UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum Hamburg, Cardiovascular Research Center

Direktor: Prof. Dr. Stefan Blankenberg

Bedeutung der leukozytären Peroxidase Myeloperoxidase für das Angiotensin II-vermittelte vaskuläre Remodeling im Mausmodell

Dissertation

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

vorgelegt von:

Kevin Schadwald
aus Heide
Hamburg 2014

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.11.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

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

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Arterieller Hypertonus als Risikofaktor für Herz-Kreislauferkrankungen 1

1.1.1 Hintergrund 1

1.1.2 Definition und Einteilung 1

1.1.3 Epidemiologie 3

1.1.4 Arterieller Hypertonus und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) 3

1.2 Das menschliche Gefäßsystem 6

1.2.1 Aufbau arterieller Gefäße 6

1.2.2 Das Endothel 7

1.2.2.1 Physiologische Funktion 7

1.2.2.2 Verminderte NO°-Bioverfügbarkeit und Atherosklerose 8

1.3 Der neutrophile Granulozyt 10

1.3.1 Granula 10

1.3.2 Funktion 11

1.4 Myeloperoxidase 13

1.4.1 Katalytische Aktivität und mikrobizide Eigenschaften 15

1.4.2 Wert in der Entstehung von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose sowie extramikrobizide Eigenschaften 18

2 Zielsetzung 23

3 Material und Methoden 24

3.1 Material 24

3.1.1 Verbrauchsmaterialien 24

3.1.2 Reagenzien und Arzneistoffe 24

3.1.3 Puffer und Lösungen 26

3.1.4 Reaktionskits 27

3.1.5 Antikörper 27

3.1.6 Mauslinien 28

3.1.7 Laborgeräte, Apparaturen und Software 28

3.2 Methoden 29

3.2.1 Tierexperimentelles Modell 29

3.2.2 Befüllung der osmotischen Minipumpen 29

3.2.3 Implantation der osmotischen Minipumpen 30

3.2.4 Probenentnahme 30

3.2.5 Gewebehomogenisierung 31

3.2.6 Proteinbestimmung mittels Pierce BCA-Protein Assay 31

3.2.7 Quantifizierung von MPO in murinem Plasma 32

3.2.8 Messung der Endothelfunktion im Organbad 33

3.2.9 Quantifizierung von Endothelfunktionsmarkern 34

3.2.10 Histologische Messung der Mediadicke 35

3.2.11 Isolierung von humanen PMN aus venösem Humanblut 36

3.2.12 Stimulierung humaner PMN mit AT II und/oder PMA und anschließende Quantifizierung von MPO 37

3.2.13 Statistik 37

4 Ergebnisse 38

4.1 Quantifizierung von MPO in murinem Plasma 38

4.2 Messung der Endothelfunktion im Organbad 39

4.3 Quantifizierung von Endothelfunktionsmarkern 46

4.4 Histologische Messung der Intima-Mediadicke 49

4.5 Quantitative Messung von MPO nach PMN Stimulation 52

5 Diskussion 55

5.1 Wirkung von AT II auf PMN 55

5.2 Wirkung von MPO und AT II auf die Gefäßfunktion 55

5.3 Wirkung von MPO und AT II auf strukturelle Veränderungen am Gefäß 58

5.4 MPO als therapeutisches Target 60

5.5 Ausblick 61

6 Zusammenfassung 62

7 Abkürzungsverzeichnis 63

8 Literaturverzeichnis 66

9 Danksagung 78

10 Lebenslauf 79

11 Eidesstattliche Erklärung 80

1 Einleitung

1.1 Arterieller Hypertonus als Risikofaktor für Herz-Kreislauferkrankungen

1.1.1 Hintergrund

Die Haupttodesursache in industrialisierten Ländern sind Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, vor Infektionen und malignen Neoplasien (WHO 2008). Laut statistischem Bundesamt verstarben 2012 insgesamt 349 217 Menschen an einer Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems, dies entsprach 40,2 % aller Todesfälle in der Bundesrepublik Deutschland. Haupttodesursachen unter den Herz-Kreislauferkrankungen sind neben der chronisch ischämischen Herzkrankheit der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz (Statistisches Bundesamt 2012). Zu den wichtigsten Risikofaktoren, eine Erkrankung des Kreislaufsystems zu erleiden, gehören neben der genetische Disposition, dem Rauchen, der Fettleibigkeit, der Zuckerkrankheit und den Störungen im Fettstoffwechsel auch die arterielle Hypertonie.

1.1.2 Definition und Einteilung

Die *European Society of Hypertension*, die *European Society of Cardiology* und die Deutsche Hochdruckliga beschreiben in ihren Leitlinien, dass jede Blutdruckerhöhung als Hypertonie gelten sollte. Der arterielle Hypertonus kann nach verschiedenen Kriterien eingeteilt werden. Als die beiden Wichtigsten sind die Einteilung nach Höhe des systolischen und diastolischen Blutdruckes in mmHg und die Einteilung nach der Genese zu nennen.

Der Tabelle 1 ist die Einteilung der WHO zu entnehmen. Hierbei ist zu beachten, dass bei Patienten mit einem hoch-normalen (*borderline*) Blutdruck ein Handlungsbedarf bestehen kann, wenn weitere Risikofaktoren für eine kardiovaskuläre Erkrankung vorliegen. Durch die 1999 erschienene Hot-Studie (*Hypertension optimal treatment*) änderte die WHO die Schwelle zum Hypertonus von vorher >160/>95 mmHg auf jetzt >140/>90 mmHg (Hansson 1999).

Tabelle 1: Einteilung der arteriellen Hypertonie (Moser 1999)

Kategorie	Systolisch (mmHg)	Diastolisch (mmHg)
normal	120-129 und/oder	80-84
hoch-normal (*borderline*)	130-139 und/oder	85-89
Hypertonus Grad 1	140-159 und/oder	90-99
Hypertonus Grad 2	160-179 und/oder	100-109
Hypertonus Grad 3	>180 und/oder	>110

Nach der Genese wird die Hypertonie in eine primäre (essentielle) Hypertonie und eine sekundäre Hypertonie eingeteilt. Hierbei macht die primäre Hypertonie mit ca. 90 % den Großteil der Hypertoniker aus. Sie wird als multifaktorelle und polygene Erkrankung gesehen und hängt mit verschiedenen Ernährungsfaktoren, wie Übergewicht und Kochsalzaufnahme, Stressfaktoren, Alter und Nikotinabusus zusammen. Jedoch bleibt die Ursache dieser Form der Hypertonie noch ungeklärt und wird weiterhin als idiopathisch angesehen. Dagegen wird bei der sekundären Hypertonie eine bestehende Erkrankung als Ursache für die Blutdruckerhöhung gesehen. In Tabelle 2 sind diese Erkrankungen zusammengefasst.

Tabelle 2: Einteilung der sekundären Hypertonieformen

renale Hypertonie	
renoparenchymatöse Erkrankungen	Glomerulonephritis, diabetische Glomerulosklerose
renovaskuläre Erkrankungen	Nierenarterienstenose
endokrine Hypertonie	Hyperaldosteronismus Phäochromozytom andere maligne Neoplasien Morbus Cushing Hyperthyreose
Schlafapnoe-Syndrom	
neurogene Hypertonie	Enzephalitis
psychogen	Schmerzen

1.1.3 Epidemiologie

Die weltweite Prävalenz der arteriellen Hypertonie liegt bei ca. 26,4 %, wobei Männer mit 26,6 % häufiger als Frauen betroffen sind (Kearney et al. 2005). Im europäischen Vergleich belegt die deutsche Bevölkerung mit 55,3 % Hypertonieprävalenz einen Spitzenplatz (Wolf-Maier et al. 2003). Laut dem Monica (*Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease*) Projekt der WHO steigt die Prävalenz mit steigendem Lebensalter und zusätzlich findet eine Umverteilung zwischen Männern und Frauen statt. So leiden ca. 50 % der 50-jährigen an Bluthochdruck, wobei es im höheren Alter bereits 70 % sind. Außerdem sind im mittleren Alter mehr Männer als Frauen an erhöhten Blutdruckwerten erkrankt, im höheren Alter sind es dann mehr Frauen (Gasse et al. 2001).

1.1.4 Arterieller Hypertonus und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Ein zentrales Stellglied in der Regulation des arteriellen Blutdrucks ist das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Renin ist eine Protease und wird durch den juxtaglomerulären Apparat bei zu niedrigem Nieren-perfusionsdruck ausgeschüttet. Nach der Freigabe in die Blutzirkulation trifft Renin auf das Substrat Angiotensinogen, das in der Leber synthetisiert wird. Angiotensinogen wird durch Proteolyse zu Angiotensin I (AT I) gespalten. Das hauptsächlich aus der Lunge stammende Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) wandelt AT I in Angiotensin II (AT II), den Haupteffektor dieses Systems, um. ACE wird aber nicht nur in der Lunge produziert, sondern kommt auch als vaskuläre Form vor (Triggle et al. 2012). AT II wirkt als starker Vasokonstriktor an Gefäßen. Diese Wirkung wird über den AT II-Typ-1-Rezeptor vermittelt. Neben dem AT II-Typ-1-Rezeptor gibt es noch den AT II-Typ-2-Rezeptor, dessen Wirkung noch nicht vollständig bekannt ist, dem aber eher anti-atherosklerotische Wirkungen zugeschrieben werden (Batenburg et al. 2005, Iwai et al. 2005).

Über den AT II-Typ-1-Rezeptor wird die Freisetzung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebenniererinde gesteuert. Die Vasokonstriktion führt zu einer Erhöhung des peripheren Widerstandes. Aldosteron hingegen bewirkt eine vermehrte Natrium- und damit auch Wasserretention, was ein erhöhtes Gesamtvolumen zur Folge hat. Beide Reaktionen gehen mit einer Erhöhung des Blutdruckes einher und sind sehr wichtige Mechanismen in der Autoregulation der Nierendurchblutung und der Regulation des Wasserhaushalts. Aber allein der erhöhte Blutdruck führt zur Schädigung des Endothels und damit zur endothelialen Dysfunktion.

AT II wirkt über den AT II-1-Rezeptor allerdings nicht nur auf den Blutdruck, sondern auch auf andere Funktionen des Endothels und der glatten Gefäßmuskulatur. So steigert die Aktivierung des Rezeptors die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die an der Aktivierung und Migration von Leukozyten beteiligt sind. Genauer wird dieser Mechanismus im Kapitel 1.3.2 beschrieben. Einige an diesem Vorgang beteiligte Substanzen, wie Interleukin 1beta (IL-1-β), Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-α) und Interleukin 6 (IL-6) steigern die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase. Die NADPH-Oxidase kommt nicht nur in phagozytierenden Zellen, wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten vor, sondern auch in glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten (Griendling et al. 1994). Die reaktiven Sauerstoffspezies sind wichtige Mitspieler in der Entstehung und Progression von Atherosklerose. Sie reagieren u. a. mit Low-Density-Lipoproteinen (LDL) und führen zu einer vermehrten Aufnahme dieser durch Makrophagen. Die Makrophagen werden zu Schaumzellen, die sich in der Gefäßwand ansammeln und die atherosklerotischen Läsionen bilden (Keidar et al. 2001). Weiterhin führt AT II zu einer Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und somit zu einer Hypertrophie der Tunica media arterieller Blutgefäße (Kintscher et al. 2003).

El Bekay et al. und Hazan-Halevy et al. beschreiben in ihren Arbeiten die stimulierende Wirkung von AT II auf menschliche Polymorphkernige Neutrophile (PMN) und weitere phagozytierende Zellen.

Außerdem zeigen die Autoren, dass PMN, die mit AT II inkubiert wurden, eine höhere NADPH-Oxidase-Aktivität zeigen und mehr ROS produzieren als Zellen, die zusätzlich mit dem AT II-1-Rezeptor-Inhibitor Irbesartan inkubiert wurden. Durch die reaktiven Sauerstoffspezies wird u. a. der redox-sensitive Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert (El Bekay et al. 2003, Hazan-Halevy et al. 2005). Dies führt zu einer vermehrten Freisetzung von Zytokinen und chemotaktischen Substanzen. Außerdem werden auf der Zelloberfläche vermehrt Adhäsionsmoleküle ausgebildet, sodass im Zusammenspiel mit den vorherigen Veränderungen weitere Immunzellen angelockt werden und es zu einer Entzündungsreaktion kommen kann.

Bei einer Entzündungsreaktion kommt es zum einen zu einer Erhöhung der Endothelpermeabilität und konsekutiv zu einer Erhöhung der extravasalen Flüssigkeit. Zum anderen können nun Leukozyten, die durch chemotaktische Moleküle aktiviert werden, aus der Blutbahn in den extravasalen Raum migrieren und den Ort der Entzündung infiltrieren. Der Mechanismus der Leukozytenmigration wird in Kapitel 1.3.2 genauer behandelt. Zu den ersten Immunzellen gehören u. a. die neutrophilen Granulozyten, die in Kapitel 1.3 näher behandelt werden. Der letzte Schritt der Entzündungsreaktion ist der Gewebeumbau, der auch Remodeling genannt wird. In den meisten Fällen führt das Remodeling nicht zur gleichen Bindegewebsstruktur und es entsteht eine Narbe, die mit einer Einschränkung der Funktionalität einhergeht (Cheng et al. 2005).

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass das RAAS und im Speziellen AT II über die beschriebenen Mechanismen (NADPH-Oxidase-Aktivierung, erhöhte ROS-Produktion, Ausschüttung von Immunsystemmodulatoren, Ausbildung von Adhäsionsmolekülen und Initiation und Aufrechterhaltung der Enzündungsreaktion) ein wichtiger Teilhaber in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion ist.

1.2 Das menschliche Gefäßsystem

Gemäß einer groben Einteilung besteht das Gefäßsystem des menschlichen Körpers aus einem Hoch- und einem Niederdrucksystem. Das Hochdrucksystem (arterielles System) setzt sich aus dem linken Herzen, der Aorta, den großen Arterien und den sich immer feiner verzweigenden Arteriolen zusammen. Die letzteren stellen über die Mikrozirkulation - das Kapillarsystem - eine Verbindung zum Niederdrucksystem (venöses System) her. Von den Kapillaren ausgehend schließen sich Venolen, die kleinen Venen, die großen zum Herzen führenden Venen und das rechte Herz an. Im arteriellen System werden die herznahen elastischen Gefäße von den in der Peripherie liegenden muskulären Gefäßen unterschieden. Diese Unterscheidung ist wichtig für die Funktion des Herz-Kreislaufsystems. So können die Arterien vom elastischen Typ, wie es die herznahe Aorta ist, das vom linken Herzen ausgeworfene Blutvolumen kurzfristig speichern und somit für eine kontinuierliche Durchblutung auch in der Diastole sorgen. Die Gefäße vom muskulären Typ bilden den peripheren Widerstand, der eine wichtige Regelgröße für die Aufrechterhaltung und Steuerung des Blutdruckes darstellt.

1.2.1 Aufbau arterieller Gefäße

Die arteriellen Gefäße zeigen einen dreischichtigen Wandaufbau. Von außen nach luminal gesehen sind zu nennen: die bindegewebige Adventitia, die muskuläre oder elastische Media und die Intima. Die Adventitia setzt sich aus der Membrana elastica externa und der Tunica externa zusammen. Sie beinhaltet die für die Eigenversorgung der Gefäßwand wichtigen Gefäße und regulierenden sympathischen Nervenfasern. Die Tunica media besteht bei Gefäßen vom muskulären Typ hauptsächlich aus zahlreichen glatten Muskelzellen, welche sich in vielen Lagen ringförmig um das Lumen angeordnet haben. Bei Gefäßen vom elastischen Typ hingegen besteht sie hauptsächlich aus vielen elastischen Fasern. Die Intima setzt sich aus der Membrana elastica interna, dem bindegewebigen Stratum subendotheliale und dem auf der Basalmembran sitzenden Endothel zusammen.

1.2.2 Das Endothel

Das Endothel gehört zu den flachen Plattenepithelien, ebenso wie Endokard und Pleura, und entspringt embryonal gesehen genau wie diese dem Mesoderm. Die Zellen bilden einen einschichtigen Verband und kleiden sowohl Blut- als auch Lymphgefäße aus. Das Endothel kommt als kontinuierliche Schicht in den Gefäßen vor. Ausnahmen sind Organe mit Filterfunktion wie die Nieren, die ein fenestriertes Endothel besitzen, und die Leber sowie die Milz, deren Gefäße mit diskontinuierlichem Endothel ausgekleidet sind. Der Unterschied zwischen fenestriertem und diskontinuierlichem Endothel besteht aus der bei letzterem nicht vorhandenen Basalmembran und der Größe der durchtretenden Moleküle und Zellen.

1.2.2.1 Physiologische Funktion

Die ungefähr 10^{13} Endothelzellen im Körper eines erwachsenen Menschen bilden ein ca. 1 kg schweres Organ und haben als dieses verschiedenste Aufgaben. Sie funktionieren in erster Linie als nicht thrombogene Grenzfläche zwischen dem Blut und seinen Bestandteilen sowie dem Rest des Gefäßsystems. Des Weiteren haben sie aber auch Aufgaben bei der Initiation der Gerinnung, der Thrombolyse, der Thrombozytenaggregation, der Regulierung des Blutdrucks und der Synthese sowie dem Transport verschiedenster Moleküle. Die wichtigsten Syntheseprodukte sind neben dem vasodilatativ wirkenden Stickstoffmonoxid (NO°) und dem endothelialen ACE, vor allem Aktivatoren der Gerinnungskaskade. Zu diesen Aktivatoren gehören der von Willebrand-Faktor, Thromboxan A_2, Plättchenaktivierender Faktor und ihre Gegenspieler Prostazyklin, Antithrombin und der Plasminogen Aktivator. Weiterhin werden verschiedenste Entzündungsmediatoren, wie Interleukine und Leukotriene von Endothelzellen gebildet.

Das vasodilatativ wirksame NO° wird durch die Desaminierung von L-Arginin zu Citrullin gebildet. Diese Reaktion wird von der NO°-Synthase (NOS) und dem Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4) katalysiert. In Endothelzellen kommen zwei Isoformen der NOS vor. Zum einen die durch Zytokine induzierbare NOS (iNOS) und zum anderen die endotheliale NOS (eNOS), welche neben Scherstress auch durch Acetylcholin und Bradykinin aktiviert wird. Da NO° ein kleines und lipophiles Molekül ist, diffundiert es durch die Endothelzelle und den subendothelialen Raum bis hin zu den in der Tunica media liegenden glatten Muskelzellen. Hier bindet NO° an die Guanylatzyklase. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Die vasodilatative Wirkung wird von cGMP durch Aktivierung einer Proteinkinase vermittelt, welche durch Verminderung des Calziumeinstroms in die Muskelzelle die Aktivität der Myosinleichtkettenkinase verringert (Galley 2004, Triggle et al. 2012).

1.2.2.2 Verminderte NO°-Bioverfügbarkeit und Atherosklerose

Die endotheliale Dysfunktion geht den strukturellen Veränderungen der Gefäße bei der Artherosklerose voran.

Die endotheliale Dysfunktion wurde erstmals 1980 durch Furchgott und Zawadzki beschrieben und ist durch die fehlende oder veränderte Reaktion der Endothelzellen auf einen vasoaktiven Reiz charakterisiert. Die Autoren entdeckten, dass Endothelzellen und die auf ihnen präsentierten Acetylcholin-Rezeptoren maßgeblich für die Vasodilatation des Gefäßes verantwortlich sind (Furchgott und Zawadzki 1980). Ludmer et al. zeigten in ihrer Studie die vasokonstriktorische Wirkung von Acetylcholin auf atherosklerotisch veränderte Herzkranzgefäße und schlossen daraus auf einen Zusammenhang mit der Zerstörung des Endothels (Ludmer et al. 1986). Ein wichtiger Mitspieler in der Gefäßfunktion ist NO°. Die verringerte Bioverfügbarkeit von NO° ist einer der ersten Schritte zur gestörten Gefäßfunktion. Wie wichtig NO° hierbei ist zeigten Experimente an eNOS defizienten Mäusen, die durch die fehlende Vasodilatation an einem arteriellen Hypertonus leiden (Duplain et al. 2001).

Die im Kapitel 1.1.4 schon erwähnten reaktiven Sauerstoffspezies, zu welchen neben einer Vielzahl von freien Radikalen auch Moleküle wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und hypochlorige Säure (HOCl) gehören, haben großen Einfluss auf die NO°-Synthese. Sie oxidieren BH_4 und verändern damit den NOS-Komplex, sodass dieser nicht mehr die Entstehung von NO° sondern von Superoxid katalysiert (Stroes 1998). Neben der Beeinflussung der NO°-Synthese können ROS entstandenes NO° oxidieren und die Bioverfügbarkeit so verringern. Des Weiteren führen diese reaktionsfreudigen Moleküle – z. B. Moleküle wie Hydroxylradikale, Superoxidionen und verschiedene Lipidradikale - zu Kettenreaktionen bei denen neue Radikale entstehen. Die Radikale greifen die Zellmembran an und beeinflussen weitere für die Zelle funktionell wichtige Strukturen und Moleküle, wie zum Beispiel die DNA und verschiedene Signalproteine (Nussbaum et al. 2013). Eines dieser von ROS aktivierten Moleküle ist der Transkriptionsfaktor NFκB. Dieser Faktor ist redox-sensibel und initiiert auf DNA-Ebene die Produktion von Chemokinen, Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, vasoaktiven Substanzen und weiteren pro-entzündlichen Molekülen. Diese Moleküle sind, wie in Kapitel 1.1.4 beschrieben, wichtig bei der Initiation und Aufrechterhaltung einer Entzündung. Aber nicht nur chemotaktische Moleküle können Leukozyten zur Migration bringen, sondern auch der Mangel an NO°, z. B. durch die endotheliale Dysfunktion bedingt, wirkt als eine Art chemotaktisches Signal für die Leukozyten (Kubes et al. 1991). Diese können dann via Diapedese die Gefäßwand überwinden (Johnson-Léger et al. 2000).

Somit wirken reaktive Sauerstoffspezies zytotoxisch und pro-entzündlich (Cai und Harrison 2000) und sind wichtige Faktoren für die Reduzierung der NO°-Bioverfügbarkeit und somit der Entstehung der endothelialen Dysfunktion. Diese geht mit einer funktionellen Störung des Endothels einher und wird u. a. durch die ROS verursacht. Die Störung des Endothels verursacht eine weitere Entstehung von ROS, die wiederum zu einer geringeren Bioverfügbarkeit von NO° und zu einer Entzündungsreaktion führen.

Die endotheliale Dysfunktion kann im Zusammenspiel mit der oben erwähnten Entzündungsreaktion als Vorstufe der Artherosklerose gesehen werden. Diese bildet die Grundlage für eine koronare Herzkrankheit (KHK).

Bei der KHK kommt es zu einer langsam zunehmenden Stenosierung der Herzkranzgefäße durch einen stabilen Plaque. Dies geht mit einer Unterversorgung des Herzmuskelgewebes einher. Kommt es zur Ruptur dieses Plaques gelangen thrombogene Bestandteile aus dem Inneren in weiter distal gelegenen Koronarabschnitte. Dies kann schließlich in einem Myokardinfarkt enden und geht mit dem Untergang des betroffenen Herzareals einher.

1.3 Der neutrophile Granulozyt

Neutrophile Granulozyten bilden als Teil des angeborenen unspezifischen Immunsystems neben Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen eine wichtige Verteidigungslinie gegen von außen eindringende Mikroorganismen. Mit circa 2/3 der gesamten Leukozyten bilden sie den größten Anteil dieses Systems. Granulozyten werden nach ihrer Anfärbbarkeit in eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten eingeteilt. Der Durchmesser von neutrophilen Granulozyten liegt bei ungefähr 15 µm und beträgt somit das Doppelte der Größe eines Erythrozyten. Diese kugeligen Zellen beinhalten neben einem aus 3-5 Segmenten bestehenden Kern verschiedene Granula, welche wichtig für ihre Funktion sind. Aufgrund des Erscheinungsbildes des Kernes werden die neutrophilen Granulozyten auch polymorphkernige Neutrophile genannt.

1.3.1 Granula

Die oben erwähnten Granula werden im Zytoplasma der PMN gelagert und grob in Myeloperoxidase (MPO) positiv oder auch primäre beziehungsweise azurophile Granula und Myeloperoxidase negativ eingeteilt. Bei letzteren werden wiederum sekundäre von tertiären unterschieden. Wie der Name es andeutet beinhalten die azurophilen Granula hauptsächlich Myeloperoxidase.

Dieses Enzym hat wichtige Aufgaben sowohl bei der mikrobiziden Funktion der PMN als auch bei anderen Prozessen, bei denen neutrophile Granulozyten beteiligt sind und wird in Abschnitt 1.4 genauer behandelt. MPO-negative Granula werden aufgrund ihrer spezifischen Inhalte in sekundäre und tertiäre Granula unterteilt.

In Tabelle 3 sind einige der Moleküle aufgeführt. Außerdem sind wichtige Proteinkomplexe in der Membran verankert. So befindet sich Flavozytochrom b558, ein wichtiger Baustein der NADPH-Oxidase, an der Membran von MPO-negativen Granula (Borregaard und Cowland 1997).

Tabelle 3: Inhalte der Granula neutrophiler Granulozyten (Borregaard und Cowland 1997)

Myeloperoxidase positiv	**Myeloperoxidase negativ**	
primäre Granula	**sekundäre Granula**	**tertiäre Granula**
Myeloperoxidase Lysozyme Bactericidal permeability increasing protein Cathepsine Defensine Elastase	Lactoferrin Lysozyme Collagenase Gelatinase	Gelatinase Lysozyme

1.3.2 Funktion

Wenn Mikroorganismen die Haut oder Schleimhaut als erste Barriere überwunden haben, treten sie in Kontakt mit gewebeständigen Makrophagen oder anderen Vertretern des Immunsystems. Diese können den Eindringling phagozytieren oder reagieren auf ihn mit der Sekretion verschiedenster Substanzen, wie TNF-α, IL-1-β und Interleukin 17 (IL-17).

Die Wirkung dieser Moleküle ist vielseitig, doch ein wichtiger Teil ist die Wirkung auf Endothelzellen. Endothelzellen reagieren auf diesen Stimulus mit der Ausprägung von Selektinen (P- und E-Selektin), Integrinen und Vertretern der Immunoglobulin-Superfamilie (VCAM = vaskuläres Zelladhäsionsmolekül und ICAM = interzelluläres Adhäsionsmolekül) auf der luminalen Zellseite. Außerdem schüttet das Endothel wiederum chemotaktische Substanzen (Interleukin 8) aus, die PMN aktivieren. Dieser Schritt führt auf der Oberfläche der Neutrophilen zur Ausprägung von Adhäsionsmolekülen.

Als wichtige Moleküle sind PSLG-1 (P-Selektin-Ligand 1), ESL-1 (E-Selektin-Ligand 1), L-Selektin, CD11a/CD18 und CD11b/CD18 sowie CD44 zu nennen. Durch die Interaktion dieser Moleküle, sowohl auf der Endotheloberfläche als auch auf der Oberfläche der PMN kommt es zum einem zum ersten Kontakt zwischen Endothel und Leukozyt und zum anderen zu einer erneuten Veränderung der Leukozytenoberfläche, die die Ausbildung von Integrinen zur Folge hat. Dieser erste Kontakt geht in ein Rollen des Neutrophilen an der Endotheloberfläche über. Die endgültige feste Bindung des Leukozyten an das Endothel erfolgt durch die Interaktion zwischen Integrinen und den Vertretern der Immunoglobulin Superfamilie (Borregaard 2010, Lo et al. 1989, Springer 1994, Vestweber 2007). Nach der Bindung gibt es zwei Möglichkeiten durch die der neutrophile Granulozyt durch die Endothelschicht migrieren kann. Die erste Möglichkeit ist der Weg durch die Endothelzelle und die zweite Möglichkeit der Weg zwischen zwei Endothelzellen hindurch. Beide Wege werden wieder durch die Interaktion zwischen Integrinen und ICAM gesteuert.

Hat der PMN das Gefäß verlassen und den Grund für den Reiz, also den pathogenen Keim oder die Entzündung „gefunden“, spielen die NADPH-Oxidase und MPO eine wichtige Rolle bei der Beseitigung der Selbigen. Die NADPH-Oxidase katalysiert die Reaktion von Sauerstoffmolekülen zu Superoxid. Superoxid kann durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgesetzt werden. Weitere Moleküle die so entstehen können sind Hydroxidionen und Ozon. All diese Moleküle gehören zu den ROS und besitzen starke mikrobizide Eigenschaften.

Ein anderer Weg führt über das aus den azurophilen Granula stammende Enzym Myeloperoxidase. Dessen Eigenschaften werden in Kapitel 1.4 genauer behandelt.

Eine andere Möglichkeit der Beseitigung läuft über eine Vielzahl von Enzymen, wie Elastase, Defensine, Cathepsine, Lysozyme und Bactericidal permeability increasing protein. Diese Enzyme greifen den Eindringling nach Sekretion direkt an (Segal 2006, Segal 2005).

1.4 Myeloperoxidase

Das leukozytäre Enzym Myeloperoxidase gehört zur Gruppe der Säugetier-Häm-Peroxidasen (Davies et al. 2008) und wurde erstmals von Agner K. in den 1940ern nachgewiesen, dieser nannte sie aufgrund ihrer grünen Farbe noch Verdoperoxidase (Agner 1941).

MPO ist ein 146 kD großes Enzym, bestehend aus zwei Dimeren, welche sich wiederum aus einer leichten beta-Kette und einer schweren alpha-Kette zusammensetzen. Hierbei bilden die beiden schweren Ketten untereinander Disulfidbrücken aus, die das Enzym zusammenhalten (Lau und Baldus 2006). Das reaktive Zentrum der MPO wird von zwei Hämgruppen gebildet, welche kovalent an die schweren Ketten der jeweiligen Dimere gebunden sind (Fiedler et al. 2000). MPO ist das Produkt eines Genes, das auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert ist (Inazawa et al. 1989, Kudoh et al. 1988).

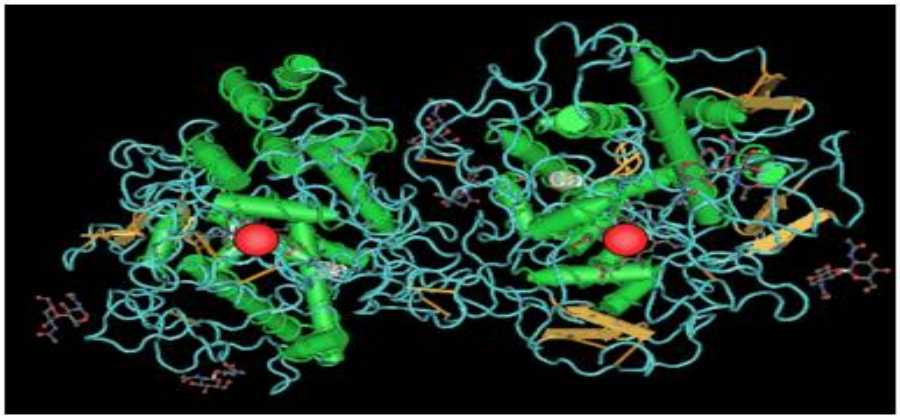

Abbildung 1: Die dreidimensionale Struktur von MPO. Zu sehen sind die beiden Dimere mit den dazugehörigen Hämgruppen (rote Kreise). Außerdem lassen sich noch die beta-Faltblatt (gelbe Abschnitte) von den alpha-Helices (grüne Abschnitte) unterscheiden. *(Lau und Baldus 2006)*

Hauptsächlich wird MPO in den azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert, kommt aber auch in niedrigeren Konzentrationen in Monozyten, gewebeständigen Makrophagen (Klebanoff 1999, Bos et al. 1978), Mikroglia (Nagra et al. 1997) und Kupfersternzellen (Brown et al. 2001) der Leber vor. Außerdem wurde MPO auch in Neuronen, die Granula enthalten, im zentralen Nervensystem nachgewiesen (Green et al. 2004). In den PMN macht MPO etwa 1 % - 5 % der Trockenmasse aus (Davies et al. 2008).

Da das Enzym stark kationisch geladen ist, hat es einen isoelektrischen Punkt im basischen Bereich. MPO wird von neutrophilen Granulozyten zum größten Teil intrazellulär in die Phagosomen sezerniert. Zu einem bestimmten Teil gelangt MPO in den extrazellulären Raum, wo es durch die positive Ladung an die stark negativ geladene Glykokalix der Endotheloberfläche bindet. Von dort aus wird MPO via Transzytose durch die Endothelzellen geschleust und akkumuliert im subendothelialen Raum (Baldus et al. 2001).

1.4.1 Katalytische Aktivität und mikrobizide Eigenschaften

Myeloperoxidase gehört zur Gruppe der Hämperoxidasen und katalysiert somit Redoxreaktionen. MPO reagiert zuerst mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Klebanoff 2005). H_2O_2 wird durch MPO zu Wasser reduziert wodurch das Eisenatom der Hämgruppe oxidiert wird. Dieser Zustand von MPO wird Compound I genannt.

In einer möglichen Rückreaktion reagiert die oxidierte Form von MPO mit einem Halogenid (Chlor-Ion, Brom-Ion) oder Pseudohalogenid (Thiocyanat-Ion). Hierbei wird die Hämgruppe in ihre Ausgangsform reduziert und der Reaktionspartner bildet die hypohalogenide Säure (z. B. hypochlorige Säure). Bei dieser Reaktion - Halogenierungskreislauf genannt - werden jeweils zwei Elektronen übertragen (Davies et al. 2008).

Eine weitere Möglichkeit ist die Rückreaktion der oxidierten MPO-Form über zwei einzelne Reaktionen, bei denen jeweils ein Elektron übertragen wird. Hierbei reagiert MPO mit organischen Molekülen (Aminosäuren, Ascorbat, Steroidhormonen und verschiedenen Medikamenten). Die Reaktionspartner geben ein Elektron ab und werden so zu Radikalen und MPO reagiert zum sogenannten Compound II. Anschließend nimmt Compound II ein weiteres Elektron von einem Reaktionspartner (wie oben genannt) auf und gelangt so in seine Ausgangsform zurück. Diese Reaktionen werden Peroxidasekreislauf genannt. Die beiden organischen Radikale können nun in einem weiteren Schritt mit anorganischen Molekülen wie Stickstoffmonoxid reagieren. Hierbei entsteht über ein Zwischenprodukt Stickstoffdioxid ($NO_2°$), dem es wiederum möglich ist andere Moleküle zu nitrieren (Davies et al. 2008).

So entsteht zum Beispiel Nitrotyrosin, ein Marker für die Myeloperoxidase-Aktivität. Ein weiterer noch spezifischerer Marker ist das Chlorotyrosin. Diese Verbindung ensteht durch die Chlorinierung von Tyrosin durch hypochlorige Säure (Hazen und Heinecke 1997).

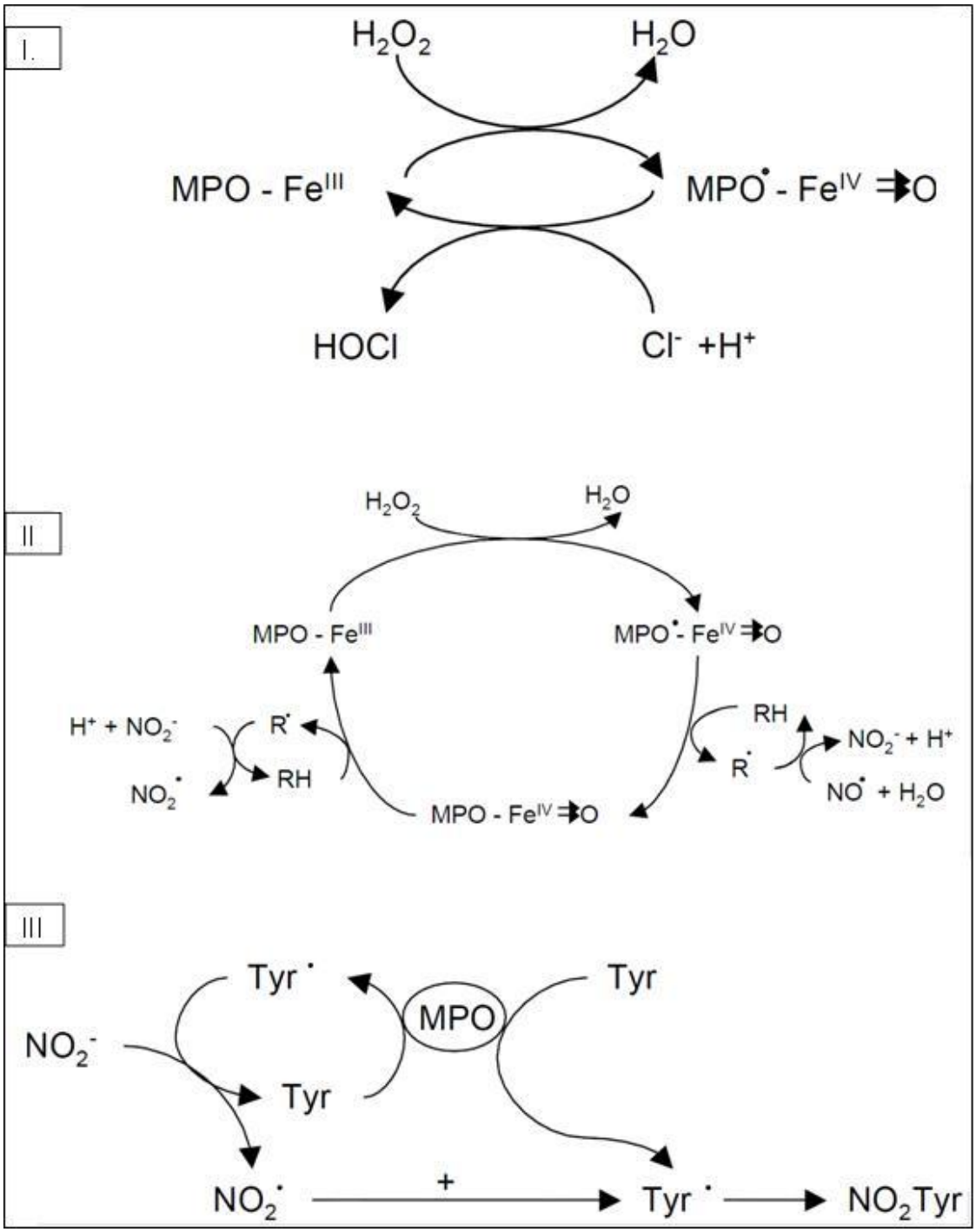

Abbildung 2: Teilabbildung I zeigt den Halogenierungskreislauf. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird zu Wasser (H_2O) in einer 2 Elektronen Übertragungsreaktion reduziert. Dieser Schritt wird von MPO katalysiert. Dabei wird das Eisenatom (MPO°-Fe^{III}) durch die beiden Elektronen zweifach oxidiert und es bildet sich Compound I. In der Rückreaktion werden auch 2 Elektronen übertragen und das Eisenatom (MPO°-Fe^{IV}) wird reduziert und das Chlorid-Ion (Cl^-) reagiert mit einem Proton (H^+) und einem Sauerstoff-Ion (O^{2-}) zu hypochloriger Säure. *Fortsetzung nächste Seite*

Teilabbildung II zeigt den Peroxidasekreislauf, bei welchem sich der erste Schritt aus Teilabbildung I wiederfindet. Als nächstes reagiert die oxierdierte MPO-Form (Compound I) in einer 1 Elektronenübertragungsreaktion mit einem organischen Molekül (RH). Dieses gibt ein Elektron ab, wodurch es zu einem organischen Radikal (R°) wird. Das Elektron wird von Compound I aufgenommen und wird so zu Compound II. Das organische Radikal holt sich das Elektron bei Stickstoffmonoxid (NO°) zurück. Dadurch gelangt es zurück in seine Ausgangsform und es bildet sich Stickstoffdioxid. Dieser Schritt der Elektronenübertragung wiederholt sich ein zweites Mal, wodurch aus Compound II wieder die Grundform von MPO entsteht. In Teilabbildung III wird die Nitrierung von Aminosäuren, in diesem Fall Tyrosin (Tyr) gezeigt. Tyrosin kann als mögliches Molekül der 1 Elektronenübertragungsreaktion aus Teilabbildung II angesehen werden. *(Klinke 2009)*

Die beschriebenen Reaktionsprodukte werden aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit im Allgemeinen reaktive Sauerstoff- beziehungsweise Stickstoffspezies (ROS, RNS) genannt. Diese Moleküle, aber vor allem die schon erwähnte hypochlorige Säure, spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Bakterien (Winterbourn et al. 2006). Dass MPO ein wichtiger Teil des Immunsystems ist, zeigten Studien mit MPO defizienten Mäusen. So starben MPO defiziente Mäuse an durch Candida albicans verursachten Pneumonien und an Infektionen mit dem gram-negativen Bakterium Klebsiella pneumoniae häufiger als nicht defiziente Mäuse (Aratani et al. 1999, Hirche et al. 2005).

Eine interessante Rolle könnte das Pseudohalogenid Thiocyanat (SCN^-) spielen. Das weiter oben schon erwähnte Molekül dient MPO als Substrat, könnte aber auch die Rolle eines Inhibitors übernehmen.

Van Dalen et. al zeigten in ihren Versuchen, dass Thiocyanat von MPO als Substrat bevorzugt wird. Dadurch entsteht vermehrt hypocyanide Säure, welche nicht so reaktiv ist wie die hypochlorige Säure (van Dalen et al. 1997). Des Weiteren steigert die Anwesenheit von Thiocyanat in Verbindung mit NO° die Konzentration von Compound II (Galijasevic et al. 2006). Dadurch wird die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt, da Compound II eine 10-fach niedrigere Reaktionsrate hat als Compound I (Davies et al. 2008).

Beide Mechanismen führen zu einer Reduktion des oxidativen Schadens. In in-vitro Experimenten konnte eine direkte inhibitorische Wirkung von Thiocyanat, durch Bindung und strukturelle Veränderung von MPO gezeigt werden. Diese Wirkung tritt allerdings erst bei höheren Thiocyanatkonzentrationen auf (Nussbaum et al. 2013).

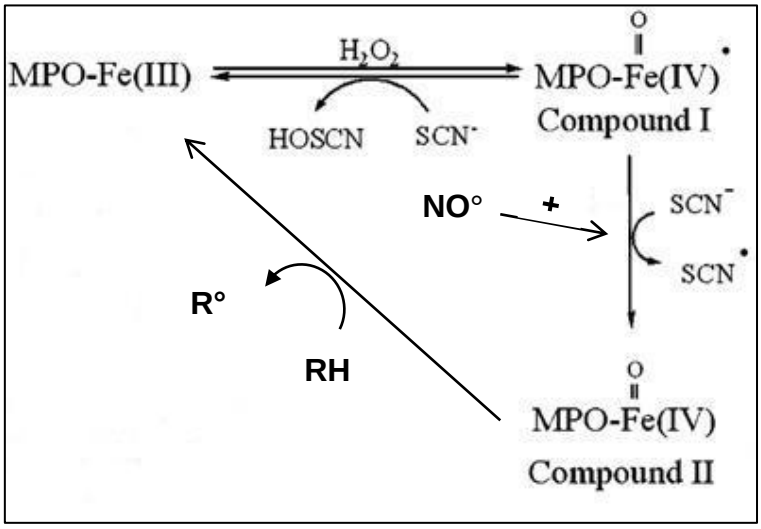

Abbildung 3: Zu sehen ist zum einen die Reaktion von MPO mit Wasserstoffperoxid zu Compound I und die mögliche Rückreaktion mit Thiocyanat (Halogenierungskreislauf). Zum anderen ist die NO°-anhängige Reaktion von Compound I mit Thiocyanat zu Compound II zusehen. Compound II reagiert in einer 1 Elektronenübertragungsreaktion (RH → R°) zurück in die MPO-Ausgangsform. (Abbildung modifiziert nach Galijasevic et al. 2006)

1.4.2 Wert in der Entstehung von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose sowie extramikrobizide Eigenschaften

Die Arbeiten von Daugherty et. al und Hazen et. al zeigten die Anreicherung von MPO und Reaktionsprodukten, wie Chlorotyrosin, in atherosklerotischen Läsionen, was nahe legt, dass MPO an deren Entstehung beteiligt sein könnte (Hazen und Heinecke 1997, Hazen et al., Daugherty et al. 1994). Diese Annahme wird noch durch das Vorhandensein von LDL in atherosklerotischen Läsionen verstärkt, welche durch hypochlorige Säure oxidiert wurden.

Verschiedene Humanstudien zeigten einen Zusammenhang zwischen den Plasma MPO-Spiegeln und dem Auftreten beziehungsweise Fortschreiten einer Herzkreislauferkrankung.

So zeigten Kutter et. al, dass eine MPO-Defizienz (1:2000-4000) einen protektiven Effekt gegen Herzkreislauferkrankung hat (Kutter et al. 2000). Promoter Polymorphismen im MPO-Gen, welche mit einer Verringerung des Plasmaspiegels einhergehen, scheinen ihre Träger vor koronarer Herzkrankheit zu schützen (Nikpoor et al. 2001, Asselbergs et al. 2004). Patienten mit erhöhten MPO-Plasmaspiegeln zeigen hingegen ein erhöhtes Risiko für eine KHK (Zhang R. et al. 2001)

Des Weiteren zeigte sich MPO als ein guter prognostischer Faktor bei Patienten mit Brustschmerzen. So haben Patienten mit Angina pectoris und einem erhöhtem MPO-Spiegel ein 3,9-fach höheres Risiko einen Myokardinfarkt zu erleiden und sogar ein 4,7-fach höheres Risiko in den nächsten ein bis sechs Monaten diesen zu entwickeln (Brennan et al. 2003).

In einer weiteren Studie wurden 1090 Patienten mit akutem Koronarsyndrom in einem 6-monatigem Zeitraum beobachtet. Endpunkte dieser Studie waren der Tod und oder ein Myokardinfarkt. Die hierbei erhobenen Daten bei Patienten mit erhöhten MPO-Plasmaspiegeln zeigten ein 3-fach erhöhtes Risiko, einen tödlichen oder nicht tödlichen Myokardinfarkt zu erleiden (Baldus et al. 2003).

Im Gegensatz zu den Humanstudien zeigten Versuche im Mausmodell keine signifikanten Hinweise auf ein Mitwirken in der Atheroskleroseentstehung. Dies könnte aber durch Unterschiede zwischen Mensch und Maus erklärt werden. So tragen murine Leukozyten 10-20 mal weniger MPO als humane Leukozyten in sich (Brennan et al. 2001, Nauseef 2001). Hingegen zeigte Myeloperoxidase im Tiermodell Einfluss auf Lipidoxidation, Proteinnitrierung und andere oxidative Veränderungen (Zhang et al. 2002). Außerdem zeigten sich Einflüsse in der Entstehung von endothelialer Dysfunktion und ventrikulären Umbauprozessen nach Myokardinfarkt (Askari et al. 2003, Brennan et al. 2002).

Eiserich et. al zeigten in ihren Versuchen, dass ein inflammatorischer Reiz zu einer Verminderung der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit bei Wildtyptieren führt. Anders als bei den Wildtyptieren reagieren MPO-defiziente Mäuse aber nicht mit einer verminderten Relaxationsfähigkeit. Diese Ergebnisse sind auf eine endotheliale Dysfunktion in Abhängigkeit von MPO zurückzuführen (Eiserich et al. 2002).

Die endotheliale Dysfunktion ist ein wichtiger Mechanismus in der Entstehung von Atherosklerose (Ross 1999). Sie ist unter anderem auf eine erniedrigte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid zurückzuführen (Nicholls und Hazan 2005).

MPO kann die NO°-Bioverfügbarkeit durch direkte Oxidation von NO° und indirekte Oxidation von NO° durch Intermediärprodukte (Thyroxin, Ascorbat), sowie die Beeinflussung der NOS, reduzieren.

Wie oben schon beschrieben akkumuliert MPO im subendothelialen Raum, durch den auch das von den Endothelzellen gebildete Stickstoffmonoxid diffundieren muss. Die dadurch bestehende räumliche Nähe zwischen beiden und die oben beschriebene Reaktion ermöglicht es MPO Stickstoffmonooxid direkt zu oxidieren (Baldus et al. 2001).

Eine weitere Möglichkeit wie MPO die NO-Bioverfügbarkeit beeinflussen kann, ist die Hemmung der endothelialen NO-Synthase. Dies geschieht zum einen über die Chlorinierung von L-Arginin, dem Ausgangsprodukt für die Stickstoffmonoxidproduktion durch die NOS (Zhang C. et al. 2001), zum anderen durch die Dislokation der eNOS durch oxidativ veränderte HDL-Moleküle (Marsche et al. 2004).

Leitner et. al zeigten in ihren Versuchen einen weiteren Mechanismus, durch den die Bioverfügbarkeit von NO° beeinflusst wird. Die Autoren belegten, dass die Konzentration des eNOS-Inhibitors asymetrisches Dimethylarginin (ADMA) durch hypochlorige Säure erhöht wird. Dies geschieht über die Hemmung des ADMA abbauenden Enzyms Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (DDAH).

Desweiteren akkumuliert ADMA in PMN und führt zu einer erhöhten Aktivität dieser und somit auch zu einer erhöhten MPO-Freisetzung (Leitner et al. 2011).

Auch wichtig im Zusammenhang mit der Entstehung von Atherosklerose ist die Oxidation von LDL-Molekülen durch Myeloperoxidase. Hierbei verändern Reaktionsprodukte LDL in eine high-uptake Form, die dann vermehrt von Makrophagen über den Scavenger-Rezeptor(CD36) aufgenommen werden. Diese Makrophagen sind als Schaumzellen in den Vorläufer-Läsionen (fatty streaks) der Atherosklerose vermehrt zu finden. Des Weiteren verändert MPO aber auch HDL-Partikel, so dass diese das in ihnen gespeicherte Cholesterol nicht mehr korrekt abgeben (Nicholls und Hazan 2009).

Ein weiterer Mitspieler in der Entwicklung der Atherosklerose ist die Rekrutierung und Migration von Leukozyten in die Gefäßwand. Neutrophile Granulozyten sind stark anionisch geladen und würden von der ebenfalls stark anionischen Endotheloberfläche abgestoßen werden. Da MPO sehr kationisch geladen ist ermöglicht es Wechselwirkungen zwischen PMN und Endotheloberfläche. Hierdurch ist es den neutrophilen Granulozyten möglich nach erfolgter Anziehung und Entlangrollen am Endothel rezeptorvermittelt die Endothelbarriere zu überwinden (Klinke et al. 2011).

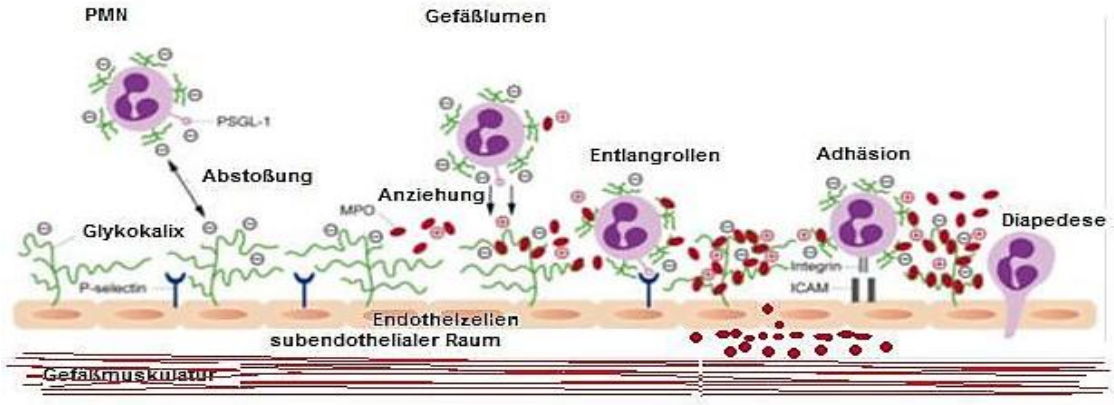

Abbildung 4: Zu sehen ist die Migration neutrophiler Granulozyten durch das Endothel mit Hilfe von MPO. Sowohl PMN als auch Glykokalix des Endothels sind negativ geladen, was eine Abstoßung zur Folge hat. MPO ist positiv geladen und funktioniert somit als eine Art Bindeglied zwischen PMN und Endothel. Dadurch kommt es zur Anziehung beider zueinander und damit zu einer Annäherung. Als nächstes folgt das Entlangrollen des neutrophilen Granulozyten am Endothel bis die zueinander passenden Adhäsionsmoleküle gefunden sind. Erst dann kommt es zur Adhäsion und zur rezeptorvermittelten Diapedese. Des Weiteren ist auf der Abbildung die Transzytose von MPO durch die Endothelzellen zu sehen. MPO akkumuliert dann im subendothelialen Raum. (*Modifiziert nach Klinke et al. 2011)*

Weiterhin spielt MPO eine Rolle bei der Stabilität und Ruptur von entstandenen atherosklerotischen Plaques. Ein wichtiger Faktor ist hier die Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die den Umbau von Bindegewebe steuern. Rudolph et. al zeigten in ihren Versuchen, dass die Aktivität von MMPs (MMP9) durch MPO, im Speziellen durch die entstandene hypochlorige Säure, erhöht wird. Des Weiteren zeigten sie, dass Angiotensin II, ein körpereigenes Peptidhormon, auf Leukozyten aktivierend wirkt und somit zu einer vermehrten Freisetzung von MPO führt (Rudolph et al. 2010).

2 Zielsetzung

In vorangehenden Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass MPO an die Gefäßwand bindet und Signalkaskaden des Gefäßes und des Gewebes beeinflusst. Hierbei wichtige Mechanismen sind die direkte Oxidation von NO° und die Nitrierung und Chlorinierung von aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Applikation von AT II zu einer Aktivierung der PMN führt und damit einen Anstieg der MPO-Plasmaspiegel induziert (Rudolph et al. 2010).

Diese Arbeit soll den Zusammenhang von Myeloperoxidase als Faktor in der Pathogenese von Endotheldysfunktion und strukturellen Umbauprozessen am Gefäß im Tiermodell untersuchen. Dabei sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Hat die langfristige Gabe von AT II Leukozyten-stimulierende Eigenschaften?

2. Führt AT II langfristig zu einer Reduzierung der NO°-Bioverfügbarkeit?

3. Verändert AT II langfristig die strukturelle Eigenschaft von Blutgefäßen?

4. Sind solche Veränderungen durch die Gabe von Inhibitoren der katalytischen Aktivität von MPO zu reduzieren?

Zur Überprüfung dieser Fragestellung wurden Experimente - mit Applikation von AT II - an Mäusen mit und ohne Defizienz im MPO-Gen durchgeführt. Weiterhin wurde Natriumthiocyanat (NaSCN) als MPO-Inhibitor verwendet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt. Es wurden Einmalplastikartikel (Pipettenspitzen usw.) der Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und Greiner (Solingen, Deutschland) verwendet. Diese werden nachfolgend nicht weiter aufgeführt.

Weitere Verbrauchsmaterialien sind:

Bezeichnung	Hersteller
Osmotische Minipumpe Modell 2006	Alzet (Cupertino, Canada)
Sterican Einmalinjektionskanüle	Braun (Melsungen, Deutschland)
Wundklammern 7,5 mm x 1,75 mm	Braun

3.1.2 Reagenzien und Arzneistoffe

Folgende Reagenzien und Arzneistoffe wurden für die Versuche verwendet:

Bezeichnung	Hersteller
2-Desoxy-D-Glukose	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Angiotensin II-acetat human	Sigma
Bovines Serumalbumin	Sigma
Buprenorphin (Temgesic®)	Essex (München, Deutschland)
Dextran	Sigma
EDTA	Sigma
EGTA	Sigma
Essigsäure	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Bezeichnung	Hersteller
Formaldehyd	Tousimis (Rockville, MD, USA)
Glyceroltrinitrat (Nitrolingual©)	G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. (Hohenlockstedt, Deutschland)
HBSS	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Heparin-Natrium 25000-ratiopharm	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Histopaque 1077	Sigma
Indometacin	Sigma
Isofluran (Forene®)	Abbott (Baar, Schweiz)
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kalziumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Natriumthiocyanat	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumchlorid-Lösung 0,9%	Braun
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
PBS	Invitrogen
PhosStop	Roche (Mannheim, Deutschland)
PMA	Sigma
Protease-Inhibitor Complete	Roche
Super Signal west Femto Stable Peroxide Buffer, Super Signal West Femto Luminol Enhancer Solution	Pierce, Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Tris-Base(Trizma®)	Sigma
Triton X-100	Sigma
Tween-20	Sigma

3.1.3 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die Versuche hergestellt:

Bezeichnung	Zusammensetzung
10xTBS	24,2 g Tris-Base, 80 g NaCl ad 1000 ml aqua dest., pH mit HCl eingestellt auf 7,6
1xTBST	100 ml 10xTBS, 1 ml Tween-20 ad 1000 ml aqua dest.
Blottingpuffer	14,4 g Glycin, 3,03 g Tris-HCl in 800 ml aqua, 200 ml Metahanol
Homogenisierungspuffer	121 mg Tris HCl, 4,28 g Sucrose, 57 mg EGTA, 292 mg EDTA ad 50 ml Aqua bidest., pH 7,5
Homogenisierungs-Lösung	1 Tablette Protease-Inhibitor (Leupeptin, Pepstatin, Aprotinin, PMSF), 1 Tablette PhosphoStop, 50 µl Triton X-100 ad 10 ml Homogenisierungs-Puffer
Laufpuffer	3,02 mg Tris, 14,4 g Glycin, 0,74 g EDTA, 1 g SDS ad 1000 ml aqua dest.
Organbadpuffer	28,9 g NaCl, 1,75 g KCl, 10,5 g $NaHCO_3$, 1,835 g $CaCl_2$, 1,48 g $MgSO_4$, 0,7 g KH_2PO_4, 10 g 7-D-Glukose ad 5000 ml aqua bidest., 15 ml Indometacin (17,875 mg in 15 ml H_2O+5Tabletten NaOH zum Lösen)
Sammelgelpuffer	60,6 g Tris, 3 g EDTA, 4 g SDS ad 1000 ml aqua bidest., pH mit HCl eingestellt auf 6,8
SDS-Probenpuffer	10 % Glycerol, 2,3 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau in 60 mM Tris-HCl
Trenngelpuffer	181,7 g Tris, 3 g EDTA, 4 g SDS ad 1000 ml aqua bidest., pH mit HCl eingestellt auf 8,8

3.1.4 Reaktionskits

Folgende Analysekits wurden benutzt:

Bezeichnung	Hersteller
Mouse MPO ELISA-Kit HK210-02	Hycult biotech (Uden, Niederlande)
MPO ELISA-Kit K6631	Immundiagnostik AG (Bensheim, Deutschland)
Pierce BCA-Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Scientific

3.1.5 Antikörper

Folgende primäre Antikörper wurden verwendet:

Bezeichnung primärer Antikörper	Spezies des Spendertiers	Hersteller
Anti-VASP/PVASP	Hase	Immuno Globe (Himmelstadt, Deutschland)
Anti-eNOS	Hase	Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA)
Anti β-Aktin	Hase	Abcam (Cambridge, UK)

Folgende sekundäre Antikörper wurden verwendet:

Bezeichnung sekundärer Antikörper	Konjugat	Spezies des Spendertiers	Hersteller
Peroxidase-labeled Anti-Rabbit IgG	Meerrettich-peroxidase	Ziege	Vector laboratories (Burlinggame, CA)

3.1.6 Mauslinien

Folgende Mauslinien wurden für die Versuche verwendet:

Bezeichnung	Herkunft
C57Bl6/J	The Jackson Laboratory (Maine, USA)
MPO^{tm1lus}/J	The Jackson Laboratory

3.1.7 Laborgeräte, Apparaturen und Software

Folgende Laborgeräte, Apparaturen und Software wurden genutzt:

Bezeichnung	Firma
Four position laboratory mount for tissue bath	Kent Scientific Cooperation (Litchfield, CT, USA)
Haake B3 Wasserheizung für Organbadanlage	Familie Haake (Karlsruhe, Deutschland)
Isometric transducer with base amplifier and wall plug-in transformer	Kent Scientific Cooperation
IVision©	BioVision Technologies (Exton, PA, USA)
Organbäder	Peter Hatch University of Iowa, Department of Chemistry (Glasshop, Iowa City, IA, USA)
Sigma Delta Vaporisateur	Penlon InterMed (Abingdon, UK)
Thermomixer comfort	Eppendorf
Transducer positioner (for tissue tensioning)	Kent Scientific Cooperation

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelles Modell

Sämtliche tierexperimentellen Methoden wurden durchgeführt nach schriftlicher Beantragung und Genehmigung gemäß Tierschutzgesetz durch die Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg, Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz Genehmigungsnummern 09/067 und 11/100.

Es wurden Wildtypen (WT) der Linie C57Bl6/J verwendet und Knockouts der Linie MPO^{tm1lus}/J (*Mpo*$^{-/-}$), die den gleichen genetischen Hintergrund aufweisen. Die *Mpo*$^{-/-}$-Maus wurde von Aldons Lusis an der University of California, LA, erzeugt und ist kommerziell bei The Jackson Laboratory erhältlich. Die Mauslinie ist homozygot für die Mutation, und es wird kein MPO Genprodukt, also weder mRNA noch Protein, erzeugt. Die Leukozytenzahlen sowie die leukozytäre Produktion von Superoxid unterscheiden sich nicht vom WT, allerdings weisen Monozyten und neutrophile Granulozyten in *Mpo*$^{-/-}$-Tieren keinerlei Peroxidase-Aktivität und Hypochlorit-Produktion auf.

3.2.2 Befüllung der osmotischen Minipumpen

Die osmotischen Minipumpen (Modell 2006) der Firma Alzet (Cupertino, Canada), die ein Fördervolumen von 0,15 µl pro Stunde leisten und bis zu 42 Tage in den Mäusen verweilen können, wurden mit einer Lösung humanen AT II der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland) befüllt. Die Konzentration der Lösung wurde so berechnet, dass eine Fördermenge von 1 ng/gKG/min erreicht wurde. Hierzu wurde das humane AT II in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung gelöst und dann mit Einmalspritzen in die Minipumpen injiziert. Um das AT II besser lösen zu können, wurden 1 µl 1 M Essigsäure pro Milliliter NaCl hinzu gegeben.

3.2.3 Implantation der osmotischen Minipumpen

Für den Versuch wurden 20 männliche WT und 11 männliche *Mpo*$^{-/-}$-Mäusen mit einem Gewicht von 21 g - 28 g und einem Alter von acht bis zwölf Wochen ausgewählt.

Nach Inhalationsnarkose mit einem Isofluran (Abbott (Baar, CH))/Sauerstoffgemisch (Einleitungsdosis 5 %, Erhaltungsdosis 1,5 % - 2,5 % ad 100 % Sauerstoff) und Überprüfung der Schmerzreflexe wurden den Mäusen 150 µl Buprenorphin (0,1 mg/kg) (Essex (München, Deutschland)) zur Analgesie subkutan gespritzt. Als nächstes wurden die Tiere auf einer Wärmeplatte fixiert, um sie vor Auskühlung während der Operation zu schützen. Nachdem eine gründliche Hautdesinfektion durchgeführt wurde, erfolgte mit einer Schere eine ca. 1 cm lange Hautinzision im Schulterbereich der Tiere. Nach Hautinzision im rechten Schulterbereich der Tiere wurde eine subkutane, ca. 2,5 cm nach kaudal reichende, Tasche mit einer Schere stumpf präpariert. Nach Einführen der Pumpe in die entstandene Tasche erfolgte der Wundverschluss mit Klammernaht.

Ein Teil der Mäuse erhielten nach der Operation bis zur Probenentnahme eine 0,1 % Natriumthiocyanatlösung über ihr Trinkwasser.

3.2.4 Probenentnahme

Sechs Wochen nach Implantation der osmotischen Minipumpen wurden sowohl die Tiere der Implantations- als auch der Kontrollgruppe der Probenentnahme unterzogen. Hierzu wurden sie mit einem Isofluran/ Sauerstoffgemisch (Einleitungsdosis 5 %, Erhaltungsdosis 3 % ad 100 % Sauerstoff) anästhesiert. Nach Überprüfung der Schmerzreflexe und Fixation der Tiere auf einer Wärmeplatte wurden die Mäuse mittels Durchtrennung der Vena cava inferior getötet. Das Blut wurde mit einer Einmalspritze aufgefangen und in ein mit heparinisierten Kügelchen befülltes Eppendorf-Gefäß gegeben. Nach Zentrifugation der Blutproben bei 3500 rpm für sechs Minuten wurde das Plasma abpipetiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80° C gelagert.

Für weitere Untersuchungen wurde auch die thorakale Aorta entnommen. Hierfür wurde nach Entfernung der Lunge die Aorta unterhalb des Zwerchfells durchtrennt und vorsichtig entlang der Wirbelsäule bis zum Aortenbogen freipräpariert.

3.2.5 Gewebehomogenisierung

Die Aorten wurden in einem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff sehr fein zerstoßen. Als nächstes wurden sie in ein in flüssigem Stickstoff vorgekühltes Eppendorf-Gefäß überführt und mit 30 µl gekühltem Homogenisierungspuffer versetzt. Nun wurden die Proben eine Stunde auf Eis gelagert und in regelmäßigen Abständen gevortext bevor sie für 15 Minuten bei 14000 rpm in einer auf 4° C heruntergekühlten Zentrifuge zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde nun abpipettiert und weiteren Analysen zugeführt. Das Pellet, das sich am Boden des Eppendorf-Gefäßes gebildet hat, wurde verworfen.

3.2.6 Proteinbestimmung mittels Pierce BCA-Protein Assay

Die Proteinbestimmung der Gewebshomogenate wurde mit Pierce BCA-Protein Assay Kit, nach Vorgabe des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurden 2,5 µl des Überstandes aus der Gewebshomogenisierung mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Nun wurden jeweils 10 µl in Doppelbestimmung in die Wells einer 96-well-Platte gegeben. Als nächstes wurde ein externer Standard aus bovinen Serumalbumin (BSA), in der Konzentration 0 - 250 µg/ml, hergestellt, von dem 10 µl in Doppelbestimmung in die Wells pipettiert wurde. Danach wurde das working-reagents (WR) hergestellt. Hierfür wurden Reagenz A (alkalische, tatrathaltige Bicinchoninsäure) mit Reagenz B (Kupfersulfat-Lösung) im Verhälnis 50:1 gemischt und 200 µl WR mit einer Multichannel-Pipette in die belegten Wells pipettiert. Die Platte wurde nun mit Folie verschlossen und für 20 Sekunden leicht geschüttelt. Anschließend wurde die Platte für 30 Minuten bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit reagierte nun das aus Cu^{2+} an der Peptidbindung enstandene Cu^{+} mit der Bicinchoninsäure zu einem blau-violetten Chelatkomplex.

Die Intensität der Färbung wurde mittels Absorptionsmessung bei 562 nm im Dynx-Reader bestimmt. Die Absorptionen des Standards wurden gegen die Konzentration aufgetragen. Es wurde die Formel der Standardkurve bestimmt mittels derer dann die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden konnten.

3.2.7 Quantifizierung von MPO in murinem Plasma

Für die MPO-Bestimmung im ELISA wurden die bei -80° C gelagerten Plasmaproben der verschiedenen Versuchsgruppen aufgetaut und mit dem im MPO ELISA-Kit enthaltenen Probenpuffer 1:8 verdünnt. Es wurde mit dem ebenfalls im Versuchs-Kit enthaltenen Standard eine Verdünnungsreihe durchgeführt, die von 0 ng/ml bis 100 ng/ml reicht. Nun wurden 100 µl sowohl der 8 Standards als auch der Proben in Doppelbestimmung in die Öffnungen der 96-Well-Platten pipettiert. Als nächstes wurden die Öffnungen mit Folie abgedeckt und die Platten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bindete sich das im Plasma enthaltene MPO an die MPO-Antikörper, mit denen die Öffnungen der 96-Well-Platten beschichtet sind. Nach einer Stunde wurden die 96-Well-Platten gewaschen, indem die Flüssigkeit in den Öffnungen abpipettiert wurde und die Wells danach mit Waschpuffer aufgefüllt wurden. Nach 20 Sekunden Wartezeit wurde auch der Waschpuffer wieder abpipettiert. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt. Nach dem dritten Durchlauf wurde der Waschpuffer wieder entfernt und es wurden 100 µl der Tracer-Lösung in alle Öffnungen der Platte pipettiert. Hiernach wurden die Platten wieder mit Folie abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der Tracer-Lösung sind MPO-Antikörper, welche an das schon gebundene MPO binden. Nun wurde die Waschprozedur wiederholt und es wurden 100 µl der Streptavidin-Peroxidase-Lösung in die Wells pipettiert. Die Platten wurden wieder mit Folie abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnte die Peroxidase an den zweiten Antikörper binden. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl der Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB), die der Peroxidase als Substrat dient, in die Öffnungen pipettiert. Nach erneuter 30 minütiger Inkubation wurden 100 µl der Stop-Lösung in die Wells pipettiert und die Platten innerhalb von 30 Minuten im Dynx-Reader bei 450 nm gemessen.

3.2.8 Messung der Endothelfunktion im Organbad

Die Aorten, die für die Untersuchung im Organbad vorgesehen waren, wurden sofort nach der Entnahme in ein Eppendorf-Gefäß mit gekühltem Organbadpuffer (Krebspufferlösung: 28,9 g NaCl, 1,75 g KCl, 10,5 g $NaHCO_3$, 1,835 g $CaCl_2$, 1,48 g $MgSO_4$, 0,7 g KH_2PO_4, 10 g 7-D-Glukose ad 5000 ml aqua bidest.) überführt. Um die Prostaglandinsynthese zu unterdrücken wurden 15 ml Indometacin (17,875 mg in 15 ml H_2O+5 Tabletten NaOH zum Lösen) in die Krebspufferlösung gegeben. Nun wurden die entnommenen Aorten unter dem Mikroskop von überschüssigem Bindegewebe befreit. Danach wurden jeweils zwei 5 mm starke Aortenringe pro Aorta präpariert. Als nächstes wurden die Aorten-Ringe zwischen zwei rostfreien Stahlhaken aufgehängt, wobei der untere Haken in einem 25 ml Glasgefäß befestigt war. Der obere Haken war über einen Draht mit dem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden, welcher jede Änderung der Kontraktion über einen Verstärker an einen Computer weitergab. Während der Messungen wurden die Ringe von der Krebspufferlösung, welche von einem Wasserbad auf 37° C gehalten wurde, umspült. Außerdem wurde in das Organbad ein Carbogen-Gasgemisch (95 % Sauerstoff+5 % Kohlenstoffdioxid). Nach dem Einhängen der Ringe wurden diese manuell im Abstand von sieben Minuten auf 1,1 gram vorgespannt. Als nächstes wurde zweimalig ein Kaliumchlorid-Bolus (zwei Mal 1 ml 2 M KCl-Lösung) mit anschließendem Waschen der Ringe gegeben. Nun wurde erneut ein 1 ml KCl-Bolus hinzugegeben und zwanzig Minuten abgewartet. Nach erneutem Waschen wurden nun die Ringe mit 10 µl Prostaglandin $F2_{alpha}$ (10 mM) mindestens um 1 gram kontrahiert. Anschließend wurde die endothelabhängige Relaxation mit Acetylcholin (Konzentration von 10^{-9} M bis $10^{-5,5}$ M) gemessen. Nach 30 Minuten Ruhepause wurden die Ringe wieder mit Prostaglandin vorkontrahiert. Nun wurde die endothelunabhängige Relaxation mit Nitroglycerin (Konzentration von 10^{-9} M bis $10^{-4,5}$ M) durchgeführt. Die Kontraktionsänderungen der Ringe wurden mittels der Chartv 4.0 Software ausgewertet.

3.2.9 Quantifizierung von Endothelfunktionsmarkern

Der Überstand aus der Gewebehomogenisierung wurde mit SDS-Probenpuffer (10 % Glycerol, 2,3 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau in 60 mM Tris-HCl) versetzt und für fünf Minuten bei 95° C denaturiert. Anschließend wurden die Proben bei -20° C bis zur Elektrophorese gelagert.

Für die Auftrennung der Proteine wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Verwendung von 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein 10 %iges SDS-Trenngel (5 ml Trenngelpuffer (181,7 g Tris, 3 g EDTA, 4 g SDS ad 1000 ml aqua bidest., pH mit HCl auf 8,8 eingestellt), 10 ml H_2O, 5 ml 40 %iges Acrylamid/Bisacrylamid, 35 µl TEMED, 100 µl 10 %iges APS) gegossen. Damit das Trenngel einen waagerechten Abschluss bildet, wurde es mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel ausgehärtet war, wurde das 4,5 %ige SDS-Sammelgel (2,5 ml Sammelgelpuffer (60,6 g Tris, 3 g EDTA, 4 g SDS ad 1000 ml aqua bidest., pH mit HCl auf 6,8 eingestellt), 6,4 ml H_2O, 1,1 ml Acrylamid/Bisacrylamid, 35 µl TEMED, 100 µl 10 %iges APS) über das Trenngel gegossen. Nun wurde ein 15 Kammer-Kamm eingesetzt und gewartet bis auch das Sammelgel auspolymerisiert war. Anschließend wurde die Elektrophorese bei 130 Volt in SDS-Laufpuffer (100 ml 10x Laufpuffer (3,02 mg Tris, 14,4 g Glycin, 0,74g EDTA, 1g SDS ad 1000ml aqua dest.) ad 1000 ml aqua dest.) durchgeführt.

Danach wurden die aufgetrennten Proteine mittels Blotting auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Dies geschah in einem speziellen Puffer (14,4 g Glycin, 3,03 g Tris-HCl in 1000 ml aqua dest., 100 mA Stromstärke) damit das Gel nicht zu quellen anfing. Nun wurden nicht spezifische Bindungstellen der Membran mittels Blockmedium (5% milk in 1xTBST (100 ml 10x TBS (24,2 g Tris-Base, 80 g NaCl ad 1000ml aqua dest., pH mit HCl eingestellt auf 7,6), 1 ml Tween-20, 900 ml aqua dest.) besetzt.

Als nächstes wurde die Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach mehrfachem Waschen der Membran mit TBST wurde der sekundäre Antikörper hinzugegeben und für eine Stunde inkubiert.

Nach erneutem Waschen in TBST wurde dann die Entwicklerlösung (Super Signal west Femto Stable Peroxide Buffer, Super Signal West Femto Luminol Enhancer Solution, Pierce) auf die Membran gegeben. Die Entwicklerlösung reagiert mit der Peroxidaseaktivität des sekundären Antikörpers, was die Belichtung eines Films zur Folge hat. Die belichteten Bereiche wurden dann mittels ImageJ-Software ausgewertet.

Als primäre Antikörper wurden Anti-VASP/PVASP ((Immuno Globe (Himmelstadt, Deutschland), 1:2500 in Blockmedium)), Anti-eNOS ((Cell Signaling Technology (Boston, MA USA), 1:1000 in Blockmedium)) und Anti-β-Aktin ((Abcam(Cambridge, UK), 1:1000 in Blockmedium) benutzt.

Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-labeled Anti-Rabbit IgG-Antikörper benutzt (sämtlich erhältlich bei Vector laboratories (Burlinggame,CA), 1:10000 in Blockmedium)

3.2.10 Histologische Messung der Mediadicke

Die Aortenabschnitte wurden nach der Entnahme in 3 % Formalin-Lösung fixiert und dann in aufsteigender Ethanolkonzentration (60 %-75 %-90 %-100 %) und Xylol entwässert und danach der Länge nach in Paraffin gegossen. Aus den Paraffinblöcken wurden dann 5 µm dicke Schnitte hergestellt, welche auf einen Objektträger gezogen wurden.

Es wurden immer vier Schnitte pro Aorta erzeugt. Die Schnitte wurden anschließend mit Xylol und absteigenden Ethanolkonzentrationen (100 %-90 %-75 %-60 %) entparaffinisiert.

Die Aortenschnitte wurden einer Masson-Goldner-Bindegewebsfärbung nach Standardprotokoll unterzogen. Diese Färbung lässt Bindegewebe grün-blau erscheinen. Die histologische Aufbereitung geschah in Zusammenarbeit mit der Mauspathologie-Facility des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf. Nach dem Färben wurden die Anschnitte in einer 10-fachen Vergrößerung abfotografiert und in das Programm IVision© geladen. Hier wurde nun an zehn zufällig gewählten Stellen jedes Aortenanschnitts die Mediadicke gemessen und danach der Mittelwert aus diesen 40 Messungen pro Aorta gebildet.

3.2.11 Isolierung von humanen PMN aus venösem Humanblut

Für diesen Versuch wurden Blutproben von Mitarbeitern im eigenen Labor benutzt. Zur Zeit der Blutentnahme lagen keine Anzeichen für ein akutes oder chronisches Entzündungsgeschehen im Körper vor, wodurch eine Verfälschung der Daten möglich gewesen wäre.

Nach gründlicher Sprühdesinfektion wurden mit einem Butterfly-Blutentnahmeset aus einer der oberflächigen Ellenbeugen-Venen 5,5 ml Blut entnommen, welche sofort in einem heparinisiertem Blutentnahmeröhrchen gesammelt wurden.

Als nächstes wurde zu den 5,5 ml Blut 5,5 ml Dextranlösung (45 mg Dextran pro Milliliter NaCl) hinzu gegeben. Dieses Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Hierdurch fand eine Sedimentation statt, bei welcher sich die Leukozyten im Überstand ansammelten. Nun wurde der Überstand mit einer Pipette aspiriert und auf Histopaque 1077 im Verhältnis 1:1 aufgeschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur und 600 g für 30 Minuten. Diesmal wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde einer hypotonen Lyse unterzogen. Hierbei wurde das Pellet zuerst in 4° C kaltem bidestiliertem Wasser für 10 Sekunden resuspendiert. Als nächstes wurden 35 ml 4°C kalte NaCl hinzugefügt und das Gemisch bei 4°C und 350 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet wurde in 1ml HBSS/0,25 % BSA gelöst. Die so erhaltenen Proben wurden bis zu ihrer Weiterverwendung auf Eis gelagert.

3.2.12 Stimulierung humaner PMN mit AT II und/oder PMA und anschließende Quantifizierung von MPO

Zur Stimulation der PMN wurden den einzelnen Proben PMA und/ oder AT II in verschiedenen Konzentrationen (100 nM, 10 µM und 100 µM) zugefügt. Die Proben wurden nun für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit den Substanzen inkubiert. Danach erfolgte die Messung der MPO-Konzentration mit dem MPO-ELISA-Kit der Firma Immun Diagnostik. Die Durchführung des MPO-ELISA erfolgte genau nach den Erklärungen des Herstellers. Am Ende wurde die Extinktion bei 450 nm im Dynx-Reader gemessen und durch zur Hilfenahme der Standardkurve in die jeweiligen MPO-Konzentrationen umgerechnet.

3.2.13 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS Statistic 20 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden die Ergebnisse nach Überprüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnoff-Test einer einfaktoriellen ANOVA-Analyse oder einer multifaktoriellen ANOVA-Analyse zugeführt. Bei Homogenität der Varianzen diente der LSD als post-hoc-Test. Bei Inhomogenität wurde der Tamhane verwendet. Ein Unterschied mit einem p-Wert ≤ 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte ± SEM dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Quantifizierung von MPO in murinem Plasma

Es wurden die MPO-Konzentrationen aus murinen Plasmaproben bestimmt und als Mittelwert ± SEM in Abbildung 5 dargestellt.

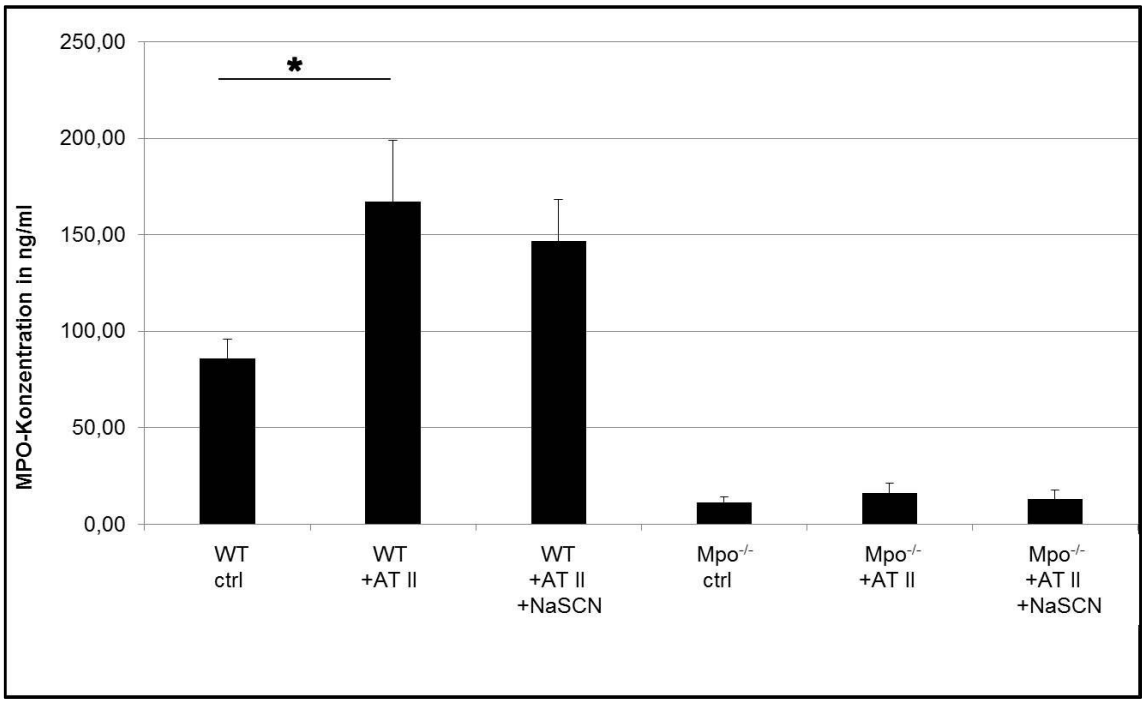

Abbildung 5: MPO-Konzentration in murinen Plasmaproben der verschiedenen Versuchsgruppen (WT ctrl n=20, WT+AT II n=28, WT+AT II+NaSCN n=11, *Mpo*$^{-/-}$ ctrl n=11, *Mpo*$^{-/-}$+AT II n=15, *Mpo*$^{-/-}$+AT II + NaSCN n=5) gemessen im MPO-ELISA. Die MPO-Knockout-Gruppen zeigen signifikant-niedrigere Konzentratration im Vergleich zu den WT ctrl-Tieren. Außerdem zeigen die WT+AT II-Tiere signifikant-höhere Konzentrationen im Vergleich zu den WT ctrl-Tieren. Zur Symbol-Erklärung: * p-Wert ≤0,05

Der ELISA zeigt für die *Mpo*$^{-/-}$-Tiere Werte unter 20 ng/ml an, die unterhalb der Detektionsgrenze des ELISAs liegen und daher als unspezifisches Hintergrundsignal zu interpretieren sind. Die *Mpo*$^{-/-}$-Tiere unterscheiden sich von den WT ctrl-Tieren signifikant. Des Weiteren zeigen die WT+AT II-Tiere signifikant höhere MPO-Plasmaspiegel im Vergleich zu den WT ctrl-Tieren (WT+AT II: 166,98±31,85 ng/ml; WT ctrl: 85,74±9,97 ng/ml; p=0,027).

4.2 Messung der Endothelfunktion im Organbad

Es wurde die Relaxationsfähigkeit der Aortenringe von den verschiedenen Versuchsgruppen im Organbad ermittelt. Hierbei wurde zuerst die endothelabhängige Relaxation durch Acetylcholingabe in aufsteigender Konzentration ermittelt und danach die endothelunabhängige Relaxation durch Gabe von Nitroglycerin. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SEM der Relaxationsfähigkeit (y-Achse) zu den verschiedenen Konzentrationspunkten (x-Achse) aufgetragen. Hierbei liegt der Konzentrationsbereich von Acetylcholin zwischen 10^{-9} M – $10^{-5,5}$ M und der von Nitroglycerin zwischen 10^{-9} M – $10^{-4,5}$ M.

In Abbildung 6 wird die Gruppe der WT+AT II-Tiere mit den WT ctrl-Tieren verglichen. Hierbei zeigt sich eine signifikant schlechtere endothelabhängige Relaxation bei den behandelten Tieren (WT+AT II: 50,41±2,49 % WT ctrl:73,64±3,49 %; p=0,0001). Die in der Klammer angegebenen Werte entsprechen der Relaxation an dem Punkt der maximalen Konzentration der gegebenen Substanz. In den folgenden drei Abbildungen werden die Ergebnisse der endothelabhängigen (Acetylcholin) Relaxationsmessung dargestellt.

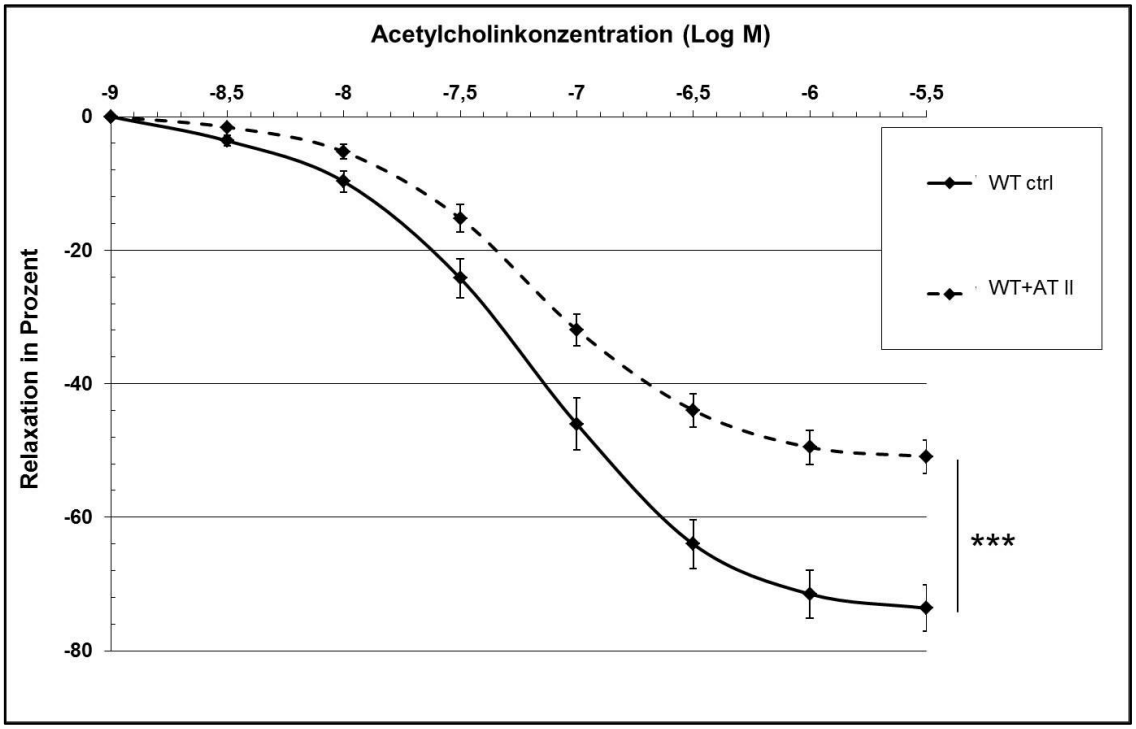

Abbildung 6: Prozentuale Relaxation der maximalen Prostaglandin $F2_{alpha}$-induzierten Konstriktion der Aortensegmente unter dem Einfluss von aufsteigenden Acetylcholinkonzentrationen. Die Aortensegmente der WT+AT II-Tiere (n=17) zeigen eine signifikant schlechtere Relaxation als die WT ctrl-Tiere (n=9) (p=0,0001). Zur Symbol-Erklärung: *** p-Wert ≤0,0001

Weiterhin zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den WT+AT II-Tieren und den *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren. Hierbei zeigten die *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tiere eine bessere endothelabhängige Relaxationsfähigkeit als die WT+AT II-Tiere (WT+AT II: 50,91±2,49 % *Mpo*$^{-/-}$+AT II: 65,07±3,53 %; p= 0,0003). Diese Ergebnisse sind Abbildung 7 zu entnehmen. Des Weiteren lässt sich in Abbildung 7 erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren und der *Mpo*$^{-/-}$ ctrl-Tieren gibt (*Mpo*$^{-/-}$+AT II: 65,07±3,05 % *Mpo*$^{-/-}$ ctrl:74,04±5,17 %; p=0,312).

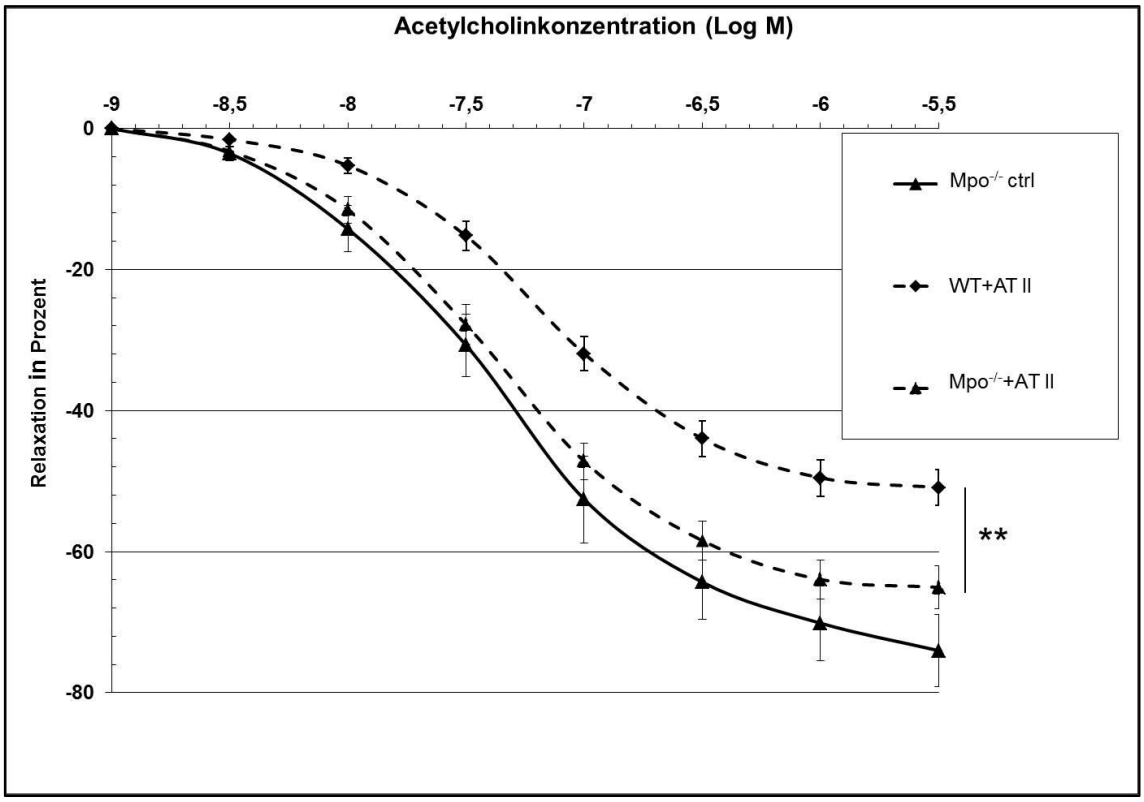

Abbildung 7: Prozentuale Relaxation der maximalen Prostaglandin $F2_{alpha}$-induzierten Konstriktion der Aortensegmente unter dem Einfluss von aufsteigenden Acetylcholinkonzentrationen. Die *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tiere (n=12) zeigen eine signifikant bessere Relaxation im Vergleich zu den WT+AT II-Tieren (n=17) (p=0,0003). Zwischen den *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren und den *Mpo*$^{-/-}$ ctrl-Tieren (n=4) zeigt sich kein signifikanter Unterschied (p=0,312). Zur Symbol-Erklärung: ** p-Wert ≤0,001

Es zeigten sich weiterhin keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen (WT ctrl:73,64±3,49 % *Mpo*$^{-/-}$ ctrl:74,04±5,17 %; p=0,613).

In Abbildung 8 werden WT+AT II+NaSCN-Tiere mit den WT ctrl-Tieren und den WT+AT II-Tieren verglichen. Hierbei zeigen die Tiere, welche zusätzlich zu dem AT II noch NaSCN bekommen haben eine ähnliche Relaxationsfähigkeit wie die Kontrolltiere. Hierbei fällt ein signifikanter Unterschied zu den nur mit AT II behandelten Tiere auf (WT+AT II: 50,91±2,49 % WT+AT II+NaSCN: 72,41±3,48 %; p=0,0001). Zwischen den WT+AT II+NaSCN-Tieren und den WT ctrl-Tieren gibt es keinen signifikanten Unterschied (WT ctrl: 73,64±3,49 % WT+AT II+NaSCN: 72,41±3,48 %; p=0,871).

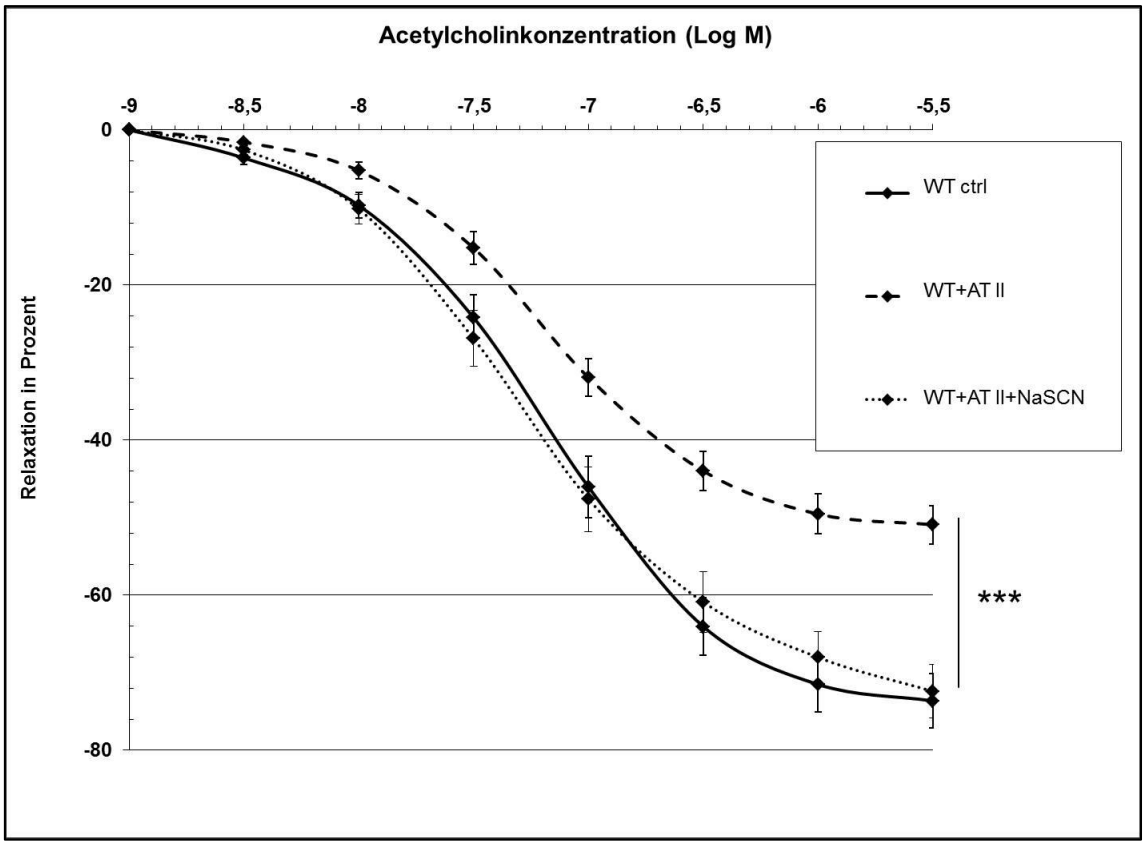

Abbildung 8: Prozentuale Relaxation der maximalen Prostaglandin $F2_{alpha}$-induzierten Konstriktion der Aortensegmente unter dem Einfluss von aufsteigenden Acetylcholinkonzentrationen. Durch die zusätzliche Gabe von Natriumthiocyanat über das Trinkwasser zeigen WT+AT II-Tiere (n=10) keine signifikanten Unterschiede zu den WT ctrl-Tieren (p=0,871). Der Unterschied zu den nur mit AT II behandelten Tieren ist signifikant (p=0,0001). Zur Symbol-Erklärung: *** p-Wert ≤0,0001

In den folgenden drei Abbildungen werden die Ergebnisse der endothelunabhängigen (Nitroglycerin) Relaxationsmessung dargestellt.

Abbildung 9 vergleicht die WT+AT II-Tiere und die WT ctrl-Tiere. Hierbei fällt ein signifikanter Unterschied zwischen beiden auf. Die behandelten Tiere zeigen eine schlechtere Relaxationsfähigkeit als die Kontrollen (WT+AT II: 69,74±3,51 % WT ctrl: 85,29±2,28 %; p=0,005).

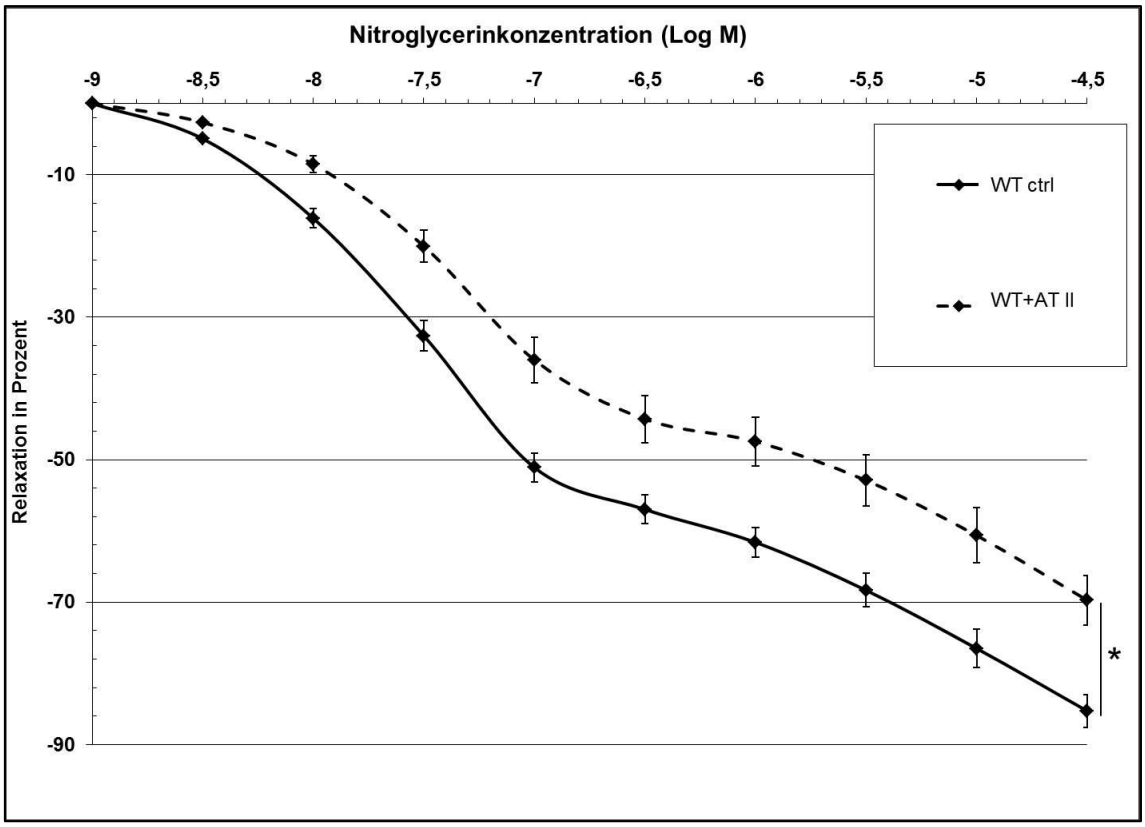

Abbildung 9: Prozentuale Relaxation der maximalen Prostaglandin $F2_{alpha}$-induzierten Konstriktion der Aortensegmente unter dem Einfluss von aufsteigenden Nitroglycerinkonzentrationen. Die Aortensegmente der WT+AT II-Tiere (n=17) zeigt eine signifikant schlechtere Relaxation im Vergleich zu den WT ctrl-Tieren (n=5) (p=0,005). Zur Symbol-Erklärung: * p-Wert ≤0,05

Der Vergleich zwischen den WT+AT II-Tieren und den *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren zeigte keinen signifikanten Unterschied in der endothelunabhängigen Relaxationsfähigkeit (WT AT II: 69,74±3,51 % *Mpo*$^{-/-}$+ATII: 73,57±2,43 %; p=0,310). Des Weiteren sind auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen (WT ctrl: 85,29±2,28 % *Mpo*$^{-/-}$ ctrl: 84,59±5,69 %; p=0,948) und zwischen den *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren und den *Mpo*$^{-/-}$ ctrl-Tieren (*Mpo*$^{-/-}$+AT II: 73,57±2,43 % *Mpo*$^{-/-}$ ctrl: 84,59±5,69 %; p=0,075) zu erkennen. Alle diese Ergebnisse sind in Abbildung 10 zusammengefasst.

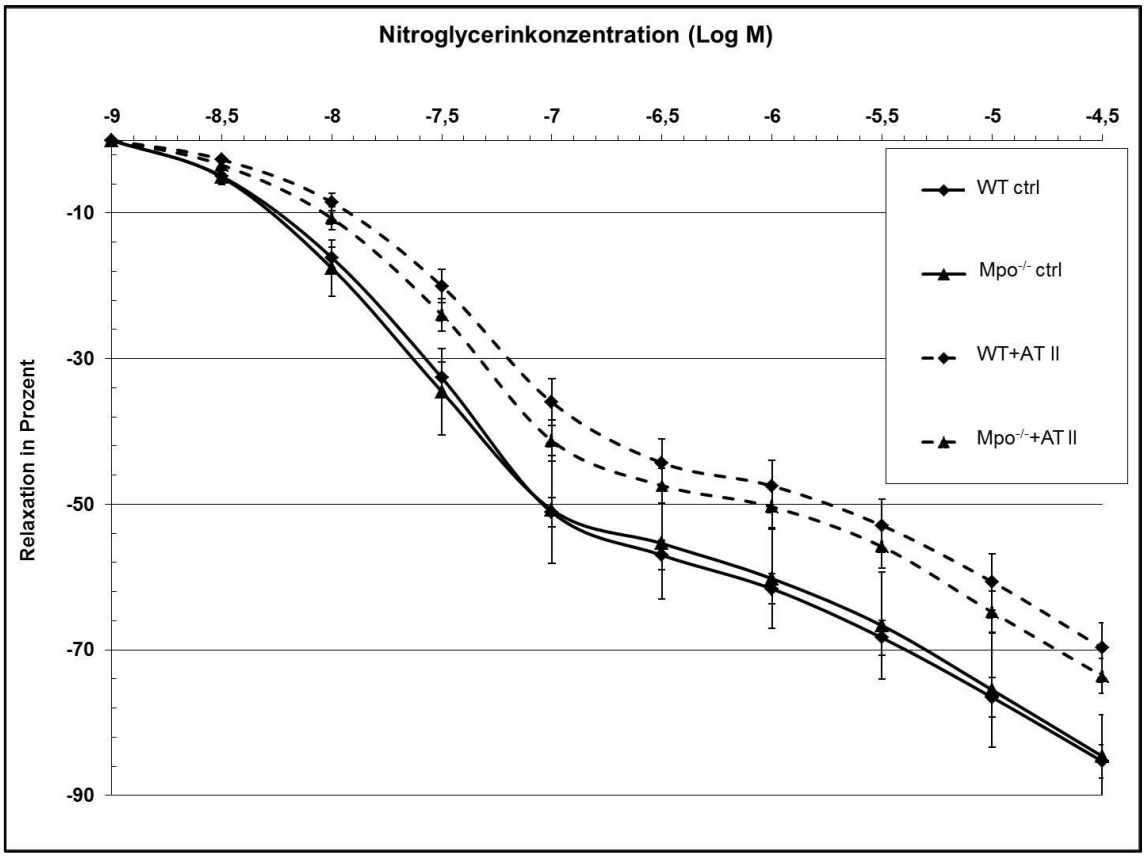

Abbildung 10: Prozentuale Relaxation der maximalen Prostaglandin $F2_{alpha}$-induzierten Konstriktion der Aortensegmente unter dem Einfluss von aufsteigenden Nitroglycerinkonzentrationen. Die *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tiere (n=12) zeigen keine signifikanten Unterschiede zu den WT+AT II-Tieren (p=0,310). Auch zwischen den beiden Kontrollgruppen (p=0,948) und zwischen den *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren und den *Mpo*$^{-/-}$ ctrl-Tieren (n=4)(p=0,075) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Abbildung 11 vergleicht die WT+AT II+NaSCN-Tiere mit den WT+AT II-Tieren und den WT ctrl-Tieren. Hierbei zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den WT+AT II-Tieren und den WT+AT II+NaSCN-Tieren. Dieser Unterschied besteht in einer besseren Relaxationsfähigkeit der Tiere, die zusätzlich das NaSCN im Trinkwasser bekommen haben (WT+AT II: 69,74±3,51 % WT+AT II+NaSCN: 80,34±2,33 %; p=0,009). Des Weiteren unterscheiden die WT+AT II+NaSCN-Tiere sich nicht signifikant von den WT ctrl-Tieren (WT ctrl: 85,29±2,28 % WT+AT II+NaSCN: 80,34±2,33 %; p=0,463).

Bei *Mpo*$^{-/-}$-Tieren hat NaSCN keinen Einfluss auf die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit (*Mpo*$^{-/-}$+AT II: 73,57±2,43 % *Mpo*$^{-/-}$+AT II+NaSCN: 72,94±3,64 %; p=0,156) und diese unterscheidet sich nicht von derer der WT+AT II+NaSCN-Tiere (*Mpo*$^{-/-}$+AT II+NaSCN: 72,94±3,64 % WT+AT II+NaSCN: 80,34±2,33 %; p=0,809) - diese Daten sind nicht in der Abbildung gezeigt. Weiterhin nicht in den Abbildungen aufgeführt ist der Vergleich zwischen WT+AT II und *Mpo*$^{-/-}$+AT II+NaSCN-Tieren. Diese beiden Versuchsgruppen unterscheiden sich signifikant in ihrer endothelunabhängigen Relaxationsfähigkeit voneinander (WT+AT II: 69,74±3,51 % *Mpo*$^{-/-}$+AT II+NaSCN: 72,94±3,64 %; p=0,033).

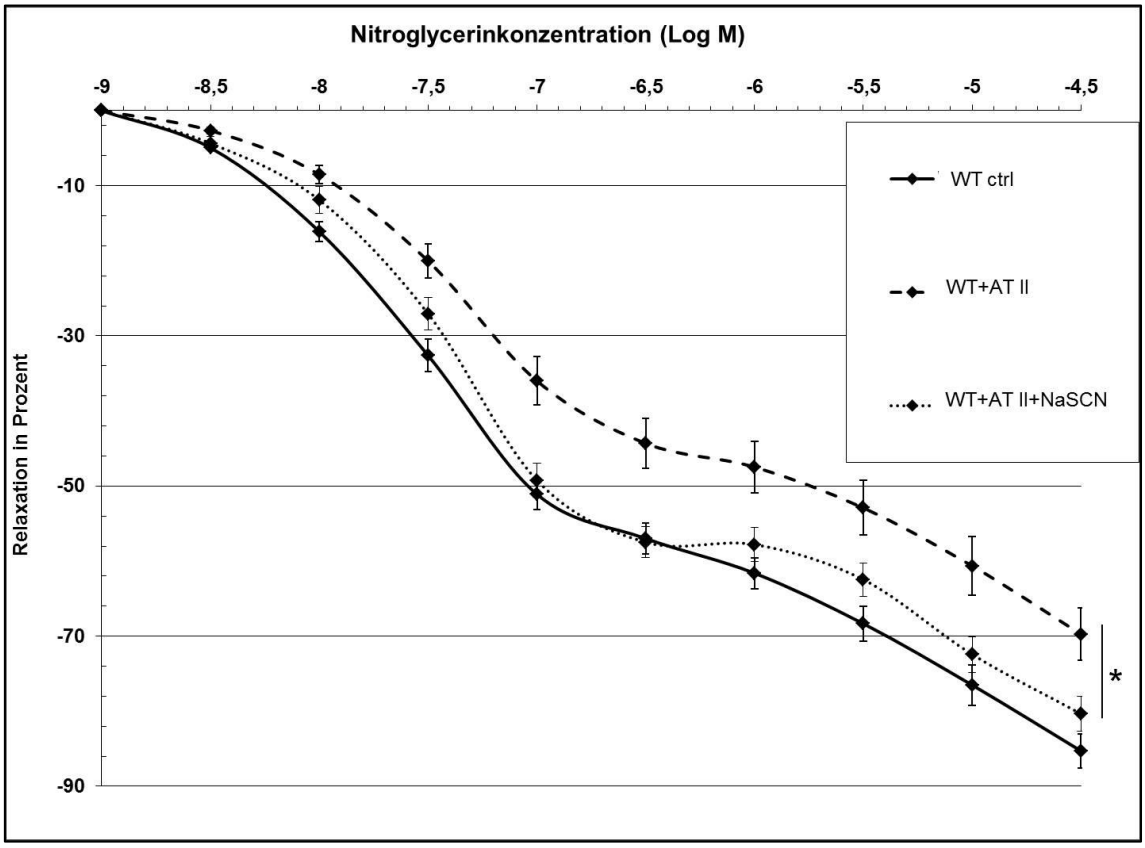

Abbildung 11: Prozentuale Relaxation der maximalen Prostaglandin F2$_{alpha}$-induzierten Konstriktion der Aortensegmente unter dem Einfluss von aufsteigenden Nitroglycerinkonzentrationen. Durch die zusätzliche Gabe von Natriumthiocyanat über das Trinkwasser zeigen WT+AT II-Tiere (n=10) keine signifikanten Unterschiede zu den WT ctrl-Tieren (p=0,463). Der Unterschied zu den nur mit AT II behandelten Tiere ist signifikant (p=0,009). Zur Symbol-Erklärung: * p-Wert ≤0,05

4.3 Quantifizierung von Endothelfunktionsmarkern

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen das Verhältnis von phosphoryliertem Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein (P-VASP) zu nicht phosphoryliertem Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP) (Abbildung 12) und eNos zu ß-Aktin (Abbildung 13). P-VASP und eNos sind hierbei Bestandteile der NO°-Kaskade und Ausdruck für die NO°-Bioverfügbarkeit bzw. NO°-Synthese. Die Verhältnisse sind als Mittelwerte±SEM auf der y-Achse aufgetragen.

Abbildung 12 zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen WT+AT II-Tieren und *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren (WT+AT II: 1,46±0,15 *Mpo*$^{-/-}$+AT II: 1,72±0,30; p=0,521). Die einzigen signifikanten Unterschiede bestehen jeweils zwischen den Kontrollgruppen und den jeweiligen behandelten Gruppen. So gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen WT ctrl-Tieren und WT+AT II-Tieren und zwischen *Mpo*$^{-/-}$ ctrl-Tieren und *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren (WT ctrl: 2,72±0,25 WT+AT II: 1,46±0,15; p= 0,012) (*Mpo*$^{-/-}$ ctrl: 3,08±0,50 *Mpo*$^{-/-}$+AT II: 1,72±0,30; p=0,005).

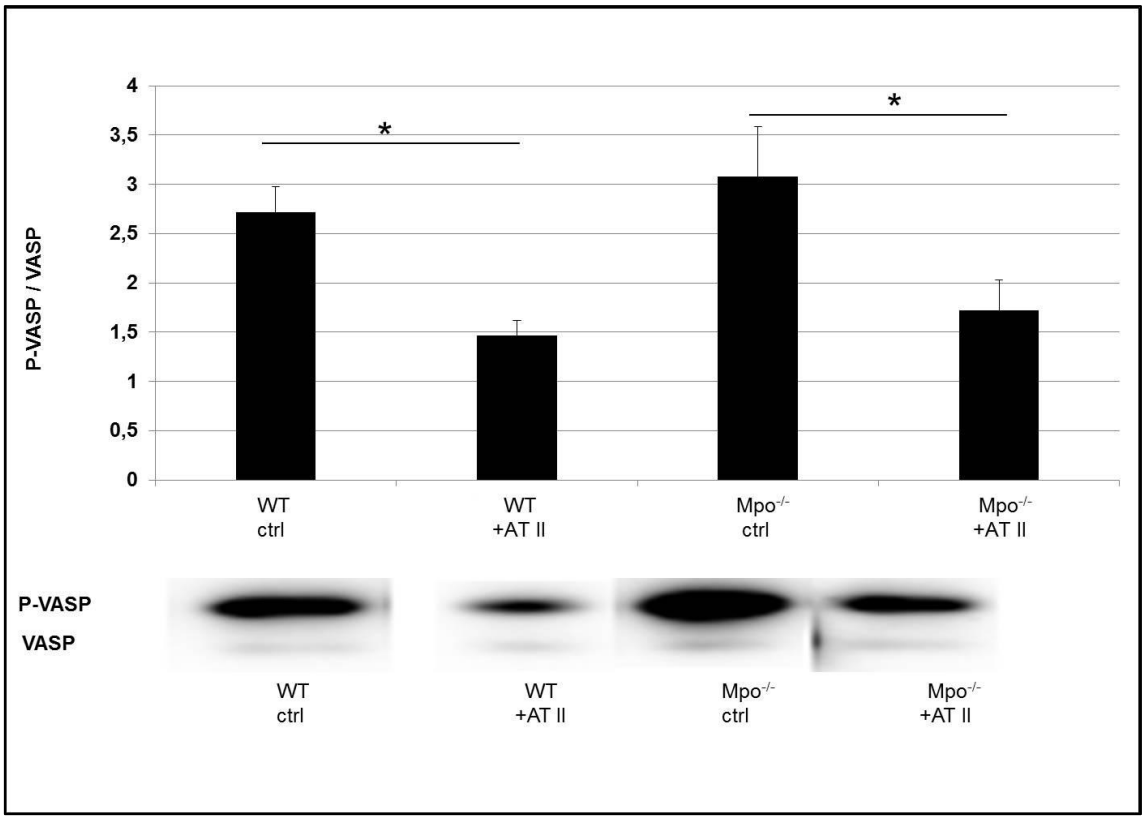

Abbildung 12: Bandenausschnitt aus der Westernblot-Analyse (unten). Verhältnisse zwischen P-VASP und VASP (oben). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den WT+AT II-Tieren und den *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren (p=0,521). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen zu den jeweiligen Kontrollgruppen (WT ctrl: 2,72±0,25 WT+AT II: 1,46±0,15; p= 0,012) (*Mpo*$^{-/-}$ ctrl: 3,08±0,50 *Mpo*$^{-/-}$+AT II: 1,72±0,30; p=0,005). Zur Symbol-Erklärung: * p-Wert ≤0,05

Vergleicht man die Ergebnisse aus Abbildung 13 zeigen sich weder signifikante Unterschiede zwischen WT+AT II-Tieren und *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren noch zwischen anderen Versuchsgruppen.

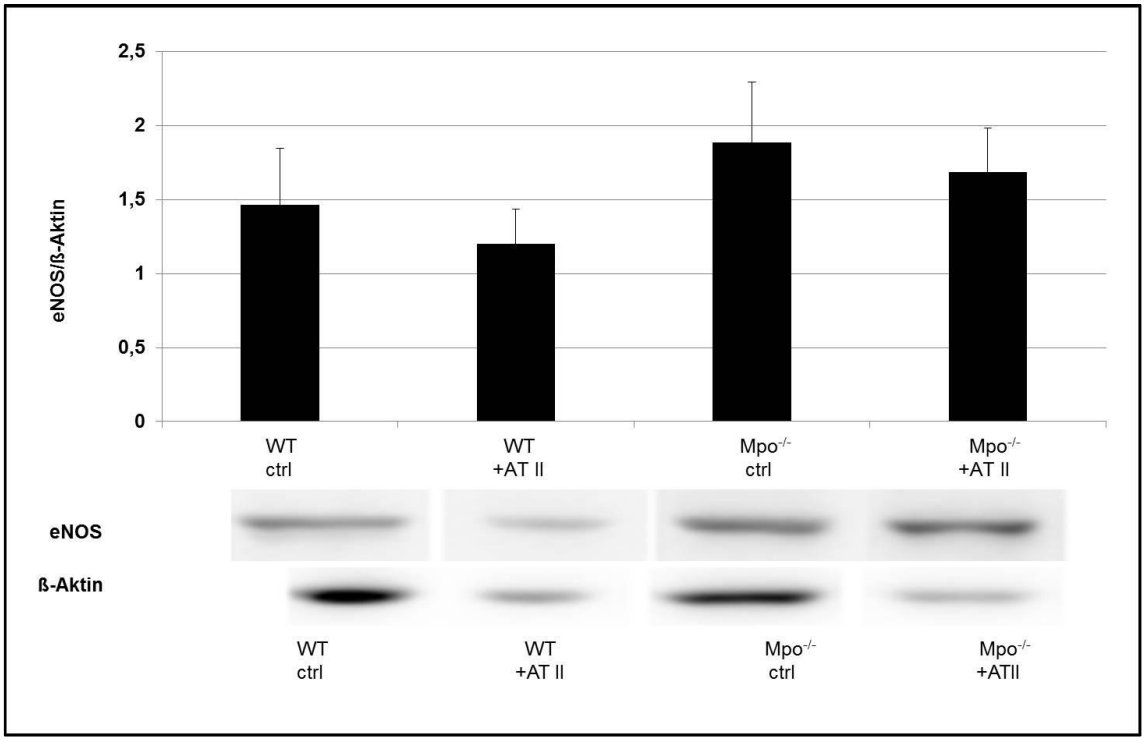

Abbildung 13: Bandenausschnitt aus der Westernblot-Analyse (unten). Verhältnisse zwischen eNOS und ß-Aktin (oben). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den WT+AT II-Tieren und den *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren (p=0,273).

4.4 Histologische Messung der Intima-Mediadicke

Die Intima-Mediadicken der Aorten wurden bestimmt und dann auf der y-Achse aufgetragen. Die Werte sind als Mittelwerte±SEM dargestellt.

Aus Abbildung 14 lässt sich entnehmen, dass sich die WT ctrl-Tiere signifikant von den WT+AT II-Tieren hinsichtlich der Intima-Mediadicke unterscheiden: So ist die Intima-Mediadicke der Aorten der WT ctrl-Tiere im Mittel 39% dünner als die der WT+AT II-Tiere (WT+AT II: 144,80±2,43 µm WT ctrl: 87,82±3,74 µm; p=0,000003). Dieser signifikante Unterschied zeigte sich auch zwischen den *Mpo*$^{-/-}$±AT II-Tieren. Hier zeigten die *Mpo*$^{-/-}$ ctrl-Tiere im Mittel eine um 30 % dünnere Intima-Mediadicke (*Mpo*$^{-/-}$+AT II: 141,80±6,27 µm *Mpo*$^{-/-}$ ctrl: 99,15±8,03 µm; p=0,00003). Ein weiterer Unterschied zeigte sich zwischen den WT+AT II+NaSCN-Tieren und den WT+AT II-Tieren. Die WT+AT II+NaSCN-Tiere zeigten eine im Mittel um 25 % dünnere Intima-Mediadicke (WT+AT II: 144,80±2,43 µm WT+AT II+NaSCN: 106,35±6,85 µm; p=0,0012). Auch der Unterschied zwischen *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren und *Mpo*$^{-/-}$+AT II+NaSCN-Tieren ist mit einem p-Wert von 0,000001 signifikant (*Mpo*$^{-/-}$+AT II: 141,80±6,27 µm *Mpo*$^{-/-}$+AT II+NaSCN: 83,53±7,59 µm; p=0,000001).

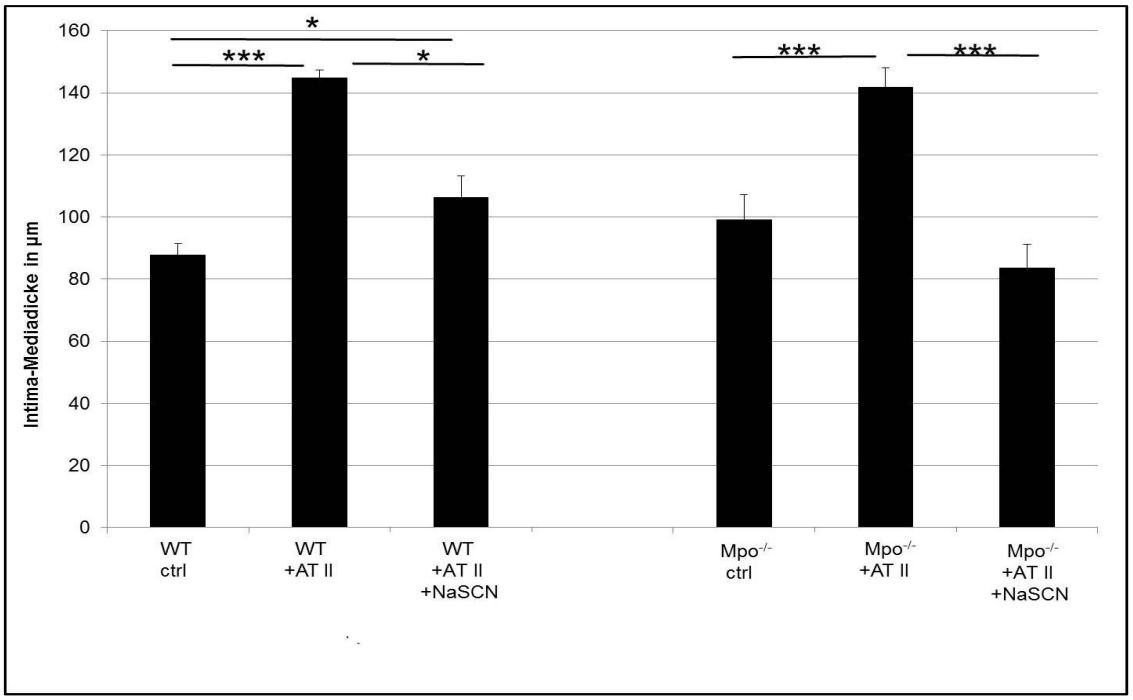

Abbildung 14: Ergebnisse der Intima-Mediadicken-Messung in µm. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den WT+AT II-Tieren und den *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren (p>0,05). Es zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen WT ctrl-Tieren und WT+AT II-Tieren (p=0,000003) sowie *Mpo*$^{-/-}$ ctrl-Tieren und *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren (p=0,00003). Weiterhin zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen WT+AT II-Tieren und WT+AT II+NaSCN-Tieren (p=0,0012) und zwischen *Mpo*$^{-/-}$+AT II-Tieren und *Mpo*$^{-/-}$+AT II+NaSCN-Tieren (p=0,000001). Zur Symbol-Erklärung: * p-Wert ≤0,05; ** p-Wert ≤0,001;* p-Wert ≤0,0001.**

Auch der Unterschied zwischen den WT ctrl-Tieren und den WT+AT II+NaSCN-Tieren ist mit einem p-Wert von 0,04 signifikant. Hierbei beträgt der Unterschied im Mittel 17 % (WT ctrl: 87,82±3,74 µm WT+AT II+NaSCN: 106,35±6,85 µm; p=0,04). Nicht signifikant waren die Unterschiede zwischen den WT+AT II-Tieren und den *Mpo*$^{-/-}$-+AT II-Tieren (WT+AT II: 144,80±2,43 µm *Mpo*$^{-/-}$ +AT II: 141,80±6,27 µm; p=0,747) und die Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen (WT ctrl: 87,82±3,74 µm *Mpo*$^{-/-}$ ctrl: 99,15±8,03 µm; p=0,229).

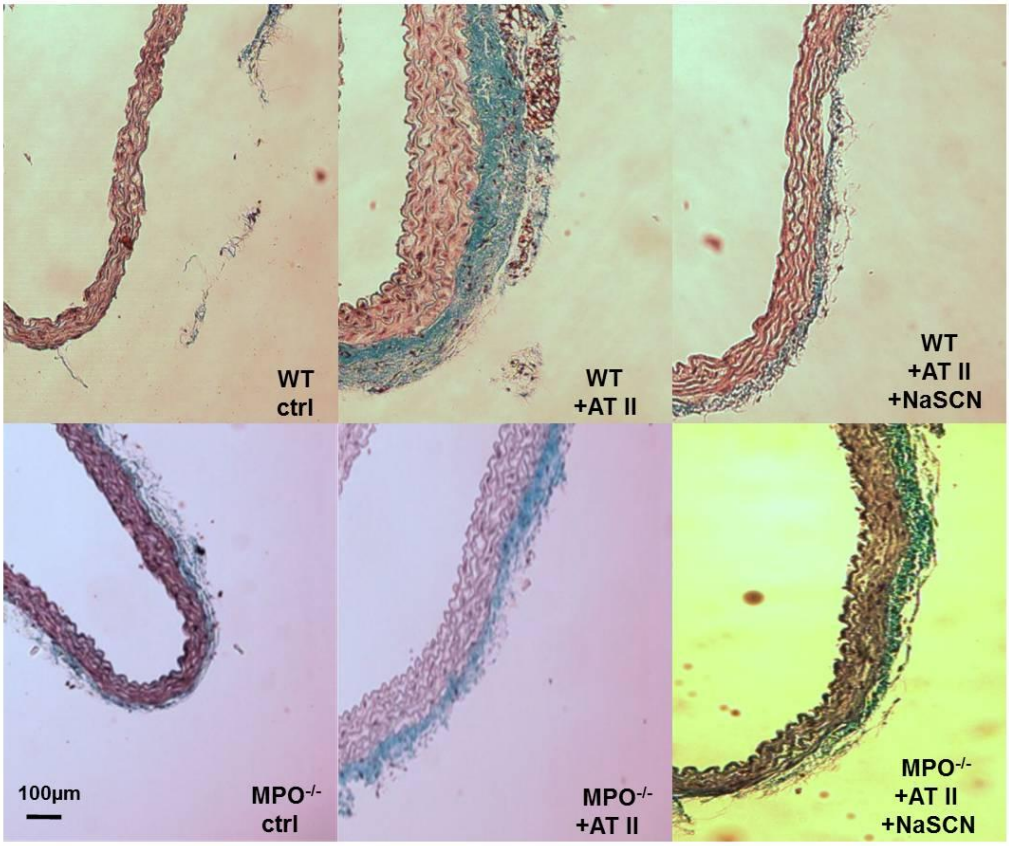

Abbildung 15: Fotografien von repräsentativen Aortenanschnitten der verschiedenen Versuchsgruppen. Bei der Färbung handelt es sich um eine Masson-Goldner-Färbung. Bei dieser Färbung erscheint kollagenes Bindegewebe grün, Muskelfasern rot und Zellkerne braun-schwarz. Im unteren linken Abbildungsteil ist der Maßstab angegeben.

4.5 Quantitative Messung von MPO nach PMN Stimulation

Die MPO-Konzentrationen, welche bei dem unter 2.2.11 und 2.2.12 beschriebenen Versuchsaufbau nach Stimulation isolierter PMN ex-vivo gemessen wurden, wurden in ng/ml umgerechnet und dann zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Spendern jeweils auf die zugehörige Kontrollprobe bezogen, sodass die Probe 1=100 % gesetzt wurde. In Abbildung 16 sind auf der y-Achse die relative MPO-Konzentration bezogen auf die Kontrolle als Mittelwerte±SEM abgebildet.

Aus der Abbildung 16 lässt sich entnehmen, dass die Stimulation mit 5 nM PMA zu einer fast 4-fachen MPO-Konzentration im Überstand der Zellen im Vergleich zur Kontrolle führt (ctrl: 1±0 5 nM PMA: 3,84±1,40; p= 0,010). Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und der Gruppe mit 5 nM PMA+10 µM AT II (ctrl: 1±0 5 nM PMA+10 µM AT II: 3,10±0,68; p= 0,50) und zwischen den Kontrollen und der Gruppe mit 5 nM PMA+100 µM AT II (ctrl: 1±0 5 nM PMA+100 µM AT II: 3,19±1,09; p=0,042). Nicht signifikant voneinander unterschieden sich hingegen die Kontrollen von der Gruppe mit 5 nM PMA+100 nM AT II (ctrl: 1±0 5 nM PMA+100 nM AT II: 2,53±0,69; p=0,145). Weiterhin zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und den Gruppen nur mit AT II-Stimulation in den verschiedenen Konzentrationen (ctrl: 1±0 100 nM AT II: 1,00±0,10; p=0,997), (ctrl:1±0 10 µM AT II: 0,95±0,18; p=0,961), (ctrl: 1±0 100 µM AT II:0,98±0,07; p=0,985).

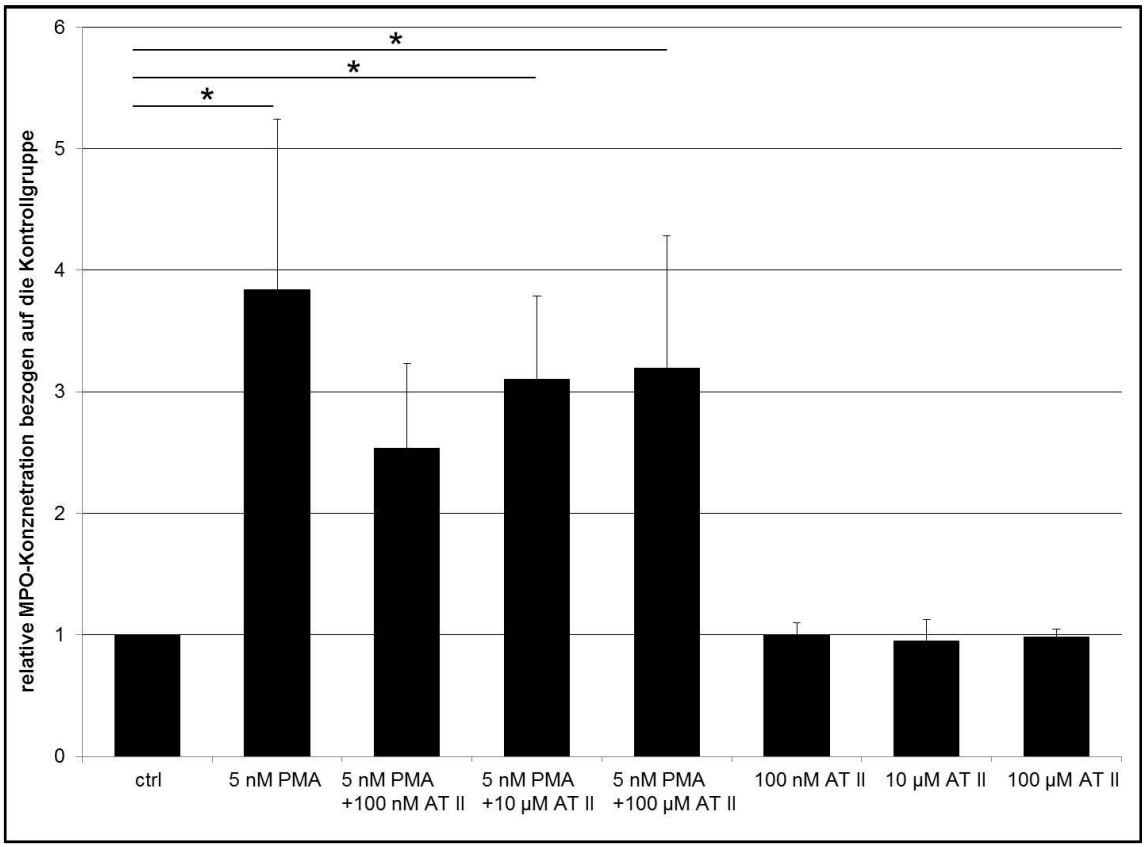

Abbildung 16: Ergebnisse der quantitativen MPO-Messung nach Stimulation der PMN mit PMA und/ oder AT II in verschiedenen Konzentrationen. Die Ergebnisse sind zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Spendern (n=4) auf den Mittelwert der ctrl bezogen. Das heißt: die ctrl wurde 1=100% gesetzt und die anderen Ergebnisse auf diese bezogen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den ctrl und den Proben, welche mit 5 nM PMA inkubiert wurden (p= 0,010). Weiterhin zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den ctrl und 5 nM PMA+10 µM AT II (p= 0,050) und zwischen den ctrl und den 5 nM PMA+100 µM AT II (p= 0,042). Nicht signifikant unterschieden sich die ctrl von 5 nM PMA+100 nM AT II (p=0,145) sowie von 100 nM AT II (p=0,997), 10 µM AT II (p=0,961) und 100 µM AT II (p=0,985). Zur Symbol-Erklärung: * p-Wert ≤0,05

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Infusion von AT II führt in WT-Tieren zu erhöhten MPO-Plasma-Spiegeln.

2. AT II vermindert MPO-abhängig die endothelabhänige Relaxation der Gefäße im Tierversuch.

3. Unter der Applikation von NaSCN - einem Inhibitor der Myeloperoxidase - wird die unter 2. beschriebene Wirkung von ATII auf die endothelabhängige Relaxation nahezu aufgehoben.

4. Die Infusion von AT II hat bei WT-Tiere eine schlechtere endothelunabhängige Relaxation von Gefäßen zur Folge, welche wiederum von NaSCN verbessert wird.

5. Die Infusion von AT II führt in *Mpo*$^{-/-}$-Tieren zu einer Verschlechterung der endothelunabhängigen Relaxationsfähigkeit von Gefäßen, allerdings ohne Reversibilität durch NaSCN.

6. Die Infusion von AT II hat in WT-Tieren und in *Mpo*$^{-/-}$-Tieren eine Zunahme der histologisch gemessenen Intima-Mediadicken zur Folge. Diese pathologische Veränderung ist bei gleichzeitiger Gabe von NaSCN deutlich geringer ausgeprägt.

7. Die Stimmulation von humanen PMN mit verschiedenen Konzentrationen von AT II führt in-vitro nicht zu einer Erhöhung der MPO-Ausschüttung.

5 Diskussion

5.1 Wirkung von AT II auf PMN

Die von El Bekay et al. und Hazan-Halevy et al. in ihren Arbeiten beschriebene stimulierende Wirkung von AT II auf menschliche PMN im in-vitro Versuch, konnte in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. Allerdings zeigt sich in den in-vivo Versuchen eine signifikant erhöhte MPO-Ausschüttung durch die Applikation von AT II (Abbildung 5).

Wie aus Abbildung 16 zu entnehmen führt die alleinige Applikation von AT II in verschiedenen Konzentrationen nicht zu einem signifikanten Anstieg der MPO-Freisetzung aus den isolierten PMN im in vitro Versuch. Dies könnte Hinweis auf die Anwesenheit von anderen Molekülen sein, welche wichtig für die Ausschüttung von MPO aus PMN sind. Ein weiterer Grund für die fehlende MPO-Ausschüttung könnte auch der Umstand sein, dass es schwer möglich ist die physiologischen Bedingungen eines in vivo Experiments nachzustellen. So haben z. B. Temperatur, pH und die Konzentration der einzelnen Moleküle eine hohe Auswirkung auf die Versuchsergebnisse.

Die Gabe des Granulozytenaktivators PMA führt zu einer signifikanten Erhöhung der MPO-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings führt nur die Kombination von PMA und AT II in den beiden höheren Konzentrationen (10µM und 100µM) zum selben Effekt. Die Applikation von AT II führt allerdings auch nicht zu einer signifikanten Reduzierung der MPO-Freisetzung.

5.2 Wirkung von MPO und AT II auf die Gefäßfunktion

Angiotensin II ist für seine stark vasokonstriktorische Wirkung auf das menschliche Gefäßsystem bekannt. Diese Wirkung wird hauptsächlich direkt über den AT II-Typ-1-Rezeptor entfaltet.

Der Typ-1-Rezeptor ist allerdings nicht nur für die Vasokonstriktion verantwortlich, sondern führt über verschiedenste Signalkaskaden auch zur Freisetzung von chemotaktischen Mediatoren, die wiederum Leukozyten anlocken (El Bekay et al. 2003, Hazan-Halevy et al. 2005).

Abbildung 6 und 7 zeigen die Wirkung von AT II auf die endothelabhängige Relaxationsfähigkeit von WT-Tieren und *Mpo*$^{-/-}$-Tieren. Hierbei führt AT II zu einer Verschlechterung der Relaxationsfähigkeit der WT-Tiere. Diese Verschlechterung ließ sich allerdings nicht im *Mpo*$^{-/-}$-Tier nachweisen. Das bedeutet, dass MPO eine Rolle bei der Entwicklung dieser Pathologie spielt. Man könnte sogar vermuten, dass AT II zu Vasokonstriktion und einer vermehrten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren führt, wobei aber erst die Anwesenheit von Leukozyten und hier speziell von PMN MPO vermittelt eine Kaskade mit Reduzierung der NO°-Bioverfügbarkeit und einhergehender Verschlechterung der Relaxationsfähigkeit initiiert. Eiserich et al. zeigen, dass ein inflammatorischer Reiz zu einer Verschlechterung der Relaxationsfähigkeit im WT führt, welche aber im *Mpo*$^{-/-}$-Tier ausbleibt (Eiserich et al. 2002).

Das aus den PMN freigestzte MPO akkumuliert im subendothelialen Raum (Baldus et al. 2001) und kann über verschiedene Mechanismen die Bioverfügbarkeit von NO° verringern. Dies ist ein wichtiger Faktor der endothelialen Dysfunktion (Nicholls und Hazan 2005) und somit wichtig in der Atheroskleroseentstehung (Ross 1999). Zum einen können die durch MPO gebildeten ROS die NO°-Bioverfügbarkeit direkt durch Oxidation verringern (Stroes et al. 1998) und zum anderen ist es Reaktionsprodukten der MPO möglich, das Ausgangsmolekül (L-Arginin) der NO°-Synthese zu chlorinieren.
Die Chlorinierung hat zur Folge, dass die NOS blockiert wird und nicht mehr richtig arbeitet (Zhang C. et al. 2001). Eine weitere Möglichkeit in die NO°-Synthese einzugreifen ist zum einen die Dislokation der eNOS durch oxidativ veränderte HDL-Partikel (Marsche et al. 2004) und zum anderen die Inhibition der eNOS durch das endogen gebildetet Molekül ADMA, dessen Konzentration durch die von MPO gebildete hypochlorige Säure erhöht wird (Leitner et al. 2011).

In unseren Versuchen, zur Quantifizierung von Enthothelfunktionsmarkern, zeigten sich die erwarteten Unterschiede in der NO°-Bioverfügbarkeit zwischen Tieren mit und ohne MPO nicht, dies ist aus der Abbildung 12 zu entnehmen.

Man würde erwarten, dass WT-Tiere mit AT II Behandlung eine geringere Phosphorylierung von VASP als Ausdruck der erniedrigten NO°-Bioverfügbarkeit im Vergleich zu *Mpo*$^{-/-}$-Tieren mit AT II Behandlung zeigen.

Diese Beobachtungen könnten mit dem Aufbau des Versuches zusammenhängen. So wäre es durchaus denkbar, dass sich andere Wege, welche zu einer höheren NO°-Bioverfügbarkeit führen, über einen Versuchszeitraum von 6 Wochen entwickeln. So wäre es möglich, dass durch die Ansammlung von ROS in WT-Tieren unter AT II Behandlung der Transkriptionsfaktor NFκB vermehrt aktiviert wird, was u.a. eine erhöhte Expression der iNOS induziert. So würde trotz der Oxidation von NO° und Hemmung der NO-Synthese durch MPO im WT eine ähnliche Bioverfügbarkeit von NO° wie im *Mpo*$^{-/-}$-Tier auftreten (Morgan und Liu 2010). Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der Ergebnisse stellt die unterschiedliche Präparation der Aorten für die Messungen im Organbad und die Durchführung der Western Blots dar. So wurden die Aorten für die Organbadversuche von der Adventitia befreit, während diese bei den Western Blots nicht entfernt wurde. Des Weiteren ist P-VASP nur ein Marker für die NO°-Bioverfügbarkeit und kein direkter Nachweis für diese.

Die Verschlechterung der endothelabhängigen Relaxationsfähigkeit wird durch eine Zuführung von NaSCN über das Trinkwasser der Versuchstiere insoweit aufgehoben, dass wie aus Abbildung 8 zu entnehmen ist, kein signifikanter Unterschied zwischen den WT ctrl und den WT+AT II+NaSCN besteht. Der Unterschied zwischen den WT+AT II und den WT+AT II+NaSCN ist allerdings signifikant. Somit scheint NaSCN einen Einfluss auf die Reaktionskaskade zu haben. Van Dalen et al. untersuchten den Einfluss von NaSCN auf MPO. Hierbei endeckten sie, dass NaSCN von MPO als Substrat bevorzugt umgesetzt wird. Bei dieser Reaktion entsteht anstatt der sehr oxidativ-wirksamen hypochlorigen Säure die weniger reaktive hypocyanide Säure.

Außerdem beschrieben sie, dass es vermehrt zur Bildung von Compound II kommt, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit von MPO herabgesetzt wird (van Dalen et al. 1997, Davies et al. 2008).

5.3 Wirkung von MPO und AT II auf strukturelle Veränderungen am Gefäß

Im Hinblick auf die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit, die in den Abbildungen 9 bis 11 dargestellt wird, fallen folgende Ergebnisse auf. AT II hat auch hier einen negativen Einfluss auf die Relaxationsfähigkeit in WT-Tieren. Allerdings führt die Applikation von AT II in *Mpo*$^{-/-}$-Tieren zu einer Relaxationsfähigkeit, welche sich erstens signifikant von der Relaxationsfähigkeit der *Mpo*$^{-/-}$ ctrl-Tieren unterscheidet und zweitens keinen signifikanten Unterschied zu den WT+AT II-Tieren zeigt. Diese Ergebnisse werden noch untermauert durch die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen, die aus Abbildung 14 zu entnehmen sind. Hier zeigt sich, dass die Applikation von AT II in WT-Tiere und *Mpo*$^{-/-}$-Tiere zu einer Zunahme der Intima-Mediadicke im Vergleich zu den Kontrollen führt. Die Zunahme ist durch eine Hypertrophie der glatten Gefäßmuskelzellen zu erklären (Kintscher et al. 2003).

Die endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit ist hierbei unter anderem ein Marker für die Ausstattung des Gefäßes mit Kollagenfasern, die für die Flexibilität des Gefäßes von großer Bedeutung sind. Weiterhin spielt auch die Proliferation und Funktion von glatten Muskelzellen eine große Rolle bei der Flexibilität des Gefäßes. Die Veränderungen der Zusammensetzung der Kollagenfasern wird Fibrose genannt und wird u. a. durch Reaktionsprodukte wie HOCl getriggert.

Hierbei hat HOCl einen aktivierenden Einfluss auf MMPs, welche wiederum für den Umbau von Kollagenfasern verantworlich sind (Fu et al. 2001, Fu et al. 2003). Ein möglicher Grund für die in ähnlichem Maße veränderte endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit und die Hypertrophie der Intima-Media bei *Mpo*$^{-/-}$-Tieren und WT-Tieren unter AT II- Applikation könnte zum einen sein, dass diese Versuchsergebnisse komplett MPO unabhängig sind.

Zum anderen könnte die Akkumulation von H_2O_2 eine Rolle spielen. Es könnte durch den fehlenden MPO-vermittelten Umsatz zu einer Anreicherung von H_2O_2 in der *Mpo*$^{-/-}$ Maus kommen. Da H_2O_2 selbst auch oxidativ wirksam ist, wäre eine profibrotische und vielleicht auch proinflammatorische Wirkung, zum Beispiel über die NFκB-Kaskade möglich (Schreck et al. 1991).

Wie schon bei der endothelabhängigen Relaxation führt die Gabe von NaSCN zu einer Aufhebung des Effekts von AT II auf die endothelunabhängige Relaxation im WT-Tier. Im *Mpo*$^{-/-}$-Tier hat NaSCN hingegen keinen Einfluss auf die AT II-Wirkung. Dieser Effekt zeigt, dass die Applikation von NaSCN zu einer höheren NO°-Bioverfügbarkeit durch MPO-Inhibierung führt.

Aus den Versuchen zur Messung der Intima-Mediadicke ist zu entnehmen, dass NaSCN auch hier einen regulierenden Einfluss auf die Wirkung von AT II hat. So reagieren die Gefäße von WT-Tieren und *Mpo*$^{-/-}$-Tieren auf die Applikation von AT II mit einer Hypertrophie der Intima-Media. Wurde nun zusätzlich NaSCN zugefügt, fällt die Zunahme wesentlich niedriger aus.

Hier stellt sich die Frage warum ein Unterschied in Bezug auf die Wirkung von NaSCN auf die *Mpo*$^{-/-}$-Tiere zu sehen ist, obwohl dieser in den obengenannten Organbadversuchen nicht zu sehen ist. In diesem Fall könnten noch andere Peroxidasen z. B. die eosinophile Peroxidase (EPO) eine Rolle spielen. Diese ist in den *Mpo*$^{-/-}$-Tiere vorhanden und produziert neben anderen oxidativen Produkten auch hypothiocyanide Säure aus NaSCN. Bei den WT-Tieren wird durch MPO ebenfalls vermehrt hypothiocyanide Säure hergestellt, da NaSCN bevorzugt umgesetzt wird, außerdem hemmt NaSCN MPO (van Dalen et al. 1997, Davies et al. 2008).

Die bei der Umsetzung von NaSCN durch EPO und MPO entstehende hypothiocyanide Säure hat nicht nur eine geringere oxidative Wirkung, sondern wirkt sogar antioxidativ, in dem sie, zumindest im WT-Tier direkt mit HOCl oder den Reaktionsprodukten reagiert und diese so unschädlich macht (Chandler und Day 2012).

5.4 MPO als therapeutisches Target

Wie oben dargestellt spielt MPO eine bedeutende Rolle in der Entstehung von endothelialer Dysfunktion und Atherosklerose. Die Inhibition von MPO würde somit sowohl kurativen als auch präventiven Charakter bei der Behandlung von Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems haben. Eine Behandlungsmöglichkeit dieser Erkrankungen, wie z. B. der koronaren Herzkrankheit, durch die Inhibition von MPO, wäre von hoher klinischer Relevanz.

Da MPO aber eine wichtige Rolle im Immunsystem bei der Abwehr von Mikroorganismen und anderen Pathogenen spielt, stellt sich die Frage, ob die Inhibierung von MPO zu einem erhöhten Infektionsrisiko führt. Hierbei ist die Studienlage nicht eindeutig. So scheinen Patienten mit hereditärer MPO-Defizienz ein höheres Risiko für eine Pneumonie mit Candida albicans zu haben. Allerdings scheint die Abwehr anderer Pathogene nicht betroffen zu sein (Parry et al. 1981). Außerdem muss die Immunkompetenz auch immer im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen gesehen werden. So wurde in klinischen Studien ein Zusammenhang der Infektion von MPO-defizienten Patienten mit Candida albicans zu Diabetes mellitus hergestellt (Lanza 1998).

Aufgrund einer möglichen Kreuzreaktivität mit anderen Peroxidasen (u. a. Laktoperoxidase, eosinophiler und thyreoidaler Peroxidase) muss eine hohe Selektivität eines MPO-Inhibitors gewährleistet sein, um ein ausgeprägtes Nebenwirkungsspektrum zu verhindern.

Somit müssen diese Fragen in weiteren Studien und wissenschaftlichen Experimenten untersucht werden.

5.5 Ausblick

Von großem wissenschaftlichem Interesse sind zukünftig nähere Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von NO°. So sollten weitere an der Generierung beteiligte Proteine wie z. B. die induzierbare NO-Synthase qualitativ und quantitativ analysiert werden. Interessant wäre auch die Untersuchung weiterer Proteine der NO°-*Downstream*-Kaskade, wie zum Beispiel Proteinkinase G, die Guanylatzyklase und cGMP. Diese könnten analysiert und auf oxidative Veränderung untersucht werden. Hierbei wären insbesondere Chlorinierungen von Interesse, da diese spezifisch für die durch MPO verursachten Oxidationen sind. Von weiterem Interesse könnten auch Analysen zu vasokonstriktorisch wirksamen Elementen, wie der Rho-Kinase, sein. Hierzu könnten auch in-vivo Versuche zum peripheren Gefäßwiderstand gemacht werden.

In zusätzlichen Versuchen muss der genauen Mechanismen der Wirkung von NaSCN auf von MPO-abhängigen Reaktionen untersucht werden. Weiterhin könnten andere MPO-Inhibitoren zum Einsatz kommen. Auch sollten Untersuchungen durchgeführt werden, die eine Leukozytenrekrutierung und -migration in betroffene Gefäßareale belegen. Dies könnte zum Beispiel mit immunhistologischen Methoden erfolgen.

Die Entwicklung eines MPO-spezifischen Inhibitors ist von großer klinischer Bedeutung und sollte weiter vorangetrieben werden.

6 Zusammenfassung

MPO und dessen oxidativ wirksame Produkte - wie HOCl - spielen eine wichtige Rolle in der Pathogen Abwehr. Sie sind aber gleichzeitig von Bedeutung für pro-inflammatorische Mechanismen, welche sich vor allem im Gefäßsystem manifestieren und die vaskuläre Integrität beeinträchtigen. Vorangehende Arbeiten konnten aufzeigen, dass MPO über Synthese kleiner Radikalzwischenprodukte die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid verringert und so die Entstehung von endothelialer Dysfunktion bedingt. Diese Arbeit untersucht den Effekt einer chronischen MPO-Freisetzung im Tiermodell und explizit die Bedeutung von MPO im Zusammenhang mit dem AT II vermittelten vaskulären Remodeling.

Diese Arbeit zeigt, dass durch AT II die MPO-Freisetzung aus PMN in vivo stimuliert wird. Außerdem lassen die in vitro Experimente mögliche Kofaktoren in der MPO-Freisetzung aus aktivierten PMN vermuten. Weiterhin bestätigt diese Arbeit, dass MPO und seine Reaktionsprodukte eine wichtige Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung von endothelialer Dysfunktion - einer Vorstufe der Atherosklerose - spielen. So wird die endotheliale Gefäßfunktion durch AT II nur in Anwesenheit von MPO gestört. Dies führt zu einer Reduzierung der NO°-Bioverfügbarkeit und damit zu einer Abnahme der Relaxationsfähigkeit des Gefäßes. Die Bedeutung von MPO für AT II-vermittelte strukturelle Veränderungen des Gefäßes werden durch diese Arbeit nur zum Teil beleuchtet und bedürfen weiterer Untersuchungen. Der Inhibierung von MPO kommt eine hohe klinische Relevanz zu. So zeigt diese Arbeit, dass die MPO vermittelte Wirkung auf die NO°-Bioverfügbarkeit und strukturelle Veränderungen am Gefäßsystem durch die Applikation von NaSCN – einem Inhibitor der Myeloperoxidase – reduziert wird.

Zusammengefasst untersucht die vorliegende Arbeit die Wirkung der Myeloperoxidase auf das AT II-vermittelte vaskuläre Remodeling. Diese Arbeit trägt zum pathophysiologischen Verständnis der Gefäßdysfunktion bei, unterstreicht die Bedeutung von AT II als Leukozytenaktivator und zeigt mit MPO ein wichtiges Zielmolekül für die Behandlung der Atherosklerose auf.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACE	*Angiotensin-Converting-Enzyme*
ADMA	asymmetrisches Dimethylarginin
APS	Ammoniumpersulfat
AT I	Angiotensin I
AT II	Angiotensin II
BH_4	Tetrahydrobiopterin
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CD11a/CD18	*Cluster of Differentiation 11a/ Cluster of Differentiation 18*
CD11b/CD18	*Cluster of Differentiation 11b/ Cluster of Differentiation 18*
CD36	*Cluster of Differentiation 36 (scavenger receptor)*
CD44	*Cluster of Differentiation 44*
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl^-	Chlorid-Ion
ctrl	Kontrolle
DDAH	Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase
DNA	*Desoxyribonucleinacid*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPO	Eosinophile Peroxidase
ESL-1	E-Selektin-Ligand 1
GTP	Guanosintriphosphat
H^+	Proton
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid

HBSS	*Hanks balanced salt solution*
HCl	Salzsäure
HDL	*high-Density-Lipoprotein*
HOCl	hypochlorige Säure
Hot-Studie	*Hypertension optimal treatment*-Studie
ICAM	*Intercellular Celladhäsion Molecül*
IL-1-β	Interleukin 1 beta
IL-17	Interleukin 17
IL-6	Interleukin 6
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KCl	Kaliumchlorid
kD	kiloDalton
Kg	Kilogramm
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	*Low-Density-Lipoprotein*
M	Molar
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrixmetalloproteinase
Monica	Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease
MPO	Myeloperoxidase
Mpo$^{-/-}$	Knockout für Myeloperoxidase
MPO°-Fe^{III}	Myeloperoxidase
MPO°-Fe^{IV} → O	Myeloperoxidase Compound I
MPO-Fe^{IV} → O	Myeloperoxidase Compound II
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid

NaSCN	Natriumthiocyanat
NFκB	*Nuclear Factor „kappa light chain enhancer“ of activated B-cells*
NO°	Stickstoffmonoxid
NO_2°	Stickstoffdioxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O^{2-}	Sauerstoff-Ion
PBS	*phosphate buffered saline*
pH	*pondus Hydrogenii* (pH-Wert)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PSLG-1	P-Selektin-Ligand 1
P-VASP	Phosporyliertes *Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein*
R°	organisches Radikal
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RH	organisches Molekül
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	*rounds per minute*
SCN^-	Thiocyanat-Ion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	*standard error of mean*
TBS	*tris buffered saline*
TBST	*tris buffered saline* +Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Tyr°	Tyrosin
VASP	*Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein*
VCAM	*Vascular Celladhäsion Molecule*
WT	Wildtyp

8 Literaturverzeichnis

Agner, K. (1941): Verdoperoxidase. A ferment isolated from leucocytes. In: *Acta Chem. Scand.* (A 2 (Suppl. 8),), S. 1–62.

Aratani, Y.; Koyama, H.; Nyui, S.; Suzuki, K.; Kura, F.; Maeda, N. (1999): Severe impairment in early host defense against Candida albicans in mice deficient in myeloperoxidase. In: *Infect. Immun.* 67 (4), S. 1828–1836.

Askari, A. T.; Brennan, M. L.; Zhou, X.; Drinko, J.; Morehead, A.; Thomas, J. D. et al. (2003): Myeloperoxidase and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Play a Central Role in Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction AT Askari and M.-L. Brennan contributed equally to this work. In: *Journal of Experimental Medicine* 197 (5), S. 615–624.

Asselbergs, Folkert W.; Tervaert, Jan-Willem Cohen; Tio, René A. (2004): Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. In: *N. Engl. J. Med.* 350 (5), S. 516-8; author reply 516-8.

Baldus, S.; Eiserich, J. P.; Mani, A.; Castro, L.; Figueroa, M.; Chumley, P. et al. (2001): Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. In: *J Clin Invest* 108 (12), S. 1759–1770.

Baldus, Stephan; Heeschen, Christopher; Meinertz, Thomas; Zeiher, Andreas M.; Eiserich, Jason P.; Münzel, Thomas et al. (2003): Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. In: *Circulation* 108 (12), S. 1440–1445.

Batenburg, Wendy W.; Tom, Beril; Schuijt, Martin P.; Danser, A. H. Jan (2005): Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation. Focus on bradykinin, NO and endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). In: *Vascul. Pharmacol.* 42 (3), S. 109–118.

Borregaard, Niels (2010): Neutrophils, from marrow to microbes. In: *Immunity* 33 (5), S. 657–670.

Borregaard, N.; Cowland, J. B. (1997): Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. In: *Blood* 89 (10), S. 3503–3521.

Bos, A.; Wever, R.; Roos, D. (1978): Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 525 (1), S. 37–44.

Brennan, M. L.; Anderson, M. M.; Shih, D. M.; Qu, X. D.; Wang, X.; Mehta, A. C. et al. (2001): Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. In: *J. Clin. Invest.* 107 (4), S. 419–430.

Brennan, Marie-Luise L.; Penn, Marc S.; van Lente, Frederick; Nambi, Vijay; Shishehbor, Mehdi H.; Aviles, Ronnier J. et al. (2003): Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. In: *N Engl J Med* 349 (17), S. 1595–1604.

Brennan, Marie-Luise; Wu, Weijia; Fu, Xiaoming; Shen, Zhongzhu; Song, Wei; Frost, Heather et al. (2002): A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. In: *J. Biol. Chem.* 277 (20), S. 17415–17427.

Brown, K. E.; Brunt, E. M.; Heinecke, J. W. (2001): Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver. In: *Am. J. Pathol.* 159 (6), S. 2081–2088.

Cai, H.; Harrison, D. G. (2000): Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. In: *Circ Res* 87 (10), S. 840–844.

Chandler, Joshua D.; Day, Brian J. (2012): Thiocyanate: a potentially useful therapeutic agent with host defense and antioxidant properties. In: *Biochem. Pharmacol.* 84 (11), S. 1381–1387.

Cheng, Zhong Jian; Vapaatalo, Heikki; Mervaala, Eero (2005): Angiotensin II and vascular inflammation. In: *Med Sci Monit* 11 (6), S. RA194-205.

Daugherty, A.; Dunn, J. L.; Rateri, D. L.; Heinecke, J. W. (1994): Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. In: *J Clin Invest* 94 (1), S. 437–444.

Davies, Michael J.; Hawkins, Clare L.; Pattison, David I.; Rees, Martin D. (2008): Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. In: *Antioxid. Redox Signal.* 10 (7), S. 1199–1234.

Duplain, H.; Burcelin, R.; Sartori, C.; Cook, S.; Egli, M.; Lepori, M. et al. (2001): Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. In: *Circulation* 104 (3), S. 342–345.

Eiserich, Jason P.; Baldus, Stephan; Brennan, Marie-Luise L.; Ma, Wenxin; Zhang, Chunxiang; Tousson, Albert et al. (2002): Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. In: *Science* 296 (5577), S. 2391–2394.

El Bekay, Rajaa; Alvarez, Moisés; Monteseirín, Javier; Alba, Gonzalo; Chacón, Pedro; Vega, Antonio et al. (2003): Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. In: *Blood* 102 (2), S. 662–671.

Fiedler, T. J.; Davey, C. A.; Fenna, R. E. (2000): X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 A resolution. In: *J Biol Chem* 275 (16), S. 11964–11971.

Fu, X.; Kassim, S. Y.; Parks, W. C.; Heinecke, J. W. (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. In: *J Biol Chem* 276 (44), S. 41279–41287.

Fu, Xiaoyun; Kassim, Sean Y.; Parks, William C.; Heinecke, Jay W. (2003): Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. In: *J Biol Chem* 278 (31), S. 28403–28409.

Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V. (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. In: *Nature* 288 (5789), S. 373–376.

Galijasevic, Semira; Saed, Ghassan M.; Hazen, Stanley L.; Abu-Soud, Husam M. (2006): Myeloperoxidase metabolizes thiocyanate in a reaction driven by nitric oxide. In: *Biochemistry* 45 (4), S. 1255–1262.

Galley, H. F. (2004): Physiology of the endothelium. In: *British Journal of Anaesthesia* 93 (1), S. 105–113.

Gasse, C.; Hense, H. W.; Stieber, J.; Döring, A.; Liese, A. D.; Keil, U. (2001): Assessing hypertension management in the community: trends of prevalence, detection, treatment, and control of hypertension in the MONICA Project, Augsburg 1984-1995. In: *J Hum Hypertens* 15 (1), S. 27–36.

Green, Pattie S.; Mendez, Armando J.; Jacob, Jason S.; Crowley, Jan R.; Growdon, Whit; Hyman, Bradley T.; Heinecke, Jay W. (2004): Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. In: *J. Neurochem.* 90 (3), S. 724–733.

Griendling, K. K.; Minieri, C. A.; Ollerenshaw, J. D.; Alexander, R. W. (1994): Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. In: *Circ. Res.* 74 (6), S. 1141–1148.

Hansson, L. (1999): The Hypertension Optimal Treatment study and the importance of lowering blood pressure. In: *J Hypertens Suppl* 17 (1), S. S9-13.

Hazan-Halevy, Inbal; Levy, Tal; Wolak, Talya; Lubarsky, Ira; Levy, Rachel; Paran, Esther (2005): Stimulation of NADPH oxidase by angiotensin II in human neutrophils is mediated by ERK, p38 MAP-kinase and cytosolic phospholipase A2. In: *J. Hypertens.* 23 (6), S. 1183–1190.

Hazen, S. L.; Crowley, J. R.; Mueller, D. M.; Heinecke, J. W. (1997): Mass spectrometric quantification of 3-chlorotyrosine in human tissues with attomole sensitivity: a sensitive and specific marker for myeloperoxidase-catalyzed chlorination at sites of inflammation. In: *Free Radical Biology and Medicine* 23 (6), S. 909–916.

Hazen, S. L.; Heinecke, J. W. (1997): 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. In: *J Clin Invest* 99 (9), S. 2075–2081.

Hirche, Tim O.; Gaut, Joseph P.; Heinecke, Jay W.; Belaaouaj, Azzaq (2005): Myeloperoxidase plays critical roles in killing Klebsiella pneumoniae and inactivating neutrophil elastase: effects on host defense. In: *J. Immunol.* 174 (3), S. 1557–1565.

Inazawa, J.; Inoue, K.; Nishigaki, H.; Tsuda, S.; Taniwaki, M.; Misawa, S.; Abe, T. (1989): Assignment of the human myeloperoxidase gene (MPO) to bands q21.3----q23 of chromosome 17. In: *Cytogenet. Cell Genet.* 50 (2-3), S. 135–136.

Iwai, Masaru; Chen, Rui; Li, Zhen; Shiuchi, Tetsuya; Suzuki, Jun; Ide, Ayumi et al. (2005): Deletion of angiotensin II type 2 receptor exaggerated atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. In: *Circulation* 112 (11), S. 1636–1643.

Johnson-Léger, C.; Aurrand-Lions, M.; Imhof, B. A. (2000): The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair? In: *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 6), S. 921–933.

Kearney, Patricia M.; Whelton, Megan; Reynolds, Kristi; Muntner, Paul; Whelton, Paul K.; He, Jiang (2005): Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. In: *Lancet* 365 (9455), S. 217–223.

Keidar, S.; Heinrich, R.; Kaplan, M.; Hayek, T.; Aviram, M. (2001): Angiotensin II administration to atherosclerotic mice increases macrophage uptake of oxidized ldl: a possible role for interleukin-6. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (9), S. 1464–1469.

Kintscher, Ulrich; Bruemmer, Dennis; Blaschke, Florian; Unger, Thomas; Law, Ronald E. (2003): p38 MAP kinase negatively regulates angiotensin II-mediated effects on cell cycle molecules in human coronary smooth muscle cells. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305 (3), S. 552–556.

Klebanoff, S. J. (1999): Myeloperoxidase. In: *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111 (5), S. 383–389.

Klebanoff, Seymour J. (2005): Myeloperoxidase: friend and foe. In: *J. Leukoc. Biol.* 77 (5), S. 598–625.

Klinke, A. (2009): Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten. naturwissenschaftliche Dissertation. Universität Hamburg. Department Chemie.

Klinke, Anna; Nussbaum, Claudia; Kubala, Lukas; Friedrichs, Kai; Rudolph, Tanja K.; Rudolph, Volker et al. (2011): Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. In: *Blood* 117 (4), S. 1350–1358.

Kubes, P.; Suzuki, M.; Granger, D. N. (1991): Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (11), S. 4651–4655.

Kudoh, J.; Minoshima, S.; Hashinaka, K.; Nishio, C.; Yamada, M.; Shimizu, Y.; Shimizu, N. (1988): Assignment of the myeloperoxidase gene MPO to human chromosome 17 using somatic cell hybrids and flow-sorted chromosomes. In: *Jinrui Idengaku Zasshi* 33 (3), S. 315–324.

Kutter, D.; Devaquet, P.; Vanderstocken, G.; Paulus, J. M.; Marchal, V.; Gothot, A. (2000): Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit ? In: *Acta Haematol.* 104 (1), S. 10–15.

Lanza, F. (1998): Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. In: *J Mol Med (Berl)* 76 (10), S. 676–681.

Lau, Denise; Baldus, Stephan (2006): Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. In: *Pharmacol Ther* 111 (1), S. 16–26.

Leitner, E.-C von; Klinke, A.; Atzler, D.; Slocum, J. L.; Lund, N.; Kielstein, J. T. et al. (2011): Pathogenic Cycle Between the Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor Asymmetrical Dimethylarginine and the Leukocyte-Derived Hemoprotein Myeloperoxidase. In: *Circulation* 124 (24), S. 2735–2745.

Lo, S. K.; van Seventer, G. A.; Levin, S. M.; Wright, S. D. (1989): Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands. In: *J. Immunol.* 143 (10), S. 3325–3329.

Ludmer, P. L.; Selwyn, A. P.; Shook, T. L.; Wayne, R. R.; Mudge, G. H.; Alexander, R. W.; Ganz, P. (1986): Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. In: *N. Engl. J. Med.* 315 (17), S. 1046–1051.

Marsche, Gunther; Heller, Regine; Fauler, Günter; Kovacevic, Alenka; Nuszkowski, Alexander; Graier, Wolfgang et al. (2004): 2-chlorohexadecanal derived from hypochlorite-modified high-density lipoprotein-associated plasmalogen is a natural inhibitor of endothelial nitric oxide biosynthesis. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (12), S. 2302–2306.

Morgan, Michael J.; Liu, Zheng-gang (2010): Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. In: *Cell Res* 21 (1), S. 103–115.

Moser, Marvin (1999): World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension-Do These Differ From the U.S. Recommendations? Which Guidelines Should the Practicing Physician Follow? In: *J Clin Hypertens (Greenwich)* 1 (1), S. 48–54.

Nagra, R. M.; Becher, B.; Tourtellotte, W. W.; Antel, J. P.; Gold, D.; Paladino, T. et al. (1997): Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. In: *J Neuroimmunol* 78 (1-2), S. 97–107.

Nauseef, W. M. (2001): The proper study of mankind. In: *J. Clin. Invest.* 107 (4), S. 401–403.

Nicholls, Stephen J.; Hazen, Stanley L. (2005): Myeloperoxidase and cardiovascular disease. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (6), S. 1102–1111.

Nicholls, Stephen J.; Hazen, Stanley L. (2009): Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. In: *J. Lipid Res.* 50, S. S346-51.

Nikpoor, B.; Turecki, G.; Fournier, C.; Théroux, P.; Rouleau, G. A. (2001): A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. In: *Am. Heart J.* 142 (2), S. 336–339.

Nussbaum, Claudia; Klinke, Anna; Adam, Matti; Baldus, Stephan; Sperandio, Markus (2013): Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. In: *Antioxid Redox Signal* 18 (6), S. 692–713.

Parry, M. F.; Root, R. K.; Metcalf, J. A.; Delaney, K. K.; Kaplow, L. S.; Richar, W. J. (1981): Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. In: *Ann. Intern. Med.* 95 (3), S. 293–301.

Ross, R. (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease. In: *N. Engl. J. Med.* 340 (2), S. 115–126.

Rudolph, Volker; Andrié, René P.; Rudolph, Tanja K.; Friedrichs, Kai; Klinke, Anna; Hirsch-Hoffmann, Birgit et al. (2010): Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. In: *Nat Med* 16 (4), S. 470–474.

Schreck, R.; Rieber, P.; Baeuerle, P. A. (1991): Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. In: *EMBO J.* 10 (8), S. 2247–2258.

Segal, Anthony W. (2005): How neutrophils kill microbes. In: *Annu. Rev. Immunol.* 23, S. 197–223.

Segal, Anthony W. (2006): How superoxide production by neutrophil leukocytes kills microbes. In: *Novartis Found. Symp.* 279, S. 92-8; discussion 98-100, 216-9.

Springer, T. A. (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. In: *Cell* 76 (2), S. 301–314.

Statistisches Bundesamt (2012): Anzahl der Gestorbenen nach ausgewählten Todesursachen 2012. Online verfügbar unter https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html, zuletzt geprüft am 02.06.2014 um 16.00 Uhr.

Stroes, E.; Hijmering, M.; van Zandvoort, M.; Wever, R.; Rabelink, T. J.; van Faassen, E. E. (1998): Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. In: *FEBS Lett.* 438 (3), S. 161–164.

Triggle, Chris R.; Samuel, Samson Mathews; Ravishankar, Shalini; Marei, Isra; Arunachalam, Gnanapragasam; Ding, Hong (2012): The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. In: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90 (6), S. 713–738.

van Dalen, C. J.; Whitehouse, M. W.; Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J. (1997): Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. In: *Biochem J* 327 (Pt 2), S. 487–492.

Vestweber, Dietmar (2007): Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium. In: *Immunol. Rev.* 218, S. 178–196.

Winterbourn, Christine C.; Hampton, Mark B.; Livesey, John H.; Kettle, Anthony J. (2006): Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. In: *J Biol Chem* 281 (52), S. 39860–39869.

Wolf-Maier, Katharina; Cooper, Richard S.; Banegas, José R.; Giampaoli, Simona; Hense, Hans-Werner; Joffres, Michel et al. (2003): Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. In: *JAMA* 289 (18), S. 2363–2369.

WHO (World Health Organization): Cause-specific mortality, 2008: WHO region by country. Online verfügbar unter http://www.who.int/entity/gho/mortality_burden_disease/global_burden_disease_DTH6_2008.xls, zuletzt geprüft am 02.06.2014 um 16.00 Uhr.

Zhang, R.; Brennan, M. L.; Fu, X.; Aviles, R. J.; Pearce, G. L.; Penn, M. S. et al. (2001): Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. In: *JAMA* 286 (17), S. 2136–2142.

Zhang, Renliang; Brennan, Marie-Luise L.; Shen, Zhongzhou; MacPherson, Jennifer C.; Schmitt, Dave; Molenda, Cheryl E.; Hazen, Stanley L. (2002): Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. In: *J Biol Chem* 277 (48), S. 46116–46122.

Zhang, C.; Reiter, C.; Eiserich, J. P.; Boersma, B.; Parks, D. A.; Beckman, J. S. et al. (2001): L-arginine chlorination products inhibit endothelial nitric oxide production. In: *J Biol Chem* 276 (29), S. 27159–27165.

9 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Stephan Baldus für die Überlassung des Themas und die immer freundliche und motivierende Betreuung bedanken.

Bei Frau Dr. Anna Klinke danke ich für die große Unterstützung, die fachliche Betreuung, das kritische Lesen meiner Arbeit und die vielen Tipps und Ratschläge, ohne die ich so manches Mal ratlos gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt Hartwig Wieboldt für die Hilfe bei der Durchführung der Organbadversuche und die tatkräftige Unterstützung bei weiteren Versuchen sowie Dr. Florian Deuschl, der mir immer mit Rat zur Seite stand und die Antworten auf fast alle meine Fragen wusste.

Denise Lau und Lisa Remane möchte ich für den wissenschaftlichen Austausch, Tipps und Tricks und natürlich für die immer gute Stimmung danken.

Ein weiterer Dank gilt Heidrun Rößler und Volker Jahr, die mir sehr geholfen haben das letzte „Komma“ in dieser Arbeit korrekt zu setzen.

Von Herzen danken möchte ich meinen Eltern, die mich immer positiv bestärkt haben und mir ermöglichten diesen Weg zu gehen.

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Karen Rößler für den wertvollen Austausch, die immerwährende uneingeschränkte Unterstützung und den gewissen Antrieb in Situationen, in denen ich den Überblick zu verlieren drohte.

10 Lebenslauf

Name:	Kevin Schadwald
Geburtsdatum:	07.07.1987
Geburtsort:	Heide

Schulische Laufbahn:

1994-1998	Grundschule in Viöl
1998-2008	Theodor-Storm Gymnasium Husum
2008	Abitur

Studium der Humanmedizin:

2008-2010	Erster Abschnitt der ärztlichen Ausbildung: „Medizin I“, Universität Hamburg
09/2010	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung Note: gut
2010-2013	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Ausbildung: „Medizin II“, Universität Hamburg
Seit 08/2013	Praktisches Jahr

11 Eidesstattliche Erklärung

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: .....