

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Universitären Herzzentrum Hamburg

Klinik für Allgemeine und Interventionelle Kardiologie

Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. med. Thomas Meinertz

Regulation der Endothelfunktion durch das leukozytäre Hämprotein Myeloperoxidase

Dissertation

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

vorgelegt von:

Anja Coym

aus Hamburg

Hamburg 2011

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.02.2011

Veröffentlicht mit der Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD. Dr. K. Sydow

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. W. Fiedler

Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2	Einleitung	2
2.1	Myeloperoxidase	2
2.1.1	Historisches	2
2.1.2	Struktur	3
2.1.3	Reaktionen	5
2.2	Stickstoffmonoxid	9
2.3	Nikotin	11
3	Material und Methoden	13
3.1	Materialien	13
3.1.1	Chemikalien	13
3.1.2	Puffer und Lösungen	13
3.1.3	Antikörper	14
3.1.4	Reaktionskits	15
3.1.5	Verbrauchsmaterial und Geräte	15
3.1.6	Computerprogramme	16
3.2	Methoden	17
3.2.1	Studiendesign	17
3.2.2	Probandenakquise	17
3.2.3	Procedere	18
3.3	Probengewinnung und Aufarbeitung	18
3.3.1	Plasmagewinnung	19
3.3.2	Isolierung der neutophilen Granulozyten	19
3.3.3	Bestimmung der MPO-Plasmaspiegel	20
3.3.4	Proteinbestimmung	21
3.3.5	Western Blot	21
3.3.6	MPO-Aktivitätsmessung	23
3.3.7	MMP-9	23
3.3.8	Nitrit-Bestimmung	24
3.3.9	Nikotin-Bestimmung	25

3.4	Ultraschalluntersuchung der A. brachialis	26
3.4.1	Flow Mediated Dilatation (FMD)	26
3.4.2	Nitroglycerin Mediated Dilatation (NMD)	27
3.4.3	Auswertung	28
3.5	Bestimmung des Myeloperoxidase-Index (MPXI)	29
3.6	Genanalyse	30
3.7	Statistik	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Demographische Variablen	33
4.2	Endothelfunktion	34
4.3	MPO in neutrophilen Granulozyten	36
4.4	MPO-Aktivität	37
4.5	MPO-Plasmaspiegel	38
4.6	MMP-9-Plasmaspiegel	39
4.7	Nikotin-Plasmaspiegel	40
4.8	Nitrit-Plasmaspiegel	41
4.9	Korrelationsanalyse	42
4.10	Genanalyse	43
5	Diskussion	44
6	Zusammenfassung	52
7	Literaturverzeichnis	53
8	Danksagung	59
9	Lebenslauf	60
10	Abkürzungsverzeichnis	61
11	Eidesstattliche Erklärung	63

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Dieses Forschungsprojekt beschäftigt sich mit dem Einfluss der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und der von ihnen sezernierten Myeloperoxidase (MPO) auf das Gefäßsystem, bzw. den Gefäßtonus.

Die zugrunde liegende Hypothese unserer Arbeit ist, dass die Aktivierung von PMN durch die Ausschüttung von MPO zu einer Verschlechterung der endothelialen Funktion führt.

Es handelt sich um eine Querschnittsstudie mit Probanden, die eine verminderte Myeloperoxidase Aktivität aufweisen (einfachheitshalber werden diese nachfolgend als MPO-Defiziente bezeichnet) und einer „gematchten“ Kontrollgruppe. Nach Nikotin Applikation zur Aktivierung der PMN sollen, unserer Hypothese zufolge, die MPO-Defizienten Probanden eine weniger ausgeprägte Verschlechterung der Gefäßfunktion aufweisen.

Im Folgenden sollen die Grundlagen und die wichtigsten Elemente dieses Projekts dargestellt werden.

2 Einleitung

2.1 Myeloperoxidase

2.1.1 Historisches

MPO wurde lange Zeit als wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr vermutet, da ein großer Anteil der Myeloperoxidase (MPO) in neutrophilen Granulozyten aufzufinden ist und sie die Entstehung von potenten Oxidantien katalysiert.

Die ersten Studien bezüglich Peroxidasen wurden in den zwanziger Jahren von G. S. Graham veröffentlicht. In seinem Artikel "The neutrophilic granules of the circulating blood in health and in disease" [Graham et al. 1920] machte er auf die Reduzierung der Granula bei Aktivierung neutrophiler Granulozyten aufmerksam und zwar in Abhängigkeit der Menge der Bakterieneinschlüsse.

Anfang der vierziger Jahre isolierte K. Agner die Myeloperoxidase und stellte fest, dass sie in Konzentrationen von 1-2% des Trockengewichtes der Zellen vorhanden ist [Agner et al. 1941]. Anfänglich nannte Agner sie aufgrund ihrer grünen Farbe Verdoperoxidase, dieser Name wurde jedoch bald in Myeloperoxidase umgeändert.

Nachfolgende Studien zeigten, dass MPO eines der aus den Granulozyten freigesetzten Enzyme ist [Lau et al. 2006]. Sie wird während der Degranulation in die Phagosomen sezerniert oder während der Entstehung eines Phagosoms vollständig aus der Zelle herausgeleitet. Letzteres ist nach Antikörperstimulation festgestellt worden. Die Studien zu dieser Zeit beschäftigten sich fast ausschließlich mit dem Einfluss der Peroxidase auf das Immunsystem. Allerdings wurde gleichzeitig festgestellt, dass MPO, wenn aus der Zelle sezerniert, an negativ geladene Oberflächen wie biologische Membranen bindet.

In den sechziger Jahren wurde dann der Zusammenhang zwischen MPO, seinem Cosubstrat Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und seiner katalytischen Aktivität weiter untersucht und als ein starkes antimikrobielles System in neutrophilen Granulozyten beschrieben [Klebanoff et al. 2005].

Der Einfluss der MPO auf das Immunsystem wird auch heute noch in vielen Arbeitsgruppen diskutiert. Aratani et al. zeigte, dass MPO-Defiziente Mäuse auf eine Infektion mit Fungi wie *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* mit einer schwächeren Immunantwort reagieren als Wildtyp-Mäuse. Interessanterweise leiden MPO-Defiziente Menschen nicht häufiger an Infektionen [Aratani et al. 2004].

Im Laufe der Jahre wurde man mehr und mehr auf die Bedeutung der MPO in Bezug auf die Initiation und Progression der Atherosklerose aufmerksam und konnte diesen Zusammenhang nachweisen [Nikpoor et al. 2001, Carr et al. 2000].

2.1.2 Struktur

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Hämprotein, hauptsächlich vorhanden in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Subtypen von Gewebsmakrophagen (u. a. Kupferzellen der Leber). Sie macht bis zu 5% des Gesamtproteingehalts von Granulozyten aus [Nicholls et al. 2005, Heinecke et al. 1999].

MPO ist das Produkt eines Genes, das auf dem langen Arm des Chromosoms 17 in Segment q12-24 lokalisiert ist. Es handelt sich um ein ~ 11kb großes Gen mit 11 Introns und 12 Exons. Das initiale Translationsprodukt dieses Gens ist ein Protein, das durch Proteolyse und Glykolysierung in ein enzymatisch inaktives apoproMPO umgewandelt wird. Dieses bildet im endoplasmatischen Retikulum mit den Calcium bindenden Proteinen Calreticulin und Calnexin einen Komplex. Calreticulin und Calnexin dienen dabei als Chaperone [Williams et al. 1995]. Der Komplex wird durch Insertion eines Häms in die enzymatisch aktive Form des MPO, das so genannte proMPO, konvertiert. Nach weiterer Proteolyse und Generierung von schweren α -Untereinheiten und leichten β -

Untereinheiten, bildet sich ein schwer-leicht Protomer: die reife MPO. Seine molekulare Masse beträgt ~150kD. Die schweren α -Untereinheiten sind mit Disulfid-Brücken untereinander gebunden. Die mannosereichen Kohlenhydrate und die zwei Hämoleküle sind kovalent an die schweren Untereinheiten gebunden [Klebanoff et al. 2005, Olsen et al. 1984].

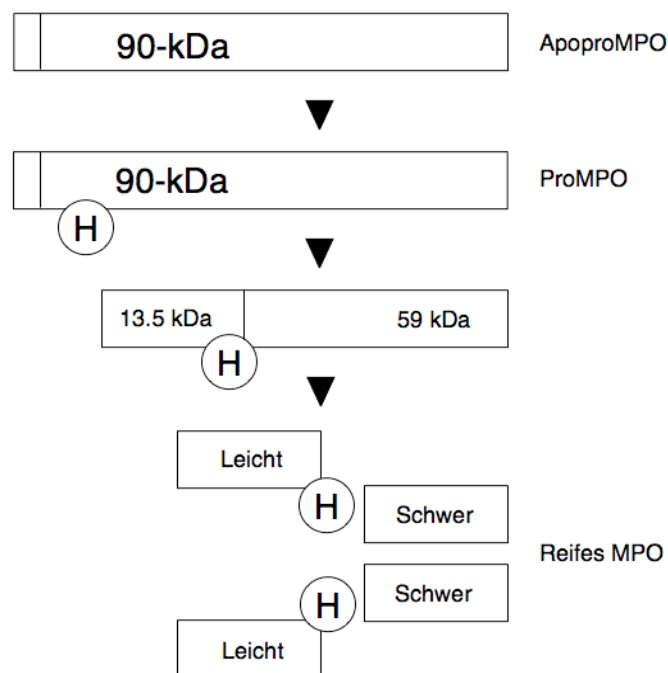


Abbildung 1: Nach Nauseef et al. 1998. Die proteolytische Entwicklung von ApoproMPO bis hin zum reifen MPO mit Einbau der Hämoleküle (H). kDa : Kilodalton.

Da MPO stark kationisch geladen ist, mit einem isoelektrischen Punkt > 10 , bindet es effektiv an anionisch geladene Proteine bzw. Oberflächen. Diese Bindungsfähigkeit ermöglichen Heparin-Bindungsstellen, die an Glykosaminoglykane binden.

Die MPO-Defizienz wurde erstmals 1954 von P. und A. Alius beschrieben [Petrides et al. 1998]. Es kann sich um eine totale oder subtotale Defizienz handeln, welche in einer Häufigkeit von 1: 2000-4000 auftritt [Nicholls et al.

2005, Kizaki et al. 1994]. Sowohl hereditäre als auch erworbene Defizienzen sind beschrieben, wobei die erbliche häufiger vorkommt. Die erworbene MPO Defizienz ist meist nur partiell ausgeprägt und nur bei einem Teil der neutrophilen Granulozyten vorhanden. Verschiedene Umstände scheinen zu einer erworbenen Defizienz führen zu können, unter anderem Schwangerschaft, Bleivergiftung und Eisenmangel. Die Ursache liegt hier wahrscheinlich in der Hemmung der Häm-Synthese [Kutter et al. 1998, Lanza et al. 1998].

Hereditäre Defizienzen werden autosomal rezessiv vererbt und können durch verschiedene Mutationen verursacht werden. Es handelt sich um verschiedene Allel Kombinationen. Einige Polymorphismen sind beschrieben [Marchetti et al. 2004]:

R569W, Y173C, R449C, M251T, A332V, D371G, G501S, L572W.

Der am häufigsten identifizierte Polymorphismus ist bislang ein Austausch von Arginin mit Tryptophan auf dem Codon 569 (R569W). Der Reifungsprozess der MPO wird hierbei gestört, so dass das Stadium der apopro-MPO nicht überschritten wird, es also in einer enzymatisch inaktiven Form persistiert [Nauseef et al. 2004, Hansson et al. 2006].

Ein Weiterer ist der Austausch von Tyrosin mit Cystein auf dem Codon 173 (Y173C). In diesem Fall wird apopro-MPO in das pro-MPO konvertiert, jedoch liegt ein Fehler in der Proteinfaltung vor, so dass es sich nicht zum reifen MPO weiterentwickeln kann.

Es sind zusätzlich Mutationen bekannt, die die Reifung der MPO zulassen, aber ihre enzymatische Aktivität einschränken [Lanza et al. 1998].

2.1.3 Reaktionen

MPO ist, wie bereits erwähnt, ein basisches Protein und bindet schnell an negativ geladene Flächen. Es kann die in neutrophilen Granulozyten aufgenommenen Mikroorganismen umhüllen oder, wenn es aus der Zelle herausgeschleust wird, an biologische Membranen binden. Allerdings kann es außerhalb der Zelle im nicht gebundenen Zustand, z.B. durch Makrophagen in der extrazellulären Flüssigkeit, inaktiviert werden. Durch Bindung an den

Mannoserezeptor können die Makrophagen das Protein phagozytieren [Klebanoff et al. 2005].

Im Beisein seines Cosubstrats H_2O_2 wird MPO oxidiert. Es durchläuft eine 2-Elektronen Reaktion und wird in seine reaktive Form umgewandelt (Compound I). Um in seine Ausgangsform zurückzugelangen, reagiert es unter anderem mit Halogenen, wobei hier Chlorid im Vordergrund steht; einfach auf Grund der Tatsache, dass es physiologisch in der größten Konzentration vorliegt. Alternativ kann diese Reaktion mit anderen Halogeniden oder auch Nitrit (NO_2^-) ablaufen [Nicholls et al. 2005].

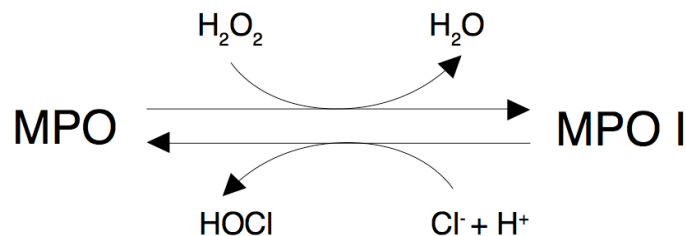


Abbildung 2: Die durch die katalytische Aktivität des MPO ablaufende 2-Elektronen Reaktion von MPO zu MPO I (= Compound I) und beispielhaft die Rückreaktion mit Chlorid.

Bei einer Neutrophilenaktivierung wird neben Hydrogenperoxid und Superoxid auch MPO in die Phagosomen und den extrazellulären Raum ausgeschüttet [Baldus et al. 2004]; hier läuft die oben beschriebene Reaktion ab: Die Myeloperoxidase katalysiert zusammen mit ihrem Substrat H_2O_2 die Bildung von HOCl (Abb.2) [Eiserich et al. 2002]. HOCl ist ein Anteil der Bleiche, die bakterizid und antiviral wirkt [Nicholls et al. 2005]. In vitro konnte so die immunkompetente Wirkung der Myeloperoxidase bewiesen werden; es stellte sich jedoch heraus, dass in vivo mit MPO-Defizienten Mäusen keine Immunsuppression nachgewiesen werden konnte [Eiserich et al. 2002].

Neben der oben beschriebenen Reaktion besteht eine alternative Möglichkeit des Compound I in die Ausgangsform zurückzureagieren. Hier geht das Compound I zwei aufeinander folgende Ein-Elektron Reduktionen ein, wobei

niedermolekulare Reduktionsmittel oxidiert werden, z. B. Tyrosin. Die hier gebildeten Radikale (u. a. Tyrosyl-Radikale) können direkt mit NO reagieren, wodurch Nitrit (NO_2^-) gebildet und NO dementsprechend abgebaut wird. Bei diesen Reaktionen entsteht das so genannte Compound II.

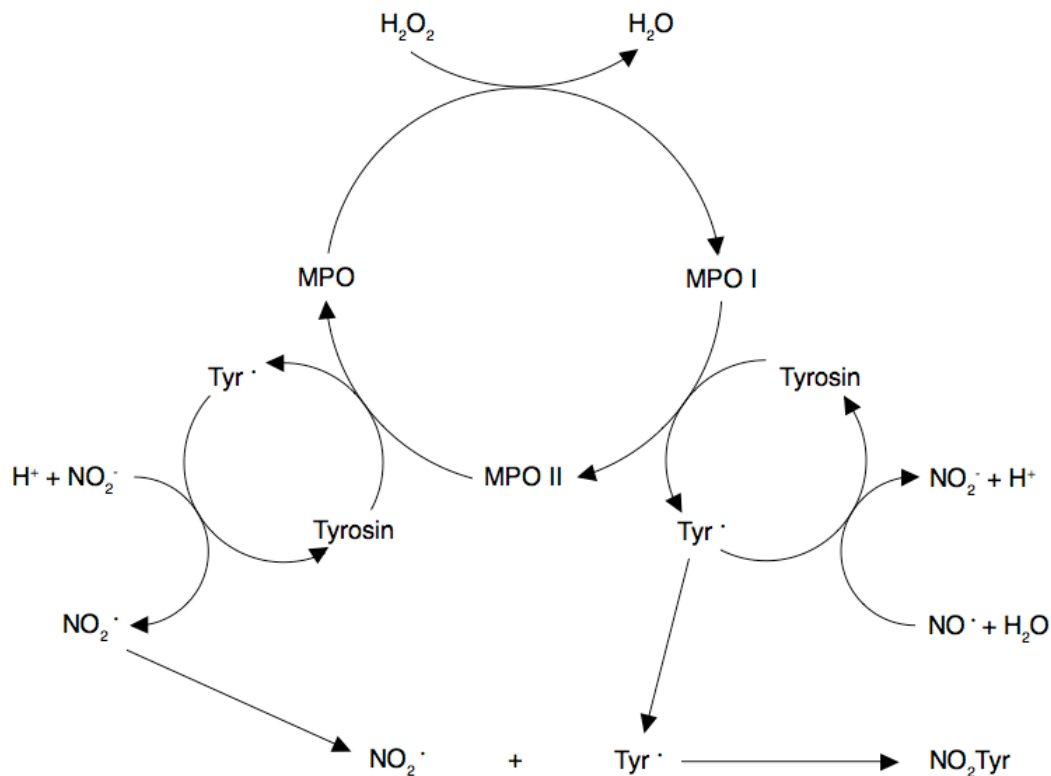


Abbildung 3: Der große Reaktionskreislauf der durch MPO katalysierten Reaktionen: Zwei 1-Elektron Reaktionen über MPO II (= Compound II) zur Ausgangsform. Beispielhaft wird die NO Konsumption anhand der Reaktion mit Tyrosin verdeutlicht. H_2O_2 : Wasserstoffperoxid, NO_2^- : Nitrit, NO_2 : Stickstoffdioxid, NO_2Tyr : Nitrotyrosin.

Im Nagermodell wurde nachgewiesen, dass nach Aktivierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) – z. B. im Rahmen eines Inflammationsprozesses – MPO aus den azurophilen Granula in die Blutbahn freigesetzt wird und durch elektrostatische Wechselwirkungen mit Heparan-Glykosaminoglykane an Endothelzellen bindet. Mittels Transzytose gelangt MPO, das weiterhin katalytisch aktiv ist, in den subendothelialen Raum. Dort

reagiert es mit seinem Cosubstrat und moduliert die NO abhängige Signalkaskade, indem das aus dem Endothel stammende NO katalytisch abgebaut wird. Aus NO entsteht durch Oxidation Nitrit, welches dann weitere Reaktionen eingehen kann, wodurch Stickstoffdioxid entsteht (Abb. 3) [Klebanoff et al. 2005, Baldus et al. 2001].

Der Einfluss dieser Reaktionen konnte von Eiserich et al. in „MPO, a Leukozyte-Derived Vascular NO Oxidase“ [Eiserich et al. 2002] gezeigt werden: Im hier verwendeten Nagermodell zeigte sich, dass nach Injektion von Lipopolysacchariden – ein Bakterien-Zellwand-Anteil, folglich eine PMN Aktivierung – MPO-Defiziente Mäuse im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keine Verschlechterung der Endothelfunktion aufweisen. Ergo, MPO hat einen direkten Einfluss auf die Gefäßfunktion im Sinne einer Verschlechterung im Tiermodell.

Diese beschriebenen Vorgänge haben klinische Relevanz: 2004 konnte von Baldus et al. gezeigt werden, dass eine NO abhängige Zunahme des Unterarm-Blutflusses bei KHK Patienten invers mit dem MPO Plasmaspiegel korreliert [Baldus et al. 2004].

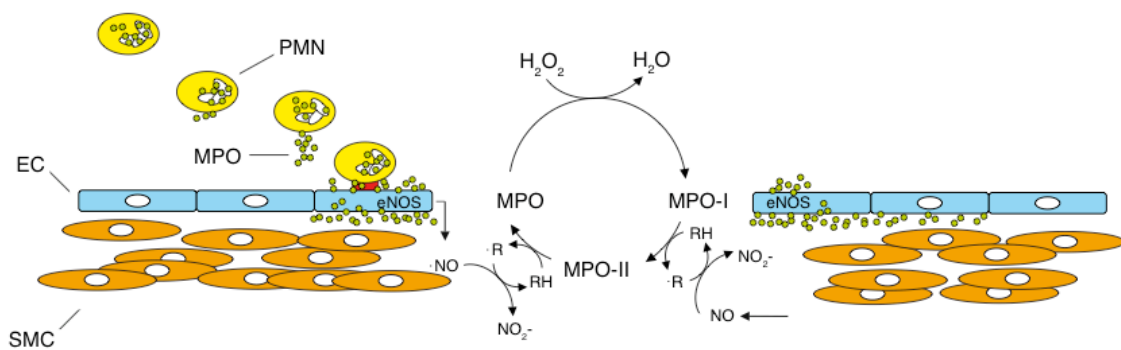


Abbildung 4: Nach Baldus et al. (2004) Schematische Darstellung des komplexen Geschehens bei PMN Aktivierung in Bezug auf den Gefäßtonus: Degranulation, Transzytose und subendotheliale NO-Konsumption. EC: Endothelzelle, SMC: glatte Muskelzelle, eNOS: endotheliale NO-Synthase, PMN: polymorphkernige neutrophile Granulozyten, R: Radikal. NO: Stickstoffmonoxid, H₂O₂: Wasserstoffperoxid, NO₂⁻: Nitrit.

Die Auswirkungen der durch MPO katalysierten Reaktionen, führen nicht nur zu verminderter Bioverfügbarkeit von NO mit konsekutiv aggravierter endothelialer Dysfunktion. Strukturelle Veränderungen des Gefäßes werden begünstigt durch ein anderes Reaktionsprodukt von MPO, HOCl und Stickstoffdioxid. Sie begünstigen die Entstehung von Nitrotyrosin [Lau et al. 2006].

Die Oxidation von Lipoproteinen durch HOCl oder Nitrotyrosin führt dazu, dass LDL durch Makrophagen bevorzugt aufgenommen wird und HDL seine antiinflammatorischen Eigenschaften verliert. HOCl vermittelte Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen begünstigt das Aufbrechen der Deckplatte des Plaques und begünstigt damit die Plaqueruptur [Fu et al. 2001]. Damit übt MPO durch Oxidation von NO sowohl auf die humorale Gefäßintegrität detrimentalere Effekte aus als auch durch posttranslationale Proteinmodifikation auf die strukturelle Integrität.

2.2 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid ist ein wichtiges inter- und intrazelluläres Signalmolekül. Es ist ein Radikal, das u. a. in Endothelzellen gebildet wird. Es wirkt vasodilatatorisch, indem es die benachbarten glatten Muskelzellen relaxiert und auch die Proliferation der glatten Muskelzellen inhibiert [Kubes et al. 1991].

Eine weitere wichtige Funktion ist der antiinflammatorische Effekt des NO [Moncada et al. 1993]. Es inhibiert Leukozytenaktivierung durch Herunterregulierung von endothelialen Adhäsionsmolekülen. Gleichzeitig hemmt es die Thrombozyten Aggregation und Adhäsion an Endothelzellen [Diodati et al. 1998, Radomski et al. 1987].

Der Reiz zur Freisetzung des Stickstoffmonoxids kann durch verschiedene Mediatoren ausgelöst werden, z. B. Histamin und Bradykinin oder auch durch Scherstress [Deanfield et al. 2007].

NO wird mittels NO-Synthasen (NOS) hergestellt, von der drei Subtypen bekannt sind. Es handelt sich um Oxidoreduktasen, deren drei Isoformen sich endotheliale (eNOS), neuronale (nNOS) und induzierbare (iNOS) NO-Synthase

nennen. Die beiden erstgenannten werden konstitutiv exprimiert und bei Erhöhung der Ca^{2+} /Calmodulin Konzentration aktiviert [Corretti et al. 2002]. Die iNOS hingegen, die in Zellen des Immunsystems vorkommt, wird von verschiedenen Cytokinen und anderen Stimuli aktiviert. Mit Hilfe dieser Synthesen wird aus Arginin über N-Hydroxy-Arginin und Citrullin Stickstoffmonoxid generiert.

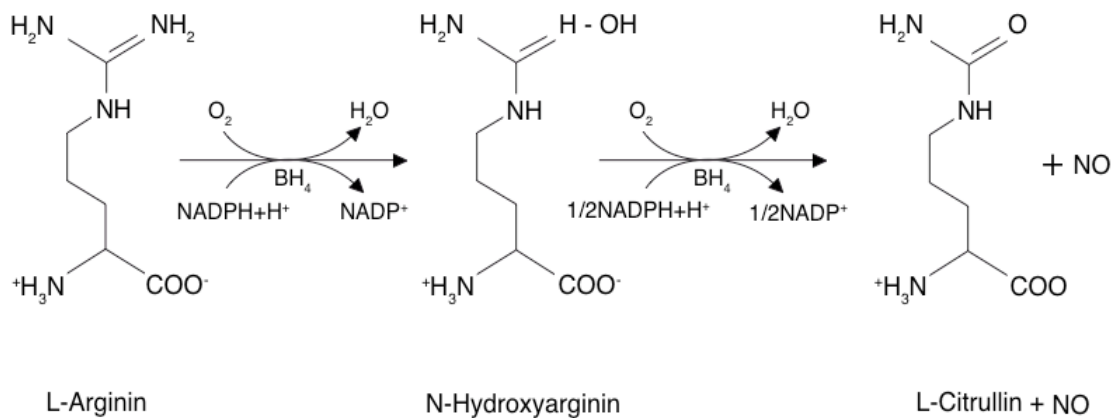


Abbildung 5: Schematische Darstellung der NO-Biosynthese. Dieser Reaktionen-Komplex wird von der NO Synthase katalysiert. BH_4 : Tetrahydrobiopterin.

Die Lebensdauer des NO beträgt 2-30 Sekunden, trotzdem ist die Reichweite recht groß, da es leicht durch Gewebe diffundiert. NO vermittelt die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur über folgende Reaktionskette: NO wird in Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen durch eNOS gebildet. Als potenter Vasodilatator und Gefäßrelaxans diffundiert es in die benachbarten glatten Muskelzellen und aktiviert dort die lösliche Guanylatzyklase. Diese führt zu einer gesteigerten Produktion von zyklischem Guanosinmonophosphat ($\text{GTP} \rightarrow 3', 5' - \text{cyclo} - \text{GMP} + \text{Pyrophosphat}$, katalysiert durch die Guanylatzyklase) und aktiviert die Ionenkanäle sowie die cGMP abhängigen Kinasen. Bei diesen Kinasen handelt es sich um Serin- und Threoninkinasen (MAPK); diese kommen vor allem in glatten Muskelzellen, Thrombozyten und im Kleinhirn vor.

Sie beeinflussen die intrazelluläre Calciumkonzentration und führen so zu einer Relaxation der glatten Muskulatur.

Da NO ein chemisch sehr instabiles Gas ist und rasch zerfällt, reagiert es, sobald die Möglichkeit dazu besteht, mit ungepaarten Elektronen anderer Verbindungen. Aus Sauerstoff abgeleitete freie Radikale reagieren mit NO, welches so in seiner Bioverfügbarkeit eingeschränkt wird. Der hauptverantwortliche Mechanismus scheint die schnelle Reaktion von NO mit Superoxid zu sein [Baldus et al. 2004].

MPO hat, wie bereits oben erwähnt, ebenfalls Einfluss auf die endotheliale Bioverfügbarkeit von NO: Im Nagermodell konnte 2001 gezeigt werden, dass bei akuter Inflammation, MPO, intraluminal freigesetzt von aktivierten PMN, in die subendotheliale Matrix übertritt und dort im Beisein von H_2O_2 katalytisch das aus dem Endothel freigesetzte NO abbaut [Baldus et al. 2004, 2001].

2.3 Nikotin

Nikotin ($C_{10}H_{14}N_2$) ist ein vor allem in der Tabakpflanze vorkommendes Alkaloid; genau genommen ein Nervengift. Es hat eine agonistische Wirkung auf nikotinerge Acetylcholinrezeptoren, die unter anderem an parasymphatischen und sympathischen Ganglien, an motorischen Endplatten und auch an Immunzellen lokalisiert sind. Die Bindung des Nikotins führt zu einer unspezifischen Permeabilitätserhöhung für Kationen und folglich zu einer Depolarisation der Zelle.

Nikotin fördert die Ausschüttung von Adrenalin, Dopamin und Serotonin. Gleichzeitig führt es zu einer Steigerung der Herzfrequenz sowie des Blutdrucks; zusätzlich sinken Hautwiderstand und Hauttemperatur.

Durch die kleine Größe und den lipophilen Charakter des Nikotins kann es Membranen direkt durchdringen, ohne dass eine Rezeptormediation notwendig

ist; das heißt, Nikotin bindet zwar an die oben genannten Rezeptoren, wirkt aber ebenfalls durch Diffusion.

Nikotin ist durch seine Effekte auf das Gefäß selbst und die zirkulierenden inflammatorischen Mediatoren ein potenter Stimulus der vaskulären Inflammation. Im Tiermodell hat sich gezeigt, dass Nikotin zu strukturellen Schädigungen der aortalen Endothelzellen führt. An Menschen konnte dies so jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Allerdings weiß man, dass Zigarettenrauch einen direkten toxischen Effekt auf humane Endothelzellen hat [Zeiger et al. 1995] und die endotheliale Prostacyclin Produktion reduziert [Reinders et al. 1986].

Nikotin interagiert mit den Neutrophilen über cholinerge und nichtcholinerge Rezeptoren. Es scheint, dass beide Rezeptoren bei einer Nikotin vermittelten PMN Funktionsmodulation involviert sind. Es hat sich gezeigt, dass Tabakrauch die Rezeptorexpression an der PMN-Oberfläche dosisabhängig induziert. In einer Studie von Iho et al. wurde die Tatsache, dass Raucher zu Leukozytosen (v. a. Granulozytosen) neigen, näher untersucht und der Zusammenhang zwischen Nikotin und der Interleukin 8 Ausschüttung beschrieben: Sowohl in vivo als auch in vitro Versuche zeigten, dass erhöhte IL 8 Parameter – die bekanntermaßen mit Neutrophilie vergesellschaftet sind – vor allem bei Rauchern/Nikotineinfluss bestanden. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass diese Neutrophilie im gleichen Ausmaß auftrat, wie nach Stimulation der Leukozyten mit LPS [Iho et al. 2003]. Dies erlaubt den Rückschluss, dass Nikotin durch direkte Aktivierung von Neutrophilen eine wesentliche proinflammatorische Potenz besitzt.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

- Aceton: Merck (Darmstadt)
- Dextran von leuconostoc mesenteroides: Sigma
- EDTA: Sigma
- Glycin: Merck (Darmstadt)
- HBSS: Invitrogen
- Histopaque-1077: Sigma
- Methanol: Merck (Darmstadt)
- Natriumchlorid-Lösung 0,9%: BBraun (Melsungen)
- N,N Dimethylformamid: Sigma
- Triton X-100: Sigma
- PFB-Bromid: Sigma
- Protease-Inhibitor Complete: Roche (Mannheim)

3.1.2 Puffer und Lösungen

- Block-Puffer: 5 mg Magermilchpulver
auf 100
ml TBST
- Blotting-Puffer: 3,03 g/l Tris, 14,4 g/l
Glycin, 20% Methanol
- ECL-Lösung: PIERCE Biotechnology
(Rockford, IL, USA)
- H₂O₂-Lösung: 11 µl H₂O₂ (30%) ad 10 ml
Aqua dest.

- Laemmli: 250 mM Tris HCl (pH 6,8),
9,2% (w/v) SDS, 40%
Glycerol, 0,2% (w/v)
Bromphenolblau
- Lysepuffer: 1 Tablette Protease-
Inhibitor, 0,1% Triton X-
100 ad 10 ml NaH₂PO₄
(100 mM)
- SDS-PAGE Laufpuffer: 3,0 g/l Tris, 14,4 g/l
Glycin, 0,744 g /l EDTA,
0,6 g/l SDS
- TBS: 24,2 g Tris Base, 80g
NaCL ad 1000 ml Aqua
millipore (pH 7,6)
- TBST: 100 ml TBS ad 1000 ml
aqua dest., 1 ml Tween-20
- TMB-Lösung: 4,8 mg TMB (3,3,5,5-
Tetramethylbenzidin,
98%) ad 1 ml N,N-
Dimethylformamid (99%)

3.1.3 Antikörper

- Anti-MPO-Antikörper: Prognostix (Cleveland,
OH, USA)
- MMP-9-Antikörper: Quantikine, R&D Systems
(Minneapolis, MN, USA)
- Erstantikörper:
 - Anti-MPO-Antikörper: Calbiochem (San Diego,
CA, USA)

- Zweitantikörper:
 - IgG, Anit-Rabbit mit Peroxidase: Calbiochem (San Diego, CA, USA)

3.1.4 Reaktionskits

- Big Dye Termination kit: ABI (Weiterstadt)
- DNA Kit: Qiagen (Hilden)
- MPO ELISA: Calbiochem (San Diego, CA, USA)
- MMP-9 ELISA: Quantikine, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
- PIERCE BCA-Protein Assay Kit: PIERCE, Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)

3.1.5 Verbrauchsmaterial und Geräte

- Gaschromatograph (CP-3800): Varian (Darmstadt)
- Heparin: Roche (Mannheim)
- Massenspektrometer: Varian (Darmstadt)
- Nikotinkaugummi: Nicorette 4 mg (Neuss)
- Nitrolingual-Nitroglyzerin-Spray: Pohls-Boskamp (Hohenlockstedt)
- PAGEr Precast Gel: Lonza (Rockland, ME, USA)
- 1,5 ml Safe-Lock Tubes: Eppendorf (Hamburg)
- S-Monovetten: Sarstedt (Nürnbrecht)
- Sonografiegerät: Siemens (München)
- Taq-Polymerase: PeqLab (Erlangen)

- Technichon H1 Hematology Analyzer: Bayer (Tarrytown, NY, USA)
- Ultraschallgel Caeser & Loretz (Hilden)

3.1.6 Computerprogramme

- Brachial Analyzer: Medical Imaging Applications LLC (Iowa, USA)
- Mass Spectrometry Workstation: Varian (Darmstadt)
- Scan Pack: Biometra (Göttingen)
- Vascular Imager: Medical Imaging Applications LLC (Iowa, USA)

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden 45 freiwillige Probanden untersucht: 15 MPO-Defiziente und 30 Probanden als gematchte Kontrollgruppe.

Alle Teilnehmer unterzogen sich jeweils an einem Tag den gleichen Untersuchungen.

Von allen Probanden wurden persönliche Daten aufgenommen und anschließend anonymisiert. Nach ausführlicher Aufklärung über die Bedeutung sowie die Inhalte der Studie unterschrieb jeder Proband eine Einverständniserklärung.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg (Aktenzeichen: OB/IX/03) akzeptiert.

3.2.2 Probandenakquise

Zwischen dem Jahr 2002 und 2005 erfolgte aus Routineblutentnahmen – die von den Patienten für Forschungszwecke freigegeben wurden – ein Screening von 12135 Patienten im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf auf Peroxidase-Aktivität mittels dem Technicon H1 Hematology Analyzer von Bayer. Hierbei konnten 30 Patienten mit verminderter Peroxidase-Aktivität identifiziert werden. Eingeschlossen wurden lediglich Individuen mit einem Myeloperoxidase-Index (MPXI) von < -15 [Kutter D 1998]. Ausschlusskriterien waren: akute schwere Erkrankungen, akute Infektionen, vorliegende Schwangerschaft, Alter unter 18 Jahre und Nikotin-Allergie.

Nach telefonischer Kontaktaufnahme konnten schließlich 15 Probanden in die Studie eingeschlossen werden. Alle wurden in das Universitäre Herzzentrum Hamburg einbestellt.

Zu jedem der Peroxidase-defizienten Probanden wurden zwei gematchte Kontrollprobanden akquiriert. Die folgenden Faktoren wurden einbezogen:

- Geschlecht
- Altersgruppe
- Raucherstatus
- Gefäßerkrankungen

3.2.3 Procedere

Es wurden zwei Blutentnahmen durchgeführt – vor und nach Konsum eines Nikotinkaugummi – sowie jeweils zwei Ultraschalluntersuchungen der A. brachialis. Beide Ultraschalluntersuchungen wurden erst ohne, dann nach einem Hub Nitroglyzerin sublingual durchgeführt. Die Probanden waren während des gesamten Untersuchungszeitraums nüchtern.

Nach der ersten Blutentnahme und Ultraschalluntersuchung pausierten die Patienten für 2 Stunden (um den Abbau des Nitroglyzerins zu gewährleisten), dann erhielten sie das Nikotinkaugummi, auf dem sie eine halbe Stunde kauen sollten. Direkt im Anschluss folgten die zweite Blutentnahme und Ultraschalluntersuchung.

3.3 Probengewinnung und Aufarbeitung

Die erste Blutentnahme beinhaltete ein Blutprofil mit kleinem Blutbild, Kreatinin, CRP und den Lipiden; diese Parameter wurden vom Zentrallabor bestimmt.

Neben den Monovetten für das Zentrallabor wurden NH_4 Heparin, EDTA und Serum Monovetten zur Gewinnung des Plasmas abgenommen. Zusätzlich wurde eine Perfusorspritze mit Heparin versetzt, in die zwischen 10 und 40 ml Blut abgenommen wurden, dieses Blut wurde zur Isolierung der neutrophilen Granulozyten genutzt.

3.3.1 Plasmagewinnung

Nach Abnahme der genannten Monovetten wurden diese bei 1000 rcf zentrifugiert und das gewonnene Plasma zuerst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C verwahrt.

3.3.2 Isolierung der neutrophilen Granulozyten

Aus dem heparinisierten Blut der Perfusorspritze wurden die neutrophilen Granulozyten isoliert. Hierzu wurde das gewonnene Blut in Dextranlösung überführt. Nach einer Wartezeit von etwa 45 Minuten konnte der Überstand des aufgetrennten Blutes in 15 ml Histopaque 1077, SIGMA (Raumtemperatur) pipettiert werden. Dies wurde dann in einer Zentrifuge für 30 Minuten bei 600 rcf und einer Temperatur von 23°C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde verworfen und das zurückgebliebene Pellet mit zwei Hüben Aqua millipore zur Lyse versetzt und anschließend mit NaCl 0,9% auf 40 ml aufgefüllt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 400 rcf und 23°C für 10 Minuten. Der Überstand wurde ebenfalls wieder verworfen und das eben beschriebene Procedere erneut durchgeführt. Nach wiederholter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 1 ml auf 37°C erwärmten HBSS Puffer vermischt. Von diesem Granulozytengemisch wurde 1 µl abgenommen und in 99 µl HBSS Puffer überführt. Dies diente zum elektronenmikroskopischen Zählen der Granulozyten. Nach Ermittlung der Granulozytenmenge wurde das oben genannte Granulozytengemisch in, je nach Anzahl, zwei oder mehr Eppendorf Tubes aufgeteilt und auf einer Tischzentrifuge bei 1.0 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert und die eine Hälfte der Eppendorf Tubes mit dem Granulozytenpellet in flüssigen Stickstoff überführt und danach auf -80°C gestellt. Die restlichen Pellets wurden mit aufgetautem Lysepuffer (100mM NaH₂PO₄ 0,1% Triton Proteaseinhibitor) versetzt, mit Ultraschall behandelt und danach, wie die Pellets, schockgefroren und bei -80°C verwahrt.

3.3.3 Bestimmung der MPO-Plasmaspiegel

Die Plasmaproben aus den NH₄Heparin Monovetten wurden aufgetaut und mittels enzyme linked immunoassay (ELISA) der MPO-Plasmaspiegel ermittelt. Der Test wurde nach Angaben des Herstellers (Calbiochem) durchgeführt.

Hierbei handelt es sich um einen sogenannten Sandwich-ELISA, es werden also zwei Antikörper verwendet, die beide an verschiedenen Stellen an das gleiche Antigen binden – in diesem Fall MPO. Ein Antikörper ist fest in der Mikrotiterplatte gebunden, der zweite Antikörper wird in einem späteren Schritt hinzugegeben, so dass sich ein Antikörper-Antigen (MPO)-Antikörperkomplex bildet. Da der zweite Antikörper an ein Enzym (Meerrettichperoxidase) gebunden ist, das nach Zugabe eines chromogenen Substrates eine Farbreaktion auslöst, kann mittels spektrophotometrischer Messung bei 450 nm die MPO-Konzentration bestimmt werden.

Zunächst wurden alle zu nutzenden Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und die Proben, Kalibratoren und Kontrollen gründlich durchmischt. Je 100 μ l der Kalibratorsubstanzen wurden in die dafür vorgesehenen Wells pipettiert. Jeweils 10 μ l Probe oder Kontrolle wurden mit 90 μ l Assaypuffer in die restlichen Wells gegeben. Zugedeckt wurde die Mikrotiterplatte bei 500 rpm auf dem Schüttler 45 Minuten inkubiert. Daraufhin wurde die Platte vier Mal mit 400 μ l vorher angesetztem Waschpuffer gewaschen. Danach wurde in jedes Well 100 μ l Antikörperkonjugat (mit Meerrettichperoxidase versehen, siehe oben) gegeben. Es folgte die erneute Inkubation auf dem Schüttler für 45 Minuten und die oben beschriebene Waschung wurde ebenfalls wiederholt. Nun wurden jeweils 100 μ l des TMB Substratreagens in die Wells pipettiert, wodurch die oben beschriebene Farbreaktion beginnen konnte. Nach 15 Minuten Inkubation auf dem Schüttler wurden jeweils 100 μ l Stopp-Lösung hinzugefügt. Da hiermit die Reaktion beendet wurde, konnte nun die Absorption bei 450 nm gemessen werden.

3.3.4 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration in den isolierten Granulozyten (siehe oben) nutzten wir das PIERCE BCA-Protein-Assay-Kit nach Angaben des Herstellers. Dieses Verfahren basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine in alkalischem Medium (Biuret-Reaktion) und einer Farbreaktion des Kupfers mit Bicinchoninsäure (BCA). Diese formen einen lila gefärbten Chelatkomplex, der bei einer Absorption von 562 nm den Proteingehalt widerspiegelt.

Die isolierten Granulozyten wurden in einem Verhältnis von 1:20 mit Lysepuffer verdünnt. 25 μl eines bovinen Serum Albumin (BSA) wurden als Standard in Konzentrationen von 0-2000 $\mu\text{g/ml}$ in die dafür vorgesehenen Wells gegeben. Die restlichen Wells wurden mit 25 μl der verdünnten Proben befüllt. Nachfolgend wurden 200 μl eines vorher angesetzten Arbeitsreagenzes (BCA und Kupfer, siehe oben) in alle Wells pipettiert und für 30 Sekunden auf einem Schüttler vermischt. Die bedeckte Platte wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlung konnte im Spektrophotometer die Absorption gemessen werden und durch die Standardkurve die Proteinkonzentration der Proben ermittelt werden.

3.3.5 Western Blot

(SDS-PAGE = Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit 0,1% Natrium dodecylsulfat)

Der Western Blot ist ein Verfahren zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dies wird mittels Gel-Elektrophorese erreicht, bei der die Proteine stets in gleicher Richtung zur Anode wandern und je nach Größe (von 10-200 kDa) zum Stehen kommen.

Im Vorfeld ist eine Proteinbestimmung notwendig (siehe oben), um jeweils gleiche Konzentrationen auf das Gel auftragen zu können.

In diesem Fall nutzten wir ein bereits vorgefertigtes Polyacrylamid-Gel (PAGEr Precast Gel / Lonza). 50 μl der oben beschriebenen Proben wurden mit 25 μl

Laemmli versetzt und 5 Minuten bei 95°C im Thermomixer gekocht. Diese Proben wurden danach auf -20°C gelagert. Der Laemmli Puffer dient der Dichteerhöhung der Probe.

Nach Auftauen der Proben konnten sie in die Taschen des Gels pipettiert werden. Diese wurden zuvor mit SDS-PAGE Laufpuffer ausgespült. Die Proben, ein 10 kDa-Molekulargewichtstandard und ein vorgefärbter Proteinstandard, wurden nun in die Taschen gegeben. Danach wurde eine Spannung von 125 V angelegt, bis die Farbbanden das Ende des Gels erreichten. Die Spannung wurde abgeschaltet und das Gel entnommen.

Das sogenannte Blotting ist ein Verfahren zum Transfer der aufgetrennten Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran. Dazu wird ein Blotting-Puffer verwendet in den ein Schwamm, ein Filterpapier, eine zugeschnittene Nitrozellulose Membran, ein weiteres Filterpapier und ein zweiter Schwamm aufeinander gelegt werden. Mit einer Blothalterung wird dieser Stapel in die mit gekühltem Blotting-Puffer gefüllte Transferkammer eingesetzt. Nach Einstellung der Stromstärke auf 200 mA dauerte der Transfer etwa 90 Minuten. Danach wurde die Membran entnommen, mit Aqua dest. gespült und mit Ponceau S (roter Farbstoff) angefärbt. So konnten die Banden des 10kDa Molekulargewichtstandard mit Bleistift nachgezeichnet und die Färbung mit Blockpuffer entfernt werden. Durch den Blockpuffer wurden unbesetzte Bindungsstellen der Membran belegt, so dass im späteren Verlauf hier keine Antikörper unspezifisch binden konnten. Nach etwa 30 Minuten wurde der Blockpuffer gewechselt und die Membran für weitere 30 Minuten inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit einem Anti-MPO-Antikörper über Nacht auf 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal je 20 Minuten bei Raumtemperatur mit Blockpuffer auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend wurde der Zweitantikörper, der einen Peroxidase Anteil enthält, wiederum mit Blockpuffer und Membran für eine Stunde inkubiert und folgend vier Mal je 20 Minuten bei Raumtemperatur mit TBST gewaschen. Die Membran wurde aus dem Puffer entnommen, auf eine Glasplatte gelegt, mit einer ECL-Lösung versetzt und fünf Minuten inkubiert. Dann wurde die abgetropfte Membran in eine Filmkassette gelegt und in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm gelegt. Hier entstand durch die Reaktion der Peroxidase mit dem Luminol

(enthalten in der ECL-Lösung) Chemilumineszenz. Es wurde also Licht freigesetzt, das den Röntgenfilm schwärzte. Mittels Scanner und „Scan Pack“-Software konnten die Bandenintensitäten ermittelt werden.

3.3.6 MPO-Aktivitätsmessung

Die MPO-Aktivitätsmessung (MPO-TMB-Assay) ist eine Messung mit der man durch eine Farbreaktion photometrisch die Aktivität von Enzymen ermitteln kann.

Tetramethylbenzidin (TMB), die MPO enthaltende Probe, Wasserstoffperoxid und NaH_2PO_4 (80mM, pH 5,5) sind die benötigten Agenzien; wobei die ersten drei Komponenten für die blaue Färbung verantwortlich sind. Für unsere Messung benötigten wir ein Volumen von 1ml. Hierzu wurden die lysierten Granulozyten aufgetaut und so verdünnt, dass jeweils der gleiche Granulozytenanteil (entsprechend 100000 Granulozyten) in allen Proben bestand. Jeweils $2\mu\text{l}$ dieser Proben wurden mit $928\mu\text{l}$ NaH_2PO_4 in eine Küvette pipettiert und anschließend $60\mu\text{l}$ der TMB-Lösung hinzugegeben (4,8mg TMB/ml Dimethylformamid). Gestartet wurde die Reaktion mit $10\mu\text{l}$ H_2O_2 , weshalb nach Hinzupipettieren ein sofortiger Transfer der Küvette ins Photometer notwendig war.

Hier wurde die Absorption bei 655nm für drei Minuten gemessen. Sie wurde gegen die Zeit aufgetragen und durch die Steigung die Aktivität errechnet.

3.3.7 MMP-9

Die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) ist eine zink-abhängige Endopeptidase, die Prozesse wie Inflammation und Remodeling beeinflusst. Die Vorstufe Pro MMP-9 wird vor allem von neutrophilen Granulozyten bei ihrer Aktivierung sezerniert. Verschiedene Proteinasen sind in der Lage dieses Pro MMP-9 in das reife MMP-9 umzuwandeln. Da unser Vorhaben der Beweis für die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten war, wurde in diesem ELISA sowohl

das Pro MMP-9 (92kDa) als auch das reife MMP-9 (82kDa) gemessen. Dazu verwendeten wir den Quantikine MMP-9 Immunoassay und heparinisiertes Probandenplasma. Der Test erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die aufgetaute Plasmaprobe wurde in einem Verhältnis von 1:40 mit einem Verdünnungspuffer (RD5-10) versetzt.

In alle Wells der Mikrotiterplatte wurde der sogenannte Assay Diluent (RD-1-34) aufgetragen, nachfolgend jeweils 100 μ l der Proben, Kontrollen und Standards und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler (500 \pm 50 rpm) inkubiert. Da nun das MMP-9 an die in der Mikrotiterplatte befindlichen Antikörper gebunden haben sollte, wurde der Überstand abpipettiert und dreimal mit 400 μ l Waschpuffer gespült. Danach wurde der polyklonale MMP-9 Antikörper in die Wells gegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Darauf folgte nochmals die schon beschriebene Waschung. Um die erwünschte Farbreaktion zu erhalten, wurden die beiden Farbreagenzien vermischt, in die Wells gegeben und lichtgeschützt 30 Minuten inkubiert. Die Zugabe der Stopp-Lösung beendete die Farbreaktion und die MMP-9 Konzentration konnte bei 450nm bestimmt werden.

3.3.8 Nitrit-Bestimmung

Das Nitrit wurde mittels Gaschromatographie / Massenspektrometrie (GC/MS) bestimmt. Die hier angewandte Methode basiert auf einem Verfahren, das bei Tsikas et al. beschrieben ist [Tsikas et al. 2000]. Das Prinzip basiert auf der Reaktion zwischen PFB-Bromid, Nitrat und Nitrit – sie bilden PFB-NO₂ und PFB-ONO₂. Dadurch kann schließlich die Konzentration von Nitrit ermittelt werden.

Es wurden jeweils 100 μ l der Plasmaproben mit 400 μ l Aceton und 10 μ l eines internen Standards (400 μ M Nitrat und 4 μ M Nitrit in Aqua millipore) zusammengegeben. Dazu wurden 10 μ l PFB-Bromid pipettiert, alles gründlich vermischt und für eine Stunde bei 50°C im Thermoblock inkubiert. Nach Abkühlung unter Stickstoff wurden 300 μ l Toluol hinzugegeben, vermischt und

fünf Minuten bei 2000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach folgte die Nitritbestimmung mit Hilfe der GC/MS.

3.3.9 Nikotin-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung des Nikotins im Serum erfolgte mittels Festphasenextraktion und anschließender Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS). Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Isolierung des Nikotins durch Ionenaustausch und einer anschließenden basischen Elution sowie nachfolgender Einengung des Extraktes, so dass das Nikotin in der Probe sensitiv und selektiv gemessen werden kann.

Zuerst wurden die SPEC DAU Säulen mit je 250µl Methanol konditioniert, anschließend 1ml der Serumprobe in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 500µl eines Standardpools (10ng Nikotin-D₄ absolut in aqua dest.) und 2ml Essigsäure (0,1Mol) versetzt. Nach kurzer Durchmischung folgte die Zentrifugation für 5min. Der gewonnene Überstand wurde auf die konditionierte Säule (siehe oben) gegeben, die Durchlaufgeschwindigkeit auf etwa 0,5ml/min festgelegt. Anschließend wurde die Säule mit je 1ml Aqua dest. und Methanol gewaschen und dann 2min. unter Vakuum trocken gesaugt. Die Probe wurde mit 1ml Elutionsmittel (Dichlormethan 76%, Isopropanol 20%, Ammoniak (25%) 4%) extrahiert und in ein Chromacolgefäß überführt. Danach wurde das Eluat bei ca. 30°C unter Stickstoff eingedampft, der Rückstand in 60µl Ethylacetat aufgenommen und 2µl mittels GC/MS analysiert (GC-Säule: Varian Factor four®, Methylpolysiloxan mit 5% Phenyl, Schichtdicke 0,25µm, nominale Länge 30m, Durchmesser 0,25mm). Temperaturprogramm: 75°C für 1,5min, dann Erhöhung auf 205°C mit 20°C/min, anschließend eine Temperaturerhöhung auf 310°C mit 100°C/min, die Flussrate des Trägergases (Helium) beträgt konstant 1,0ml/min. Nikotin und der interne Standard Nikotin D₄ wurden im SIM-Modus (selected ion monitoring) detektiert (Nikotin: m/z: Target Ion = 162, Qualifier = 161; Nikotin-D₄: m/z: Target Ion = 166, Qualifier = 165), die Quantifizierung erfolgte mittels einer Kalibrationskurve über das Verhältnis der Peakfläche des Nikotins zur Peakfläche des internen Standards. Die Nachweisgrenze dieser

Methode beträgt 0,26ng/ml, die Bestimmungsgrenze 0,91ng/ml. Die Präzision und die Richtigkeit der Methode entsprechen den Vorgaben (Die relative Standardabweichung der inter- und intra-day Präzision und der Bias der Richtigkeit lagen jeweils unter 15%).

3.4 Ultraschalluntersuchung der A. brachialis

Die Messung der Endothelfunktion wurde mittels Doppler-Sonographie unter Beachtung der Leitlinienempfehlung des „American College of Cardiology“ durchgeführt [Corretti et al. 2002] und die Veränderungen des Gefäßdurchmessers der A. brachialis unter den verschiedenen Bedingungen (u. a. prä und post Nikotin) bestimmt. Um jeweils gleiche Bedingungen zu schaffen, wurden die Patienten nüchtern einbestellt und in einem ruhigen und stets gleich temperierten Raum untersucht. Der Proband wurde auf einer Liege mit leicht erhöhtem Oberkörper, auf dem Rücken liegend untersucht [Anderson et al. 1995].

3.4.1 Flow Mediated Dilatation (FMD)

Die flussabhängige Vasodilatation ist eine etablierte Untersuchungsmethode zur Erfassung der Endothelfunktion [Corretti et al. 2002]. Es wurde ein Sonografiegerät der Marke Siemens (Sonoline G50) mit einem hochauflösenden 12MHz Schallkopf verwendet, das die entsprechenden Sequenzen digital aufzeichnete. Dem Probanden wurde eine Blutdruckmanschette um den Oberarm gelegt und ein gut zu schallender Bereich der A. brachialis in der Ellenbeuge aufgesucht. Im 2D Bild wurde der Ausgangsdurchmesser bestimmt und nachfolgend die Manschette etwa 50mmHg über den systolischen Blutdruck aufgepumpt. Nach fünf Minuten war die erwünschte Ischämie in der A. brachialis erreicht und der Druck wurde abgelassen. Hierbei erfolgte die Erfassung des Flusses mit der Doppler-Methode und nach einer Minute die Bestimmung des Gefäßdurchmessers.

Durch die postischämisch wirkenden Scherkräfte, die zur Freisetzung von NO führen, ist die entstehende fluss- bzw. endothelabhängige Vasodilatation zu erklären. Diese Untersuchung erfolgte vor und nach Nikotinapplikation.

3.4.2 Nitroglycerin Mediated Dilatation (NMD)

Die NMD ist die flussunabhängige Vasodilatation, die die Funktion der glatten Gefäßmuskulatur repräsentiert. Hierzu wurde 10 Minuten nach der bereits erläuterten Messung – um den entstandenen Scherstress abklingen zu lassen – 1 Hub Nitroglycerin-Spray (entspricht 0,4mg) sublingual verabreicht [Leeson et al. 1997]. Diese Nitroapplikation wurde im Rahmen der Ultraschalluntersuchungen durchgeführt, um die Dilatationsfähigkeit des Gefäßes zu ermitteln. Die zwei Stunden Wartezeit zwischen der ersten und zweiten Ultraschalluntersuchung waren notwendig, um den Abbau des Nitroglycerins zu gewährleisten.

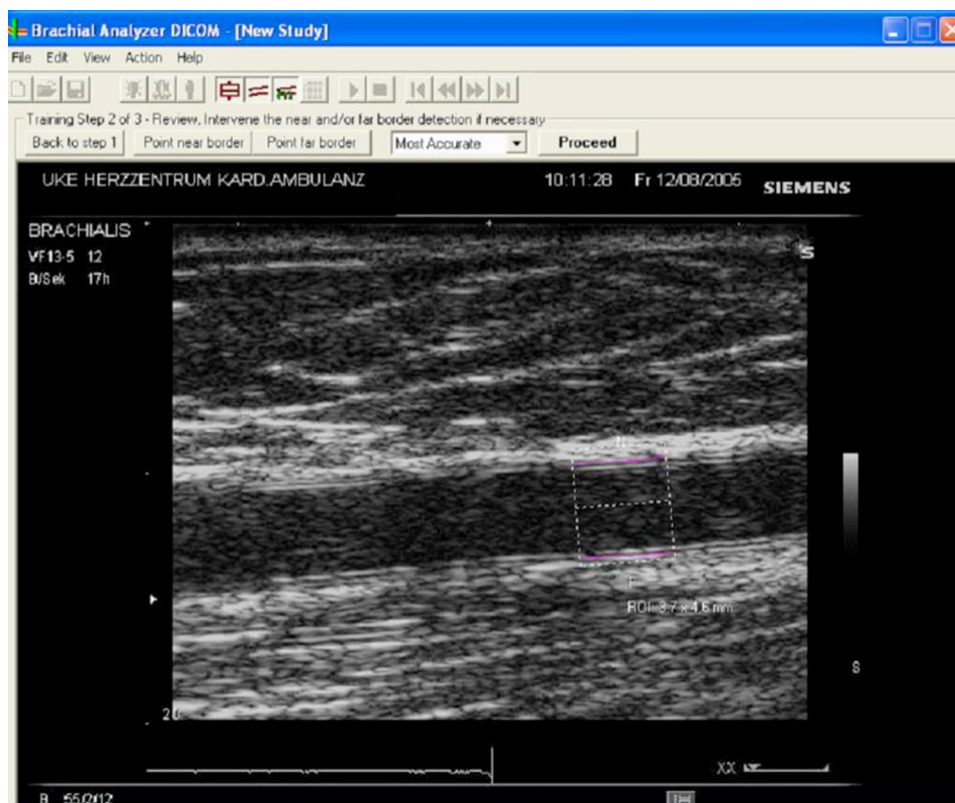


Abbildung 6: Ultraschall der A. brachialis im Longitudinalschnitt.

3.4.3 Auswertung

Die aufgezeichneten Ultraschallsequenzen der A. brachialis wurden mit dem Programm „Brachial Analyzer“ ausgewertet [Mancini et al. 2002]. Mit den in Abbildung 7 dargestellten Formeln und deren Kenngrößen wurden FMD und NMD berechnet.

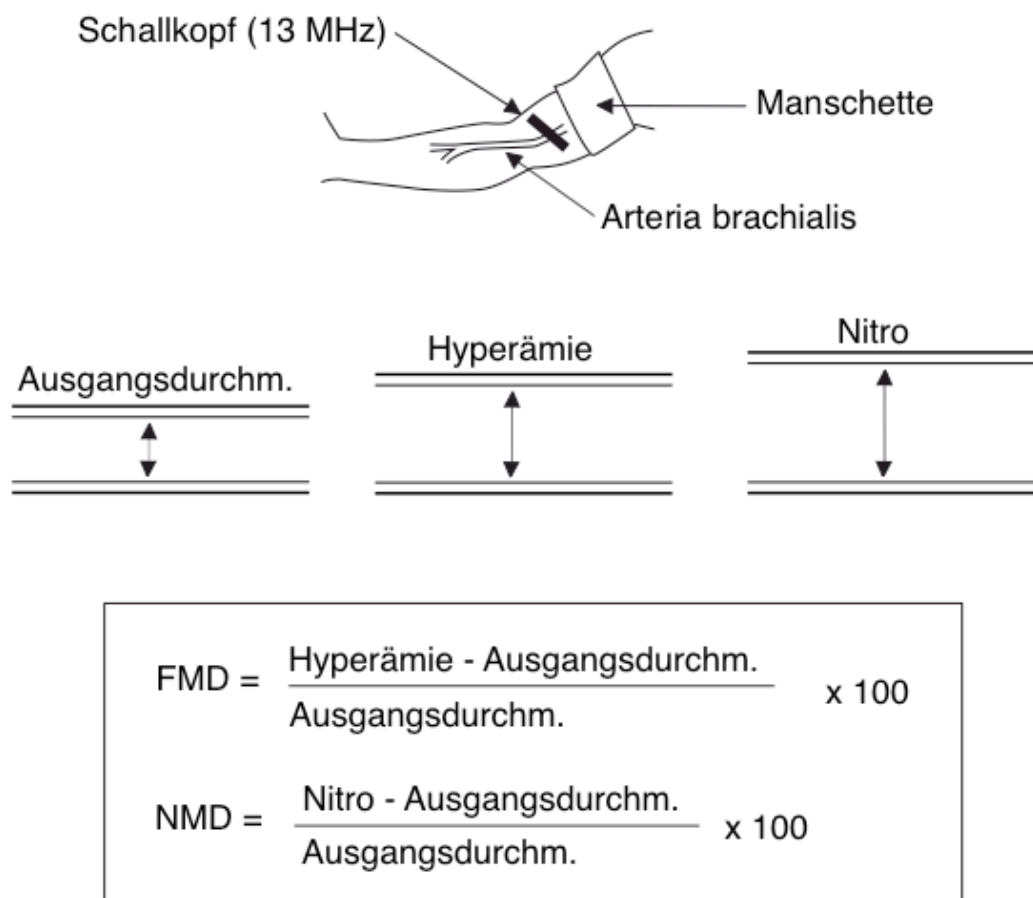


Abbildung 7: Nach Frick et al. (2002). Schematische Darstellung der nichtinvasiven Bestimmung der Endothelfunktion der A. brachialis mittels Ultraschall.

3.5 Bestimmung des Myeloperoxidase-Index (MPXI)

Das bereits erwähnte Screeningverfahren zur Ermittlung MPO-Defizienter Probanden basiert zum einen auf einer Differenzierung der weißen Blutzellen nach ihrer Größe und zum andern auf einer Farbreaktion, die Peroxidase-Aktivität nachweist. Das genutzte Analysegerät (Technicon H1 Hematology Analyzer von Bayer) vereint beide Messungen in einem Gerät, so dass keine aufwändigen Färbetechniken (nach Kaplow) angewandt werden mussten. Unter Verwendung von Vollblut entsteht ein Diagramm, das die verschiedenen Leukozytengruppen darstellt (Abbildung 8).

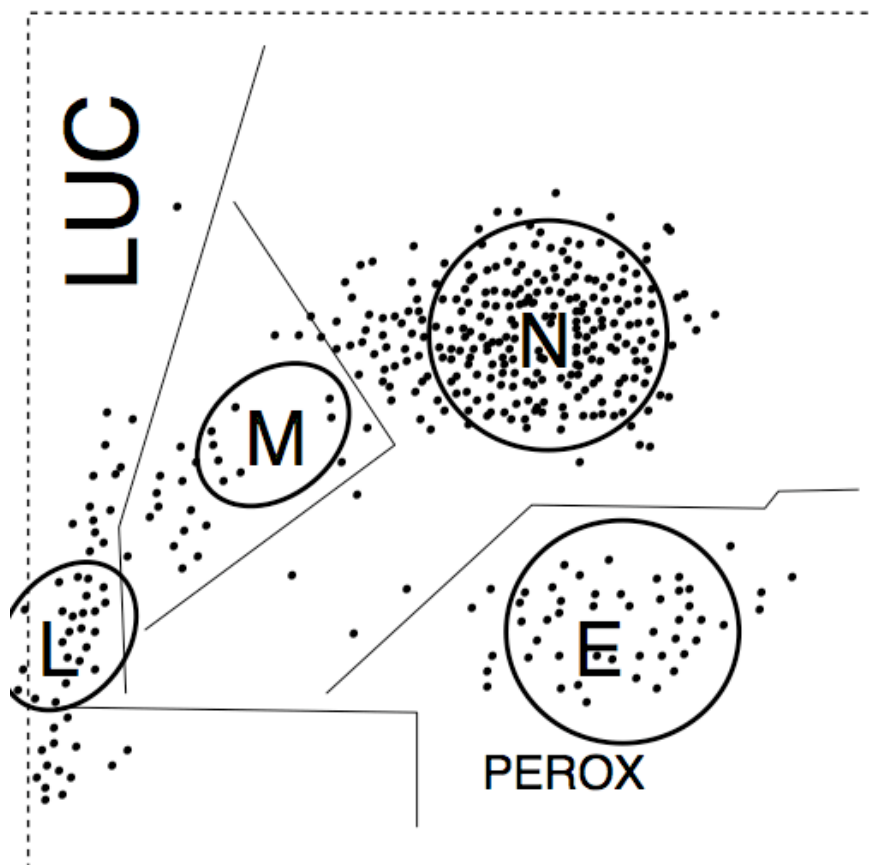


Abbildung 8: Nach Kutter et al. (1998). PEROX-Diagramm: Die verschiedenen Leukozytengruppen; quantitative Darstellung mittels Technicon H1 Analyzer. L: Lymphozyten, M: Monozyten, E: eosinophile Granulozyten, N: neutrophile Granulozyten, LUC: Area of large unstained cells (große, nicht gefärbte Zellen).

Es folgt ein zweites Diagramm, um die schlecht zu differenzierenden basophilen Granulozyten zu identifizieren. Hierzu wird mit einer Pufferlösung vorbehandeltes Vollblut verwendet. Dieser säurehaltige Puffer sorgt für eine Reinigung der Leukozyten, so dass sie von Protoplasma befreit sind. Gleichzeitig werden die Erythrozyten lysiert, die ein Störfaktor im Rahmen der Messung wären. Lediglich die basophilen Granulozyten werden durch dieses Verfahren verändert; so können sie mittels Laser identifiziert werden.

Die sogenannten Cluster im dargestellten Diagramm (Bereiche der verschiedenen Leukozyten) spiegeln im Bereich der neutrophilen Granulozyten die MPO Aktivität wider. Der MPO-Index (MPXI) wird aus einem Algorithmus, der die Cluster-Position relativ zu einem idealen Wert beschreibt, ermittelt.

Die „normalen“ Werte bewegen sich zwischen -10 und +10. Auf das Diagramm bezogen kann man sagen: desto weiter links der Cluster liegt, desto niedriger die Peroxidase-Aktivität, also auch der MPXI [Kutter et al. 1998].

3.6 Genanalyse

Im Rahmen dieser Arbeit versuchten wir bekannte Mutationen, die erwiesenermaßen zu MPO-Defizienz führen, nachzuweisen. Als Material dienten isolierte neutrophile Granulozyten von 10 unserer defizienten Probanden. Die DNA wurde mittels Qiagen DNA Kit extrahiert und folgend wurden die Sequenzen des MPO-Gens (17q23) amplifiziert. Diese Amplifizierung erfolgte durch die PCR Technik mit Taq-Polymerase unter Standard Bedingungen. Die Primer- und Sequenzgrößen (Amplicons) sind in Tabelle 1 dargestellt.

Amplicon	Forward Primer	Reverse Primer	Größe (bp)
Exon 1	ACCCCCAGCTTAGAGGACAT	AAGGGGTCTCTGGAACACAA	441
Exon 2	TCCAGAGACCCCTTTTCTCA	GCTGTTCTCCCATCCAGAAA	353
Exon 3	TTTCTGGATGGGAGAACAGC	GGGTCCCTAGGAGGAGTCAC	444
Exons 4/5	TGCCTGGGATAGGAAGTGAG	CGGGACACGGAGATCAGC	485
Exon 6	GGAGTATGAGGACGGCTTCTC	AGCGTCTGGGAAAGGAAAC	465
Exon 7	GCAGGGGGAGATCCAGTT	CAGACTCACTGTGGCTCCAA	462
Exon 8	AGGGGTGAGTAGGAGGCATT	CAGGAGCGTTAGGAACTTGC	363
Exon 9	AGAGACTCTGGCCCTCCTGT	GTGATCCCTACCCACCTTT	401
Exon 10	AGCCCTCTTCTCGAATCCTC	AGGGACCCTAGAGTGGGAAG	371
Exon 11	TCTTCCCTGCTGTCTCCAGT	CAGGTTCAGGGCACATTAGG	492
Exon 12 (part)	ATATCCTGGGAGCAGCACAA	GGAGGGTAATTTGCTCAAGG	681

Tabelle 1: Primer und Sequenzgrößen (Amplicons) die zur Analyse verwendet wurden. bp: Basenpaar.

Die PCR Produkte wurden nach der dideoxy Methode (Big Dye Termination kit) sequenziert [Sanger et al. 1977]; unter Verwendung der oben genannten Primer. Die Chromatogramme wurden analysiert und auf mögliche Mutationen untersucht.

3.7 Statistik

Kategoriale Variablen wurden als Häufigkeiten und als prozentuale Werte angegeben. Sie wurden mittels χ^2 Test und dem exakten Test nach Fisher verglichen.

Stetige Variablen wurden auf Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Test geprüft. Die hier ermittelten normal verteilten Variablen wurden mit Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Der T-Test fand für unverbundene und verbundene Stichproben Anwendung.

Die nicht normal verteilten Variablen wurden mit Median und Interquartilsabständen angegeben und mittels Mann-Whitney U-Test, sowie Wilcoxon's Vorzeichenrangtest verglichen.

Ein p – Wert von $p < 0,05$ gilt als statistisch signifikant.

Zur Ermittlung von Abhängigkeiten und Zusammenhängen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson verwendet.

Die Durchführung aller Berechnungen erfolgte mit dem Programm SPSS-Version 15.

4 Ergebnisse

4.1 Demographische Variablen

Alle Probanden wurden nach ihrem Gesundheitsstatus, vor allem den kardiovaskulären Risikofaktoren und Medikamenten befragt. In Tabelle 2 sind die ermittelten Faktoren aufgelistet und im Vergleich zwischen der MPO-Defizienten- und der Kontrollgruppe dargestellt. Es zeigt sich, dass die erhobenen Parameter im Vergleich zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Abweichungen aufweisen. Die Kontrollprobanden sind also korrekt auf die MPO-Defizienten gematcht worden.

	MPO^{Def} (N = 15)	KONTROLLGRUPPE (N = 30)	P-WERT
Alter (Jahre)	56 ± 14,7	56 ± 15,8	0,887
Geschlecht (m, %)	40,0	40,0	0,629
BMI (kg/m ²)	24,7 ± 4,2	23,5 ± 3,4	0,284
HTN (%)	46,7	46,7	0,623
HLP (%)	26,7	26,7	0,632
DM (%)	20,0	20,0	0,644
Aktueller Raucherstatus (%)	20,0	20,0	0,644
ASS (%)	20,0	26,7	0,460
Clopidogrel (%)	6,7	6,7	0,714
Beta-Blocker (%)	46,7	33,3	0,292
ACE-Hemmer (%)	20,0	26,7	0,460
CSE (%)	26,7	23,3	0,540
Hb (g/dl)	12,11 ± 3,63	17,81 ± 6,25	0,426
Leukozyten (10e ⁶)	7,48 ± 4,65	6,55 ± 2,25	0,375
Kreatinin (mg/dl)	1,06 ± 0,44	1,04 ± 0,64	0,914
CRP (mg/dl)	0,87 ± 2,29	1,11 ± 2,68	0,762

Gesamt-Cholesterin (mg/dl)	171,4 ± 42,0	186,7 ± 48,1	0,302
LDL (mg/dl)	86,7 ± 27,2	102,0 ± 34,6	0,144
HDL (mg/dl)	63,67 ± 13,86	62,33 ± 19,06	0,811
Triglyzeride (mg/dl)	134,3 ± 78,7	111,7 ± 71,4	0,338
RRsys (mmHg)	130 ± 21	140 ± 30	0,371
RRdia (mmHg)	77 ± 15	77 ± 12	0,90
Herzfrequenz (/min)	68 ± 11	69 ± 10	0,83

Tabelle 2: Die erhobenen Daten aller Probanden mit Standardabweichung und p-Wert.

BMI: Body-Mass-Index, HTN: Hypertonus, HLP: Hyperlipoproteinämie, DM: Diabetes mellitus, ASS: Acetylsalizylsäure, ACE: Angiotensin-Converting-Enzyme, CSE: Cholesterin-Synthese-Enzym, Hb: Hämoglobin, CRP: C-reaktives Protein, LDL: Low-Density-Lipoprotein, HDL: High-Density-Lipoprotein, RRsys: systolischer Blutdruck, RRdia: diastolischer Blutdruck.

4.2 Endothelfunktion

Abbildung 9 zeigt die endothelabhängige Vasodilatation der MPO-Defizienten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, jeweils vor und nach Nikotinapplikation.

Bei den MPO-Defizienten Probanden ist kein signifikanter Unterschied der FMD vor und nach Nikotin zu erkennen. Im Gegensatz dazu kommt es in der Kontrollgruppe nach Nikotinapplikation zu einer deutlichen Abnahme der FMD mit statistischer Signifikanz von $p < 0,01$.

Beide Gruppen zeigen eine in etwa gleiche Ausgangs-FMD ohne signifikanten Unterschied, wohingegen die Messwerte nach Konsum des Nikotinkaugummi mit $p < 0,05$ einen signifikanten Unterschied zeigen.

In Abbildung 10 ist der durch Nitroglycerin erzielte Effekt auf die Gefäßfunktion im Sinne einer Gefäßdilatation dargestellt. Sowohl vor als auch nach Nikotinkonsum zeigt sich in beiden Gruppen keine signifikante Veränderung. Jedoch zeigt bereits die Ausgangs-NMD beider Gruppen einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$. Es ist eine deutlich stärkere Dilatation durch Nitroglycerin in der Gruppe der MPO-Defizienten nachweisbar.

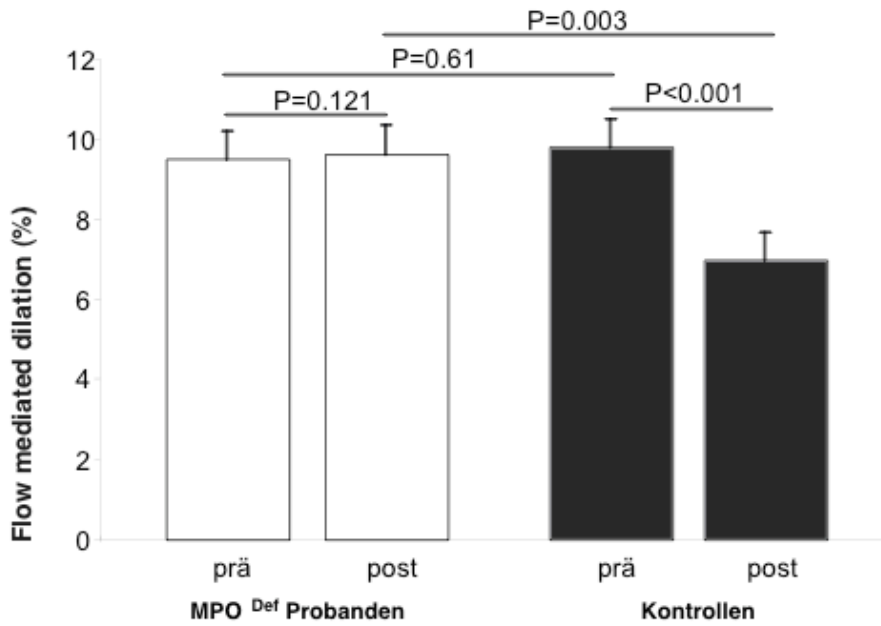


Abbildung 9: Vergleich der flussabhängigen Dilatation (FMD) beider Probandengruppen vor und nach Nikotinkonsum. Mittelwert \pm Standardabweichung.

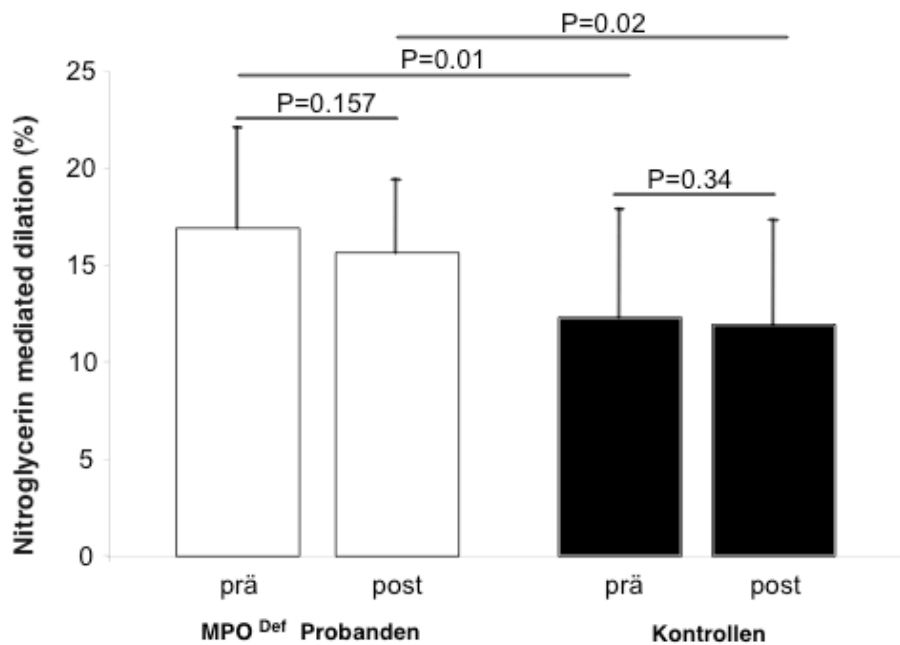


Abbildung 10: Vergleich der Nitroglycerin vermittelten Dilatation (NMD) beider Probandengruppen vor und nach Nikotinkonsum. Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.3 MPO in neutrophilen Granulozyten

Bei der MPO Bestimmung mittels Western Blot besteht zwischen der MPO-Defizienten- und der Kontrollgruppe eine signifikante Differenz der MPO Expression ($p < 0,001$). Wie auch in Abbildung 11 im Western Blot Ausschnitt zu erkennen, sind bei der MPO-Defizienten Gruppe keine oder nur geringe MPO Spiegel nachzuweisen.

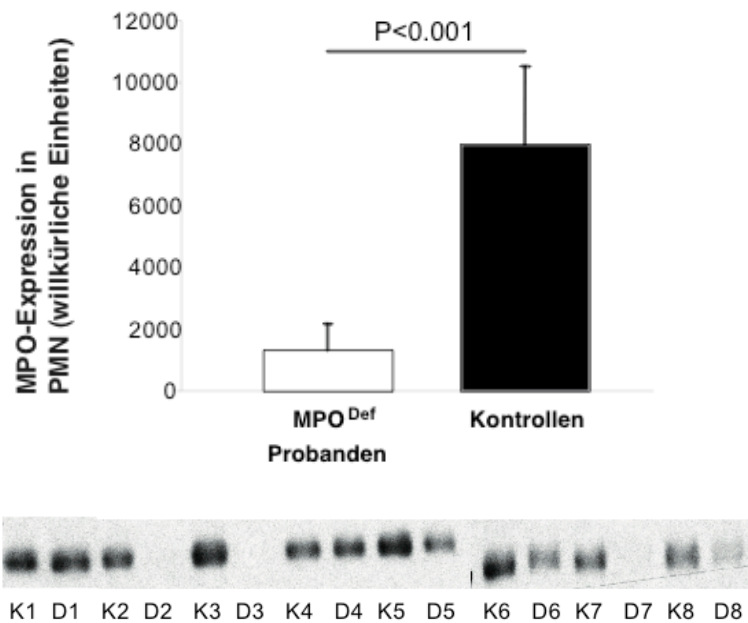


Abbildung 11: MPO-Gehalt der neutrophilen Granulozyten (PMN) der MPO-Defizienten- und der Kontrollgruppe mit beispielhaftem Westernblot. Mittelwert \pm Standardabweichung. K: Kontrolle, D: Defizienz.

4.4 MPO-Aktivität

In Abbildung 12 ist die Extinktion im TMB-Assay grafisch dargestellt. Diese entspricht der MPO-Aktivität der neutrophilen Granulozyten. Es ist zu sehen, dass die Kontrollgruppe, mit statistischer Signifikanz von $p < 0,001$, eine deutlich stärkere Absorption zeigt.

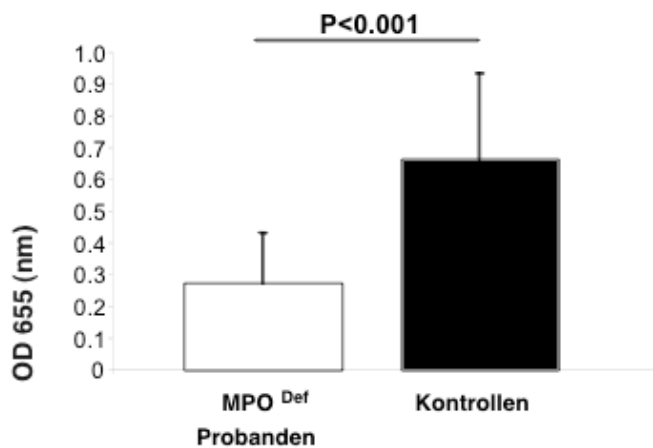


Abbildung 12: Die MPO-Aktivität der neutrophilen Granulozyten mittels TMB Assay und Messung der Extinktion. Mittelwert \pm Standardabweichung. OD : optische Dichte.

4.5 MPO-Plasmaspiegel

Die MPO-Plasmaspiegel vor und nach Nikotinkonsum (Abbildung 13) zeigen bei der MPO-Defizienten Gruppe keine signifikante Änderung ($p = 0,363$). Ihre Konzentration liegt unter der der Kontrollgruppe, sowohl vor als auch nach Nikotinapplikation ($p < 0,001$).

Nach Nikotinexposition zeigt sich in der Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der MPO-Plasmaspiegel ($p = 0,005$).

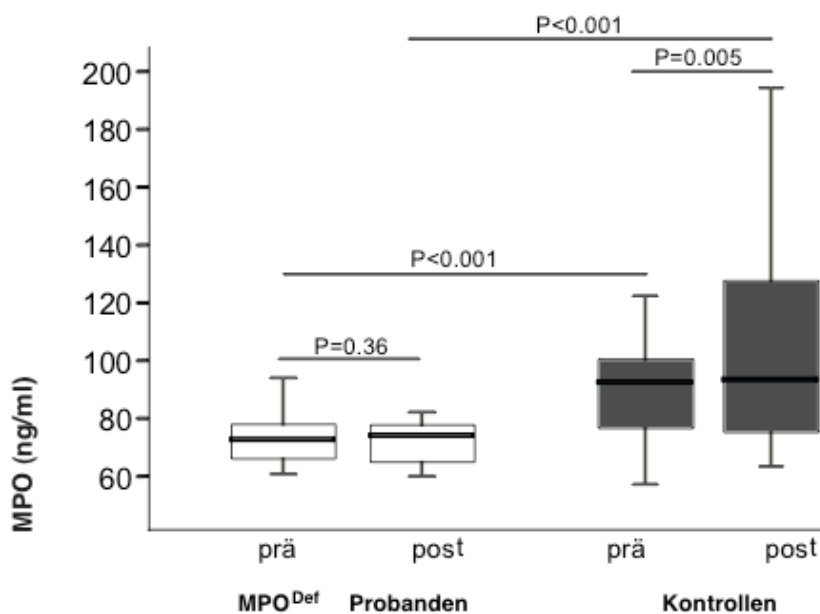


Abbildung 13: Die MPO-Plasmaspiegel in ng/ml beiden Gruppen vor und nach Nikotinapplikation. Dargestellt sind Median und 25-75% Perzentile.

4.6 MMP-9-Plasmaspiegel

Abbildung 14 zeigt die grafische Darstellung der MMP-9-Plasmaspiegel, die zwischen den Gruppen jeweils prä- und post- Nikotinapplikation keine statistische Signifikanz aufweisen.

Lediglich innerhalb der Gruppen lassen sich Abweichungen erkennen: In der MPO-Defizienten-Gruppe ist ein Anstieg der MMP-9-Plasmaspiegel zu verzeichnen, dieser erreicht allerdings keine statistische Signifikanz ($p = 0,07$). In der Kontrollgruppe hat sich eine signifikante Steigerung der MMP-9-Spiegel nach Nikotinkonsum ergeben ($p = 0,03$).

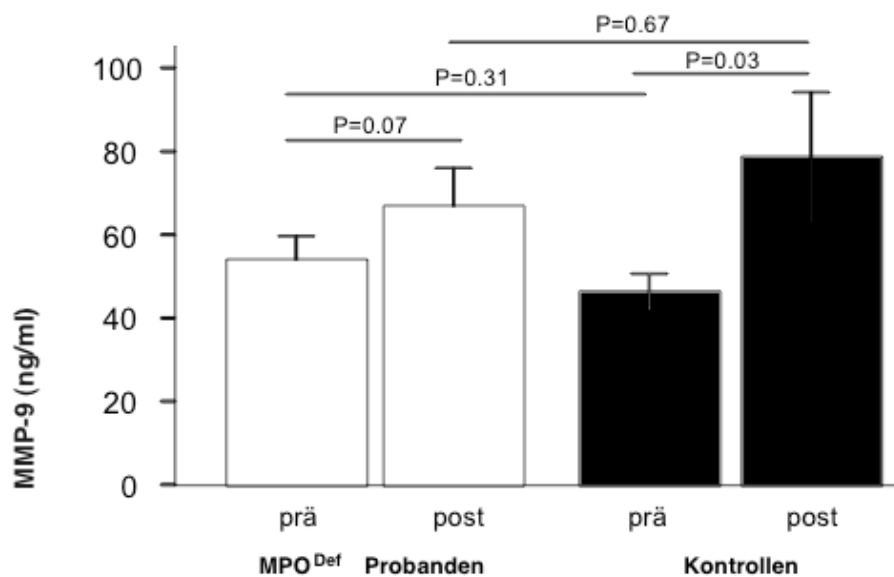


Abbildung 14: Die MMP-9-Plasmaspiegel in ng/ml beider Gruppen jeweils vor und nach Nikotinkonsum. Mittelwert \pm Standardabweichung. MMP-9 : Matrix-Metalloproteinase-9.

4.7 Nikotin-Plasmaspiegel

In Abbildung 15 ist der Nikotingehalt der MPO-Defizienten- und der Kontrollgruppe grafisch dargestellt. Der Nikotinspiegel wurde im Plasma aller Probanden, nach halbstündigem Kauen des Nikotinkaugummis, gemessen. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit $p = 0,59$.

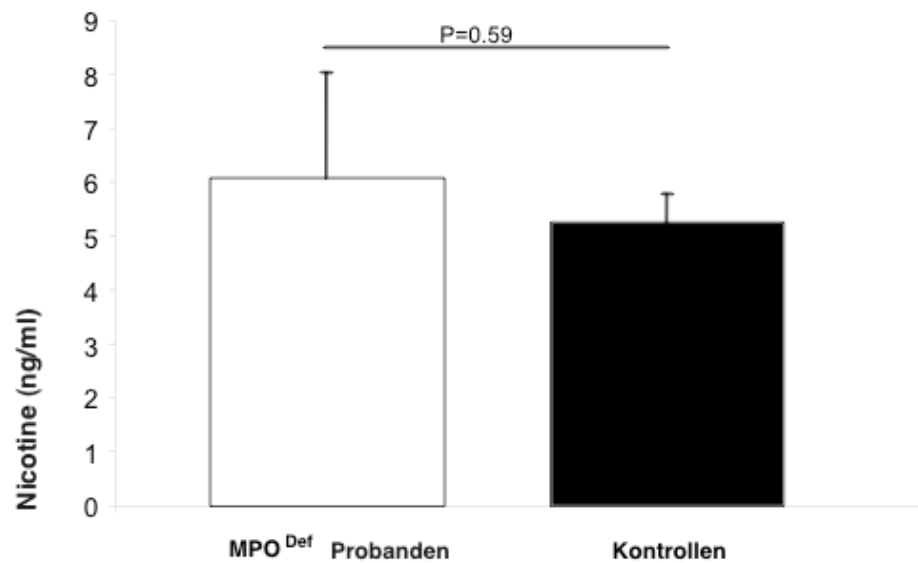


Abbildung 15: Die Nikotinspiegel im Plasma der MPO-Defizienten- und Kontrollgruppe nach Kauen des Nikotinkaugummis. Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.8 Nitrit-Plasmaspiegel

Die Nitrit-Spiegel der Probanden (Abbildung 16) zeigen innerhalb der Gruppen vor und nach Nikotinapplikation keinen signifikanten Unterschied. Allerdings sind die Nitritspiegel der MPO-Defizienten im Vergleich zur Kontrollgruppe um ca. 1,5 μM höher. Es liegt sowohl zwischen beiden prä-Nikotin Proben, als auch zwischen beiden post-Nikotin Proben ein statistisch signifikanter Unterschied vor mit $p < 0,01$.

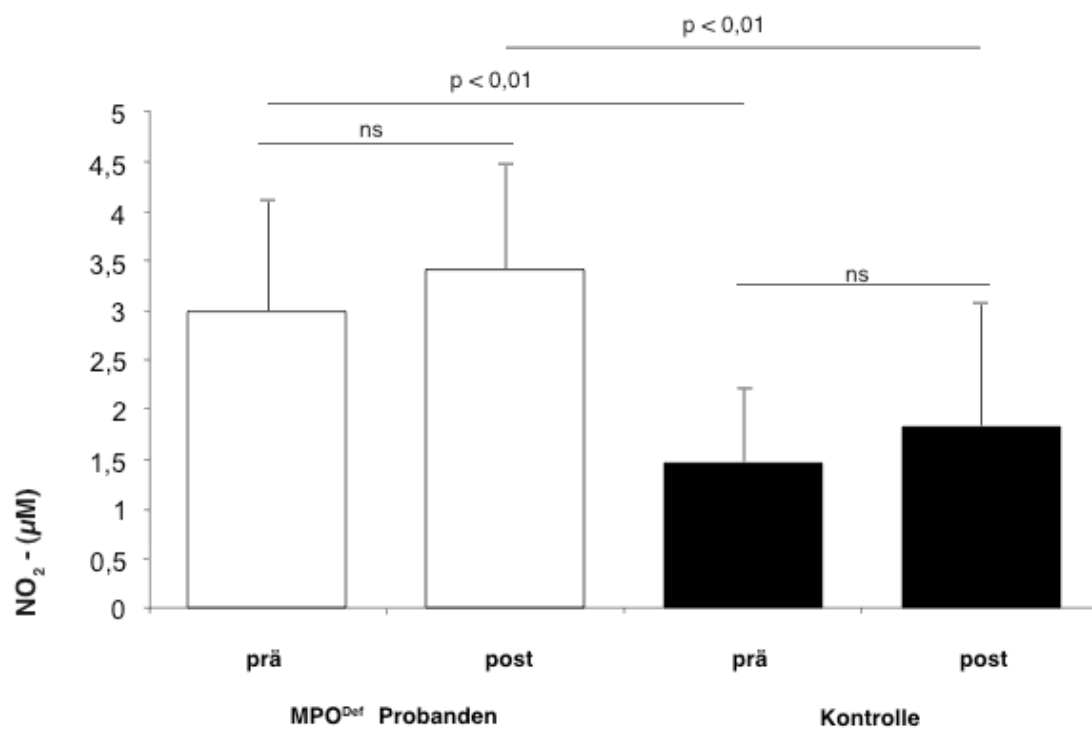


Abbildung 16: Die Nitritwerte in μM , bestimmt im Plasma beider Probandengruppen vor und nach Nikotin. Mittelwert \pm Standardabweichung. NO_2^- = Nitrit.

4.9 Korrelationsanalyse

Um die Zusammenhänge zwischen den einzelnen dargestellten Ergebnissen zu verdeutlichen, berechneten wir verschiedene Korrelationskoeffizienten nach Pearson (Tabelle 3 und 4). Wir verwendeten die logarithmierte Form der MPO-Plasmaspiegel, da MPO nicht normalverteilt ist und die Berechnung nach Pearson in diesem Fall nur in logarithmierter Form erlaubt ist.

Ein besonders wichtiger Parameter in dieser Arbeit ist die FMD. Wie in Abbildung 9 zu sehen, kommt es nach Nikotinapplikation nur in der Kontrollgruppe zu einer deutlichen Abnahme der FMD, wohingegen die Ausgangswerte mit 8% - 10% nicht signifikant voneinander abweichen.

Um mögliche Einflussfaktoren auf die FMD zu ermitteln, haben wir Korrelationsanalysen zwischen FMD und Parametern wie MPO-Plasmaspiegeln und MPO-Aktivität durchgeführt (Tabelle 3). Es besteht eine negative Abhängigkeit zwischen diesen Parametern, das heißt je höher MPO-Plasmaspiegel oder MPO-Aktivität, desto schlechter die Endothelfunktion (FMD).

	LogMPO prä	LogMPO post	MPO TMB
FMD prä	r = -0,332 (p = 0,028)		
FMD post		r = -0,300 (p = 0,045)	r = -0,477 (p < 0,01)

Tabelle 3: Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson, zur Darstellung der jeweiligen Assoziation zwischen FMD, MPO und MPO-Aktivität (TMB). r: Korrelationskoeffizient.

MMP-9-Plasmaspiegel wurden zur Bestätigung der PMN-Aktivierung bestimmt. Zwischen MPO- und MMP-9-Plasmaspiegeln besteht eine positive Korrelation. Generell steigen also MPO und MMP-9 Werte miteinander an (Tabelle 4).

	MMP-9 prä	MMP-9 post
LogMPO prä	r = 0,433 (p < 0,01)	r = 0,358 (p = 0,016)
LogMPO post	r = 0,342 (p = 0,021)	r = 0,579 (p < 0,01)

Tabelle 4: Die Korrelationskoeffizienten nach Pearson, zur Darstellung der jeweiligen Assoziation zwischen MPO und MMP-9. r: Korrelationskoeffizient.

4.10 Genanalyse

In der Genanalyse der MPO-Defizienten Probanden konnten drei verschiedene Mutationen und Polymorphismen bei vier Individuen nachgewiesen werden (Tabelle 5). Ein Proband konnte als heterozygot für die folgende Mutation identifiziert werden: A332V, also ein Austausch von Alanin und Valin auf Codon 332. Bei einem weiteren Probanden wiesen wir einen Austausch von Methionin mit Threonin auf Codon 251 (M251T) nach (homozygot). Bei zwei Probanden konnte ein Splicing Defekt, jeweils heterozygot, in Exon 12 entdeckt werden.

	rs-Nummer	Variation		Anzahl der Proben (Total n=10)		
		mRNA	Effekt	Homozyg wt-Allele	Heterzyg	Homozyg r-Allele
Exon 6	56378716	c.752T>C	p.Met251Thr	9	-	1
Exon 7	28730837*	c.995C>T	p.Ala332Val	9	1	-
Intron 11	2071409	c.2031-6A>C	-	8	1	1
Intron 11	35897051*	c.2031-2A>C	splicing	8	2	-

Tabelle 5: Mutationen und Polymorphismen bei vier MPO-Defizienten Probanden. rs: reference SNP (= Einzel Nucleotid Polymorphismus), wt: Wildtyp, r: rezessiv.

5 Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sind:

- PMN-Aktivierung führt akut zu einer Verschlechterung der Endothelfunktion
- MPO muss maßgeblich an dieser Dysfunktion beteiligt sein

Die zu Grunde liegende These dieser Studie, dass die Aktivierung von PMN durch die Ausschüttung von MPO zu einer endothelialen Dysfunktion führt, konnten wir also im Rahmen dieser Arbeit bestätigen.

In wie weit andere Aspekte diese Ergebnisse beeinflussen, soll Gegenstand der nachfolgenden kritischen Diskussion sein.

Die Tatsache, dass oxidativer Stress zu endothelialer Dysfunktion führt, ist weitestgehend bekannt [Cai et al. 2000]. Auch die NO-Konsumption durch MPO und somit die Verschlechterung der Gefäßfunktion, sowie der Zusammenhang zwischen MPO und Atherosklerose wurde in mehreren Arbeiten beschrieben [Baldus et al. 2006, Brennan et al. 2003, Nicholls et al. 2005, Zhang et al. 2001].

In dieser Studie steht ausschließlich der Einfluss der MPO nach PMN Aktivierung im Vordergrund und zwar ihre direkten Auswirkungen auf die Endothelfunktion.

Wir konnten, anders als in bisherigen Arbeiten, durch den Vergleich von MPO-Defizienten Probanden mit einer Kontrollgruppe ganz spezifisch auf die Effekte der MPO Bezug nehmen.

Vorab die Klärung des verwendeten Begriffes „MPO-Defizient“ und der trotzdem vorhandenen MPO-Spiegel in unseren Messungen:

Es ist festzuhalten, dass trotz geringer MPO-Konzentrationen eine MPO-Defizienz vorliegt, wenn sie sich der Myeloperoxidase-Index – im BAYER H1

Technicon Hematology Analyzer – im Bereich unter -10 befindet [Kutter et al. 1998]. Das war bei all unseren MPO-Defizienten Probanden der Fall.

Es spielen verschiedene weitere Faktoren eine Rolle:

Zunächst muss ein Unterschied zwischen MPO-Proteinkonzentrationen in PMN und ihrer Aktivität gemacht werden. Die mittels Protein-Assay und Western-Blot bestimmten Konzentrationen spiegeln zwar definitiv das Vorhandensein der MPO wider, dadurch jedoch, dass die in dieser Methode ablaufenden Farbumschläge durchaus durch MPO Vorstufen bedingt sein können, lassen sich geringe Mengen auch in MPO-Defizienten Probanden messen. Das bedeutet, dass wir zwar bei den MPO-Defizienten MPO-Spiegel nachweisen können, es jedoch wahrscheinlich keine reifen, funktionstüchtigen Enzyme sind [Tobler et al. 1989, Nauseef et al. 1996]. Zusätzlich haben wir die Enzymaktivität mittels TMB-Assay bestimmt. Auch hier konnten wir geringe Aktivitäten in den MPO-Defizienten finden. Die Begründung liegt erstens darin, dass, wie bereits oben erwähnt, MPO-Defiziente durchaus geringe MPO Konzentrationen besitzen können, zweitens besteht die Möglichkeit, dass bei der Granulozytenisolation leichte Verunreinigungen aufgetreten sein können und zum Beispiel eosinophile Granulozyten mit ihrer eosinophilen Peroxidase die Aktivität im TMB-Assay hervorrufen, bzw. andere Peroxidasen, wie zum Beispiel die Lactoperoxidase.

Des Weiteren muss die genetische Komponente näher betrachtet werden.

In den 10 genetisch untersuchten Probandenproben wurden lediglich bei vier von ihnen bekannte relevante Mutationen, die zu MPO-Defizienz führen, festgestellt.

Bei zwei Probanden wurde ein Splicing Defekt in Exon 12 festgestellt, wodurch die entstehende mRNA funktionsuntüchtig wird. Die zwei weiteren Mutationen sind der seltene Austausch von Methionin auf Codon 251 mit Threonin (M251T), was zu sehr geringer Peroxidase Aktivität führt [Nauseef 2004] und die A332V Mutation, wodurch die Basen Alanin und Valin ausgetauscht werden. Letztere wurde erst im Jahr 2004 von Marchetti et al. gefunden.

Zwar konnten wir nur 4 Mutationen feststellen, es ist jedoch wahrscheinlich, dass bis dato noch nicht beschriebene Mutationen vorliegen, z. B. in Introns und Promotorregionen.

Die Endothelfunktion erfassten wir mittels flussabhängiger Vasodilatation (FMD). Sie zeigt, ähnlich wie in anderen Studien, die allerdings im Vergleich zu dieser Arbeit nicht den akuten, sondern den chronischen Einfluss von Nikotin erfassen [Celermajer et al. 1993, Sorensen et al. 1995, Zeiher et al. 1995], dass durch Nikotinapplikation eine signifikante Verschlechterung der Endothelfunktion hervorgerufen wird. Im Rahmen dieser Arbeit ist zusätzlich der Aspekt der Granulozytenaktivierung und MPO Sezernierung mit einbezogen. Die für die Endotheldysfunktion verantwortlichen Reaktionen sind in Abbildung 17 verdeutlicht.

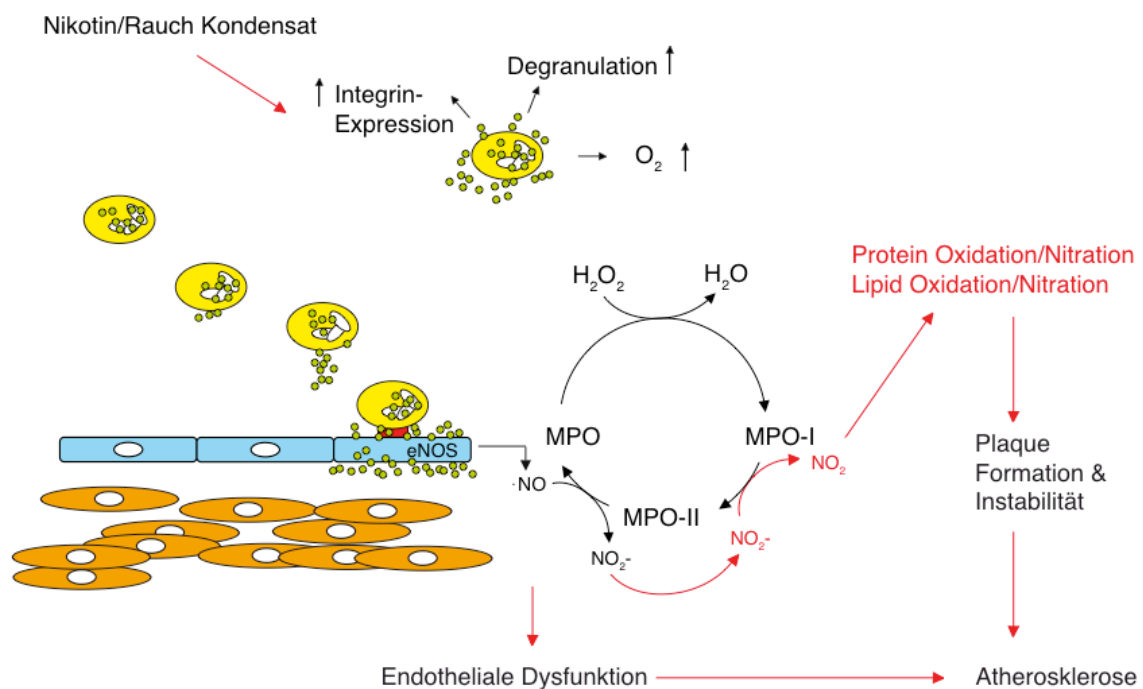


Abbildung 17: nach Rudolph et al. (2008). Aktivierung der PMN durch Nikotin und die darauf folgende Reaktionskaskade mit u. a. dem Resultat der endothelialen Dysfunktion. MPO: Myeloperoxidase, MPO I: Compound I, MPO II: Compound II, NO: Stickstoffmonoxid, H_2O_2 : Wasserstoffperoxid, NO_2^- : Nitrit, $\cdot NO_2$: Stickstoffdioxid, O_2^- : Superoxid, eNOS: endotheliale NO-Synthase.

Alle Probanden wurden unter gleichen Bedingungen und Voraussetzungen untersucht. Das spiegelt sich in den FMD-Ausgangswerten wider: In beiden Gruppen bewegten sie sich zwischen 8% und 10%, also ohne signifikanten Unterschied. Da ausschließlich die Kontrollgruppe nach Nikotinapplikation eine Verschlechterung der FMD erfuhr ($p < 0,01$), muss der MPO eine entscheidende Rolle für die endotheliale Funktion zukommen. Um diesen Aspekt noch weiter zu untermauern, berechneten wir verschiedene Korrelationskoeffizienten nach Pearson.

Es liegt eine negative Abhängigkeit zwischen FMD und den jeweiligen MPO Werten (logarithmiert aufgrund der nicht Normalverteilung MPOs) vor. Das heißt, je höher die MPO-Spiegel, desto schlechter stellt sich die Endothelfunktion dar. Das Ergebnis der Korrelationsanalyse zwischen FMD und MPO-Aktivität unterstützt vorheriges: Es zeigte sich, dass die FMD nach Nikotin-Stimulation negativ mit der granulozytären MPO-Aktivität korreliert.

Im Rahmen dieser Ergebnisse stellt sich die Frage: Aus welchem Grund führt Nikotinapplikation bei MPO-Defizienten zu keiner Endothelfunktionsverschlechterung? Um dies zu diskutieren, ist das Verständnis des Reaktionskreislauf von PMN Aktivierung, MPO Sezernierung und NO Konsumption aus Abbildung 17 notwendig. Bekanntermaßen führt Nikotinkonsum zu PMN Aktivierung [Rudolph et al. 2008]. Nach Aktivierung sezernieren die neutrophilen Granulozyten MPO und dieses bindet über elektrostatische Wechselwirkungen an die Heparan-Glykosaminoglykane der endothelialen Oberfläche [Baldus et al. 2001]. Mittels Transzytose gelangt sie in den subendothelialen Raum, trifft hier auf das endothelial generierte NO [Baldus et al. 2006] und konsumiert letzteres [Eiserich et al. 2002]. Aufgrund der Tatsache, dass NO ein potenter Vasodilatator ist und antiinflammatorisch wirkt [Kubes et al. 1991, Moncada et al. 1993], lässt sich schließen, dass eine geringere Bioverfügbarkeit des NO zu endothelialer Dysfunktion führt. Diese Bedingungen entsprechen denen in der untersuchten Kontrollgruppe. Da bei den MPO-Defizienten kein oder signifikant weniger MPO vorhanden ist, wird nach Granulozyten-Aktivierung nicht mehr NO konsumiert und somit bleibt die Endothelfunktion unbeeinflusst.

Die gemessene FMD zeigt noch einen weiteren MPO-vermittelten Effekt auf: Die initiale Nitroglycerin Applikation (vor Nikotingabe) führt bei den MPO-Defizienten zu einer nachweisbar ausgeprägteren Vasodilatation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser signifikante Unterschied spricht für den Einfluss von MPO auf die strukturelle Integrität, z. B. durch vermehrte Fibrosierung des Gefäßes [Rudolph et al. 2010] oder durch vermehrte Akkumulation von Lipoproteinen [van der Veen et al. 2009] – ein wichtiger Hinweis für die adversen Effekte von MPO auf die humorale und strukturelle Integrität des Gefäßes.

Dass es durch die Applikation von Nikotin wirklich zu einer Aktivierung der PMN gekommen ist, zeigt sich darin, dass es in der Kontrollgruppe nach Nikotinapplikation zu einem signifikanten Anstieg der MPO-Plasmaspiegel kam. Diese Annahme konnten wir durch den Nachweis eines Nikotin-vermittelten MMP-9-Plasmaspiegelanstiegs (Nachweisparameter der PMN-Aktivierung) bestätigen [Birkedal-Hansen et al. 1993]. Zusätzlich konnten wir feststellen, dass nach Nikotinapplikation bei der MPO-Defizienten-Gruppe kein MPO-Plasmaspiegelanstieg zu verzeichnen war. Das unterstreicht, dass diese Gruppe auch wirklich aus MPO-Defizienten Individuen bestand. Ein weiterer Aspekt, der eine mögliche Fehlerquelle ausschließt, ist die Tatsache, dass beide Gruppen eine ähnlich hohe, nicht signifikant abweichende PMN-Aktivierung aufwiesen (siehe Abbildung 14 im Ergebnisteil).

Um zu untersuchen, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von aktivem MPO und NO besteht, erfolgte neben der Bestimmung von MPO die Bestimmung von NO im Plasma. Da aufgrund der Kurzlebigkeit des NO eine direkte Messung nicht möglich ist, griffen wir auf eine etablierte Methode der Surrogatparameter-Bestimmung zurück [Tsikas et al. 2000]. Als Surrogatparameter nutzten wir Nitrit, wie bereits in der Literatur beschrieben [Rassaf et al. 2002, Lauer et al. 2002].

Es zeigte sich, dass die Nitritspiegel in der MPO-Defizienten-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe sind. Das ist damit zu erklären, dass durch die geringeren bzw. nicht vorhandenen MPO-Spiegel bei dieser Gruppe eine geringere NO-Konsumption stattfindet und die NO-Spiegel dementsprechend

höher sein müssen. Nitrit als Surrogatparameter für NO entspricht dieser Hypothese.

Für die Aussagekraft dieser Studie ist es wichtig, dass in beiden untersuchten Gruppen der Stimulus für die Leukozytenaktivierung – also die Nikotinapplikation – vergleichbar ist. Die erreichten Plasmanikotinspiegel können hierüber Auskunft liefern. Zwar kauten alle Probanden gleich lange den Nikotinkaugummi, doch beweist das noch nicht, dass die Probanden beider Gruppen ähnlich hohe Nikotinkonzentrationen im Blut enthielten. Um diese mögliche Fehlerquelle auszuschließen, bestimmten wir die Nikotinkonzentration im Plasma. Die MPO-Defiziente- und die Kontrollgruppe zeigten hierbei vergleichbare Plasmanikotin-Spiegel.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass PMN, die üblicherweise dem Immunsystem zugeschrieben und als Abwehrzellen angesehen werden [Ross et al. 1999], noch darüber hinaus Funktionen im Körper wahrnehmen.

Dass scheinbar gegensätzliche Aktivitäten neutrophiler Granulozyten bestehen, ist bekannt, sozusagen ein Paradoxon, da ihnen die Aufgabe der Pathogenabwehr eigen ist, doch offensichtlich ebenfalls Gewebsschäden durch PMN verursacht werden [Smith et al. 1994].

Durch unsere Ergebnisse können wir zeigen, dass die PMN durch ihre Aktivierung akut Einfluss auf den Gefäßtonus nehmen, im Sinne einer Endotheldysfunktion. Neben der unbestrittenen Pathogenabwehr übernehmen neutrophile Granulozyten also auch noch weitere, bisher nicht beschriebene Funktionen in vivo. Gleichzeitig belegen wir, dass der Mechanismus, über den die PMN akut Einfluss auf den Gefäßtonus nehmen, über MPO vermittelt ist. Diesen Schluss können wir aus der Beobachtung ziehen, dass in den untersuchten MPO-Defizienten Individuen trotz gleichen Ausmaßes an Granulozytenaktivierung keine Verschlechterung der Endothelfunktion auftrat. Wir zeigen also mit unseren Daten einen deutlichen Zusammenhang zwischen PMN Aktivierung, MPO-Sezernierung und konsekutiv akuter endothelialer Dysfunktion.

In anderen Arbeiten wurde bereits die Verbindung von verminderter NO-Bioverfügbarkeit zur Endotheldysfunktion beschrieben [Cai et al. 2000], auch der Bezug der MPO zu diesen Mechanismen konnte gezeigt werden [Baldus et al. 2004, Eiserich et al. 2001, Nicholls et al. 2005]; doch wurde der Einfluss der PMN auf die Endothelfunktion nicht in dem Maße mit einbezogen wie wir es in dieser Studie taten. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit legen derzeitige veröffentlichten Studien über MPO-Defizienz ihr Augenmerk auf Infektionen [Aratani et al. 2004], maligne Erkrankungen [Lanza et al. 1998] und Genanalyse [DeLeo et al. 1998, Kutter et al. 1998, Marchetti et al. 2004, Romano et al. 1997, Tobler et al. 1989].

Bekanntermaßen sind endotheliale Dysfunktion und die Entwicklung von Atherosklerose vor allem Prozesse der akuten und chronischen vaskulären Inflammation. Arbeitsgruppen, die sich mit diesem Aspekt befassen, zeigen, dass Leukozyten einen wesentlichen Anteil daran haben [Ross et al. 1999], zumal sie in frühen Stadien von Atheroskleroseläsionen zu finden sind [Libby et al. 2002]. Die antiinflammatorische Wirkung des NO scheint hier nicht greifen zu können. Das lässt sich auf verschiedene Mechanismen zurückführen:

1. Atherosklerotische Läsionen inhibieren die endotheliale Produktion von NO [Libby et al. 2002].
2. Die antiinflammatorische Wirkung des NO wird durch MPO verringert, da die NO Produktion und/oder Bioverfügbarkeit herunterreguliert wird [Eiserich et al. 2002].
3. NO wird mittels MPO zu Nitrit oxidiert und so abgebaut [van der Vliet et al. 1997].

Zhang et al. zeigte 2001 in seiner Arbeit „Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease“, dass hohe MPO-Spiegel mit dem Auftreten koronarer Herzerkrankung vergesellschaftet sind, so dass die MPO als Indikator für das Vorliegen einer KHK beziehungsweise als wichtiger pathophysiologischer Faktor für diese Erkrankung diskutiert wurde [Zhang et al. 2001]. In einer Arbeit von Baldus et al.: „Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion“ wurde der direkte

Einfluss der MPO als Mediator der Endotheldysfunktion durch NO-Konsumption aufgezeigt [Baldus et al. 2004]. Bei dieser Arbeit wurde jedoch keine Negativkontrolle im Sinne eines Vergleiches von MPO-Defizienten Individuen mit einbezogen. Im Rahmen unserer Arbeit konnten wir die oben beschriebenen Vermutungen und Ergebnisse bestätigen und durch den direkten Vergleich der MPO-Defizienten- und der Kontrollgruppe die Einflüsse der PMN und der MPO als Mediatoren der Endotheldysfunktion unterstreichen.

Der Ausblick, dass möglicherweise endothelialer Dysfunktion vorgebeugt werden kann, indem man zum Beispiel die Myeloperoxidasesekretion aus neutrophilen Granulozyten verhindert, ist kritisch zu bewerten. Schließlich sind die in dieser Arbeit präsentierten Auswirkungen lediglich ein Ausschnitt aus dem komplexen System der Granulozyten. Andere Arbeitsgruppen zeigen zum Beispiel ein erhöhtes Malignomrisiko bei MPO-Defizienz. Somit müssen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse als Teil eines großen – noch nicht vollständig verstandenen – Systems betrachtet werden.

6 Zusammenfassung

Die seit den 40er Jahren bekannte Myeloperoxidase ist in vielen Bereichen Gegenstand intensiver Forschung. Anfänglich wurde das, vor allem in neutrophilen Granulozyten vorkommende Hämprotein, vornehmlich als Mediator des Immunsystems verstanden.

Mittlerweile befassen sich unter anderem Forschungsgruppen der Kardiologie, der Hämatologie/Onkologie, der Pneumologie und der Gynäkologie mit der MPO. Vor allem die in den 50er Jahren erstmals beschriebene MPO-Defizienz beschäftigt viele dieser Arbeitsgruppen, da z. B. ein Zusammenhang zwischen MPO-Defizienz und Malignomen vermutet wird.

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns auf die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten (mittels Nikotin) und die folgende Sezernierung der MPO konzentriert. Zusätzlich haben wir den Einfluss der MPO auf die Endothelfunktion untersucht. Dadurch, dass in unserem Studiendesign sowohl MPO-Defiziente als auch MPO-kompetente Probanden eingeschlossen waren, konnten wir auf die direkte Wirkung der MPO im Menschen schließen.

Es hat sich gezeigt, dass nach Aktivierung der PMN ausschließlich die Endothelfunktion der MPO-kompetenten Probanden (Kontrollgruppe) schlechter geworden ist. Bei den MPO-Defizienten konnten wir keine signifikante Endotheldysfunktion feststellen.

Unsere zugrunde liegende Hypothese, dass die Aktivierung von PMN durch die Ausschüttung von MPO zu einer Verschlechterung der endothelialen Funktion führt, konnten wir bestätigen.

7 Literaturverzeichnis

- Abu-Soud HM, Hazen SL (2000) Nitric oxide is a physiological Substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem* 48: 37524-37532
- Agner K (1941) Verdoperoxidase. A ferment isolated from leucocytes. *Acta Chem. Scand. A* 2: 1-62
- Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangre D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC, Selwyn AP (1995) Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 26: 1235-1241
- Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Dinauer MC, Maeda N, Koyama H (2004) In Vivo Role of Myeloperoxidase for the Host Defense. *Jpn J Infect Dis* 57: 15
- Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ Res* 87: 840-844
- Baldus S, Eiserich JP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, Ma W, Tousson A, White CR, Bullard DC, Brennan ML, Lusis AJ, Moore KP, Freeman BA (2001) Endothelial transzytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest* 108: 1759-1770
- Baldus S, Heeschen C, Meinertz T et al. (2003) Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 108: 1440-1445
- Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP et al. (2004) Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 37: 902-911
- Baldus S, Rudolph V, Roiss M, Wulf ID, Rudolph T, Eiserich JP, Sydow K, Lau D, Szöcs K, Klinke A, Kubala L, Berglund L, Schrepfer S, Deuse T, Haddad M, Risius T, Klemm H, Reichenspurner HC, Meinertz T, Heitzer T (2006) Heparins Increase Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by Liberating Vessel-Immobilized Myeloperoxidase. *Circulation* 113: 1871-1878
- Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993) Matrix Metalloproteinases: A Review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4: 197

- Brennan ML, Penn MS, Van Lente F et al. (2003) Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med* 349: 1595-1604
- Carr AC, McCall MR, Frei B (2000) Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1716-1723
- Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos, Bull C, Thomas O, Robinson J, Deanfield JE (1993) Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 88: 2149-2155
- Cepinskas G, Sandig M, Kvietys PR (1999) PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. *JCS* 112: 1937-1945
- Corretti M, Anderson T, Benjamin E, Celermajer D, Charbonneau F, Creager M, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R (2002) Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 39(2): 257-260
- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H et al. (2001) A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 107: 1255-1262
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ (2007) Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance. *Circulation* 115: 1285-1295
- DeLeo FR, Goedken M, McCormick SJ, Nauseef WM (1998) A Novel Form of Hereditary Myeloperoxidase Deficiency Linked to Endoplasmic Reticulum/Proteasome Degradation. *J Clin Invest* 101: 2900-2909
- Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM et al. (1998) Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation* 98: 17-24
- Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML et al. (2002) Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 296: 2391-2394
- Frick M, Neunteufl T, Schwarzacher SP, Wascher TC, Weidinger F (2002) Flow-mediated vasodilation (FMD) of the brachial artery: methodology and clinical relevance. *J Kardiol* 9: 439-444
- Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW (2001) 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

- Graham GS (1920) The neutrophilic granules of the circulating blood in health and disease. N.Y. State J. Med. 20: 46-55
- Hansson M, Olsson I, Nauseef WM (2006) Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. Arch Biochem Biophys 445: 214-224
- Heinecke JW (1999) Mechanisms of oxidative damage by myeloperoxidase in atherosclerosis and other inflammatory disorders. J Lab Clin Med 133: 321-325
- Heitzer T, Baldus S, von Kodolitsch Y, Rudolph V, Meinertz T (2005) Systemic Endothelial Dysfunction as an Early Predictor of Adverse Outcome in Heart Failure. Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 1174-1179
- Iho et al. (2003) Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF- κ B. Journal of Leukocyte Biology 74: 1-9
- Jonas MA, Oates JA, Ockene JK, Hennekens CH (1992) Statement on smoking and cardiovascular disease for health care professionals. Circulation 86: 1664-1669
- Kizaki M, Miller CW, Selsted ME, Koeffler HP (1994) Myeloperoxidase (MPO) gene mutation in hereditary MPO deficiency. Blood 83(7): 1935-1940
- Klebanoff SJ, Waltersdorff AM, Rosen H (1984) Antimicrobial activity of myeloperoxidase. Methods Enzymol 105: 399-403
- Klebanoff SJ (2005) Myeloperoxidase: friend and foe. Journal of Leukocyte Biology 77: 598-624
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 4651-4655
- Kutter D (1998) Prevalence of myeloperoxidase deficiency: population studies using Bayer-Technicon automated haematology. J Mol Med 76: 669-675
- Lanza F (1998) Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. J Mol Med 76: 676-681
- Lau D, Mollnau H, Eiserich JP et al. (2005) Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. PNAS 102: 431-436
- Lau D, Baldus S (2006) Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. Pharmacol Ther 111(1): 16-26
- Lauer T, Kleinbongard P, Kelm M (2002) Indexes of NO bioavailability in human blood. News Physiol Sci 17: 251-255
- Leeson CP, Whincup PH, Cook DG, Donald AE, Papacosta O, Lucas A, Deanfield JE (1997) Flow-mediated dilation in 9-11-year-old children: the

- influence of intrauterine and childhood factors. *Circulation* 96: 2233-2238
- Libby et al. (2002) Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135
 - Mancini GB, Yeoh E, Abbot D, Chan S (2002) Validation of an automated method for assessing brachial artery endothelial dysfunction. *Can J Cardiol* 18: 259-262
 - Marchetti C, Patriarca P, Solero GP et al. (2004) Genetic studies on myeloperoxidase deficiency in Italy. *Jpn J Infect Dis* 57(5): 10-12
 - Marletta MA (1993) Nitric Oxide Synthase Structure and Mechanism. *JBC* 17: 12231-12234
 - Masuda M, Suzuki T, Friesen MD, Ravant JL, Cadet J, Pignatelli B, Nishino H, Ohshima H (2001) Chlorination of Guanosine and Other Nucleosides by Hypochlorous Acid and Myeloperoxidase of Activated Human neutrophils. *J Biol Chem* 44: 40486-40496
 - Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329: 2002-2012
 - Nauseef WM, Cogley M, McCormick S (1996) Effect of the R569W missense mutation on the biosynthesis of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 271: 9546-9549
 - Nauseef WM (1998) Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. *J Mol Med* 76: 661-668
 - Nauseef WM (2004) Lessons from MPO deficiency about functionally important structural features. *Jpn J Infect Dis* 57(5): 4-5
 - Neunteufl T, Heher S, Kostner K, Mitulovic G, Lehr S, Khoschsorur G, Schmid R, Maurer G, Stefenelli T (2002) Contribution of nicotine to acute endothelial dysfunction in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol* 39: 251-256
 - Nicholls SJ, Hazen SL (2005) Myeloperoxidase and Cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1102-1111
 - Nikpoor B, Turecki G, Fournier C, Th roux P, Rouleau GA (2001) A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. *American Heart Journal* 142:336-339
 - Olsen RL, Little C (1984) Studies on the subunits of human myeloperoxidase. *Biochem. J.* 222: 701-709
 - Petrides PE (1998) Molecular genetics of peroxidase deficiency. *J Mol Med* 76: 688-698
 - Petrides PE, Nauseef WM (1998) Molecular and clinical aspects of neutrophil peroxidase deficiency:multidisciplinary approaches on an international scale. *J Mol Med* 76: 659-660

- Quyyumi AA (2003) Prognostic Value of Endothelial Function. *Am J Cardiol* 91: 19-24
- Radomski MW, Palmer RM, and Moncada S (1987) Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2: 1057-1058
- Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Laurer T, Heiß C, Strauer BE, Feelisch M, Kelm M (2002) Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest* 109: 1241-1248
- Reinders JH, Brinkman HJ, van Mourik JA, de Groot PG (1986) Cigarette smoke impairs endothelial cell prostacyclin production. *Arteriosclerosis* 6(1): 15-23
- Romano M, Dri P, Dadalt L, Patriarca P, Baralle FE (1997) Biochemical and molecular characterization of hereditary myeloperoxidase deficiency. *Blood* 90: 4126-4134
- Ross R (1999) Mechanisms of Disease: Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 340: 115-126
- Rudolph TK, Rudolph V, Baldus S (2008) Contribution of Myeloperoxidase to Smoking-dependent Vascular Inflammation. *Proc Am Thorac Soc* 5: 820-823
- Rudolph V, Andrié RP, Rudolph TK, Friedrichs K, Klinke A, Hirsch-Hoffmann B, Schwoerer AP, Lau D et. al. (2010) Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nature Medicine* 16(4): 470-474
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467
- Smith JA (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* 56(6): 672-686
- Sorensen KE, Celermajer DS, Spiegelhalter DJ, Georgakopoulos D, Robinson J, Thomas O, Deanfield JE (1995) Non-invasive measurement of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J* 74: 247-253
- Tobler AM, Selsted E, Miller CW, Johnson KR, Novotny MJ, Rovera G, Koeffler HP (1989) Evidence for a pretranslational defect in hereditary and acquired myeloperoxidase deficiency. *Blood* 73: 1980-1986
- Tsikas D (2000) Simultaneous Derivatization and Quantification of the Nitric Oxide Metabolites Nitrite and Nitrate in Biological Fluids by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal Chem* 72: 4064-4072
- van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P (2009) Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and

- disease. *Antioxid Redox Signal* 11(11): 2899-2937
- van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE (1997) Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 272(12): 7617–7625
 - Williams DB (1995) Calnexin: a molecular chaperone with a taste for carbohydrate. *Biochem Cell Biol* 73: 123
 - Zeiher AM, Schächinger V, Minners J (1995) Long-term Cigarette Smoking Impairs Endothelium-Dependent Coronary Arterial Vasodilator Function. *Circulation* 92: 1094-1100
 - Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL (2001) Association Between Myeloperoxidase Levels and Risk of Coronary Artery Disease. *JAMA* 286: 2136-2142
 - Zhong C, Quanzhong Y, Genshan M, Hua Z, Ruolong Z, Jiahong W, Chunheng G (2009) Myeloperoxidase gene-463G > A polymorphism and premature coronary artery disease. *Genetics and Molecular Biology* 32(2): 260-263

8 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. Stephan Baldus für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung, diese Dissertationsarbeit erstellen zu können.

Des Weiteren gilt mein großer Dank Frau Dr. med. Tanja und Herrn Dr. med. Volker Rudolph, die mir durch ihre Betreuung stets eine große Hilfe waren und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dem Laborteam möchte ich ganz besonders danken. Sowohl für die Einarbeitung als auch für die permanente fachliche und psychische Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Anna Klinke, Dr. rer. nat. Denise Lau, Dr. rer. nat. Eike-Christin von Leitner und Hartwig Wiebold. Kai Friedrichs möchte ich für seine stete Hilfsbereitschaft und seine Unterstützung bei den sonographischen Untersuchungen danken.

Großer Dank gilt außerdem Dr. Thomas Rau, Dr. rer. nat. Hilke Andresen und Dr. rer. nat. Edzard Schwedhelm für ihre Unterstützung bei der Genotypisierung sowie der Nikotin- und Nitrit-Bestimmung.

Ganz herzlicher Dank gilt meinem Bruder Olaf Coym und meinen Eltern Dr. med. Olaf und Christa Coym, die mich in jeder Lebenslage uneingeschränkt unterstützt haben. Meinen Großeltern Ingrid und Hans-Gerd Möller möchte ich für ihr Interesse und ihre motivierenden Worte danken.

Bei Kaike Schorsch und Helga Seifert bedanke ich mich ganz herzlich für ausdauerndes Korrekturlesen.

Moritz Seifert danke ich ganz besonders für seine Unterstützung, seine Geduld und die Hilfe beim Layout.

Inbesondere möchte ich mich auch bei allen Probanden bedanken, die ihre Zeit für diese Arbeit geopfert haben.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Coym
Vorname: Anja
Geburtsdatum: 02.06.1982
Geburtsort: Hamburg

Schulbildung:

1988 – 1992 Grundschole Döhrnstr., Hamburg
1992 – 2001 Gymnasium Corveystr., Hamburg
1998 – 1999 Sidney High School, Sidney, MT, USA
2001 Abitur

Hochschulstudium

2002 – 2009 Studium der Humanmedizin (Universität Hamburg)
2005 Ärztliche Vorprüfung
2008 – 2009 Praktisches Jahr
Universitetshospital Odense, Dänemark, Anästhesie
Marienkrankenhaus, Hamburg, Chirurgie
Marienkrankenhaus, Hamburg, Innere Medizin
2009 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

2009 Assistenzärztin der Inneren Medizin im Marienkrankenhaus Hamburg

10 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ASS	Acetylsalizylsäure
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	Body-Mass-Index
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺	Kalzium
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl ⁻	Chlorid
CRP	C-reaktives Protein
CSE	Cholesterin-Synthese-Enzym
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent Assay
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FMD	Flow Mediated Dilatation
GC / MS	Gaschromatographie / Massenspektrometrie
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglobin
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HDL	High-Density-Lipoprotein
HLP	Hyperlipoproteinämie
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorige Säure
HTN	Hypertonus

IL-8	Interleukin 8
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
kDa	Kilo Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
MPO	Myeloperoxidase
MPXI	Myeloperoxidase-Index
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NMD	Nitroglycerin Mediated Dilatation
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₂ [·]	Stickstoffdioxid
NOS	NO-Synthasen
NO ₂ Tyr	Nitrotyrosin
O ₂ ⁻	Superoxid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFB-Bromid	Pentafluorobenzyl-Bromid
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RCF	Relative Centrifugal Force
RR _{dia}	Diastolischer Blutdruck
RR _{sys}	Systolischer Blutdruck
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
Taq	Thermus aquaticus
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TMB	Tetramethylbenzidin

11 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: