

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum Hamburg, Cardiovascular Research Center

Direktor: Prof. Dr. T. Meinertz

Die Bedeutung der Myeloperoxidase in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Kai Peter Friedrichs
aus Bad Segeberg

Hamburg 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 06.12.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. S. Baldus

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. H. Ehmke

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. S. Willems

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Vorhofflimmern	5
1.1.1 Definition	5
1.1.2 Epidemiologie	5
1.1.3 Klassifikation	6
1.1.4 Pathophysiologie	7
1.1.5 Therapie	15
1.2 Neutrophile Granulozyten	16
1.3 Die Myeloperoxidase	17
1.3.1 Katalytische Aktivität und Pathogenabwehr	18
1.3.2 Extramikrobizide Eigenschaften der MPO	20
2. Zielsetzung	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Material	24
3.1.1 Reagenzien und Arzneistoffe	24
3.1.2. Materialien	24
3.1.3 Puffer und Lösungen	25
3.1.4 Antikörper	25
3.1.5 Reaktionskits	25
3.1.6 Mauslinien	26
3.1.7 Laborgeräte, Apparaturen und Software	26
3.2 Methoden	27
3.2.1 Patientenkollektive	27
3.2.2 Laborparameter	27
3.2.3 Schrittmacheranalyse	28
3.2.4 Bestimmung der Gefäßfunktion mittels Ultraschall	28
3.2.5 Homogenisierung von Gewebe	30
3.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration	30
3.2.7 Analyse der humanen MPO Plasma- und Gewebespiegel	31
3.2.8 Analyse der humanen Elastase Plasmaspiegel	31
3.2.9 Immunfluoreszenz-Färbung von MPO und Chlorotyrosin	32
3.2.10 Quantifizierung des Chlorotyrosingehaltes in humanem Vorhofgewebe	32
3.2.11 Tierexperimentelles Modell	33
3.2.12 Implantation von osmotischen Minipumpen	33
3.2.13 Anlage von intravenösen Jugularis-Kathetern zur Applikation von MPO	34
3.2.14 Radiotelemetrische Blutdruckmessung	34
3.2.15 Echokardiographische Untersuchung	35
3.2.16 Immunfluoreszenz-Färbung von Chlorotyrosin in murinen Vorhöfen	35
3.2.17 Quantifizierung des Chlorotyrosingehaltes in murinem Vorhofgewebe	35
3.2.18 Analyse der murinen MPO Plasma- und Gewebespiegel	35
3.2.19 Bestimmung der MMP Aktivität	36
3.2.20 Quantifizierung der Proteinmenge an MMP in murinen Vorhöfen	36
3.2.21 Histologische Fibroseanalyse	37
3.2.22 Elektrophysiologische Untersuchung	38
3.2.23 Epikardiales, elektrophysiologisches Mapping	39
3.2.24 Statistische Auswertung	40
4. Ergebnisse	41
4.1 Charakterisierung der Patientenkollektive	41
4.1.1 Klinische Daten	41

4.1.2 Bestimmung der flussabhängigen Gefäßfunktion	43
4.1.3 Humane MPO und Elastase Plasma- und Gewebespiegel	43
4.1.4 Immunfluoreszenz-Färbung von Chlorotyrosin und MPO in humanem Vorhofgewebe	44
4.1.5 Quantifizierung von Chlorotyrosin in humanem Vorhofgewebe mittels LC/MS/MS	45
4.2 Tierexperimente	46
4.2.1 Blutdruckmessung	46
4.2.2 Echokardiographie	48
4.2.3 MPO Plasmaspiegel und atriale MPO Gewebespiegel	48
4.2.4 Immunfluoreszenz-Färbung von Chlorotyrosin in murinem Vorhofgewebe	49
4.2.5 Quantifizierung von Chlorotyrosin in murinem Vorhofgewebe mittels LC/MS/MS	50
4.2.6 Auswertung des Fibrosegrades in murinen Vorhöfen	51
4.2.7 Aktivitätsbestimmung von MMP mittels Zymographie	52
4.2.8 Proteinanalyse von MMP mittels Western-Blot	52
4.2.9 Elektrophysiologische Untersuchung	53
4.2.10 Elektrophysiologisches Mapping	57
Zusammenfassung der humanen Ergebnisse	60
Zusammenfassung der tierexperimentellen Ergebnisse	60
5. Diskussion	61
5.1 MPO als Mediator von Vorhoffibrose	61
5.2 Angiotensin II als Zytokin	64
5.3 Therapeutische Konsequenz	65
5.4 Ausblick	66
6. Zusammenfassung	68
7. Summary	69
8. Abkürzungsverzeichnis	70
9. Literaturverzeichnis	73
10. Eidesstattliche Versicherung	84

1. Einleitung

1.1. Vorhofflimmern

1.1.1 Definition

Vorhofflimmern ist durch die ungerichtete und unorganisierte Depolarisationen von Zellen des Vorhofmyokards, die zu sich chaotisch ausbreitenden Wellenfronten innerhalb des Vorhofes führen und funktionell in einer inadäquaten Vorhofkontraktion resultieren, charakterisiert ¹.

Die erste Beschreibung von Vorhofflimmern stammt bereits aus dem 18. Jahrhundert von den Physiologen Harvey und Senac, die über die klinische Beobachtung von Patienten mit „unregelmäßigem Puls“ und einer Assoziation mit Mitralklappenerkrankungen und dilatierten Vorhöfen berichten ². Cushny verglich 1907 arterielle Pulscurven einer Patientin mit unregelmäßigem Puls mit denen von Hunden, die im Tierexperiment eine „fibrilläre Kontraktion des Vorhofes“ aufwiesen und kam zu der Erkenntnis, dass seine Patientin ebenfalls an Vorhofflimmern leide ³. Die erste elektrokardiographische Dokumentation von Vorhofflimmern stammt bereits aus dem Jahre 1906 vom niederländischen Physiologen William Einthoven, der 1924 für die Entwicklung des Elektrokardiogramms mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde ⁴.

1.1.2 Epidemiologie

Vorhofflimmern ist neben der ventrikulären Extrasystolie die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen und stellt ein sowohl klinisch als auch gesundheitsökonomisch bedeutendes Problem dar. In den westlichen Industrienationen sind etwa 1 % der über Sechzig-, 5 % der über Siebzig- sowie etwa 10 % der über Achtzigjährigen betroffen ⁵. Innerhalb der nächsten 50 Jahre ist mit einem weiteren Anstieg der Prävalenz des Vorhofflimmerns um das Zweieinhalbfache zu rechnen, wobei bereits heute eine Zunahme der Hospitalisation aufgrund von Vorhofflimmern zu beobachten ist ⁶.

Die Bedeutung des Vorhofflimmerns lässt sich anhand von Erkenntnissen der Framingham-Studie unterstreichen, so konnten Kannel et al zeigen, dass die Mortalität unter chronischem Vorhofflimmern um das Doppelte erhöht ist im Vergleich zu einem Kollektiv im Sinusrhythmus ⁵.

Bei etwa 89 % der Patienten mit Vorhofflimmern lässt sich hauptbefundlich eine strukturelle oder funktionelle Herzerkrankung diagnostizieren ⁷. Mit der Prävalenz des Vorhofflimmerns unabhängig assoziierte Erkrankungen sind die Arterielle Hypertonie, Herzklappenerkrankungen, Adipositas, Hyperthyreose, Herzinsuffizienz, Koronare Herzerkrankung sowie kardiogene thrombembolische Komplikationen ^{8,9}. Letztgenannten kommt eine besondere klinische Bedeutung zu, da für unbehandelte Patienten ein jährliches Risiko von 4,5 % besteht, einen apoplektischen Insult zu erleiden ¹⁰.

1.1.3 Klassifikation

Eine einheitliche Klassifikation ist aufgrund uneinheitlicher Symptome der Patienten und variierender elektrokardiographischer Befunde problematisch, jedoch hat sich eine klinische Einteilung nach Auftreten und Dauer des Vorhofflimmerns durchgesetzt.

So können paroxysmales, persistierendes und permanentes Vorhofflimmern unterschieden werden ¹¹.

Für das paroxysmale Vorhofflimmern gilt, dass es spontan terminiert und nicht länger als 48 Stunden anhält. Dabei kann es sich um eine erstmalig aufgetretene Episode oder mehrere Episoden innerhalb der vergangenen 3 Monate handeln, die jeweils unbehandelt oder unter medikamentöser Therapie auftreten.

Persistierendes Vorhofflimmern ist gekennzeichnet durch eine Dauer von mehr als 48 Stunden und erfolgreiche Kardioversion - im Gegensatz zum permanenten Vorhofflimmern, bei dem letztere frustran verläuft oder nicht indiziert ist ^{12,13}.

1.1.4 Pathophysiologie

Viele aktuelle Befunde zeichnen ein multifaktorielles Bild der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns (Abb. 1). Das sogenannte „elektrische Remodeling“ mit konsekutiver Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards sowie das „strukturelle Remodeling“ vor allem im Sinne fibrotischer Gewebeveränderungen bilden etablierte Konzepte im Verständnis der Entstehung und Aufrechterhaltung der Rhythmusstörung ¹⁴. Zusätzlich gibt es klinische und experimentelle Hinweise auf eine Beteiligung inflammatorischer Vorgänge an der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns, die in Zukunft neue therapeutische Ansätze ermöglichen könnten ¹⁵.

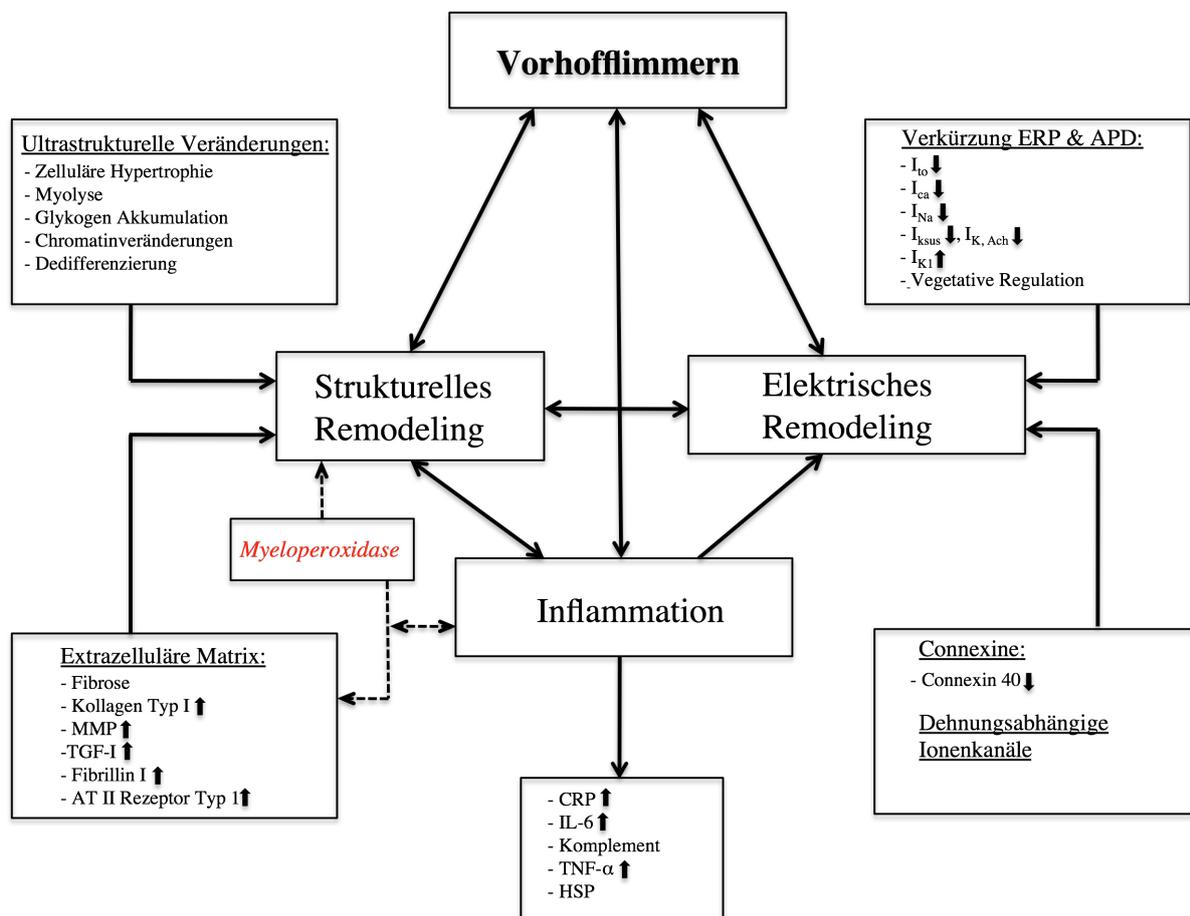


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns und Darstellung der potentiellen Rolle von MPO.

1.1.4.1 Elektrisches Remodeling

Die Beobachtung, dass eine zunehmende Dauer an Episoden paroxysmalen Vorhofflimmerns trotz fehlender weiterer Risikofaktoren mit einer hohen Wahrscheinlichkeit in persistierendes oder permanentes Vorhofflimmern mündet sowie die Abhängigkeit des Kardioversionserfolges von der Dauer des vorbestehenden Vorhofflimmerns führten zu der Erkenntnis, dass Vorhofflimmern selbst als wichtiger Risikofaktor für die Chronizität der Erkrankung anzusehen ist: „*Atrial fibrillation begets atrial fibrillation*“¹⁶.

Der zugrunde liegende Mechanismus wird als „elektrisches Remodeling“ bezeichnet und beschreibt Vorgänge, die in einer Verkürzung der effektiven Refraktärzeit, verminderten Frequenzadaptation der Aktionspotenzialdauer sowie veränderter Aktionspotenzialmorphologie des Vorhofmyokards bzw. der Kardiomyozyten resultieren^{16,17,18}. Verantwortlich dafür sind Veränderungen an Ionenkanälen, vor allem an jenen für Kalium und Kalzium.

Kalziumkanäle:

Modulation des L-Typ Kalziumkanals ($I_{Ca,L}$) unter Vorhofflimmern wirkt sich auf die Aktionspotenzialdauer und Frequenzadaptation der Repolarisation aus¹⁹, da der verminderte Kalziuminflux in die Zelle eine reduzierte Aktionspotenzialdauer bedeutet^{20,21}. Ursächlich dafür ist neben veränderten biophysikalischen Eigenschaften des Kanals²⁰ einerseits eine unter Vorhofflimmern verringerte mRNA Expression der α_{1c} Untereinheit²², andererseits scheint diese Downregulation kompensatorisch zu erfolgen aufgrund des erhöhten intrazellulären Kalziumgehaltes während der Arrhythmie^{23,24}. Weitere Befunde zeigen zusätzlich eine geringere Expression der regulierenden β_b/β_c Untereinheit des Kanals²⁰. Zusätzlich ist ebenfalls die Anzahl der funktionellen Kanäle in der Zellmembran bei Vorhofflimmern reduziert, da die Proteinexpression des Kanals vermindert ist und die Kanäle eine 40 % Verringerung von Dihydropyridin-Bindungsstellen aufweisen²⁵.

Kaliumkanäle:

Kaliumkanälen werden eine besondere Bedeutung im Erhalt des Ruhemembranpotenziales, der Repolarisationsphase sowie der spontanen diastolischen Depolarisation des myokardialen Aktionspotenziales zugeschrieben, und auch sie unterliegen morphologischen sowie funktionellen Veränderungen durch Vorhofflimmern. Im Rahmen des atrialen Remodelings zeigte sich sowohl im Patienten als auch im Tierversuch eine Verminderung des transienten Kalium-Auswärtsstromes über den I_{to} Kanal, deren Ursache eine verringerte Genexpression der Kv4.3 Untereinheit des Kanals ist.

Entscheidend für die terminale Phase der Repolarisation sind sogenannte *Inward Rectifier* Kaliumkanäle mit ihrem wichtigsten Vertreter I_{K1} sowie dem acetylcholin-abhängigen Kanal I_{KACH} , deren Vorkommen unter Vorhofflimmern im Patienten signifikant gesteigert ist und somit entscheidend zur Heterogenität und Beschleunigung der Repolarisation beiträgt, was für den I_{KACH} vor allem eine Rolle bei vagal-induziertem Vorhofflimmern spielt^{20,26}. Die Bedeutung weiterer Kaliumkanäle, z.B. des anhaltenden Auswärtsstroms über I_{sus} und I_{Kur} für die Pathophysiologie des Vorhofflimmerns ist unklar, so zeigte eine Studie an isolierten, humanen Kardiomyozyten aus Vorhofohrgewebe von Patienten mit und ohne Vorhofflimmern eine Verminderung der jeweiligen Stromdichte²⁶, die eine zweite zumindest im Tiermodell nicht bestätigen konnte²¹.

Diese gestörte zelluläre Kalium-Homöostase und veränderte Ionenkanalausstattung konnte an Patienten nach kardiovaskulärem, chirurgischem Eingriff und postoperativ aufgetretenem Vorhofflimmern bestätigt werden. Diesen Veränderungen kann damit eine entscheidende Bedeutung vor allem in der Initiierung der Erkrankung zugeschrieben werden²⁷.

Connexine:

Connexine sind Transmembranproteine, die am Aufbau der sogenannten „*gap junctions*“ beteiligt sind. Auf diesem Wege ermöglichen sie den interzellulären Austausch von Molekülen und Ionen zwischen Kardiomyozyten und somit auch die elektrische Reizweiterleitung, so dass sich morphologische Veränderungen und Veränderung ihrer Expression über die Beeinflussung der myokardialen

Refraktärzeiten und allgemeinen Leitungseigenschaften potenziell proarrhythmisch auswirken können¹⁴. Die relevantesten Vertreter dieser Proteingruppe sind Connexin 43 (Cx43), welches ubiquitär im Herzen vorkommt sowie Connexin 40 (Cx40), dessen Präsenz selektiv auf den Vorhof beschränkt ist und in tierexperimentellen Studien mit dem Auftreten von Vorhofflimmern assoziiert werden konnte^{14,28}. Unter chronischem Vorhofflimmern zeigte sich eine verringerte myokardiale Dichte sowie diskontinuierliche Verteilung von Cx40²⁹, zusätzlich konnte in Cx40-defizienten Mäusen eine gesteigerte Vulnerabilität für Vorhofflimmern nach atrialer Stimulation beobachtet werden³⁰, deren Ursache in einer heterogenen elektrischen Erregungsausbreitung begründet ist, die das Auftreten von Vorhofflimmern begünstigt. Die klinische Bedeutung von Connexinen in der Arrhythmogenese wird durch die Tatsache evident, dass Patienten mit Vorhofflimmern vermehrt verschiedene genetische Polymorphismen tragen, die mit einer reduzierten Cx40-Expression einhergehen^{31,32}. Die bisher veröffentlichten Studien beschränken sich auf einen deskriptiven Ansatz: Auf welchem Wege und über welche Zielstrukturen abgesehen von genetischen Veränderungen es zu Störungen der Connexin-Homöostase im Rahmen des elektrischen Remodelings kommt, ist nicht bekannt.

1.1.4.2 Myokardiales Remodeling

Strukturelle Veränderungen des Vorhofmyokards bei Vorhofflimmern wurden sowohl bei Patienten als auch im Tiermodell beobachtet und werden seither als „Remodeling“ bezeichnet. Eine etablierte Vorstellung ist, dass dieser Prozess zu Regionen verminderter elektrischer Konduktion innerhalb des Vorhofes führt, so dass die Reizweiterleitung über alternative Bahnen erfolgen muss. Auf diesem Wege entstehen Areale unterschiedlicher benachbarter Refraktärzeiten, was die Induktion pathologischer, sogenannter „Reentrykreise“ und die Initiierung von Vorhofflimmern zur Folge haben kann^{33,34}. Strukturelles Remodeling wurde sowohl auf zellulärer Ebene als auch im funktionellen Zellverband beobachtet - ob es einen kausalen Beitrag zur Entstehung des Vorhofflimmerns leistet oder in dessen Folge entsteht, ist nicht hinreichend geklärt.

Zelluläre Mechanismen:

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Kardiomyozyten von Hunden nach invasiver, tachykarder Vorhofstimulation (6 Wochen, Herzfrequenz 400 min^{-1}) zeigten zelluläre Veränderungen im Sinne vergrößerter Zellkerne und Mitochondrien sowie Atypien des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums. Makroskopisch imponierte eine signifikante Zunahme der Vorhofgröße, und funktionell konnte an diesen Tieren eine Verkürzung der effektiven Refraktärzeiten sowie eine gesteigerte Vulnerabilität für Vorhofflimmern nachgewiesen werden³⁵. Vergleichbare mikroskopische Befunde konnten an Patienten mit Mitralklappenerkrankungen und Vorhofflimmern bestätigt werden³⁶. Die zellulären Veränderungen wurden beschrieben als Mechanismen einer Entdifferenzierung und Degeneration von Kardiomyozyten unter Vorhofflimmern, welche aufgrund eines gesteigerten Vorkommens von α -Aktin und β -Myosin an die fetale Entwicklung von Kardiomyozyten erinnern. Dieser zytoskelettäre Umbau kann als kompensatorischer Mechanismus im Rahmen des Vorhofflimmerns verstanden werden^{37,38}, in funktioneller Konsequenz imponiert jedoch eine erhöhte Proarrhythmogenität für das gesamte Vorhofmyokard, da die Aktionspotenziale der Einzelzellen nachweislich verkürzt sind¹⁴.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass diese zellulären Vorgänge unter Vorhofflimmern irreversibel sind, da erhöhte Apoptoseraten, eine erhöhte Expression von Caspase-3, einem Schlüsselenzym der Apoptose, sowie eine Reduktion des Gehaltes an anti-apoptotischem Protein BCL-2 im atrialen Gewebe nachgewiesen wurden³⁹.

Eine Schlüsselrolle ist in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns neben elektrischer Modulation und zellulärer Aberration der myokardialen Fibrose als wichtigstem Vorgang innerhalb des strukturellen Remodelings zuzuschreiben

^{14,40,41,42,43}.

Fibrose:

Als Fibrose bezeichnet man eine abnormale Deposition fibrillärer, extrazellulärer Matrixproteine (ECM), insbesondere von Kollagen. Eine Fibrose kann degeneratives (apoptotisches oder nekrotisches) Gewebe ersetzen und wird dann als reparative Fibrose bezeichnet, oder sie kann eine interstitielle Expansion des Gewebes verursachen (reaktive Fibrose). Beide führen im Myokard zur Ausbildung einer Barriere für die Reizweiterleitung^{44,45}.

Als konventionelle Stimuli einer myokardialen Fibrose gelten vor allem mechanische Dehnung, anhaltender Scherstress, Apoptose, Nekrose, Angiotensin II, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und proinflammatorische Zytokine. Wichtige Mediatoren des fibrotischen Prozesses sind Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*, TIMPs), der *Transforming Growth Factor* TGF- β 1 und der *Platelet derived Growth Factor* PDGF⁴⁶. Hierbei sprechen die genannten Stimuli sowohl Kardiomyozyten selbst als auch Fibroblasten an: Beide Zellspezies besitzen sowohl Rezeptoren für Angiotensin II als auch für TGF- β 1. Dabei wird TGF- β 1 ebenso wie MMPs und TIMPs von beiden Zellspezies exprimiert. TGF- β 1 bewirkt im Fibroblasten über intrazelluläre Signalkaskaden, insbesondere über die Aktivierung von Proteinen der Smad-Familie und konsekutive Stimulation der Genexpression, die vermehrte Produktion extrazellulärer Matrixproteine⁴⁷. Weiterhin veranlassen profibrotische Stimuli die verstärkte Synthese von pro-MMPs sowie deren Aktivierung zu MMPs. Gleichzeitig ist ebenfalls eine Inaktivierung der MMPs und auch der TIMPs beschrieben, was insgesamt zu einer Imbalance zwischen Matrix-Synthese und Degradierung führt - ein Phänomen, welches einen zentralen Mechanismus der Fibrosierung darstellt.

1.1.4.3 Inflammation

Wie bereits erwähnt sind heute proinflammatorische Zytokine und ROS als Stimuli eines fibrotischen Prozesses akzeptiert. Entzündungsprozesse wurden ferner in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns bereits 1976 von Spodick et al beschrieben, jedoch nahmen sie eine Nebenrolle ein neben elektrischen und strukturellen

Veränderungen des Vorhofmyokards, die in der multifaktoriellen Genese der Erkrankung von größerer Bedeutung zu sein schienen⁴⁸. Bruins et al zeigten dann 1997 erstmals einen Zusammenhang zwischen postoperativ aufgetretenem Vorhofflimmern und erhöhten Spiegeln an C-reaktivem Protein sowie einer Aktivierung des Komplementsystems⁴⁹.

Aktuelle Befunde konnten die früheren Beobachtungen bestätigen und weiterhin eine Assoziation zwischen dem Auftreten von Vorhofflimmern und der Aktivierung von Leukozyten^{50,51} sowie erhöhten Spiegeln an Zytokinen, z.B. Interleukin-6, bei Vorhofflimmern nachweisen⁵², was die These stützte, dass der Inflammation in der komplexen Pathophysiologie der Erkrankung eine essentielle Rolle zukommt^{42,15}. Es ist bekannt, dass inflammatorische Zytokine über verschiedene Signalkaskaden (ERK, JNK, p38-MAPK), Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B induzieren und so die Produktion von Kollagen sowie MMPs anregen und die Proliferation von Fibroblasten stimulieren^{53,54,55}. Ebenfalls greifen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aktivierend in diese Signalkaskaden ein.

Angiotensin II:

Dem Renin-Angiotensin-System kommt eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns und der myokardialen Fibrosierung zu⁵⁶. Klinisch erwies sich die Blockade des Angiotensin Rezeptors AT-1 als präventiv gegen die Entwicklung von Vorhofflimmern bei kardiovaskulär-vorerkrankten Patienten und reduzierte die Morbidität und Mortalität^{57,58}.

Die Rolle des Peptidhormons Angiotensin II ist in der Pathophysiologie myokardialer Fibrose bisher etabliert als Stimulus der Fibroblasten-Proliferation, zellulärer (kardiomyozytärer) Hypertrophie und Apoptose^{59,60,61}. Diese Prozesse werden induziert über die kardiomyozytären und fibroblastischen AT-1 Rezeptoren, denen verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden nachgeschaltet sind. Zum einen ist konsekutiv die Aktivierung der NADPH-Oxidase und damit die Produktion von Superoxid beschrieben, welche selbst zur Generierung zahlreicher weiterer reaktiver Sauerstoffspezies führt. Zum anderen werden verschiedene Kinasen aktiviert, die in entsprechender Modulation der Genexpression resultieren. Insbesondere sind hier wie

oben erwähnt die p38 MAPK, JNK und ERK1/2 involviert ⁶⁰. Außerdem folgt der Stimulation des AT-1 Rezeptors die Aktivierung der Phospholipase C, was unter anderem letztendlich in einer vermehrten Ausschüttung von Kalzium aus intrazellulären Speichern resultiert ⁶² (siehe Abb. 2). Dabei besitzen alle genannten Signalkaskaden (ROS, Kinasen und Kalzium-Homöostase), die ihrerseits wiederum auf mehreren Ebenen ineinander übergreifen, eine ausgeprägte proinflammatorische und proapoptotische Potenz^{15,41,50}.

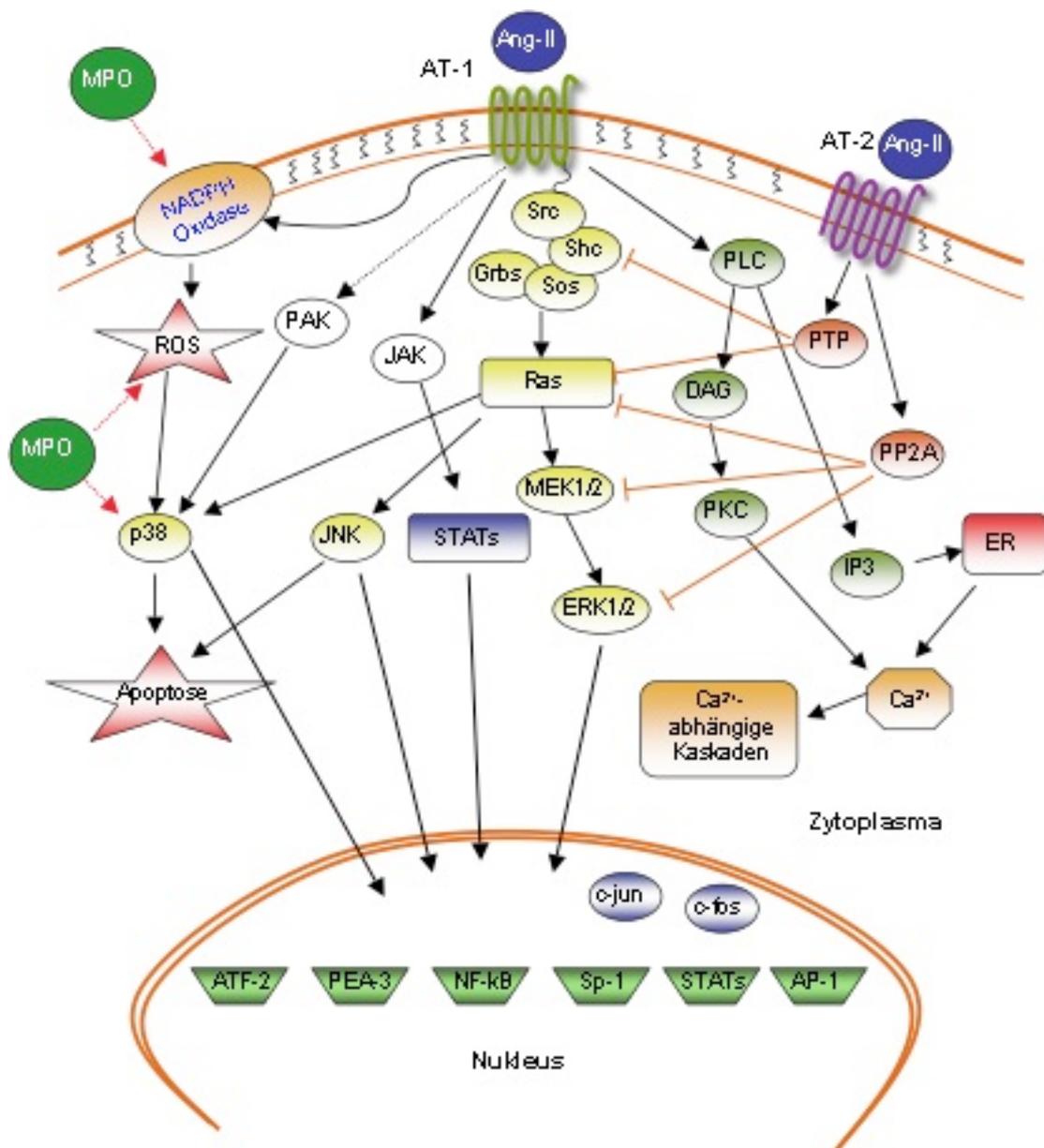


Abbildung 2: Schematische Darstellung Angiotensin II-vermittelter, intrazellulärer Signalkaskaden und mögliche Beteiligung von MPO, mod. nach Lin et al., *Cell Mol Life Sci* (2008).

1.1.5 Therapie

Die Therapie des Vorhofflimmerns erfolgt gemäß aktueller Leitlinien der *American Heart Association* (AHA) und *European Society of Cardiology* (ESC) entweder durch Erhalt bzw. Herstellung eines Sinusrhythmus oder durch Frequenzkontrolle bei bestehendem Vorhofflimmern¹¹. Sie kann weiterhin nach interventionellen, medikamentösen oder operativen Ansätzen beziehungsweise einer Kombinationen aus allen klassifiziert werden. Eine Sonderstellung nimmt die Therapie extrakardialer Ursachen des Vorhofflimmerns wie Hyperthyreose oder Alkoholintoxikation ein.

Ein Verfahren zur Wiederherstellung des Sinusrhythmus ist die elektrische Kardioversion, die in der Akutsituation mit hämodynamisch relevanter Beeinträchtigung des Patienten, nach frustriertem Versuch der medikamentösen Kardioversion oder bei länger bestehendem Vorhofflimmern in Kombination mit antiarrhythmischer Medikation angewandt wird¹¹.

Die medikamentöse Therapie zur Rhythmuskontrolle und Rezidivprophylaxe ist fokussiert auf die Blockade von Ionenkanälen und somit die Beeinflussung der elektrophysiologischen Eigenschaften des Myokards: Hier sind vorwiegend Antiarrhythmika der Klassen I und III zu nennen. Frequenzkontrolle erfolgt vorwiegend über negativ-dromotrop wirkende Medikamente der Klassen II und IV bzw. Glykoside.

Vitamin-K Antagonisten sind essentieller Bestandteil der medikamentösen Prophylaxe thrombembolischer Komplikationen und vermögen bei Patienten mit länger als 48 Stunden bestehendem, persistierendem oder permanentem Vorhofflimmern sowie Patienten, die mindestens einen Risikofaktor wie Arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz (EF<35%), Diabetes mellitus, stattgehabter Hirninfarkt oder Alter über 75 Jahre vorweisen, das Risiko für thrombembolische Komplikationen um 62 % zu senken⁶³. Im Falle von Kontraindikationen oder einem niedrigen Risikoprofil kann gemäß aktueller Leitlinien eine orale Antikoagulation mit Aspirin erfolgen¹¹.

Katheterinterventionelle Therapiestrategien verfolgen einen potenziell kurativen Ansatz. Supraventrikuläre Extrasystolen als häufigster Auslöser des Vorhofflimmerns und die Isolation der fokalen Trigger, die nach Haissaguerre et al zu 94 % aus den Pulmonalvenen stammen ⁶⁴, beziehungsweise die komplette Elimination der Pulmonalvenenpotenziale durch zirkumferentielle ostiale Ablation sind die primären Ziele dieses Therapieverfahrens ^{65,66,67}.

Als operative Option meist im Rahmen elektiver kardiochirurgischer Eingriffe bot das MAZE Verfahren nach Cox et al eine Möglichkeit via multipler atrialer Inzisionen das Auftreten pathologischer Reentrykreise im Vorhof zu unterbinden ⁶⁸. Diese Prozedur bot teils hohe Erfolgsaussichten; eine hohe Quote an teils schwerwiegenden Komplikationen führte jedoch zu Modifikationen des ursprünglichen Vorgehens. Mittlerweile stellt es, in modifizierter Form, für Patienten mit vorbestehendem Vorhofflimmern bzw. dem begründeten Risiko, im Rahmen eines herzchirurgischen Eingriffs postoperatives Vorhofflimmern zu entwickeln, eine etablierte therapeutische Option dar ¹¹.

1.2 Neutrophile Granulozyten

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) bilden einen Anteil von 50-60% der gesamten Leukozyten. Sie sind für die unspezifische Elimination von Pathogenen verantwortlich und sind damit die wichtigsten Mediatoren der angeborenen Immunantwort. Die Zellen werden durch bestimmte Reize provoziert, die Zirkulation zu verlassen und im Gewebe Pathogene oder Fremdpartikel zu phagozytieren oder durch Sekretion mikrobizider Bestandteile zu bekämpfen (Degranulation) ⁶⁹. Treten die PMN bereits im Gefäß mit aktivierenden Stimuli in Kontakt, so kann schon dort eine Degranulation der Zellen stattfinden, weshalb Inhalte der Granula im Plasma als Maß für die Aktivierung der PMN benutzt werden können. Als Stimuli der PMN-Aktivierung sind Komplement-Faktoren, TNF- α , Leukotriene, N-formylierte Peptide und Chemokine wie IL-8 beschrieben ^{69,70}. Auch Scherstress oder die Adhäsion an bestimmte Matrices und Rezeptoren (z.B. Fibronectin, Fibrinogen, ICAMs) können zur Aktivierung der Zellen führen. In der jüngeren Vergangenheit wurde Angiotensin

II als potenter Aktivator der PMN identifiziert. Es wurde gezeigt, dass nach Bindung an den granulozytären AT-1-Rezeptor die NADPH-Oxidase direkt aktiviert wird und eine Stimulation von MAP-Kinasen stattfindet, die ebenfalls zur Aktivierung der NADPH-Oxidase sowie einer Reihe weiterer zell-aktivierender Kaskaden in dem Granulozyten führt^{71,72,73}. Aufgrund der Produktion und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, Proteasen und weiteren zytotoxischen Molekülen durch aktivierte PMN üben diese neben ihrer Funktion in der Immunantwort bedeutende proinflammatorische Eigenschaften aus und sind daher mit der Pathophysiologie zahlreicher Erkrankungen assoziiert^{74,75}. Ob PMN an der Pathogenese atrialer Fibrose und des Vorhofflimmerns relevant beteiligt sind ist bisher wenig untersucht. Es ist bekannt, dass durch granulozytäre Enzymsysteme die Aktivität von MMPs und TIMPs moduliert wird^{76,77}, so dass ein gestörter Matrixprotein-Umsatz hierdurch wahrscheinlich ist. Außerdem ist anzunehmen, dass die Freisetzung von Zytokinen und ROS hier einen maßgeblichen Beitrag zu leisten vermag (siehe auch 1.1.4.3).

1.3 Die Myeloperoxidase

Myeloperoxidase (MPO) ist ein leukozytäres Enzym, welches hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und zu geringerem Anteil von Monozyten, einigen Gewebe-residenten Makrophagen, Mikroglia und Kupfferzellen exprimiert wird^{78,79}. MPO ist ein 150 kDa schweres, homodimeres Hämprotein, dessen zwei Monomere aus einer schweren und einer leichten Untereinheit zusammengesetzt sind und je ein an die schwere Kette kovalent gebundenes Häm-Molekül tragen⁸⁰ (Abb. 3). Die seit über 60 Jahren bekannte Funktion der MPO ist die Katalyse der Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS) im Zuge der Pathogenabwehr.

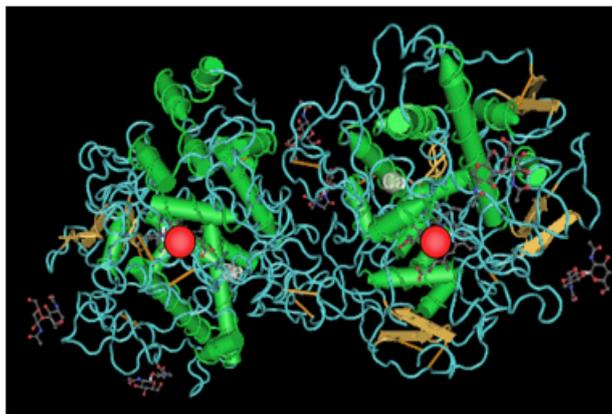


Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der homodimeren Myeloperoxidase mit hervorgehobenen Häm-Molekülen (rot), Alpha-Helices (grün) und Beta-Faltblatt-Strukturen (gelb). Aus Lau et al., Pharm Ther 2006.

1.3.1 Katalytische Aktivität und Pathogenabwehr

MPO wird in PMN in azurophilen Granula gespeichert und sowohl bei Aktivierung der Zellen nach außen (Degranulation), als auch innerhalb der PMN in Phagosomen sezerniert, um dort gegen phagozytierte Pathogene zu wirken.

Zur Katalyse enzymatischer Reaktionen benötigt das Enzym als Substrat Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und ein oxidierbares Kosubstrat. H_2O_2 wird vorwiegend durch die Dismutation von Superoxid, welches durch die NADPH-Oxidase aktivierter Zellen produziert wird, bereitgestellt. MPO reduziert das H_2O_2 zunächst zu Wasser und oxidiert dann entweder Halogenide, Pseudohalogenide oder Nitrit (NO_2^-), von denen Chlorid (Cl^-) auf Grund der höchsten physiologischen Konzentration den wesentlichen Reaktionspartner darstellt⁸¹. Chlorid wird oxidiert zu hypochloriger Säure (HOCl), einem starken Oxidans und somit toxischen Molekül gegenüber Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen und Helminthen, gleichzeitig aber auch gegenüber körpereigenen Strukturen. Aus HOCl können weitere ebenfalls reaktive Oxidantien hervorgehen, unter anderem molekulares Chlor^{82,83}. Dieses kann zur Mono- und Dichlorierung von Phenolresten, insbesondere von Tyrosin führen, so dass 3-Chloro- und 3,5-Dichlorotyrosin als spezifische Marker der MPO-Aktivität herangezogen werden⁸⁴. Alternativ können diverse geeignete Reduktionsmittel wie Ascorbat oder aromatische Aminosäuren durch MPO oxidiert werden, aus denen Radikalintermediate

hervorgehen, die dann wiederum weiter reagieren.

Weitere Reaktionspartner der oxidierten MPO sind NO und NO_2^- ⁸⁵. Sie können direkt mit MPO reagieren, wobei unter physiologischen Bedingungen die Reaktion mit den durch MPO generierten Radikalintermediaten wahrscheinlicher ist.

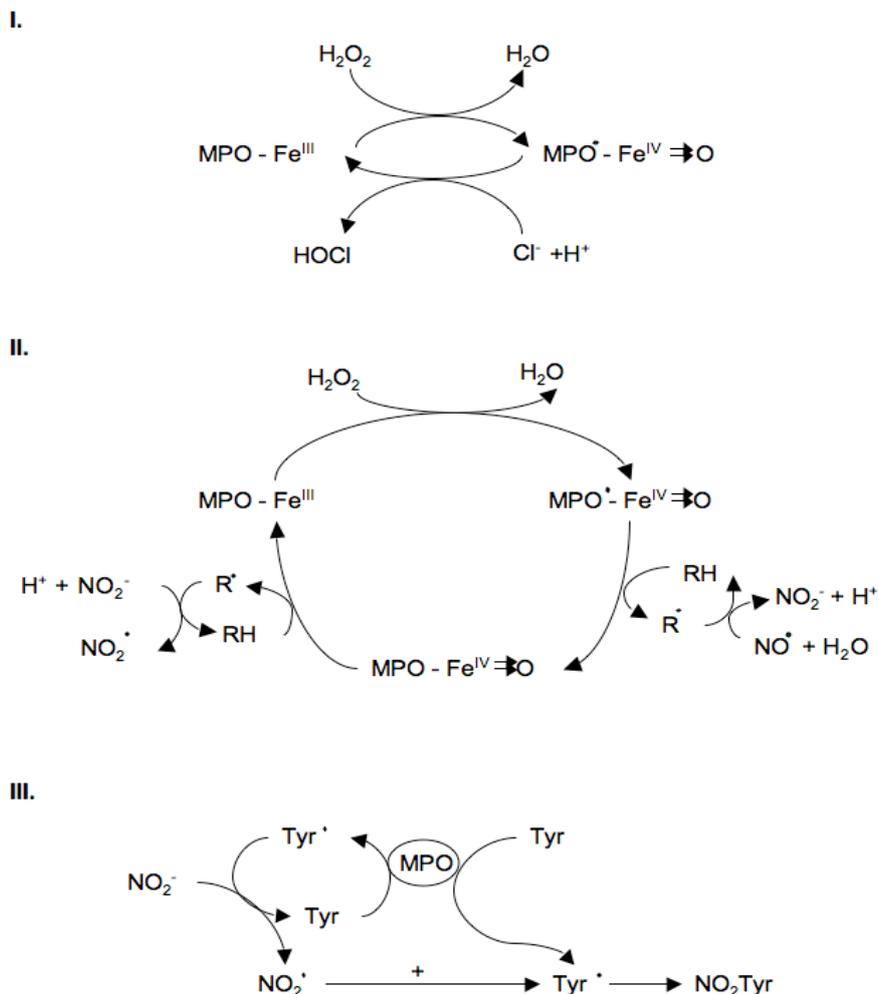


Abb. 4: MPO-katalysierte Reaktionen. I. MPO reduziert H_2O_2 und wird oxidiert zu Compound-I ($\text{MPO}^\bullet\text{-Fe}^{\text{IV}}$). Diese wird wiederum zu MPO reduziert durch Oxidation von Cl^- zu HOCl . II. Alternativ zu I geschieht die Reduktion der Compound-I zu MPO in zwei Schritten durch Reaktion mit oxidierbaren physiologischen Substraten (RH) über Compound-II ($\text{MPO-Fe}^{\text{IV}}$), wobei durch Wasserstoffabstraktion Radikalintermediate (R^\bullet) entstehen. Diese können mit NO^\bullet und NO_2^- reagieren, wobei NO_2^\bullet und NO^\bullet entstehen. III. Die Oxidation von Tyrosin (Tyr) zum Tyrosin-Radikal ist eine mögliche Reaktion wie in II beschrieben. Aus der Reaktion von NO_2^\bullet mit dem Tyrosin-Radikal geht Nitrotyrosin (NO_2Tyr) hervor (mod. nach Klinke, A.: Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten (2009)).

NO wird so zu NO_2^- und NO_2^- zu Stickstoffdioxid (NO_2) oxidiert, welches wiederum ein reaktives Radikal und nitrierendes Agens darstellt ⁸⁶ und zur Bildung von 3-Nitrotyrosin führen kann. 3-Nitrotyrosin wird ebenfalls als Marker der MPO-Aktivität mit lediglich geringerer Spezifität als 3-Chlorotyrosin verwendet (Abb. 4).

Obwohl die Generierung dieser ROS und RNS eine potente mikrobizide Strategie der Immunzellen darstellt, wurde in der jüngeren Vergangenheit angezweifelt, dass das MPO-System unbedingt erforderlich für eine suffiziente Pathogenabwehr sei, eine Frage, die noch umstritten bleibt ⁸⁷. Die MPO-Defizienz beim Menschen, die mit einer Inzidenz von 1:2000 bis 1:4000 auftritt, führt lediglich zu milder, erhöhter Infektanfälligkeit in Verbindung mit weiteren Erkrankungen wie Diabetes mellitus ^{88,89}.

1.3.2 Extramikrobizide Eigenschaften der MPO

MPO konnte als unabhängiger prädiktiver Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert werden und besitzt eine zentrale Bedeutung für die Entwicklung vaskulär-inflammatorischer Prozesse.

So besteht eine Korrelation hoher MPO-Plasmaspiegel mit einer gestörten Gefäßfunktion, bestimmt durch Fluss-abhängige Dilatation der A. brachialis ⁹⁰. Weiterhin zeigte sich, dass während Koronarangiographie ermittelte, erhöhte MPO-Konzentrationen im Plasma und in Leukozyten positiv assoziiert waren mit dem Vorkommen einer KHK ⁹¹. Ebenfalls wurden gesteigerte MPO-Konzentrationen im Plasma von Patienten mit akutem Koronarsyndrom als unabhängiger Prädiktor für ein erhöhtes Risiko eines kardialen Ereignisses innerhalb eines 6 monatigen Follow-Up Zeitraumes identifiziert ⁹². Außerdem konnte eine Korrelation erhöhter MPO-Plasmaspiegel mit eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion in Patienten gefunden werden ⁹³. Bei Patienten mit Angina pectoris konnten initial gemessene, hohe MPO-Plasmaspiegel als unabhängiger Prädiktor für das frühe Risiko für myokardiale Ischämien identifiziert werden ⁹⁴. Darüber hinaus wurden erhöhte MPO-Spiegel in gesunden Patienten als unabhängiger prädiktiver Marker für das Auftreten einer KHK in einem Follow-up Zeitraum von 8 Jahren aufgedeckt ⁹⁵.

Während die beschriebenen Befunde zum großen Teil nicht klären, ob MPO hier kausal beteiligt oder nur durch konsekutive Aktivierung der PMN in erhöhter Konzentration zu finden ist, deuten weiterführende Untersuchungen auf eine kausale Beteiligung hin ⁹⁶. Einen zentralen Ansatz zum Verständnis dieser Beobachtungen liefert die Entdeckung, dass MPO in pathophysiologisch-relevantem Ausmaß NO oxidiert ⁸⁵ und damit die Bioverfügbarkeit dieses wichtigen vasoaktiven und antiinflammatorischen Moleküls reduziert. Dies äußerte sich sowohl im Tiermodell ex-vivo ⁸⁵, in-vivo (Rudolph TK et al., unveröffentlichte Daten) als auch in Patienten nach myokardialer Ischämie und Reperfusion ⁹⁷ in verminderter vaskulärer Relaxationsfähigkeit bzw. veränderter Hämodynamik. Eine zentrale Voraussetzung zur MPO-vermittelten NO-Konsumption ist die räumliche Nähe des Enzyms zum sehr kurzlebigen NO-Radikal und damit die Beobachtung, dass MPO nach Sezernierung aus aktivierten PMN mit hoher Affinität an die Gefäßwand bindet und konsekutiv in der subendothelialen Matrix akkumuliert ⁹⁸. Hier verbleibt das Enzym katalytisch aktiv und bewirkt neben der Oxidation von NO, wie oben beschrieben, auch die Chlorierung und Nitrierung von Tyrosinresten, was zur Beeinträchtigung der Funktion verschiedener Proteine führen kann ⁹⁹.

Weiterhin ist bekannt, dass die MPO-generierte HOCl die Lipoproteine LDL und HDL oxidiert ¹⁰⁰, womit die Differenzierung von Makrophagen, die oxidiertes LDL bevorzugt aufnehmen, zu proatherogenen Schaumzellen begünstigt wird. HOCl trägt im atherosklerotischen Plaque durch Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen und durch Initiierung der Aktivierung und Apoptose von Endothelzellen als auch ihrer Ablösung von der Matrix auch zur Destabilisierung und Ruptur des Atheroms bei ¹⁰¹.

Weiterhin wurde aktive MPO mit einer verstärkten linksventrikulären (LV) Dilatation und einer verschlechterten LV-Funktion in MPO-kompetenten im Vergleich zu MPO-defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt in Verbindung gebracht ¹⁰². Myokardiale Ischämie führte in der MPO-kompetenten Maus zu vermehrter myokardialer Infiltration von PMN und zu ungünstigem ventrikulären Remodeling im Vergleich zum MPO-defizienten Tier ¹⁰³. Außerdem zeigte sich nach renaler Ischämie und Reperfusion weniger PMN-Infiltration und ein schwächer ausgeprägter Nierenschaden in der MPO-defizienten Maus ¹⁰⁴. Jüngste Untersuchungen konnten einen direkten Einfluss der MPO auf die Rekrutierung von PMN nachweisen. Diesem Effekt liegt

eine elektrostatische Interaktion zwischen der kationischen MPO und der anionischen Glykokalyx der PMN zugrunde (Klinke et al., unveröffentlichte Daten). Damit wird diese Wirkung durch MPO selbst und nicht durch generierte reaktive Spezies vermittelt. Als eine weitere extrakatalytische Funktion des Proteins ist beschrieben, dass MPO über die Bindung an das Integrin CD11b/CD18 die PMN aktiviert^{105,80}, was in einer Erhöhung der Phosphorylierung mehrerer zellulärer Proteine, in der Aktivierung intrazellulärer Proteintyrosin-Kinasen, in verstärkter Degranulation und außerdem in vermehrter Expression der CD11b-Integrine resultiert.

2. Zielsetzung

Die dem Vorhofflimmern zugrunde liegende Pathophysiologie ist bislang nur inkomplett verstanden. So zeigen aktuelle Studien zwar, dass inflammatorische Einflüsse eine essentielle Rolle für die dem Vorhofflimmern zugrunde liegenden elektrischen und strukturellen Veränderungen einnehmen, jedoch beschränken sie sich dabei auf einen deskriptiven Ansatz - ob sie ursächlich sind oder nur ein Epiphänomen darstellen bleibt unbekannt. Diese Arbeit soll einen grundlagenwissenschaftlichen Beitrag leisten zum Verständnis der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns unter besonderer Berücksichtigung des aus Leukozyten stammenden Enzyms Myeloperoxidase. Dabei sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Zeigen Patienten mit Vorhofflimmern phänotypisch eine gesteigerte Aktivierung von PMN?
2. Resultiert eine systemische Aktivierung von PMN in vermehrter myokardialer Deposition von Myeloperoxidase?
3. Führt eine erhöhte myokardiale Bioverfügbarkeit von MPO über Regulierung profibrotischer Enzymsysteme zu strukturellem Remodeling des Vorhofes?
4. Resultieren MPO-vermittelte Strukturveränderungen im Sinne von Fibrose in einer erhöhten Vulnerabilität für Vorhofflimmern?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien und Arzneistoffe

Bezeichnung	Hersteller
Angiotensin II-acetat	Sigma (Deisenhofen, D)
Bovines Serumalbumin	Sigma
Dako Faramount Aqueous Mounting Medium	Dako (Glostrup, DK)
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako
Dapi	Sigma
Formaldehyd	Tousimis (Rockville, MD, USA)
Glyceroltrinitrat (Nitrolingual®)	G. Pohl-Boskamp GmbH & Co.
Isofluran (Forene®)	Abott
Ketamin Gräub	AniMedica (Senden-Bösensell)
Metamizol	Ratiopharm
Myeloperoxidase (MPO), human	Planta Natural Products (Wien, A)
Myeloperoxidase, rekombinant human	R&D
Natriumchlorid-Lösung, 0,9%	BBraun (Melsungen)
OCT-Medium (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Europe
PBS	Invitrogen
Protease-Inhibitor Complete	Roche (.)
Rompun 2% (Xylazin)	Bayer (Leverkusen)
Super Signal west Femto Stable Peroxide Buffer, Super Signal West Femto Luminol Enhancer Solution	Pierce
Triton X-100	Sigma
Ziegenserum	Sigma

3.1.2. Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Elektrophysiologischer Katheter	NuMed Inc., New York, USA
Jugularis-Katheter	Alzet
Osmotische Minipumpen 1007D, 1002	Alzet
Telemetriesender TA11PA-C10	Data Sciences International, St. Paul, USA

3.1.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blottingpuffer	14,4g Glycin, 3,03g Tris-HCl in 800 ml Wasser, 200 ml Methanol
Homogenisierungs-Puffer	121mg Tris-HCl, 4,28g Saccharose, 57mg EGTA, 292mg EDTA ad 50ml Aqua bidest., pH 7,5,
Homogenisierungs-Lösung	1 Tablette Protease-Inhibitor, 50 μ l Triton X-100 ad 10ml Homogenisierungs-Puffer
SDS-Probenpuffer	10% Glycerol, 2,3% SDS, 0,05% Bromphenolblau in 60mM Tris-HCl
Zymographie-Puffer	0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 20% (v/v) Glycerol, 4% (w/v) SDS (Natrium-dodecylsulfat), 0,005% Bromphenolblau

3.1.4 Antikörper

Bezeichnung	Spezifität	Spezies des Spendertiers	Hersteller
Primäre Antikörper			
Chlorotyrosin, anti-human	polyklonal	Kaninchen	Hbt
MMP-9, anti-Maus	polyklonal	Ziege	R&D
MPO, anti-human	monoklonal	Maus	Abcam
MPO, anti-human	polyklonal	Kaninchen	Calbiochem
Bezeichnung	Konjugat	Spezies des Spendertiers	Hersteller
Sekundäre Antikörper			
Alexa Fluor 488 anti-Mouse	Alexa Fluor 488	Ziege	Molecular Probes (Invitrogen)
Alexa Fluor 488 anti-Rabbit	Alexa Fluor 488	Ziege	Molecular Probes
Alexa Fluor 594 anti-Rabbit	Alexa Fluor 594	Ziege	Molecular Probes
Anti-Goat-IgG	Meerrettichperoxidase	Pferd	VectorLabs

3.1.5 Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
Pierce BCA-Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)

MPO ELISA, human	Prognostix
MPO ELISA, Maus	HyCult Biotechnology
PMN Elastase ELISA	IBL

3.1.6 Mauslinien

Bezeichnung	Herkunft
C57BL6/J	The Jackson Laboratory (Maine, USA)
MPO ^{tm1lus} /J	The Jackson Laboratory

3.1.7 Laborgeräte, Apparaturen und Software

Bezeichnung	Firma
Brachial Analyzer	Medical Imaging Applications LLC, USA
CCD-Kamera, Retiga 1300	QImaging (Surrey, BC, Canada)
Elektrophysiologischer Stimulator	Medtronic Model 5380
Fluoreszenzmikroskop, DMLB	Leica (Solms)
Ultraschallgerätes Vevo 770 micro-imaging system (Maus)	VisualSonics Inc., Toronto, Kanada
Ultraschallgerät (Patienten)	Siemens Sonoline

3.2 Methoden

3.2.1 Patientenkollektive

Der Antrag zur Genehmigung dieser Studie wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (Bearb.-Nr.: 025/05).

Jeder Patient willigte nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung in die Messung der Gefäßfunktion mittels Ultraschall sowie in die venöse Blutentnahmen schriftlich ein.

Für die Untersuchung des klinischen Zusammenhanges zwischen MPO und Vorhofflimmern sowie der Bestimmung der Gefäßfunktion wurden 42 Patienten untersucht, die sich zur elektiven Kontrolle des vorhandenen Zwei-Kammer Schrittmachersystems vorstellten. Es wurden eine ausführliche Anamnese sowie eine klinische Untersuchung durchgeführt, in welcher unter anderem die vorab definierten Ausschlusskriterien wie ACS innerhalb des letzten Monats, dekompensierte Herzinsuffizienz, Tumorleiden, Autoimmunerkrankung, Niereninsuffizienz und/oder Herzklappenerkrankungen ab Stadium 3 nach NYHA überprüft wurden. Eine venöse Blutentnahme erfolgte gemäß anerkannter Standards. Die erhobenen Anamnesedaten sowie weitere klinische Parameter sind in Tabelle 1 dargelegt.

In einem zweiten Ansatz wurden 27 Patienten rekrutiert, die sich einem elektiven koronarchirurgischen Eingriff unterzogen. Auf diese Weise konnte humanes Vorhofgewebe von Patienten mit und ohne Vorhofflimmern gewonnen werden, welches perioperativ entnommen wurde. Anamnestische und klinische Daten dieses Patientenkollektivs sind in Tabelle 2 aufgeführt.

3.2.2 Laborparameter

Zum Ausschluss potentieller Einflussfaktoren auf die Ergebnisse wurden zu Versuchsbeginn relevante laborchemische Daten der eingeschlossenen Patienten im Institut für klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf untersucht. Hämatologische Parameter wie Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und Hämoglobin-Gehalt wurden aus EDTA-Vollblut bestimmt sowie Gesamtcholesterin,

LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, Kreatinin, hs-CRP und Interleukin-6 aus Blutplasma.

3.2.3 Schrittmacheranalyse

Die Interventionsrate des Schrittmacheraggregates, die Gesamtzeit der Rhythmusanalyse sowie das sog. *AF-Burden* als Maß für die Zeit unter Vorhofflimmern wurden während der Schrittmacheruntersuchung zur späteren Analyse gewonnen. Das Vorhandensein von Vorhofflimmern und somit das *AF-Burden* wurden definiert als Vorhoffrequenz von mehr als 200 Schlägen pro Minute, und die Zuordnung des Patienten zu einem Kollektiv mit vorhandenem Vorhofflimmern erfolgte bei einer *AF-Burden* von mehr als 0 % gemäß Schrittmacherprotokoll.

3.2.4 Bestimmung der Gefäßfunktion mittels Ultraschall

3.2.4.1 Messung der flussabhängigen Vasodilatation (FMD)

Der Patient befand sich in Rückenlage mit leicht erhöhtem Oberkörper in einem klimatisierten und reizarmen Untersuchungsraum. Eine Blutdruckmanschette wurde am rechten Oberarm angebracht und eine nicht-invasive Blutdruckmessung nach Riva-Rocci zu Untersuchungsbeginn durchgeführt. Nach 10-minütiger Reperfusion und Ruhe wurde oberhalb des Ellenbogens ein longitudinaler Anschnitt der A. brachialis mit dem Ultraschallkopf aufgesucht. Zur besseren Reproduzierbarkeit der Messungen wurden charakteristische Orientierungshilfen (Blutgefäße, Bindegewebe, Muskulatur) aufgesucht, um im Verlauf die identische Stelle des Blutgefäßes erneut vermessen zu können. Ein mindestens 5 cm langer Bereich mit deutlicher Abgrenzbarkeit der unterschiedlichen Gefäßwandbereiche wurde basal für 4 Sekunden als zweidimensionaler Filmclip aufgezeichnet (Abb. 5). Es folgte, ebenfalls unter Ausgangsbedingungen, die Bestimmung des Blutflusses des gewählten Gefäßabschnittes mittels Doppler Technik. Im Anschluss erzielte man eine Ischämie durch Aufpumpen der Blutdruckmanschette auf suprasystolische Werte (systolischer Ausgangswert plus 50 mmHg); diese Okklusion wurde für 5 Minuten aufrecht

erhalten, sofern der Patient dies tolerierte. Unmittelbar nach Beendigung der Okklusion wurde während der Phase der reaktiven Hyperämie mittels Doppler-Technik erneut der Blutfluss bestimmt, und nach der erwarteten maximalen Dilatation der Arterie nach 60 Sekunden wurde der Gefäßdiameter analog zur Ausgangsmessung wiederholt bestimmt.

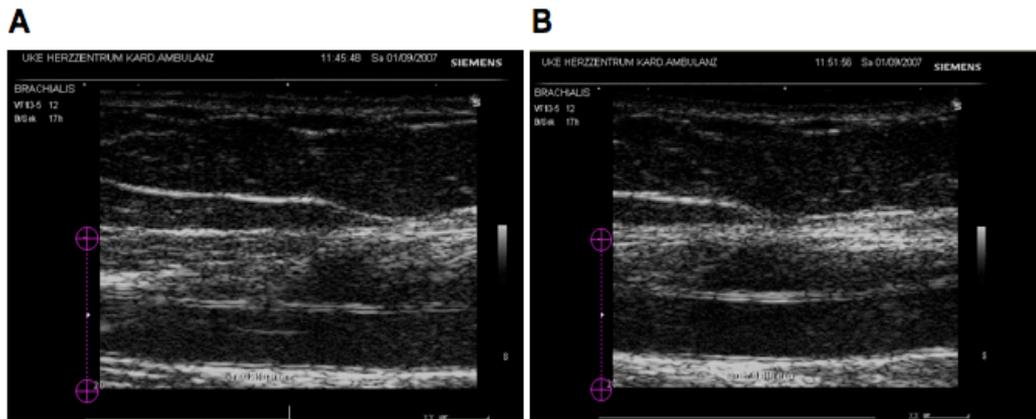


Abb. 5: Repräsentative Darstellung eines longitudinalen Gefäßanschnittes der Arteria brachialis mit den arterientypischen Gefäßwand-Abschnitten mittels Ultraschall-Technik. A) Ausgangsbedingung; B) Darstellung des gleichen Gefäßabschnittes 60 Sekunden nach 5-minütiger, suprasystolischer Okklusion.

3.2.4.2 Messung der flussunabhängigen Vasodilatation (NMD)

Eine mindestens zehnmünütige Pause wurde nach Bestimmung der flussabhängigen Dilatation eingehalten. Die Ausgangsmessung wurde wie in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben wiederholt. An Stelle der Okklusion mittels Blutdruckmanschette trat die sublinguale Gabe 0,4 mg Glyceroltrinitrat. Vier Minuten nach Applikation, zum Zeitpunkt der maximalen Dilatation, wurden in Analogie zur ersten Messung der Gefäßdiameter und der Fluss bestimmt.

3.2.4.3 Auswertung

Die zweidimensionalen Filmsequenzen der FMD- und NMD-Messungen wurden mittels Graustufenerkennungssoftware (Brachial Analyzer, Medical Imaging Applications LLC, USA) ausgewertet und der jeweilige Gefäßdiameter der A.

brachialis zur Ausgangssituation und nach Okklusion errechnet. Via Berechnung des Geschwindigkeits-Zeit-Integrals (VTI) des Doppler-Flusses wurde ein Volumen-Fluss-Quotient ermittelt (*flow-ratio*) aus maximalem Fluss während Hyperämie und Ausgangswert – ein Parameter zur Beurteilung der Gefäßfunktion neben der absoluten und relativen Querschnittsveränderung des Blutgefäßes.

3.2.5 Homogenisierung von Gewebe

Bei -80°C gefrorene Gewebeproben wurden in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zügig fein zerrieben und in einem ebenfalls mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Eppendorf-Gefäß mit kalter Homogenisierungs-Lösung versetzt. Die Suspension wurde 10 min gevortext und anschließend für 10 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand weiterer Analyse zugeführt.

3.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Gewebehomogenaten erfolgte mittels BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers:

Die Homogenate wurden zunächst 1:30 in Homogenisierungspuffer verdünnt und in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte gegeben. Ebenfalls wurde eine Lösung von bovinem Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0 – 250 µg/ml als externer Standard in die Platte gegeben. Dazu wurde dann frisch vorbereitetes Arbeitsreagenz gegeben, bestehend aus alkalischer, Tartrat-haltiger Bicinchoninsäure- und Kupfersulfat-Lösung. Die Platte wurde 30 Minuten abgedeckt bei 37°C inkubiert, so dass in einer Biuret-Reaktion das Cu^{2+} zu Cu^{1+} reagieren konnte, welches dann mit der Bicinchoninsäure einen blau gefärbten Chelatkomplex formt. Die Intensität der Färbung wurde dann durch Messung der Absorption bei 562 nm quantifiziert. Die Ergebnisse wurden nach x =Absorption, y =Konzentration aufgetragen und die Formel der Standardkurve bestimmt. Anhand dieser wurde die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

3.2.7 Analyse der humanen MPO Plasma- und Gewebespiegel

Die Bestimmung der Konzentration der MPO in humanem Plasma und Homogenaten von humanem Vorhofohr wurde durchgeführt mittels CardioMPO ELISA Kit (Prognostix) entsprechend den Angaben des Herstellers. Das zuvor bei -80°C gelagerte Heparin-Plasma und Gewebehomogenat wurde hierzu 1:10 mit Probenpuffer verdünnt und nach dem Prinzip eines *sandwich* ELISAs (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) analysiert: Die Proben und Lösungen mit aufsteigender Konzentration des Antigens als externer Standard wurden in eine Mikrotiterplatte gegeben, in der ein monoklonaler Antikörper gegen MPO immobilisiert war. Nach entsprechender Inkubationszeit, in der die MPO vom Antikörper gebunden wurde, wurden Proben und Standards entfernt und die Kavitäten wiederholt gewaschen. Anschließend wurde eine Lösung des Antikörpers gegen MPO zugegeben, der mit Meerrettichperoxidase konjugiert war. Nach Inkubation zur Bindung des Antikörpers und wiederholtem Waschen wurden die Kavitäten mit einer Lösung von Tetramethylbenzidin gefüllt, welches von der Peroxidase oxidiert wurde und dabei eine blaue Farbe entwickelte. Nach definierter Zeit wurde zum Stoppen der Reaktion Salzsäure zugegeben, wodurch ein Farbumschlag nach gelb stattfand. Die Intensität der Färbung in den einzelnen Kavitäten wurde durch Messung der Absorption bei 450 nm bestimmt. Die Werte des Standards wurden gemäß $x=\text{Absorption}$ und $y=\text{Konzentration (pmol/l)}$ aufgetragen und die Formel der resultierenden Kurve ermittelt. Damit konnten die MPO-Konzentrationen in den analysierten Proben berechnet werden.

3.2.8 Analyse der humanen Elastase Plasmaspiegel

Die Bestimmung der Elastase-Konzentration im Plasma erfolgte mittels PMN-Elastase ELISA (IBL) entsprechend den Angaben des Herstellers nach gleichem Prinzip wie unter 3.2.7 beschrieben. In diesem Fall wurden die Proben 1:100 mit Probenpuffer verdünnt. Bei dem immobilisierten und Meerrettichperoxidase-gekoppelten Antikörper handelte es sich um einen polyklonalen Antikörper gegen humane Elastase aus neutrophilen Granulozyten.

3.2.9 Immunfluoreszenz-Färbung von MPO und Chlorotyrosin

Proben aus humanem Vorhofohr-Gewebe wurden in OCT-Medium eingebettet und über flüssigem Stickstoff langsam gefroren. Mittels Kryotom wurden 3 μm dicke Schnitte angefertigt, die nach folgendem Protokoll gefärbt wurden:

Die Präparate wurden für 15 min. mit 3,7% Formaldehydlösung fixiert und anschließend 3 mal 5 min. mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Gewebe für 20 min. mit 0,1% Triton X 100 in PBS permeabilisiert, und nachfolgend wurden für 1 h mittels 10% Ziegen Serum in 0,1% Triton X 100/PBS die unspezifischen Bindungsstellen blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern gegen MPO (monoklonal, Maus, 1:1000, Abcam) und Chlorotyrosin (polyklonal, Kaninchen, 1:100, Hbt) in Ziegen Serum / Triton / PBS bei 4°C über Nacht. Zur Kontrolle wurde jeweils eine Probe mit entsprechenden Ig-Isotypantikörpern behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit den sekundären Antikörpern Alexa 488 gegen Maus IgG und Alexa 594 gegen Kaninchen IgG (1:100, Molecular Probes) für 1 h in Ziegen Serum / Triton / PBS im Dunkeln behandelt. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen, zur Kernfärbung für 15 min. mit Dapi (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert und erneut gewaschen. Die abschließende Einbettung der Präparate erfolgte in Dako-Medium. Die Auswertung erfolgte mittels Leica-Fluoreszenzmikroskop und *IPLab* - Software.

3.2.10 Quantifizierung des Chlorotyrosingehaltes in humanem Vorhofgewebe

Der Gehalt an Protein-assoziiertem 3-Chlorotyrosin in Geweben aus humanen Vorhofohren (LAA) wurde quantifiziert mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (Aria LX Series HPLC, Cohesive Technologies Inc., Franklin, Massachusetts, USA) und Tandem-Massenspektrometrie (LC/MS/MS; ABI 3000, Ionics, Concord, Canada) im Labor von Prof. S. L. Hazen der Cleveland Clinic, Ohio, USA. Das Gewebe wurde homogenisiert und eine saure Hydrolyse durchgeführt. Als interner Standard wurden synthetisches [$^{13}\text{C}_6$]-3-Chlorotyrosin zugefügt und die Proben wie beschrieben analysiert¹⁰⁶.

3.2.11 Tierexperimentelles Modell

Sämtliche tierexperimentellen Methoden wurden durchgeführt nach schriftlicher Beantragung und Genehmigung gemäß Tierschutzgesetz durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg, Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz, vom 24.10.2007, Genehmigungsnummer 077/07.

Es wurden Wildtyp-Mäuse (WT) der Linie C57BL6/J verwendet und die *knockout* Maus-Linie $MPO^{tm11us/J}$ ($Mpo^{-/-}$), die den gleichen genetischen Hintergrund aufweist.

Die $Mpo^{-/-}$ Maus wurde von Aldons Lysis an der University of California, LA, erzeugt und ist kommerziell bei *The Jackson Laboratory* erhältlich. Die Mauslinie ist homozygot für die Mutation, und es wird kein MPO Genprodukt, also weder mRNA noch Protein, erzeugt. Die Leukozytenzahlen sowie die leukozytäre Produktion von Superoxid unterscheiden sich nicht vom Wildtyptier, allerdings weisen Monozyten und neutrophile Granulozyten in $Mpo^{-/-}$ Tieren keinerlei Peroxidase-Aktivität und Hypochlorit-Produktion auf.

3.2.12 Implantation von osmotischen Minipumpen

Vorbereitung: Es wurden osmotische Minipumpen (Alzet, Modell 1002, Kalifornien, USA) mit einer Pumprate von $0,25 \mu\text{l/h}$ und einer Pumpdauer von 14 Tagen mit einer Lösung humanen Angiotensins II (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bzw. isotonischer NaCl-Lösung befüllt, so dass Pumpraten von $1,5 \text{ ng / gKG / min.}$ für Angiotensin II bzw. $0,25 \mu\text{l NaCl pro Stunde}$ erzielt wurden. Für die Implantation wurden 49 männliche Tiere (WT n=29, $Mpo^{-/-}$ n=20) im Alter zwischen 10 und 12 Wochen und einem Gewicht zwischen 20 und 30 Gramm durch Inhalation eines Isofluran/Sauerstoff Gemisches (initial 5 % Isofluran, 2 % Erhaltungsdosis ad 100 % Sauerstoff) anästhesiert. In Narkose wurde eine Analgesie durch subkutane Injektion von Metamizol durchgeführt ($200\text{mg/kg KG Metamizol in } 300\mu\text{l NaCl-Lösung}$). Nach Hautdesinfektion erfolgte ein etwa 1,5 cm langer Hautschnitt im Nacken des

Versuchstieres mit anschließender Präparation einer subkutanen Tasche, in welcher die Pumpe platziert wurde. Der Wundverschluss erfolgte mittels Klammernaht.

3.2.13 Anlage von intravenösen Jugularis-Kathetern zur Applikation von MPO

Zur intravenösen Infusion von MPO wurden 29 Tiere (WT n=16, *Mpo*^{-/-} n=13) in Inhalationsnarkose und unter Analgesie wie beschrieben mit einer osmotischen Minipumpe gemäß vorheriger Beschreibung versehen. Die Pumpen (Alzet, Modell 1007D, Kalifornien, USA) mit einer Pumpleistung von 0,5 μ l/h und einer Pumpdauer von einer Woche wurden vorab nach Anweisung des Herstellers mit rekombinanter MPO oder NaCl-Lösung befüllt, woraus sich Dosierungen von 5,0, 12,5 und 50 pg / gKG / min. MPO bzw. 0,5 μ l NaCl pro Stunde in den Tieren ergaben. Nachfolgend wurde ein circa 1 cm langer zervikaler Hautschnitt durchgeführt und die V. jugularis sinistra frei präpariert, woraufhin ein an der Pumpe befestigter Katheter vom Nacken des Tieres subkutan nach ventral vorgeschoben und in der Vene platziert wurde. Zwei durchgeführte Ligaturen fixierten den Katheter am Blutgefäß sowie an der Haut des Nackens. Der zervikale Wundverschluss erfolgte mittels Einzelknopfnah, der dorsale mittels Klammernaht. Für den Operationstag sowie den ersten postoperativen Tag wurden die Tiere mit Weichfutter und Glucoselösung (5 %) versorgt.

3.2.14 Radiotelemetrische Blutdruckmessung

Nach Inhalationsnarkose und Analgesie wie bereits beschrieben erfolgte ein Hautschnitt von etwa 2 cm Länge im linken Halsbereich mit anschließender Präparation der A. carotis communis der gleichen Seite. Nach cranialer Ligatur der Arterie wurde der Katheter des Telemetriesenders (TA11PA-C10; Data Sciences International, St. Paul, USA) im Gefäß platziert und mit einer zweiten Ligatur gesichert. Im Anschluss wurde der Sender in einer vorbereiteten, subkutan gelegenen Tasche im linken Leistenbereich des Versuchstieres implantiert. Der zervikale Wundverschluss erfolgte via Einzelknopfnah, die Wunde im Leistenbereich wurde mittels Klammernaht verschlossen. Am 10. postoperativen Tag begann, nach erfolgter primärer Wundheilung, die basale Messung des Blutdruckes jeweils für 1 Minute alle

5 Minuten über insgesamt 72 Stunden. Am 13. postoperativen Tag wurden osmotische Minipumpen mit MPO, Angiotensin II oder NaCl-Lösung wie beschrieben subkutan implantiert und die Blutdruckmessung für eine weitere Woche fortgesetzt. Die radiotelemetrische Blutdruckanalyse erfolgte in Kooperation mit dem Institut für vegetative Physiologie und Pathophysiologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf.

3.2.15 Echokardiographische Untersuchung

Die mit Angiotensin II oder NaCl vorbehandelten Tiere wurden anästhesiert durch Inhalationsnarkose wie bereits beschrieben. Der Diameter des linken Vorhofes wurde in Einstellung einer modifizierten, parasternalen langen Achse mittels 30 MHz Schallkopf des Ultraschallgerätes (Vevo 770 micro-imaging system, VisualSonics Inc., Toronto, Kanada) bestimmt. Diese Untersuchungen fanden in Kooperation mit dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf statt.

3.2.16 Immunfluoreszenz-Färbung von Chlorotyrosin in murinen Vorhöfen

Die Färbung von Chlorotyrosin in Schnitten aus murinen Vorhöfen erfolgte nach dem Protokoll wie unter 3.2.9 beschrieben. Als primärer Antikörper wurden verwendet: Chlorotyrosin (polyklonal, Kaninchen, 1:100, Hbt) und als sekundäre Antikörper Alexa 488 gegen Kaninchen IgG (1:100, Molecular Probes).

3.2.17 Quantifizierung des Chlorotyrosingehaltes in murinem Vorhofgewebe

Die Quantifizierung von 3-Chlorotyrosin in murinen Vorhöfen erfolgte wie unter 3.2.10 beschrieben im Labor von Prof. S. L. Hazen in Cleveland, Ohio, USA.

3.2.18 Analyse der murinen MPO Plasma- und Gewebespiegel

Die Bestimmung der MPO-Konzentration in murinem Plasma und Herzhomogenat erfolgte mittels ELISA (Hycult Biotechnology) nach den Angaben des Herstellers und

dem Prinzip wie unter 3.2.7 beschrieben. Homogenate und Heparin-Plasma wurden hier zuvor 1:4 mit Probenpuffer verdünnt. In Unterschied zu 3.2.7 wurde nach Bindung des Antigens ein Antikörper mit konjugiertem Biotin zugegeben. Daraufhin wurde nach wiederholtem Waschen an Meerrettichperoxidase gebundenes Streptavidin zugefügt. Die Entwicklung der Färbung und Auswertung erfolgte wie oben erwähnt.

3.2.19 Bestimmung der MMP Aktivität

Homogenat (je 20 μg Protein) von murinen Vorhöfen wurde mit Zymographie-Puffer (0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 20% (v/v) Glycerol, 4% (w/v) SDS (Natrium-dodecylsulfat) und 0,005% Bromphenolblau) versetzt und für 10 min. inkubiert. Die Proben wurden auf ein 10% Polyacrylamid-Gel aufgetragen, welches 0,1 mg/ml Gelatine enthielt. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, das Gel zwei mal für 30 min. in 2,5% Triton X 100 zur Entfernung des SDS gewaschen und bei 37°C über Nacht in Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl_2) inkubiert. Nach Färbung des Gels mit Coomassie-Brilliant-Blau konnten Bereiche mit Gelatinase-Aktivität als ungefärbte Zonen identifiziert werden. Zum quantitativen Vergleich der MMP-Aktivität in den einzelnen Proben erfolgte die Bestimmung der Größe der Flächen der jeweiligen Bereiche mittels *ImageJ* Software. Die Durchführung der Zymographie erfolgte im Labor von Prof. B. Freeman in Pittsburgh, PA, USA durch Dr. T. Rudolph.

3.2.20 Quantifizierung der Proteinmenge an MMP in murinen Vorhöfen

Homogenat von murinen Vorhöfen wurde mit SDS-Probenpuffer (10% Glycerol, 2,3% SDS, 0,05% Bromphenolblau in 60mM Tris-HCl) versetzt und für 5 min. bei 95°C inkubiert. Die Homogenate wurden auf ein 8% Polyacrylamid-Gel aufgetragen, und anschließend wurde eine Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch *Blotting* auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (*Blotting*puffer 14,4 g Glycin, 3,03 g Tris-HCl in 800 ml Wasser, 200 ml Methanol, 200 mA Stromstärke). Daraufhin erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen der Membran durch 3% bovines Serumalbumin (BSA) in TBST-

Puffer und die Inkubation mit primärem Antikörper gegen MMP-9 (polyklonal, 1:200, R&D) in 3% BSA/TBST. Nach wiederholtem Waschen der Membran mit TBST wurde mit sekundärem, Meerrettichperoxidase-gebundenem Antikörper (1:10000, Vectorlabs) behandelt und nochmals gewaschen. Zur Erzeugung eines Signals wurde die Membran mit Peroxidase-Substrat (Super Signal west Femto Stable Peroxide Buffer, Super Signal West Femto Luminol Enhancer Solution, Pierce) behandelt, welches durch die Reaktion mit der Peroxidase Lumineszenz entwickelt. Die Lumineszenz wurde auf einem Film festgehalten und die belichteten Bereiche wurden mittels ImageJ Software densitometrisch ausgewertet.

3.2.21 Histologische Fibroseanalyse

Die Beurteilung des Fibrosegrades erfolgte in linken Vorhöfen muriner Herzen, welche in der Längsachse halbiert und in 4% Formaldehydlösung fixiert wurden. Die Herzen wurden anschließend in einen Paraffinblock gegossen, aus dem 5 μm dicke Schnitte angefertigt wurden. Die Schnitte wurden durch Behandlung mit Xylol und Ethanol in absteigender Konzentration (100%, 90%, 75%, 60%) entparaffinisiert und einer Picosiriusrot-Färbung unterzogen: Die Schnitte wurden für 1h in einer 0,1% Lösung von Siriusrot F3BA in gesättigter, wässriger Pikrinsäure pH 2, inkubiert. Anschließend wurden die Präparate für 2 min. in 0,01 N Salzsäure gewaschen. Die Präparate wurden durch Behandlung mit Ethanol in aufsteigender Konzentration und Xylol entwässert und mit EUKITT-Medium eingebettet. Anschließend wurden mit einer an ein Mikroskop angeschlossenen Videokamera (Sony) Bilder der gefärbten Schnitte in 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Zur Verdeutlichung von Strukturunterschieden durch unterschiedliche Faserverläufe der fibrotischen Areale wurde hier um 90° polarisiertes Licht verwendet. Die Bilder wurden mittels Bildanalysesoftware (Optimas® 6.0) ausgewertet und die fibrotische Fläche in Prozent der Gesamtfläche des Bildes dargestellt.

Die Färbung und Analyse erfolgte durch Prof. K. Klingel, Pathologie, Uniklinikum Göttingen.

3.2.22 Elektrophysiologische Untersuchung

Die Tiere wurden anästhesiert mittels Inhalation eines Isofluran/Sauerstoff Gemisches (initial 5 % Isofluran, 2 % Erhaltungsdosis ad 100 % Sauerstoff). Für die Ableitung eines Oberflächen-Elektrokardiogramms wurde an jeder Extremität intramuskulär je eine Kanüle (Sterican 25 G, Braun, Deutschland) platziert und über Kabel mit dem Stimulator (Model 5328, Medtronic) verbunden. Vor dem eigentlichen Eingriff erfolgte für mindestens 3 Minuten eine Aufzeichnung des Oberflächen EKGs, die ebenso wie die nachfolgende elektrophysiologische Untersuchung zur späteren Analyse gespeichert wurde (Bard stamp amplifier; C.R. Bard Inc.).

Ein rechtsseitiger, zervikaler Hautschnitt von 2 Zentimeter Länge wurde durchgeführt und anschließend die Vena jugularis von Binde- und Fettgewebe frei präpariert. Eine durchgeführte Ligatur mittels geflochtenem Faden der Stärke 4/0 diente der Fixierung des Blutgefäßes und blutarmer Operationsverhältnisse während der Platzierung des oktapolaren elektrophysiologischen Katheters (2.0 F; CIBer Mouse, NuMed Inc., Hopkinton, USA) im rechten Vorhof und Ventrikel. Anhand des abgeleiteten intrakardialen Elektrokardiogramms wurde die korrekte Katheterlage überprüft und anschließend mit einer weiteren Ligatur der Katheter gesichert. Gemäß Stimulationsprotokoll wurden atriale Refraktärzeit (ARP), AV-Knoten-Refraktärzeit (AVNRP), Sinusknotenerholungszeit (SKEZ) sowie der Wenckebachpunkt (WBP) bestimmt. Zur Untersuchung der Vulnerabilität für Vorhofflimmern wurden eine programmierte atriale Stimulation sowie eine sogenannte atriale Burst-Stimulation durchgeführt.

Stimulationsprotokoll:

Es wurden 3 festfrequente Stimulationsmanöver mit einem Grundintervall (S_1) von jeweils 120 ms, 110 ms und 100 ms sowie einem verkürzend angehängtem Extrastimulus (S_2) durchgeführt. Die Zykluslänge des Extrastimulus wurde in Schritten von 10 ms jeweils ausgehend von 120 ms bis auf 10 ms verkürzt. Für die atriale Burst-Stimulation wurde ebenfalls Schritten von 10 ms ein Grundintervall von 50 ms bis zu 10 ms gewählt und für eine Dauer von 7 Sekunden stimuliert. Sämtliche Stimulationsmanöver wurden bei einer Stromstärke von 1 und 2 mA durchgeführt. Im

Anschluss an die Untersuchung wurden die Tiere noch in Narkose durch finale Organ- und Blutentnahme sakrifiziert. Die elektrophysiologischen Untersuchungen fanden in Kooperation mit der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Bonn statt.

3.2.23 Epikardiales, elektrophysiologisches Mapping

Zur Charakterisierung der myokardialen Leitungseigenschaften und deren möglicher Beeinflussung durch MPO-abhängiges, strukturelles Remodeling wurden elektrophysiologische Mapping Untersuchungen an Langendorff-perfundierten Herzen von WT und *Mpo*^{-/-} Tieren jeweils nach Ang II Stimulation bzw. NaCl durchgeführt.

Die Herzen wurden in Inhalationsnarkose nach Präparation des umliegenden Gewebes entnommen und sofort in eine 4 °C kalte Krebs-Henseleit-Lösung überführt. Das isolierte Herz wurde nach Darstellung der Aorta ascendens und Kanülierung in die Langendorff-Apparatur (Radnoti Technologies Inc., Monrovia, CA, USA) gehängt und bei konstantem Druck von 80 mmHg sowie konstanter Temperatur von 37 °C mit Nährlösung retrograd perfundiert, worauf es erneut zu schlagen begann. Mit einem eigens hergestellten und dem Vorhof aufliegenden Mapping-Katheter (Interelektroden Abstand: $300 \pm 7 \mu\text{m}$) wurden 128 epikardiale Vorhofelektrogramme aufgezeichnet und in Beziehung gesetzt zu einer Referenzelektrode, die sich im Langendorff Wasserbad befand. Festfrequente Stimulation des Vorhofes sowie Stimualtion mittels Extra-Stimulus Technik erfolgten nach unstimulierter Basismessung mit 2 separaten Elektroden, woraufhin die folgenden Elektrogramme bei 50 Hz gefiltert, analysiert, digitalisiert und archiviert wurden (25 kHz, Multi Channel Systems, Reutlingen, Deutschland). Der Zeitpunkt der lokalen Aktivierung wurde definiert anhand des ersten Signals eines lokalen unipolaren Elektrogramms ($\delta V / \delta t$)¹⁰⁷. Die longitudinale und transversale Leitungsgeschwindigkeit wurde unter Berücksichtigung des myokardialen Faserverlaufs berechnet über die Latenzen der lokalen Aktivierung zwischen zwei benachbarten Elektroden dividiert durch den Interelektrodenabstand¹⁰⁸. Um Werte einer artifiziellen, lokalen Verlangsamung der Leitungsgeschwindigkeit durch die Einzelelektroden zu vermeiden, wurden die variierenden Aktivierungszeiten zweier benachbarten Elektroden auf den jeweiligen Elektrodenabstand normalisiert. Neben optischer Darstellung der elektrischen Leitungsgeschwindigkeit erfolgte die

Quantifizierung der longitudinalen und vektoralen Geschwindigkeiten durch Messung der Strecke des Anfangspunktes einer Erregung bis zu seinem Endpunkt, bezogen auf die vergangene Zeit. Die longitudinale Konduktion bezog sich auf den Signalverlauf in vertikaler Richtung, die vektorale entsprach der tatsächlichen Richtung der Erregungsausbreitung innerhalb des Vorhofes.

3.2.24 Statistische Auswertung

Bei der Analyse der Patientendaten des Herzschrittmacher-Kollektivs sollte ein minimaler Unterschied in MPO-Plasmaspiegeln von 15% detektiert werden. Bei einem α -Fehler von 0,05 und einer Power von 80% ergab die Berechnung eine notwendige Probandenzahl von $n=17$ pro Gruppe. Der primäre Endpunkt der Gewebeanalysen aus dem herzchirurgischen Kollektiv war die unterschiedliche Ausprägung der Chlorotyrosin-Deposition zwischen Patienten mit und ohne Vorhofflimmern. Da unter diesem Aspekt keine Erfahrungen aus Vorversuchen bzw. anerkannter Literatur vorlagen, wurde für dieses Kollektiv auf eine Fallzahl-Berechnung verzichtet.

Der Vergleich kategorischer Daten erfolgte mittels χ^2 -Test.

Kontinuierliche Daten wurden auf Normalverteilung geprüft mittels Kolmogorov-Smirnoff-Test. Normalverteilte Daten wurden dargestellt als Mittelwert \pm Standardabweichung; nicht-normalverteilte Daten wurden präsentiert als Median und Interquartilsabstand.

Der Vergleich normalverteilter Daten wurde vorgenommen mit dem *Student's t-Test*, für nicht-normalverteilte Daten wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Mehrfachvergleiche wurden durchgeführt mittels one-way ANOVA mit Bonferroni post-hoc Test oder Kruskal-Wallis mit Mann-Whitney U post-hoc Test. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant bewertet.

Die statistischen Analysen wurden durchgeführt mit SPSS Version 13 (SPSS, Chicago, IL, USA).

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Patientenkollektive

4.1.1 Klinische Daten

Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen MPO-Plasmaspiegeln und dem Auftreten von Vorhofflimmern wurden 42 Patienten untersucht und hinsichtlich ihrer Vorhofflimmer-Inzidenz gemäß Schrittmacher-Protokoll in zwei Gruppen eingeteilt. Hierfür wurden 18 Patienten mit durchgehendem Sinusrhythmus während eines durchschnittlichen Beobachtungszeitraumes von 114 +/- 73 Tagen identifiziert und 24 Patienten mit einem mittleren AF-Burden von 45,2 +/- 39,9 % gegenüber gestellt. Relevante klinische Daten sind für beide Gruppen vergleichend in Tabelle 1 dargestellt.

	Sinusrhythmus (n=18)	Vorhofflimmern (n=24)	p
Geschlecht weiblich	5 (2,8)	8 (33,3)	0,70
Alter	68,5 ± 8,3	70,1 ± 6,8	0,50
BMI	24,2 ± 7,0	24,0 ± 5,4	0,94
Arterielle Hypertonie	15 (83,3)	21 (87,5)	0,40
Hypercholesterinämie	10 (55,5)	10 (41,7)	0,28
Diabetes mellitus	2 (11,1)	3 (12,5)	0,89
Nikotinabusus	0 (0,0)	0 (0,0)	
Positive Familienanamnese	13 (72,2)	13 (54,2)	0,19
Aspirin	7 (38,9)	3 (12,5)	0,05
Orale Antikoagulation	6 (33,3)	19 (79,2)	<0,05
Betablocker	6 (33,3)	12 (50,0)	0,28
ACE-Inhibitoren	12 (66,6)	10 (41,7)	0,11
AT1-Inhibitoren	0 (0,0)	2 (8,3)	0,21
Statine	7 (38,9)	8 (33,3)	0,71
Hämoglobin g/dl	14,4 ± 0,9	14,0 ± 1,3	0,22
Leukozyten 1000/ μ l	5,8 ± 1,1	5,8 ± 1,4	0,99
Thrombozyten 1000/ μ l	284,2 ± 50,1	257,9 ± 61,5	0,15
Kreatinin mg/dl	1,0 ± 0,5	1,1 ± 0,2	0,41
Cholesterin gesamt mg/dl	211,3 ± 27,6	193,8 ± 38,7	0,11
LDL-Cholesterin mg/dl	110,7 ± 19,9	102,9 ± 30,1	0,35
HDL-Cholesterin mg/dl	71,0 ± 15,6	63,0 ± 16,8	0,12
Ejektionsfraktion %	51,9 ± 9,0	49,3 ± 8,7	0,38
Mitralinsuffizienz Grad I	9 (50,0)	12 (50,0)	0,43
Mitralinsuffizienz Grad II	2 (11,1)	6 (25,0)	
LA-Diameter mm	44,2 ± 4,3	44,4 ± 4,8	0,91
SM-Interventionsrate min ⁻¹	57,5 ± 15,7	57,5 ± 13,6	1,00

Tabelle 1: Patientencharakteristika Schrittmacher-Kollektiv.

Es zeigte sich, dass signifikante Unterschiede lediglich für die Häufigkeit der Einnahme einer oralen Antikoagulation bestanden, was durch die Therapie des Vorhofflimmerns erklärt werden kann. Dies sollte nicht zu einer Versuchsbeeinflussung führen, so dass als einzig relevanter Unterschied das Vorkommen von Vorhofflimmern angenommen werden konnte.

Um neben der systemischen zusätzlich eine lokale Bedeutung der MPO für das Auftreten von Vorhofflimmern zu analysieren, wurden in einem zweiten Ansatz Gewebeproben und klinische Daten von 10 Patienten mit und 17 Patienten ohne dokumentiertes Vorhofflimmern untersucht, die sich einem elektiven koronarchirurgischen Eingriff unterzogen haben. Gruppenspezifische Charakteristika dieser Kohorte sind in Tabelle 2 dargestellt.

	Sinusrhythmus	Vorhofflimmern	p
Geschlecht weiblich	4 (23,5)	4 (40)	0,37
Alter	68,6 ± 13,8	71,0 ± 6,5	0,60
Arterielle Hypertonie	10 (58,8)	7 (70)	0,69
Hypercholesterinämie	6 (35,3)	3 (30)	0,78
Diabetes mellitus	3 (17,6)	2 (20)	0,89
Nikotinabusus	5 (29,4)	1 (10)	0,36
Aspirin	14 (82,4)	1 (10)	<0,05
Betablocker	12 (70,6)	4 (40)	0,22
ACE-Inhibitoren	10 (58,8)	6 (60)	0,95
Statine	13 (76,5)	5 (50)	0,22
Hämoglobin g/dl	13,6 ± 1,9	13,0 ± 1,2	0,41
Leukozyten 1000/ μ l	7,59 ± 1,98	7,58 ± 2,1	0,99
Kreatinin mg/dl	1,16 ± 0,36	1,14 ± 0,41	0,86

Tabelle 2: Patientencharakteristika herzchirurgisches Kollektiv

4.1.2 Bestimmung der flussabhängigen Gefäßfunktion

Patienten mit Vorhofflimmern zeigten eine signifikant verminderte, endothelabhängige Gefäßfunktion im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus (Abb. 6, FMD 6,4 +/- 3,6 vs. 8,8 +/- 3,7 %, $p=0,04$), wohingegen keine fluss- bzw. endothelunabhängigen Unterschiede (NMD) gesehen werden konnten. Die flussabhängige Dilatationsfähigkeit kann im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit als Maß der vaskulären NO-Bioverfügbarkeit angesehen werden.

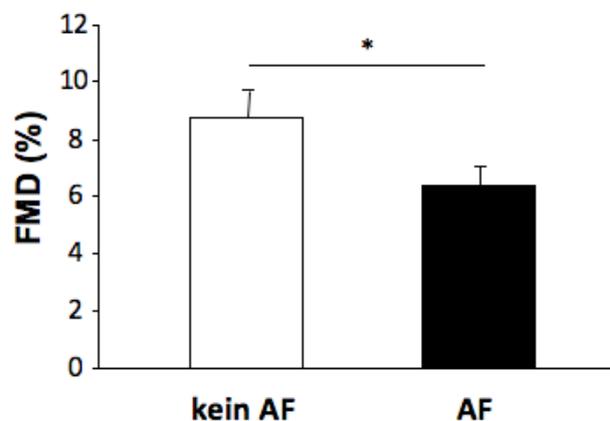


Abbildung 6: FMD der Patienten mit Sinusrhythmus (kein AF, $n=18$) und mit Vorhofflimmern (AF, $n=24$) * = $p<0,05$.

4.1.3 Humane MPO und Elastase Plasma- und Gewebespiegel

Es wurden MPO und Elastase Plasmaspiegel des Herzschrittmacher-Kollektivs sowie MPO Gewebespiegel aus Vorhoffhomogenaten des herzchirurgischen Kollektivs untersucht. Es zeigten sich signifikant erhöhte MPO Plasmaspiegel bei Patienten mit Vorhofflimmern im Vergleich zu Patienten im Sinusrhythmus (503,1 vs 437,8 pmol/l; $p=0,025$), ebenso wie erhöhte Gewebespiegel von MPO (187,2 vs 72,9 ng/mg Protein; $p=0,018$). Neben der Erhöhung der MPO Plasmaspiegel zeigte sich auch eine Erhöhung der Elastase-Plasmaspiegel bei Patienten mit Vorhofflimmern (50,5 +/- 23,9 vs 38,3 +/- 12,4 ng/ml; $p=0,039$) (Abb. 7). Als Ursache der erhöhten MPO

Plasmaspiegel kann somit eine systemische PMN Aktivierung angenommen werden, da MPO und Elastase in identischen Granula der PMN gespeichert werden.

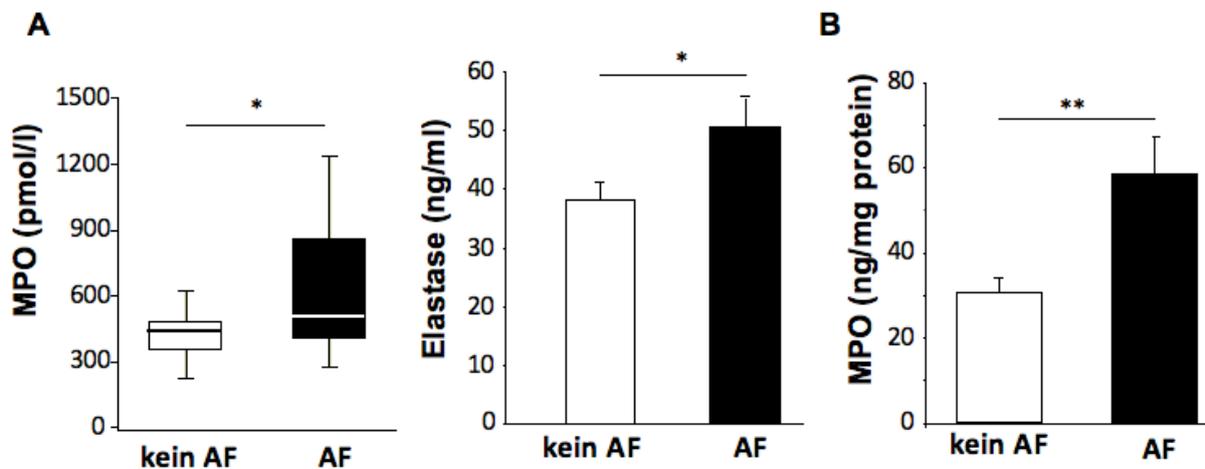


Abbildung 7: A) Plasmakonzentrationen von MPO und Elastase in Patienten mit Sinusrhythmus (kein AF, n=18) und Patienten mit Vorhofflimmern (AF, n=24). B) MPO-Konzentration im Vorhofgewebe von Patienten mit Sinusrhythmus (kein AF, n=17) und Patienten mit Vorhofflimmern (AF, n=10) * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

4.1.4 Immunfluoreszenz-Färbung von Chlorotyrosin und MPO in humanem Vorhofgewebe

In den Gewebeproben des herzchirurgischen Kollektivs wurde die Immunreaktivität für MPO und Chlorotyrosin (ClTyr) mittels Fluoreszenzfärbung dargestellt. ClTyr gilt als Indikator für die Präsenz und katalytische Aktivität von MPO, da dies posttranslational durch HOCl gebildet wird. In den Gewebeschnitten der Patienten mit Sinusrhythmus war eine deutlich geringere Immunreaktivität von MPO und ClTyr detektierbar als in denen der Patienten mit Vorhofflimmern. In diesen war eine deutliche Kolo-kalisation von MPO und ClTyr zu beobachten (Abb. 8).

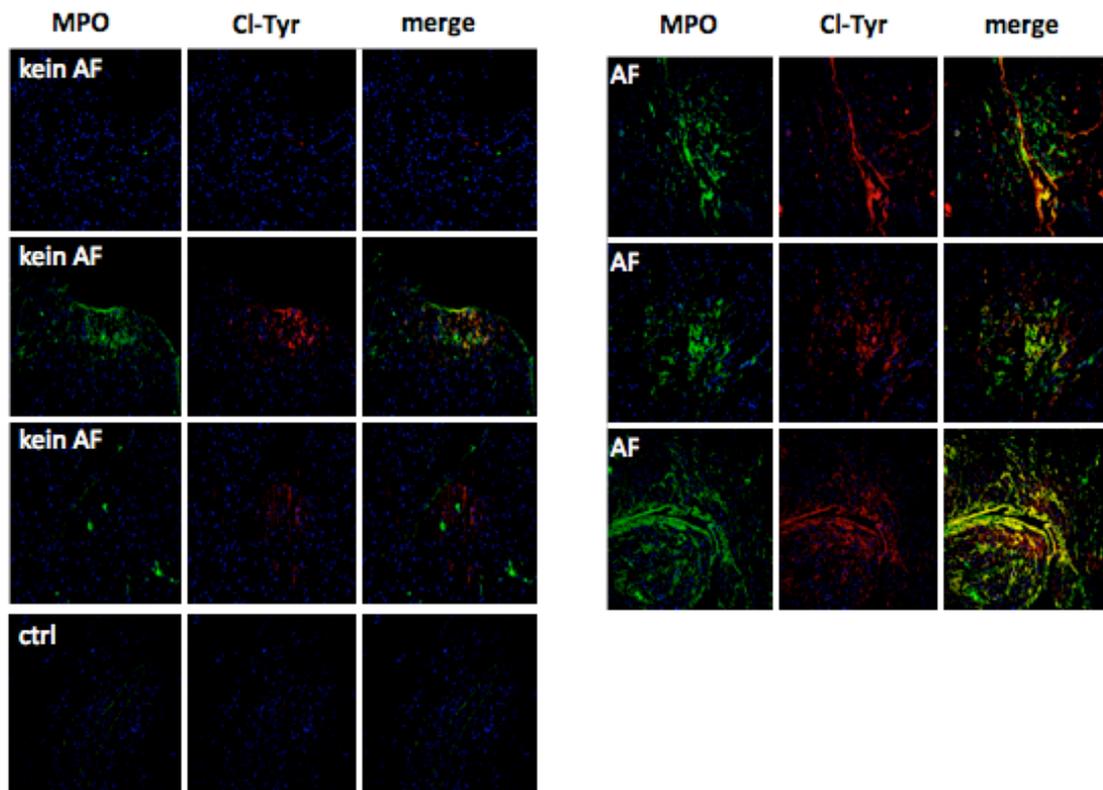


Abbildung 8: Immunreaktivität von MPO (grün) und Chlorotyrosin (Cl-Tyr, rot) und Kolokalisation (merge). Repräsentative Schnitte aus Vorhofohrgewebe von 7 Patienten mit Sinusrhythmus (no AF) und 7 Patienten mit Vorhofflimmern (AF). Kernfärbung = Dapi (blau), ctrl = ohne Erstantikörper.

4.1.5 Quantifizierung von Chlorotyrosin in humanem Vorhofgewebe mittels LC/MS/MS

Als Indikator für die Präsenz und katalytische Aktivität von MPO im Vorhofmyokard wurde in Vorhofgewebe von Patienten mit und ohne Vorhofflimmern aus dem herzchirurgischen Kollektiv der Gehalt an ClTyr mittels LC/MS/MS quantifiziert. Es zeigten sich signifikant erhöhte Spiegel bei Patienten mit Vorhofflimmern verglichen mit Patienten im Sinusrhythmus (Abb. 9; 187,2 vs 72,9 $\mu\text{mol/mol Tyr}$; $p=0,018$).

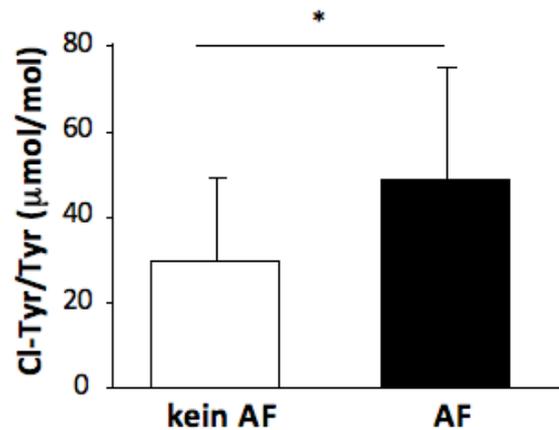


Abbildung 9: LC/MS/MS-basierte Quantifizierung von Chlorotyrosin (Cl-Tyr) in Vorhofohr-Gewebe von Patienten mit Sinusrhythmus (kein AF, $n=17$) und Patienten mit Vorhofflimmern (AF, $n=10$) * = $p < 0,05$.

4.2 Tierexperimente

4.2.1 Blutdruckmessung

Die Auswertung der murinen Blutdruckwerte erfolgte getrennt nach Tageszeiten und adaptiert an die zirkadiane Tag-Nacht-Rhythmik der Versuchstiere. Die Basisanalyse über 3 Tage zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und $Mpo^{-/-}$ Tieren (MAP Tag 95,8 vs 98,8 mmHg; MAP Nacht 111,1 vs 107,1 mmHg).

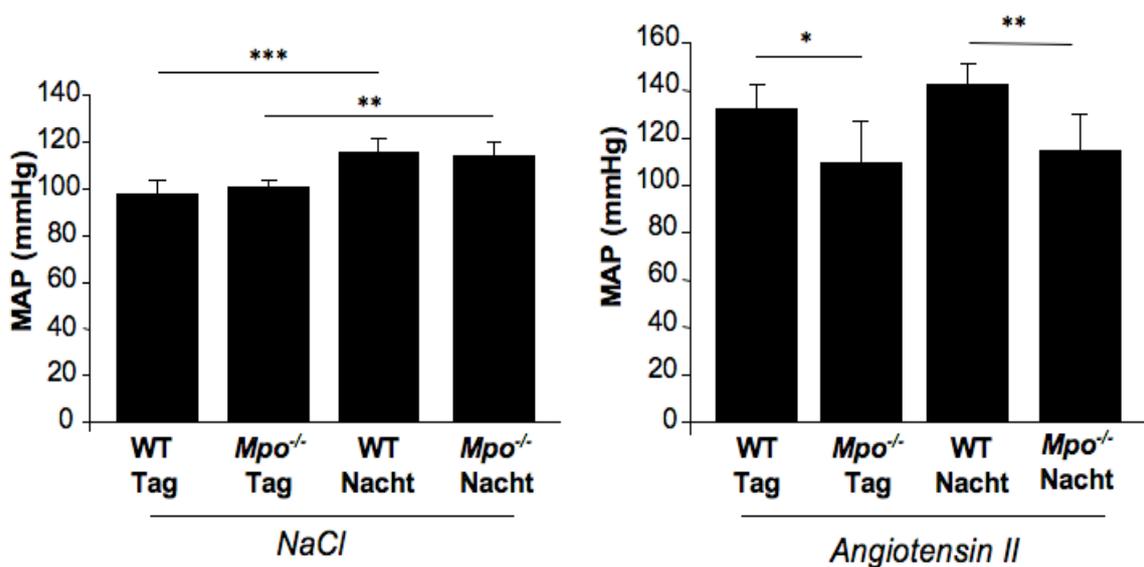


Abbildung 10: Radiotelemetrisch ermittelter, mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) von WT und $Mpo^{-/-}$ Tieren nach Ang II bzw. NaCl Behandlung ($n=10$), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Ang II Infusion führte zu einem signifikanten Anstieg des MAP in Wildtyptieren (Tag 137,7 mmHg; Nacht 150,9 mmHg), jedoch nicht in $Mpo^{-/-}$ Tieren, gemessen über einen Zeitraum von 7 Tagen nach Pumpenimplantation (Tag 95,3 mmHg; Nacht 103,7 mmHg) (Abb. 10).

$Mpo^{-/-}$ Tiere, denen MPO, aber nicht Ang II zugeführt wurde, reagierten mit keiner Veränderung der Blutdruckwerte im Vergleich zu den Ausgangswerten (Abb. 11).

Ein ebenfalls aufgezeichnetes Herzfrequenzprotokoll über den gesamten Versuchszeitraum zeigte keine relevanten Unterschiede innerhalb der Gruppen unter basalen als auch unter Stimulationsbedingungen mit Ang II bzw. MPO.

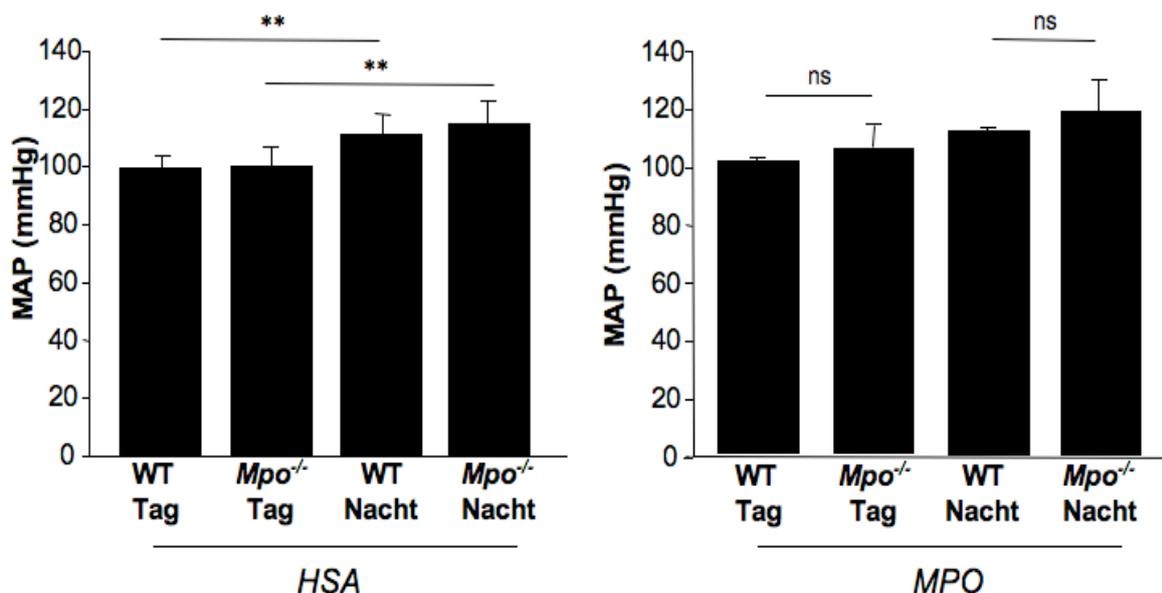


Abbildung 11: Radiotelemetrisch ermittelter, mittlerer arterieller Blutdruck von WT und $Mpo^{-/-}$ Mäusen nach intravenöser HSA bzw. MPO Infusion über 7 Tage ($n = 6-7$), ** = $p < 0,01$.

4.2.2 Echokardiographie

Die transthorakale Echokardiographie zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Vorhofgröße des linken Vorhofes von WT- und *Mpo*^{-/-} Tieren nach Ang II (Abb. 12) bzw. MPO Infusion sowie Kontrolle.

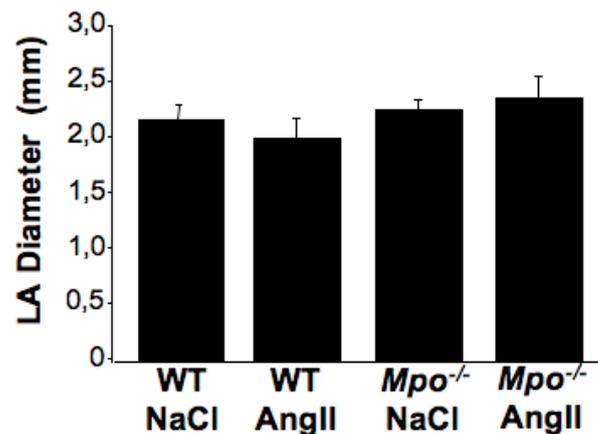


Abbildung 12: Echokardiographische Bestimmung des linksatrialen Diameters bei WT und *Mpo*^{-/-} Mäusen nach Ang II bzw. NaCl Behandlung (n=8).

4.2.3 MPO Plasmaspiegel und atriale MPO Gewebespiegel

Im tierexperimentellen Versuchsaufbau wurden Blutplasma und Gewebehomogenate aus murinen Vorhöfen zur MPO-Analyse herangezogen. Wildtypiere unter Vorbehandlung mit Ang II entwickelten signifikant erhöhte MPO Plasmaspiegel als auch MPO Spiegel im Vorhofmyokard im Vergleich zu Wildtypieren unter NaCl-Infusion. In *Mpo*^{-/-} Tieren zeigte die Ang II-Applikation dagegen keinen Effekt auf die MPO-Spiegel in Plasma und Vorhofmyokard (Abb. 13). Die intravenöse Infusion von MPO in ansteigenden Dosierungen in *Mpo*^{-/-} Tieren resultierte in gleichsam ansteigenden, erhöht messbaren Plasmaspiegeln, was konsequenterweise in Kontrolltieren mit HSA ausblieb.

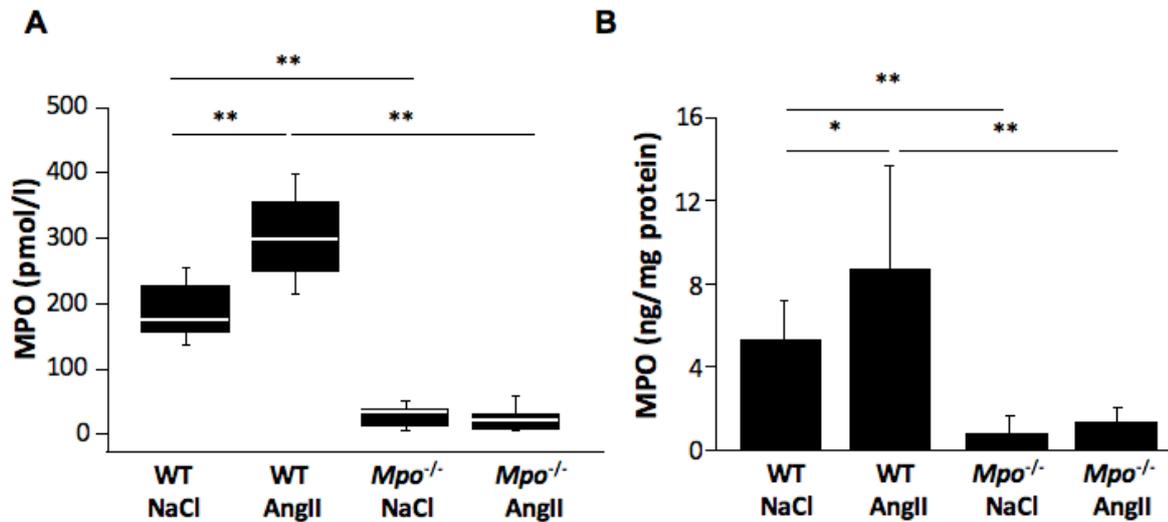


Abbildung 13: A) MPO Plasmaspiegel in WT und *Mpo*^{-/-} Tieren nach Ang II bzw. NaCl Behandlung (n=14-19). B) MPO Gewebespiegel aus Vorhöfen von WT und *Mpo*^{-/-} Tieren nach Ang II bzw. NaCl Behandlung (n= 14-19), * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

4.2.4 Immunfluoreszenz-Färbung von Chlorotyrosin in murinem Vorhofgewebe

In Analogie zur Immunfluoreszenz-Färbung von ClTyr im humanen Vorhofgewebe wurde ClTyr in den murinen Vorhöfen angefärbt. Es zeigte sich keine Immunreaktivität in den Präparaten der *Mpo*^{-/-} Tiere und ein geringes Signal in den WT Tieren, die mit NaCl behandelt wurden. Die Ang II-behandelten WT Mäuse hingegen zeigten deutliche Reaktivität für ClTyr im gesamten Vorhofmyokard, während dieser Effekt von Ang II in *Mpo*^{-/-} Mäusen nicht zu beobachten war (Abb. 14).

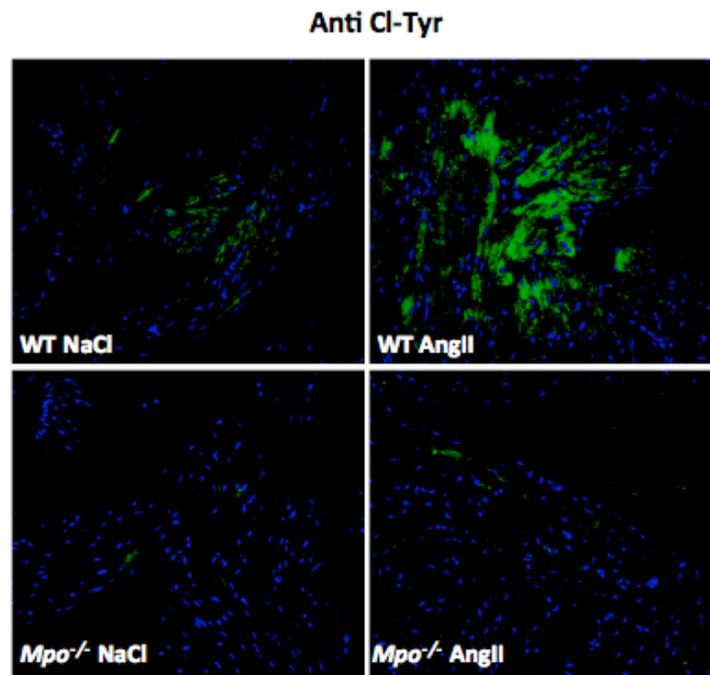


Abbildung 14: Repräsentative Immunfluoreszenz-Darstellung von Chlorotyrosin in Vorhöfen von WT und $Mpo^{-/-}$ Tieren nach Ang II bzw. NaCl Behandlung.

4.2.5 Quantifizierung von Chlorotyrosin in murinem Vorhofgewebe mittels LC/MS/MS

Die quantitative Chlorotyrosinbestimmung in murinen Vorhofpräparaten zeigte signifikant erhöhte Spiegel in WT Tieren nach Ang II Behandlung im Vergleich zu $Mpo^{-/-}$ Tieren unter Ang II und Kontrollen (Abb. 15; 51,5 vs 15,2 $\mu\text{mol/mol}$ Tyr ; $p < 0,001$) und lässt so Rückschlüsse auf eine erhöhte Bioverfügbarkeit von HOCl in diesen Tieren zu.

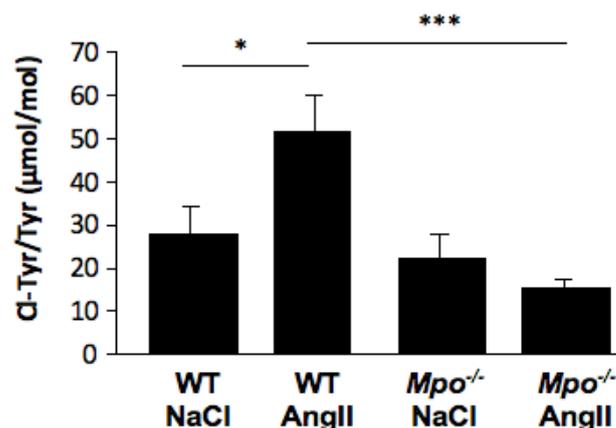


Abbildung 15: LC/MS/MS-basierte Quantifizierung von Chlorotyrosin (Cl-Tyr) in Vorhofgewebe von WT und $MPO^{-/-}$ Tieren nach Ang II bzw. NaCl Behandlung ($n=10$), * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

4.2.6 Auswertung des Fibrosegrades in murinen Vorhöfen

Die immunhistochemische Auswertung der murinen Vorhofpräparate zur Quantifizierung des Fibrosegrades zeigte in WT Tieren unter Ang II Stimulation im Vergleich zu $Mpo^{-/-}$ Tieren als auch zu WT und $Mpo^{-/-}$ Kontrolltieren unter NaCl bzw. HSA eine signifikant vermehrte Fibrose. Diese Vermehrung von Kollagen im Vorhofmyokard, die in unbehandelten $Mpo^{-/-}$ Tieren zunächst nicht zu sehen war, konnte nach intravenöser Rekonstitution von MPO letztlich in vergleichbarem Maße wie in WT-Ang II Tieren gefunden werden (Abb. 16).

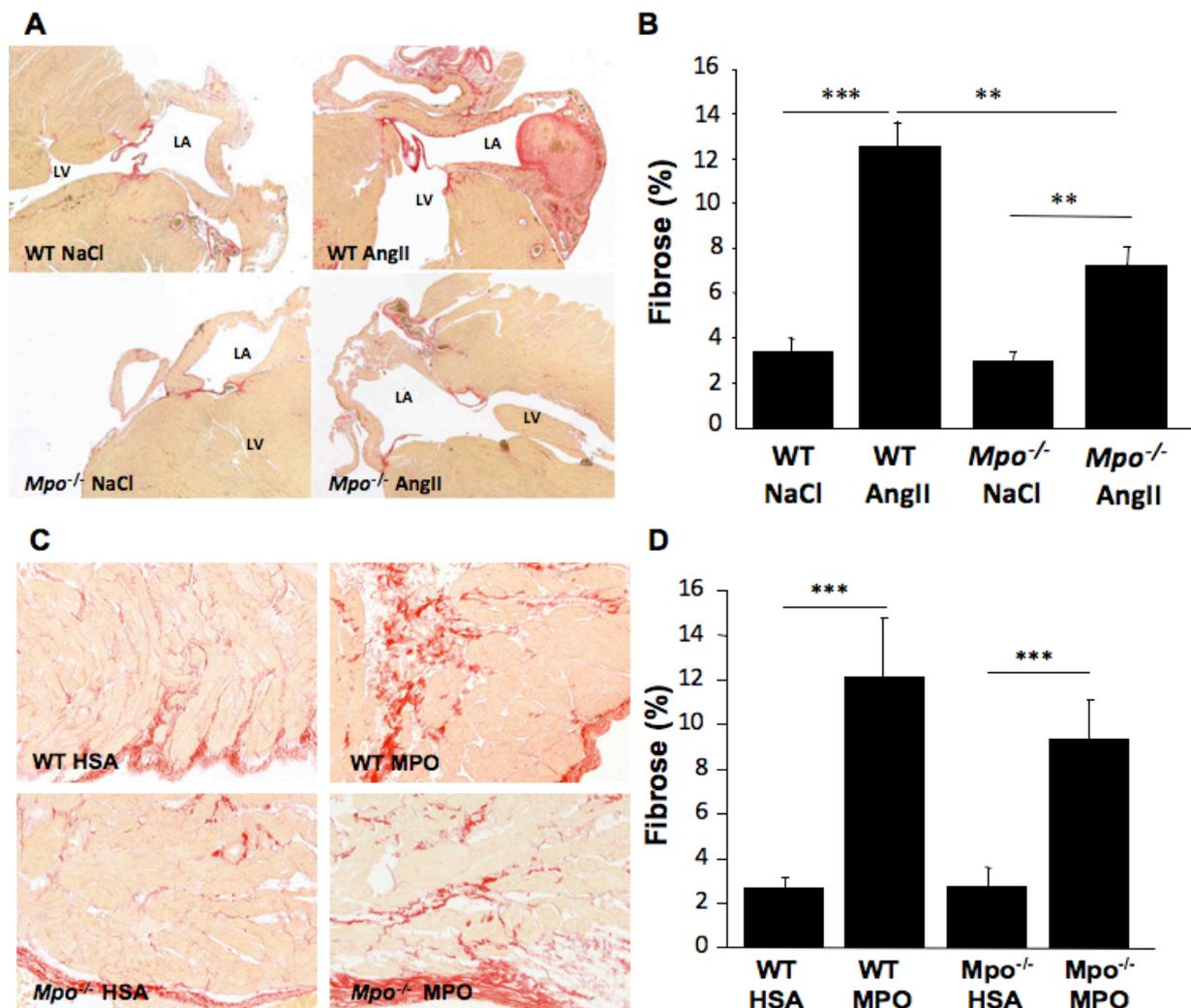


Abbildung 16: Histologische Fibrosefärbung in WT und $Mpo^{-/-}$ Tieren nach A) Ang II bzw. NaCl Behandlung und nach C) MPO bzw. HSA Behandlung. Repräsentative Darstellung von Vorhöfen in Siriusrot-Färbung aus 10 Bildern pro Tier ($n=8-10$). B) und D) Quantitative Bestimmung der atrialen Fibrose in WT und $Mpo^{-/-}$ Tieren nach B) Ang II bzw. NaCl Behandlung und D) MPO bzw. HSA Behandlung ($n=8-10$), ** = $p<0,01$; *** = $p<0,001$.

4.2.7 Aktivitätsbestimmung von MMP mittels Zymographie

Zur Bestimmung der MMP-Aktivität wurde Vorhof-Homogenat von Ang II-behandelten WT und *Mpo*^{-/-} Mäusen zymographisch analysiert. In Homogenaten der WT Mäuse wurde im Vergleich zur *Mpo*^{-/-} Maus eine signifikant erhöhte Aktivität von MMP-2 und MMP-9 gemessen (Abb. 17).

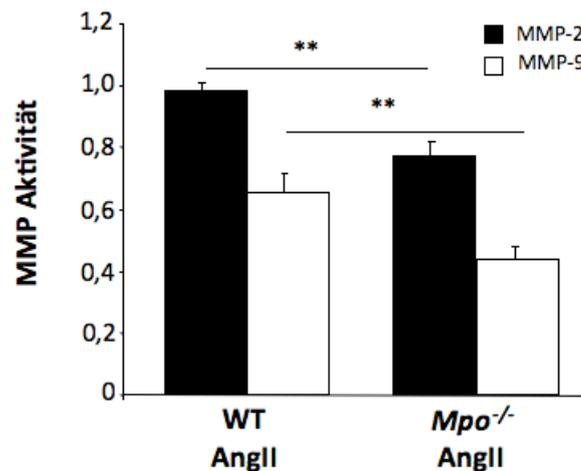


Abbildung 17: Bestimmung der Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in Ang II-behandelten WT und *Mpo*^{-/-} Tieren (n=7), ** = $p < 0,01$.

4.2.8 Proteinanalyse von MMP mittels Western-Blot

Um den Anteil von aktiver MMP am gesamten MMP-Protein zu ermitteln wurde die Protein-Menge von pro-MMP-9 und aktivem MMP-9 in Homogenaten von WT und *Mpo*^{-/-} Kontrolltieren und Ang II - behandelten WT und *Mpo*^{-/-} Mäusen quantifiziert. Es zeigten sich keine Unterschiede in den Proteinnmengen der inaktiven pro-MMP-9 zwischen den vier Gruppen. Die aktive Form der MMP-9 allerdings war in den Tieren der Kontrollgruppen nicht vorhanden, während in den Ang II-behandelten *Mpo*^{-/-} Mäusen das Protein detektiert wurde, jedoch in deutlich geringerer Menge als in der Ang II - behandelten WT Maus (Abb. 18).

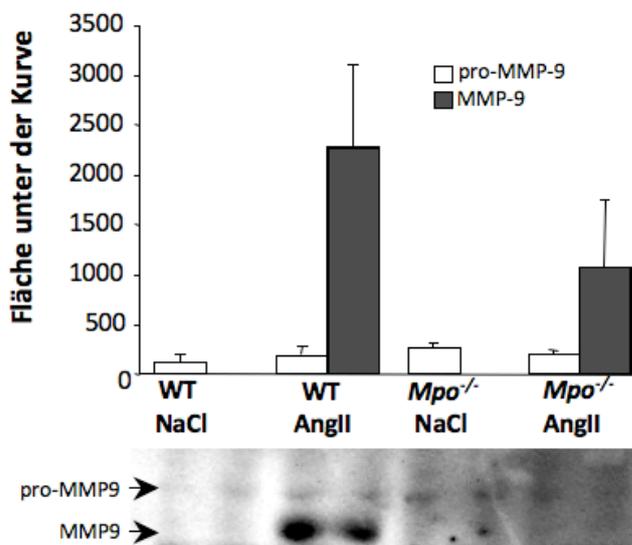


Abbildung 18: Quantifizierung mittels Western-Blot von pro-MMP-9 und MMP-9 in murinem Vorhofgewebe.

4.2.9 Elektrophysiologische Untersuchung

Anhand des abgeleiteten Oberflächen-EKGs und der intrakardialen Ableitungen konnten folgende signifikanten Unterschiede in der Dauer der Erregungsausbreitung auf Vorhofebene gesehen werden: Ang II – behandelte WT Tiere besaßen eine signifikant verbreiterte P-Welle im Vergleich zu *Mpo*^{-/-} Tieren unter Ang II Stimulation (14,1 vs 10,4 ms; $p < 0,001$) sowie zu WT-Kontrolltieren (14,1 vs 10,8 ms; $p < 0,001$), ein Zeichen einer gestörten Erregungsausbreitung in den Vorhöfen der betroffenen Tiere (Abb. 19).

Weitere elektrophysiologische Parameter ergaben keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen und sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

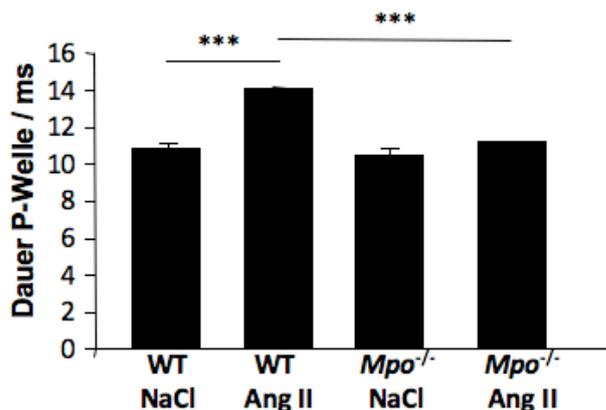


Abbildung 19: Elektrokardiographisch bestimmte Dauer der P-Welle von WT und MPO^{-/-} Tieren nach Ang II bzw. NaCl Behandlung als Ausdruck einer verzögerten Erregungsausbreitung im Vorhof (n=10-16 pro Gruppe), *** = p<0,001.

	WT NaCl	WT Ang II	MPO ^{-/-} NaCl	MPO ^{-/-} Ang II
Oberflächen EKG				
Herzfrequenz, min ⁻¹	540,8 ± 41,0	526,3 ± 57,1	504,1 ± 43,9	531,1 ± 55,1
P-Intervall, ms	17,3 ± 3,0	18,9 ± 2,9	17,5 ± 1,3	19,8 ± 3,4
PQ-Zeit, ms	41,2 ± 3,4	40,7 ± 5,7	38,6 ± 2,6	36,7 ± 3,0
Intrakardiales EKG				
AH-Intervall, ms	33,1 ± 3,5	35,2 ± 6,3	33,8 ± 8,9	28,7 ± 3,5
AV-Intervall, ms	40,7 ± 4,5	43,0 ± 7,7	41,8 ± 10,4	37,4 ± 3,8
Stimulation				
SKEZ, ms (S ₁ S ₂ 100 ms)	154,0 ± 32,8	169,6 ± 44,3	178,8 ± 32,7	168,3 ± 46,1
ARP, ms (S ₁ S ₂ 100 ms)	19,2 ± 4,4	19,3 ± 7,5	17,0 ± 2,7	15,5 ± 6,9
	WT HSA	WT MPO	MPO ^{-/-} HSA	MPO ^{-/-} MPO
Oberflächen EKG				
Herzfrequenz, min ⁻¹	486,9 ± 46,6	496,2 ± 31,1	519,2 ± 57,4	545,8 ± 34,5
P-Intervall, ms	10,3 ± 1,0	13,8 ± 1,9	11,0 ± 0	12,6 ± 1,3
PQ-Zeit, ms	39,3 ± 4,2	41,8 ± 5,4	39,2 ± 3,3	39,4 ± 4,2
Intrakardiales EKG				
AH-Intervall, ms	34,0 ± 5,3	36,6 ± 6,3	31,8 ± 2,5	29,7 ± 3,8
AV-Intervall, ms	41,0 ± 6,3	44,1 ± 7,3	38,8 ± 2,5	37,1 ± 3,8
Stimulation				
SKEZ, ms (S ₁ S ₂ 100 ms)	180,5 ± 55,5	154,3 ± 30,3	147,8 ± 16,3	143,1 ± 19,7
ARP, ms (S ₁ S ₂ 100 ms)	19,2 ± 2,0	18,9 ± 3,3	16,7 ± 2,9	16,4 ± 6,3

Tabelle 3: Elektrophysiologische Charakteristika von WT und Mpo^{-/-} Versuchstieren.

Zur Beurteilung der Vorhofflimmer-Vulnerabilität wurden Anzahl und Dauer aller Vorhofflimmer-Episoden sowie die Wahrscheinlichkeit, ein Quotient aus ausgelösten Vorhofflimmer-Episoden und der Gesamtzahl an durchgeführten Stimulationsmanövern, bestimmt.

Ang II Infusion führte in WT Tieren zu signifikant häufigeren und längeren Episoden als auch zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit im Vergleich zu Kontrolltieren, die NaCl erhielten. Dieser Effekt von Ang II konnte in *Mpo*^{-/-} Tieren nicht beobachtet werden.

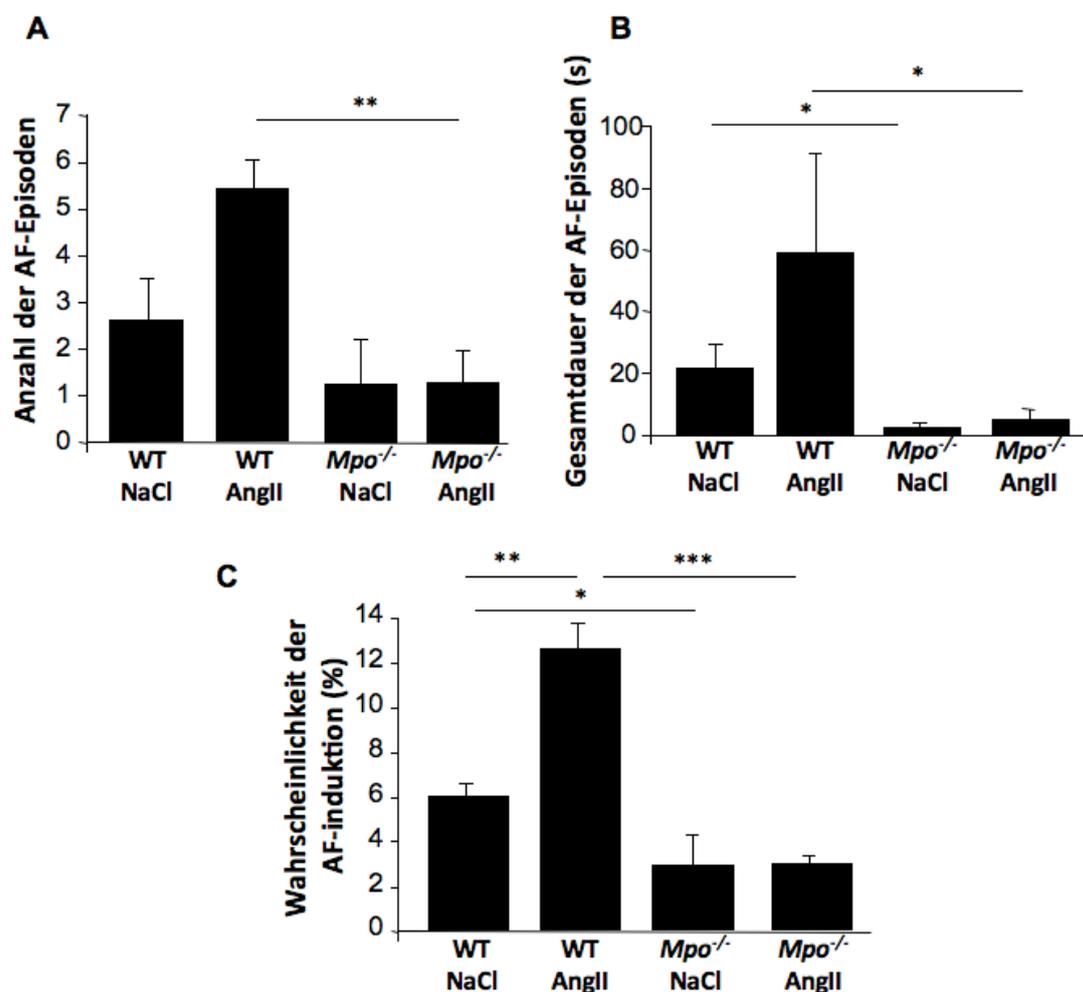


Abbildung 20: Elektrophysiologische Bestimmung der Vorhofflimmer-Vulnerabilität in WT und *Mpo*^{-/-} Tieren nach Ang II bzw. NaCl Behandlung (n=10-16) : A) Anzahl der Episoden an Vorhofflimmern. B) Gesamtdauer der Vorhofflimmer-Episoden. C) Wahrscheinlichkeit der Vorhofflimmer-Induzierbarkeit: Anzahl der Episoden / Anzahl der Stimulationsmanöver, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

WT Tiere unter Vorbehandlung mit Ang II als auch WT-Kontrolltiere zeigten generell eine erhöhte Anfälligkeit hinsichtlich Episodenzahl, -Dauer und -Wahrscheinlichkeit im Vergleich zu *Mpo*^{-/-} Tieren, welche weitgehend geschützt blieben vor der Entwicklung von Vorhofflimmern (Abb. 20).

Die Rekonstitution von MPO in unterschiedlichen Dosierungen durch intravenös liegende, osmotische Minipumpen führte in *Mpo*^{-/-} Tieren zu einer deutlichen, signifikanten Steigerung der Episodenzahl, Episodendauer und Wahrscheinlichkeit verglichen zum Ausgangswert und zu MPO-kompetenten Tieren, wobei eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen infundierter MPO und Vorhofflimmer-Vulnerabilität gezeigt werden konnte (Abb. 21, 22).

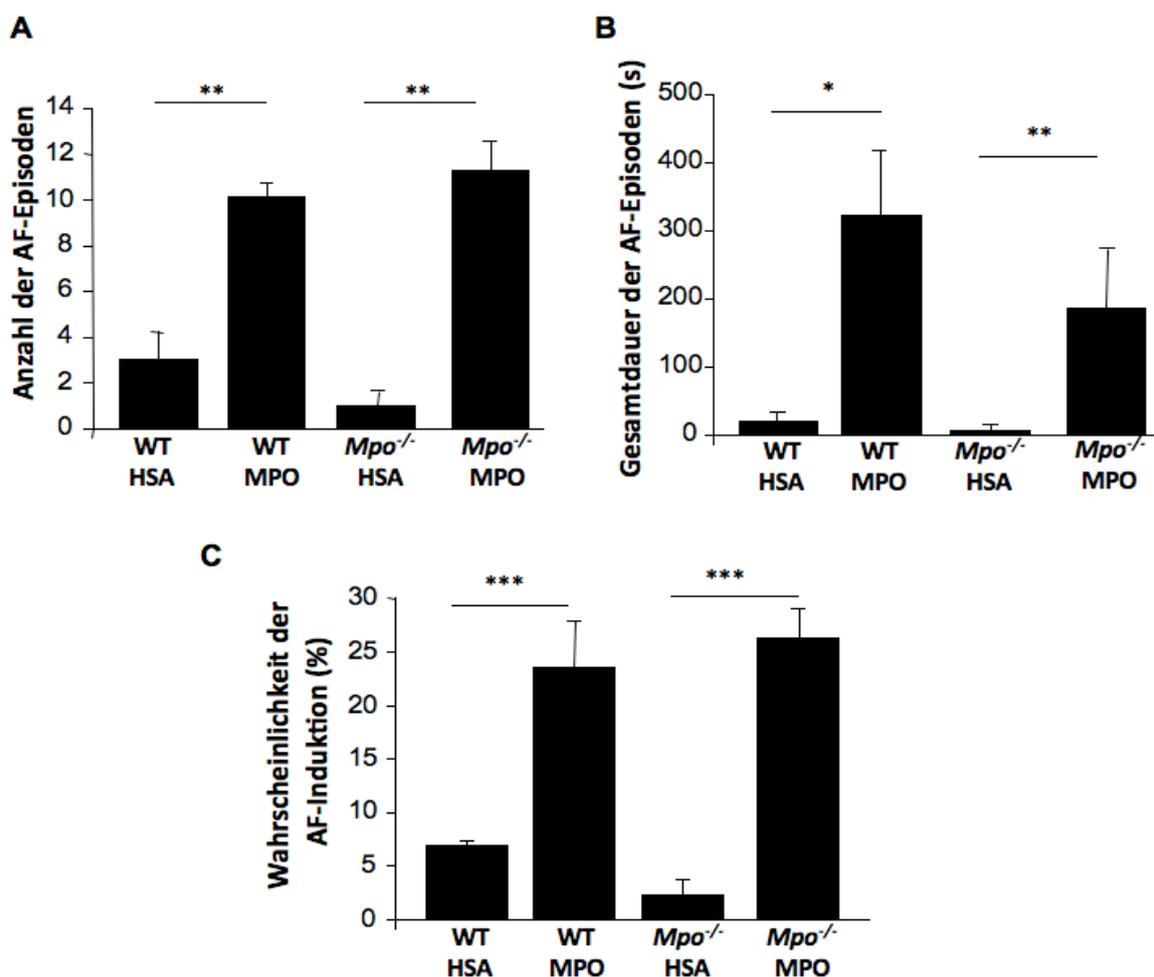


Abbildung 21: Elektrophysiologische Bestimmung der Vulnerabilität für Vorhofflimmern in WT und *Mpo*^{-/-} Tieren nach intravenöser MPO bzw. HSA Infusion (n=10-15): A) Anzahl der Episoden an Vorhofflimmern. B) Gesamtdauer der Vorhofflimmer-Episoden. C) Wahrscheinlichkeit der Vorhofflimmer-Induzierbarkeit: Anzahl der Episoden / Anzahl der Stimulationsmanöver, * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

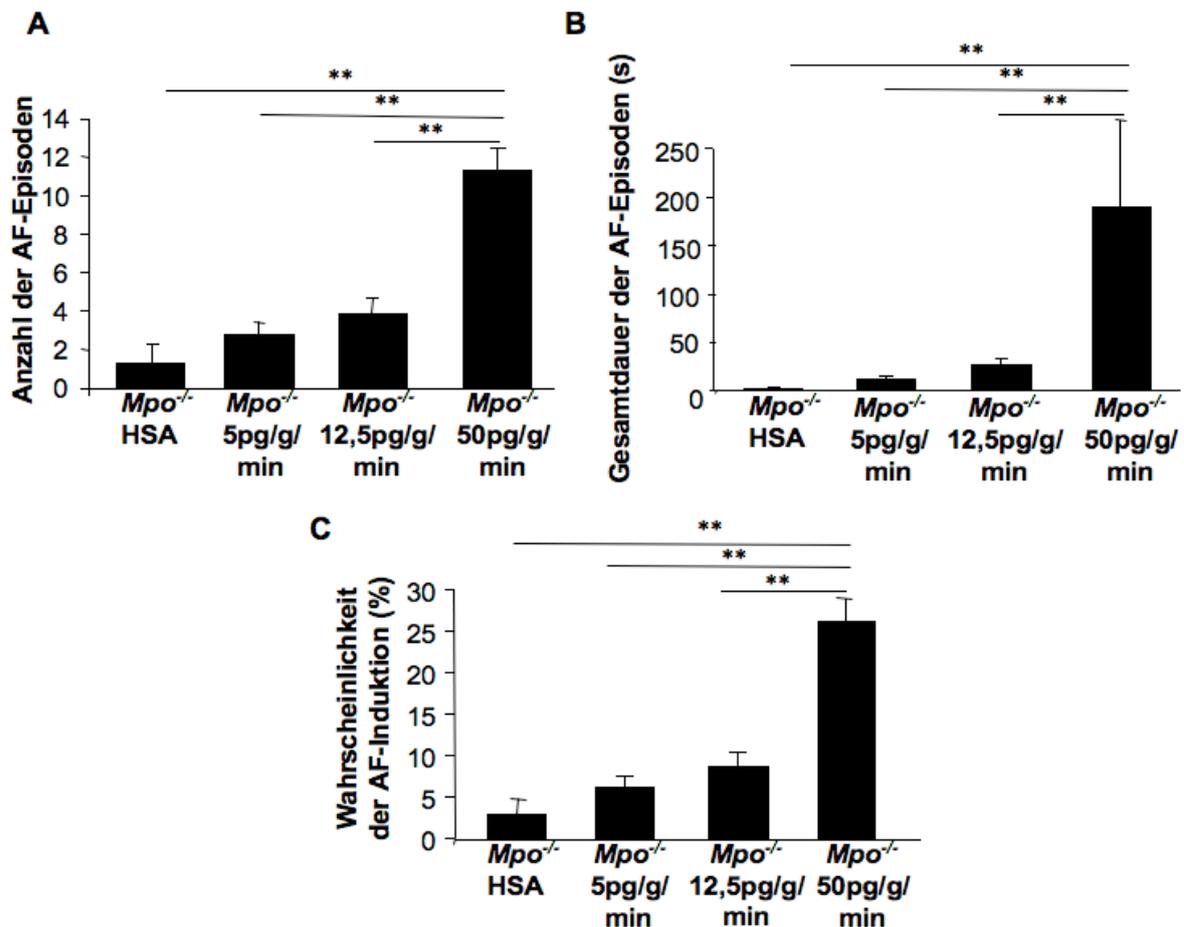


Abbildung 22: : Elektrophysiologische Bestimmung der Vulnerabilität für Vorhofflimmern in *Mpo*^{-/-} Tieren nach intravenöser Infusion von HSA bzw. ansteigenden Dosierungen von MPO ($n=10-15$): A) Anzahl der Episoden an Vorhofflimmern. B) Gesamtdauer der Vorhofflimmer-Episoden. C) Wahrscheinlichkeit der Vorhofflimmer-Induzierbarkeit: Anzahl der Episoden / Anzahl der Stimulationsmanöver, ** = $p < 0,01$.

4.2.10 Elektrophysiologisches Mapping

Die funktionelle und für die Entstehung von Vorhofflimmern prädisponierende Konsequenz einer gesteigerten Vorhoffibrose sind die Reduktion der atrialen Leitungsgeschwindigkeit sowie die elektrische Heterogenität des Vorhofmyokards¹⁰⁹, welche mittels epikardialer Mapping Untersuchung dargestellt werden konnten. Die Vorhöfe von *Mpo*^{-/-} Tieren zeigten im Gegensatz zu denen von WT Tieren nach Ang II Stimulation keine signifikante Reduktion der Leitungsgeschwindigkeit. Optisch imponierte zusätzlich ein homogener Verlauf der elektrischen Signale in *Mpo*^{-/-} Tieren, wohingegen die Erregungsfronten in Vorhöfen der Wildtypiere einen chaotischeren

Verlauf nahmen und benachbarte Myokardbereiche unterschiedlicher Konduktion imponierten (Abb. 23).

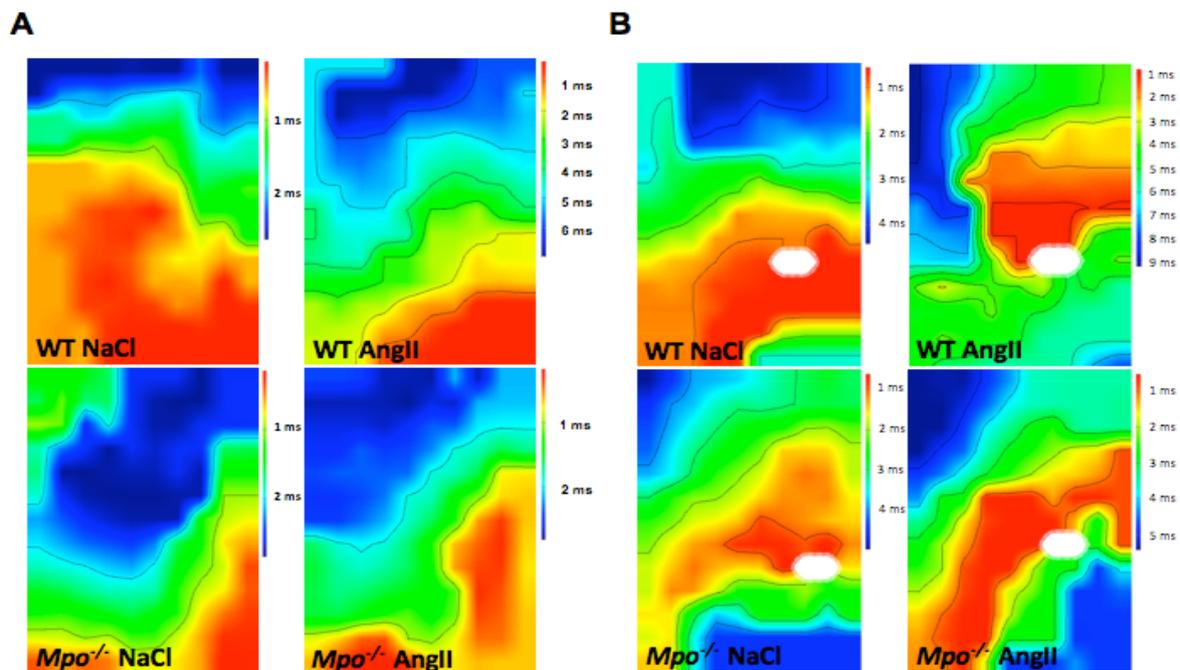


Abbildung 23: Epikardiale Mapping Untersuchung an Langendorff-perfundierten Herzen von WT und $Mpo^{-/-}$ Tieren nach Ang II bzw. NaCl Behandlung.

A) Repräsentative Beispiele der spontanen atrialen Leitungsgeschwindigkeiten.

B) Repräsentative Beispiele der stimulierten atrialen Leitungsgeschwindigkeiten.

In $Mpo^{-/-}$ Tieren führte Ang II Applikation im Gegensatz zu WT Tieren zu keiner Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit sowohl in longitudinaler als auch vektoraler Betrachtung. Die Homogenität des Erregungsverlaufs sowie seine Geschwindigkeit waren in $Mpo^{-/-}$ Tieren basal und nach Stimulation vergleichbar mit gesunden WT Tieren, wohingegen sich die elektrische Konduktion der WT-Ang II Gruppe mit typischen Zeichen einer spezifischen Verlangsamung, wie sie auch bei Vorhofflimmer-Patienten bekannt ist, präsentiert (Abb. 24).

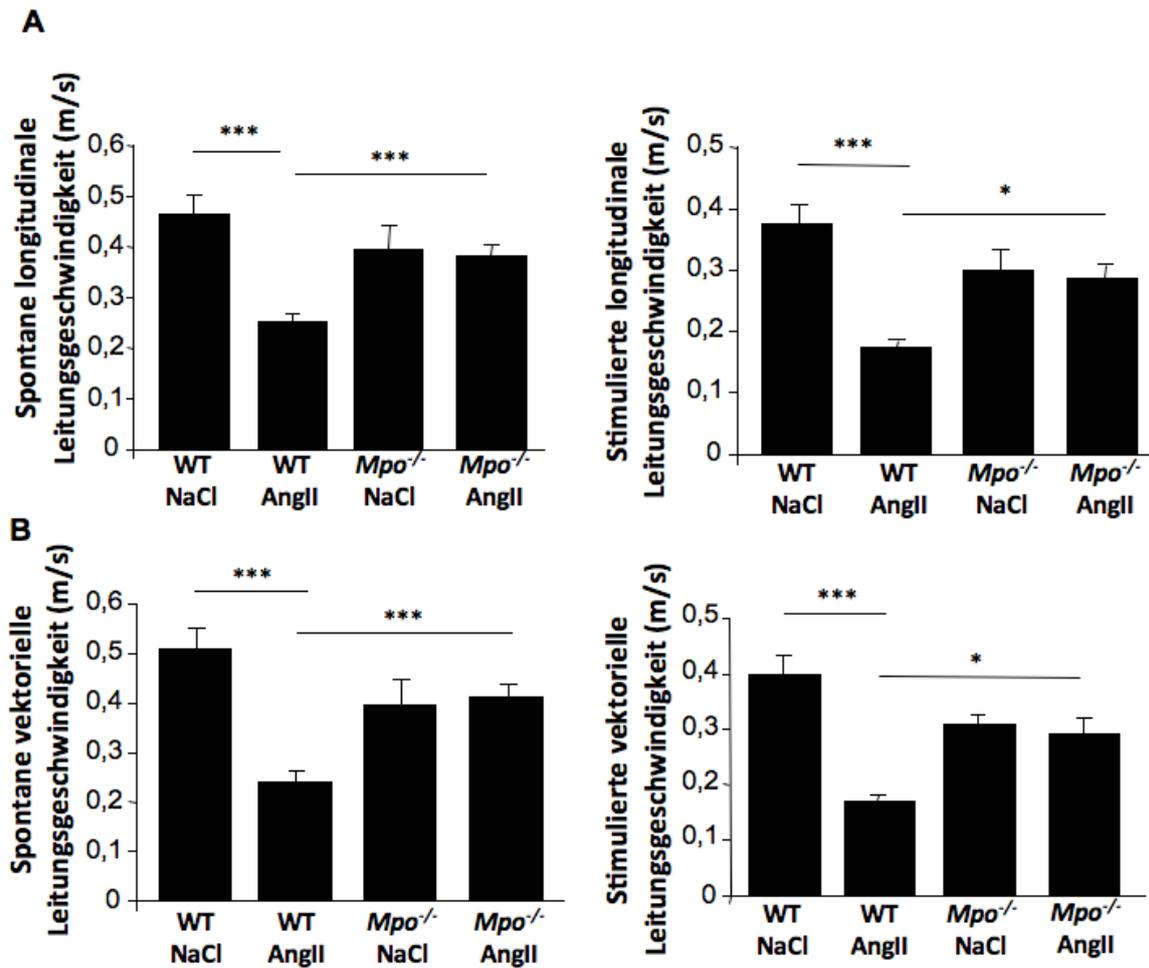


Abbildung 24: Quantifizierung der atrialen Leitungsgeschwindigkeiten mittels epikardialer Mapping Untersuchung ($n=5-13$ pro Gruppe) : A) Spontane und stimulierte longitudinale Leitungsgeschwindigkeit. B) Spontane und stimulierte vektorielle Leitungsgeschwindigkeit, * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$.

Zusammenfassung der humanen Ergebnisse

1. Patienten mit Vorhofflimmern besaßen erhöhte systemische Spiegel an MPO und Elastase.
2. Patienten mit Vorhofflimmern zeigten eine verschlechterte Endothelfunktion im Sinne einer verminderten flussabhängigen vaskulären Dilatation.
3. Patienten mit Vorhofflimmern zeigten eine gesteigerte atriale Deposition von MPO, Nitrotyrosin und Chlorotyrosin.

Zusammenfassung der tierexperimentellen Ergebnisse

1. Chronische Ang II Infusion führte in WT Tieren zu erhöhten systemischen Spiegeln an MPO und Elastase.
2. Stimulation mit Ang II resultierte in vermehrter MPO Deposition in Vorhöfen von WT Tieren.
3. Gesteigertes myokardiales Vorkommen an MPO führte zu gleichsam lokal erhöhtem Vorkommen an Chlorotyrosin.
4. Ang II – behandelte WT Tiere besaßen im Gegensatz zu *Mpo*^{-/-} Tieren vermehrte Aktivität von MMP-9 im Vorhof.
5. Die Infusion mit Ang II resultierte in gesteigerter atrialer Fibrosierung in WT Tieren - nicht in *Mpo*^{-/-} Tieren.
6. Die chronische, intravenöse Infusion von MPO in *Mpo*^{-/-} Tieren führte zu einer Zunahme atrialer Fibrose auf WT-Niveau.
7. WT Tiere zeigten nach Ang II Gabe im Gegensatz zu *Mpo*^{-/-} Tieren eine verlangsamte, heterogene elektrische Erregungsausbreitung innerhalb der Vorhöfe.
8. Mit Ang II behandelte WT Tiere besaßen eine gesteigerte Vulnerabilität für Vorhofflimmern – *Mpo*^{-/-} Tiere blieben vor Vorhofflimmern geschützt.
9. Die intravenöse Rekonstitution von MPO erhöhte die Anfälligkeit für Vorhofflimmern in *Mpo*^{-/-} Tieren auf WT - Niveau.

5. Diskussion

Die erhobenen Daten lassen die These zu, dass MPO eine kausale Rolle als Mediator des strukturellen Vorhofremodelings in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns spielt und unterstreichen damit die bislang unterschätzte Bedeutung inflammatorischer Vorgänge für die Initiierung und Perpetuierung der Erkrankung. Die tierexperimentellen Daten erlauben die Deutung, dass in strukturell und elektrisch zunächst unbeeinflusstem Vorhofmyokard durch akut einsetzende und sukzessiv gesteigerte MPO Bioverfügbarkeit, einerseits durch Angiotensin II – vermittelte Aktivierung von PMN, andererseits durch MPO Gabe selbst, ein struktureller Umwandlungsprozess initiiert wird, der kausal zur Entstehung des Vorhofflimmerns führt. Als weiterer Mechanismus muss diskutiert werden, dass bereits vorhandenes Vorhofflimmern - in Analogie zum klinischen Paradigma „*Atrial fibrillation begets atrial fibrillation*“ - zu einer sekundären Aktivierung von PMN und damit erhöhter atrialer MPO Aktivität führt. Somit kann angenommen werden, dass MPO sowohl primär als kausaler Faktor für die Entstehung, als auch sekundär für die Chronifizierung des Vorhofflimmerns eine Rolle spielt.

5.1 MPO als Mediator von Vorhoffibrose

Fibrose als wichtiger Bestandteil des strukturellen Remodelings ist in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns von zentraler Bedeutung. Die vorliegende Arbeit beweist, dass erhöhte atriale Akkumulation von MPO unabhängig vom Aktivierungszustand neutrophiler Granulozyten eine gesteigerte Fibrosierung des Vorhofes nach sich zieht.

Ein denkbarer Mechanismus, über den MPO diese Fibrose induzieren könnte, besteht in der vermehrten Chlorinierung extrazellulärer Matrixproteine durch das MPO-spezifische Reaktionsprodukt Chlorotyrosin, einem Indikator der MPO-Aktivität, nicht zuletzt da MPO selbst eine hohe Affinität zu Matrixproteinen besitzt⁹⁸.

Es ist denkbar, dass diese posttranslationale Proteinmodifikation einen gesteigerten Matrix-Umsatz, z.B. über MMPs, initiiert, der über vermehrte Kollagendeposition in einer erhöhten Anfälligkeit für Vorhofflimmern mündet. Sowohl in Patienten mit

Vorhofflimmern, als auch in Tieren, die eine erhöhte Anfälligkeit für Vorhofflimmern besaßen, konnten erhöhte lokale Spiegel von Chlorotyrosin sowie eine Kolo-kalisation mit MPO gezeigt werden.

MPO-abhängige MMP-Aktivierung induziert Vorhoffibrose:

Auf der Suche nach einem weiteren molekularen Mechanismus der MPO-vermittelten Fibrosierung ist Matrixmetalloproteinase eine besondere Relevanz zuzuschreiben, da bekannt ist, dass diese durch MPO beziehungsweise MPO-vermittelte Oxidation aktiviert werden ^{76,77}.

Im gesunden Myokard herrscht eine homogene Balance der Aktivierungszustände von MMPs und ihrer Inhibitoren TIMPs – durch Oxidation einer oder beider Proteingruppen kann diese essentielle Homöostase jedoch beeinflusst werden mit der Folge einer Dysregulation und konsekutiv gesteigerten Fibrosierung.

So führt erhöhte lokale Aktivität von MMP-9 erwiesenermaßen zu Vermehrung extrazellulärer Matrixproteine und Fibrose, was letztlich klinisch zu einem erhöhten Risiko für Vorhofflimmern führt ^{110,111}.

Die MPO-abhängige Generierung von HOCl im Vorhof bedarf in diesem Zusammenhang besonderer Beachtung, denn es ist bekannt, dass HOCl in der Lage ist, vermehrt Cysteinreste, beispielsweise an pro-MMP-7, zu oxidieren und auf diesem Wege eine gesteigerte Aktivierung herbeizuführen ^{76,112}.

Weiterhin konnte in-vitro gezeigt werden, dass HOCl mittels Chlorinierung von Aminosäuren des aktiven Zentrum der MMPs zu einer Inhibition des Enzyms führt ⁷⁷.

Ein zusätzlicher Weg über den HOCl profibrotische Eigenschaften vermittelt, ist die Inaktivierung von TIMPs über Oxidation von Thiolgruppen des Cysteins, so dass in Addition die genannten Mechanismen zu einem Missverhältnis aus Aktivierung und Inhibition dieser Enzymsysteme und folglich gestörtem myokardialen Remodeling führen ¹¹².

Die vorliegende Arbeit stellt diesen Zusammenhang erstmals in-vivo mit seiner klinischen Relevanz dar. So führte im Tierexperiment erhöhte atriale MPO-Deposition und Aktivität, damit erhöhtes Vorkommen von HOCl und Chlorotyrosin, zur Aktivierung von MMP-9 und folglich zum gesteigerten Umsatz von extrazellulären

Matrixproteinen und somit zur Fibrose. Der klinische Bezug wird weiterhin deutlich durch den Beweis erhöhter systemischer Spiegel von MPO sowie gesteigerten atrialen Gehaltes an MPO und Chlorotyrosin bei Patienten mit Vorhofflimmern.

Um in den Versuchstieren pathologisch erhöhte systemische und lokale Spiegel an MPO auf möglichst physiologischem Wege zu erzielen, wurde eine Angiotensin II-Infusion zur Aktivierung von Granulozyten gewählt. Diese künstlich gesteigerte Zunahme der Bioverfügbarkeit von Angiotensin II führte neben PMN-Aktivierung zu einer Erhöhung des Blutdruckes in Wildtyptieren.

Die Unabhängigkeit der MPO-assoziierten Anfälligkeit für Vorhofflimmern im Tiermodell von Angiotensin II-mediierter Blutdruckerhöhung ergibt sich aus der Behandlung von MPO-defizienten Tieren mit MPO – so führte diese MPO Rekonstitution nicht zu einer Erhöhung des systemischen Blutdruckes, wohl aber zu Fibrose und gleichsam gesteigerter Vulnerabilität für Vorhofflimmern. Der in Wildtyptieren unter Angiotensin II Behandlung observierte Anstieg des Blutdruckes scheint wiederum MPO-abhängig zu sein, denn Angiotensin II alleine erhöhte in MPO-defizienten Tieren den Blutdruck nicht. Ein denkbarer Mechanismus, der hier weitergehende Evaluation benötigt, ist eine potentielle Gegenregulation der über Angiotensin II und dessen Rezeptoren vermittelten Vasokonstriktion, die in der MPO-defizienten Maus eine bedeutendere Rolle spielt als im WT: Es könnte z.B. über Aktivierung oder gesteigerte Expression der eNOS oder iNOS eine konsekutive Erhöhung der vaskulären NO-Bioverfügbarkeit erfolgen. MPO könnte dieser Gegenregulation durch Konsumption von NO entgegenwirken und dadurch den Angiotensin II Effekt verstärken bzw. eine Angiotensin II-vermittelte Blutdruckerhöhung erst ermöglichen, was das Ausbleiben eines relevanten Blutdruckanstieges bei Abstinenz von MPO in entsprechenden Tieren erklären könnte.

Zusammenfassend beschreiben die erhobenen Befunde somit zwei unterschiedliche Mechanismen: Einerseits MPO-vermitteltes und Angiotensin II-unabhängiges strukturelles Vorhofremodeling, andererseits einen Aspekt der Blutdruckregulation, der das Zusammenspiel von MPO und Ang II benötigt.

Es kann anhand der erhobenen Daten nicht ausgeschlossen werden, dass trotz unveränderter Vorhofdiameter der in behandelten Wildtyp-Tieren detektierte Blutdruckanstieg per se einen Beitrag zu gesteigerter Fibrose leistet, beispielsweise im Sinne von Fibroblastenaktivierung durch mechanische Vorhofdehnung, deren subtile Ausprägung kompensiert bzw. makroskopisch nicht als Dilatation zu diagnostizieren ist. Neben der MMP-Regulation sind sicherlich weitere MPO-abhängige Reaktionen denkbar, die in MPO-kompetenten Tieren zu vermehrtem Vorhofflimmern führten: Gesteigerte kardiomyozytäre Apoptose durch MPO-abhängige Oxidation, Inaktivierung der myofibrillären Creatinkinase ¹¹³ und Inhibition des Inhibitors von α 1-Antitrypsin durch MPO-vermittelte Oxidation ¹¹⁴ sowie Inaktivierung von TIMPs sind hier zu nennen ¹¹².

5.2 Angiotensin II als Zytokin

Eine anerkannte Wirkung von Angiotensin II ist die Induktion von spezifischen zellulären Reaktionen wie Proliferation, Hypertrophie und Apoptose im Myokard ^{59,60,61}. Nach Bindung an kardiomyozytäre oder fibroblastische Angiotensin I und II Rezeptoren wird eine Signalkaskade über MAP-Kinasen durchlaufen, die nach Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die erwähnten zellulären Effekte hervorruft und somit profibrotisch wirkt ⁴¹.

Diese hormonelle Funktion des Angiotensins ist in-vitro bestätigt - die aktuellen tierexperimentellen Befunde zeigen jedoch, dass Angiotensin II Administration in MPO-defizienten Tieren nicht zu vermehrter Fibrose führt und klinisch nicht in Vorhofflimmern mündet. Vielmehr geben die Daten Anlass zu der Annahme, dass MPO als essentieller Co-Faktor in der Induktion der Angiotensin-spezifischen zellulären Wirkungen vonnöten ist.

Angiotensin II besitzt als bekannter Aktivator von Leukozyten zytokin-ähnliche Eigenschaften, so erfolgte im gewählten Versuchsaufbau die Aktivierung der PMN mit nachfolgender MPO-Freisetzung maßgeblich über Angiotensin II ⁷¹.

Die sowohl profibrotische als auch blutdrucksteigernde Wirkung von Angiotensin II war in-vivo ohne verfügbare MPO klinisch nicht existent. Dies unterstreicht die primäre Wirkung von Angiotensin II als Zytokin, denn die essentielle Wirkung über

Aktivierung von Leukozyten mit Mobilisation von MPO ist vonnöten, um eine klinische Konsequenz im Sinne Vorhofflimmerns bzw. erhöhten Blutdruckes zu erzielen. Besondere Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang der MPO-Freisetzung zu. Die beschriebene Wirkung von Angiotensin II als Zytokin über Aktivierung von PMN ist auch in MPO-defizienten Tieren vorhanden und resultiert z.B. in Generierung von ROS oder Interleukinen, jedoch ohne phänotypische Konsequenz wie Vorhofflimmern. Der entscheidende Mediator, dessen Wirkung unabhängig oder in Kombination mit Angiotensin erfolgen kann, ist hier also Myeloperoxidase.

5.3 Therapeutische Konsequenz

Die erhobenen Daten unterstreichen die Bedeutung inflammatorischer Vorgänge in der Pathogenese des Vorhofflimmerns - so könnten antiinflammatorische Ansätze in Zukunft einen festen Stellenwert neben etablierten antiarrhythmischen Therapieregimen erlangen. Erste teils erfolgversprechende Versuche einer präventiven medikamentösen Behandlung mit Kortikosteroiden zeigten eine signifikante Reduktion des Rezidiv-Risikos in Patienten mit erstmals aufgetretenem Vorhofflimmern und erfolgreicher Kardioversion. Die Gabe von Methylprednisolon über 3 Monate senkte das Rezidivrisiko auf 9,6 Prozent im Vergleich zu 50 Prozent unter Plazebo und reduzierte zusätzlich signifikant die Spiegel an hsCRP, einem bekannten Entzündungsmarker und Rezidiv-Prädiktor des Vorhofflimmerns ¹¹⁵. Die mangelnde Spezifität und das hohe Nebenwirkungsprofil von Kortikosteroiden stehen diesen Beobachtungen entgegen, so konnte dieses Therapieverfahren sich im klinischen Gebrauch bislang nicht durchsetzen.

Die gezielte pharmakologische Blockade der Myeloperoxidase wäre eine denkbare Alternative - die Entwicklung eines spezifischen MPO-Inhibitors befindet sich derzeit im Tierexperiment bzw. in präklinischer Phase. Bezug nehmend auf die vorliegenden Daten könnte auf diesem Wege beispielsweise im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe das strukturelle Vorhofremodeling positiv beeinflusst bzw. verhindert und die hohe postoperative Inzidenz an Vorhofflimmern gesenkt werden. Denkbar wäre

ebenfalls ein Einsatz in der medikamentösen Langzeittherapie von Vorhofflimmern oder präventiv im Sinne zusätzlicher Rezidivprophylaxe neben antiarrhythmischer Medikation. Die klinischen Folgen einer fehlenden MPO-Funktion scheinen hierbei keine relevante Rolle zu spielen, zumal humane MPO-Defizienz zu keinem Phänotypen und insbesondere zu keiner signifikanten Immundefizienz führt^{89,88}. In 5 % der Fälle humaner MPO-Defizienz wurde in klinischen Studien eine Assoziation mit Diabetes mellitus und vermehrter Inzidenz an *Candida albicans* Infektion beschrieben; eine relevante Anfälligkeit für bakterielle oder virale Infektionen besteht gemäß vorhandener Studienlage jedoch nicht.

Eine wichtige Frage stellt sich nach der Spezifität der Inhibition, so ist nicht auszuschließen, dass weitere Peroxidasen wie eosinophile Peroxidase, Lactoperoxidase und vor allem thyreoidale Peroxidase einer Beeinflussung unterliegen und sich daraus ein breiteres Nebenwirkungsspektrum ergibt.

5.4 Ausblick

Weiterführende Versuche in Zellkultur an Kardiomyozyten und Fibroblasten könnten die profibrotischen Eigenschaften der MPO zusätzlich charakterisieren. So könnten nach Inkubation der Zellen mit MPO beispielsweise Proliferation, Kollagen- und MMP-Expression betrachtet werden.

Die Bedeutung der Angiotensin-vermittelten MPO-Freisetzung nach Aktivierung von PMN kann fortführend evaluiert werden über orale Gabe eines Angiotensin-1-Rezeptor Inhibitors bei Wildtyptieren. So dürfte sich trotz subkutaner Angiotensin II Applikation bei Gabe eines AT1-Blockers die Vulnerabilität für Vorhofflimmern vermindern. Die Bedeutung des Angiotensin 1 Rezeptors für die Aktivierung von PMN und Vorhofflimmern könnte in diesem Ansatz analysiert werden.

Dem CD11b/CD18 Integrin ist eine wichtige Bedeutung in der PMN-Aktivierung zuzuordnen. Es existieren Versuchstiere, die durch genetische Veränderung kein CD11b/CD18 Integrin auf der Oberfläche der Granulozyten exprimieren können und somit eine reduzierte Aktivierbarkeit dieser Zellen aufweisen. Die Folge sollte ebenfalls eine verringerte Migration der PMN z.B. ins Myokard sein, so dass in Konsequenz auch eine geringere lokale MPO-Deposition und verminderte bzw.

ausgebliebene myokardiale Fibrosierung zu erwarten ist. Erste Versuche, die diesen denkbaren Schutz vor der Entwicklung von Vorhofflimmern bei CD11b/CD18-Defizienz sowie die Bedeutung der CD11b/CD18-abhängigen Aktivierung und Migration von PMN für Vorhofflimmern untersuchen, haben bereits begonnen. Es zeigt sich in Analogie zu den hier gezeigten Befunden eine verminderte Anfälligkeit für Vorhofflimmern während elektrophysiologischer Untersuchung sowie eine reduzierte Anzahl ins Vorhofmyokard migrierter Granulozyten im histologischen Nachweis für Tiere mit CD11b/CD18 – Defizienz im Vergleich zum WildtypTier.

Die erhobenen Daten der vorliegenden Arbeit gründen sich vor allem auf die katalytische Aktivität der MPO. Durch genetische Manipulation über Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum konnte katalytisch inaktivierte MPO generiert werden, deren intravenöse Infusion im Tiermodell zu keinerlei Strukturveränderung des Vorhofes und klinisch nicht vermehrt zu Vorhofflimmern führen sollte. Dieser Aspekt wurde bislang jedoch noch nicht untersucht bzw. experimentell bestätigt.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit untersuchte die Bedeutung des leukozytären Enzyms Myeloperoxidase in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns.

Molekulare Mechanismen, die zu sogenanntem elektrischen Remodeling sowie strukturellen Veränderungen des Vorhofmyokards führen, sind als Risikofaktoren für die Entstehung und Persistenz des Vorhofflimmerns etabliert und gut charakterisiert. Zusätzlich konnte in jüngerer Vergangenheit eine Kontribution inflammatorischer Vorgänge an pathophysiologischen Mechanismen des Vorhofflimmerns identifiziert werden – ein Ansatz, den diese Arbeit aufnimmt und unter besonderer Berücksichtigung von neutrophilen Granulozyten und MPO fortführt.

In einem tierexperimentellen Modell führte eine erhöhte systemische und lokale MPO Präsenz nach PMN Aktivierung über Angiotensin II zu posttranslationalen Proteinmodifikationen auf Vorhofebene und Aktivierung profibrotischer Enzymssysteme (Matrixmetalloproteinasen) mit konsekutiver Anreicherung von Kollagenen im Sinne einer Fibrosierung des Vorhofmyokards. Dieses sogenannte strukturelle Remodeling resultierte in einer gesteigerten Vulnerabilität für Vorhofflimmern während elektrophysiologischer Stimulation, wohingegen MPO Defizienz weder zu strukturellem Umbau des Vorhofmyokards, noch zu einer erhöhten Inzidenz an Vorhofflimmern führte.

Zur Translation dieser Befunde in das humane System und die Analyse ihrer klinischen Relevanz wurden in einem zweiten Ansatz Patienten mit und ohne Vorhofflimmern untersucht: Hier konnte eine Korrelation zwischen MPO Gehalt im Plasma sowie myokardialer MPO Deposition und der Inzidenz und Dauer von Vorhofflimmern gezeigt werden. Patienten mit positiver Vorhofflimmer-Anamnese besaßen erhöhte MPO-Plasmaspiegel, vermehrte MPO Deposition in den Vorhöfen sowie eine verminderte flussabhängige Dilatationsfähigkeit der Arteria brachialis als Maß gesteigerter NO Konsumption.

Die Studie beweist für neutrophile Granulozyten und im Speziellen für MPO eine kausale Beteiligung in der Initiierung und Perpetuierung des Vorhofflimmerns und trägt somit zu einem tieferen Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung bei. Zusätzlich zeigt sie dadurch potenzielle therapeutische Ansätze für die Zukunft auf,

die neben den klassischen, vorwiegend medikamentösen antiarrhythmischen Verfahren das Therapieregime um antiinflammatorische Konzepte erweitern könnten und somit der multifaktoriellen Genese des Vorhofflimmerns in erweitertem Maße gerecht werden würde.

7. Summary

Observational clinical and ex vivo studies have established a strong association between atrial fibrillation and inflammation. However, whether inflammation is the cause or the consequence of atrial fibrillation and which specific inflammatory mediators may increase the atria's susceptibility to fibrillation remain elusive. Here we provide experimental and clinical evidence for the mechanistic involvement of myeloperoxidase (MPO), a heme enzyme abundantly expressed by neutrophils, in the pathophysiology of atrial fibrillation. MPO-deficient mice pretreated with angiotensin II (AngII) to provoke leukocyte activation showed lower atrial tissue abundance of the MPO product 3-chlorotyrosine, reduced activity of matrix metalloproteinases and blunted atrial fibrosis as compared to wild-type mice. Upon right atrial electrophysiological stimulation, MPO-deficient mice were protected from atrial fibrillation, which was reversed when MPO was restored. Humans with atrial fibrillation had higher plasma concentrations of MPO and a larger MPO burden in right atrial tissue as compared to individuals devoid of atrial fibrillation. In the atria, MPO colocalized with markedly increased formation of 3-chlorotyrosine. Our data demonstrate that MPO is a crucial prerequisite for structural remodeling of the myocardium, leading to an increased vulnerability to atrial fibrillation.

8. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACS	Akutes Koronarsyndrom
AF	Vorhofflimmern (<i>Atrial Fibrillation</i>)
AHA	<i>American Heart Association</i>
Ang II	Angiotensin II
AP-1	Aktivator Protein-1
ARP	Atriale Refraktärzeit
AT 1 Rezeptor	Angiotensin-Rezeptor Typ 1
AVNRP	AV-Knoten Refraktärzeit
BSA	Bovines Serumalbumin
CABG	<i>Coronary Artery Bypass Graft</i>
ClTyr	Chlorotyrosin
CRP	C-reaktives Protein
Cx	Connexin
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
ESC	<i>European Society of Cardiology</i>
FMD	<i>Flow-mediated Dilatation</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HDL	<i>High-density Lipoprotein</i>
HSA	Humanes Serumalbumin
hsCRP	hochsensitives C-reaktives Protein
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül

IL	Interleukin
I _{Ca}	Kalzium-aktivierter Kaliumkanal
I _{K1}	<i>Inward rectifier</i> Kaliumkanal 1
I _{K, ACh}	Acetylcholin-abhängiger Kaliumkanal
I _{to}	transienter Kalium-Auswärtsstrom-Kanal
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LA	Linkes Atrium
LAA	Linkes Vorhofohr (<i>left atrial appendage</i>)
LC/MS/MS	Liquid-Chromatographie/Tandem-Massenspektrometrie
LDL	<i>Low-density</i> Lipoprotein
LV	Linker Ventrikel
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
MSA	Murines Serumalbumin
NMD	<i>Nitro-mediated Dilatation</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SKEZ	Sinusknotenerholungszeit
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases</i>

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tyr	Tyrosin
V.	Vena
VTI	Geschwindigkeits-/Zeit-Integral
WBP	Wenckebachpunkt
WT	Wildtyp

9. Literaturverzeichnis

1. Zipes, D. P. in *Braunwald's Heart Disease* 2008).
2. McMichael, J. History of atrial fibrillation 1628-1819 Harvey - de Senac - Laënnec. *Br Heart J* **48**, 193-197 (1982).
3. CUSHNY, A. R. & EDMUNDS, C. W. Paroxysmal Irregularity Op the Heart Amd Auricular Fibrillation. *The American Journal of the Medical Sciences* **133**, 66 (1907).
4. Lip, G. Y. & Beevers, D. G. ABC of atrial fibrillation. History, epidemiology, and importance of atrial fibrillation. *BMJ* **311**, 1361-1363 (1995).
5. Kannel, W. B., Abbott, R. D., Savage, D. D. & McNamara, P. M. Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study. *N Engl J Med* **306**, 1018-1022 (1982).
6. Tsang, T. S., Petty, G. W., Barnes, M. E., O'Fallon, W. M., *et al.* The prevalence of atrial fibrillation in incident stroke cases and matched population controls in Rochester, Minnesota: changes over three decades. *J Am Coll Cardiol* **42**, 93-100 (2003).
7. Nieuwlaat, R., Capucci, A., Camm, A. J., Olsson, S. B., *et al.* Atrial fibrillation management: a prospective survey in ESC member countries: the Euro Heart Survey on Atrial Fibrillation. *Eur Heart J* **26**, 2422-2434 (2005).
8. Zipes, D. P. in *Braunwald's Heart Disease* 2008).
9. Wang, T. J., Parise, H., Levy, D., D'Agostino, R. B., *et al.* Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *JAMA* **292**, 2471-2477 (2004).
10. Wang, T. J., Massaro, J. M., Levy, D., Vasan, R. S., *et al.* A risk score for predicting stroke or death in individuals with new-onset atrial fibrillation in the community: the Framingham Heart Study. *JAMA* **290**, 1049-1056 (2003).
11. Fuster, V., Rydén, L. E., Cannom, D. S., Crijns, H. J., *et al.* ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart

Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* **114**, e257-e354 (2006).

12. Sopher, S. M. & Camm, A. J. Atrial fibrillation: maintenance of sinus rhythm versus rate control. *Am J Cardiol* **77**, 24A-37A (1996).

13. Lévy, S., Novella, P., Ricard, P. & Paganelli, F. Paroxysmal atrial fibrillation: a need for classification. *J Cardiovasc Electrophysiol* **6**, 69-74 (1995).

14. Kourliouros, A., Savelieva, I., Kiotsekoglou, A., Jahangiri, M. & Camm, J. Current concepts in the pathogenesis of atrial fibrillation. *Am Heart J* **157**, 243-252 (2009).

15. Boos, C. J., Anderson, R. A. & Lip, G. Y. Is atrial fibrillation an inflammatory disorder? *Eur Heart J* **27**, 136-149 (2006).

16. Wijffels, M. C., Kirchhof, C. J., Dorland, R. & Allessie, M. A. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* **92**, 1954-1968 (1995).

17. Bosch, R. F., Grammer, J. B., Kühlkamp, V. & Seipel, L. [Electrical remodeling in atrial fibrillation--cellular and molecular mechanisms]. *Z Kardiol* **89**, 795-802 (2000).

18. Bosch, R. F., Scherer, C. R., Rüb, N., Wöhr, S., *et al.* Molecular mechanisms of early electrical remodeling: transcriptional downregulation of ion channel subunits reduces I(Ca,L) and I(to) in rapid atrial pacing in rabbits. *J Am Coll Cardiol* **41**, 858-869 (2003).

19. Li, G. R. & Nattel, S. Properties of human atrial I_{Ca} at physiological temperatures and relevance to action potential. *Am J Physiol* **272**, H227-H235 (1997).

20. Bosch, R. F., Zeng, X., Grammer, J. B., Popovic, K., *et al.* Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* **44**, 121-131 (1999).

21. Yue, L., Feng, J., Gaspo, R., Li, G. R., *et al.* Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res* **81**, 512-525 (1997).

22. Van Gelder, I. C., Brundel, B. J., Henning, R. H., Tuinenburg, A. E., *et al.* Alterations in gene expression of proteins involved in the calcium handling in patients with atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* **10**, 552-560 (1999).

23. Lai, L. P., Su, M. J., Lin, J. L., Lin, F. Y., *et al.* Down-regulation of L-type calcium channel and sarcoplasmic reticular Ca(2+)-ATPase mRNA in human atrial

fibrillation without significant change in the mRNA of ryanodine receptor, calsequestrin and phospholamban: an insight into the mechanism of atrial electrical remodeling. *J Am Coll Cardiol* **33**, 1231-1237 (1999).

24. Yue, L., Melnyk, P., Gaspo, R., Wang, Z. & Nattel, S. Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation. *Circ Res* **84**, 776-784 (1999).

25. Gaspo, R., Sun, H., Fareh, S., Levi, M., *et al.* Dihydropyridine and beta adrenergic receptor binding in dogs with tachycardia-induced atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* **42**, 434-442 (1999).

26. Van Wagoner, D. R., Pond, A. L., McCarthy, P. M., Trimmer, J. S. & Nerbonne, J. M. Outward K⁺ current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. *Circ Res* **80**, 772-781 (1997).

27. Dobrev, D., Graf, E., Wettwer, E., Himmel, H. M., *et al.* Molecular basis of downregulation of G-protein-coupled inward rectifying K(+) current (I(K,ACh) in chronic human atrial fibrillation: decrease in GIRK4 mRNA correlates with reduced I(K,ACh) and muscarinic receptor-mediated shortening of action potentials. *Circulation* **104**, 2551-2557 (2001).

28. Gutstein, D. E., Morley, G. E., Vaidya, D., Liu, F., *et al.* Heterogeneous expression of Gap junction channels in the heart leads to conduction defects and ventricular dysfunction. *Circulation* **104**, 1194-1199 (2001).

29. van der Velden, H. M., Ausma, J., Rook, M. B., Hellemons, A. J., *et al.* Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res* **46**, 476-486 (2000).

30. Hagedorff, A., Schumacher, B., Kirchhoff, S., Lüderitz, B. & Willecke, K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* **99**, 1508-1515 (1999).

31. Firouzi, M., Ramanna, H., Kok, B., Jongsma, H. J., *et al.* Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res* **95**, e29-e33 (2004).

32. Gollob, M. H., Jones, D. L., Krahn, A. D., Danis, L., *et al.* Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N Engl J Med* **354**, 2677-2688 (2006).

-
33. Nattel, S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* **415**, 219-226 (2002).
 34. Allessie, M., Ausma, J. & Schotten, U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* **54**, 230-246 (2002).
 35. Morillo, C. A., Klein, G. J., Jones, D. L. & Guiraudon, C. M. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional, and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation* **91**, 1588-1595 (1995).
 36. Thiedemann, K. U. & Ferrans, V. J. Left atrial ultrastructure in mitral valvular disease. *Am J Pathol* **89**, 575-604 (1977).
 37. Ausma, J., Wijffels, M., Thoné, F., Wouters, L., *et al.* Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* **96**, 3157-3163 (1997).
 38. Rücker-Martin, C., Pecker, F., Godreau, D. & Hatem, S. N. Dedifferentiation of atrial myocytes during atrial fibrillation: role of fibroblast proliferation in vitro. *Cardiovasc Res* **55**, 38-52 (2002).
 39. Aimé-Sempé, C., Folliguet, T., Rücker-Martin, C., Krajewska, M., *et al.* Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria. *J Am Coll Cardiol* **34**, 1577-1586 (1999).
 40. Lin, C. S., Lai, L. P., Lin, J. L., Sun, Y. L., *et al.* Increased expression of extracellular matrix proteins in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *Heart Rhythm* **4**, 938-949 (2007).
 41. Lin, C. S. & Pan, C. H. Regulatory mechanisms of atrial fibrotic remodeling in atrial fibrillation. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1489-1508 (2008).
 42. Nattel, S. & Opie, L. H. Controversies in atrial fibrillation. *The Lancet* **367**, 262-272 (2006).
 43. Xu, J., Cui, G., Esmailian, F., Plunkett, M., *et al.* Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation* **109**, 363-368 (2004).
 44. Burstein, B. & Nattel, S. Atrial structural remodeling as an antiarrhythmic target. *J Cardiovasc Pharmacol* **52**, 4-10 (2008).
 45. Nattel, S., Burstein, B. & Dobrev, D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **1**, 62-73 (2008).

-
46. Border, W. A. & Noble, N. A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* **331**, 1286-1292 (1994).
 47. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700 (2003).
 48. Spodick, D. H. Arrhythmias during acute pericarditis. A prospective study of 100 consecutive cases. *JAMA* **235**, 39-41 (1976).
 49. Bruins, P., te Velthuis, H., Yazdanbakhsh, A. P., Jansen, P. G., *et al.* Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia. *Circulation* **96**, 3542-3548 (1997).
 50. Sata, N., Hamada, N., Horinouchi, T., Amitani, S., *et al.* C-reactive protein and atrial fibrillation. Is inflammation a consequence or a cause of atrial fibrillation? *Jpn Heart J* **45**, 441-445 (2004).
 51. Fontes, M. L., Mathew, J. P., Rinder, H. M., Zelterman, D., *et al.* Atrial fibrillation after cardiac surgery/cardiopulmonary bypass is associated with monocyte activation. *Anesth Analg* **101**, 17-23, table of contents (2005).
 52. Conway, D. S., Buggins, P., Hughes, E. & Lip, G. Y. Prognostic significance of raised plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein in atrial fibrillation. *Am Heart J* **148**, 462-466 (2004).
 53. Siwik, D. A., Chang, D. L. & Colucci, W. S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* **86**, 1259-1265 (2000).
 54. Li, Y. Y., McTiernan, C. F. & Feldman, A. M. Proinflammatory cytokines regulate tissue inhibitors of metalloproteinases and disintegrin metalloproteinase in cardiac cells. *Cardiovasc Res* **42**, 162-172 (1999).
 55. Sarkar, S., Vellaichamy, E., Young, D. & Sen, S. Influence of cytokines and growth factors in ANG II-mediated collagen upregulation by fibroblasts in rats: role of myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H107-H117 (2004).
 56. Freestone, B., Beevers, D. G. & Lip, G. Y. The renin-angiotensin-aldosterone system in atrial fibrillation: a new therapeutic target? *J Hum Hypertens* **18**, 461-465 (2004).

-
57. Healey, J. S., Baranchuk, A., Crystal, E., Morillo, C. A., *et al.* Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* **45**, 1832-1839 (2005).
58. Madrid, A. H., Peng, J., Zamora, J., Marín, I., *et al.* The role of angiotensin receptor blockers and/or angiotensin converting enzyme inhibitors in the prevention of atrial fibrillation in patients with cardiovascular diseases: meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Pacing Clin Electrophysiol* **27**, 1405-1410 (2004).
59. Dostal, D. E., Hunt, R. A., Kule, C. E., Bhat, G. J., *et al.* Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function: intracardiac effects and signal transduction pathways. *J Mol Cell Cardiol* **29**, 2893-2902 (1997).
60. Sugden, P. H. & Clerk, A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* **9**, 337-351 (1997).
61. Ushio-Fukai, M., Alexander, R. W., Akers, M. & Griendling, K. K. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J Biol Chem* **273**, 15022-15029 (1998).
62. Berk, B. C. & Corson, M. A. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ Res* **80**, 607-616 (1997).
63. Hart, R. G., Benavente, O., McBride, R. & Pearce, L. A. Antithrombotic therapy to prevent stroke in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis. *Ann Intern Med* **131**, 492-501 (1999).
64. Haïssaguerre, M., Jaïs, P., Shah, D. C., Takahashi, A., *et al.* Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* **339**, 659-666 (1998).
65. Pappone, C., Oreto, G., Rosanio, S., Vicedomini, G., *et al.* Atrial electroanatomic remodeling after circumferential radiofrequency pulmonary vein ablation: efficacy of an anatomic approach in a large cohort of patients with atrial fibrillation. *Circulation* **104**, 2539-2544 (2001).
66. Haïssaguerre, M., Jaïs, P., Shah, D. C., Garrigue, S., *et al.* Electrophysiological end point for catheter ablation of atrial fibrillation initiated from multiple pulmonary venous foci. *Circulation* **101**, 1409-1417 (2000).

-
67. Haïssaguerre, M., Jaïs, P., Shah, D. C., Arentz, T., *et al.* Catheter ablation of chronic atrial fibrillation targeting the reinitiating triggers. *J Cardiovasc Electrophysiol* **11**, 2-10 (2000).
68. Cox, J. L., Schuessler, R. B., D'Agostino, H. J., Stone, C. M., *et al.* The surgical treatment of atrial fibrillation. III. Development of a definitive surgical procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg* **101**, 569-583 (1991).
69. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P. & Halbwachs-Mecarelli, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* **80**, 617-653 (2000).
70. Heit, B., Tavener, S., Raharjo, E. & Kubes, P. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol* **159**, 91-102 (2002).
71. El Bekay, R., Alvarez, M., Monteseirín, J., Alba, G., *et al.* Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. *Blood* **102**, 662-671 (2003).
72. El Bekay, R., Alba, G., Reyes, M. E., Chacón, P., *et al.* Rac2 GTPase activation by angiotensin II is modulated by Ca²⁺/calcineurin and mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J Mol Endocrinol* **39**, 351-363 (2007).
73. Hazan-Halevy, I., Levy, T., Wolak, T., Lubarsky, I., *et al.* Stimulation of NADPH oxidase by angiotensin II in human neutrophils is mediated by ERK, p38 MAP-kinase and cytosolic phospholipase A2. *J Hypertens* **23**, 1183-1190 (2005).
74. Jordan, J. E., Zhao, Z. Q. & Vinten-Johansen, J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **43**, 860-878 (1999).
75. Naruko, T., Ueda, M., Haze, K., van der Wal, A. C., *et al.* Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* **106**, 2894-2900 (2002).
76. Fu, X., Kassim, S. Y., Parks, W. C. & Heinecke, J. W. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* **276**, 41279-41287 (2001).
77. Fu, X., Kassim, S. Y., Parks, W. C. & Heinecke, J. W. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in

the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem* **278**, 28403-28409 (2003).

78. Klebanoff, S. J. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians* **111**, 383-389 (1999).

79. Daugherty, A., Dunn, J. L., Rateri, D. L. & Heinecke, J. W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **94**, 437-444 (1994).

80. Lau, D. & Baldus, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther* **111**, 16-26 (2006).

81. Harrison, J. E. & Schultz, J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* **251**, 1371-1374 (1976).

82. Hazen, S. L., Hsu, F. F., Mueller, D. M., Crowley, J. R. & Heinecke, J. W. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *J Clin Invest* **98**, 1283-1289 (1996).

83. Henderson, J. P., Byun, J. & Heinecke, J. W. Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes produces 5-chlorocytosine in bacterial RNA. *J Biol Chem* **274**, 33440-33448 (1999).

84. Domigan, N. M., Charlton, T. S., Duncan, M. W., Winterbourn, C. C. & Kettle, A. J. Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *J Biol Chem* **270**, 16542-16548 (1995).

85. Eiserich, J. P., Baldus, S., Brennan, M. L., Ma, W., *et al.* Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* **296**, 2391 (2002).

86. Eiserich, J. P., Hristova, M., Cross, C. E., Jones, A. D., *et al.* Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* **391**, 393-397 (1998).

87. Klebanoff, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* **77**, 598-625 (2005).

88. Parry, M. F., Root, R. K., Metcalf, J. A., Delaney, K. K., *et al.* Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* **95**, 293-301 (1981).

89. Lanza, F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med* **76**, 676-681 (1998).

-
90. Vita, J. A., Brennan, M. L., Gokce, N., Mann, S. A., *et al.* Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* **110**, 1134-1139 (2004).
91. Zhang, C., Reiter, C., Eiserich, J. P., Boersma, B., *et al.* L-arginine chlorination products inhibit endothelial nitric oxide production. *J Biol Chem* **276**, 27159-27165 (2001).
92. Baldus, S., Heeschen, C., Meinertz, T., Zeiher, A. M., *et al.* Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **108**, 1440-1445 (2003).
93. Rudolph, V., Rudolph, T. K., Hennings, J. C., Blankenberg, S., *et al.* Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic Biol Med* **43**, 1189-1196 (2007).
94. Brennan, M. L., Penn, M. S., Van Lente, F., Nambi, V., *et al.* Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med* **349**, 1595-1604 (2003).
95. Meuwese, M. C., Stroes, E. S., Hazen, S. L., van Miert, J. N., *et al.* Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *J Am Coll Cardiol* **50**, 159-165 (2007).
96. Goldmann, B. U., Rudolph, V., Rudolph, T. K., Holle, A. K., *et al.* Neutrophil activation precedes myocardial injury in patients with acute myocardial infarction. *Free Radic Biol Med* **47**, 79-83 (2009).
97. Baldus, S., Heitzer, T., Eiserich, J. P., Lau, D., *et al.* Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* **37**, 902-911 (2004).
98. Baldus, S., Eiserich, J. P., Mani, A., Castro, L., *et al.* Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest* **108**, 1759-1770 (2001).
99. Vissers, M. C. & Thomas, C. Hypochlorous acid disrupts the adhesive properties of subendothelial matrix. *Free Radic Biol Med* **23**, 401-411 (1997).
100. Leeuwenburgh, C., Hardy, M. M., Hazen, S. L., Wagner, P., *et al.* Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem* **272**, 1433-1436 (1997).

-
101. Sugiyama, S., Kugiyama, K., Aikawa, M., Nakamura, S., *et al.* Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1309-1314 (2004).
102. Vasilyev, N., Williams, T., Brennan, M. L., Unzek, S., *et al.* Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation* **112**, 2812-2820 (2005).
103. Askari, A. T., Brennan, M. L., Zhou, X., Drinko, J., *et al.* Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *Journal of Experimental Medicine* **197**, 615 (2003).
104. Matthijsen, R. A., Huugen, D., Hoebbers, N. T., de Vries, B., *et al.* Myeloperoxidase is critically involved in the induction of organ damage after renal ischemia reperfusion. *Am J Pathol* **171**, 1743-1752 (2007).
105. Johansson, M. W., Patarroyo, M., Oberg, F., Siegbahn, A. & Nilsson, K. Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). *J Cell Sci* **110** (Pt 9), 1133-1139 (1997).
106. Zheng, L., Nukuna, B., Brennan, M. L., Sun, M., *et al.* Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* **114**, 529-541 (2004).
107. Coronel, R., Wilms-Schopman, F. J., de Groot, J. R., Janse, M. J., *et al.* Laplacian electrograms and the interpretation of complex ventricular activation patterns during ventricular fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* **11**, 1119-1128 (2000).
108. van Rijen, H. V., Eckardt, D., Degen, J., Theis, M., *et al.* Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation* **109**, 1048-1055 (2004).
109. Verheule, S., Sato, T., Everett, T., Engle, S. K., *et al.* Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res* **94**, 1458-1465 (2004).
110. Polyakova, V., Miyagawa, S., Szalay, Z., Risteli, J. & Kostin, S. Atrial extracellular matrix remodelling in patients with atrial fibrillation. *J Cell Mol Med* **12**, 189-208 (2008).

-
111. Chen, C. L., Huang, S. K., Lin, J. L., Lai, L. P., *et al.* Upregulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol* **45**, 742-753 (2008).
112. Wang, Y., Rosen, H., Madtes, D. K., Shao, B., *et al.* Myeloperoxidase inactivates TIMP-1 by oxidizing its N-terminal cysteine residue: an oxidative mechanism for regulating proteolysis during inflammation. *J Biol Chem* **282**, 31826-31834 (2007).
113. Mihm, M. J., Yu, F., Carnes, C. A., Reiser, P. J., *et al.* Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* **104**, 174-180 (2001).
114. Desrochers, P. E., Mookhtiar, K., Van Wart, H. E., Hasty, K. A. & Weiss, S. J. Proteolytic inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor and alpha 1-antichymotrypsin by oxidatively activated human neutrophil metalloproteinases. *J Biol Chem* **267**, 5005-5012 (1992).
115. Dernellis, J. & Panaretou, M. Relationship between C-reactive protein concentrations during glucocorticoid therapy and recurrent atrial fibrillation. *Eur Heart J* **25**, 1100-1107 (2004).

Publikationen

1. Rudolph, V., Steven, D., Gehling, U. M., Goldmann, B., *et al.* Coronary plaque injury triggers neutrophil activation in patients with coronary artery disease. *Free Radic Biol Med* **42**, 460-465 (2007).
2. Steven, D., Rostock, T., Lutomsky, B., Klemm, H., *et al.* What is the real atrial fibrillation burden after catheter ablation of atrial fibrillation? A prospective rhythm analysis in pacemaker patients with continuous atrial monitoring. *Eur Heart J* **29**, 1037-1042 (2008).
3. Rudolph, V., Andrić, R., Rudolph, T.K., Friedrichs, K., *et al.* Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nat. Med.* 6(4):470-4 (2010)

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: