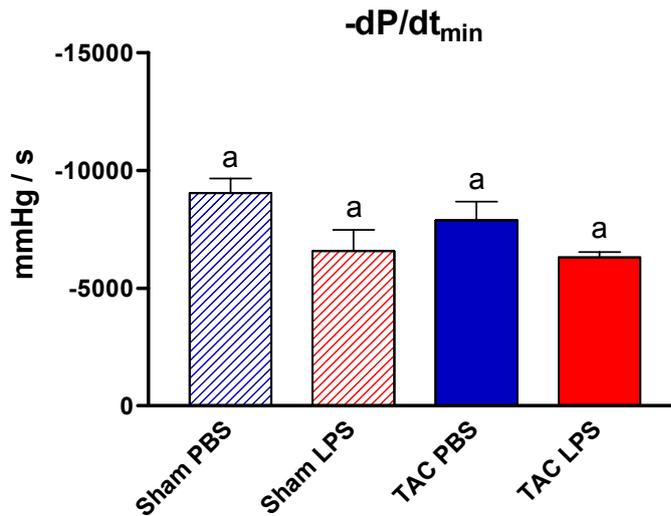


Abbildung 3.59: $-dP/dt_{min}$ von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen, Angaben: $MW \pm SEM$

Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

3.5.5. Elektrokardiogramm

Vor der Aufzeichnung des arteriellen und linksventrikulären Blutdruckes wurde bei jedem Tier für 10 Minuten ein Elektrokardiogramm (EKG) geschrieben. Es wurde eine bipolare Standard-Extremitätenableitung nach Einthoven angewendet, wobei lediglich die Ableitung II aufgezeichnet wurde.

3.5.5.1. Originalregistrierungen

Aus der letzten Minute der EKG-Aufzeichnung wurden 50 aufeinander folgende Komplexe markiert und gemittelt. Beispielhaft seien hier die gemittelten EKG-Komplexe zweier Gruppen gegenübergestellt, erstens eines Tieres der Gruppe Sham PBS und zweitens eines Tieres der Gruppe TAC LPS (Abbildung 3.60). Es handelt sich dabei um typische EKG-Komplexe für die jeweiligen Gruppen. Bereits bei erster Betrachtung fallen bei der Gruppe TAC LPS das unterhalb der isoelektrischen Linie gelegene PQ-Intervall sowie die im Vergleich zur Kontrolle nicht soweit herunterreichende S-Zacke auf.

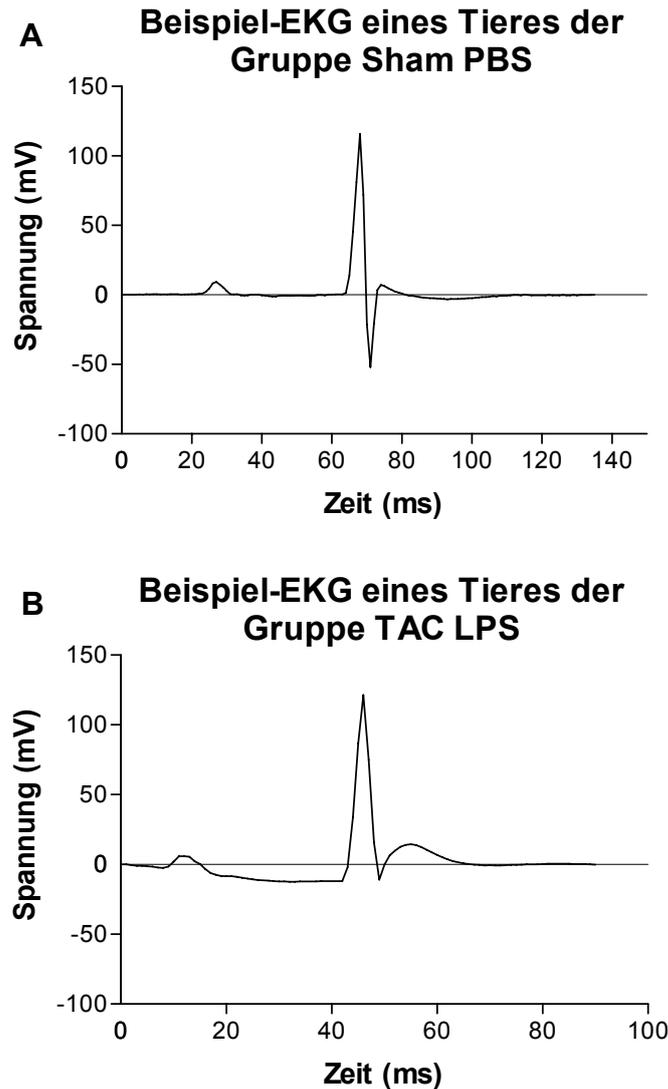


Abbildung 3.60: Beispielhafte EKG-Komplexe je eines Tieres der Gruppen Sham PBS (A) und TAC LPS (B). Je 50 Komplexe wurden gemittelt und übereinander gelagert.

3.5.5.2. Ergebnisse verschiedener Parameter aus dem EKG

- **P-Welle:** Die P-Welle ist die erste Struktur eines EKG-Komplexes und gibt die Vorhoferregung wieder. Bezüglich der Dauer zeigten sich in den Experimenten für die vorliegende Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 3.5). Wenn man die Amplitude der P-Welle betrachtet, so kommt es sowohl bei Sham- als auch TAC-operierten Tieren zu einer signifikant höheren P-Welle. Weiterhin ist zu erkennen, dass die TAC bei PBS- und LPS-stimulierten Mäusen zu einer flacheren P-Welle führt.

- **PR-Strecke:** Die PR-Strecke, die in humanen EKG üblicherweise als PQ-Strecke angegeben wird, ist ein Maß für die Überleitungszeit der Vorhoferregung auf die Kammererregung. Sowohl durch Stimulation als auch durch die TAC-Operation kommt es zu einer signifikanten Verminderung der PR-Strecke (Tabelle 3.5).
- **Absoluter Wert der Q-Zacke:** Dieser Parameter wurde aufgenommen, da bereits bei der graphischen Beurteilung der EKG der verschiedenen Gruppen auffiel, dass sich das PQ-Intervall bei den Tieren der Gruppe TAC LPS häufig unterhalb der, wenn auch parallel zur isoelektrischen Linie befand (vergleiche auch Abbildung 3.60). Der absolute Wert der Q-Zacke ist deshalb nur ein Parameter, der diesen Umstand wiedergibt. Die statistische Auswertung ergab, dass die Linie des PQ-Intervalls bei der Gruppe TAC LPS signifikant niedriger lag als bei den anderen Gruppen (Tabelle 3.5).
- **QRS-Komplex:** Der QRS-Komplex ist Ausdruck der Erregungsausbreitung in beiden Ventrikeln. Er beginnt beim Menschen mit der negativen Q-Zacke, die bei den vorliegenden Experimenten nicht beobachtet werden konnte. Sie geht über in einen positiven Ausschlag, der R-Zacke genannt wird. Das Ende des QRS-Komplexes wird durch die S-Zacke vorgegeben. In den für diese Arbeit geschriebenen EKG zeigt sich durch die TAC eine leichte numerische Zunahme der Dauer des QRS-Komplexes, die jedoch nicht signifikant ist. Durch Stimulation mit LPS sinken die Mittelwerte, wenn auch nicht signifikant. Bezüglich der Amplitude des QRS-Komplexes zeigt lediglich die Gruppe TAC LPS im Vergleich zur Gruppe TAC PBS einen signifikant flacheren Komplex (Tabelle 3.5).
- **QT-Intervall:** Das QT-Intervall ist die Zeit von Beginn der Q-Zacke bis zum Ende der T-Welle und entspricht der Gesamtdauer der Kammererregung. Die QT-Zeit ist abhängig von der Herzfrequenz, sie nimmt bei Tachykardie ab und bei Bradykardie zu. Aus diesem Grunde sollte also zur Beurteilung dieses Parameters stets die herzfrequenzkorrigierte QT-Zeit zugrunde gelegt werden, wie sie in Tabelle 3.5 zu sehen ist. In den vorliegenden Ergebnissen kommt es sowohl durch Stimulation als auch nach TAC zu einer signifikanten Erhöhung

3. Ergebnisse

der QT-Zeit. Durch die zusätzliche LPS-Stimulation TAC-operierter Tiere kam es zu einer signifikanten Verringerung der QT-Zeit im Vergleich zu den nur TAC-operierten Mäusen.

- **JT-Strecke:** Da bei der Maus die S-Zacke ohne ST-Strecke, wie es beim Menschen der Fall ist, in die T-Welle übergeht, wird als Maß für die JT-Strecke als Ausdruck für die Erregungsrückbildung der Kammern verwendet. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass es durch TAC zu einer signifikanten Verlängerung der JT-Strecke kommt. Diese wird durch zusätzliche Gabe von LPS wieder signifikant verkürzt (Tabelle 3.5).

	Sham		TAC	
	PBS (n = 12)	LPS (n = 10)	PBS (n = 12)	LPS (n = 8)
Dauer der P-Welle (ms)	13,5 ± 4,9 a	10,1 ± 3,4 a	11,0 ± 2,3 a	9,8 ± 2,2 a
Amplitude der P-Welle (mV)	8,6 ± 3,4 a	12,8 ± 2,7 b	5,7 ± 1,9 c	9,4 ± 4,2 a
PR-Strecke (ms)	38,4 ± 3,4 a	35,0 ± 2,1 b	33,2 ± 2,6 b	33,8 ± 3,8 b
Wert der Q-Zacke (mV)	0,7 ± 0,8 a	0,8 ± 1,4 a	-0,9 ± 4,0 a	-5,2 ± 5,0 b
Dauer QRS-Komplex (ms)	7,8 ± 0,9 a	7,3 ± 1,1 a	8,1 ± 1,2 a	7,8 ± 1,9 a
Amplitude QRS-Komplex (mV)	134,6 ± 24,1 a	136,9 ± 34,6 a	160,1 ± 34,3 a,b	101,2 ± 33,8 a,c
korrigierte QT-Zeit (ms)	44,9 ± 5,0 a	50,3 ± 3,9 b	54,9 ± 3,8 c	48,6 ± 6,4 a,b
JT-Strecke (ms)	40,2 ± 5,3 a	42,1 ± 4,4 a	45,3 ± 8,8 b	35,9 ± 0,6 a,c

Tabelle 3.5: Verschiedene Parameter aus den geschriebenen EKG von C57BL/6 Mäusen unter verschiedenen Bedingungen.

Ungleiche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Ein statistischer Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einer one-way ANOVA und Newman-Keuls post hoc test durchgeführt.

4. Diskussion

4.1. *Validität der angewandten in vitro Methoden*

Um die Validität der mit den in vitro Experimenten erzielten Ergebnisse beurteilen zu können, ist es notwendig, sowohl Qualität und Quantität der Isolierungsmethode der Kardiomyozyten als auch Validität und Reliabilität der Messmethode zu bewerten.

In unserer Arbeitsgruppe wurde die Technik der Isolation der Herzmuskelzellen bereits in vielen Arbeiten, zunächst von Meerschweinchen, Ratten und Kaninchen (Meyer, 1989; Linz und Meyer, 2000) und zuletzt auch von der Maus (Baumgarten et al., 2006; Kempelmann, 2005; Tiemann et al., 2003), erfolgreich durchgeführt. Das Ergebnis der Isolation waren dabei sowohl eine hohe erzielte Quantität an lebenden Zellen (bis ca. 70%) als auch gute qualitative Eigenschaften der Zellen (Stäbchenform, intakte Zellenden und gleichmäßige Querstreifung).

Damit die Zellen mit verschiedenen Stoffen für fünf bis neun Stunden stimuliert werden und danach noch reproduzierbare Ergebnisse liefern konnten, wurden sie im Anschluss an die Isolation in einem Kulturmedium inkubiert. Das Rezept für das Medium wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich angewendet (Schuhmacher, 2006) und beruht auf in der Literatur beschriebene Angaben für Langzeitkulturmedien isolierter Kardiomyozyten (Clark et al., 1998; He et al., 1996). Nach der Inkubationszeit war die Zahl der vitalen Zellen nicht maßgeblich gesunken. Allerdings kam es zu einer deutlichen Verringerung der Ruhesarkomerlänge. Diese trat aber in allen Gruppen gleichmäßig auf und hatte somit keinen Einfluss auf die jeweiligen Zielgrößen.

Das für die Messung der Sarkomerverkürzung verwendete Reizmuster aus sieben verschiedenen Frequenzen wurde mit Bedacht gewählt. Zum ersten soll die 30-sekündige Pause zwischen zwei Frequenzen gewährleisten, dass die Zellen, die sich vor der Messung in Ruhelage befinden, auch während der Messung vor jeder Frequenz ebenfalls in Ruhelage sind. Das alternierende Muster aus niedrigen und höheren Frequenzen soll verhindern, dass ein Einfluss, der durch ansteigende oder absteigende Frequenzen bedingt sein könnte, auf die Zielvariablen wirkt. Die höchste gemessene Frequenz war 10 Hz, die bereits bei Tiemann et al. (2003) angewendet wurde. Diese haben bei Mäusen unter Kontrollbedingungen eine physiologische Herzfrequenz von $580 \pm 11 \text{ min}^{-1}$ gemessen. Das entspricht einer Frequenz von ca.

9,5 Hz. Damit liegt die hier in vitro angewendete Frequenz von 10 Hz im physiologischen Bereich in vivo. In allen bisher publizierten Arbeiten wurden isolierte Kardiomyozyten nur mit niedrigeren Frequenzen stimuliert, was ein weiteres Indiz für die hohe Qualität der hier verwendeten Zellen ist.

In den Experimenten wurden optisch die absolute Sarkomerlänge und die Verkürzung der Sarkomere gemessen. Diese Methode ist unabhängig von der Zellgröße und hat damit entscheidende Vorteile gegenüber den häufig verwendeten Zellverkürzungsmessungen (edge detection), bei der die Verschiebung der Zellränder als Maß für die Verkürzung angesehen wird. Wie Nair und Nair (2001) zeigen konnten, korreliert die Zellgröße mit dem Alter der Tiere. Aus diesem Grund ist bei der edge-detection-Methode eine Normierung auf die Ruhezelllänge nötig. Auf eine solche Normierung kann bei der Messung der Sarkomerverkürzung verzichtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Qualität der isolierten Kardiomyozyten außergewöhnlich gut ist, vor allem daran festgemacht, dass sie Stimulationsfrequenzen bis zu 10 Hz zulassen.

Die in dieser Arbeit zunächst verwendete LPS-Konzentration von 10 µg/ml Kulturmedium beruhte ursprünglich auf Angaben von Kinugawa et al. (1997) und Wagner et al. (1998), die diese Konzentration zur Stimulation von isolierten Kardiomyozyten von Ratten eingesetzt hatten. Diese Konzentration fand deshalb auch bereits in mehreren Experimenten unserer Arbeitsgruppe Anwendung (Baumgarten et al., 2006). Durch schrittweise Verringerung der Konzentration in den vorliegenden Versuchen um insgesamt das zehnfache konnte aber gezeigt werden, dass es zu keiner Änderung der depressiven Wirkung des LPS auf die Zellen kam. Dadurch ist anzunehmen, dass der LPS-Effekt maximal gesättigt war. Da es durch mit LPS kontaminierte Collagenase zu einer Präkonditionierung der Zellen mit LPS hätte kommen können, wurde der Kollagenaselösung während der Isolierungsprozedur Polymyxin B zugesetzt, wie es bei Lew et al. (1997) beschrieben ist.

Das Zeitfenster, das für die Messungen der kultivierten, mit LPS stimulierten Zellen und deren Kontrollen verwendet wurde, betrug 5 bis 8 Stunden. Es wurde vor allem deshalb gewählt, weil in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass der größte LPS-Effekt auf das Verkürzungsverhalten von Kardiomyozyten nach 5 h eintritt (Baumgarten et al., 2006). Für die Stimulierung der Zellen mit LTA und

PGN wurde ein Zeitintervall von 6 bis 9 h gewählt. Das stützt sich auf die Erfahrungen mit LPS. Es wurde angenommen, dass die Änderung des Verkürzungsverhaltens durch Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien einer ähnlichen zeitlichen Dynamik unterliegt.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde simultan zur Sarkomerlängenverkürzung die intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) gemessen. Diese erfolgte über eine Fluoreszenzmessung mit Fura-2/AM beladenen Zellen. Da diese simultanen Messungen in unserem Labor noch nie durchgeführt worden waren, galt es zunächst, ein geeignetes Beladungsprotokoll zu entwickeln. Die Konzentration des Fura-2/AM bei der Beladung der Zellen wurde aufgrund der wenigen Quellen in der Literatur zunächst empirisch ermittelt. Wichtig dabei war, einen Mittelweg zwischen beiden simultanen Messungen zu finden. Da der Farbstoff aus einem Kalziumchelator entwickelt wurde (Tsien et al., 1980), wirkt er auch als Puffer für Ca^{2+} -Ionen. Daher kam es bei zu hohen Konzentrationen dazu, dass zwar ein gutes, rauscharmes Signal der 340/380-Ratio aufgezeichnet wurde, dieses aber zu Lasten der Sarkomerverkürzung ging, da zuviel Ca^{2+} , das für die Verkürzung notwendig war, vom Farbstoff abgefangen wurde. Wurde die Beladungskonzentration hingegen zu gering gewählt, war die Messung der Sarkomerverkürzung von gewohnt guter Qualität, das Signal-Rausch-Verhältnis des Signals der $[Ca^{2+}]_i$ wurde jedoch zu schlecht. Ein guter Mittelweg konnte bei dem unter 2.3.5.3 angegebenen Beladungsprotokoll gefunden werden.

Ein Nachteil der simultanen Messung der $[Ca^{2+}]_i$ und der Sarkomerlängenmessung war sicherlich, dass die Qualität der Zellen durch die Beladung mit Fura-2 deutlich gesunken ist. Das äußerte sich vor allem darin, dass das komplette Reizmuster mit sieben verschiedenen Frequenzen nicht durchführbar war. So zeigte sich bei der Testung der einzelnen Reizfrequenzen, dass vier Hertz die höchste Frequenz war, bei der noch sinnvolle Sarkomerverkürzungen messbar waren. Ein möglicher Grund dafür mag die Pufferwirkung des Fura-2 sein, durch die die Elimination des Ca^{2+} aus dem Cytosol deutlich verlangsamt wird. Es sollte weiterhin noch erwähnt werden, dass die $[Ca^{2+}]_i$ lediglich als relatives Maß, nämlich dem Bruch aus den einzelnen Emissionshelligkeiten bei 340 und 380 nm Anregungslicht, angegeben wird. Diese ist jedoch proportional zur tatsächlichen Kalziumkonzentration in nM und dadurch ein verlässliches Maß.

Was in Bezug auf die simultane Messung der $[Ca^{2+}]_i$ und Sarkomerlänge sicherlich noch diskutiert werden muss, ist die Aussagekraft der Tyrodegruppe. In der reinen Sarkomerlängenmessung konnte sie ohne Frage als Kontrolle zur Gruppe Kultur eingesetzt werden, da es hier in den meisten Frequenzen zu keinen signifikanten Unterschieden kommt. Dies ist in den Ergebnissen der Sarkomerverkürzungsmessungen zu sehen. Der einzige Parameter, in dem die Tyrodegruppe sich von der Gruppe Kultur unterscheidet, ist die Ruhesarkomerlänge, wie es ebenfalls auch bei Kempelmann (2005) und Schuhmacher (2006) auftrat. Gründe dafür sind nicht bekannt. Bei der Verkürzungsmessung während der simultanen Messung ändern sich diese Verhältnisse nicht. Betrachtet man jedoch nur die Daten der Messung der $[Ca^{2+}]_i$, ist zu erkennen, dass die Mittelwerte der Gruppe Tyrode sich sowohl bei WT als auch bei TLR4^{-/-} Mäusen bei allen Parametern außer der Dauer der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ von der Gruppe Kultur unterscheiden. Es ist somit anzunehmen, dass das Kulturmedium, wie auch immer, einen bedeutenden Einfluss entweder auf die Kalziumtransiente oder die Kalziumbindung während der Verkürzung hat. Ein möglicher Grund dafür könnte die Verwendung von Serum im Kulturmedium sein, das nach Chao et al. (2005) einen entscheidenden Einfluss auf $[Ca^{2+}]_i$ und Kontraktilität von Kardiomyozyten hat.

Insgesamt lässt sich zur Messung der $[Ca^{2+}]_i$ aber sagen, dass aufgrund des relativ geringen Standardfehlers recht zuverlässige Messwerte aufgezeichnet wurden, und dies bei allen Gruppen. Aufgrund dessen kann man davon ausgehen, dass die relative Vergleichbarkeit dieses Maßes sehr gut ist.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde versucht, einen direkten Zusammenhang zwischen $[Ca^{2+}]_i$ und Sarkomerlänge nachzuweisen. Dazu sollte die $[Ca^{2+}]_i$ nur langsam ansteigen und so in der Herzmuskelzelle eine Kontraktur ausgelöst werden. In isolierten, mit Fura-2/AM beladenen Kardiomyozyten wurde dafür zunächst mit Coffein eine Entleerung des Kalziums aus dem SR provoziert und eine Ca^{2+} -Wiederaufnahme ins SR mit einer gleichzeitigen Gabe Thapsigargin, einem Hemmstoff der SERCA, verhindert. Diese Methode der SR-Entleerung wurde in der Vergangenheit bereits in vielen Experimenten angewendet (Bassani und Bers, 1995; Bradley et al., 2002). Anschließend wurden die Zellen mit einer Na^+ -freien Tyrodelösung umspült. Zum Ausgleich der durch das Fehlen von Na^+ geringeren Osmolarität der Lösung wurde Cholin eingesetzt. Durch das fehlende extrazelluläre

Natrium sollte die Funktion des NCX umgekehrt werden, sodass er dem Konzentrationsgradienten folgend einen Auswärtsstrom von 3 Na⁺ und einen Einstrom von 1 Ca²⁺ vermittelt und somit zu einem langsamen Anstieg der [Ca²⁺]_i führt. Diese reverse Funktion des NCX ist in der Literatur bereits oft beschrieben (Übersichtsartikel: Hilgemann, 2004). Sie kann erhöht werden durch eine Erhöhung der intrazellulären Na⁺-Konzentration, einen Umstand, den man sich bei der Digitalistherapie gegen Herzinsuffizienz zunutze macht (Bers, 2001). Diese Therapie bewirkt, dass die Na⁺/K⁺-ATPase gehemmt wird, was eine erhöhte intrazelluläre Na⁺-Konzentration zur Folge hat. Dies bewirkt eine Hemmung des NCX und resultiert in einem erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Gehalt und einer erhöhten Ca²⁺-Freisetzung aus dem SR. Das wiederum verstärkt die elektromechanische Koppelung und erhöht die kardiale Kontraktilität (Karow und Lang-Roth, 2004).

In der vorliegenden Arbeit zeigten die Zellen eine relativ konstante und vergleichbare Kontraktur, sobald die Tyrode in der Messkammer durch Na⁺-freie Tyrode ersetzt war. Das deutet darauf hin, dass es sowohl zu einer vollständigen Entleerung des SR kam als auch die reverse Funktion der NCX eingetreten war. [Ca²⁺]_i und Sarkomerlänge verhielten sich dabei antiproportional. Da jedoch bereits in den Baselinewerten der Ruhesarkomerlänge Varianzen von ca. 0,1 µm zu beobachten waren, war ein direkter Zusammenhang zwischen [Ca²⁺]_i und Sarkomerlänge nicht zu erkennen. Aus diesem Grund wurde lediglich die Steigung der Regressionsgeraden der einzelnen Zellen ausgewertet. Auch wenn mit diesen Experimenten das gewünschte Ziel nicht erreicht werden konnte, so diente diese Versuchsreihe doch zur Validierung der Ergebnisse der simultanen [Ca²⁺]_i- und Kontraktionsmessungen mit externer Stimulation.

4.2. Frequenzabhängigkeit der Sarkomerverkürzung unter Kontrollbedingungen

Dass die Verkürzung von Kardiomyozyten sich nach einer Stimulationspause zu einem Gleichgewicht hin ändert, ist lange bekannt. Es können positive und negative Herztreppe auftreten. Bei einer negativen nimmt die Verkürzung sukzessive ab bis zum Erreichen des Gleichgewichts, bei der positiven Herztreppe ist es umgekehrt. Dieses Verhalten von Kardiomyozyten lässt sich bei allen Spezies beobachten, es

scheint aber speziesspezifische Unterschiede zu geben. So wurden bei Herzmuskelstreifen von Fröschen oder bei humanen Herzmuskeltrabekeln positive Herztreppe beobachtet (Niedergerke et al., 1956; Pieske et al., 1999). Negative Herztreppe hingegen traten bei Ratten auf (Bers, 2001; Borzak et al., 1991).

In den vorliegenden Untersuchungen zeigen die Herztreppe bei isolierten Kardiomyozyten unter Kontrollbedingungen frequenzabhängige Unterschiede. So sind sie bei Frequenzen kleiner vier Hertz negativ, während bei Reizfrequenzen ab sechs Hertz positive Herztreppe auftreten. Dieses Phänomen konnte in der Vergangenheit bereits von Tiemann et al. (2003) gezeigt werden. An isolierten ventrikulären Kardiomyozyten der Ratte ist es auch bereits beschrieben worden (Borzak et al., 1991).

Der Grund für die Ausbildung der Herztreppe liegt in der initialen Ca^{2+} -Beladung des SR nach Stimulationspause. Da bei der Maus die SERCA ca. 90% der Ca^{2+} -Elimination bei der Relaxation ausmacht, füllt sich das SR während der Stimulationspause. Dadurch kommt es zu der in dieser Arbeit beobachteten stets größten Postrest-Verkürzung nach der 30-sekündigen Pause. Bei der negativen Herztreppe ist das SR nach jeder Verkürzung sukzessive weniger gefüllt, bis es schließlich zu einem Gleichgewicht kommt, in dem die SR-Beladung stagniert und der NCX genauso viel Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytosol ausschleust wie der L-Typ Ca^{2+} -Kanal bei der Erregung in die Zelle lässt.

Es treten aber auch bei der Betrachtung der Verkürzungen im Gleichgewicht Frequenzabhängigkeiten auf. So zeigt sich in den vorliegenden Experimenten ein biphasischer Verlauf der Verkürzungsamplitude in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz bei den isolierten Herzmuskelzellen der Kontrollgruppen. Bei 0,5 Hz ist die Verkürzungsamplitude maximal und sinkt bis zu einem Minimum bei 2 Hz. Bei weiter steigender Frequenz steigt die Verkürzungsamplitude wieder an bis sie zwischen 8 und 10 Hz wieder ein Maximum erreicht. Der hier beobachtete zweigipflige Verlauf bei der adulten Maus wurde bereits mehrfach beschrieben (Borzak et al., 1991; Ito et al., 2000; Stuyvers et al., 2002; Tiemann et al., 2003). Dieser Verlauf scheint dabei aber speziesspezifisch zu sein. So konnte bei verschiedenen Versuchstierspezies und auch beim Menschen eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung gezeigt werden (Endoh, 2004; Pieske et al., 1999; Vila-Petroff, 2003). Hier wurden aber nur Frequenzbereiche untersucht, die im Bereich der physiologischen Herzfrequenzen der jeweiligen Spezies liegen. Tiemann et al. (2003)

zeigten bei adulten Mäusen unter Kontrollbedingungen eine Herzfrequenz von ca. $580 \text{ min}^{-1} \approx 9,5 \text{ Hz}$. In diesem Bereich zeigt die Maus ebenfalls eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung.

Ein möglicher Grund für die positive Inotropie bei höheren Reizfrequenzen könnte eine Veränderung der Regulation des Kalziums sein. Je höher die Reizfrequenz wird, desto mehr Kalzium strömt pro Zeiteinheit über spannungsabhängige Kalziumkanäle in die Zelle ein, da pro Zeiteinheit mehr Kanäle aktiviert werden. Gleichzeitig kann der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), der in hohem Maße an der Hinausbeförderung des Kalziums aus dem Intrazellulärraum beteiligt ist, weniger Kalzium aus der Zelle befördern, da diese bei höheren Frequenzen bei gleich bleibender Dauer des Aktionspotentials längere Zeit depolarisiert sind. Um aber nun die ansteigende $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auszugleichen, steigt die Aktivität der sarkoplasmatischen Kalzium-ATPase (SERCA), die die freien Ca^{2+} -Ionen aus dem Cytosol in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) pumpt. Beim nächsten Reiz wird nun dieses mehr vorhandene Kalzium über den Ryanodinrezeptor aus dem SR freigesetzt und steht der nächsten Kontraktion voll zur Verfügung, was den positiv inotropen Effekt bedingt.

Der Anteil des NCX scheint dabei je nach Spezies unterschiedlich zu sein. So ist der NCX bei Maus und Ratte nur zu 7% an der Elimination des intrazellulären Kalziums während der Relaxation beteiligt, während er beim Kaninchen einen Anteil von 28% hat (Bers, 2002). Der Großteil von 92% (Ratte, Maus) oder 70% (Kaninchen) der Kalzium-Entfernung wird von der SERCA übernommen. Langsame Systeme, wie die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase und der mitochondriale Ca^{2+} -Uniporter haben bei allen Spezies mit 1 - 2% eine untergeordnete Rolle (Bers, 2002). Dadurch kommt es bei der Maus zu einer relativ höheren Kalziumkonzentration im SR in der Diastole.

Wang et al. (1988) konnten an Papillarmuskeln von Meerschweinchen zeigen, dass die intrazelluläre Na^+ -Konzentration frequenzabhängig erhöht ist. Sollte dies bei der Maus ebenfalls der Fall sein, könnte dadurch der Kalziumausstrom über den NCX durch Verminderung der treibenden Kraft eingeschränkt sein (Shattock und Bers, 1989), was wiederum zu einer frequenzabhängig höheren $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Diastole führt und so die positive Inotropie zusätzlich begünstigt.

Ebenso Einfluss auf die Regulation der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und damit auf die positive Inotropie bei hohen Reizfrequenzen könnte dem Phospholamban (PLB) zugesprochen werden. PLB ist eine Proteinkinase, die inhibitorisch auf die SERCA wirkt und so zu einer verminderten Aufnahme von Ca^{2+} in das SR führt. Bei Phosphorylierung des PLB wird

diese inhibitorische Wirkung aufgehoben (Koss und Kranias, 1996). Bei Experimenten mit PLB-defizienten Mäusen zeigten diese eine negative Kraft-Frequenz-Beziehung im Gegensatz zu den Kontrolltieren (Bluhm et al., 2000). Das deutet darauf hin, dass die positive Kraft-Frequenz-Beziehung unter physiologischen Bedingungen vom PLB entscheidend beeinflusst wird.

Gao et al. (1998) beobachteten bei simultanen Messungen der Zellverkürzung und der $[Ca^{2+}]_i$ eine überproportionale Zunahme der erzielten Verkürzung im Vergleich zur Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ bei steigender Frequenz. Aufgrund dieser Ergebnisse schlossen sie auf eine weitere Möglichkeit für die positive Inotropie, die nur indirekt von der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ beeinflusst ist, nämlich einer Sensitivierung der Myofilamente für Ca^{2+} . Die Experimente wurden jedoch bei Raumtemperatur durchgeführt und sind somit nicht mit den vorliegenden Ergebnissen zu vergleichen. Wie Lim et al. (2000) nämlich zeigen konnten, besteht ein Zusammenhang zwischen Kraft-Frequenz-Beziehung und der Temperatur.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass isolierte Kardiomyozyten der Maus unter physiologische Bedingungen eine positive Kraft-Frequenz-Beziehung zeigen, was durch diese Arbeit untermauert wird. Dieses Phänomen ist seit langem bekannt und sicher multifaktoriell.

4.3. Auswirkungen von LPS auf die Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyozyten, deren Abhängigkeit von TLR4 und deren Beeinflussung durch E5564

Bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts konnte Richard Pfeiffer, ein Mitarbeiter von Robert Koch am Institut für Infektionskrankheiten, mit Lysaten von hitze-inaktivierten Cholera-Bakterien bei Meerschweinchen einen septischen Schock auslösen. Er schloss daraus, dass es in der Bakterienzelle ein hitzstabiler Stoff geben muss, den er aufgrund dessen Endotoxin nannte (Alexander und Rietschel, 2001; Pfeiffer, 1892). Erst 1943 konnte dieser Stoff extrahiert und chemisch bestimmt werden. Er erhielt daraufhin einen neuen Namen nach seiner chemischen Struktur: Lipopolysaccharide (Shear und Turner, 1943). Heute weiß man, dass LPS ein essentieller Bestandteil der äußeren Zellmembran der meisten gram-negativen

Bakterien ist und einer der stärksten bekannten immunstimulatorischen Stoffe ist (Alexander und Rietschel, 2001).

Bereits in der Einleitung wurde erläutert, dass LPS nach Lyse der Bakterien an LBP gebunden an CD14 bindet, der dann wiederum eine Verbindung mit dem TLR4/MD-2 Komplex eingeht und so die Weiterleitung des Signals ins Zellinnere vermittelt. Eine Wirkung wird aber nicht direkt erzielt sondern über eine mit mehreren Zwischenschritten versehene Kaskade verschiedener Proteinkinasen.

Diese LPS/TLR4-Signalkaskade lässt sich einteilen in zwei verschiedene Wege. Der erste wird früh aktiviert und ist abhängig vom Myeloid-Differenzierungsprotein 88 (MyD88), einem Adaptorprotein, das mit der C-terminalen TIR-Domäne an die intrazytoplasmatische TIR-Domäne des TLR4 bindet. Aminoterminal hat MyD88 eine so genannte death domain (DD), die das Signal weiterleitet. Neben MyD88 gibt es in diesem Signalweg noch ein Adaptorprotein, das MyD88-adaptor like protein (Mal), das ebenso notwendig ist. Mal-Knockout Mäuse zeigten ebenso wie MyD88-defiziente Mäuse eine Resistenz gegenüber der Toxizität von LPS (Pålsson-McDermott und O'Neill, 2004). Die DD von MyD88 gibt das Signal weiter durch Bindung und Aktivierung von Interleukin-Rezeptor assoziierte Kinasen (IRAK). Diese durch Phosphorylierung aktivierten Proteine interagieren weiter mit dem TNF-Rezeptor assoziierten Faktor 6 (TRAF6). Dieser aktiviert wiederum die Transformierende-Wachstumsfaktor- β -aktivierende Kinase 1 (TAK1), die das inhibitorische Bindungsprotein B veranlasst, I κ B zu phosphorylieren. Dieses spaltet sich in dieser Form vom Nukleären Faktor κ B (NF- κ B) ab, der dann in den Zellkern transloziert werden kann (Kopp und Medzhitov, 1999; Pålsson-McDermott und O'Neill, 2004). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der an die Promotoren der Gene verschiedener Zytokine wie TNF- α , IL-1 β aber auch der iNOS bindet und so ihre Transkription induziert.

Zusätzlich zu dem erklärten Weg ist später auch noch ein von MyD88 unabhängiger Signalweg beschrieben worden. Wie an MyD88-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte, kommt es nach LPS-Gabe dennoch zur Bildung von NF- κ B, aber zeitlich verzögert (Lakhani und Bogue, 2003; Pålsson-McDermott und O'Neill, 2004). Die ersten Adaptormoleküle an TLR4 bei diesem Signalweg sind das TIR-enthaltende Adaptormolekül TRIF und das TRIF-zugehörige Adaptormolekül (TRAM). Diese leiten das Signal weiter und aktivieren TRAF6 und den Interferon-response factor 3 (IRF3). Dies ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription des Gens

von IFN- β induziert. Der weitere Signalweg ab TRAF6 entspricht dem des MyD88-abhängigen Weges (Lakhani und Bogue, 2003; Pålsson-McDermott und O'Neill, 2004).

Die Produktion und Expression der Zytokine führt weiterhin zu einer direkten Verminderung der Funktion von Kardiomyozyten, wie es im septischen Schock beobachtet werden kann (Kapadia et al., 1995; Müller-Werdan et al., 1998; Pagani et al., 1992). So konnte an Kardiomyozyten gezeigt werden, dass Stimulation mit TNF- α zu einer Dysfunktion führt (Finkel et al., 1992; Goldhaber et al., 1996; Pagani et al., 1992).

Eine wichtige Frage, die stets in der Literatur diskutiert wird, ist aber, ob Kardiomyozyten selbst LPS erkennen können und ihrerseits Zytokine bilden können. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die Anwesenheit von immunkompetenten Zellen notwendig ist, die ihrerseits über TLR4 das LPS erkennen können, das Signal weiterleiten können und Zytokine sezernieren, die zur Dysfunktion der Kardiomyozyten führen. Dass TLR4 auf Kardiomyozyten exprimiert wird, konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden (Comstock et al., 1998; Frantz et al., 1999). Ob über ihn aber ein wirkungsvoller Signalweg in Gang gesetzt werden kann, der zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen führt, wird diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch verschiedene Versuchsansätze gezeigt werden, dass es in isolierten Kardiomyozyten nach LPS-Behandlung zur Dysfunktion kommt. So zeigten sich in Bezug auf die Verkürzungsamplitude, Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit und Dauer der Verkürzung negative Auswirkungen der LPS-Stimulation im Vergleich zu den Kontrollzellen bei WT Mäusen (C3H/HeN und C57BL/6). Da die Zellen *in vitro* stimuliert worden sind, also nach der Isolation ohne die Anwesenheit von Immunzellen, kann man davon ausgehen, dass die Kardiomyozyten selbst das LPS erkennen und die Weiterverarbeitung dieses Signals vermitteln. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Tao und McKenna (1994), die bei isolierten Kardiomyozyten, also ohne Anwesenheit von Immunzellen, nach *in vitro* Stimulation mit LPS ebenfalls verlängerte Verkürzungs- und Relaxationszeiten zeigen konnten.

Weiterhin lässt sich an den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ablesen, dass der negative LPS-Effekt auf die Kardiomyozyten TLR4-vermittelt ist. Die LPS-Stimulation hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Funktion isolierter Kardiomyozyten von TLR4^{-/-} Mäusen. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung

von Tieren, deren TLR4-Rezeptorgen gentechnisch ausgeschaltet wurde, die Abhängigkeit der LPS-Erkennung und der Weiterleitung des Signals vom TLR4 auf Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Durch den gleichen Versuchsaufbau konnte dies auch schon von Baumgarten et al. (2006) gezeigt werden. Hier wurden allerdings C3H/HeJ Mäuse verwendet, die eine Spontanmutation im TLR4-Gen haben, sodass die Weiterleitung des Signals ins Zellinnere nicht mehr möglich ist (Poltorak et al., 1998). Bei spontanmutierten Tieren lassen sich mögliche andere Einflüsse nicht ausschließen.

Tavener et al. (2004) beschrieben in ihrer Arbeit die Notwendigkeit von Zellen des Immunsystems, um einen LPS-Effekt bei Kardiomyozyten zu erzielen. Zwar sahen sie bei isolierten Herzmuskelzellen von WT Tieren, denen zuvor intraperitoneal LPS verabreicht wurde, eine signifikante Verminderung der Verkürzungsamplitude. Bei in vitro Stimulation von WT Zellen durch Inkubation für 4 h in einem LPS-haltigen Kulturmedium konnten sie jedoch keinen Effekt erkennen.

Gründe für die gegensätzlichen Beobachtungen müssen vor allem in der Dauer der Inkubationszeit gesucht werden. Während Tavener et al. ihre Zellen nach 4-stündiger Stimulation gemessen haben, erfolgten die Messungen in der vorliegenden Arbeit nach mind. 5 h. Diese Zeit stützt sich zum einen auf eine Reihe von Arbeiten, in denen der beschriebene LPS-Effekt jeweils nach 5 h aufgetreten war (Lew et al., 1997b; Tao und McKenna, 1994; Wagner et al., 1998; Yasuda et al., 1997). Zum anderen konnte durch Messung einer zeitlichen Kinetik der Wirkung von LPS in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass es nach 5-stündiger Inkubation in LPS-haltigem Kulturmedium zu einer signifikanten Verminderung der Sarkomerverkürzung kommt (Baumgarten et al., 2006).

LPS war bereits seit langer Zeit als Virulenzfaktor mit vielen schwerwiegenden klinischen Erscheinungen bekannt. Aus diesem Grund war man schon früh, lange vor Entdeckung des eigentlichen LPS-Rezeptors TLR4, bestrebt, einen Weg zu finden, um die Wirkung von LPS zu antagonisieren.

Die ersten Bemühungen bezogen sich auf Lipid X, einer Monosaccharid-Vorstufe in der Biosynthese von LPS in *E. coli*. Dieser Stoff war bekannt für seine LPS-antagonistische Wirkung und zeigte auch protektive Wirkung bei Mäusen und Schafen gegen LPS-induzierte akute letale Toxizität (Golenbock et al., 1987; Proctor et al., 1986). Ebenso konnte in einigen, wenigen Zelllinien seine inhibitorische

Wirkung auf LPS gezeigt werden (Danner et al., 1987; Pohlman et al., 1987; Schwartz et al., 1989). Der Versuch der Entwicklung eines potenten Antagonisten war aber von begrenztem Erfolg (Christ et al., 1995).

Loppnow et al. (1989) fanden heraus, dass Lipid IV_A, eine Disaccharid-Vorstufe des LPS, die Bildung von IL-1 β in humanen LPS-stimulierten Monozyten verhinderte. In einer anderen Studie wurde berichtet, dass die TNF- α Produktion in stimulierten humanen, weißen Blutzellen durch diesen Stoff unterdrückt wird (Kovach et al., 1990). Bei der Untersuchung der biologischen Aktivität von Lipid IV_A fand man aber bedeutende Unterschiede heraus zwischen humanen Zellen, wo es antagonistische Wirkung zeigt, bzw. murinen Zellen, in denen es agonistische Wirkung hat (Golenbock et al., 1991).

Die antagonistische Wirkung all dieser Stoffe schien dabei immer kompetitiver Natur zu sein.

Weiterhin wurden Lipid A Moleküle der nichtpathogenen Bakterienstämme *Rhodobacter (R.) capsulatus* und *sphaeroides* entdeckt, die ebenfalls LPS-antagonistische Eigenschaften aufwiesen (Christ et al., 1995). Aus einem Struktur analog von Lipid A von *R. capsulatus* wurde später das synthetische E5531 entwickelt. Es wurde chemisch modifiziert insofern, als dass zwei Acylreste über eine Ätherverbindung an die jeweiligen Zuckermoleküle gekoppelt sind anstelle von Esterverbindungen, Veränderungen, die vor allem der Stabilität des Moleküls dienen (Alexander und Rietschel, 2001). E5531 zeigte keinerlei agonistische Eigenschaften in in vitro-Experimenten. In vivo-Studien an Mäusen zeigten, dass E5531 sowohl einen positiven Einfluss auf die Sterblichkeit nach LPS-Injektion und auch auf die nach einer Infektion mit lebenden *E. coli* hat (Christ et al., 1995).

E5531 zeigte bei der Anwendung eine zeitabhängige, steil nachlassende Aktivität, die einer Interaktion mit Plasmalipoproteinen zugeschrieben wurde (Wasan et al., 1999; Rose et al., 2000). Daraufhin wurde als zweite Generation E5564 entwickelt, das aus einem Struktur analog von *R. sphaeroides* Lipid A (RSLA) gewonnen wurde (Mullarkey et al., 2002). Im Gegensatz zu E5531 weist es eine deutlich geringere strukturelle Komplexität auf und zeigt eine höhere Aktivität und bessere pharmakologische Eigenschaften (Mullarkey et al., 2002).

Dieser Stoff kam bereits in mehreren Studien, unter anderem am Menschen zum Einsatz. Dort konnte an gesunden Probanden gezeigt werden, dass die

Zytokinproduktion nach LPS-Gabe durch eine gleichzeitige Dauertropfinfusion komplett gehemmt wird (Lynn et al., 2004).

Da es, wie oben erläutert, in isolierten Kardiomyozyten zu einer verminderten Kontraktilität infolge LPS-Stimulation kommt und diese wie aus eigenen Ergebnissen zu sehen, abhängig vom kardialen TLR4 ist, lag es nahe zu untersuchen, ob dieser Effekt durch den zusätzlichen Einsatz von E5564 blockiert werden kann. Diese Untersuchungen zeigen ein deutliches Bild. E5564 ist in der Lage, den Effekt von LPS auf die Sarkomerverkürzungsamplitude bei allen gemessenen Frequenzen zu blockieren. Dies gilt ebenso für die Verkürzungsgeschwindigkeit und die Dauer der Verkürzung. Die verminderte Relaxationsgeschwindigkeit durch LPS-Behandlung konnte von E5564 nicht vollständig verhindert werden. Dies könnte an einer noch zu niedrig gewählten Konzentration des E5564 gelegen haben.

Allerdings scheint es zumindest bei in vitro Experimenten notwendig zu sein, den Stoff mehrere Male nachzugeben, da seine Wirkung rasch abnimmt. Dies ist auch schon von Rossignol und Lynn (2002) beobachtet worden.

In diesem Abschnitt konnte dargestellt werden, dass LPS als Modell einer gram-negativen Sepsis zu einer verminderten Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten der Maus führt. Des Weiteren konnte durch den Einsatz von TLR4^{-/-} Mäusen gezeigt werden, dass der TLR4 auf ventrikulären Kardiomyozyten exprimiert wird und dass die reduzierte Kontraktilität dieser Zellen durch LPS-Stimulation über den TLR4 vermittelt wird. Welche Bedeutung der myokardiale TLR4 für die Entwicklung der septischen Kardiomyopathie sowohl im Ganztiermodell als auch in der Sepsis beim Patienten hat, oder ob der Hauptanteil über die Bildung von Zytokinen durch immunkompetente Zellen vermittelt ist, lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht sagen und wäre daher ein Ansatzpunkt für weitere Experimente.

E5564 kann als kompetitiver Antagonist des LPS die depressive Wirkung auf die Herzmuskelzellen aufheben und ist somit als möglicher Therapieansatz in Betracht zu ziehen. Ob die Symptome der Sepsis wirksam mit E5564 bekämpft werden können und E5564 als Therapeutikum am Patienten eingesetzt werden kann, wird in klinischen Studien der Phase III zurzeit geklärt.

4.4. Abhängigkeit des LPS-Signalweges in isolierten Kardiomyozyten von iNOS

Stickstoffmonoxid (NO) ist das kleinste bekannte bioaktive Molekül in Zellen von Säugetieren, das von den meisten Zelltypen produziert werden kann (Kleinert et al., 2003). Es ist ein ubiquitärer inter- und intrazellulärer Botenstoff, der eine Fülle von Funktionen hat, wie etwa das Anpassen des Blutflusses, die Beeinflussung der Blutgerinnung oder auch der neuronalen Aktivität. Es spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der unspezifischen Abwehr in Bezug auf die Bekämpfung von Tumoren und Pathogenen (Beckman und Koppenol, 1996). Im Herzen verhält sich NO als ein endogener Inhibitor, der der positiv inotropen Wirkung durch β -adrenerge Stimulation entgegenwirkt (Panas et al., 1998). Wohl auch aus diesen Gründen wurde NO 1992 von der Zeitschrift Science zum „Molekül des Jahres“ gewählt (Balligand und Cannon, 1997).

NO wurde erst 1985 durch LPS-induzierte Nitrat- und Nitrit-Bildung in Makrophagen entdeckt (Stuehr und Marletta, 1985). 1988 wurde NO als initiales Produkt erkannt (Marletta et al. 1988), aus dem Nitrat und Nitrit gebildet wird.

Die Bildung von NO geschieht über die NO-Synthasen (NOS). Sie katalysieren die Reaktion von L-Arginin, O_2 und dem Coenzym NADPH zu L-Citrullin und dem freien Radikal NO (Kelly et al., 1996). Bis heute wurden drei verschiedene NOS-Typen in Säugetierzellen beschrieben. Sie wurden zunächst in verschiedenen Gewebetypen nachgewiesen: im Gehirn die neuronale NOS (nNOS, NOS1), in Makrophagen die induzierbare NOS (iNOS, NOS2) und in Endothelzellen die endotheliale NOS (eNOS, NOS3) (Balligand und Cannon, 1997). Die beiden Enzyme nNOS und eNOS werden Ca^{2+} -abhängig und in fortlaufend pulsartiger Weise exprimiert und werden daher auch als konstitutive NOS (cNOS) zusammengefasst. Die resultierende NO-Konzentration ist auf einem eher niedrigen Niveau. Alle drei Isoformen der NOS kommen im Herzen vor. Die nNOS wird in sympathischen Nervenendigungen exprimiert und reguliert die Freisetzung von Katecholaminen im Herzen. Die endotheliale NOS wird außer in endothelialen und endokardialen Zellen auch konstitutiv in Kardiomyozyten exprimiert, wenn auch zu einem sehr viel geringeren Teil, wo sie autokrin den positiv inotropen Effekten der Katecholamine durch muskarinerge und β -adrenerge Rezeptor Stimulation entgegenwirkt (Balligand und Cannon, 1997). Dagegen wird iNOS Ca^{2+} -unabhängig nur nach Stimulation durch verschiedene Reize wie Zytokine gebildet (Kojda und Kottenberg, 1999). Das Enzym katalysiert anschließend

kontinuierlich die Reaktion zur Bildung einer hohen Menge NO, solange, bis es wieder abgebaut wird (MacMicking et al., 1997).

Die verschiedenen NOS sind Produkte verschiedener Gene mit unterschiedlicher Lokalisation und daher auch unterschiedlicher Regulation. Beim Menschen gibt es 51 – 57% Homologie zwischen den Isoformen (Kleinert et al., 2003). Wie die Analyse des Promotors des Gens für die iNOS zeigte, wird die Regulation der Transkription einerseits über NF- κ B aber andererseits auch über andere Transkriptionsfaktoren, die durch TNF- α und IL-6 induziert werden, vermittelt. (Kleinert et al., 2003; Lin et al., 1996). Kan et al. (1999) berichteten, dass IL-1 β alleine die iNOS-Produktion induziert, während dies für TNF- α nicht zutrifft. Laut dieser Autoren verstärkt dieses Zytokin aber den Effekt des IL-1 β über MAP-Kinasen und NF- κ B.

Damit ist eine direkte Verbindung der Wirkung von LPS über die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und NF- κ B bis hin zur Bildung von iNOS beschrieben.

Die hohen Konzentrationen von NO, die durch die Induktion der iNOS gebildet werden, können einerseits nützliche mikrobiozide, antivirale, antiparasitäre und antitumorale Effekte haben (Bogdan, 2001). Andererseits scheint eine aberrant hohe NO-Produktion an einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt zu sein, wie Asthma, Psoriasis, in der Tumorentwicklung oder auch im septischen Schock (Kleinert et al., 2003). Im Herzen kann NO kardioprotektiv sein (Rubbo et al., 1996) und als antioxidatives Molekül fungieren (Wink et al. 1993). Zu hohe Konzentrationen führen jedoch zu kontraktilen Dysfunktionen in Kardiomyozyten (Kelly et al., 1996; Balligand et al., 1993; Brady et al., 1992).

Dass es einen Zusammenhang zwischen einer LPS-Exposition und der Expression der iNOS gibt, wurde bereits früher berichtet. So konnte schon gezeigt werden, dass eine Endotoxämie zur Expression der iNOS im Herzmuskel führt (Schulz et al., 1992). Wei et al. (1995) berichteten, dass sich iNOS knock out Mäuse resistent gegenüber einer LPS-induzierten Mortalität zeigten. Baumgarten et al. (2006) zeigten, dass es in isolierten Kardiomyozyten, die in vitro mit LPS stimuliert worden waren, zu einer erhöhten iNOS-Expression im Vergleich zu Kontrollzellen kam. Weiterhin zeigten sie, dass eine durch LPS induzierte verminderte Sarkomerverkürzung von Kardiomyozyten durch Blockade der iNOS komplett aufgehoben werden konnte. Dabei folgte die iNOS-Expression einer zeitlichen Kinetik. So wurde sie erst nach mehreren Stunden nach LPS oder Zytokin-

Stimulation beobachtet, wobei das Maximum bei 6 h lag (Luss et al., 1995, Balligand et al., 1994, Schulz et al., 1992). Dass die Expression der iNOS auch einen Einfluss auf die Funktion kardialer Myozyten hat, zeigten Brady et al. (1992) an Zellen von Meerschweinchen. Finkel et al. (1992) konnten zeigen, dass die kardiale Depression durch proinflammatorische Zytokine über NO vermittelt ist.

Die für diese Arbeit erzielten Ergebnisse lassen bezüglich der Sarkomerverkürzung deutlich erkennen, dass sich die verminderte Kontraktilität LPS-stimulierter Zellen durch Inhibierung der iNOS komplett blocken lässt. Sowohl die Verkürzungsamplitude als auch Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit der Zellen der Gruppe Kultur + LPS + SMT unterscheiden sich nicht signifikant von denen der Gruppe Kultur. Die Expression der iNOS in isolierten Kardiomyozyten ist also ein notwendiger Zwischenschritt für die verminderte Funktionalität dieser Zellen durch den Einfluss von LPS.

Einige Autoren postulieren jedoch, dass es in der Sepsis nicht zu einer Aktivierung der iNOS kommt. So berichteten Yokoyama et al. (1993), dass es durch Inhibierung der NOS zu keiner Verminderung des negativ inotropen Effektes von TNF- α kommt. Jedoch haben die Autoren die NOS-Inhibitoren bereits eine Stunde vor der Stimulation mit TNF- α zugegeben. Die Untersuchungen erfolgten 30 min nach der Stimulation. Da das Maximum der iNOS-Expression aber erst nach 6 h erfolgt, ist es wahrscheinlich, keinen Effekt durch NO zu sehen. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte in ihren Experimenten an isolierten Papillarmuskeln der Ratte, dass SMT zwar die verminderte Kontraktilität durch LPS wieder aufhebt, dass aber die NO-Konzentration nicht mit der kardialen Depression korreliert (Afulukwe et al., 2000). Des Weiteren gibt es noch Berichte, in denen die Anwendung von Blockern der NOS die durch LPS induzierte verminderte Kontraktilität nicht aufheben konnte (Keller et al., 1997; Klabunde et al., 1995; Toth und Heard 1997).

Eine weitere Möglichkeit der Einflussnahme der iNOS und des NO auf die kardiale Kontraktilität während der Sepsis ist die Bildung von Radikalen. Durch das gehäufte Auftreten von NO ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass es zur Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻) kommt (Beckman and Koppenol, 1996; Ferdinandy et al., 2000; Mungrue et al., 2002), gebildet aus einer Reaktion von NO mit dem Sauerstoffradikal Superoxid (O₂⁻). So konnten erhöhte Konzentrationen NO und ONOO⁻ sowohl in septischen Herzen als auch in mit LPS stimuliertem Myokardgewebe gefunden werden (Luss et al., 1995; Kooy et al., 1997; Flesch et al., 1999).

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ONOO^- Anteil hat an zytokin- oder LPS-induzierter myokardialer Depression (Ferdinandy et al., 2000; Panas et al., 1998). Kahdour et al. (2002) berichteten, dass in Herzen von mit LPS stimulierten Ratten neben reduzierter kardialer Funktion sowohl die NO- als auch die O_2^- -Produktion verstärkt war, was ebenfalls zu einer erhöhten Bildung von Peroxynitrit führte. Nach einer Studie von Brunner und Wolkart (2003) führt ONOO^- zu einer Depression der Herzfunktion durch eine verminderte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente, was nur teilweise durch einen Blocker der Proteinkinase G aufgehoben werden konnte. ONOO^- kann zur Nitrifikation von Aktin führen, was erhebliche negative Auswirkungen auf die kontraktile Funktion der Myofilamente haben kann (Beckman et al., 1994; Szabolcs et al., 1996). Ebenso könnte es über die NO-vermittelte Bildung von freien Radikalen zur Denaturierung der myofibrillären Proteine führen (Beckman et al., 1990; Stamler et al.; 1992), was die gleichen Effekte hätte.

Schließlich lässt sich anhand der vorliegenden Daten dieser Arbeit eindeutig sagen, dass iNOS ein essentieller Bestandteil des LPS/TLR4 Signalweges ist. Inwieweit NO als Produkt der iNOS an der kardialen Depression beteiligt ist, oder ob und in welchem Maße auch Abkömmlinge von NO, wie das Sauerstoffradikal Peroxynitrit, mitverantwortlich sind, ist mit den vorliegenden Ergebnissen nicht zu belegen. Dies wäre ein Ansatz für weitere Experimente.

4.5. Subzelluläre Mechanismen der LPS-abhängigen reduzierten Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten

In dieser Arbeit wurden bereits Ergebnisse diskutiert, die zeigen, dass der Signalweg des LPS TLR4-abhängig ist und dass dieser auf Kardiomyozyten exprimiert wird. Es wurde auch gezeigt, dass sich der gesamte Signalweg und damit die LPS-abhängige Kardiodepression durch kompetitive Hemmung des TLR4 durch E5564 blockieren lassen. Eine dritte Erkenntnis ist, dass in der Signalkaskade, die durch LPS in Kardiomyozyten ausgelöst wird, in einer Zwischenstufe iNOS exprimiert wird und es dadurch zur Bildung von NO kommt. Weitere Fragestellungen sind nun, erstens, wie ist der Zusammenhang in der Signalkaskade vom NO zur Ausbildung einer

reduzierten Kontraktilität, und zweitens, welches ist der letztendliche Mechanismus, der zur beobachteten reduzierten Kontraktilität der Kardiomyozyten führt.

In der Literatur werden für diesen Mechanismus zwei Wege der LPS-Wirkung diskutiert. Einen Ca^{2+} -abhängigen Weg, der die Wirkung über eine Veränderung der Kalziumhomöostase vermittelt ist, und einen Ca^{2+} -unabhängigen Weg, der auf einer Kalzium-Desensitivierung der Myofilamente beruht. Ziel eines Teiles der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welcher der beiden Wege in isolierten Kardiomyozyten vorliegt.

Die Theorie hinter dem Ca^{2+} -abhängigen Weg ist, dass es durch den Einfluss vom LPS zu einer geringeren Kalziumtransiente kommt. Dadurch steigt die für die Kontraktion so wichtige $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nicht in gleichem Maße an wie unter Kontrollbedingungen. Ein solcher Mechanismus wäre in der Versuchsdurchführung in der vorliegenden Arbeit direkt durch eine Amplitude der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu erkennen. Es gibt zwei Möglichkeiten, dass es zur verminderten Kalziumtransiente kommen kann.

Die erste ist die, dass zu wenig Ca^{2+} über den sarkolemmalen L-Typ Kalziumkanal in die Zelle kommt. So fanden Zhong et al. (1997) bei isolierten Kardiomyozyten aus 4 h mit LPS stimulierten Meerschweinchen mittels Patch clamp Technik ein verkürztes AP und, korrespondierend dazu, einen verkürzten $I_{\text{Ca,L}}$. Ein verkürztes AP beschrieben auch Hung und Lew (1993) bei Kardiomyozyten von LPS-stimulierten Kaninchen, die aus ihren Ergebnissen auch eher auf eine Veränderung des Ca^{2+} -Stroms durch die Zellmembran schlossen. Ebenso konnten Rigby et al. (1998) zeigen, dass es bei LPS-stimulierten Kardiomyozyten von Meerschweinchen zu einer verminderten Ca^{2+} -Transiente kommt.

Die zweite Möglichkeit der veränderten Kalziumtransiente bezieht sich auf das SR. So kann es einerseits zu einer verminderten Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR über den Ryanodinrezeptor kommen und andererseits zu einer reduzierten Wiederaufnahme des Ca^{2+} über die SERCA, wie es in einer Reihe von Experimenten an Hunden gezeigt werden konnte (Liu und Wu, 1991; Wu und Liu, 1991).

Diese verminderte Kalziumtransiente führt dann zu einer niedrigeren maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während des AP. Dadurch kann weniger Ca^{2+} an Troponin C binden (s. a. Abschnitt 1.2), was wiederum dazu führt, dass an den Aktinfilamenten weniger Bindungsstellen für den Myosinkopf frei werden. Somit kann die Zelle sich nur mit geringerer Kraft kontrahieren.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich zum Teil auch durch eine verminderte Kalziumtransiente erklären. Dazu müssen allerdings einige Vorbemerkungen gemacht werden. Durch Inkubation im Kulturmedium scheint es bei den Zellen zu einer Sensitivierung der Myofilamente zu kommen. Das lässt sich an folgendem erklären. Man kann davon ausgehen, dass bei allen Zellen die gleiche Ca^{2+} -Beladung in Ruhe vorliegt. Die Zellen, die direkt nach der Isolation in Tyrodelösung überführt werden und im direkten Anschluss gemessen werden, haben bei gleicher Sarkomerverkürzung eine höhere Amplitude der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die angebotenen Ca^{2+} -Ionen können also nicht in vollem Umfang an ihren Akzeptor, dem TnC, binden. Aufgrund dessen sollte man die Zellen der Gruppe Tyrode losgelöst von den inkubierten Zellen betrachten. Die für diese Fragestellung wichtigen Gruppen Kultur, Kultur + LPS und Kultur + LPS + SMT wurden deshalb noch einmal separat ausgewertet in Bezug auf folgende Parameter: Amplitude der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und beide Geschwindigkeiten der Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die one-way ANOVA und der anschließende Newman-Keuls post test zeigten, dass es bei den Zellen der Gruppe Kultur + LPS zu einer signifikanten Verminderung sowohl bei der Amplitude als auch der Maxima der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kommt. Das gilt ebenfalls für die Anstiegs- und Abnahmegeschwindigkeit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Diese Verminderung wird durch Zugabe des iNOS-Inhibitors wieder aufgehoben. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es infolge LPS-Stimulation zu einer verminderten Kalziumtransiente kommt. Diese könnte beruhen auf einer verminderten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR oder auf einem verminderten L-Typ Ca^{2+} -Strom. Welches von beiden hier vorliegt oder ob es sich um eine Kombination von beiden handelt, lässt sich anhand der Daten nicht sagen und wäre somit ein Ansatz für weitere Experimente. Dieser Einfluss von LPS ist bei $\text{TLR4}^{-/-}$ Tieren nicht vorhanden. Das beweist, dass der Effekt auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$, der von LPS hervorgerufen wird, über den TLR4 vermittelt wird.

In den vorliegenden Experimenten ist weiterhin zu sehen, dass die Zeitkonstante τ_1 bei den mit LPS stimulierten Zellen bei den Reizfrequenzen 0,5 und 1 Hz signifikant niedriger ist als bei den Kontrollgruppen. Das bedeutet, dass LPS bewirkt, dass die Zellen bei diesen Reizfrequenzen schneller ein Gleichgewicht erreichen, in dem bei gleich bleibender Ca^{2+} -Beladung des SR der NCX während der Relaxation genauso viel Ca^{2+} -Ionen aus dem Cytosol befördert, wie der L-Typ Ca^{2+} -Kanal nach dem AP in die Zelle schleust. Als mögliche Erklärungen kommen drei Möglichkeiten in Frage: Erstens könnte die SERCA gehemmt sein, sodass nach den ersten Kontraktionen

nach Stimulationspause, wo bei Mäusen das SR vermehrt gefüllt ist, die Wiederbeladung nicht mehr so gut funktioniert. Das wäre in Übereinstimmung mit den Daten von Wu und Liu (1991), die bei Hunden eine LPS-abhängige Verminderung der Ca^{2+} -Aufnahme des SR zeigen konnten. Die zweite Möglichkeit wäre, dass der NCX schneller arbeitet. Somit würde das vermehrte Kalzium aus dem SR, das bei der ersten Erregung nach Stimulationspause freigesetzt wird, über ihn schneller eliminiert, sodass sich das Gleichgewicht schneller einstellt. Drittens könnte die Funktion des L-Typ Ca^{2+} -Kanals gehemmt sein. Wäre dies der Fall, käme über diesen Kanal weniger Ca^{2+} in die Zelle als über den NCX ausgeschleust werden kann. Somit kann das überschüssige Ca^{2+} aus dem SR schneller eliminiert werden, was zu einem schnelleren Gleichgewicht führt. Die dritte Möglichkeit würde sich mit den Beobachtungen von Zhong et al. (1997) decken, die bei isolierten Kardiomyozyten vom Meerschweinchen ebenfalls einen verminderten $I_{\text{Ca,L}}$ gesehen haben.

Der Ca^{2+} -unabhängige Weg, über den LPS zu einer verminderten Kontraktilität führt, ist vermittelt über eine verminderte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente, d.h. die kontraktile Proteine können das durchaus vorhandene Ca^{2+} nicht in vollem Maße annehmen. Dass die LPS-Wirkung über diesen Mechanismus wirkt, wurde bereits in mehreren Publikationen vorgeschlagen (Vila-Petroff et al., 1999 ; Tavernier et al., 1998 ; Tavernier et al., 2000; Yasuda und Lew, 1997). Die Beobachtungen beruhen vor allem darauf, dass es bei verminderter Kontraktilität nicht zu einer signifikanten Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gekommen ist. Yasuda und Lew (1997) fanden dabei an mit LPS injizierten Kaninchen heraus, dass die Ca^{2+} -Desensitivierung von der LPS-Dosis abhängig ist.

In der vorliegenden Arbeit lässt sich eine verminderte Ansprechbarkeit der Myofilamente für Ca^{2+} an isolierten Kardiomyozyten der Maus durch simultane Messung der Sarkomerverkürzung und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 5 h nach Stimulation mit LPS nur indirekt erklären. Durch Bildung von Quotienten aus der Sarkomerverkürzungsamplitude und der Amplitude der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ respektive der maximalen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während einer Verkürzung kann man zeigen, dass LPS-stimulierte Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine größere Menge freier Ca^{2+} -Ionen im Cytosol benötigen, um eine gewisse Sarkomerverkürzung zu erreichen. Das bedeutet, dass in der Zelle durchaus vorhandene freie, und damit für eine Verkürzung verfügbare Ca^{2+} -Ionen nicht an den Akzeptor, im Falle einer kardialen

Kontraktion das TnC, binden kann. Es kommt also bei nahezu gleich bleibender $[Ca^{2+}]_i$ zu einer deutlichen Verminderung der Sarkomerverkürzung. Tavernier et al. (2000) konnten an Kardiomyozyten von endotoxämischen Ratten ähnliche Ergebnisse erzielen. Diese Daten werden bestätigt durch die Experimente in dieser Arbeit, in denen durch drastische Verminderung der extrazellulären Na^+ -Konzentration eine Kontraktur herbeigerufen wurde. An dem Vergleich der Steigungen der Regressionsgeraden jeder Zelle der verschiedenen Gruppen ist zu erkennen, dass bei den LPS-stimulierten Zellen die Sarkomerlänge mit steigender $[Ca^{2+}]_i$ weniger stark ansteigt als bei den Kontrollzellen. Daraus kann man auf eine verminderte Ansprechbarkeit der Zelle, genauer gesagt der Myofilamente, auf Ca^{2+} -Ionen schließen.

Layland et al. (2001) konnten zeigen, dass durch Gabe eines direkten NO-Donors (DEA/NO) die Kontraktilität von Kardiomyozyten von Ratten sank, ohne die $[Ca^{2+}]_i$ zu ändern. Sie schlossen darauf, dass es zu einer verminderten Ca^{2+} -Sensitivität durch den Einfluss von NO kommt. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Abhängigkeit des LPS-Weges zur verminderten Sarkomerverkürzung von iNOS nachgewiesen werden. Die Wirkungsweise dieses Ca^{2+} -unabhängigen Weges der reduzierten Kontraktilität könnte also in einem direkten Zusammenhang zur iNOS-Expression und NO-Wirkung stehen.

Als ein Akzeptor für NO gilt die lösliche Guanylatcyclase (sGC). NO bindet dabei direkt an die Häm-Gruppe des Enzyms unter Bildung eines Eisen-Nitrosyl-Häm-Komplexes (Lucas et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des aufgereinigten Enzyms durch NO um das 100- bis 200-fache steigt (Stone und Marletta, 1994). Neben vielen anderen Zelltypen ist die sGC auch in Kardiomyozyten gefunden worden (Hobbs, 1997; Lohmann et al., 1991). Die sGC katalysiert die Reaktion von Guanosintriphosphat (GTP) zu dem im Körper ubiquitär auftretenden second messenger zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und Pyrophosphat. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass cGMP zu negativen funktionalen Effekten und auch zu einer verminderten Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente sowohl im Ganzherz als auch in Kardiomyozyten führt (Layland et al., 2002; Shah et al., 1994; Shah et al., 2000).

Eine der Hauptbindungsstellen für cGMP im Herzen stellt ein Effektorprotein dar: die cGMP-abhängige Proteinkinase (PKG) (Lohmann et al., 1991). Die Ca^{2+} -Desensitivierung der Myofilamente geschieht über eine Aktivierung der PKG durch

cGMP. An gehäuteten kardialen Muskelfasern konnten Pfitzer et al. (1992) zeigen, dass es durch die PKG zur verminderten Ca^{2+} -Sensitivität kommt. Als grundlegender Mechanismus dafür wird die Phosphorylierung des cTnI durch die PKG angesehen. Es konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass es durch die aktivierte PKG zu einer Phosphorylierung des cTnI kommt (Blumenthal et al., 1978; Lincoln und Corbin, 1978). PKG bindet dabei an die cTnI-Bindungsstelle Serin 23 und 24 des cTnI (Layland et al., 2005), die ebenfalls eine Bindungsstelle für die cAMP-abhängige Proteinkinase darstellt. Sind diese Stellen phosphoryliert, sinkt die Affinität des cTnI zu TnC. Ebenso sinkt die Affinität des TnC für Ca^{2+} -Ionen. Dadurch kommt es zur verminderten Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente (Chandra et al., 1997; Robertson et al., 1982). Dass es einen Zusammenhang zwischen LPS und der Phosphorylierung des cTnI gibt, konnten Layland et al. (2005) zeigen. Durch Ersetzung des cTnI durch das embryonale slow skeletal TnI (ssTnI) in transgenen Mäusen, das keine Bindungsstelle hat für PKG, konnte in ihren Experimenten die kontraktile Depression von Kardiomyozyten durch LPS verhindert werden. Bereits im Jahre 2000 haben Tavernier et al. die verminderte Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente einer erhöhten Phosphorylierung des cTnI zugeschrieben.

Ein weiterer möglicher Mechanismus, der die verminderte Ansprechbarkeit der Myofilamente für Calcium erklären könnte, ist die Proteolyse des cTnI, wie Rigby et al. (1998) vorgeschlagen haben. Sie schrieben diese Proteolyse extrazellulären Proteasen zu, die durch LPS-Stimulation von Entzündungszellen im Herzen gebildet werden und dann während der mechanischen Isolation an den Myofibrillen ansetzen können. Diese Proteolyse konnte aber in anderen Arbeiten weder bei in vitro (Layland et al., 2005) noch bei in vivo-Modellen bestätigt werden (Powers et al., 1998; Tavernier et al., 1998). Sollte es in der vorliegenden Arbeit zu einer verminderten Kontraktilität aufgrund einer Proteolyse der Myofilamente gekommen sein, wäre dies aufgrund der LPS-Stimulation nach der Isolation bei allen Gruppen von Zellen aufgetreten. Zusätzlich sollte dieser Effekt auch durch den Einsatz von Trypsininhibitor in der Messtyrode verhindert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte aber ebenfalls eine verminderte Kalziumtransiente gezeigt werden. Dieser Mechanismus lässt sich ebenfalls über die Aktivierung der PKG erklären. Dieses Enzym scheint also eine tragende Rolle in der verminderten Kontraktilität zu haben.

So ist es zum ersten bei verschiedenen Tierarten bereits gezeigt worden, dass eine Stimulation der PKG durch hohe cGMP-Konzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) zu einer Inhibition des spannungsabhängigen L-Typ Kalziumkanals kommt (Hartzell und Fischmeister, 1986; Levi et al., 1989; Nawrath, 1977). Dies soll über eine Phosphorylierung des Kanals vermittelt werden (Jahn et al., 1988). Der phosphorylierte Kanal leitet dann bei der Erregung der Zelle weniger Ca^{2+} -Ionen in das Zytoplasma, sodass weniger Ca^{2+} für die Kontraktion zur Verfügung steht.

Zusammenfassend zu diesem Abschnitt lässt sich sagen, dass es sich bei den subzellulären Mechanismen, die letztendlich für die verminderte Kontraktilität unter Sepsisbedingungen verantwortlich sind, um eine Kombination handelt, die sowohl den Ca^{2+} -abhängigen als auch den Ca^{2+} -unabhängigen Weg einschließt. Beide Einflüsse zugleich wurden in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Nach den in dieser Arbeit vorhandenen Daten zu urteilen, ist die Komponente, die die Hauptwirkung ausmacht, jedoch in der verminderten Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente zu suchen.

Für zukünftige Experimente wäre es denkbar, durch Blockierung verschiedener Zwischenstufen ein genaueres Bild von dem LPS/TLR4-Signalweg in isolierten Kardiomyozyten zu erlangen. Zu erwähnen wäre zunächst die Blockierung der löslichen Guanylatzyklase, die als Akzeptor für NO dient. Als kompetitiver Hemmstoff dieses Enzyms wirkt das 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on (ODQ) (Taxeira et al., 2005; Schrammel et al., 1996). Es wurde zunächst am Nervengewebe angewendet (Garthwaite et al., 1995), hat aber auch bereits in mit IL-6 stimulierten Kardiomyozyten von Ratten die cGMP-Konzentration signifikant senken können (Yu et al., 2005). Ein weiterer Vorteil dieser Methode wäre es, Wirkungen von NO in septischen Kardiomyozyten zu untersuchen, die unabhängig von cGMP funktionieren.

Ein weiterer Ansatz wäre die Blockierung der PKG in LPS-stimulierten Kardiomyozyten durch Substanzen wie KT5823 (Yasuda und Lew, 1997) oder Rp-8-Br-cGMP (Yu et al., 2005). Diese Experimente wären vor allem deshalb sehr viel versprechend, da so der gesamte Ca^{2+} -unabhängige Weg, der über Phosphorylierung des cTnI zur Desensitivierung der Myofilamente führt, ausgeschaltet wird und so bei simultanen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - und Verkürzungsmessungen der wirkliche Anteil des Ca^{2+} -abhängigen Weges untersucht werden kann.

4.6. Einfluss von Zellwandbestandteilen gram-positiver Bakterien auf die kardiale Kontraktilität

Die bakterielle Sepsis ist nach wie vor eine klinisch schwerwiegende Erkrankung mit einer hohen Letalitätsrate. Myokardiale Dysfunktionen, die eine zentrale Stellung innerhalb der pathophysiologischen Vorgänge einnehmen, tragen zu dieser hohen Sterblichkeit bei (Knüfermann et al., 2004). Doch neben gram-negativen Bakterien sind auch gram-positive Bakterien, unter anderem *Staphylococcus (S.) aureus*, in der Lage, einen septischen Schock hervorzurufen, der ebenfalls letztendlich zum Multiorganversagen führen kann (De Kimpe et al., 1995). In einem Sepsismodell am Hund konnte sogar gezeigt werden, dass eine Infektion mit *S. aureus* die gleichen Sepsissymptome hervorruft wie eine solche mit *E. coli* (Natanson et al., 1989).

Die Zellwand gram-positiver Bakterien enthält kein LPS. Es wurde doch berichtet, dass LTA, ein Zellwandbestandteil gram-positiver Bakterien, von *S. aureus* zur Sepsis führen könnte (Kengatharan et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass LTA an immunkompetenten Zellen die Produktion von NF- κ B und Zytokinen provoziert (Übersichtsartikel: Fournier und Philpott, 2005). Ebenso konnte gezeigt werden, dass PGN in Monozyten und Makrophagen von verschiedenen Spezies die Produktion von TNF- α , IL-1 β und IL-6 anregt (Heumann et al., 1994; Mattsson et al., 1993; Timmerman et al., 1993; Wakabayashi et al., 1991).

Knüfermann et al. (2004) zeigten, dass es durch die Stimulation mit aufgereinigten *S. aureus* auch im Herzen zu einer verminderten Kontraktilität und einer erhöhten Produktion von Zytokinen kam. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob es auch in isolierten Kardiomyozyten zu einer verminderten Kontraktilität kommt, ohne dass es sich immunkompetente Zellen daran beteiligen. Die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe zeigen eine deutlich verminderte Kontraktilität der mit LTA und PGN stimulierten Zellen. Diese Versuche waren jedoch mit kommerzieller LTA durchgeführt worden. Mehrere Studien zeigen, dass es bei diesen kommerziellen Produkten häufig zu einer Verunreinigung mit LPS kommt (Gao et al., 2001; Morath et al., 2002). Deshalb wurde mit dem Limulus amoebocyte lysate assay als Standarddiagnostik der LPS-Gehalt der verwendeten LTA bestimmt. Dieser lag bei 29 endotoxin units (EU). Das entspricht einer in den Experimenten benutzten Menge von 3,6 ng LPS pro 2 ml Kulturmedium. Obwohl diese LPS-Konzentration im Vergleich zu den Experimenten, in denen die Zellen gewollt mit LPS stimuliert worden sind, fast 300-fach geringer sind, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass

der beobachtete Effekt bei diesen Experimenten auf LPS beruht. In einer zweiten Versuchsreihe wurde eine hochgereinigte LTA verwendet, die frei von LPS-Verunreinigungen war. Auch hier zeigten die stimulierten Zellen eine deutlich verminderte Kontraktilität, sowohl bezogen auf die Sarkomerverkürzungsamplitude als auch auf Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit. Dieser Effekt unterschied sich nicht von dem der ersten Versuchsreihe, sodass die Wirkung des LPS in der kommerziellen LTA zu vernachlässigen ist. Es konnte also gezeigt werden, dass Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien, LTA und PGN, die Kontraktilität von isolierten Kardiomyozyten senken. Eine Anwesenheit und Beteiligung von Zellen des Immunsystems ist dabei nicht notwendig.

Es stellt sich nun die Frage, wie die Kardiomyozyten diese Substanzen erkennen und wie es zu dem Effekt kommt. Es wurde bereits in vielen Studien berichtet, dass der Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) an der Erkennung von LTA und PGN beteiligt ist (Dziarski et al., 2001; Heine et al., 1999; Schwandner et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Yoshimura et al., 1999). Frantz et al. (2001) konnten zeigen, dass TLR2 auch auf Herzmuskelzellen exprimiert wird.

Diese Experimente sind die ersten, die zeigen konnten, dass eine Stimulation mit Zellwandbestandteilen gram-positiver Bakterien zu einer verminderten Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten führt. Ob TLR2 auch in den vorliegenden Experimenten an dieser verminderten Kontraktilität beteiligt war, lässt sich anhand der Ergebnisse nicht mit Bestimmtheit sagen. Ebenso der jeweilige Einfluss von LTA oder PGN kann dadurch nicht abgeschätzt werden. Versuche in unserer Arbeitsgruppe zur Sarkomerverkürzung an isolierten Herzmuskelzellen konnten jedoch zeigen, dass es durch jeweilige Stimulation mit den Einzelsubstanzen jeweils zu einer signifikant erniedrigten Kontraktilität kam. Gleiche Versuche an Zellen TLR2-defizienter Mäuse zeigten keinen Effekt, wodurch man auf eine Beteiligung des TLR2 an der reduzierten Kontraktilität der Zellen schließen kann (Plück et al., 2005).

Anders als bei LPS und TLR4 wurde zumindest für PGN sogar gezeigt, dass es direkt, ohne ein Bindungsprotein wie LBP, an eine der mehreren Bindungsstellen des TLR2 bindet (Iwaki et al., 2002). Trovassos et al. (2005) dagegen behaupteten, dass die Erkennung des PGN überhaupt nicht über TLR2 funktioniert.

Der TLR2 ist ebenso wie TLR4 ein membranständiger Rezeptor. Er besteht wie alle TLR aus einer extrazellulären, einer membranären und einer cytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre N-terminale Domäne ist wie der TLR4 aufgebaut aus

LRR, die C-terminale, cytoplasmatische Domäne heißt auch beim TLR2 TIR-Domäne und ist essentiell für die Weiterleitung des Signals ins Zellinnere (Fournier und Philpott, 2005).

Der TLR2-Signalweg unterscheidet sich nur geringfügig von dem des TLR4. Die Hauptunterschiede liegen vor allem in dem Fehlen eines MyD88-unabhängigen, verzögerten Signalweges (Takeda, 2005), gezeigt durch fehlende Produktion von NF- κ B in MyD88-knockout Mäusen. Ein weiterer Unterschied im TLR2-Signalweg ist das Fehlen der Adaptorproteine TRIF und TRAM, die in der TLR4-Signaltransduktionskette essentiell sind (Pålsson-McDermott und O'Neill, 2004; Takeda, 2005). TLR2 stellt damit im Vergleich zum TLR4 einen vereinfachten Signalweg dar. Eine Gemeinsamkeit, die anderen TLR fehlt, ist die Abhängigkeit des Weges von Mal, das den anderen TLR fehlt.

Insgesamt scheint der TLR2 somit eine wichtige Rolle in der Erkennung von gram-positiven Bakterien zu spielen und seine Aktivierung ebenso wie diejenige des TLR4 zur Sepsis führen. Er könnte möglicherweise durch Entwicklung eines wirksamen Antagonisten ebenfalls ein Ziel für therapeutische Maßnahmen gegen eine von diesen Erregern verursachte Sepsis darstellen.

4.7. Validität der angewandten in vivo-Methoden

Für das Modell einer induzierten Druckhypertrophie wurde bei Mäusen eine transversale aortale Konstriktion durchgeführt. Dies ist eine weit verbreitete Methode, die in unserer und anderen Arbeitsgruppen bereits erfolgreich Anwendung gefunden hat (Bittig, 2005; Rockman et al., 1991; Ha et al., 2005). Dabei wird eine Teilligatur um den Aortenbogen gelegt, um die Nachlast des Herzens zu erhöhen und damit zu einer Zunahme der myokardialen Masse zu führen.

Um zu vermeiden, dass der Aortenbogen bei dem Eingriff vollständig ligiert wurde, wurde ein Kanülenstück mit einem Durchmesser von 0,4 mm zwischen die Ligatur gelegt. Durch das unter Verwendung dieses Abstandhalters standardisierte Verfahren und der Wahl eines relativ engen Altersfensters für die Versuchstiere kann davon ausgegangen werden, dass die Operation unter gleich bleibenden Bedingungen durchgeführt wurde und dass die aufgetretene Varianz bei den

verschiedenen Hypertrophieparametern zu einem lediglich geringen Teil auf Unterschiede in der Durchführung der TAC zurückzuführen waren.

Die Mortalität innerhalb von drei Tagen nach TAC lag in der Literatur bei etwa 18% (Nakamura et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit beträgt die Mortalität TAC-operierter Tiere ca. 15%. Die gleichen Autoren berichteten auch von einer Zunahme der linksventrikulären Masse von ca. 35% drei Tage nach dem Eingriff. In der vorliegenden Arbeit zeigten die TAC-operierten Tiere nach drei Tagen eine Zunahme der linksventrikulären Masse von ca. 38% im Vergleich zu den Kontrolltieren. Dadurch ist zu ersehen, dass die Eingriffe fachgerecht durchgeführt wurden und die Experimente methodisch mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar waren.

Um das murine Modell einer induzierten Hypertrophie infolge einer Drucküberlastung zu evaluieren, wurden verschiedene morphologische und hämodynamische Parameter bestimmt. Einige dieser Parameter waren bei TAC im Vergleich zu Sham 72 Stunden nach dem Eingriff erhöht. Dazu gehörte die auf die Tibialänge normierte linksventrikuläre Masse, die bei TAC operierten Mäusen um ca. 38% angestiegen war. Ebenso zeigten der periphere und auch der linksventrikuläre Blutdruck einen signifikanten Anstieg bei diesen Tieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen daher darauf schließen, dass die Versuchstiere bereits drei Tage nach TAC eine kompensierte Druckhypertrophie entwickelt haben.

Die Erfassung der Blutdruckparameter erfolgte durch direkte intravasale oder intraventrikuläre Messung mittels eines Millar-Katheters. Diese Methode der Blutdruckmessung wurde in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls bereits mit Erfolg angewendet (Bittig, 2005). Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde der Katheter an jedem Tag einer Messung, bei Verdacht auf mögliche Abweichungen auch mehrmals täglich, auf 0 und 100 mmHg geeicht. Weiterhin erfolgt die Messung sowohl des EKGs als auch des Blutdruckes unter gleichzeitiger Kontrolle und Einstellung der Körperkerntemperatur auf für Mäuse physiologische 37,0°C, um mögliche daherrührende Einflüsse zu vermeiden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die angewendeten in vivo Methoden valide und reproduzierbar sind und mit Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmen.

4.8. Auswirkungen der peritonealen, gram-negativen Sepsis auf Morphologie und Funktion des drucküberlasteten Herzens

Dass LPS und damit die gram-negative Sepsis zur kontraktile Depression isolierter Kardiomyozyten führt, konnte in den vorangegangenen Abschnitten dargestellt werden. Viele Studien haben bereits gezeigt, dass LPS und die gram-negative Sepsis auch in vivo zu einer linksventrikulären Dysfunktion führen (Parker et al., 1984; Parrillo, 1993) und ist ebenfalls seit langer Zeit bekannt. Die Dysfunktionen äußern sich in einem Abfall des arteriellen Blutdruckes ebenso wie in einer Erhöhung der Herzfrequenz (Nemoto et al., 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ein sehr ähnliches Bild. Durch systemische Stimulation mit LPS und der damit verbundenen Induktion einer peritonealen, gram-negativen Sepsis kommt es zu einer signifikanten Verminderung nahezu aller in den Experimenten erhobenen Parameter der kardialen Funktion. LPS stimulierte Tiere zeigen sowohl beim peripheren als auch linksventrikulären systolischen Blutdruck eine signifikante Verminderung im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen. Dies gilt sowohl für die Gruppe der TAC als auch für die der Sham-operierten Tiere. Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel, $+dP/dt_{max}$, die direkt mit der Kontraktionskraft des Herzens korreliert, ist ebenfalls bei mit LPS behandelten Tieren signifikant erniedrigt. Die Herzfrequenz ist unter Einfluss von LPS signifikant erhöht. Die durch Stimulation mit LPS beobachteten Veränderungen des EKG sind die Verkürzung der PR-Strecke, die ein Maß für die Überleitung der Erregung von den Vorhöfen auf die Ventrikel darstellt, und die Verlängerung der frequenzkorrigierten QT-Zeit als ein Maß der Kammererregung. Die PR-Strecke ist aber in hohem Maße von der Herzfrequenz abhängig. Je höher diese ist, desto kürzer wird die PR-Strecke (Börger, 1987). Deshalb ist die signifikante Verringerung der PR-Strecke bei LPS-stimulierten Tieren auf die gleichzeitige Erhöhung der Herzfrequenz zurückzuführen. Die Befunde der verlängerten Kammererregung stehen etwas im Gegensatz zu denen, die sowohl Hung und Lew (1993) als auch Zhong et al. (1997) berichteten. Beide Arbeitsgruppen fanden an isolierten, mit LPS vorbehandelten Kardiomyozyten verkürzte Aktionspotentiale, die die Erregung der Einzelzelle wiedergeben. Deshalb wäre am Ganzherz eine ebenfalls verkürzte QT-Zeit zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass LPS eine verzögerte Weiterleitung des Reizes von einer Zelle zur nächsten bewirkt und deshalb die Kammererregung verlängert ist. Das

müsste durch weitere Experimente belegt werden. Ein weiterer EKG-Befund ist die erhöhte Amplitude der P-Welle, die ein Ausmaß der Erregung der Vorhöfe darstellt. Diese könnte dadurch erklärt werden, dass es im Rahmen der Sepsis zu einer verminderten Ejektionsfraktion des Herzens kommt und in Zuge dessen zu einem erhöhten enddiastolischen Volumen. Das hat in den vorliegenden Experimenten zur Folge, dass die Vorhöfe LPS-stimulierter Tiere gegen einen erhöhten enddiastolischen Kammerdruck angehen müssen, was eine erhöhte Erregung der Kammern erklären könnte.

Durch die intraperitoneale Stimulation mit LPS zeigen die Tiere also klassische Sepsissymptome. Die zugrunde liegenden Strukturen und Mechanismen, wie etwa die Notwendigkeit von TLR4 oder die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen, die zur kardialen Depression führen, wurden in den vorangegangenen Abschnitten (siehe Abschnitte 4.3 bis 4.5) hinreichend dargestellt. Die in dieser Versuchsreihe erzielten Ergebnisse zeigen die durch die auf Zellebene gemachten Beobachtungen erwarteten Auswirkungen von LPS am Ganztier.

Der Körper hat mehrere Möglichkeiten, auf eine erhöhte Druckbelastung des Herzens zu reagieren. Bei einer akuten Belastung erfolgt die Anpassung des Herzens über eine kurzfristige erhöhte Inotropie, die kardiale Ursachen, wie z. B. den Frank-Starling-Mechanismus, und extrakardiale Ursachen (nervale und endokrine Regulationsmechanismen) haben kann.

Bei chronisch erhöhter Druckbelastung, wie im vorliegenden Fall durch eine induzierte Aortenstenose, kommt es vordergründig zur strukturellen Adaptation und Kompensation der Herzmuskulatur in Form einer zunächst adaptiven, konzentrischen Myokardhypertrophie (Urbaszek und Seipel, 1993). Dadurch kommt es im Herzen zuerst zu einer Verbesserung der kontraktile Leistung des linken Ventrikels (Nakamura et al., 2001). Durch die fortschreitende Hypertrophie und der damit verbundenen erhöhten Kontraktionskraft des Herzens nimmt die Funktionalität des Ventrikels noch weiter zu.

In den in vivo Untersuchungen für die vorliegende Arbeit kam es bei TAC operierten Tieren zu einer signifikant erhöhten Masse des linken Ventrikels im Vergleich zu den Kontrollen. Auch die auf die Tibialänge normierte Masse des linken Ventrikels war nach TAC erhöht. Es kam also bereits nach drei Tagen zu einer Hypertrophie. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Vergleich der linksventrikulären Masse (LVM) drei und

vierzehn Tage nach TAC durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass es nach drei Tagen zu einer Zunahme der Masse um ca. 38% im Vergleich zur Kontrolle gegeben hat. Nach 14 Tagen war es zu einer Zunahme um ca. 47% gekommen. Das deutet an, dass der Hauptteil der Hypertrophie in den ersten Tagen nach Induktion der erhöhten Nachlast geschieht. Das steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Nakamura et al. (2001). Diese Autoren berichten, dass es nach drei Tagen zu einer Zunahme von ca. 35%, nach 10 Tagen aber bereits eine Zunahme der LVM von ca. 70% gekommen ist. Die Ursache für die Diskrepanz scheint aber bei den Sham-operierten Tieren zu liegen. Bei diesen Autoren gab es kaum einen Unterschied der Masse des linken Ventrikels der Kontrollen bei drei und zehn Tagen, wobei in dieser Arbeit die Kontrollen zu 14 Tagen eine um 24% höhere LVM hatten im Vergleich zum Zeitraum von 3 Tagen. Eine mögliche Ursache mag die Wahl der Tiere für die Experimente gewesen sein, da die Tiere in der vorliegenden Arbeit vor dem Eingriff um ca. 4-5 g leichter waren als bei Nakamura und Kollegen. Im Übrigen waren diese Autoren in der Lage, die Entwicklung der LVM durch nichtinvasive Methoden innerhalb eines Tieres zu bestimmen, während in dieser Arbeit für jeden Zeitpunkt eigene Versuchstiere mit eigenen Kontrollen nötig waren. Dadurch bieten sich bei Nakamura et al. natürlich bessere Möglichkeiten, die Entwicklung der LVM zu studieren.

Weiterhin zeigten TAC-operierte Mäuse bezüglich der gemessenen Parameter für die Hämodynamik signifikant erhöhte arterielle und linksventrikuläre, systolische Blutdrücke. Das Herz versucht so somit, die durch die TAC induzierte Stenose zu kompensieren.

Bei dauerhafter Druckentwicklung geht die kompensierte Hypertrophie in eine Dekompensation über, die von einer exzentrischen Hypertrophie und Dilatation der Ventrikel gekennzeichnet ist. Dadurch kommt es immer mehr zu Funktionseinbußen. Takaoka et al. (2002) beschrieben einen signifikanten Abfall der $-dP/dt_{\min}$ 7 Tage nach TAC, was durch die Bildung einer Myokardfibrose zu erklären ist. Bezüglich der maximalen Druckabfallsgeschwindigkeit ($-dP/dt_{\min}$) zeigen sich in der vorliegenden Arbeit jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, also auch nicht durch die TAC. In dem für die vorliegende Arbeit gewählten Zeitintervall von drei Tagen zwischen Eingriff und Messung der Hämodynamik scheint es zu dieser Umbildung noch nicht oder nur in geringem Maße gekommen zu sein.

Anzeichen im EKG, die auf eine Hypertrophie schließen lassen, wären insbesondere im QRS-Komplex zu suchen. Es kann bei der linksventrikulären Hypertrophie sowohl

zu einer Verlängerung als auch zu einer Erhöhung der Amplitude der QRS-Komplexe kommen. Die Verbreiterung von QRS kommt dabei durch Verlängerung des Weges der Erregungswelle bedingt durch die vergrößerte Muskelmasse zustande. Die erhöhte Amplitude ist zum Einen darauf zurückzuführen, dass das Herz näher an der Brustwand liegt. Weiterhin führen die Zunahme der Muskelfaserdicke und die Vergrößerung der Epikardoberfläche zu der Amplituden-Erhöhung. In der vorliegenden Arbeit kommt es lediglich zu einer numerischen, wenn auch nicht signifikanten Erhöhung von QRS. Das könnte darin begründet sein, dass die Hypertrophie nach drei Tagen noch nicht weit genug fortgeschritten ist. Signifikante Veränderungen im EKG durch TAC zeigen sich in der Verlängerung der Gesamterregung und der Erregungsrückbildung der Kammern. Das könnte auf ähnliche Gründe zurückzuführen sein wie die Verbreiterung von QRS, da es durch die erhöhte Muskelmasse auch zu verlängerten Wegen bei der Erregungsrückbildung kommt (Kalusche und Czapo, 1997; Börger, 1987).

Schließlich lässt sich sagen, dass es drei Tage nach Induktion einer durch Aortenstenose bedingten Erhöhung der Nachlast im Mausmodell bereits signifikante Anzeichen einer kompensierten Druckhypertrophie in Form einer Zunahme der Herzmasse und einer Erhöhung des systolischen Druckes gibt. Der Prozess scheint aber noch nicht so weit fortgeschritten zu sein, dass es zu Umbildungen im Herzmuskelgewebe und zur Ausbildung einer Myokardfibrose kommt.

Baumgarten et al. (2002) konnten zeigen, dass es in drucküberlasteten Herzen zu einer Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL6 kommt. Das Maximum der Zytokinproduktion liegt bei 6 h nach der Operation und sinkt innerhalb von 72 h wieder auf den Baseline-Wert zurück. Trotzdem bleibt das Myokard in der Lage, auf einen zweiten Stimulus in erhöhtem Maße zu reagieren. Die Autoren zeigten nämlich weiterhin, dass durch TAC präkonditionierte Mäuse in Bezug auf Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6 hyperresponsiv auf eine zusätzliche Stimulation mit LPS reagieren im Vergleich zu LPS-stimulierten, Sham-operierten Mäusen. Um zu untersuchen, ob die erhöhte Ansprechbarkeit präkonditionierter Tiere daher rührt, dass der LPS-Rezeptor TLR4 oder sein Co-Rezeptor CD14 in erhöhtem Maße exprimiert werden, wurden in unserer Arbeitsgruppe neue Experimente durchgeführt. In diesen konnte auch gezeigt werden, dass es durch LPS Stimulation

nach TAC zu einer signifikant erhöhten CD14-Expression kommt (Baumgarten et al., 2006b).

Hinweise darauf, dass es durch dieses „second hit“-Modell, also dem Zusammenwirken von Druckhypertrophie und einer gram-negativen, systemischen Sepsis, zu einem synergistischen Effekt kommt, zeigen sich anhand der vorliegenden Daten an zwei Parametern. Zum Ersten ist die Mortalität der Gruppe TAC/LPS bedeutend höher als bei den anderen Gruppen, also auch bei TAC/PBS und Sham/LPS, bei denen jeweils nur einer der schädigenden Faktoren wirken konnte. Das zeigt sich vor allem im Bereich des Zeitfensters der sechsstündigen Stimulation 72 h nach TAC, in dem es ausschließlich in der Gruppe TAC/LPS zu Sterblichkeiten unter den Versuchstieren gekommen war. Ebenso bei der Messung des Blutdruckes zeigten die Tiere der Gruppe TAC/LPS eine deutlich erhöhte Mortalität, da hier ca. 68% (10 von 16 Tieren) der Mäuse beim Verschieben des Katheters in den linken Ventrikel ein akutes Herzversagen zeigten, zu erkennen an dem abrupten Abfall des systolischen Blutdruckes. Der zweite Parameter, bei dem sich die Interaktion von TAC und LPS auf die Morphologie auswirkt, ist die Masse der Lunge. Diese ist bei der Gruppe TAC LPS signifikant erhöht im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Dies ist wahrscheinlich aber nur eine Auswirkung der verminderten Funktionalität des linken Ventrikels, sodass es zum Rückstau in die Lunge kommt. Die Folge ist ein Lungenödem. Dieses scheint aber nur durch die synergistische Wirkung beider schädigender Faktoren Druckhypertrophie und Stimulation mit LPS zu geschehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die durch Baumgarten et al. (2002) berichteten Ergebnisse der Hyperresponsivität TAC-operierter Tiere auf LPS mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse vereinbaren lassen und sich somit neben den Auswirkungen auf molekularer Ebene auch funktionelle und morphologische Auswirkungen auf einige Parameter zeigen. Klinisch gesehen könnte man vermuten, dass eine bakterielle Sepsis bei Menschen mit paralleler Herzinsuffizienz eine im Vergleich zu Gesunden schlechtere Prognose zur Folge hat.

5. Zusammenfassung

Die Sepsis ist eine schwerwiegende und lebensbedrohende Komplikation der bakteriellen Infektion, die nach wie vor sehr häufig auftritt und mit einer hohen Mortalität einhergeht. Diese durch die Infektion hervorgerufene generalisierte Entzündungsreaktion des Körpers kann durch Störung der Makro- und Mikrozirkulation zu einer Minderperfusion der Organe und zu Multiorganversagen führen. An diesem Prozess ist auch eine kardiale Dysfunktion beteiligt. Die Erkennung verschiedener bakterieller Moleküle geschieht über Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr, den Toll-like Rezeptoren (TLR). Dabei bindet Lipopolysaccharid (LPS), ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, an den TLR4, der auch auf Herzmuskelzellen exprimiert wird. Dieser kardiale TLR4 kann LPS erkennen und zur verminderten Kontraktilität von Kardiomyozyten führen. Einige Zwischenschritte des Signalweges von LPS, vor allem die Mechanismen, die letztendlich die verminderte Kontraktilität verursachen, waren jedoch bisher unklar. Insbesondere die Rolle des intrazellulären Kalziums wird noch kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob LPS einen Einfluss auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) von Kardiomyozyten hat oder ob es zu einer Desensitivierung der Myofilamente für Kalzium kommt. Dazu wurden simultan optisch die Sarkomerverkürzung und die $[Ca^{2+}]_i$ isolierter Herzmuskelzellen von Wildtyp- und TLR4-defizienten Mäusen unter Einfluss von LPS bestimmt. Durch Zugabe eines Inhibitors der induzierbaren NO-Synthase wurde die mögliche Beteiligung von NO bei der Erkennung und Weiterleitung des LPS-Signals erforscht. Als denkbarer therapeutischer Ansatz wurde die Auswirkung des TLR4-Antagonisten E5564 auf die frequenzabhängige Sarkomerverkürzung LPS-stimulierter Zellen bestimmt. Weitere Versuche wurden durchgeführt, um die Auswirkungen der peritonealen, gram-negativen Sepsis auf Morphologie und Funktion des drucküberlasteten Herzens zu untersuchen.

Da auch die gram-positive Sepsis immer mehr an klinischer Bedeutung gewinnt, wurde in einer Reihe von Experimenten die Wirkung von Zellwandbestandteilen gram-positiver Bakterien auf die frequenzabhängige Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyozyten untersucht.

Die Stimulation mit den Zellwandbestandteilen sowohl gram-negativer als auch gram-positiver Bakterien führte in allen Experimenten mit isolierten Kardiomyozyten von

Wildtyp-Mäusen zu einer verminderten Kontraktilität. Diese Ergebnisse wurden durch in vivo Messungen des arteriellen und linksventrikulären Blutdrucks bestätigt. Bei TLR4-defizienten Tieren und auch durch Zugabe des iNOS-Inhibitors SMT oder des TLR4-Antagonisten E5564 wurde die Wirkung des LPS auf die Sarkomerverkürzung der Herzmuskelzellen vermindert oder aufgehoben. Bezüglich der Messung der $[Ca^{2+}]_i$ stellte sich heraus, dass es sowohl zu einer verminderten Kalziumtransiente als auch zu einer Kalzium-Desensitivierung der Myofilamente kommt, wobei letzterer wohl die Hauptwirkung in Bezug auf die verminderte Kontraktilität zuzuschreiben ist. Bezüglich der in vivo Versuche zeigt sich, dass eine Hyperresponsivität vorgeschädigter Herzen auf eine gram-negative Sepsis besteht, die sich auch morphologisch und funktionell äußert.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnten somit neue und tiefere Einblicke in die inflammatorische Wirkung sowohl gram-positiver als auch gram-negativer Bakterien auf die Herzfunktion gewonnen werden. Die Untersuchung des unter Umständen therapeutisch einsetzbaren E5564 zeigt einen direkten klinischen Nutzen der durch diese Arbeit erzielten Erkenntnisse.

6. Summary

Sepsis still is a severe and life threatening complication of a bacterial infection associated with a high incidence and mortality. The infection evokes a generalized inflammation reaction, which leads to multi organ failure and death. Cardiac dysfunctions are also involved in this process. Responsible for the recognition of different bacterial molecules are receptors of the innate immune system, the Toll-like receptors (TLR). TLR4 binds lipopolysaccharides (LPS), cell wall components of gram-negative bacteria. This receptor also is expressed on cardiac myocytes. The cardiac TLR4 is able to recognize LPS and leads to reduced contractility of cardiac myocytes. Some of the steps in the signal pathway of LPS remain unclear, especially those which finally lead to the reduced contractility of cardiac myocytes. Particularly, the role of intracellular calcium is still under discussion.

It was examined in this thesis, whether LPS shows an influence on intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) of cardiac myocytes or whether it leads to a Ca^{2+} -desensitization of the myofilaments. Therefore, simultaneous measurements on sarcomere shortening and $[Ca^{2+}]_i$ of isolated LPS stimulated cardiac myocytes of wild type and TLR4-deficient mice were conducted optically. To investigate a possible participation of NO in recognition and transmission of the LPS-signal SMT, an inhibitor of the inducible NO-synthase was added to the culture medium. As a possible therapeutic approach the effect of E5564, a competitive TLR4 antagonist, was examined on the frequency-dependent sarcomere shortening of cardiac myocytes stimulated with LPS. Another series of experiments was conducted to evaluate the effect of a peritoneal, gram-negative sepsis on morphology and function of the pressure overloaded murine heart.

Since the clinical impact of gram-positive sepsis is still increasing over the last years, in another series of experiments the effect of cell wall components from gram-positive bacteria was examined on the frequency-dependent sarcomere shortening of isolated cardiac myocytes.

The stimulation of cardiac myocytes from wild type mice with cell wall components from either gram-positive or gram-negative bacteria lead in all experiments to a reduced contractility.

In all experiments with isolated cardiac myocytes from wild type mice the stimulation with cell wall components of gram negative as well as gram positive bacteria lead to

decreased contractility. These results were confirmed by in vivo measurements of arterial and left ventricular blood pressure. Adding of the iNOS-inhibitor SMT or the TLR4-antagonist E5564 reduces the effect of LPS on the contractility of cardiac myocytes from wild type mice. LPS did not show any effect in myocytes from TLR4 deficient mice. Regarding the measurements of $[Ca^{2+}]_i$ it came apparent that under the influence of LPS it came to a reduced Ca^{2+} transient as well as to a Ca^{2+} desensitization of myofilaments, while the latter one seems to contribute the main part to the reduced contractility.

The in vivo experiments show that mice with preharmed hearts react hyper responsive on gram-negative sepsis, morphologically and functionally.

In summary, new and deeper insights in the inflammatory effects of gram-positive and gram-negative bacteria could be gained by this thesis. The examination of E5564, which possibly may be used as a therapeutic treatment, shows, that there is a direct clinical benefit of the results of this thesis.

Literaturverzeichnis

- Afulukwe IF, Cohen RI, Zeballos GA, Mobeen I, Scharf SM. 2000.** *Selective NOS Inhibition Restores Myocardial Contractility in Endotoxemic Rats; However, Myocardial NO Content Does Not Correlate with Myocardial Dysfunction.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 162:21-26.
- Alexander C, Rietschel ET. 2001.** *Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity.* Journal of Endotoxin Research 7:167-202.
- Bach F, Bause H, Kaisers U, Mertzlufft F. 2006.** *Sepsis - an ever new challenge.* Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie 41:27-31.
- Balligand J-L, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, Smith TW. 1993.** *Abnormal Contractile Function due to Induction of Nitric Oxide Synthesis in Rat Cardiac Myocytes Follows Exposure to Activated Macrophage-conditioned Medium.* Journal of Clinical Investigation 91:2314-2319.
- Balligand J-L, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA. 1994.** *Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro.* Journal of Biological Chemistry 269:27580-27588.
- Balligand J-L, Cannon PJ. 1997.** *Nitric Oxide Synthases and Cardiac Muscle - Autocrine and Paracrine Influences.* Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 17:1846-1856.
- Bassani RA, Bers DM. 1995.** *Rate of Diastolic Ca Release from From the Sarcoplasmic Reticulum of Intact Rabbit and Rat Ventricular Myocytes.* Biophysical Journal 68:2015-2022.
- Baumgarten G, Knuefermann P, Kalra D, Gao F, Taffet GE, Michael L, Blackhear PJ, Carballo E, Sivabramanian N, Mann DL. 2002.** *Load-Dependent and -Independent Regulation of Proinflammatory Cytokine and Cytokine Receptor Gene Expression in the Adult Mammalian Heart.* Circulation 105:2192-2197.
- Baumgarten G, Knuefermann P, Schuhmacher G, Vervölgyi V, von Rappard J, Dreiner U, Fink K, Djoufack C, Hoeft A, Grohe C, Knowlton AA, Meyer R. 2006.** *Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia.* Shock 25:43-49.
- Baumgarten G, Kim S-C, Stapel H, Vervölgyi V, Bittig A, Hoeft A, Meyer R, Grohe C, Knuefermann P. 2006.** *Myocardial injury modulates the innate immune system and primes for myocardial LPS responsiveness.* Basic Research in Cardiology 101:427-435.

- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. 1990.** *Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide.* Proceedings of the National Academy of Sciences 87:1620-1624.
- Beckman JS, Koppenol WH. 1996.** *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.* American Journal of Physiology - Cell Physiology 271:C1424-C1437.
- Bers DM. 2002.** *Cardiac excitation-contraction coupling.* Nature 415:198-205.
- Bers DM, Weber CR. 2002.** *Na⁺/Ca²⁺ exchange function in intact ventricular myocytes.* Annals of the New York Academy of Sciences 976:500-512.
- Bittig A. 2005.** *Der Einfluss von Geschlechtshormonen auf die Hypertrophieantwort nach Druckbelastung im Myokard der Maus.* Diss Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Bluhm WF, Kranias EG, Dillmann WH, Meyer M. 2000.** *Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 278:H249-H255.
- Blumenthal DK, Stull JT, Gill GN. 1978.** *Phosphorylation of cardiac troponin by guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase.* Journal of Biological Chemistry 253:334-336.
- Bochud PY, Glauser MP, Calandra T. 2001.** *Antibiotics in sepsis.* Intensive Care Medicine 27 Suppl 1:S33-S48.
- Bogdan C. 2001.** *Nitric oxide and the immune response.* Nature Immunology 2:907-916.
- Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. 1992.** *The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure.* Chest 101:1481-1483.
- Borzak S, Murphy S, Marsh JD. 1991.** *Mechanisms of rate staircase in rat ventricular cells.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 260:H884-H892.
- Börger HH. 1987.** *EKG-Information.* Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- Bradley KN, Flynn ERM, Muir TC, McCarron JG. 2002.** *Ca²⁺ regulation in guinea-pig colonic smooth muscle: the role of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger and the sarcoplasmic reticulum.* The Journal of Physiology 538:465-482.
- Brady AJ, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. 1992.** *Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 263:H1963-H1966.
- Brunner F, Wolkart G. 2003.** *Peroxynitrite-induced cardiac depression: role of myofilament desensitization and cGMP pathway.* Cardiovascular Research 60:355-364.

- Carafoli E. 1987.** *Intracellular calcium homeostasis.* Annual Review of Biochemistry 56:395-433.
- Chandra M, Dong WJ, Pan BS, Cheung HC, Solaro RJ. 1997.** *Effects of protein kinase A phosphorylation on signaling between cardiac troponin I and the N-terminal domain of cardiac troponin C.* Biochemistry 36:13305-13311.
- Chao W, Shen Y, Zhu X, Zhao H, Novikov M, Schmidt U, Rosenzweig A. 2005.** *Lipopolysaccharide Improves Cardiomyocyte Survival and Function after Serum Deprivation.* Journal of Biological Chemistry 280:21997-22005.
- Christ W.J., Asano O., Rodidoux A.L., Perez M., Wang Y., Dubuc G.R., Gavin W.E., Hawkins L.D., McGuinness P.D., Mullarkey M.A. 1995.** *E5531, a pure endotoxin antagonist of high potency.* Science 268:80-83.
- Clark WA, Decker ML, Behnke-Barklay M, Janes DM, Decker RS . 1998.** *Cell contact as an independent factor modulating cardiac myocyte hypertrophy and survival in long-term primary culture.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology 30:139-155.
- Cleveland MG, Gorham JD, Murphy TL, Tuomanen E, Murphy KM. 1996.** *Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway.* Infection and Immunity 64:1906-1912.
- Comstock KL, Krown KA, Page MT, Martin D, Ho P, Pedraza M, Castro EN, Nakajima N, Glembotski CC, Sabbadini RA. 1998.** *LPS-induced TNF-alpha release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology 30:2761-2775.
- Cowan DB, Poutias DN, Del Nido PJ, McGowan FX, Jr. 2000.** *CD14-independent activation of cardiomyocyte signal transduction by bacterial endotoxin.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 279:H619-H629.
- Danner RL, Joiner KA, Parrillo JE. 1987.** *Inhibition of endotoxin-induced priming of human neutrophils by lipid X and 3-Aza-lipid X.* Journal of Clinical Investigation 80:605-612.
- De Kimpe SJ, Kengatharan M, Thiemermann C, Vane JR. 1995.** *The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus act in synergy to cause shock and multiple organ failure.* Proceedings of the National Academy of Sciences 92:10359-10363.
- Doevendans PA, Daemen MJ, de Munick ED, Smits JF. 1998.** *Cardiovascular phenotyping in mice.* Cardiovascular Research 39:34-49.
- Drenckhahn D. 1994.** *Muskelgewebe.* in D. Drenckhahn and W. Zenker, eds. Anatomie, Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Urban und Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore.

- Dziarski R, Wang Q, Miyake K, Kirschning CJ, Gupta D. 2001.** *MD-2 enables Toll-like receptor 2 (TLR2)-mediated responses to lipopolysaccharide and enhances TLR2-mediated responses to Gram-positive and Gram-negative bacteria and their cell wall components.* Journal of Immunology 166:1938-1944.
- Endoh M. 2004.** *Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance.* European Journal of Pharmacology 500:73-86.
- Fentzke RC, Buck SH, Patel JR, Lin H, Wolska BM, Stojanovic MO, Martin AF, Solaro RJ, Moss RL, Leiden JM. 1999.** *Impaired cardiomyocyte relaxation and diastolic function in transgenic mice expressing slow skeletal troponin I in the heart.* Journal of Physiology 517:143-157.
- Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. 2000.** *Peroxynitrite Is a Major Contributor to Cytokine-Induced Myocardial Contractile Failure.* Circulation Research 87:241-247.
- Ferrero E, Jiao D, Tsuberi BZ, Tesio L, Rong GW, Haziot A, Goyert SM. 1993.** *Transgenic Mice Expressing Human CD14 are Hypersensitive to Lipopolysaccharide.* Proceedings of the National Academy of Sciences 90:2380-2384.
- Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. 1992.** *Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide.* Science 257:387-389.
- Flesch M, Kilter H, Cremers B, Laufs U, Sudkamp M, Ortmann M, Muller FU, Bohm M. 1999.** *Effects of endotoxin on human myocardial contractility involvement of nitric oxide and peroxynitrite.* Journal of the American College of Cardiology 33:1062-1070.
- Fournier B, Philpott DJ. 2005.** *Recognition of Staphylococcus aureus by the Innate Immune System.* Clinical Microbiology Reviews 18:521-540.
- Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA. 1999.** *Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal an failing myocardium.* Journal of Clinical Investigation 104:271-280.
- Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. 2001.** *Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes.* Journal of Biological Chemistry 276:5197-5203.
- Gao JJ, Xue Q, Zuvanich EG, Haghi KR, Morrison DC. 2001.** *Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro.* Infection and Immunity 69:751-757.
- Gao WD, Perez NG, Marban E. 1998.** *Calcium cycling and contractile activation in intact mouse cardiac muscle.* The Journal of Physiology 507:175-184.

- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. 1995.** *Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one.* Molecular Pharmacology 48:184-188.
- Goldhaber JI, Kim KH, Natterson PD, Lawrence T, Yang P, Weiss JN. 1996.** *Effects of TNF-alpha on $[Ca^{2+}]_i$ and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 271:H1449-H1455.
- Golenbock D.T., Hampton R.Y., Qureshi R.Y., Takayama K., Raetz C.R. 1991.** *Lipid A-like molecules that antagonize the effects of endotoxins on human monocytes.* Journal of Biological Chemistry 266:19490-19498.
- Golenbock DT, Will JA, Raetz CR, Proctor RA. 1987.** *Lipid X ameliorates pulmonary hypertension and protects sheep from death due to endotoxin.* Infection and Immunity 55:2471-2476.
- Gupta D, Kirkland TN, Viriyakosol S, Dziarski R. 1996.** *CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan.* Journal of Biological Chemistry 271:23310-23316.
- Hartzell HC, Fischmeister R. 1986.** *Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca^{2+} current in single heart cells.* Nature 323:273-275.
- Hasselbach W, Makinose M. 1963.** *Über den Mechanismus des Calciumtransportes durch die Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums.* Biochemische Zeitschrift 339:94-111.
- Hattor Y, Kasai K, Akimoto K, Thiemermann C. 1997.** *Induction of NO synthesis by lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus in J774 macrophages: involvement of a CD14-dependent pathway.* Biochemical and Biophysical Research Communications 233:375-379.
- Haziot A, Ferrero E, Kontgen F, Hijiya N, Yamamoto S, Silver J, Stewart CL, Goyert SM. 1996.** *Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice.* Immunity. 4:407-414.
- Haziot A, Lin XY, Zhang F, Goyert SM. 1998.** *The induction of acute phase proteins by lipopolysaccharide uses a novel pathway that is CD14-independent.* Journal of Immunology 160:2570-2572.
- He Q, Spiro MJ. 1996.** *Suspension culture of differentiated rat heart myocytes on non-adhesive surfaces.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology 28:1177-1186.
- Heine H, Kirschning CJ, Lien E, Monks BG, Rothe M, Golenbock DT. 1999.** *Cutting edge: cells that carry a null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin.* Journal of Immunology 162:6971-6975.
- Hellige G, Gonska BD, Bretschneider HJ, Kreuzer H. 1991.** Page 16.1-16.29 in K. Hierholzer and R. F. Schmidt, eds. Pathophysiologie des Menschen. VCH, Weinheim - Basel - Cambridge - New York.

- Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A. 1994.** *Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes.* Infection and Immunity 62:2715-2721.
- Hilgemann DW. 2004.** *New insights into the molecular and cellular workings of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger.* American Journal of Physiology - Cell Physiology 287:C1167-C1172.
- Hobbs AJ. 1997.** *Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling.* Trends in Pharmacological Sciences 18:484-491.
- Hung J, Lew WY. 1993.** *Cellular mechanisms of endotoxin-induced myocardial depression in rabbits.* Circulation Research 73:125-134.
- Hunter JJ, Chien KR. 1999.** *Signaling Pathways for Cardiac Hypertrophy and Failure.* The New England Journal of Medicine 341:1276-1283.
- Ito K, Yan X, Tajima M, Su Z, Barry WH, Lorell BH. 2000.** *Contractile Reserve and Intracellular Calcium Regulation in Mouse Myocytes From Normal and Hypertrophied Failing Hearts.* Circulation Research 87:588-595.
- Iwaki D, Mitsuzawa H, Murakami S, Sano H, Konishi M, Akino T, Kuroki Y. 2002.** *The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from Staphylococcus aureus.* Journal of Biological Chemistry 277:24315-24320.
- Jahn H, Nastainczyk W, Rohrkasten A, Schneider T, Hofmann F. 1988.** *Site-specific phosphorylation of the purified receptor for calcium-channel blockers by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases, protein kinase C, calmodulin-dependent protein kinase II and casein kinase II.* European Journal of Biochemistry 178:535-542.
- Kalusche D, Csapo G. 1997.** *Konventionelle und intrakardiale Elektrokardiographie.* Novartis Pharma GmbH, Wehr/ Baden.
- Kan H, Xie Z, Finkel MS. 1999.** *TNF-alpha enhances cardiac myocyte NO production through MAP kinase-mediated NF-kappa B activation.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 277:H1641-H1646.
- Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. 1995.** *Tumor Necrosis Factor- α Gene and Protein Expression in Adult Feline Myocardium after Endotoxin Administration.* Journal of Clinical Investigation 96:1042-1052.
- Kawata H, Fujishiro N. 1990.** *Effects of sodium depletion on the caffeine-induced contraction of frog's skeletal muscle.* Japanese Journal of Physiology 40:243-251.
- Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM. 1998.** *Medizinische Mikrobiologie.* Thieme, Stuttgart - New York.
- Keller RS, Jones JJ, Kim KF, Myers PR, Adams HR, Parker JL, Rubin LJ. 1995.** *Endotoxin-induced myocardial dysfunction: is there a role for nitric oxide?* Shock 4:338-344.

- Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. 1996.** *Nitric Oxide and Cardiac Function.* Circulation Research 79:363-380.
- Kempelmann H. 2005.** *Der Einfluß von Gelsolin auf die Verkürzung isolierter ventrikulärer Kardiomyozyten der Maus.* Diss Medizinische Fakultät Universität Bonn.
- Kengatharan KM, De KS, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C. 1998.** *Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure.* Journal of Experimental Medicine 188:305-315.
- Khadour FH, Panas D, Ferdinandy P, Schulze C, Csont T, Lalu MM, Wildhirt SM, Schulz R. 2002.** *Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats.* American Journal of Physiology - Heart 283:1108-1115.
- Kinugawa KI, Kohmoto O, Yao A, Serizawa T, Takahashi T. 1997.** *Cardiac inducible nitric oxide synthase negatively modulates myocardial function in cultured rat myocytes.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 272:H35-H47.
- Klabunde RE, Coston AF. 2006.** *Nitric oxide synthase inhibition does not prevent cardiac depression in endotoxic shock.* Shock 3:73-78.
- Kleinert H, Schwarz PM, Forstermann U. 2003.** *Regulation of the Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase.* Biological Chemistry 384:1343-1364.
- Knuefermann P, Sakata Y, Baker JS, Huang CH, Sekiguchi K, Hardarson HS, Takeuchi O, Akira S, Vallejo JG. 2004.** *Toll-like receptor 2 mediates Staphylococcus aureus-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart.* Circulation 110:3693-3698.
- Kojda G, Kottenberg K. 1999.** *Regulation of basal myocardial function by NO.* Cardiovascular Research 41:514-523.
- Kooy NW, Lewis SJ, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. 1997.** *Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite.* Critical Care Medicine 25:812-819.
- Kopp EB, Medzhitov R. 1999.** *The Toll-receptor family and control of innate immunity.* Current Opinion in Immunology 11:13-18.
- Korte T, Fuchs M, Arkudas A, Geertz S, Meyer R, Gardiwal A, Klein G, Niehaus M, Krust A, Chambon P, Drexler H, Fink K, Grohe C. 2005.** *Female Mice Lacking Estrogen Receptor β Display Prolonged Ventricular Repolarization and Reduced Ventricular Automaticity After Myocardial Infarction.* Circulation 111:2282-2290.
- Koss KL, Kranias EG. 1996.** *Phospholamban: A Prominent Regulator of Myocardial Contractility.* Circulation Research 79:1059-1063.

- Kovach NL, Yee E, Munford RS, Raetz CR, Harlan JM. 1990.** *Lipid IVA inhibits synthesis and release of tumor necrosis factor induced by lipopolysaccharide in human whole blood ex vivo.* Journal of Experimental Medicine 172:77-84.
- Kusunoki T, Hailman E, Juan TS, Lichenstein HS, Wright SD. 1995.** *Molecules from Staphylococcus aureus that bind CD14 and stimulate innate immune responses.* Journal of Experimental Medicine 182:1673-1682.
- Lakhani SA, Bogue C.W. 2003.** *Toll-like receptor signaling in sepsis.* Current Opinion in Pediatrics 15:278-282.
- Layland J, Li JM, Shah AM. 2002.** *Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes.* The Journal of Physiology 540:457-467.
- Layland J, Cave AC, Warren C, Grieve DJ, Sparks E, Kentish JC, Solaro RJ, Shah AM. 2005.** *Protection against endotoxemia-induced contractile dysfunction in mice with cardiac-specific expression of slow skeletal troponin I.* The FASEB Journal 19:1137-1139.
- Lehman W, Craig R, Vibert P. 1994.** *Ca²⁺-induced tropomyosin movement in Limulus thin filaments revealed by three-dimensional reconstruction.* Nature 368:65-67.
- Levi RC, Alloatti G, Fischmeister R. 1989.** *Cyclic GMP regulates the Ca-channel current in guinea pig ventricular myocytes.* Pflügers Archiv: European Journal of Physiology 413:685-687.
- Lew W.Y., Lee M., Yasuda S., Bayna E. 1997.** *Depyrogenation of digestive enzymes reduces lipopolysaccharide tolerance in isolated cardiac myocytes.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology 29:1985-1990.
- Lew WY, Ryan J, Yasuda S. 1997.** *Lipopolysaccharide induces cell shrinkage in rabbit ventricular cardiac myocytes.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 272:H2989-H2993.
- Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT. 2000.** *Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide.* Journal of Clinical Investigation 105:497-504.
- Lim CC, Apstein CS, Colucci WS, Liao R. 2000.** *Impaired cell shortening and relengthening with increased pacing frequency are intrinsic to the senescent mouse cardiomyocyte.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology 32:2075-2082.
- Lin AW, Chang CC, McCormick CC. 1996.** *Molecular cloning and expression of an avian macrophage nitric-oxide synthase cDNA and the analysis of the genomic 5'-flanking region.* Journal of Biological Chemistry 271:11911-11919.
- Lincoln TM, Corbin JD. 1978.** *Purified cyclic GMP-dependent protein kinase catalyzes the phosphorylation of cardiac troponin inhibitory subunit (TN-1).* Journal of Biological Chemistry 253:337-339.

- Linz KW, Meyer R. 2000.** *Profile and kinetics of L-type calcium current during the cardiac ventricular action potential compared in guinea-pigs, rats and rabbits.* Pflügers Archiv: European Journal of Physiology 439:588-599.
- Liu MS, Wu LL. 1991.** *Reduction in the Ca²⁺-induced Ca²⁺ release from canine cardiac sarcoplasmic reticulum following endotoxin administration.* Biochemical and Biophysical Research Communications 174:1248-1254.
- Lohmann SM, Fischmeister R, Walter U. 1991.** *Signal transduction by cGMP in heart.* Basic Research in Cardiology 86:503-514.
- Loppnow H, Brade H, Durrbaum I, Dinarello CA, Kusumoto S, Rietschel ET, Flad HD. 1989.** *IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures.* Journal of Immunology 142:3229-3238.
- Lorenz JN, Robbins J. 1997.** *Measurement of intraventricular pressure and cardiac performance in the intact closed-chest anesthetized mouse.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 272:H1137-H1146.
- Löffler G. 1999.** *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie.* Springer, Berlin.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. 2000.** *Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP.* Pharmacological Reviews 52:375-414.
- Luss H, Watkins SC, Freeswick PD, Imro AK, Nussler AK, Billiar TR, Simmons RL, Del Nido PJ, McGowan FX, Jr. 1995.** *Characterization of inducible nitric oxide synthase expression in endotoxemic rat cardiac myocytes in vivo and following cytokine exposure in vitro.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology 27:2015-2029.
- Lynn M, Wong YN, Wheeler JL, Kao RJ, Perdomo CA, Noveck R, Vargas R, D'Angelo T, Gotzkowsky S, McMahan FG, Wasan KM, Rossignol DP. 2004.** *Extended in vivo pharmacodynamic activity of E5564 in normal volunteers with experimental endotoxemia [corrected].* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 308:175-181.
- MacLennan DH, Holland PC. 1975.** *Calcium transport in sarcoplasmic reticulum.* Annual Review of Biophysics and Bioengineering 4:377-404.
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1997.** *Nitric oxide and macrophage function.* Annual Review of Immunology 15:323-350.
- Marletta M.A., Yoon P.S., Iyengar R., Leaf C.D., Wichnok J.S. 1988.** *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate.* Biochemistry 29:8706-8711.
- Mattsson E, Verhage L, Rollof J, Flier A, Verhoef J, van DH. 1993.** *Peptidoglycan and teichoic acid from Staphylococcus epidermidis stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6.* FEMS Immunology and Medical Microbiology 7:281-287.

- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. 1997.** *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.* Nature 388:394-397.
- Medzhitov R, Janeway C. 2000.** *Innate Immunity.* The New England Journal of Medicine 343:338-344.
- Medzhitov R. 2001.** *Toll-like receptors and innate immunity.* Nature Reviews Immunology 1:135-145.
- Meyer R. 1989.** *Oberflächenstruktur, Membranströme und Kontraktilität isolierter Herzmuskelzellen.* Habilitationsschrift Medizinische Fakultät Universität Bonn.
- Miller RJ. 1992.** *Voltage-sensitive Ca²⁺ Channels.* Journal of Biological Chemistry 267:1403-1406.
- Morath S, Geyer A, Spreitzer I, Hermann C, Hartung T. 2002.** *Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic Acid preparations.* Infection and Immunity 70:938-944.
- Mukhopadhyay S, Herre J, Brown GD, Gordon S. 2004.** *The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors.* Immunology 112:521-530.
- Muller-Werdan U, Engelmann H, Werdan K. 1998.** *Cardiodepression by tumor necrosis factor-alpha.* European Cytokine Network 9:689-691.
- Mungrue IN, Gros R, You X, Pirani A, Azad A, Csont T, Schulz R, Butany J, Stewart DJ, Husain M. 2002.** *Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death.* Journal of Clinical Investigation 109:735-743.
- Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K. 2002.** *Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution.* Nature Immunology 3:667-672.
- Nair RR, Nair P. 2001.** *Age-dependent variation in contractility of adult cardiac myocytes.* International Journal of Biochemistry & Cell Biology 33:11-125.
- Nakamura A, Rokosh DG, Paccanaro M, Yee RR, Simpson PC, Grossman W, Foster E. 2001.** *LV systolic performance improve with development of hypertrophy after transverse aortic constriction in mice.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 281:H1104-H1112.
- Natanson C, Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Peart KW, Banks SM, MacVittie TJ, Walker RI, Parrillo JE. 1989.** *Role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality. Escherichia coli and Staphylococcus aureus challenges in a canine model of human septic shock.* Journal of Clinical Investigation 83:243-251.
- Nawrath H. 1977.** *Does cyclic GMP mediate the negative inotropic effect of acetylcholine in the heart?* Nature 267:72-74.

- Nemoto S, Vallejo JG, Knuefermann P, Misra A, Defreitas G, Carabello BA, Mann DL. 2002.** *Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the heart.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 282:H2316-H2323.
- Niedergerke R. 1956.** *The staircase phenomenon and the action of calcium on the heart.* Journal of Physiology 134:569-583.
- Pagani FD, Baker LS, Hsi C, Knox M, Fink MP, Visner MS. 1992.** *Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs.* Journal of Clinical Investigation 90:389-398.
- Pålsson-McDermott EM, O'Neill LA. 2004.** *Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4.* Immunology 113:153-162.
- Panas D, Khadour FH, Szabo C, Schulz R. 1998.** *Proinflammatory cytokines depress cardiac efficiency by a nitric oxide-dependent mechanism.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 275:H1016-H1023.
- Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. 1990.** *Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy.* Annals of Internal Medicine 113:227-242.
- Parrillo JE. 2006.** *Pathogenetic Mechanisms of Septic Shock.* The New England Journal of Medicine 328:1471-1478.
- Pfeiffer R. 1892.** *Untersuchungen über das Cholera Gift.* Zeitschrift der Hygiene 11:393-411.
- Pfister G, Ruegg JC, Flockerzi V, Hofmann F. 1982.** *cGMP-dependent protein kinase decreases calcium sensitivity of skinned cardiac fibres.* FEBS Letters 149:171-175.
- Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. 1999.** *Ca²⁺ Handling and Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Content in Isolated Failing and Nonfailing Human Myocardium.* Circulation Research 85:38-46.
- Plück JM, Vervölgyi V, Dreiner U, Grohe C, Meyer R, Knuefermann P. 2005.** *Influence of toll-like receptor 2 on sarcomere shortening of isolated cardiac myocytes.* Pflügers Archive: European Journal of Physiology 449:S136.
- Pohlman TH, Munford RS, Harlan JM. 1987.** *Deacylated lipopolysaccharide inhibits neutrophil adherence to endothelium induced by lipopolysaccharide in vitro.* The Journal of Experimental Medicine 165:1393-1402.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van HC, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. 1998.** *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.* Science 282:2085-2088.

- Powers FM, Farias S, Minami H, Martin AF, Solaro RJ, Law WR. 1998.** *Cardiac myofilament protein function is altered during sepsis.* Journal of Molecular and Cellular Cardiology 30:967-978.
- Proctor RA, Will JA, Burhop KE, Raetz CR. 1986.** *Protection of mice against lethal endotoxemia by a lipid A precursor.* Infection and Immunity 52:905-907.
- Rensing H. 2003.** *Pathogenetische Bedeutung bei der Sepsis.* Anaesthesist 52:S7-S13.
- Rigby SL, Hofmann PA, Zhong J, Adams HR, Rubin LJ. 1998.** *Endotoxemia-induced myocardial dysfunction is not associated with changes in myofilament Ca²⁺ responsiveness.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 274:H580-H590.
- Robertson SP, Johnson JD, Holroyde MJ, Kranias EG, Potter JD, Solaro RJ. 1982.** *The effect of troponin I phosphorylation on the Ca²⁺-binding properties of the Ca²⁺-regulatory site of bovine cardiac troponin.* Journal of Biological Chemistry 257:260-263.
- Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ros J, Chien KR. 1991.** *Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy.* Proceedings of the National Academy of Sciences 88:8277-8281.
- Rose JR, Mullarkey MA, Christ WJ, Hawkins LD, Lynn M, Kishi Y, Wasan KM, Peteherych K, Rossignol DP. 2000.** *Consequences of interaction of a lipophilic endotoxin antagonist with plasma lipoproteins.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44:504-510.
- Rossignol DP, Lynn M. 2002.** *Antagonism of in vivo and ex vivo response to endotoxin by E5564, a synthetic lipid A analogue.* Journal of Endotoxin Research 8:483-488.
- Rubbo H, Darley-Usmar V, Freeman BA. 1996.** *Nitric Oxide Regulation of Tissue Free Radical Injury.* Chemical Research in Toxicology 9:809-820.
- Ruegg JC. 2000.** *Muskel.* Pages 67-91 in R. F. Schmidt, G. Thews, and F. Lang, eds. Physiologie des Menschen. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.
- Schletter J, Heine H, Ulmer AJ, Rietschel ET. 1995.** *Molecular mechanisms of endotoxin activity.* Archives of Microbiology 164:389.
- Schrader J. 1996.** *Das Herz.* Pages 105-140 in R. Klinke and S. Silbernagel, eds. Lehrbuch der Physiologie. Thieme Verlag, Stuttgart - New York.
- Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. 1996.** *Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase.* Molecular Pharmacology 50:1-5.

- Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT. 2001.** *Molecular Genetic Analysis of an Endotoxin Nonresponder Mutant Cell Line: A Point Mutation in a Conserved Region of MD-2 Abolishes Endotoxin-induced Signaling.* The Journal of Experimental Medicine 194:79-88.
- Schuhmacher G. 2006.** *TLR-4-Rezeptor-vermittelter Einfluß von Endotoxin auf die Kontraktilität isolierter Kardiomyozyten der Maus.* Diss Medizinische Fakultät Universität Bonn.
- Schulz R, Nava E, Moncada S. 1992.** *Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the myocardium.* British Journal of Pharmacology 105:575-580.
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. 1990.** *Structure and function on the lipopolysaccharide binding protein.* Science 249:1429-1431.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. 1999.** *Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2.* Journal of Biological Chemistry 274:17406-17409.
- Schwartz BS, Monroe MC, Bradshaw JD. 1989.** *Endotoxin-induced production of plasminogen activator inhibitor by human monocytes is autonomous and can be inhibited by lipid X.* Blood 73:2188-2195.
- Shattock MJ, Bers DM. 1989.** *Rat vs. rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes.* American Journal of Physiology - Cell Physiology 256:C813-C822.
- Shear MJ, Turner FC. 1943.** *Isolation of hemorrhage-producing fraction from Serratia marcescens (Bacillus prodigiosus) culture filtrates.* Journal of the National Cancer Institute 4:81-97.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. 1999.** *MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4.* The Journal of Experimental Medicine 189:1777-1782.
- Solaro RJ. 1991.** *Regulation of Ca²⁺-signaling in cardiac myofilaments.* Medicine and Science in Sports and Exercise 23:1148.
- Solaro RJ, Rarick HM. 1998.** *Troponin and Tropomyosin : Proteins That Switch on and Tune in the Activity of Cardiac Myofilaments.* Circulation Research 83:471-480.
- Southan GJ, Szabo C, Thiemermann C. 1995.** *Isothioureas: potent inhibitors of nitric oxide synthases with variable isoform selectivity.* British Journal of Pharmacology 114:510-516.
- Stamler JS, Simon DI, Jaraki O, Osborne JA, Francis S, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. 1992.** *S-Nitrosylation of Tissue-Type Plasminogen Activator Confers Vasodilatory and Antiplatelet Properties on the Enzyme.* Proceedings of the National Academy of Sciences 89:8087-8091.

- Stone JR, Marletta MA. 1994.** *Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states.* *Biochemistry* 33:5636-5640.
- Stuehr DJ, Marletta MA. 1985.** *Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide.* *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1985 Nov;. 82:7738-7742.
- Stuyvers BD, McCulloch AD, Guo J, Duff HJ, ter Keurs HEDJ. 2002.** *Effect of stimulation rate, sarcomere length and Ca²⁺ on force generation by mouse cardiac muscle.* *The Journal of Physiology* 544:817-830.
- Stühmer W. 1991.** *Structure-function studies of voltage-gated ion channels.* *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 20:65-78.
- Szabo C, Southan GJ, Thiemermann C. 1994.** *Beneficial Effects and Improved Survival in Rodent Models of Septic Shock with S-Methylisothiourrea Sulfate, a Potent and Selective Inhibitor of Inducible Nitric Oxide Synthase.* *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:12472-12476.
- Takaoka H, Esposito G, Mao L, Suga H, Rockman HA. 2002.** *Heart size-independent analysis of myocardial function in murine pressure overload hypertrophy.* *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 282:H2190-H2197.
- Takeda K. 2005.** *Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors.* *Journal of Endotoxin Research* 11:51-55.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999.** *Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components.* *Immunity* 11:443-451.
- Tao S, McKenna TM. 1994.** *In vitro endotoxin exposure induces contractile dysfunction in adult rat cardiac myocytes.* *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 267:H1745-H1752.
- Tavener SA, Long EM, Robbins SM, Mc Rae KM, Van Remmen H, Kubes P. 2004.** *Immune cell Toll-like receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia .* *Circulation Research* 95:700-707.
- Tavernier B, Garrigue D, Bouille C, Vallet B, Adnet P. 1998.** *Myofilament calcium sensitivity is decreased in skinned cardiac fibres of endotoxin-treated rabbits.* *Cardiovasc Research* 38:472-479.
- Tavernier B, Li JM, El-Omar MM, Lanone S, Yang Z-K, Trayer IP, Mebazaa A, Shah AM. 2000.** *Cardiac contractile impairment associated with increased phosphorylation of troponin I in endotoxemic rats.* *The FASEB Journal*.
- Tavernier B, Mebazaa A, Mateo P, Sys S, Ventura-Clapier R, Veksler V. 2001.** *Phosphorylation-dependent Alteration in Myofilament Ca²⁺ Sensitivity but Normal Mitochondrial Function in Septic Heart.* *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163:362-367.

- Teixeira CE, Priviero FBM, Webb RC. 2005.** *Molecular mechanisms underlying rat mesenteric artery vasorelaxation induced by the NO-independent soluble guanylyl cyclase stimulators BAY 41-2272 and YC-1.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 317:258-266.
- Thews G, Mutschler E, Vaupel P. 1989.** *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.* Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft, Stuttgart.
- Tiemann K, Weyer D, Djoufack PC, Ghanem A, Lewalter T, Dreiner U, Meyer R, Grohe C, Fink KB. 2003.** *Increasing myocardial contraction and blood pressure in C57BL/6 mice during early postnatal development.* American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 284:H464-H474.
- Timmerman CP, Mattsson E, Martinez-Martinez L, De GL, van Strijp JA, Verbrugh HA, Verhoef J, Fleer A. 1993.** *Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans.* Infection and Immunity 61:4167-4172.
- Toth I, Heard SO. 1997.** *Nitric oxide does not mediate lipopolysaccharide-induced myocardial depression in guinea pigs.* Critical Care Medicine 25:684-688.
- Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, Werts C, Boneca IG. 2004.** *Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition.* EMBO Reports 5:1000-1006.
- Tsien RY. 1980.** *New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures.* Biochemistry 19:2396-2404.
- Urbazek W, Seipel L. 1993.** *Die Adaptations- und Kompensationsphänomene des gesunden und geschädigten Myokards.* Pages 315-325 in U. Zwiener, ed. Allgemeine und klinische Pathophysiologie. Gustav Fischer Verlag, Jena - Stuttgart.
- Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ. 1999.** *Activation of Distinct cAMP-Dependent and cGMP-Dependent Pathways by Nitric Oxide in Cardiac Myocytes.* Circulation Research 84:1020-1031.
- Vila Petroff MG, Palomeque J, Mattiazzi AR. 2003.** *Na⁺-Ca²⁺ exchange function underlying contraction frequency inotropy in the cat myocardium.* The Journal of Physiology 550:801-817.
- Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JA, Segal DM. 2001.** *Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4.* Proceedings of the National Academy of Sciences 98:12156-12161.
- von AS, Schroder NW, Traub S, Gueinzus K, Lorenz E, Hartung T, Schumann RR, Hermann C. 2004.** *Heterozygous toll-like receptor 2 polymorphism does not affect lipoteichoic acid-induced chemokine and inflammatory responses.* Infection and Immunity 72:1828-1831.

- Wagner DR, Combes A, McTiernan C, Sanders VJ, Lemster B, Feldman AM. 1998.** *Adenosine Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Cardiac Expression of Tumor Necrosis Factor- α .* *Circulation Research* 82:47-56.
- Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ, Burke JF, Dinarello CA. 1991.** *Staphylococcus epidermidis induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to Escherichia coli.* *Journal of Clinical Investigation* 87:1925-1935.
- Wang DY, Chae SW, Gong QY, Lee CO. 1988.** *Role of α_{iNa} in positive force-frequency staircase in guinea pig papillary muscle.* *American Journal of Physiology* 255:C798-C807.
- Warner SJ, Mitchell D, Savage N, McClain E. 1985.** *Dose-dependent reduction of lipopolysaccharide pyrogenicity by polymyxin B.* *Biochemical Pharmacology* 34:3995-3998.
- Wasan KM, Strobel FW, Parrott SC, Lynn M, Christ WJ, Hawkins LD, Rossignol DP. 1999.** *Lipoprotein distribution of a novel endotoxin antagonist, E5531, in plasma from human subjects with various lipid levels.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43:2562-2564.
- Wei X, Charles Ian G, Smith A, Ure J, Feng G, Huang Fang-ping, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY. 1995.** *Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase.* *Nature* 375:408-411.
- Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB. 1993.** *Nitric Oxide Protects Against Cellular Damage and Cytotoxicity From Reactive Oxygen Species.* *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:9813-9817.
- Wu LL, Liu MS. 1991.** *Impaired calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism in endotoxin shock.* *Molecular and Cellular Biochemistry* 108:9-17.
- Yano K, Zarain-Herzberg A. 1994.** *Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties.* *Molecular and Cellular Biochemistry* 135:61-70.
- Yasuda S, Lew WYW. 1997.** *Lipopolysaccharide Depresses Cardiac Contractility and β -Adrenergic Contractile Response by Decreasing Myofilament Response to Ca^{2+} in Cardiac Myocytes.* *Circulation Research* 81:1011-1020.
- Yokoyama T, Vaca L, Rosen RD, Durante W, Hazarika P, Mann DL. 1993.** *Cellular Basis for the Negative Inotropic Effects of Tumor Necrosis Factor- α in the Adult Mammalian Heart.* *Journal of Clinical Investigations* 92:2303-2312.
- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock DT. 1999.** *Cutting Edge: recognition of Gram-Positive bacterial Cell Wall Components by the Innate Immune system Occurs Via Tol-Like Receptor 2.* *The Journal of Immunology* 163:1-5.

Yu XW, Liu MY, Kennedy RH, Liu SJ. 2005. *Both cGMP and peroxynitrite mediate chronic interleukin-6-induced negative inotropy in adult rat ventricular myocytes.* The Journal of Physiology 566:341-353.

Zhong J, Hwang TC, Adams HR, Rubin LJ. 1997. *Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from endotoxemic guinea pigs.* American Journal of Physiology 273:H2312-H2324.

Tabellenanhang:**Zahlenwerte zu den frequenzabhängigen Messungen der Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyten unter Einfluss von LPS und E5564**

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur + LPS			Kultur + LPS + E5564		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,107	0,055	47	0,070	0,038	9	0,093	0,041	12
1,0	0,077	0,043	54	0,050	0,018	9	0,054	0,032	12
2,0	0,056	0,031	49	0,030	0,012	11	0,039	0,019	10
4,0	0,057	0,036	32	0,030	0,018	8	0,040	0,023	9
6,0	0,078	0,038	33	0,030	0,025	5	0,066	0,036	7
8,0	0,079	0,030	38	0,050	0,010	5	0,087	0,014	7
10,0	0,076	0,030	42	0,040	0,015	6	0,090	0,025	6

Zahlenwerte zu Abbildung 3.6

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur + LPS			Kultur + LPS + E5564		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,107	0,055	47	0,050	0,020	6	0,086	0,033	13
1,0	0,077	0,043	54	0,038	0,016	6	0,053	0,019	8
2,0	0,056	0,031	49	0,025	0,019	5	0,035	0,009	9
4,0	0,057	0,036	32	0,025	0,011	3	0,031	0,005	7
6,0	0,078	0,038	33	0,051	0,011	3	0,054	0,017	6
8,0	0,079	0,030	38	0,056	0,006	2	0,060	0,022	2
10,0	0,076	0,030	42	0,059	0,013	2	0,077	0,022	5

Zahlenwerte zu Abbildung 3.7

Anhang

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur + LPS			Kultur + LPS + E5564		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,107	0,055	47	0,030	0,021	18	0,084	0,038	27
1,0	0,077	0,043	54	0,024	0,011	20	0,058	0,026	24
2,0	0,056	0,031	49	0,020	0,009	20	0,042	0,013	19
4,0	0,057	0,036	32	0,018	0,008	15	0,044	0,025	15
6,0	0,078	0,038	33	0,037	0,017	14	0,069	0,027	13
8,0	0,079	0,030	38	0,043	0,015	14	0,089	0,039	23
10,0	0,076	0,030	42	0,047	0,017	12	0,092	0,034	19

Zahlenwerte zu Abbildung 3.8

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur + LPS			Kultur + LPS + E5564		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	1,851	0,050	47	1,750	0,094	21	1,720	0,087	27
1,0	1,851	0,054	54	1,720	0,089	20	1,710	0,086	27
2,0	1,849	0,056	49	1,730	0,102	20	1,720	0,094	23
4,0	1,834	0,066	32	1,710	0,084	15	1,710	0,100	15
6,0	1,843	0,066	34	1,730	0,103	15	1,690	0,061	13
8,0	1,838	0,059	45	1,720	0,112	16	1,690	0,090	23
10,0	1,839	0,061	49	1,710	0,101	15	1,680	0,106	22

Zahlenwerte zu Abbildung 3.9

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur + LPS			Kultur + LPS + E5564		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	-5,250	2,760	47	-1,560	1,048	21	-3,780	2,280	27
1,0	-3,819	1,857	54	-1,280	0,588	20	-2,860	1,902	27
2,0	-3,134	1,510	49	-1,110	0,585	20	-2,080	0,963	23
4,0	-3,180	1,849	32	-1,050	0,501	15	-2,090	1,078	14
6,0	-4,026	1,898	34	-1,180	0,703	15	-2,150	0,978	13
8,0	-4,019	1,875	46	-1,470	0,837	16	-3,210	1,720	23
10,0	-3,636	1,726	49	-1,440	1,071	15	-3,130	1,521	22

Zahlenwerte zu Abbildung 3.10: Verkürzungsgeschwindigkeit

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur + LPS			Kultur + LPS + E5564		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	3,325	2,211	47	0,690	0,854	21	2,300	1,547	23
1,0	2,299	1,505	54	0,420	0,293	20	1,810	1,759	21
2,0	1,650	1,154	49	0,450	0,321	20	1,100	0,707	18
4,0	1,787	1,552	32	0,320	0,149	15	1,240	1,139	15
6,0	2,321	1,691	34	0,420	0,280	15	1,200	0,781	11
8,0	2,410	1,596	46	0,680	0,462	16	2,030	1,520	23
10,0	2,130	1,303	49	0,820	0,573	15	2,070	1,377	22

Zahlenwerte zu Abbildung 3.11: Relaxationsgeschwindigkeit

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur + LPS			Kultur + LPS + E5564		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,113	0,031	47	0,390	0,427	17	0,179	0,067	22
1,0	0,112	0,032	54	0,370	0,190	16	0,163	0,074	19
2,0	0,113	0,043	49	0,220	0,099	16	0,176	0,088	22
4,0	0,104	0,034	32	0,180	0,089	12	0,124	0,038	15
6,0	0,092	0,021	34	0,130	0,060	14	0,113	0,030	13
8,0	0,085	0,022	46	0,100	0,020	14	0,111	0,047	16
10,0	0,080	0,012	49	0,100	0,029	13	0,088	0,013	16

Zahlenwerte zu Abbildung 3.12: Verkürzungsdauer

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur + LPS			Kultur + LPS + E5564		
	MW	SEM	n	MW	SEM	n	MW	SEM	n
0,5	9,516	0,797	8	4,981	0,365	8	9,263	0,920	10
1,0	5,792	0,585	6	3,328	0,116	10	5,177	0,230	9
2,0	2,530	0,481	10	1,645	0,234	8	2,374	0,317	7
4,0	0,583	0,129	7	0,494	0,096	6	0,823	0,165	6
6,0	0,052	0,011	6	0,190	0,048	5	0,042	0,040	5
8,0	0,037	0,015	5	0,056	0,011	5	0,067	0,009	6
10,0	0,033	0,013	5	0,033	0,007	8	0,045	0,007	7

Zahlenwerte zu Abbildung 3.4: Werte für die Zeitkonstante τ_1

Zahlenwerte zu den simultanen Messungen der Sarkomerverkürzung und der $[Ca^{2+}]_i$

Wildtyp-Tiere:

	Tyrode n=44	Kultur n=17	Kultur + LPS n=45	Kultur + SMT n=20	Kultur + LPS + SMT n=26
RS (μm)	1,911 $\pm 0,088$	1,857 $\pm 0,066$	1,838 $\pm 0,087$	1,831 $\pm 0,048$	1,810 $\pm 0,070$
VA (μm)	0,070 $\pm 0,037$	0,072 $\pm 0,029$	0,024 $\pm 0,020$	0,067 $\pm 0,033$	0,069 $\pm 0,034$
VG ($\mu\text{m/s}$)	-2,678 $\pm 1,280$	-2,645 $\pm 0,978$	-1,210 $\pm 0,847$	-2,216 $\pm 1,119$	-2,828 $\pm 1,663$
RG ($\mu\text{m/s}$)	1,397 $\pm 1,141$	1,578 $\pm 0,826$	0,463 $\pm 0,613$	1,123 $\pm 0,952$	1,376 $\pm 1,087$
VD (s)	0,175 $\pm 0,036$	0,162 $\pm 0,033$	0,193 $\pm 0,039$	0,194 $\pm 0,033$	0,182 $\pm 0,032$
RCa (F340/F380)	T1: 1,321 $\pm 0,200$ T2: 2,490 $\pm 0,521$	1,728 $\pm 0,435$	KL1: 1,560 $\pm 0,264$ KL2: 2,375 $\pm 1,145$	1,884 $\pm 0,330$	1,949 $\pm 0,255$
MCA (F/F ₀)	1,630 $\pm 0,366$	1,349 $\pm 0,157$	1,134 $\pm 0,270$	1,255 $\pm 0,077$	1,250 $\pm 0,212$
ACA ($\Delta\text{F}/\text{F}_0$)	0,622 $\pm 0,292$	0,321 $\pm 0,118$	0,202 $\pm 0,100$	0,255 $\pm 0,077$	0,267 $\pm 0,123$
AnGCa (F340/F380)/s)	104,337 $\pm 43,233$	58,546 $\pm 37,934$	37,700 $\pm 15,986$	50,973 $\pm 22,960$	54,153 $\pm 37,697$
AbGCa (F340/F380)/s)	14,439 $\pm 6,786$	8,125 $\pm 3,509$	5,753 $\pm 2,914$	7,194 $\pm 3,649$	7,851 $\pm 7,673$
DCa (s)	0,184 $\pm 0,022$	0,162 $\pm 0,034$	0,170 $\pm 0,035$	0,185 $\pm 0,030$	0,188 $\pm 0,039$
VA/MCA ($\mu\text{m}/(\text{F}/\text{F}_0)$)	0,043 $\pm 0,024$	0,052 $\pm 0,020$	0,023 $\pm 0,018$	0,053 $\pm 0,024$	0,055 $\pm 0,028$
VA/ACA ($\mu\text{m}/(\Delta\text{F}/\text{F}_0)$)	0,123 $\pm 0,076$	0,261 $\pm 0,149$	0,137 $\pm 0,094$	0,271 $\pm 0,128$	0,268 $\pm 0,106$

Zahlenwerte zu den simultanen Messungen der Sarkomerverkürzung und der $[Ca^{2+}]_i$ bei C57BL/6 Mäusen. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung.

Erklärung der Abkürzungen: RS – Ruhesarkomerlänge; VA – Verkürzungsamplitude; VG – Verkürzungsgeschwindigkeit; RG – Relaxationsgeschwindigkeit; VD – Verkürzungsdauer; RCa – Ruhekalziumkonzentration; T1(2) – Gruppe Tyrode 1 (bzw. 2); KL1 (bzw. 2) – Gruppe Kultur LPS 1 (bzw. 2); MCA – Maximum der $[Ca^{2+}]_i$ während der Verkürzung; ACA – Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ während der Verkürzung; AnGCa – Anstiegsgeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$; AbGCa – Abnahmegeschwindigkeit der $[Ca^{2+}]_i$; DCa – Dauer der Änderung der $[Ca^{2+}]_i$

TLR4-defiziente Tiere:

	Tyrode	Kultur	Kultur + LPS
	n=21	n=19	n=18
RS (μm)	1,906 $\pm 0,049$	1,809 $\pm 0,054$	1,810 $\pm 0,076$
VA (μm)	0,049 $\pm 0,031$	0,042 $\pm 0,026$	0,045 $\pm 0,023$
VG ($\mu\text{m/s}$)	-2,182 $\pm 1,053$	-2,032 $\pm 0,880$	-1,798 $\pm 0,707$
RG ($\mu\text{m/s}$)	0,888 $\pm 0,718$	0,778 $\pm 0,886$	0,768 $\pm 0,562$
VD (s)	0,175 $\pm 0,032$	0,183 $\pm 0,023$	0,171 $\pm 0,040$
RCa (F340/F380)	2,324 $\pm 0,268$	2,248 $\pm 0,356$	2,269 $\pm 0,374$
MCa (F/F₀)	1,467 $\pm 0,122$	1,319 $\pm 0,134$	1,314 $\pm 0,137$
ACa ($\Delta\text{F}/\text{F}_0$)	0,462 $\pm 0,122$	0,319 $\pm 0,135$	0,316 $\pm 0,140$
AnGCa ((F340/F380))/s)	113,670 $\pm 47,826$	80,283 $\pm 43,954$	69,871 $\pm 33,140$
AbGCa ((F340/F380))/s)	15,768 $\pm 5,927$	11,774 $\pm 6,174$	12,060 $\pm 7,777$
DCa (s)	0,184 $\pm 0,028$	0,169 $\pm 0,037$	0,164 $\pm 0,048$
VA/MCa ($\mu\text{m}/(\text{F}/\text{F}_0)$)	0,033 $\pm 0,020$	0,031 $\pm 0,017$	0,034 $\pm 0,017$
VA/ACa ($\mu\text{m}/(\Delta\text{F}/\text{F}_0)$)	0,103 $\pm 0,055$	0,319 $\pm 0,135$	0,316 $\pm 0,140$

Zahlenwerte zu den simultanen Messungen der Sarkomerverkürzung und der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei TLR4^{-/-} Mäusen. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung.

Erklärung der Abkürzungen: RS – Ruhesarkomerlänge; VA – Verkürzungsamplitude; VG – Verkürzungsgeschwindigkeit; RG – Relaxationsgeschwindigkeit; VD – Verkürzungsdauer; RCa – Ruhekalziumkonzentration; T1(2) – Gruppe Tyrode 1 (bzw. 2); KL1 (bzw. 2) – Gruppe Kultur LPS 1 (bzw. 2); MCa – Maximum der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Verkürzung; ACa – Amplitude der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der Verkürzung; AnGCa – Anstiegsgeschwindigkeit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$; AbGCa – Abnahme­geschwindigkeit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$; DCa – Dauer der Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Zahlenwerte für die Experimente mit Natriumextraktions-Kontraktur**Gruppe Tyrode:**

Zelle	Y-Achsenabschnitt ± SD	Steigung ± SD	r²
1	-0.1583 ± 0.011	2.186 ± 0.036	0,9601
2	-0.2784 ± 0.035	2.648 ± 0.141	0,9544
3	-0.3859 ± 0.022	2.787 ± 0.062	0,9786
4	-0.3645 ± 0.057	2.543 ± 0.124	0,9118
5	-0.5457 ± 0.025	2.792 ± 0.048	0,9852
6	-0.3414 ± 0.020	2.759 ± 0.060	0,9838
7	-0.5615 ± 0.187	2.993 ± 0.397	0,818
8	-0.2493 ± 0.030	2.314 ± 0.071	0,9305
9	-0.3781 ± 0.060	2.872 ± 0.199	0,9527
10	-0.3295 ± 0.029	2.752 ± 0.098	0,957
11	-0.1867 ± 0.010	2.501 ± 0.040	0,992
12	-0.2054 ± 0.015	2.453 ± 0.043	0,9725
13	-0.2951 ± 0.005	2.682 ± 0.015	0,9989

Zahlenwerte zu den Abbildungen 3.42 A und 3.43

Gruppe Kultur:

Zelle	Y-Achsenabschnitt ± SD	Steigung ± SD	r ²
1	-0.187 ± 0.027	2.593 ± 0.113	0,9024
2	-0.859 ± 0.076	3.235 ± 0.138	0,9923
3	-0.587 ± 0.054	2.879 ± 0.110	0,9831
4	-1.017 ± 0.038	3.724 ± 0.078	0,9892
5	-0.448 ± 0.077	2.382 ± 0.119	0,9714
6	-0.681 ± 0.047	3.090 ± 0.102	0,9765
7	-0.603 ± 0.117	2.957 ± 0.232	0,7927

Zahlenwerte zu den Abbildungen 3.42 B und 3.43

Gruppe Kultur + LPS:

Zelle	Y-Achsenabschnitt ± SD	Steigung ± SD	r ²
1	-0.153 ± 0.071	2.203 ± 0.171	0,8219
2	-0.616 ± 0.059	2.611 ± 0.075	0,982
3	-0.417 ± 0.082	2.688 ± 0.168	0,928
4	-0.257 ± 0.040	2.262 ± 0.060	0,9544
5	-0.277 ± 0.073	2.452 ± 0.159	0,9353

Zahlenwerte zu den Abbildungen 3.42 C und 3.43

Zahlenwerte zu den frequenzabhängigen Messungen der Sarkomerverkürzung isolierter Kardiomyten unter Einfluss von LTA und PGN

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur			Kultur + LTA _{sigma} + PGN		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,096	0,045	58	0,083	0,048	36	0,050	0,026	27
1,0	0,071	0,036	62	0,066	0,036	49	0,044	0,021	33
2,0	0,067	0,035	57	0,064	0,042	39	0,047	0,026	31
4,0	0,069	0,034	40	0,068	0,031	30	0,052	0,023	18
6,0	0,084	0,043	32	0,088	0,043	31	0,056	0,023	13
8,0	0,080	0,037	39	0,088	0,038	42	0,058	0,020	15
10,0	0,075	0,032	35	0,079	0,035	41	0,063	0,025	20

Zahlenwerte zu der Abbildung 3.44: Verkürzungsamplitude

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur			Kultur + LTA _{hp} + PGN		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,096	0,045	58	0,083	0,048	36	0,038	0,022	14
1,0	0,071	0,036	62	0,066	0,036	49	0,036	0,018	19
2,0	0,067	0,035	57	0,064	0,042	39	0,035	0,010	15
4,0	0,069	0,034	40	0,068	0,031	30	0,036	0,012	12
6,0	0,084	0,043	32	0,088	0,043	31	0,046	0,026	10
8,0	0,080	0,037	39	0,088	0,038	42	0,055	0,019	13
10,0	0,075	0,032	35	0,079	0,035	41	0,064	0,052	13

Zahlenwerte zu der Abbildung 3.45: Verkürzungsamplitude

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur			Kultur + LTA _{hp} + PGN		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	1,857	0,08	58	1,759	0,06	36	1,761	0,08	14
1,0	1,856	0,08	62	1,753	0,07	49	1,744	0,07	19
2,0	1,864	0,08	57	1,771	0,08	39	1,760	0,07	15
4,0	1,844	0,07	40	1,756	0,08	30	1,764	0,07	12
6,0	1,849	0,08	32	1,773	0,08	30	1,772	0,08	9
8,0	1,856	0,07	39	1,772	0,08	40	1,750	0,09	12
10,0	1,845	0,08	35	1,765	0,07	40	1,754	0,07	12

Zahlenwerte zu der Abbildung 3.46: Ruhesarkomerlänge

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur			Kultur + LTA _{hp} + PGN		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	-5,138	2,225	58	-4,340	2,180	36	-2,317	0,951	14
1,0	-4,057	2,142	62	-3,690	1,757	49	-2,411	1,215	19
2,0	-3,942	1,961	57	-3,820	2,054	39	-2,307	0,846	15
4,0	-4,425	2,222	40	-3,787	1,688	30	-2,484	1,098	12
6,0	-5,011	2,450	32	-4,961	2,569	31	-2,427	1,319	10
8,0	-4,762	1,977	39	-4,966	2,274	42	-2,154	0,753	14
10,0	-4,684	2,219	35	-4,407	2,055	41	-2,040	1,813	13

Zahlenwerte zu der Abbildung 3.47: Verkürzungsgeschwindigkeit

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur			Kultur + LTA _{hp} + PGN		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	3,545	2,303	58	2,911	2,151	36	1,112	0,550	14
1,0	2,621	1,913	63	2,250	1,617	49	1,207	0,671	19
2,0	2,465	1,770	57	2,467	2,091	39	1,132	0,591	15
4,0	2,840	1,932	40	2,726	1,850	30	1,193	0,674	12
6,0	3,754	2,543	32	3,867	2,446	30	1,356	1,014	10
8,0	3,535	2,139	39	3,809	1,950	39	1,227	0,511	14
10,0	3,497	2,031	36	3,536	2,065	40	1,384	1,191	13

Zahlenwerte zu der Abbildung 3.48: Relaxationsgeschwindigkeit

Frequenz (Hz)	Tyrode			Kultur			Kultur + LTA _{hp} + PGN		
	MW	SD	n	MW	SD	n	MW	SD	n
0,5	0,099	0,024	58	0,121	0,031	32	0,132	0,066	13
1,0	0,104	0,046	62	0,122	0,046	46	0,115	0,060	19
2,0	0,103	0,040	57	0,117	0,039	39	0,115	0,055	15
4,0	0,086	0,020	40	0,100	0,022	30	0,101	0,044	12
6,0	0,087	0,021	32	0,088	0,017	31	0,080	0,023	10
8,0	0,079	0,013	39	0,081	0,013	42	0,081	0,016	14
10,0	0,077	0,009	36	0,079	0,012	41	0,087	0,034	13

Zahlenwerte zu der Abbildung 3.49: Verkürzungsdauer

Zahlenwerte der Daten zur Hämodynamik der *in vivo*-Ergebnisse

	Sham		TAC	
	PBS (n = 8)	LPS (n = 8)	PBS (n = 10)	LPS (n = 11)
SAP (mmHg)	112,57 ± 9,67	91,83 ± 13,77	153,93 ± 11,47	132,89 ± 17,75
DAP (mmHg)	85,00 ± 10,02	70,13 ± 15,14	82,20 ± 6,34	81,29 ± 11,32
MAP (mmHg)	91,76 ± 9,63	75,51 ± 14,09	104,23 ± 6,00	95,03 ± 13,23

Zahlenwerte zu den Abbildungen 3.52 bis 3.54: Peripher gemessene Parameter

	Sham		TAC	
	PBS (n = 7)	LPS (n = 6)	PBS (n = 9)	LPS (n = 5)
HR (min⁻¹)	487,16 ± 27,97	590,01 ± 46,75	561,36 ± 52,40	634,64 ± 20,50
SLVP (mmHg)	116,65 ± 11,55	90,93 ± 14,27	152,72 ± 14,11	131,78 ± 18,11
EDLVP (mmHg)	11,88 ± 6,06	5,66 ± 4,14	11,41 ± 5,37	13,76 ± 8,32
+dP/dt_{max} (mmHg/s)	-9403,54 ± 1156,65	-5716,23 ± 1341,05	-9994,88 ± 1651,68	-8090,73 ± 738,39
-dP/dt_{min} (mmHg/s)	9033,31 ± 1633,25	6567,83 ± 2025,46	7880,02 ± 2373,31	6307,54 ± 512,31

Zahlenwerte zu den Abbildungen 3.55 bis 3.59: Linksventrikulär gemessene Parameter

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5119-X



9 783835 195119 8



Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rainer Meyer danke ich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Ermöglichung dieser Arbeit und die überaus nette und engagierte Betreuung und Unterstützung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Joachim Roth möchte ich für die freundliche und unkomplizierte Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin und für die Begutachtung meiner Arbeit danken.

Herrn Dr. Georg Baumgarten und Herrn Dr. Pascal Knüfermann danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die finanzielle Förderung durch eine Stelle zu einem Großteil der Zeit für die Erstellung der Dissertation.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich danken für eine wunderschöne Zeit in Bonn. Sie war der Grund, weshalb ich auch dann gerne zur Arbeit gekommen bin, wenn die Versuche mal wieder für mehrere Wochen nicht funktioniert haben.

Einen besonderen Dank möchte ich auch Frau Hanne Bock aussprechen, die nicht nur viel zum Gelingen der Versuche beigetragen hat, sondern auch, wenn es mal Schwierigkeiten gab, immer ein offenes Ohr hatte und mit der ich auch immer einen Grund zum Lachen gefunden habe („EVO“).

Ich danke meinen Eltern und meiner ganzen Familie, die mich während meiner gesamten Ausbildung bedingungslos unterstützt und mich zu dem Menschen gemacht hat, der ich heute bin.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Frau Elke danken, die mich auch in schwierigen und frustrierten Zeiten nicht nur immer ertragen hat, sondern mir auch stets Kraft und Mut zum Weitermachen gegeben hat. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht fertig geworden.

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind.