

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**Die Rolle des Toll-like Rezeptors 4 bei der Entstehung von
Bluthochdruck und der Kontraktilität von Widerstandsgefäßen**

Ruth Ingrid Eißler (geb. Schneider)

aus

Essen

2011

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 (in der Fassung der sechsten Änderungssatzung vom 16. August 2010) von Herrn PD Dr. med. Marcus Baumann (Ph.D.) betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 06.10.2011

Ruth Ingrid Eißler

Dissertation eingereicht am: 06.10.2011

1. Gutachter: Herr PD Dr. med. Marcus Baumann (Ph.D.)
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Martin Biel

Mündliche Prüfung am: 28.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen und Bluthochdruck	6
1.2	Das angeborene Immunsystem.....	7
1.2.1	Toll-like Rezeptoren.....	8
1.2.2	Signalkaskade nach Aktivierung von TLR4	10
1.3	Die Rolle von Toll-like Rezeptor 4 bei kardiovaskulären Erkrankungen und Bluthochdruck.....	11
1.4	Kontraktion und Relaxation glatter Muskelzellen.....	13
1.5	Oxidativer Stress.....	16
1.6	Hochdruckmodelle in Ratte und Maus	19
1.7	TLR4 und therapeutische Möglichkeiten.....	20
1.8	Ziel der Dissertation	21
2.	Material.....	23
2.1	Geräte und technisches Zubehör	23
2.2	Instrumente.....	24
2.3	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.4	Chemikalien und Reagenzien.....	24
2.5	Arzneimittel	26
2.6	Kits und gebrauchsfertige Lösungen	26
2.7	Antikörper.....	27
2.8	Primer	27
2.9	(Stamm)Lösungen und Puffer.....	29
2.10	Spezielle Reagenzien und Puffer für die Immunhistochemie	30
2.11	Medien für die Zellkultur	31
2.12	Puffer für die Messung von Widerstandsgefäßen	32
2.13	Stamm-Lösungen für die Messung von Widerstandsgefäßen.....	32
2.14	Verdünnungsreihen	33
2.15	Versuchstiere.....	33
2.16	Spezielle Software	33
3.	Methoden	34
3.1	Behandlung der Versuchstiere	34
3.2	Operative Methoden.....	35
3.2.1	Blutdruckmessung mit Femoraliskatheter bei der Ratte.....	35

3.2.2	Implantation einer subkutanen Minipumpe bei der Maus.....	35
3.2.3	Implantation eines Telemetriesenders bei der Maus	35
3.2.4	Organentnahme	36
3.3	Zellbiologische Methoden.....	36
3.3.1	Isolation primärer glatter Muskelzellen	36
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	37
3.4.1	Gewinnung zellulärer RNA.....	37
3.4.2	Gewinnung von RNA aus Gewebe	37
3.4.3	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	37
3.4.4	Reverse Transkription	37
3.4.5	Real-Time PCR.....	38
3.5	Immunologische Methoden	39
3.5.1	Isolierung von Herz- und Milzzellen für die FACS-Analyse	39
3.5.2	Durchflusszytometrie (FACS)	40
3.5.3	Enzymimmuno-Assay (ELISA)	40
3.5.4	cGMP Immunoassay mit Maus-Aorten.....	41
3.6	Biochemische Methoden	42
3.6.1	Proteinisolation aus Zell-Lysaten	42
3.6.2	Proteinisolation aus Gewebe	42
3.6.3	Protein-Konzentrationsbestimmung.....	42
3.6.4	Western Blot	42
3.6.5	Bestimmung der NADPH-Oxidase Aktivität.....	43
3.7	Histologie	44
3.7.1	Anfertigung von Gefrierschnitten.....	44
3.7.2	Rakusan-Färbung.....	44
3.7.3	Auswertung der Gefrierschnitte.....	45
3.8	Immunhistochemie	45
3.8.1	Anfertigung von Gewebeschnitten	45
3.8.2	TLR4-Färbung	45
3.8.3	Elastica-van-Gison-Färbung	46
3.8.4	Berechnung des Verhältnisses Wanddicke/Lumen.....	46
3.8.5	Hämatoxylin - Eosin (HE) - Färbung.....	47
3.9	Mulvany-Myograph.....	47
3.9.1	Präparation von Maus-Widerstandsgefäßen.....	47
3.9.2	Methode	47

3.9.3	Versuchsprotokoll zur Messung der Gefäßfunktion und – kontraktilität	48
3.9.4	Auswertung	49
3.9.5	Statistik	49
4.	Ergebnisse	50
4.1	Die Rolle von TLR4 bei Bluthochdruck	50
4.1.1	Überblick	50
4.1.2	Blutdruckentwicklung in SHR	50
4.1.3	Immunhistologischer Nachweis von TLR4 in erwachsenen SHR	51
4.1.4	Nachweis von TLR4 in SHR mittels Western Blot und Zeitverlauf der TLR4- Expression	52
4.1.5	<i>In vitro</i> TLR4-Aktivierung	53
4.1.6	<i>In vivo</i> Entzündung und Einfluss von Ramipril in SHR	54
4.1.7	TLR4 bei L-NAME-induziertem Hochdruck in WKY und Einfluss von Ramipril	55
4.1.8	Differenzierung der TLR4-positiven Zellen im Herzen mittels FACS-Analyse	58
4.2	TLR4 und Gefäßkontraktilität von Widerstandsgefäßen	60
4.2.1	Überblick	60
4.2.2	Blutdruck und Gefäßkontraktilität	61
4.2.3	L-NAME-induzierte perivaskuläre Inflammation	66
4.2.4	TLR4 und oxidativer Stress in glatten Muskelzellen	66
4.2.5	TLR4 und Aktivität der sGC	67
4.2.6	Einfluss von oxidativem Stress auf die Kontraktilität von Widerstandsgefäßen im Wildtyp und TLR4 ^{-/-}	69
4.2.7	Hämodynamische Parameter	70
5.	Diskussion	71
5.1	Expression und Aktivität von TLR4 bei Bluthochdruck	72
5.2	Mikrozirkulation und Einfluss von TLR4 auf die Kontraktilität von	
	Widerstandsgefäßen	75
6.	Zusammenfassung	82
7.	Anhang	85
7.1	Tabellenverzeichnis	85
7.2	Abbildungsverzeichnis	85
7.3	Abkürzungsverzeichnis	87
8.	Literaturverzeichnis	89
9.	Danksagung	100
10.	Lebenslauf	101

1. Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen und Bluthochdruck

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems gehören weltweit zu den häufigsten Todesursachen (1). Neben Diabetes mellitus und Dyslipidämie stellt hierbei Bluthochdruck (arterielle Hypertonie) einen der entscheidenden Risikofaktoren für das Auftreten von Herzinfarkt, Herzversagen, Schlaganfall oder Nierenerkrankungen dar (2, 3). Die weltweite Prävalenz der Hypertonie bei Erwachsenen beträgt etwa 26 % (4). Für die Klassifikation der arteriellen Hypertonie wird in der Regel der systolische und diastolische oder auch der mittlere Blutdruck herangezogen (5). Nach Definition der WHO wird ein dauerhaft erhöhter Blutdruck von $\geq 140/90$ mmHg als Hypertonie bezeichnet (6), der ideale Blutdruck liegt bei maximal 120/80 mmHg (6) (Tabelle 1).

Kategorie	Systolisch [mmHg]		Diastolisch [mmHg]
Optimal	< 120	und	< 80
Normal	120 – 129	und	80 – 84
Hoch normal	130 – 139	und	85 – 89
Stadium I (milde HTN)	140 – 159	und	90 – 99
Untergruppe Grenzwert HTN	140 – 149	und/oder	90 – 94
Stadium II (mittelschwere HTN)	160 – 179	und/oder	100 – 109
Stadium III (schwere HTN)	≥ 180	und/oder	≥ 110
Isoliert systolische HTN	≥ 140	und	< 90

Tabelle 1: Klassifikation der Blutdruckstufen nach WHO/ISH 1999 (6)

Unterschieden werden zwei Arten der arteriellen Hypertonie. Bei der essentiellen bzw. primären Hypertonie, welche in über 90 % der Fälle vorliegt, ist die Ursache für die erhöhten Blutdruckwerte nicht bekannt. Die sekundäre Hypertonie ist Folge einer Grunderkrankung, z.B. einer Erkrankung der Niere, oder einer Medikamentenbehandlung (Mutschler, Arzneimittelwirkungen, 2001). Da die Entwicklung von Bluthochdruck meist nur mit uncharakteristischen Symptomen einhergeht, erfolgt die Diagnose oft erst, sobald es zu Folgeschäden an den Organen gekommen ist. Am meisten betroffen sind dabei Nieren,

Augen, Gehirn und Herz. Direkte kardiovaskulären Folgen der arteriellen Hypertonie sind häufig eine Hypertrophie des Ventrikels (7), Herzinsuffizienz (8) sowie eine Mikroangiopathie. Dabei können schon sehr frühe Veränderungen in der Mikrozirkulation zur Entstehung von Ischämien führen (9). Außerdem begünstigt Bluthochdruck die Entstehung einer Aortendissektion (10), eines Myokardinfarktes (11) sowie von atherosklerotischen Gefäßschädigungen und plötzlichem Herztod (12). Diese Ereignisse stehen in Zusammenhang mit den Gefäßwandveränderungen, die sich unter einer Hypertonie ergeben. Hier kommt es durch die Zunahme der Gefäßwandfläche und die Abnahme des Gefäßdurchmessers zu einem Anstieg des peripheren Widerstandes (13). Zusätzlich zu den kardiovaskulären Folgen steigt die Gefahr der Entstehung einer Niereninsuffizienz (14). Zu den Hauptrisikofaktoren für die beschriebenen kardiovaskulären Ereignisse gehören neben der genetischen Prädisposition auch Alter und Geschlecht, Übergewicht, ein erhöhter Blutglukosespiegel, Fettstoffwechselstörungen sowie Einflüsse, die sich durch Genussmittel und Stress ergeben.

Bei Bluthochdruck und erhöhtem kardiovaskulären Risiko ist neben der Änderung des Lebensstils der Einsatz einer medikamentösen Therapie indiziert, bei welcher hauptsächlich Diuretika, Beta-Blocker, ACE-Hemmer, AT₁-Antagonisten und Calciumantagonisten in Einfach- oder Kombinationstherapie zum Einsatz kommen (Mutschler, Arzneimittelwirkungen, 2001). Für die Monotherapie weniger geeignet sind Alpha-Blocker, die sich aber in Kombination als wirksam erwiesen haben (15). ACE-Hemmer und AT₁-Antagonisten wirken sich zusätzlich positiv auf die Nierenfunktion aus (16, 17).

1.2 Das angeborene Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor Infektionen durch Pathogene wie Bakterien, Viren oder Pilze zu schützen. Hier kommt zunächst das angeborene (unspezifische) Immunsystem zum Einsatz. Es setzt unterschiedliche Erkennungssysteme ein, um pathogene Substanzen zu identifizieren und daraufhin eine Immunreaktion auszulösen. Erst wenn die angeborenen Immun-Abwehrmechanismen umgangen werden bzw. nicht ausreichen, wird die adaptive Immunantwort notwendig. Den Stellenwert des angeborenen Immunsystems verdeutlicht, dass es in der Lage ist die Mehrheit der Infektionen zu bekämpfen (18). Die unspezifische Immunantwort setzt sich aus verschiedenen Abwehrmechanismen zusammen. Primär wirken Körperepithelien als Barriere, um das Eindringen von Erregern zu verhindern. Reicht diese Barrierefunktion nicht aus, stehen weitere Möglichkeiten der Erregerbekämpfung bereit (Vollmar/Dingermann,

Immunologie, 2005). Dabei läuft ein Weg über die Opsonisierung, Phagozytose und direkte Lyse des Erregers wobei das Komplementsystem eine wichtige Rolle spielt. Dieses besteht aus Plasmaproteinen, die an der Oberfläche von Mikroorganismen eine Reihe von proteolytischen Reaktionen auslösen (19). An der Phagozytose sind Gewebemakrophagen und neutrophile Granulozyten beteiligt. Das zweite wichtige System der angeborenen Immunantwort besteht aus Mustererkennungsrezeptoren, die hoch konservierte Strukturen in Pathogenen erkennen und dann über Aktivierung intrazellulärer Signalwege Entzündungsmediatoren freisetzen und die Genexpression von Immunzellen beeinflussen (18, 20). Natürliche Killerzellen und Interferone schließlich sind Bestandteile des angeborenen Immunsystems, die gegen Viren gerichtet sind (Vollmar/Dingermann, Immunologie, 2005).

Zur Familie der Mustererkennungsrezeptoren gehören neben der Klasse der RIG-I-like Rezeptoren (RLRs) und der Nod-like Rezeptoren (NLRs) die Toll-like Rezeptoren (TLRs). Letztere sind homolog zu Toll, einem Molekül, das die Produktion antimikrobieller Substanzen in *Drosophila melanogaster* reguliert (21). Die Aktivierung von TLRs führt zur Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden, inflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) sowie von Chemokinen und kostimulatorischen Molekülen, die das adaptive Immunsystem anstoßen (22). Daraufhin produzieren B-Zellen Pathogen-spezifische Antikörper, um Toxine zu neutralisieren, während T-Zellen über zytotoxische Effekte oder über Signale an B-Zellen wirken (23). Dies zeigt, dass das angeborene und das adaptive Immunsystem eng miteinander verbunden sind. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf dem Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), da insbesondere für diesen Rezeptor eine Rolle bei Bluthochdruck und Endorganschaden gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 1.3).

1.2.1 Toll-like Rezeptoren

1997 wurden Toll-like Rezeptoren (TLRs) im Säugetier identifiziert (24). Im Menschen wurden bisher zehn Mitglieder der TLR-Familie gefunden, in der Maus dreizehn (25). Die Rezeptoren sind als Transmembran-Glykoproteine aufgebaut und bestehen aus einer extrazellulären Leucin-reichen Bindungsdomäne für Liganden (leucin rich repeat, LRR) und einem zytoplasmatischen Bereich, der dem Interleukin-1-Rezeptor ähnelt (TIR-Domäne, Toll/IL-1 Rezeptor-Homologie) (24). TLRs erkennen nicht-variable molekulare, d.h. hochkonservierte Strukturen, die für bestimmte Pathogene charakteristisch sind. Man bezeichnet sie deshalb als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated

molecular patterns, PAMPs) und TLRs aus diesem Grund auch als Pattern-Recognition Receptors (PRR) (26). Zu den PAMPs gehören Peptidoglykane (PG), Lipoteichonsäuren (LTA), Glykane, bakterielle DNA sowie einzelsträngige und doppelsträngige RNA. Einer der wichtigsten Liganden für TLR4 ist das bakterielle Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) aus gramnegativen Bakterien (27), dessen biologisch aktiver Teil das Lipid A ist und das zur Entstehung einer Sepsis führen kann. Daneben bindet TLR4 aber auch körpereigene, endogene Liganden, die z.B. durch Schädigung von Zellen und Gewebe freigesetzt werden können und als DAMPs (damage-associated molecular patterns) bezeichnet werden (28). Darunter sind die Hitzeschockproteine HSP60 und HSP70 (29), Fibronectin, Hyaluronsäure, Fibrinogen und Heparansulfat (30). Neben TLR4 ist auch TLR2 für die Erkennung bakterieller Zellwandbestandteile verantwortlich und wird ebenso wie dieser mit kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (31, 32). TLR2 bindet Lipopeptide, die in grampositiven Bakterien vorkommen (33) und kann mit TLR1 und TLR6 dimerisieren. Darüber hinaus kann CD36 (cluster of differentiation 36) als Co-Rezeptor für TLR2/6 dienen (34). TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sowie TLR10 befinden sich auf der äußeren Membran von Immunzellen wie Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen (DC), natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Neutrophilen, Mastzellen, B-Zellen und regulatorischen T-Zellen. Dadurch wird die Bekämpfung extrazellulärer Erreger ermöglicht. Die Expression von TLRs ist jedoch nicht auf Immunzellen beschränkt. Sie finden sich auch auf Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen (35) sowie in Kardiomyozyten (36) und glatten Muskelzellen (37). TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 liegen intrazellulär, d.h. in Endosomen und dem Endoplasmatischen Retikulum vor. Sie sind für die Abwehr intrazellulärer Erreger zuständig und erkennen Nukleinsäuren. TLR3 ist dabei an der Erkennung von viraler doppelsträngiger RNA beteiligt (38), TLR7 und TLR8 binden virale Einzelstrang-RNA (39) und TLR9 erkennt bakterielle DNA mit unmethylierten CpG-Motiven (40). Die Wirkmechanismen der angeborenen Immunantwort sind auch wichtig zur Induktion der adaptiven Immunität. Die Antigenpräsentation auf Haupthistokompatibilitätsantigenen (MHC, major histocompatibility complex) und die Expression von Zytokinen führt zur Aktivierung und Proliferation der passenden CD4-T-Lymphozyten, sowie von B-Zellen, CD8-T-Zellen und weiteren Makrophagen. So stellen TLRs ein Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem dar (23).

1.2.2 Signalkaskade nach Aktivierung von TLR4

Nach Bindung eines Liganden ist die Toll-Interleukin-Rezeptor (TIR)-Domäne für die Signalweiterleitung in der Zelle zuständig. An TIR binden verschiedene Adaptermoleküle, darunter MyD88 (Myeloid Differentiation Factor 88), TRIF (TIR domain-containing adapter protein inducing IFN- β), TIRAP (TIR domain-containing adapter protein) und TRAM (TRIF-related adapter molecule) (18, 41). TLR5, TLR7, TLR9 und TLR11 vermitteln ihre Effekte ausschließlich über MyD88. TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6 verwenden neben MyD88 auch TIRAP, welches den jeweiligen TLR mit MyD88 verbindet. Die TLR3-Signalkaskade läuft ausschließlich über TRIF. Der TLR4-Signalweg geht zusätzlich zu MyD88 auch über TRIF und TRAM. Es existieren also prinzipiell zwei Haupt-Signalwege: der MyD88- und der TRIF-abhängige Pfad (42). Über beide Wege werden MAPKs (mitogen-activated protein kinases) und Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (nuclear factor kappa B) und IRFs (IFN regulatory factors) aktiviert, die die Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Interferonen induzieren (25). Bei Immunzellen sind zur Ligandenbindung durch TLR4 ferner die beiden Zelloberflächenproteine CD14 (cluster of differentiation 14) und MD-2 (Lymphozytenantigen 96) wichtig (43). Für die Bindung von LPS scheint außerdem das LBP (LPS-binding protein) von Bedeutung zu sein (44). Der TLR4-Signalfad kann wie beschrieben als einziger entweder über MyD88 oder über TRIF vermittelt werden (42) (Abb. 1). Über MyD88 werden nach NF- κ B Aktivierung proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-6 sowie Chemokine gebildet. Der MyD88-unabhängige Weg über TRIF führt zur Expression von Interferon (IFN)-induzierten Genen über Interferon-regulierende Faktoren (IRF), was v.a. zur Produktion von Chemokinen führt (Abb.1). Zeitlich verzögert wird über TRIF auch NF- κ B aktiviert. Chemokine können Immunzellen anlocken und spezielle Zytokine tragen zur Aktivierung von T- und B-Lymphozyten und somit zur Produktion von Antikörpern bei (23). Außerdem können TLRs direkt toxische Effekte vermitteln. Dazu gehört die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale, die von den NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphat) – Oxidasen (Nox) gebildet werden (45) oder von NO, das über die induzierbare NO-Synthase (iNOS) entsteht (36).

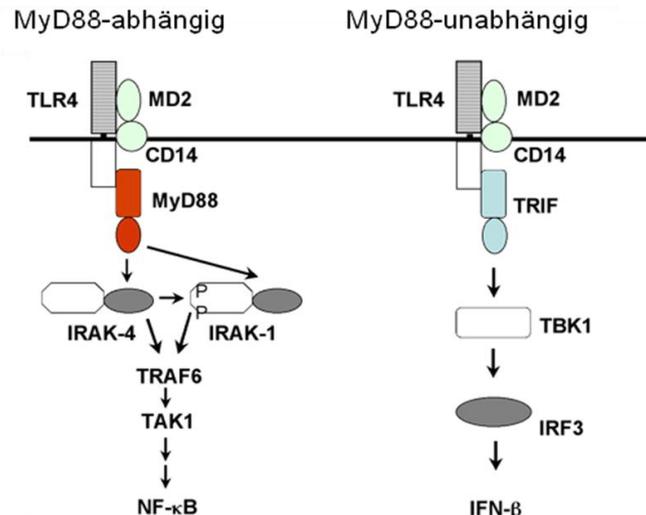


Abbildung 1: TLR4 - Signalweg

Beim MyD88-abhängigen Signalweg werden IRAK-1 und -4 (Interleukin-1 receptor-associated kinases) aktiviert. Zusammen mit TRAF6 (TNF- α receptor associated factor-6) schalten die IRAKs dann TAK1 (TGF- β -activated kinase 1) an. Dies führt zur Aktivierung von NF- κ B. Beim MyD88-unabhängigen Pfad geht der Weg über das Adapterprotein TRIF sowie IRF3 (IFN-regulatory factor 3) und es kommt zur IFN- β Induktion (TBK1, TANK-binding kinase) (46).

1.3 Die Rolle von Toll-like Rezeptor 4 bei kardiovaskulären Erkrankungen und Bluthochdruck

Viele Herz-Kreislaufkrankungen werden mit chronisch entzündlichen Prozessen assoziiert. Dazu gehört beispielsweise auch die Atherosklerose bei der es durch Entzündung zur Schädigung des Gefäßendothels und damit zu Gefäßwandveränderungen kommt (47). Die hiermit verbundenen unterschwelligen entzündlichen Vorgänge, die auch in gesunden Probanden feststellbar sind, werden über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) -Signalweg induziert. Zirkulierendes bakterielles LPS als Ligand für TLR4 kann dabei in praktisch allen gesunden Personen nachgewiesen werden (48). Außerdem ist belegt, dass TLR4 an der Entstehung kardiovaskulärer Komplikationen wie Hypertonie und Gefäßdysfunktion beteiligt ist. So konnten Ha et al. zeigen, dass das Adaptermolekül MyD88, welches eine wichtige Komponente innerhalb des TLR4-Signalfades darstellt, unter Hochdruck zur Entwicklung einer Herzhypertrophie in Ratten beiträgt. Die Blockade von MyD88 resultierte hier zudem in einer herabgesetzten Apoptoserate von Kardiomyozyten und einer verbesserten Herzfunktion *in vivo* (49). Auch bei akutem Schaden, wie dem Funktionsverlust des Herzens

bei Sepsis und Ischämie-Reperfusion ist TLR4 beteiligt (50). Dabei ist eine Attenuierung des Schadens bei TLR4-Defizienz durch eine geringere Wirkung von TLR4-Liganden wie z.B. HSP 70 anzunehmen was zum Schutz der Kardiomyozyten beiträgt (51). Weiterhin wird der Rezeptor nach einem Herzinfarkt in Mäusen verstärkt exprimiert (36). Darüber hinaus haben Mäuse, die defizient für TLR4 sind, ein geringeres Atheroskleroserisiko und auch beim Menschen wird ein eingeschränkt funktionsfähiges TLR4-Gen mit einem geringeren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und einem niedrigeren Spiegel an inflammatorischen Zytokinen in Zusammenhang gebracht (52, 53).

Essentiell für die Blutdruckregulation ist die Kontraktion und Relaxation glatter Muskelzellen. Dabei führt eine Dysfunktion im Kontraktionsverhalten, d.h. eine verschlechterte Dilatation oder verstärkte Kontraktilität von Gefäßen, zu hypertensiven Komplikationen. Darüber hinaus ist bekannt, dass es bei der Entwicklung einer Hypertonie neben einer Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz auch zu einer Mikroangiopathie bzw. zu einer pathologischen Veränderung der kleinen Blutgefäße kommt (9). Dabei zeigt sich, dass schon frühe Veränderungen in der Mikrozirkulation die Hochdruckentwicklung beeinflussen. Ferner konnte belegt werden, dass das adaptive Immunsystem eine Rolle im Zusammenhang mit einer Gefäßdysfunktion und der Entstehung einer Hypertonie spielt. Schiffrin z.B. beschreibt die Bedeutung von T-Lymphozyten bei Angiotensin II –, DOCA-Salz – und Dahl-Salzsensitivem – Hochdruck (54). Experimente von Guzik et al. zeigen, dass Mäuse, welche defizient für T- und B-Zellen sind, unter Angiotensin II und DOCA-Salz weniger Hochdruck und Gefäßdysfunktion entwickeln als Kontrolltiere (55). Dabei scheint auch die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale über die NADPH-Oxidasen eine wichtige Rolle zu spielen. Die Bedeutung des angeborenen Immunsystems in diesem Zusammenhang sowie die genaue Verbindung zwischen Gefäßkontraktilität, Entzündung und der Regulation des Blutdrucks ist jedoch noch nicht bekannt. Eine Beteiligung von Makrophagen und von TLR4 in glatten Muskelzellen wird diskutiert (56, 57).

In diesem Kontext ist es wichtig zu erwähnen, dass Veränderungen der glatten Muskelzellen der Entstehung einer Atherosklerose als Risikofaktor für Hypertonie vorausgehen. Kiechl et al. konnten im Patientenkollektiv beschreiben, dass ein Asp299Gly TLR4- Polymorphismus mit einer eingeschränkten Abwehr von gram-negativen Pathogenen und gleichzeitig mit einem erniedrigten Atheroskleroserisiko und einer niedrigeren Intima-Media-Dicke der Arteria carotis einhergeht (56). Dies zeigt, dass das unspezifische Immunsystem über den TLR4 und folglich über entzündliche Prozesse eine Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose darstellt. Zur Expression und Aktivität von TLR4 bei Hypertonie und zum direkten Einfluss des Rezeptors auf die Kontraktilität von Widerstandsgefäßen sind bisher noch keine Daten vorhanden.

1.4 Kontraktion und Relaxation glatter Muskelzellen

Die Wand eines Blutgefäßes setzt sich aus drei verschiedenen Schichten zusammen (Abb. 2 A). Die innerste Schicht besteht aus einem dünnen Endothel. Die Endothelzellen liegen dabei einer feinen Bindegewebsmembran, der Basalmembran (Elastica interna), auf und besitzen die Fähigkeit, zahlreiche bioaktive Moleküle wie Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacycline zu bilden (58). Diese Zellen sind an der Regulation des Gefäßsystems mitbeteiligt, indem sie auf Änderungen im Blutfluss, sowie auf Koagulationsprozesse, Entzündung und Plättchenaggregation reagieren (59). Endothel und Basalmembran bilden zusammen die Tunica intima. Die mittlere Schicht (Tunica media) setzt sich aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern zusammen. Die Stärke der Muskelschicht ist dabei abhängig von Ort und Funktion des Blutgefäßes, das heißt bei Arterien ist sie ausgeprägter als bei Venen und stellt hier die am kräftigsten entwickelte Wandschicht dar. Die äußerste Schicht wird von Bindegewebe gebildet und wird als Tunica externa bezeichnet. Bei größeren Arterien können Blutgefäße und Gefäßnerven in die Wand eingebunden sein und somit eine Verbindung zur jeweiligen Umgebung darstellen.

Das Prinzip der Muskelkontraktion, d.h. das Filamentgleiten, läuft in der glatten Muskelzelle genauso ab wie in der quergestreiften Muskulatur und soll hier beispielhaft anhand letzterer beschrieben werden. Den kontraktilem Apparat bilden die Myofilamente Aktin und Myosin, welche in der quergestreiften Muskulatur Sarkomer genannt werden und die kleinste funktionelle Einheit einer Muskelfaser darstellen (Abb. 2 B). Ein Sarkomer wird durch die Z - Scheiben begrenzt, die mit den Aktinfilamenten verbunden sind. In der Mitte des Sarkomers und damit auch der Myofilamente befindet sich die M - Scheibe. Aktin und Myosin sind regelmäßig über muskelspezifische Intermediärfilamente angeordnet. Das Motorprotein Myosin besteht aus einem Schwanzteil, einem beweglichen Hals und einem Kopfteil, der mit den Aktinfilamenten in Kontakt steht. Diese gleiten dadurch bei einer Kontraktion an den Myosinköpfen entlang, so dass sich das Sarkomer dabei verkleinert und der Muskel kontrahiert. Im entspannten Zustand, d.h. bei einem niedrigen Spiegel an intrazellulärem Calcium (Ca^{2+}), ist die Myosinbindestelle am Aktinfilament für Myosin nicht zugänglich. Sobald das intrazelluläre Ca^{2+} um den Faktor 10^2 ansteigt, kann Myosin am Aktinfilament andocken. Der Myosinkopf stellt eine ATPase dar, die eine Formveränderung des Köpfchens und damit ein abwechselndes Binden und Lösen am bzw. vom Aktinfilament erlaubt. Dadurch kommt es zur Muskelkontraktion. In der glatten Muskelzelle gibt es keine Einteilung in Sarkomere, sondern es liegt eine Scherengitter-Anordnung der Filamente vor. Als Calcium-Schalter dient hier außerdem Calmodulin an Stelle von Troponin.

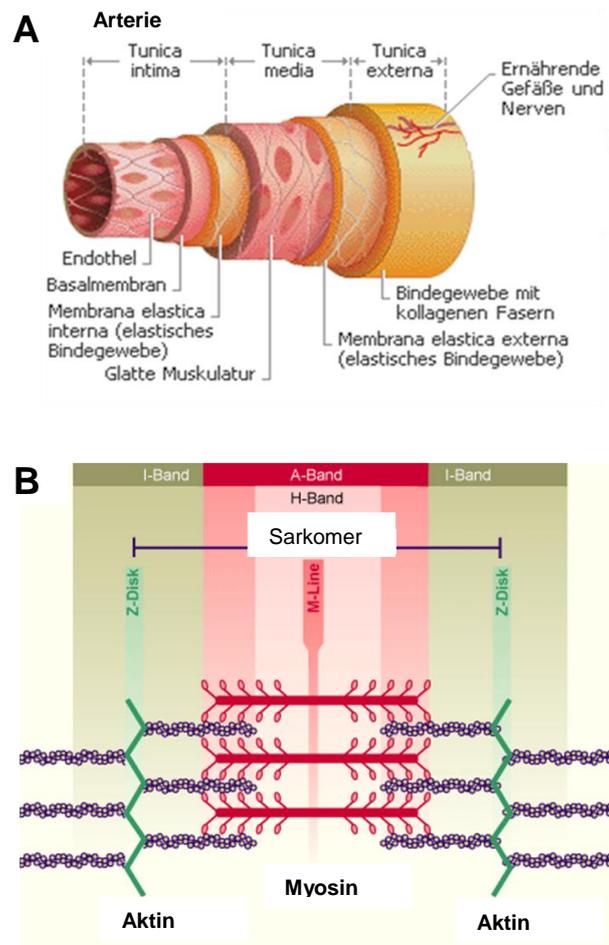


Abbildung 2: Aufbau eines Widerstandsgefäßes und Prinzip der Muskelkontraktion

(A) Aufbau einer Widerstandarterie (60).

(B) Bei einer Muskelkontraktion binden die Myosinköpfe an die entsprechenden Bindungsstellen auf dem Aktinfilament. (61).

Die Regulation des Blutdrucks wird durch die Kontraktion und Relaxation glatter Muskelzellen in den Widerstandsgefäßen gesteuert. Fehlfunktionen im Kontraktionsverhalten spielen dabei eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen wie Bluthochdruck, Herzinfarkt und Atherosklerose (62). Es ist belegt, dass eine übermäßige Kontraktilität der kleinen Gefäße zu Vasospasmen und folglich zu Ischämie, besonders in Koronar- und Zerebralarterien führen kann (63). Kontraktion und Relaxation werden über den Phosphorylierungsgrad der Myosin-Leichtkette (MLC-20) gesteuert (Abb. 3 A). Dabei bewirkt eine Phosphorylierung der MLC-20 durch die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) eine verstärkte Kontraktion, wohingegen die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) eine

MLC-20-Dephosphorylierung und eine Vasodilatation hervorruft. Die MLCP-Aktivität kann durch kleine GTPasen wie RhoA (Ras homolog gene family, member A) herabgesetzt werden und demnach kontraktionssteigernd wirken (64). Stickstoffmonoxid (NO) hingegen kann die MLCP Aktivität erhöhen und dadurch vasorelaxierend sein (65). Beide Mechanismen tragen somit zur Regulation des Gefäßtonus und des Blutdrucks bei (66, 67). Die MLCP ist ein heterotrimeres Protein, das aus drei Untereinheiten zusammengesetzt ist (Abb. 3 A). Dazu gehören PP1C (phosphatase 1 catalytic subunit), eine kleine Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 20 kDA sowie die hauptregulatorische Untereinheit MYPT1 (Myosin Phosphatase Target Subunit 1) (68). Eine Phosphorylierung der MYPT1 an der Hauptphosphorylierungsstelle Threonin 696 (Thr696) entspricht einer MLCP-Inaktivierung, eine verminderte Phosphorylierung an Thr696 umgekehrt einer MLCP-Aktivierung. Über ein nachgeschaltetes Enzym, die NO-abhängige lösliche Guanylatcyclase (sGC, soluble guanylate cyclase), welche sich im Zytosol befindet, und den sekundären Botenstoff cGMP kommt es zur Relaxation glatter Muskelzellen (69). In Endothelzellen wird NO von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert. Die sGC ist ein Heterodimer aus einer alpha- und einer Häm-haltigen beta-Untereinheit und wird durch die Bindung von NO an die Häm-Gruppe aktiviert (Abb. 3 B). Als Schlüsselenzym des NO-Signalweges ist sie bei zahlreichen physiologischen Mechanismen beteiligt, z.B. neben der Relaxation von Blutgefäßen, d.h. der Regulation des Gefäßtonus, auch bei der Hemmung der Plättchenaggregation, bei der Verminderung von oxidativem Stress sowie bei Zellwachstum und Entzündungsprozessen (70-72). Aus diesem Grund befinden sich bereits NO-unabhängige sGC-Aktivatoren in der klinischen Prüfung.

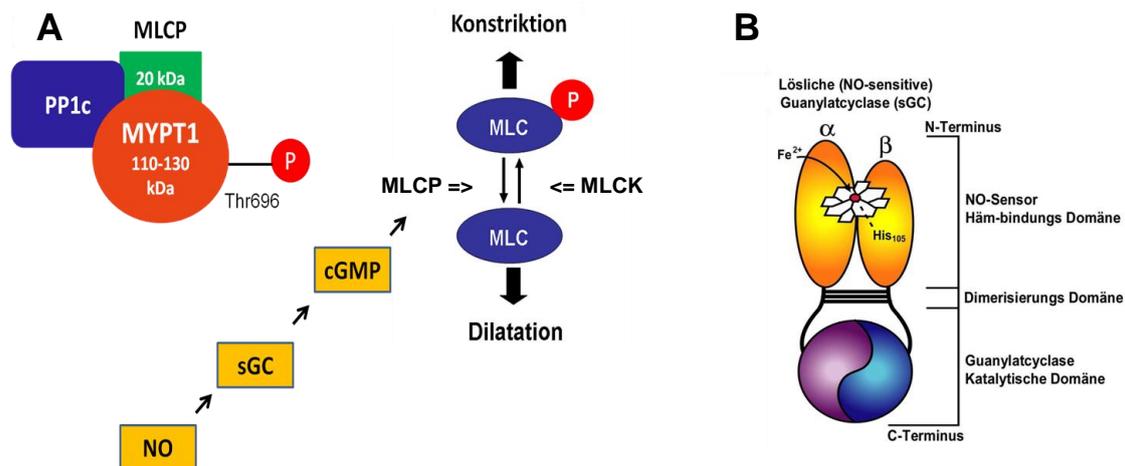


Abbildung 3: Kontraktiler Apparat in glatten Muskelzellen und Aufbau der löslichen Guanylatcyclase

(A) Kontraktiler Apparat in den glatten Muskelzellen. Die MLCP (Myosin-Leichtketten Phosphatase) ist ein heterotrimeres Protein und bewirkt eine Dephosphorylierung der MLC-20 (Myosin-Leichtkette) und dadurch eine verminderte Kontraktion. Sie kann über den NO-sGC-cGMP-Signalweg aktiviert werden.

(B) Schematischer Aufbau der löslichen Guanylatcyclase (sGC) (73).

1.5 Oxidativer Stress

Störungen des Reduktions-Oxidations (Redox)-Gleichgewichtes in Gewebe können entzündliche Prozesse auslösen. Dies wird beispielsweise bei Ischämie-Reperfusion (I/R) und hämorrhagischem Schock beobachtet (74, 75). Überdies konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Lipidperoxidation im Herzen zusammen mit einer NF- κ B-Aktivierung bereits in jungen Spontan-Hypertensiven Ratten (SHR) nachzuweisen ist und dass oxidativer Stress demnach vermutlich der Entwicklung einer Herzhypertrophie vorausgeht (76). Es ist noch nicht vollständig geklärt wie genau oxidativer Stress zum Entzündungsgeschehen beiträgt. Allerdings gibt es Belege, dass Toll-like Rezeptoren in diese Prozesse eingebunden sind. Sowohl Stress, der durch eine Infektion hervorgerufen wird, als auch oxidativer Stress wirken über die gleichen TLR-Signalwege (77, 78). Oxidativer Stress führt dabei zu einer Freisetzung endogener TLR4-Liganden. Es wurde außerdem gezeigt, dass die TLR4-Expression in Kardiomyozyten durch LPS gesteigert werden kann und dass dieser Effekt von

reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS, reactive oxygen species) abhängig ist, da sich dies durch den ROS-Fänger PDTC verhindern ließ (36).

Oxidativer Stress ist durch ein Ungleichgewicht pro- und anti-oxidativer Enzyme gekennzeichnet, was zu einer übermäßigen Produktion von freien Radikalen wie Superoxid-Anionen ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxylradikalen (OH^{\bullet}) und Lipidradikalen führt. Weitere Oxidanzien, bei welchen es sich nicht um freie Radikale handelt, sind Peroxynitrit ($ONOO^{\bullet}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und hypochlorige Säure ($HClO$) (79). Zu den Hauptquellen für die Erzeugung von oxidativem Stress im Gefäßbett gehören Makrophagen, die durch ein Entzündungsgeschehen angelockt werden, sowie ein veränderter Metabolismus in den Mitochondrien glatter Muskelzellen (80). Eine übermäßige Produktion reaktiver Sauerstoffradikale ist an zahlreichen chronischen Erkrankungen – darunter Bluthochdruck – beteiligt (Abb. 4). ROS sind normalerweise wichtig für die Aufrechterhaltung der normalen Zellphysiologie. Ein Übermaß an ROS bzw. Veränderungen im antioxidativen System, d.h. oxidativer Stress, kann jedoch in Gegenwart anderer pro-hypertensiver Stimuli eine Hypertonie auslösen und verstärken. Dabei sind Herz, Niere, Nervensystem, Gefäße und auch das Immunsystem beteiligt. Aufgrund der Bedeutung des Gefäßbettes in der Pathophysiologie von Bluthochdruck wurde hier zudem besonders der Einfluss von oxidativem Stress untersucht. Eine Hauptquelle für die Produktion von ROS ist die Familie der NADPH-Oxidasen (Nox, nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase oxidase). Es handelt sich um einen Cytochrom-b-558-haltigen Plasmamembran-gebundenen Komplex, der Superoxid-Anionen ($O_2^{\bullet-}$) erzeugt, indem er ein Elektron auf molekularen Sauerstoff überträgt. $O_2^{\bullet-}$ ist ein starkes Oxidans, das beispielsweise von Leukozyten freigesetzt wird, um infektiöse Organismen zu schädigen (81). Das Radikal ist außerdem an der Entstehung von Zellschäden (82), sowie am Tumorwachstum (83) und an der DNA-Synthese beteiligt (84). Das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert den Zerfall von $O_2^{\bullet-}$ in O_2 und H_2O_2 . Zu den NADPH-Oxidasen in glatten Muskelzellen gehören u.a. Nox1, Nox4, Nox5 und in geringeren Mengen auch Nox2 (85). Besonders die Nox4-abhängige ROS-Produktion scheint für zahlreiche physiologische und pathophysiologische Prozesse relevant zu sein. So kommt es in SHR mit Beginn des Blutdruckanstiegs in adoleszenten Tieren zu einem signifikanten Anstieg von ROS (86) und einer verringerten Aktivität der Glutathionperoxidase, die einen Schutz vor oxidativem Stress darstellt, indem sie Sauerstoff- und Lipidperoxide reduziert (87). Oxidativer Stress hat einen Einfluss auf die Entstehung von Entzündung sowie auf Hypertrophie, Apoptose, Fibrose, Angiogenese/Rarifizierung und Gefäßumstrukturierung bei Bluthochdruck. So ist auch bekannt, dass er zur Entstehung von Atherosklerose und damit von Bluthochdruck beiträgt. Die über Nox gebildeten ROS spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Endothelfunktion und des Gefäßtonus. Dabei

bewirken insbesondere $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 einen Anstieg des intrazellulären Calciums in glatten Muskelzellen, indem es zu einem verstärkten Calcium-Einstrom durch die Plasmamembran und einer gesteigerten Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern kommt. Außerdem kann dies zur Hemmung von Ca^{2+} -ATPasen in der Plasmamembran und dem Endoplasmatischen Retikulum und zur Beeinflussung von K^+ -Kanälen führen (85, 88, 89). Im Gegensatz zu Nox1 und Nox2, die zur Aktivierung regulatorische Untereinheiten benötigen, produziert Nox4 konstitutiv ROS. Vor Kurzem wurde gezeigt, dass neben anderen Transkriptionsfaktoren auch NF- κ B als Regulator der Nox1 und Nox4 gilt (90). Gleichzeitig zeigen einige Publikationen, dass LPS, oxidiertes LDL (oxLDL) und TNF- α eine ROS-Produktion über Nox4 in Endothelzellen hervorrufen können (91, 92). Da LPS und oxLDL Liganden für TLR4 sind und dieser Rezeptor auch in glatten Muskelzellen exprimiert wird, wäre über die TLR4-Nox4-Achse ein Einfluss auf die Gefäßkontraktilität denkbar. Einige Publikationen sprechen dafür, dass die TLR-Aktivierung mit der Funktion der NADPH-Oxidase zusammenhängt (45). Sasada et al. berichten, dass die Aktivierung von Peritonealmakrophagen in der Maus zu einer Aktivitätssteigerung der NADPH-Oxidase führte (93). Park et al. zeigten, dass die Nox4-gekoppelte NADPH-Oxidase nach LPS-Stimulation direkt mit der TIR-Domäne von TLR4 interagieren kann (94). Weiterhin wurde herausgefunden, dass oxidativer Stress im Zusammenhang mit dem TLR4-TRIF-TRAF6-Signalfad entscheidend bei der Entstehung einer akuten Lungenentzündung ist (95). Dabei fungiert oxidiertes Phospholipid als TLR4-Ligand. Sowohl ein Knockout von TLR4 und TRIF als auch von ncf1 (neutrophil cytosolic factor 1), einer Untereinheit der neutrophilen NADPH-Oxidase, die ebenfalls an der ROS-Produktion beteiligt ist, konnten den Grad der Schädigung abmildern. Dies zeigt, dass eine Aktivierung des Immunsystems als Ergebnis einer veränderten Produktion von ROS zu Gewebe und Organschaden beitragen kann (37).

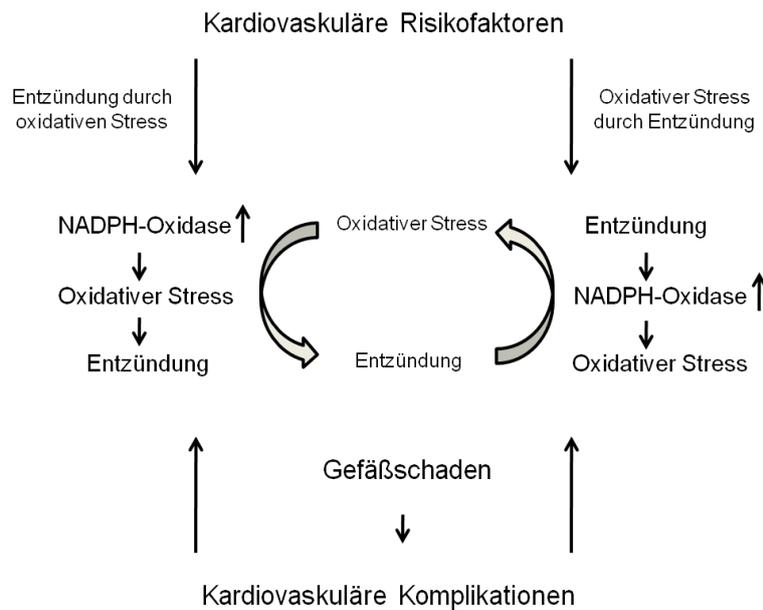


Abbildung 4: Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Entzündung

Teufelskreis aus oxidativem Stress und Entzündung, der bei Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren zu Gefäßschaden und kardiovaskulären Komplikationen führt (85).

1.6 Hochdruckmodelle in Ratte und Maus

Tierexperimentell lässt sich Bluthochdruck auf unterschiedliche Weisen erzeugen und untersuchen. Wichtige Rattenmodelle umfassen dabei die Spontan Hypertensive Ratte (SHR), die im Alter von sechs bis acht Wochen einen spontanen Hochdruck entwickelt (96), die Transgene Renin Ratte (TGR(mRen2)27), die ein zusätzliches Renin-Gen besitzt (97), das Goldblatt-Modell, bei welcher eine Nierenarterien-Stenose erzeugt wird (98), sowie das DOCA-Salz Modell zur Simulation des volumeninduzierten Hochdrucks (99). Weiterhin wird häufig das L-NAME Modell eingesetzt, ein Dosis-abhängiges Hypertoniemodell, bei dem es durch die chronische Gabe des Stickstoffmonoxid – Synthase (NOS) Inhibitors N^ω-Nitro-L-Arginin- Methyl ester (L-NAME) zu einem Hochdruck kommt, der aus einer gestörten Gefäßfunktion und Entzündung resultiert (100, 101). Bluthochdruck bewirkt in diesen Modellen die Entstehung einer Herzhypertrophie, die mit Entzündungsprozessen einhergeht (102, 103). Dabei kommt es durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB unter anderem zur Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF-α (tumor necrosis factor alpha), IL-6 (Interleukin 6) und MCP-1 (monocyte chemotactic protein). Aus diesem Grund entwickeln SHR mit einem manifesten Hochdruck in fortgeschrittenem Alter eine verschlechterte Herzkontraktilität und eine Fibrose des linken Ventrikels (104).

Auch bei Mäusen wird neben der Infusion von Angiotensin II (AngII) zur Erzeugung einer Hypertonie häufig das L-NAME Modell verwendet (105, 106). Allgemein wird unter Einwirkung von L-NAME eine endotheliale und subendotheliale Anreicherung von Makrophagen, beispielsweise im Herzen und in der Lunge, beobachtet (107, 108). Dies stimmt mit dem Befund überein, dass sich in verschiedenen Hypertoniemodellen der Ratte eine verstärkte perivaskuläre Infiltration insbesondere von Makrophagen zeigt (109). Andererseits wurde beschrieben, dass die Dezymierung von Makrophagen bei Hypertonie zu einer besseren Endothelfunktion, weniger starker Gefäßumstrukturierung und einem geringeren Grad an oxidativem Stress führt (57, 103). Die Daten lassen somit eine kritische Rolle sowohl von Makrophagen und TLR4 als Bestandteile des angeborenen Immunsystems als auch von Entzündungsprozessen an sich bei Gefäßschaden und L-NAME induziertem Bluthochdruck vermuten.

1.7 TLR4 und therapeutische Möglichkeiten

Ziel einer antihypertensiven Behandlung ist die Verringerung des Risikos von kardiovaskulären Erkrankungen und somit die Senkung der Morbiditäts- und Mortalitätsrate. Im Rahmen der pharmakologischen Behandlung werden neben Diuretika, Beta-Blockern, Alpha-Rezeptor-Antagonisten und Calcium-Antagonisten sehr häufig die zusätzlich antiinflammatorisch wirkenden ACE-Hemmer und AT₁-Rezeptor-Blocker eingesetzt (110, 111). Darüber hinaus haben Statine neben ihrer direkt cholesterinsenkenden Wirkung einen gefäßprotektiven Effekt. Sie bewirken eine bessere NO-Bioverfügbarkeit und haben einen antioxidativen und antientzündlichen Einfluss (112). In tierexperimentellen Studien konnten mit Statinen Inflammationsmarker wie MCP-1 sowie eine NF-κB Aktivierung herabgesetzt werden (113).

In vielen Ländern zeigt die Mehrheit der hypertensiven Patienten allerdings immer noch eine unzureichende Blutdruckeinstellung (6). Darüber hinaus korreliert die Verminderung des Endorgan-Schadens während einer antihypertensiven Therapie nicht immer unbedingt mit der Reduktion des arteriellen Blutdrucks (114). Aus diesem Grund sind weitere therapeutische Ansätze bei der Behandlung von Bluthochdruck notwendig. Eine neue Therapiemöglichkeit könnte sich in Zukunft mit dem Einsatz von TLR4-Antagonisten bieten, um damit auch indirekt Einfluss auf die Mikrozirkulation und das Entzündungsgeschehen zu nehmen. Die Aktivierung oder Blockade von TLRs stellt allgemein eine Möglichkeit dar, die Immunantwort in eine bestimmte Richtung zu lenken. Die TLR-Antagonisten, die derzeit entwickelt werden, sind meist strukturanalog zu den natürlichen Liganden, lösen dabei aber

keine Signalweiterleitung aus. Eine zweite Möglichkeit TLRs zu blockieren besteht im Einsatz von Anti-TLR-Antikörpern. Die wichtigsten in der klinischen Prüfung befindlichen TLR4-Blocker wurden für den Einsatz bei Sepsis entwickelt, da LPS als TLR4-Ligand septische Reaktionen auslösen kann. Dazu gehören das Lipid-A-Derivat Eritoran (E5564) und das Cyclohexen-Derivat TAK-242. Auch bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kann eine zu starke TLR4-Aktivierung vorliegen. Das Lipid CRX-526 scheint hier eine experimentelle Kolitis deutlich zu verbessern (115). Da zahlreiche Untersuchungen auf eine klinisch relevante Beteiligung von TLR4 an der Entstehung und Progression von kardiovaskulären Krankheiten hindeuten, besteht Interesse auch hier Antagonisten, z.B. als antiatherosklerotische Pharmaka einzusetzen (116). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass dadurch bei kardialer Ischämie/Reperfusion sowohl die Infarktgröße als auch die NF- κ B Aktivität und Zytokinexpression in Wildtypmäusen herabgesetzt wird (117). Demnach könnten Hemmstoffe des TLR4-Signalwegs wichtig für die Prävention und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen werden (118, 119).

1.8 Ziel der Dissertation

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Bestimmung der kardialen TLR4-Expression in einem tierexperimentellen Hypertoniemodell, da Literaturdaten zeigen, dass viele Herz-Kreislaufkrankungen mit chronisch-entzündlichen Prozessen assoziiert sind (47, 120). Zu den Komponenten, die einen Entzündungsprozess einleiten können, gehört insbesondere TLR4 als Vertreter des angeborenen Immunsystems (118, 121). So geht eine TLR4-Defizienz mit einem deutlich verringerten Atheroskleroserisiko und einem geringeren kardiovaskulären Risiko einher (122). Daten zur TLR4-Expression bei der Entwicklung einer Hypertonie sind jedoch bisher nicht vorhanden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob das angeborene Immunsystem über TLR4 einen Einfluss auf die Mikrozirkulation bzw. auf die Funktion glatter Muskelzellen hat und somit sekundär die Entstehung von Bluthochdruck beeinflussen kann. Dabei ist wichtig, dass TLR4 nicht nur auf Immunzellen, Fibroblasten und Endothelzellen sondern auch auf Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen exprimiert wird (37). Bisher ist allerdings kaum bekannt, wie die TLR-Expression in den Gefäßen reguliert wird und ob das angeborene Immunsystem einen direkten Einfluss auf die Gefäßkontraktilität nehmen kann.

Im ersten Schritt sollte die TLR4-Expression immunhistochemisch in zwei verschiedenen Hypertoniemodellen der Ratte analysiert werden. Dafür wurde das Modell der Spontan Hypertensiven Ratte (SHR) und der L-NAME-induzierten Hypertonie in Wistar-Kyoto Ratten

(WKY) herangezogen. Nachdem bei manifestem Hochdruck eine verstärkte TLR4-Expression in Kardiomyozyten beobachtet und dies mittels FACS-Analyse bestätigt werden konnte, wurde die TLR4-Expression im Zeitverlauf der Hochdruckentstehung auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Gleichzeitig erfolgte die Bestimmung von Entzündungsmarkern. In einem nächsten Schritt wurde *in vitro* eine Stimulation von Herzzellen hypertensiver SHR und normotensiver WKY mit Heparansulfat durchgeführt. Letztlich sollte geprüft werden, ob die antihypertensiven und antiinflammatorischen Eigenschaften eines ACE - Hemmers *in vivo* einen Einfluss auf die TLR4-Expression im Herzen haben.

Im zweiten Teil der Arbeit lag der Fokus auf der TLR4 - regulierten Kontraktilität von Widerstandsgefäßen, da bisher keine Daten zum Einfluss von TLR4 in glatten Muskelzellen auf die Blutdruckregulation vorliegen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die TLR4-Signalweiterleitung einen Einfluss auf die Kontraktilität von Widerstandsgefäßen und damit den peripheren Widerstand und den Blutdruck haben könnte. Im Modell der L-NAME-induzierten Hypertonie konnte zunächst gezeigt werden, dass TLR4-Knockout-Tiere (TLR4^{-/-}) im Gegensatz zu Wildtyp (WT) Tieren vor einem Blutdruckanstieg geschützt sind. Aus diesem Grund wurden die kontraktile Eigenschaften der Widerstandsgefäße von unbehandelten und L-NAME behandelten TLR4^{-/-} Tieren untersucht und mit dem Angiotensin II-Modell verglichen. Als eine verringerte Noradrenalin- und Calcium-abhängige Kontraktion in L-NAME behandelten TLR4^{-/-} Tieren festgestellt wurde, sollte weiterhin untersucht werden, ob eine Verbindung zwischen TLR4 in glatten Muskelzellen und oxidativem Stress bestehen könnte. In diesem Zusammenhang erfolgte die Analyse der Nox – Expression sowie der NADPH-Oxidase- und sGC-Aktivität in glatten Muskelzellen bzw. Aorten sowie *in vitro* die Reaktion auf oxidativen Stress in Widerstandsgefäßen von TLR4^{-/-} und WT Tieren.

2. Material

2.1 Geräte und technisches Zubehör

Autoklav, H+P/Varioklav	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Brutschrank, Heracell	Heraeus, Osterode, Deutschland
Durchflusszytometer, EPICS XL-MCL	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Einbettautomat, Shandon Excelsior ES	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
ELISA Reader, Multiskan FC	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
FLUOstar Omega Multidetektion	
Microplate Reader	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Gefrierschränke, Forma	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Gelapparatur	BioRad, München, Deutschland
Heizblock, HLC HBT 130	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Heizplatte (Temperature Controller Teco)	Provet, Lyssach, Schweiz
Kodak Image Station 200R	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Kryostat, Leica CM 3050	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop, Leica MZ 16; Olympus BX 20	Leica, Wetzlar, Deutschland; Olympus Hamburg Deutschland
Mikrotom, Leica RM 2145	Leica, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop, ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
pH-Meter	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Photometer, Multiscan FC	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
PhysioTel Telemetry System	Data Science International, s` Hertogenbosch, Niederlande
Pressure Monitor BP-1	World Precision Instruments, Berlin, Deutschland
Real Time PCR System, MyiQ Single colour Real-time PCR detection System	BioRad, München, Deutschland
Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Sterilbank, Hera Safe	Heraeus, Osterode, Deutschland
Telemtriesender, TA11PA-C10	Data Science International, s` Hertogenbosch, Niederlande
Tissuelyser, TissueLyser	Quiagen, Hilden, Deutschland
Thermocycler	BioRad, München, Deutschland
Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Waagen	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad mit Thermostat, SW 21	Julabo, Seelbach, Deutschland

Wire-Myograph, Model 410 A	Danish Myograph Technology, Aarhus, Dänemark
Zentrifugen, Biofuge/Multifuge 3 L-R	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

2.2 Instrumente

Gavage	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Klemmen	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland
Mikrochirurgische Pinzetten	Fine Science Instruments, Heidelberg, Deutschland
Mikro-Federschere, gerade und gebogen	Fine Science Instruments, Heidelberg, Deutschland
Skalpell	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland

2.3 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD, Heidelberg, Deutschland
Falcons	BD, Heidelberg, Deutschland
Flaschenaufsatzfilter	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Küvetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Nahtmaterial 3-0	Resorba, Uppsala, Schweden
Objektträger	VWR, Darmstadt, Deutschland
Osmotische Minipumpen, Model 2002	Alzet (Charles River), Sulzfeld, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Spritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Tungsten-Draht (400 µm)	Danish Myograph Technology, Aarhus, Dänemark
Zellsieb (200 µm)	BD, Heidelberg, Deutschland

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
APS (Ammoniumpersulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
Acetylcholinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acrylamid (Rotiphorese)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Angiotensin II (Acetat)	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Collagenase II	Biochrom, Berlin, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue R	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMF (Dimethylformamid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eosin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (70%, 96%, 100%)	Apotheke Klinikum r.d. Isar, München
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heparansulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin)	Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kochsalzlösung	Braun, Melsungen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Menadion	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
β – Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Apotheke Klinikum r.d. Isar, München
Milchtrockenpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat(NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N ^ω -Nitro-L-Arginin-methylester (L-NAME)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Noradrenalin	Fluka/ Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumnitroprussid (SNP)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)	LC Laboratories, Woburn, MA, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Primer	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Proteinase K	Dako, Hamburg, Deutschland
Proteinmarker, Precision Plus	BioRad, München, Deutschland
Pyruvat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ratiophorese 30 (30 % Acrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ringerlösung	Braun, Melsungen, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	Gibco (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	Apotheke Klinikum r.d. Isar, München

2.5 *Arzneimittel*

Temgesic (Buprenorphin)	Essex Pharma, München, Deutschland
Delix Protect (Ramipril)	Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland

2.6 *Kits und gebrauchsfertige Lösungen*

BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce (Thermo Fisher Scientific), Schwerte, Deutschland
cGMP Direct Immunoassay Kit	BioVision, Mountain View, CA, USA
Complete Mini Protease Inhibitor, PhosphoStop	Roche, Basel, Schweiz
Lumilight Lösung	Roche, Basel, Schweiz
LumiMax Superoxide Anion Detection Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Deutschland
rTNF- α ELISA	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
iQ SYBR Green Supermix	BioRad, München, Deutschland
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad, München, Deutschland

2.7 Antikörper

Tabelle 2: Erstantikörper

Antikörper	Konjugat	Spezies	Hersteller	Verwendung
Anti-Ratte TLR4	unkonjugiert	Kaninchen	Santa Cruz	Western Blot
Anti-Ratte Gapdh	unkonjugiert	Ziege	US Biological	Western Blot
Anti-Ratte CD45R	FITC	-	eBioscience	FACS
Anti-Ratte TLR4	unkonjugiert	Kaninchen	Santa Cruz	FACS, Immunhistologie

Tabelle 3: Zweitantikörper

Antikörper	Konjugat	Spezies	Hersteller	Verwendung
Anti-Kaninchen IgG	HRP	Ziege	Santa Cruz	Western Blot
Anti-Kaninchen IgG	biotinyliert	Ziege	Vector	Immunhistologie
Anti-Ziege IgG	HRP	Esel	Santa Cruz	Western Blot
Anti-Kaninchen IgG	PE	-	Santa Cruz	FACS

2.8 Primer

Die Primersequenzen wurden mit dem Programm CLC Workbench entworfen und die Primerspezifität mit dem BLAST Algorithmus überprüft. Die Synthese erfolgte durch Sigma-Aldrich.

Tabelle 4: Primer Ratte

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz (5'=>3') (Tm=59°C)</u>
GAPDH vorwärts GAPDH rückwärts	ATG CTT GTG ATG GGT GTG AA GGA TGC AGG GAT GAT GTT CT
PGK-1 vorwärts PGK-1 rückwärts	CGG AGA ACA CGC CAC TTG AAG GCA GGA AAA TAC TAA ACA

TNF- α vorwärts TNF- α rückwärts	GAGATGTGGAAGCTGGCAGAGG TCCGCTTGGTGGTTTGCTAC
IL-6 vorwärts IL-6 rückwärts	ATACCACCCACAACAGACCA CCAGAAGACCAGAGCAGATT
MCP-1 vorwärts MCP-1 rückwärts	CAATGAGTCGGCTGGAGAAC GCTTGAGGTGGTTGTGGAAA
TLR4 vorwärts TLR4 rückwärts	ATTGTTCCCTTCCTGCCTGAG CTCCACAGCCACCAGATTCTC

Table 5: Primer Maus

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz (5' => 3') (Tm=59°C)</u>
α – smooth muscle actin vorwärts α – smooth muscle actin rückwärts	CAACTGGTATTGTGCTGGACT GAAAGATGGCTGGAAGAGAGT
Calponin vorwärts Calponin rückwärts	ACGGCTTGTCTGCTGAAGTA AAGATGTCGTGGGGTTTCAC
Smoothelin vorwärts Smoothelin rückwärts	AGAACTGGCTACACTCTCAAC GGGTCCAATGTGTGTGCTG
sGC – α vorwärts sGC – α rückwärts	CGTCAAGGGTTATGGATCTCA GGGCGTTATGAATTGGGATGT
sGC – β vorwärts sGC – β rückwärts	ACTGAGAAGCAAGGAAGGGTT TTGGTGAACAGAGGAAGAGGA
Nox1 vorwärts Nox1 rückwärts	GGTGAGGTTGTGATCCAATGG GTTTCTGGTTTCCTGGTTGGG
Nox2 vorwärts Nox2 rückwärts	AAAACCTCCTGGGTCAGCACT AATTGTGTGGATGGCGGTGT
Nox3 vorwärts Nox3 rückwärts	TCCTTCGTGGTTGCTCTCTT CGAGTTTGTGGAAGTTGAGGT
Nox4 vorwärts Nox4 rückwärts	ACAGAAGGTCCCTAGCAGGAG ACAGAAGGTCCCTAGCAGGAG

2.9 (Stamm)Lösungen und Puffer

10 x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14.4 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, dd H ₂ O ad 1 l, pH 7.4
RNase-freies H₂O (DEPC- H₂O)	1ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) dd H ₂ O ad 1 l 12 h bei Raumtemperatur rühren; autoklavieren
10 x TBS	24.2 g Tris 80 g NaCl, dd H ₂ O ad 1 l, pH 7.6
<u>Western Blot</u>	
Blocking Puffer	150 ml 1 x TBST (1x TBS + 0.1% Tween 20) 7.5 g Milchtrockenpulver
Coomassie-Lösung	0.025 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure, dd H ₂ O ad 5 l, pH 8.4
Entfärbe-Lösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) dd H ₂ O
Laufpuffer	144 g Glycin 3.25 g Tris 5 g SDS dd H ₂ O ad 5 l, pH 8.4
Ponceau Stock-Lösung	1.25 g Ponceau S 2.5 ml Eisessig dd H ₂ O ad 250 ml; wird 1:1 mit dd H ₂ O verdünnt
RIPA-Puffer	50 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% (w/v) NP-40 0.25 % (w/v) Na-Deoxycholat; pH 7.4
4 x SDS = Ladepuffer	280 mg Tris (0.06 M) in 4 ml dd H ₂ O, pH 6.8 2 g SDS (5 %) 600 mg DTT (100 mM) 4 g Glycerol (10 %) 30 mg Bromphenolblau (0.3 % w/v) dd H ₂ O ad 10 ml

TBST=Waschpuffer	1000 ml 1 x TBS 1 ml Tween 20
Transferpuffer	75.07 g Glycin 15.15 g Tris 1000 ml Methanol, dd H ₂ O ad 4 l, pH 8.5
Polyacrylamid-Gel	
Laufgel (10%)	4 ml dd H ₂ O, 3.3 ml Ratiophorese, 2.5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8), 100 µl 10% SDS, 100 µl 10% APS, 4 µl TEMED; 20 min erstarren lassen
Sammelgel (4%)	2.7 ml dd H ₂ O, 670 µl Ratiophorese, 500 µl 1 M Tris (pH 6.8), 4 µl 10% SDS, 4 µl 10% APS, 4 µl TEMED; 25 min erstarren lassen
<u>FACS</u>	
Collagenase-Lösung	40 mg Collagenase II 400 µl Hepes 1 M 400 µl Penicillin/Streptomycin 19.4 ml HBSS
FACS-Puffer	95 ml PBS 0.5 % BSA 0.1 % Natriumazid
Hämolyse-Puffer	8.28 g NH ₄ Cl 1.0 g KCO ₃ 0.0372 g Dinatrium-EDTA; ad 1000 ml dd H ₂ O
Isolations-Puffer	1 x PBS 0.5 % BSA 2 mM EDTA

2.10 Spezielle Reagenzien und Puffer für die Immunhistochemie

Dual Endogenous Enzyme Block	Dako, Hamburg, Deutschland
Biotin Blocking System (Avidin+Biotin)	Dako, Hamburg, Deutschland
Protein Block Serumfrei	Dako, Hamburg, Deutschland
Rotihistokit II	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin Lösung	Vector Laboratories (Biozol), Eching, Deutschland
POD/HRP-Substrat	Vector Laboratories, Eching, Deutschland
Elastica van Gieson Staining Kit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Meyers Hämalau	Merck, Darmstadt, Deutschland

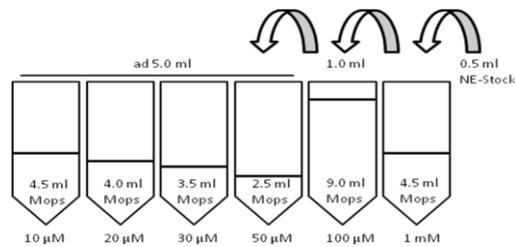
OTC/Tissue Tek	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fast Blue Salt	Merck, Darmstadt, Deutschland
Weigert Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Picrofuchsin-Lösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
AP-Puffer Stock 20x	0.2 M Tris 0.1 M MgCl ₂ 2.8 M NaCl, pH 9.5 mit HCl
AP-Substrat	10 mg Naphtol AS-MX Phopshat 0.5 ml N,N`-Dimethylformamid Ad 50 ml mit AP-Puffer/30 mg Fastblue Salz
DAP-ase Substrat	4 mg Glycyl-Prolin-4-Methoxy-β-Naphtylamid 0.5 ml N,N`-Dimethylformamid Auf 10 ml mit Na-Acetat Puffer pH 5.5/10 mg Fastblue Salt auffüllen Vor Gebrauch Zentrifugieren
1 % Eosin	10 g Eosin 1000 ml dd H ₂ O erhitzen, auf Raumtemperatur abkühlen, filtrieren Zugabe von 1 ml Eisessig
0.5 % HCl-Ethanol	200 ml 70 % Ethanol 1 ml 25 % HCl
0.1 M Natrium-Acetat-Puffer	0.1 M Natriumacetat in dd H ₂ O pH 5.5. mit NaOH

2.11 Medien für die Zellkultur

Dulbeccos MEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
PBS steril	Biochrom, Berlin, Deutschland
RPMI 1640 mit Glucose und Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
FBS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HBSS	Gibco (Invitrogen), Darmstadt, Deutschland
Medium für die Kultivierung glatter Muskelzellen (Superoxide Anion Detection Kit)	RPMI 1640 mit Glucose und Glutamin 10 % FBS 50 U/ml Penicillin-Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat 0.1 mM nichtessentielle Aminosäuren

2.14 Verdünnungsreihen

Noradrenalin



Acetylcholin

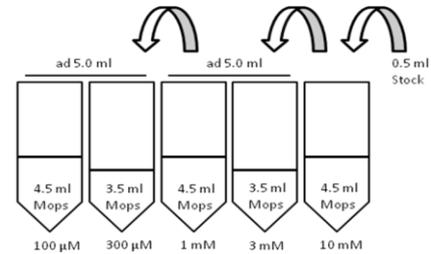


Abbildung 5: Verdünnungsreihe für die Noradrenalin- und Acetylcholin-Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung der Gefäßkontraktilität und -relaxation.

2.15 Versuchstiere

Bei allen Versuchen wurden die geltenden Tierschutzrichtlinien beachtet. Es lag eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern vor.

Ratten

Spontan Hypertensive Ratten (SHR) und Wistar Kyoto Ratten (WKY) wurden von Charles River (Sulzfeld) bezogen.

Mäuse

Die Wildtypen (C57/BL6) wurden bei Charles River (Sulzfeld) bestellt. Die Knockout-Mäuse für Toll-like Rezeptor 4 (TLR4^{-/-}) mit dem gleichen Hintergrund stammten aus eigener Zucht. Es wurden erwachsene Tiere verwendet.

2.16 Spezielle Software

Primerdesign

CLC Workbench

Auswertung von Histologie und Immunhistochemie

ScanLive

Image Pro Plus 5.0

Western Blots

Irfan View 4.23

3. Methoden

3.1 *Behandlung der Versuchstiere*

Ratten

Spontan Hypertensive Ratten (SHR): SHR entwickeln ab der fünften bis sechsten Lebenswoche einen spontanen systolischen Bluthochdruck, der sich im Alter von 10 Wochen mit Werten zwischen 160 bis 180 mmHg manifestiert. Hierbei ist keine zusätzliche bluthochdruckerzeugende Maßnahme notwendig. Für die Untersuchung der TLR4-Expression in den verschiedenen Stadien der Hypertonie wurden Tiere im Alter von 4, 8 und 16 Wochen (jeweils n=8) verwendet.

Um den antihypertensiven und antiinflammatorischen Effekt eines ACE-Hemmers auf die TLR4-Expression bei Hochdruck zu untersuchen, wurde eine weitere Gruppe von SHR (n=5) ab dem Alter von sechs Wochen für 2 Wochen mit 10 mg/kg/Tag Ramipril per Gavage behandelt.

Wistar Kyoto Ratten (WKY): Zur Erzeugung von Bluthochdruck erhielten WKY (n=18) eine Dosis von 25 mg/kg/Tag N^ω-Nitro-L-Arginin- Methyl-ester (L-NAME) per Gavage über einen Zeitraum von 2 Wochen (Alter zu Beginn der Behandlung: 8 Wochen). Davon wurde n=6 WKY 0.9 % NaCl als Vehikel verabreicht, n=6 erhielten 1 mg/kg/Tag Ramipril (therapeutische Dosis; ND=normale Dosis) und weitere 6 Ratten erhielten 10 mg/kg/Tag Ramipril (ultrahohe Dosis; HD=hohe Dosis; alles per Gavage). Als normotensive Kontrollen wurden unbehandelte WKY (n=6) verwendet.

Mäuse

Die basalen Messungen der Gefäßkontraktilität wurden an unbehandelten Wildtypen und TLR4^{-/-} durchgeführt (n=10). Als Hochdruckmodelle dienten der L-NAME und der Angiotensin II-induzierte Bluthochdruck. Dafür wurden in separaten Gruppen WT und TLR4^{-/-} (jeweils n=10) mit dem Stickstoffmonoxid (NO) Synthase Inhibitor L-NAME bzw. mit Angiotensin II behandelt.

L-NAME-induzierter Bluthochdruck: Es erfolgte eine Gabe von 50 mg/kg/Tag L-NAME im Trinkwasser über einen Zeitraum von 2 Wochen. Dabei wurden ein durchschnittliches Körpergewicht von 25 g sowie eine durchschnittliche Trinkmenge von 5 ml pro Tag angenommen. Das Wasser wurde jeden zweiten Tag gewechselt und führte nicht zu einer Beeinträchtigung des Trinkverhaltens. Die Methode ist in der Literatur vielfach beschrieben (105, 106, 123).

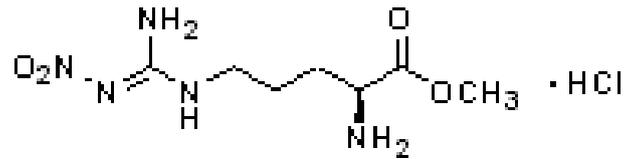


Abbildung 6: Strukturformel von L-NAME (124)

Angiotensin II-induzierter Bluthochdruck: Es wurde 1.8 µg/g KG/Tag Angiotensin II über eine subkutan implantierte osmotische Minipumpe (Pumprate: 0.5 µl/h, Reservoir: 200 µl, Pumpdauer: 14 Tage) für 2 Wochen gegeben (125, 126). Angiotensin II wurde in steriler Kochsalzlösung gelöst, die Pumpen luftblasenfrei mit der Lösung gefüllt und zur Aktivierung bei 37°C über Nacht in steriler Kochsalzlösung inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Implantation der Minipumpe.

3.2 Operative Methoden

3.2.1 Blutdruckmessung mit Femoraliskatheter bei der Ratte

Das Tier wurde auf einer Heizplatte fixiert und unter Isofluran-Anästhesie ein Längsschnitt entlang dem Verlauf der Arteria Femoralis durchgeführt. Ein heparinisierte (5 Einheiten/ml) Polyethylen-Katheter, der mit einem Druckaufnehmer verbunden war, wurde in die linke Femoralisarterie geschoben und der Blutdruck für ca. 10 – 15 min gemessen. Dabei wurde gewartet, bis sich ein stabiler Blutdruck einstellte und erst dann mit der Aufzeichnung begonnen. Danach wurden die Tiere mit einer Überdosis Isofluran getötet.

3.2.2 Implantation einer subkutanen Minipumpe bei der Maus

Die Operation wurde auf einer Heizplatte durchgeführt um die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten. Die Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte unter Isofluran (3.5% bzw. 2.5%), als Analgetikum wurde 30 min vor der Operation 0.1 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic) gespritzt. Das Fell zwischen den Schulterblättern wurde rasiert, mit Hilfe eines Skalpell wurde die Haut geöffnet (Schnittlänge 5 mm), mit Jodlösung desinfiziert und die Pumpe subkutan platziert. Der Schnitt wurde mit 3-0 Seide verschlossen und nochmals desinfiziert.

3.2.3 Implantation eines Telemetriesenders bei der Maus

Als Analgetikum wurde 30 min vor dem Eingriff 0.1 mg/kg KG Buprenorphin gespritzt. Das Tier wurde unter Isofluran-Narkose auf einer Heizplatte fixiert, zwischen den Schulterblättern rasiert und desinfiziert und die linke Arteria Carotis freigelegt. Mit einer sterilen

Injektionsnadel wurde ein Loch in die Gefäßwand gestochen. Der Meßkatheter wurde eingeführt, bis in den Aortenbogen vorgeschoben und im Gefäß eingebunden. Mit einer stumpfen Schere wurde zwischen den Schulterblättern eine Tasche geformt, der dazugehörige Sender eingeschoben und die Wunde vernäht. Nach einer Erholungszeit von 3 Tagen wurde mit der Blutdruckmessung begonnen. Das Tier konnte sich frei bewegen und der Blutdruck wurde bei Bewusstsein, d.h. unter physiologischen Bedingungen gemessen. Neben dem mittleren Blutdruck (MAP, mean arterial pressure), der für die Auswertung herangezogen wurde, erfolgte auch die Erfassung des systolischen und diastolischen Blutdrucks, sowie von Puls und Aktivität. Die Aufzeichnung der Parameter erfolgte über die Dauer der Intervention täglich. Die Werte wurden alle 10 min für 10 Sekunden gemessen und gespeichert.

3.2.4 Organentnahme

Zur Entnahme der Organe wurden die Tiere durch tiefe Isofluran-Anästhesie getötet. Nach Fixierung auf dem Operationstisch wurde die Bauchhaut rasiert, desinfiziert und durchtrennt. Zur Gewinnung der Mesenterialgefäße wurde der Darm entnommen und in MOPS (4°C) überführt, darauf folgte die Entnahme von Nieren, Milz, Leber, Herz und Aorta. Die Organe wurden geteilt und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert bzw. 48 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert und danach in 70% Ethanol umgebettet. Wenn die Organe frisch benötigt wurden erfolgte eine kurzfristige Lagerung auf Eis. Das ganze Tier sowie die entnommenen Organe wurden gewogen.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Isolation primärer glatter Muskelzellen

Die Isolation glatter Muskelzellen (VSMC) aus Mausembrionen erfolgte nach einem angepassten Protokoll von Kobayashi et al. (127). Dabei wurden Endothelzellen durch Collagenase II – Behandlung entfernt (45 min). Die Aorta wurde der Länge nach in 2mm lange Stücke geschnitten, in eine Gelatine-beschichtete Petrischale (Durchmesser 60 mm) überführt und für 3 bis 4 Wochen in DMEM Medium mit 10 % BSA kultiviert. Bei Erreichen einer genügend hohen Zelldichte wurden diese entfernt und die glatten Muskelzellen mit 0.25% Trypsin/EDTA abgelöst. Die Homogenität der Kultur wurde morphologisch (Spindel-Morphologie) sowie durch Expression von α -Smooth Muscle Actin, Calponin und Smoothelin überprüft.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Gewinnung zellulärer RNA

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie. Es wurden autoklavierte Plastikmaterialien und RNase-freies Wasser (DEPC-Wasser) verwendet. Die Zellen wurden geerntet und 350 µl RLT-Puffer (nach Zusatz von 1% β -Mercaptoethanol) zugegeben. Durch Vortexen wurde das Zellmaterial homogenisiert, anschließend erfolgte die RNA-Isolation gemäß Protokoll. Eluiert wurde mit 30 µl nukleasefreiem Wasser.

3.4.2 Gewinnung von RNA aus Gewebe

Es wurde 20-30 mg der Gewebeprobe eingewogen und sofort mit 600 µl RLT-Puffer (nach Zusatz von 1% β -Mercaptoethanol) versetzt. Im TissueLyser wurde mit Hilfe einer sterilen Edelstahlkugel 3 min bei $f=30/s$ homogenisiert und danach für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur RNA-Isolation nach Protokoll verwendet. Die Elution erfolgte mit 30 µl RNase-freiem Wasser.

3.4.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA wurde mit einem Spektralphotometer die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Hierzu wurde die RNA-Lösung 1:50 verdünnt (2 µl RNA-Lösung + 98 µl DEPC-Wasser) und in einer Küvette gemessen. Als Blank wurde DEPC-Wasser verwendet. Die Konzentration der RNA in der entsprechenden Probe wurde automatisch berechnet. Außerdem konnte über das Verhältnis der $OD_{260\text{ nm}}$ und der $OD_{280\text{ nm}}$ bestimmt werden, ob eine Proteinkontamination vorlag (bei einer proteinfreien RNA-Lösung muss das Verhältnis zwischen 1.8 und 2.0 liegen). War eine besonders niedrige RNA-Konzentration zu erwarten, so wurde die Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop durchgeführt. Hierfür wurde 1 µl der unverdünnten Lösung benötigt. DEPC-Wasser diente als Blank.

3.4.4 Reverse Transkription

Mit der Reversen Transkription wurde die isolierte RNA in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde Superscript III als fertiger Kit eingesetzt (bestehend aus Reverser Transkriptase, 5x iScript mit Oligonukleotiden, nukleasefreiem Wasser). Der Reaktionsansatz für eine Probe setzte sich zusammen aus:

RNA	250 ng
5x iScript	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Nukleasefreies Wasser	ad 20 µl

Dabei wurde für alle Proben ein Mastermix aus 5x iScript, nukleasefreiem Wasser und Reverser Transkriptase hergestellt, um Pipettierungenauigkeiten auszugleichen. Die Ansätze wurden gemischt, zentrifugiert (1000 rpm, 2 min) und nach folgendem Protokoll umgeschrieben:

5 min	25°C
30 min	42°C
5 min	85°C

Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße auf Eis abgekühlt, mit sterilem Wasser 1:5 verdünnt und bei -80°C gelagert.

3.4.5 Real-Time PCR

Die Methode der Polymerasekettenreaktion wurde 1987 von Mullis et al. etabliert (128) und dient der Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz. Im Unterschied zur einfachen PCR besteht bei der Real Time (RT) -PCR die Möglichkeit der Quantifizierung. Mit Hilfe eines fluoreszierenden, interkalierenden Farbstoffes (Reporterfarbstoff) kann man die Reaktion verfolgen. Im Laufe der PCR kommt es zu einem Fluoreszenzanstieg, der gemessen werden kann und proportional zur Menge der vorhandenen Doppelstränge ist. Zur Quantifizierung dient der Threshold Cycle (C_T – Wert). Der C_T – Wert beschreibt den PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz größer wird als die Hintergrundfluoreszenz. Für die RT-PCR wurde SYBR®Green verwendet.

Der Ansatz pro Well war wie folgt zusammengesetzt (Doppelbestimmung):

Mastermix aus	SYBR®Green	12.5 µl
	Primer vorwärts	0.025 µl
	Primer rückwärts	0.025 µl
	Steriles Wasser	7.4 µl
	1:5-verdünnte cDNA	5 µl

RT-PCR-Protokoll:	50°C	2 min	
	95°C	10 min	
	95°C	15 s	} 40 Zyklen
	59°C	1 min	

Um die Spezifität des Produktes zu überprüfen und die Bildung von Primer-Dimeren auszuschließen wurde zusätzlich eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Excel aus den mittleren C_T – Werten, wobei ein maximaler Unterschied von 1 bei den im Doppel gemessenen Proben akzeptiert wurde.

3.5 Immunologische Methoden

3.5.1 Isolierung von Herz- und Milzzellen für die FACS-Analyse

Milz (Positivkontrolle): Die Milz wurde mit einem Metallsieb (Maschenweite 100 μm) homogenisiert und in 4 ml Isolationspuffer resuspendiert. Danach wurde bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand bis auf ein Restvolumen von 500 μl verworfen, das verbleibende Pellet mit 1 ml Hämolyse-Puffer versetzt und bei Raumtemperatur 2 min vorsichtig auf- und abpipettiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 20 ml gekühltem Isolations-Puffer beendet. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (1000 rpm, 5 min) und Verwerfen des Überstandes bis auf ein Restvolumen von 1 ml. 250 μl der Milzsuspension wurden dann durch das Sieb eines FACS-Röhrchens (Maschenweite 40 μm) gegeben (Zentrifugation bei 1000 rpm, 5 min). Das Pellet wurde mit 500 μl FACS-Puffer resuspendiert und jeweils 100 μl für die Färbung verwendet.

Herz: Zunächst wurde das Herz auf Eis mit einem Skalpell zerkleinert, mit 5 ml Collagenase-Lösung versetzt und im Wasserbad bei 37°C für 45 min verdaut. Darauf wurde das Gewebe durch ein Metallsieb (Maschenweite 100 μm) gegeben, in einem Falcon aufgefangen und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min). Nach Abnehmen des Überstandes wurde mit 5 ml FACS-Puffer gewaschen, nochmals zentrifugiert und dann 250 μl des resuspendierten Pellets durch ein FACS-Röhrchen gegeben. Das Pellet nach Zentrifugation (1000 rpm, 5 min) wurde in 500 μl FACS-Puffer aufgenommen, 100 μl der Suspension wurden für die Färbung eingesetzt.

3.5.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Prinzip

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, wobei über das Streulicht auf ihre Größe und Granularität geschlossen werden kann. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. FITC mit Emissionsmaximum 525 nm, PE mit Emissionsmaximum 578 nm), die nach Anregung in unterschiedlichen Fluoreszenzbereichen leuchten, lassen sich verschiedene markierte Zellen gleichzeitig untersuchen. Durch die Bindung von spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern an bestimmte Oberflächenantigene kann mit Hilfe der Fluoreszenzintensität (Angabe der MFI = Mittleren Fluoreszenzintensität) in einem bestimmten Bereich die Expression eines Antigens quantitativ bestimmt werden. Über Größe und Granularität können unterschiedliche Zellpopulationen voneinander abgegrenzt werden (Der Experimentator – Immunologie 2009). Ziel des Experimentes in dieser Arbeit war, über eine Doppelfärbung mit dem Pan-Leukozytenmarker Anti-CD45 und Anti-TLR4 herauszufinden, ob die Immunzellen oder Kardiomyozyten als Träger von TLR4 fungieren.

Durchführung

Zur Färbung wurden 100 µl der Zellsuspension mit den Erstantikörpern versetzt (Anti-Ratte CD45, Anti-Ratte TLR4; Verdünnung 1:50) und für 35 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten ein Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer, Zentrifugieren (1000 rpm, 5 min), Abnahme von 400 µl des Überstandes und Resuspendieren des Pellets. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls in einer Verdünnung von 1:50 zugegeben, darauf 45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen wurde Propidiumiodid-Lösung (Verdünnung 1: 1000) zur Markierung von toten Zellen zugegeben und die FACS-Messung nach spätestens 30 min durchgeführt. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurde bei jeder Färbung eine ungefärbte Probe mitgemessen. Zur Auswertung wurden die TLR4-positive sowie die CD45-positive Population abgegrenzt und auf die positiven Zellen im entsprechenden Histogramm gated.

3.5.3 Enzymimmuno-Assay (ELISA)

Für den Versuch wurde der Überstand nach Proteinisolation aus dem Herz von Ratten verwendet (Proteinkonzentration 50 µg).

Bei dem hier beschriebenen Verfahren handelt es sich um einen Sandwich-ELISA, um natürliches Ratten-TNF- α nachzuweisen. Zunächst wurde eine Mikrotiterplatte mit einem Fänger-Antikörper gecoatet (Maus Anti-Ratte TNF- α , 4 µg/ml in PBS) und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Immobilisierung des Antikörpers zu erreichen. Nach

mehrmaligem Waschen am folgenden Tag wurde mit 1% BSA in 1M PBS geblockt (1 Stunde). Das Abblocken freier Proteinbindestellen diente dazu, die Hintergrundaktivität, die durch unspezifisch adsorbierte enzymmarkierte Antikörpermoleküle verursacht wird, zu reduzieren. Darauf folgte die Inkubation mit den Standards bzw. den Proben (2 h) und nach einem weiteren Waschschrift die Zugabe eines Biotin-konjugierten Detektions-Antikörpers (Ziege Anti-Ratte TNF- α , 100 ng/ml). Im nächsten Schritt wurde Streptavidin-Peroxidase zugegeben, welche spezifisch an das Biotin des Detektions-Antikörpers bindet. Nach Entfernen der nichtgebundenen Oxidase in einem weiteren Waschschrift wurde eine Substratlösung (1:1 Mischung aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidin, 20 min), zugegeben, welche eine Farbreaktion auslöst. Diese wurde durch Zugabe von 2 N H₂SO₄ gestoppt. Die optische Dichte der Färbung konnte mit Hilfe eines Photometers bei 450 nm gemessen werden. Da Färbung und Konzentration proportional sind, wurde über die Standardkurve die TNF- α Konzentration in den Proben ermittelt. Die Standardkurve umfasste einen Konzentrationsbereich von 62.5 bis 4000 pg/ml. Die Auswertung erfolgte über die Eichgerade gemäß Protokoll.

3.5.4 cGMP Immunoassay mit Maus-Aorten

Der cGMP Immunoassay ähnelt vom Prinzip her einem ELISA. Zur Probenvorbereitung wurde jeweils ein möglichst langes Stück der thorakalen und abdominalen Aorta von WT und TLR4^{-/-} freipräpariert und mit dem Skalpell in 1 cm lange Stücke geschnitten. Die Gewebestücke wurden in Hepes-gepufferter physiologischer Salzlösung (HBSS) für eine Stunde im Brutschrank inkubiert und darauf hintereinander mit dem unspezifischen Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitor IBMX (1 μ M, 30 min, 37°C) und dem NO-Donor SNP (10 μ M, 10 min, 37°C) stimuliert und sofort schockgefroren. Direkt vor Durchführung des Assays wurde nach Zugabe von jeweils 500 μ l 0.1 N HCl im Tissuelyser homogenisiert (f=13/s, 5 min), 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf Eis gelagert. Zur späteren cGMP-Konzentrationsbestimmung wurde eine 10-Punkt Standardkurve mit einem Konzentrationsbereich von 0.039 – 10 pmol/50 μ l aufgestellt. Die Proben wurden gemäß Protokoll mit Neutralisierungs- und Acetylierungspuffer versetzt. Dies diente der Erhöhung der Nachweissensitivität. Da die Mikrotiterplatte bereits mit dem Antikörper beschichtet war, konnten das Probenmaterial und der rekonstituierte cGMP-Antikörper gleich zugegeben werden. Nach Inkubation wurde eine Meerrettich-Peroxidase-Lösung zugegeben, die Reaktion nach einer weiteren Stunde Inkubation mit 1 N HCl gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen. Die Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen, die Auswertung erfolgte nach Erstellung einer Eichgerade gemäß Protokoll des Herstellers.

3.6 Biochemische Methoden

3.6.1 Proteinisolation aus Zell-Lysaten

Die glatten Muskelzellen wurden geerntet und sofort mit 400 µl Lysepuffer versetzt, dem Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt waren (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail und PhosphoStop). Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren lysiert und homogenisiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80°C gelagert.

3.6.2 Proteinisolation aus Gewebe

Zur Proteinisolation aus Gewebe wurden 20 – 30 mg des tiefgefrorenen Organs mit der 10-fachen Menge RIPA-Puffer (inklusive Protease- und Phosphataseinhibitoren) versetzt und im Tissuelyser homogenisiert ($f=30/s$, 3 min). Anschließend wurde bei 4°C und 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abpipettiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80°C gelagert.

3.6.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Messung der Proteinkonzentration wurde mit dem BCA Protein Assay Reagent Kit von Pierce durchgeführt. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe (2.000; 1.000; 500; 250; 125; 62,50; 31,25 und 0 µg/ml). Auf eine 96-Well-Platte wurden in Doppelbestimmung jeweils 10 µl Standard oder Proteinlösung aufgetragen und mit 200 µl Substratlösung (50 Teile Reagenz A + 1 Teil Reagenz B) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min (37°C) wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 565 nm gemessen.

3.6.4 Western Blot

Bei einem Western Blot werden Proteine mittels SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt und auf eine geeignete Membran, z.B. aus Nitrocellulose, übertragen. Die Proteine werden auf dem Filter immobilisiert und das nachzuweisende Protein kann über einen spezifischen Antikörper detektiert werden. Durch Zusatz eines HRP (Horseradish-Peroxidase = Meerrettich-Peroxidase)-gekoppelten Zweitantikörpers wird das gesuchte Protein durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Die Methode erlaubt somit Identifikation und quantitative Bestimmung einzelner Proteine. Die Auswertung erfolgt über Densititätsbestimmung der Signale. Bei dem hier beschriebenen Verfahren handelt es sich um einen Wet-Blot.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 4x SDS versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Die PAGE-Gele wurden direkt vor dem Blotten gegossen. Neben den Proben (10 µg Protein) wurde ein Molekulargewichts-Standard (Precision Plus, Biorad, 5 µl) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V für 90 min.

Nach der Elektrophorese wurden das Gel, Filterpapiere, Schwämme und die Membran in Transferpuffer equilibriert und dann in einer Blotapparatur wie folgt angeordnet (Abb. 7):

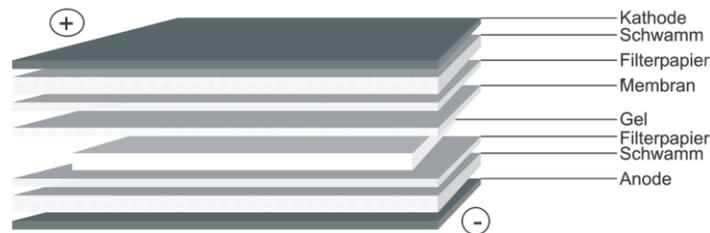


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Western Blot

Schichtung von Membran und Gel sowie Position der Elektroden (129).

Der Membrantransfer erfolgte bei 500 mA für 120 min unter Kühlung. Nach dem Transfer wurde das Gel mit Coomassie-Blau gegengefärbt, um die effiziente Übertragung der Proteine auf die Membran zu überprüfen. Die Membran wurde mit TBST gewaschen, 2 min mit Ponceau-Lösung gefärbt und unterhalb von 55 kDa geschnitten (Größe von Ratte-TLR4: 89 kDa; Größe von Ratte-GAPDH: 37 kDa). Zur Blockade unspezifischer Bindestellen erfolgte darauf eine Inkubation in Blocking Puffer (1 h). Der untere Teil wurde mit einem Primäantikörper für GAPDH inkubiert, um eine Beladungskontrolle zu haben. Der obere Membranteil diente dem Nachweis von TLR4. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primäantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran nach 3 Waschschritten mit TBST mit dem Zweitantikörper inkubiert (1 h). Die Verdünnung der Antikörper erfolgte nach Herstellerangaben in Blocking Puffer (Anti-TLR4: 1:200; Anti-Gapdh: 1: 10.000; Anti-Kaninchen: 1:1000; Anti-Maus: 1:10.000). Zur Detektion wurde eine Chemilumineszenz-Lösung (Roche, 1:1-Mischung aus Lösung A und Lösung B; Inkubationszeit 5 min) verwendet, die Aufnahmen wurden an der Kodak Image Station 200R gemacht und die Banden densitometrisch ausgewertet.

3.6.5 Bestimmung der NADPH-Oxidase Aktivität

Der LumiMax Superoxide Anion Detection Kit dient zur quantitativen Messung von Superoxid-Anionen in kultivierten Zellen. Das Prinzip beruht auf der Oxidation von Luminol durch Superoxid-Anionen. Bei der Reaktion entsteht Energie in Form von Licht, das mit einem Standard-Luminometer gemessen werden kann (130). Der Kit enthält außerdem einen Enhancer, der die Sensitivität des Assays erhöht, indem die Chemilumineszenz verstärkt wird. Dadurch können auch besonders niedrige Konzentrationen an Superoxid-Anionen

gemessen werden. Der Assay erfolgte für unstimulierte Muskelzellen von WT und TLR4^{-/-} nach folgendem Protokoll:

Zellkultur: Etwa 1.25×10^7 glatte Muskelzellen wurden mit angereichertem Wachstumsmedium versetzt, um eine Endkonzentration von 5×10^5 Zellen/ml zu erhalten und dann für 72 Stunden in Medium mit 2% BSA inkubiert.

Vorbereitung der Zellen: Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (3000 x g, 5 min; 5×10^6 Zellen). Um die Reaktivität der Zellen zu erhöhen, wurden sie mit 1 ml frischem Wachstumsmedium versetzt, für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend zu 5×10^5 Zellen aliquotiert. Darauf wurden die Gefäße zentrifugiert (1600 rpm, 2 min), der Überstand abpipettiert und 100 µl des Assay-Mediums zugegeben.

Assay: Für den Assay wurden anschließend Luminol (Endkonzentration 100 µM), Enhancer (Endkonzentration 125 µM) und PMA (NADPH-Oxidase Aktivator; Endkonzentration 199 ng/ml) zugegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrollen wurden Proben ohne PMA verwendet. Anschließend wurden die Proben in eine Mikrotiterplatte überführt und die Lichtemission nach 60 min in einem Luminometer (FLUOstar Omega Multidetetection Microplate Reader) gemessen. Die Lichtintensität wurde in RLU (Relative Light Units) angegeben.

3.7 Histologie

3.7.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung von Kryoschnitten wurden die Gewebeproben direkt ohne vorherige Fixierung in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Herzen wurden zunächst in O.C.T. (Tissue-Tek®) eingebettet. Das Schneiden erfolgte im Kryostat bei -20°C, wobei der Gewebeblock und der Probenhalter bereits vorher auf -20°C temperiert wurden. Die Schnitte wurden dann auf silanisierte Objektträger aufgezogen und eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

3.7.2 Rakusan-Färbung

Die Kapillarfärbung wurde nach dem Protokoll von Rakusan et al. angefertigt (131). Hierbei wurden die Gefrierschnitte 5 min mit Aceton fixiert und jeweils 2 min mit PBS und 0.1 M Natrium-Acetat-Puffer gewaschen. Darauf wurde 100 min mit DAP-ase Substrat inkubiert. Die Schnitte wurden mit dd H₂O und 1x AP-Puffer gespült und 25 min mit AP-Substrat

inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift mit PBS und dd H₂O wurden sie wässrig eingedeckt.

3.7.3 Auswertung der Gefrierschnitte

Pro Herzschnitt wurden 5 Bereiche des linken Ventrikels (Endomyokard) in 20-facher Vergrößerung fotografiert. Schnitte mit Gefrierbruch wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Pro Bild wurden die blau gefärbten Kapillaren gezählt und der Mittelwert für jedes Tier berechnet. Die Fläche der Kardiomyozyten wurde mit dem Programm Image Pro Plus 5.0 berechnet. Pro Schnitt wurden 5 Kardiomyozyten vermessen. Aus beiden Werten konnte dann das Verhältnis von Kapillaren pro Kardiomyozyt berechnet werden.

3.8 Immunhistochemie

Immunhistochemischen Methoden erlauben den Nachweis bestimmter Proteine in Gewebeschnitten mit Hilfe spezifischer Antikörper. Dadurch kann auf das Vorhandensein und auf die Verteilung, zum Teil auch auf die Menge des Proteins im Gewebe geschlossen werden. Zur Detektion müssen die Antigen-Antikörper-Bindungen entweder über eine Farbreaktion oder über Farbstoff-konjugierte Antikörper sichtbar gemacht werden. Um die TLR4-Expression und Verteilung im Herzen der Ratte zu untersuchen, wurden nach Fixierung des Gewebes Paraffinschnitte angefertigt und mit einem anti-TLR4-Antikörper gefärbt.

3.8.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Zur Konservierung des Gewebes wurde ein 3 – 4 mm breiter Querschnitt des Herzens nach Entnahme aus dem Tier für 48 h mit 4 % PFA im Kühlschrank fixiert und danach in 70 % Ethanol aufbewahrt. Vor der Einbettung wurde das Gewebe mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol entwässert, um das PFA zu entziehen und auf den Kontakt mit Paraffin vorzubereiten. Die Proben liefen dabei ca. 12 h durch einen Einbettautomaten. Darauf wurden sie mit 60°C warmem Paraffin in eine Gießform gegeben und erstarren gelassen. Es wurden 4 µm breite Gewebeschnitte angefertigt, auf silanisierte Objektträger aufgezogen und bei 40°C über Nacht im Trockenschrank getrocknet.

3.8.2 TLR4-Färbung

Vor der Färbung des Paraffinschnittes musste dieser zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Die Entparaffinierung erfolgte mit Xylol (3 x 10 min), die Rehydrierung über eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol). Nach einem Waschschrift von jeweils 5 min mit dd H₂O bzw. TBS wurden die Schnitte für 10 min mit 50µl Dual Block bei Raumtemperatur behandelt, um endogene alkalische Phosphatasen (AP) und Peroxidasen

(POD) zu blockieren. Danach wurde nacheinander mit jeweils einem Tropfen Avidin- und Biotin-Lösung bzw. Proteinblock für 10 min inkubiert. Dies dient der Blockade von endogenem Biotin und von unspezifischen Bindestellen. Für die TLR4-Färbung wurde der Erstantikörper in TBS gegeben (Kaninchen Anti-Ratte TLR4, 1:100) und die Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur in einer geschlossenen Kammer inkubiert. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls in TBS verdünnt und die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur (biotinylierter Anti-Kaninchen IgG, 1:100), ebenso die Behandlung mit Streptavidin-Lösung (1:100). Zwischen allen aufgeführten Schritten wurde 2x5 min mit TBS gewaschen. Um die Färbung sichtbar zu machen, wurde pro Schnitt 1 Tropfen POD/HRP-Substrat zugegeben (5 min bei Raumtemperatur) und die Reaktion anschließend gestoppt, indem der Schnitt 5 min in dd H₂O gestellt wurde. Anschließend wurden die Schnitte 2 min mit Mayers Hämalaun inkubiert, um die Nuklei gegenzufärben, 5 min mit Leitungswasser gewaschen und dann einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol jeweils 1 min, Xylol I-III jeweils 2 min) ausgesetzt. Nach dem Trocknen der Schnitte wurden Bilder vom linken Ventrikel gemacht (20- und 40-fache Vergrößerung), um die TLR4-Lokalisation und Quantität in den unterschiedlichen Proben zu ermitteln.

3.8.3 Elastica-van-Gison-Färbung

Nach Messung am Myographen wurden die Gefäße in 4 % PFA über Nacht bei Raumtemperatur fixiert und dann in 70 % Ethanol überführt. Das Gewebe wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Paraffin eingebettet, dann 4 µm breite Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Entparaffinierung erfolgte mit Xylol (I-III, jeweils 10 min) und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, jeweils 2 min). Nach Einlegen in dd H₂O (5 min) wurden die Schnitte nach Weigert für 10 min auf Elastin gefärbt, für 1 min mit Leitungswasser gespült und dann 5 min mit Weigerts-Lösung gefärbt, um die Nuklei sichtbar zu machen. Danach wurde 2 min mit Picrofuchsin-Lösung inkubiert, 1 min mit 70% Ethanol gewaschen und eine aufsteigende Alkoholreihe (96%, 100%, jeweils 30 s; Xylol I-III, jeweils 2 min) durchgeführt. Nach der Färbung waren die interne und externe Lamina elastica deutlich voneinander zu unterscheiden. Die Schnitte wurden in 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.8.4 Berechnung des Verhältnisses Wanddicke/Lumen

Zur Berechnung der Gefäßwand wurden zunächst die Flächen um die interne Lamina elastica sowie um die externe Lamina elastica ausgemessen. Aus den Flächen wurde dann jeweils der Radius berechnet, wobei ein kreisförmiger Querschnitt angenommen wurde. Die Wanddicke ergab sich aus der Differenz von Außen- und Innenradius. Daraus wurde das Verhältnis von Wanddicke zu Innendurchmesser berechnet.

3.8.5 Hämatoxylin - Eosin (HE) - Färbung

Die Schnitte wurden mit Xylol (I-III, jeweils 10 min) und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70% Ethanol, jeweils 2 min) deparaffiniert, dann 5 min mit dd H₂O gewaschen, mit Meyers Hämalaun inkubiert und mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurde mit 0.5% HCl-Ethanol gespült bis das Glas des Objektträgers durchsichtig erschien. Nach einem weiteren Waschschrift mit Leitungswasser wurde 1 – 5 min Eosin 1% zugegeben, wieder mit Wasser gewaschen, kurz in 70% Ethanol getaucht und danach 30 s in 96% Ethanol, 2x 2 min in 100% Ethanol und anschließend in Xylol gestellt (I-III, jeweils 2 min). Der Nukleus war schließlich blau gefärbt, das Zytoplasma erschien hellrot und Collagen war rot bis pink.

3.9 Mulvany-Myograph

Mit dem Mulvany-Myographen lässt sich isometrisch die Vasokonstriktion sowie die Vasodilatation von kleinen Gefäßen (60-3000 µm) messen. Durch Stimulation der Gefäße mit verschiedenen Agonisten kann die Änderung der Wandspannung registriert werden, die in mN/mm aufgezeichnet wird.

3.9.1 Präparation von Maus-Widerstandsgefäßen

Zur Isolation der Widerstandsgefäße wurde der Darm vollständig entnommen, in MOPS (4°C) überführt und in einem Präparationsgefäß (Petrischale mit Silikongel/Sylgaard) fixiert. Unter einem Operationsmikroskop wurde mit einer Federschere und mikrochirurgischen Pinzetten perivaskuläres Fett und Bindegewebe von Widerstandarterien zweiter Generation (Gefäßinnendurchmesser < 400 µm) entfernt. Zwei Edelstahldrähte (Durchmesser: 40 µm) wurden atraumatisch in das Gefäß eingeführt, um das Endothel nicht zu beschädigen, und die Arterie dann so abgeschnitten, dass die Segmentlänge 2mm betrug. Bis zur Verwendung am Myographen wurden die Gefäße in MOPS-Puffer (4°C) aufbewahrt.

3.9.2 Methode

Die Mulvany-Myographie wurde erstmals 1977 von Mulvany und Halpern beschrieben (132). Hierbei wird das Widerstandsgefäß mit Hilfe von zwei Drähten aufgespannt (Abb. 8), so dass Kontakt zu einem mechanoelektrischen Signalwandler und einer Mikrometerschraube besteht (Abstandsmesser und Kraftaufnehmer). Durch die Abstandsmessung zwischen den beiden Drähten wird der Gefäßinnendurchmesser bestimmt. Das Organbad wurde mit 10 ml MOPS befüllt und langsam auf 37°C aufgeheizt bzw. die Temperatur konstant bei 37°C gehalten. Mit dem hier verwendeten Myographen ließen sich zwei Gefäße gleichzeitig untersuchen. Um verschiedene Gefäße miteinander vergleichen zu können, mussten die Gefäße vor Beginn der Messung normalisiert werden, d.h. es wurde eine definierte Vorspannung aufgebracht. Die Normalisation wurde vom Gerät automatisch durchgeführt.

Dabei wurde das Gefäß schrittweise gedehnt. Aus der nach jedem Dehnungsschritt registrierten Wandspannung und dem inneren Umfang wurde jeweils der transmurale Druck bestimmt. Dieser stellt den Druck auf die Wand eines Hohlorgans dar und ergibt sich aus der Differenz zwischen Innendruck und Außendruck. Sobald er 100 mmHg überstieg, wurde die Normalisation beendet. Die Gefäße wurden dann auf 90% ihres maximalen Durchmessers gespannt. Es erfolgte anschließend ein Austausch des MOPS-Puffers (37°C), um durch Dehnung freigesetzten vasoaktive Substanzen auszuwaschen.

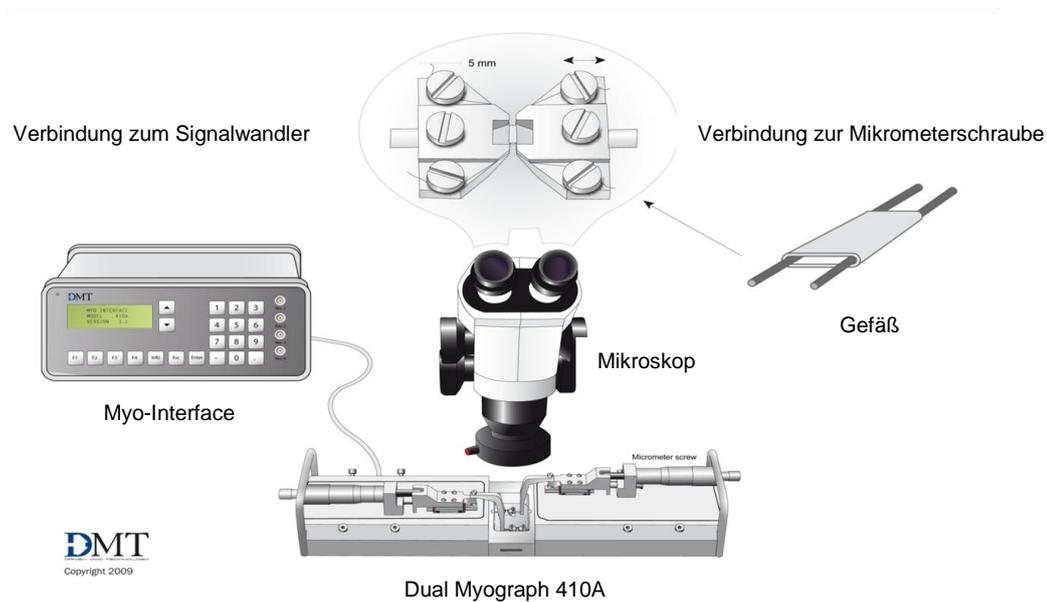


Abbildung 8: Aufbau eines Mulvany-Myographen

Das Gefäß wird so im Organbad eingespannt, dass Kontakt zum Signalwandler und zur Mikrometerschraube besteht (133).

3.9.3 Versuchsprotokoll zur Messung der Gefäßfunktion und – kontraktilität

Die Gefäßfunktion wurde mit Hilfe einer Noradrenalin-Dosis-Wirkungs-Kurve sowie einer Acetylcholin-Dosis-Wirkungs-Kurve bestimmt. Dabei wurden die Gefäße durch eine aufsteigende Noradrenalin-Reihe (1 μM - 10 μM) kontrahiert und gleich danach mit Acetylcholin (10 μM - 1 mM) dilatiert. Hierfür wurde immer 1 ml der Lösung im Organbad gegen die entsprechende Substanzlösung (siehe Abb. 5) ausgetauscht. Acetylcholin bewirkt eine endothelabhängige Vasodilatation und lässt somit auf die Intaktheit des Endothels schließen. Gefäße mit einer Vasodilatation unter 40 % wurden nicht ausgewertet. Bei jeder

Dosis-Wirkungs-Kurve wurde die nächsthöhere Agonistenkonzentration bzw. die nächste Substanz erst zugegeben, wenn die vom Gefäß erzeugte Spannung die Plateauphase erreicht hatte. Nach Austausch des MOPS-Puffers und einer Ruhezeit von 5 Minuten wurden die Gefäße durch Zugabe eines Calcium-freien MOPS-Puffers und schrittweise Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration (0 mM Ca²⁺/4.7 mM K⁺ und 0 mM Ca²⁺/125 mM K⁺) depolarisiert, d.h. die spannungsabhängigen Calciumkanäle wurden geöffnet. Darauf wurden sie durch stufenweise Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration kontrahiert (von 0.25 mM Ca²⁺/125 mM K⁺ bis 3.0 mM Ca²⁺/125 mM K⁺).

Zur Aufklärung der Bedeutung der Phosphodiesterase 5 (PDE 5) wurde vorkontrahierten Gefäßen (3.0 mM Ca²⁺/125 mM K⁺) der PDE-Inhibitor IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin) in aufsteigender Konzentration zugegeben (10⁻¹² - 10⁻⁵ M).

Um die Gefäßkontraktilität unter oxidativem Stress zu bestimmen, erfolgte die Inkubation der Mesenterialgefäße mit Menadion (10 µM, 20 min).

3.9.4 Auswertung

Die Gefäßkonstriktion wurde an den Innendurchmesser der Gefäße angepasst und für die einzelnen Messpunkte wie folgt berechnet:

$$(F_x - F_{\text{basal}}) / \text{Durchmesser}$$

Die Vasorelaxation auf Acetylcholin bzw. IBMX wurde als Umkehrwert der maximalen Konstriktion nach Zugabe von 10 µM Noradrenalin bzw. 3 mM Ca²⁺ berechnet:

$$(F_x - F_{\text{NE10}}) / (F_{\text{NE10}} - F_{\text{basal}}) * 100 \text{ bzw. } (F_x - F_{\text{Ca3}}) / (F_{\text{Ca3}} - F_{\text{basal}}) * 100$$

3.9.5 Statistik

Um statistische Signifikanzen zu ermitteln, wurde allgemein der Student's t-Test eingesetzt. Zum Vergleich normotensiver und hypertensiver Ratten wurde auch der χ^2 -Test herangezogen. Die Gruppenunterschiede zwischen den pharmakologischen Behandlungen in den L-NAME-behandelten WKY wurden über die Varianzanalyse und den post-hoc Dunnett's t-Test berechnet. Ein $p \leq 0.05$ wurde als signifikant betrachtet. Soweit nicht anders angegeben wurden Abweichungen als \pm SEM aufgetragen.

4. Ergebnisse

4.1 Die Rolle von TLR4 bei Bluthochdruck

4.1.1 Überblick

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Rolle des kardialen TLR4 bei der Entwicklung von Bluthochdruck untersucht werden. Immunhistologisch ließ sich in erwachsenen SHR eine erhöhte TLR4-Expression im Vergleich zu normotensiven WKY-Ratten nachweisen. Der Rezeptor war vor allem in den hypertrophen Kardiomyozyten lokalisiert. Um genauer zu definieren, in welchem Stadium der Hochdruckentwicklung eine TLR4-Hochregulation stattfindet, wurde die Proteinexpression in sehr jungen, adoleszenten und erwachsenen Tieren mit Hilfe von Western Blot und Real-Time PCR untersucht. Bei den jungen Tieren, d.h. im prehypertensiven Stadium, konnte kein Unterschied in der kardialen TLR4-Expression gezeigt werden, wohingegen mit Beginn eines rapide steigenden Blutdrucks ab der achten Lebenswoche eine signifikant erhöhte TLR4-Expression in den SHR verzeichnet wurde. Diese blieb auch bei den erwachsenen Tieren mit manifestem Hochdruck bestehen. Während dies *in vivo* nicht mit einer verstärkten Expression von Entzündungsparametern im Herzen einherging, wurde *in vitro* nach Stimulation mit dem endogenen TLR4-Liganden Heparansulfat eine verstärkte mRNA-Expression von TNF- α und IL-6 nachgewiesen. Dies deutet auf eine gesteigerte TLR4-Aktivität im Zusammenhang mit einem erhöhten Blutdruck hin. Als weiteres Hochdruckmodell wurde die L-NAME-induzierte Hypertonie bei WKY-Ratten herangezogen. Auch hier zeigte sich immunhistologisch eine verstärkte Lokalisation von TLR4 in den Kardiomyozyten der Hochdrucktiere, die - ebenso wie bei SHR- durch FACS-Analyse bestätigt wurde. Schließlich sollte in beiden Hochdruckmodellen der Einfluss eines ACE-Hemmers mit seinen antihypertensiven und antientzündlichen Eigenschaften auf die TLR4-Expression analysiert werden.

4.1.2 Blutdruckentwicklung in SHR

Wie in der Literatur beschrieben, kam es ab der achten Lebenswoche zu einem starken Blutdruckanstieg in den SHR gegenüber den Kontrolltieren (WKY: 98 ± 8 mmHg; SHR: 116 ± 10 mmHg; $p \leq 0.05$), der sich bis zum Alter von 16 Wochen weiter erhöhte (WKY: 104 ± 9 mmHg; SHR: 135 ± 12 mmHg; $p \leq 0.05$; Tabelle 6). Auch das Herzgewicht der SHR nahm im Vergleich zum Gesamtkörpergewicht ab der achten Woche signifikant zu (WKY 8 Wochen: 3.4 ± 0.1 mmHg, SHR 8 Wochen: 3.8 ± 0.3 ; WKY 16 Wochen: 2.7 ± 0.04 mmHg, SHR 16 Wochen: 3.4 ± 0.4 mmHg; $p \leq 0.05$) (Tabelle 6). Nach zweiwöchiger Behandlung der SHR mit Hochdosis-Ramipril (10 mg/kg/Tag) gingen sowohl der Blutdruck (80 ± 7 mmHg; $p \leq 0.05$) als auch das Verhältnis Herzgewicht/Körpergewicht (3.4 ± 0.1 ; $p \leq 0.05$) signifikant zurück. Unter dem ACE-Hemmer stellte sich somit ein Blutdruck vergleichbar mit dem junger SHR ein.

	4 Wochen		8 Wochen		16 Wochen		8 Wochen
	WKY	SHR	WKY	SHR	WKY	SHR	SHR + Ramipril
MAP (mmHg)	63 ± 5	76 ± 8 *	98 ± 8	116 ± 10 *	104 ± 9	135 ± 12 *	80 ± 7 #
HW/BW (g/kg)	4.5 ± 0.2	5.2 ± 0.3 *	3.4 ± 0.1	3.8 ± 0.3 *	2.7 ± 0.04	3.4 ± 0.4 *	3.4 ± 0.1 #

Tabelle 6: Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzgewicht/Körpergewicht in unbehandelten SHR und WKY und in Ramipril-behandelten SHR

MAP: Mean arterial pressure, HW/BW (Herzgewicht/Körpergewicht; heart weight/body weight); die Ramiprildosis lag bei 10 mg/kg/Tag

* $p \leq 0.05$ versus WKY, # $p \leq 0.05$ versus SHR unbehandelt (8 Wochen).

4.1.3 Immunhistologischer Nachweis von TLR4 in erwachsenen SHR

Die immunhistochemische Färbung mit einem TLR4-Antikörper zeigte zunächst eine deutlich gesteigerte, jedoch ungleichmäßig angeordnete TLR4-Expression in den Kardiomyozyten der hypertensiven SHR, die zudem stark hypertroph waren. Innerhalb der Kardiomyozyten war die TLR4-Färbung homogen (Abb. 9 A und 9 B), bei den SHR war sie jedoch viel intensiver ausgeprägt als bei den WKY-Ratten. Die Schnitte wiesen außerdem auf eine verstärkte perivaskuläre Inflammation in den SHR hin (Abb. 9 D und 9 E), dennoch konzentriert sich die Färbung hauptsächlich auf die Kardiomyozyten. Die Behandlung mit Hochdosis-Ramipril (10 mg/kg/Tag) führte zu einem starken Rückgang der TLR4-Expression. Dies zeigte sich daran, dass nur wenige Kardiomyozyten gefärbt waren und die Färbung eine geringe Intensität hatte. Darüber hinaus war kaum noch perivaskuläre Inflammation vorhanden (Abb. 9 C und 9 F).

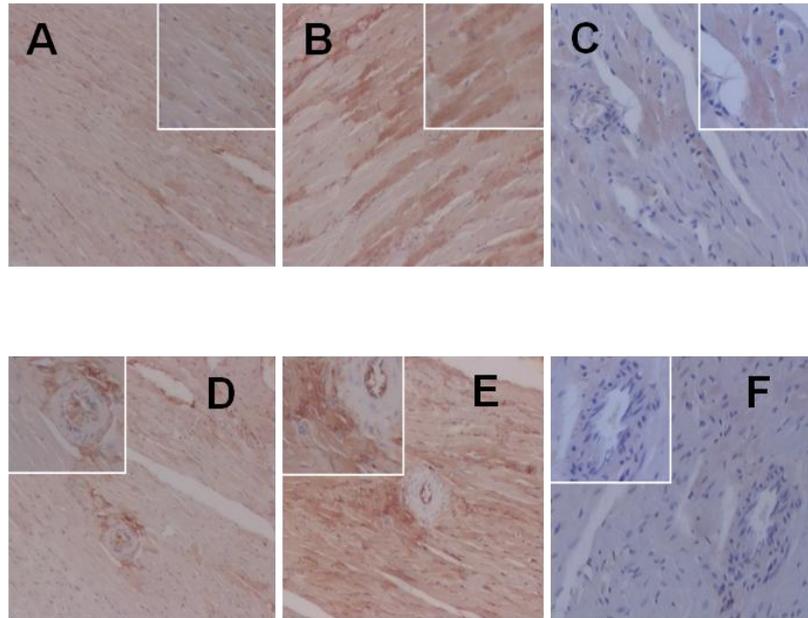


Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von TLR4 im Herzen

Die Färbungen sind in 20- bzw. 40-facher Vergrößerung gezeigt.

A - C: TLR4-Färbung in Kardiomyozyten von unbehandelten erwachsenen WKY (A), SHR (B) und von Ramipril-behandelten adoleszenten SHR (10 mg/kg/Tag, 2 Wochen) (C).

D - F: TLR4 im perivaskulären Bereich von unbehandelten erwachsenen WKY (D), SHR (E) und von Ramipril-behandelten adoleszenten SHR (10 mg/kg/Tag, 2 Wochen) (F).

4.1.4 Nachweis von TLR4 in SHR mittels Western Blot und Zeitverlauf der TLR4-Expression

Die Frage, in welchem Stadium der Bluthochdruckentwicklung eine TLR4-Hochregulation im Herzen stattfindet, wurde mit Hilfe des Western Blots beantwortet. Dabei wurden zunächst Herzlysate von erwachsenen SHR und WKY untersucht. Die TLR4-Detektion erfolgte mit einem spezifischen Antikörper, als Ladekontrolle wurde Gapdh verwendet. Ebenso wie in der Immunhistochemie zeigte sich hier eine signifikante TLR4-Überexpression in SHR (Abb. 10 A). Auch in den acht Wochen alten SHR war die TLR4-Protein Expression signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Abb. 10 B), wohingegen in den jungen, vier Wochen alten und normotensiven Tieren eine gleiche TLR4-Expression in WKY und SHR vorlag (Abb. 10 C). Daraus lässt sich schließen, dass im prehypertensiven Stadium, d.h. bei gleichem Blutdruck zwischen WKY und SHR, kein Unterschied im TLR4-Expressionsmuster vorliegt. Während der Entwicklung von Bluthochdruck und bei manifester Hypertonie hingegen zeigt sich eine kardiale TLR4-Überexpression.

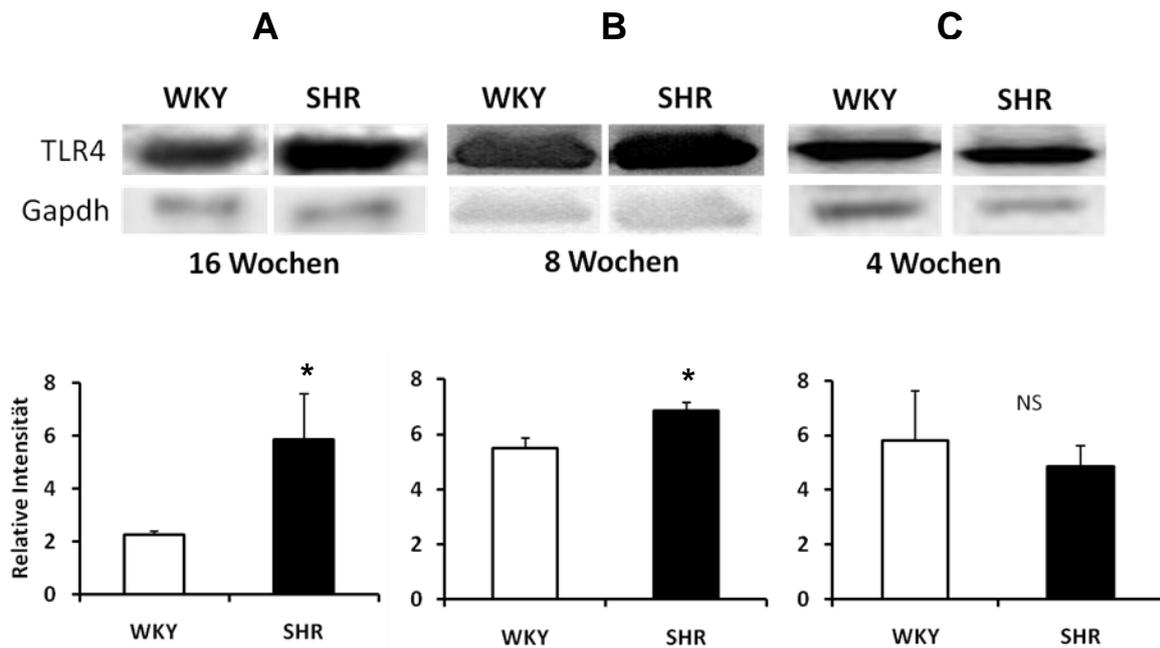


Abbildung 10: TLR4-Protein-Expression im Herzen von erwachsenen, adoleszenten und jungen SHR im Vergleich zu WKY

Western Blot und densitometrische Auswertung * $p \leq 0.05$ versus WKY

4.1.5 *In vitro* TLR4-Aktivierung

Nachdem eine TLR4-Überexpression bereits in adoleszenten SHR nachzuweisen war, sollte die proinflammatorische Aktivität von TLR4 bestimmt werden. *In vitro* wurde das Herzlysat von acht Wochen alten Tieren mit dem endogenen TLR4-Liganden Heparansulfat (HS) inkubiert (10 $\mu\text{g/ml}$; 4 Stunden). Danach wurden TNF- α , IL-6 und MCP-1 im Vergleich zu unstimulierten Zellen (basal) als Entzündungsmarker auf mRNA-Ebene bestimmt. In der SHR-Gruppe zeigte sich nach Heparansulfat-Stimulation eine signifikante Zunahme der TNF- α mRNA (TNF- α /Gapdh: 0.06 vs. 0.1; $p \leq 0.05$) und IL-6 mRNA (IL-6/Gapdh: 0.029 vs. 0.045; $p \leq 0.05$), d.h. eine verstärkte proinflammatorische Antwort im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 11 A und 11 B). Die Werte für MCP-1 unterschieden sich in beiden Gruppen nicht signifikant (Abb. 11 C).

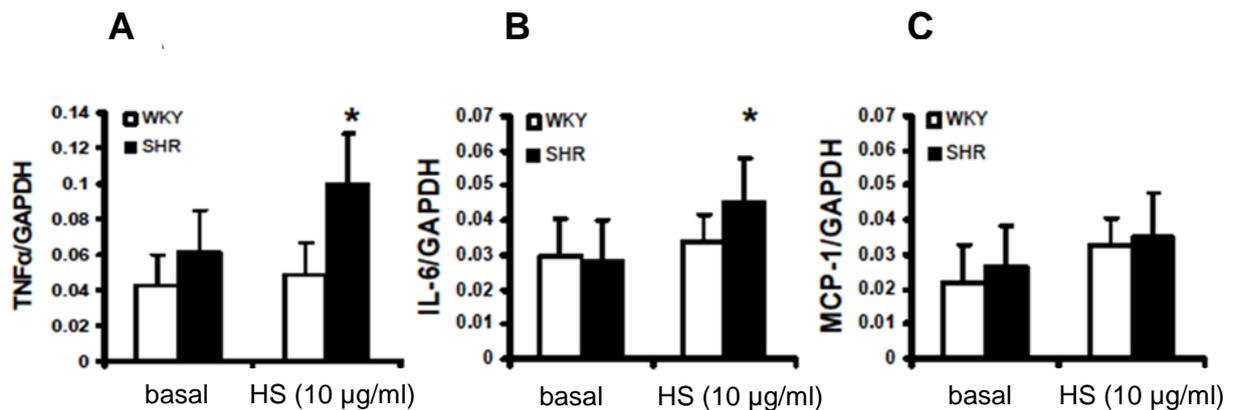


Abbildung 11: *In vitro* Stimulation von Herzzellen aus SHR und WKY mit Heparansulfat

Herzzellen aus 8-Wochen alten SHR und WKY wurden mit dem endogenen TLR4-Liganden Heparansulfat inkubiert und die mRNA-Expression von TNF- α (A), IL-6 (B) und MCP-1 (C) bestimmt. * $p \leq 0.05$ versus SHR basal

4.1.6 *In vivo* Entzündung und Einfluss von Ramipril in SHR

Während bei der *in vitro* Stimulation von TLR4 mit Heparansulfat eine Zunahme von TNF- α und IL-6 in den SHR zu sehen war, konnte *in vivo*, d.h. im Gewebe, trotz erhöhter mRNA-Expression von TLR4 keine vermehrte Expression von TNF- α , IL-6 und MCP-1 in 8-Wochen alten SHR gezeigt werden (Abb. 12 A). IL-6 war zudem nur in sehr geringen Mengen nachzuweisen (nicht gezeigt). Darüber hinaus war im Zeitverlauf *in vivo* auch keine Zunahme von TNF- α auf Proteinebene zu sehen. Dies wurde mittels ELISA gemessen (Abb. 12 B). Hochdosis-Ramipril führte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunhistochemie zu einer signifikanten Downregulation der TLR4 mRNA. Außerdem war TNF- α nach Ramiprilbehandlung in den SHR tendenziell erniedrigt, die Werte für MCP-1 waren identisch (Abb. 12 C).

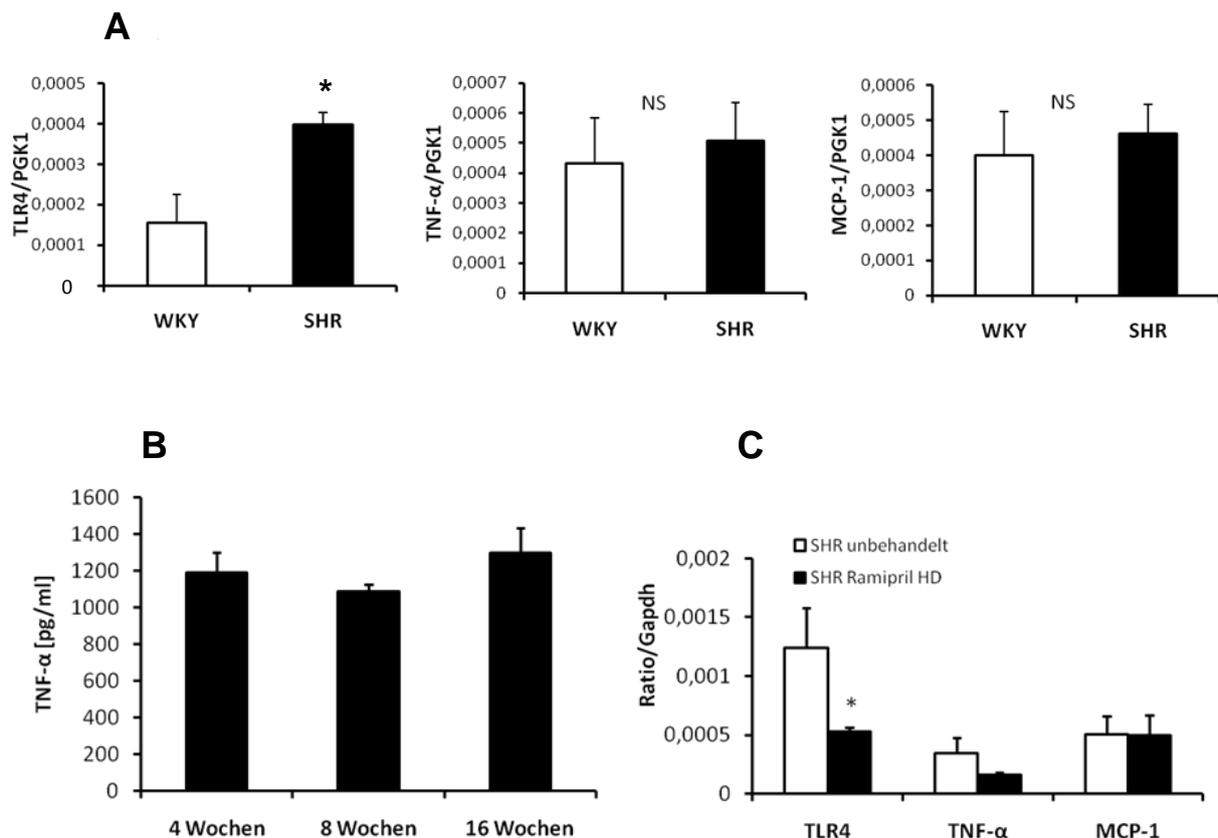


Abbildung 12: Expression von TLR4, TNF- α und MCP-1 in SHR und WKY

(A) TLR4, TNF- α und MCP-1 mRNA-Expression im Herzen von unbehandelten, 8-Wochen alten SHR und WKY. Erhöhtes TLR4 in den SHR ging nicht mit einer erhöhten TNF- α und MCP-1 Expression einher.

(B) In 4-, 8- und 16-Wochen alten SHR zeigte sich keine Zunahme der kardialen TNF- α Proteinexpression.

(C) Die Behandlung mit Ramipril regelte die TLR4 mRNA-Expression herunter, für TNF- α und MCP-1 ergab sich kein signifikanter Unterschied. * $p \leq 0.05$ versus WKY bzw. SHR unbehandelt

4.1.7 TLR4 bei L-NAME-induziertem Hochdruck in WKY und Einfluss von Ramipril

Die L-NAME-Gabe über 2 Wochen resultierte in einem signifikant höheren mittleren Blutdruck (unbehandelt vs. L-NAME: 101 ± 8 mmHg vs. 124 ± 8 mmHg; $p \leq 0.05$) und Herzgewicht/Körpergewicht in den WKY-Ratten (unbehandelt vs. L-NAME: 2.8 ± 0.15 mmHg vs. 3.5 ± 0.2 mmHg; $p \leq 0.05$). Sowohl unter der therapeutischen Ramipril-Dosis (1 mg/kg/Tag; MAP: 99 ± 10 mmHg; HW/BW: 3.1 ± 0.2 g/kg) als auch unter der Hochdosis-Ramipril-Gabe (10

mg/kg/Tag; MAP:95±13 mmHg; HW/BW:2.9±0.5 g/kg) gingen Blutdruck und Herzgewicht auf Kontrollniveau (unbehandelte Tiere) zurück (Tabelle 7).

	Unbehandelt	Vehikel + L-NAME	Ramipril(1mg/kg/d) + L-NAME	Ramipril(10 mg/kg/d) + L-NAME
MAP (mmHg)	101 ± 8	124 ± 8*	99 ± 10 [#]	95 ± 13 [#]
HW/BW(g/kg)	2.8 ± 0.15	3.5 ± 0.2*	3.1 ± 0.2 [#]	2.9 ± 0.5 [#]

Tabelle 7: Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzgewicht/Körpergewicht in unbehandelten WKY und nach Behandlung mit L-NAME und Ramipril + L-NAME

MAP: Mean arterial pressure, HW/BW (Herzgewicht/Körpergewicht; heart weight/body weight); die L-NAME-Dosis lag bei 25 mg/kg/Tag, der Zeitraum der Behandlung betrug 2 Wochen *p≤0.05 versus unbehandelt , [#]p≤0.05 versus Vehikel + L-NAME

Ebenso wie bei den SHR zeigte die immunhistochemische Färbung der Herzschnitte eine deutlich ausgeprägte Hypertrophie der Kardiomyozyten, sowie eine intensive und innerhalb der Kardiomyozyten homogene TLR4-Färbung (Abb. 13 A und 13 B). Auch die zum Teil TLR4-positive perivaskuläre Inflammation war bei den L-NAME-behandelten Tieren stärker sichtbar (Abb. 13 E und 13 F). Unter der therapeutischen Ramipril-Dosis (1 mg/kg/Tag) ging die TLR4-Expression weder in den Kardiomyozyten noch perivaskulär zurück (Abb. 13 C und 13 G), wohingegen Hochdosis-Ramipril zu einem starken Rückgang der TLR4-Färbung in den Herzen auf Kontroll-Niveau führte (Abb. 13 D und 13 H).

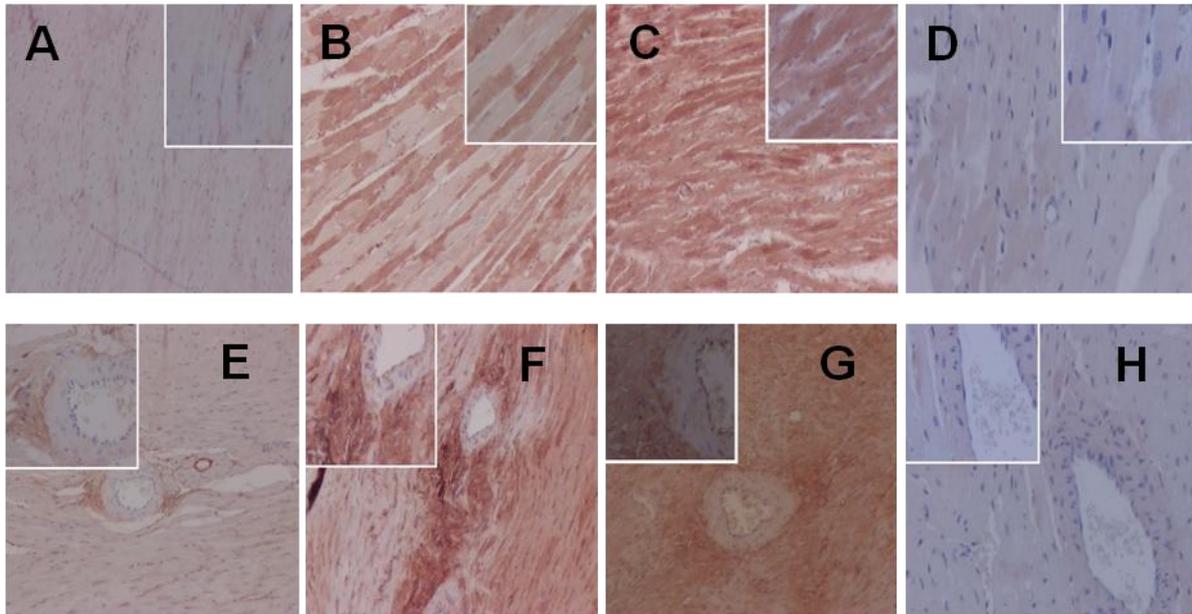


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von TLR4 im Herzen von WKY

Im Vergleich zu unbehandelten WKY (A) zeigten sich nach L-NAME-Behandlung stark hypertrophe, TLR4-positive Kardiomyozyten (B). Unter einer therapeutischen Ramipril-Dosis war kein Rückgang von TLR4 zu sehen (C), unter Hochdosis-Ramipril-Behandlung ging die TLR4-Expression stark zurück (D). Perivaskulär war weniger TLR4 nachzuweisen als in den Kardiomyozyten. Auch hier zeigte sich aber unter L-NAME (F) und L-NAME+Ramipril (1 mg/kg/Tag) (G) eine stärkere Färbung als in den Kontrollen (E). L-NAME mit Hochdosis-Ramipril regulierte die TLR4-Expression auch perivaskulär stark herunter (H).

Western Blot und Real-Time PCR bestätigten die histologischen Daten. Ramipril-Gabe in therapeutischer Dosis (1 mg/kg/Tag) führte nicht zu einem Rückgang von TLR4 auf Proteinebene (Abb.14 A). Dies war auch auf mRNA-Ebene zu sehen, wohingegen Hochdosis-Ramipril (10 mg/kg/Tag) zu einem signifikanten Rückgang von TLR4 führte (Abb. 14 B).

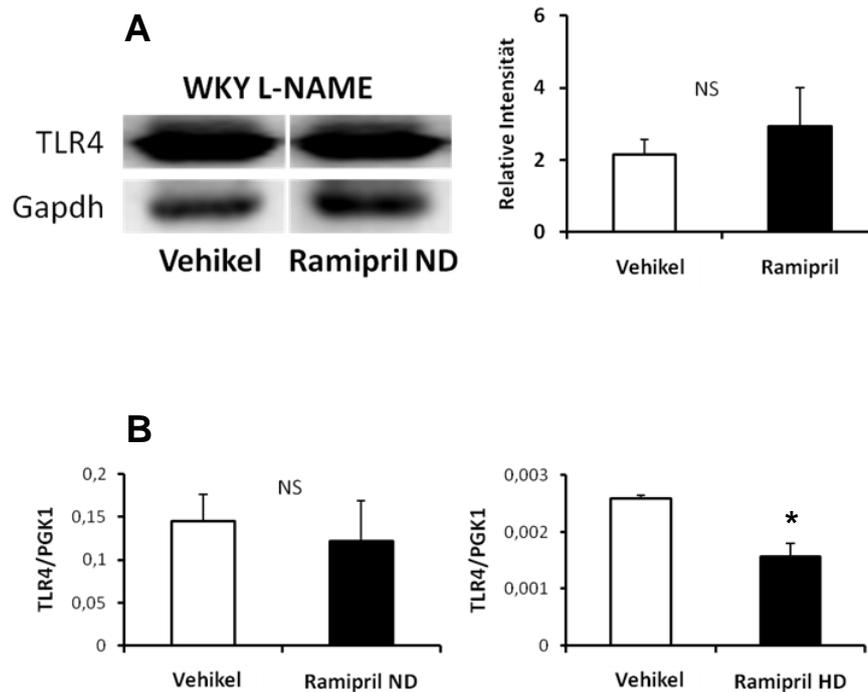


Abbildung 14: TLR4-Expression im Herzen von L-NAME sowie L-NAME- und Ramipril-behandelten WKY

Die WKY wurden mit Vehikel bzw. der therapeutischen Dosis Ramipril (ND=normale Dosis) behandelt. Hier war kein Unterschied zu sehen (A). Auch auf mRNA-Ebene war dies zu erkennen, wohingegen die Hochdosis-Ramipril-Behandlung (HD) zu einer Downregulation von TLR4 führte (B). * $p \leq 0.05$ versus Vehikel

4.1.8 Differenzierung der TLR4-positiven Zellen im Herzen mittels FACS-Analyse

Basierend auf den Ergebnissen aus Immunhistochemie, Western Blot und mRNA-Daten wurde in einem weiteren Experiment eine FACS-Analyse mit dem Herzlysat von SHR durchgeführt. Dies sollte bestätigen, dass nur ein geringer Prozentsatz der kardialen TLR4-positiven Zellen auch CD45-positiv ist. CD45 wurde hierbei als Pan-Leukozytenmarker eingesetzt. Mittels anti-CD45-FITC, anti-TLR4-PE Doppelfärbung konnte gezeigt werden, dass nur sehr wenig CD45-positive Zellen im Herzlysat vorhanden waren (Abb. 15). Die TLR4-Population (blau) (Abb. 15 A) wurde auf die TLR4-positiven Zellen im Histogramm (Abb. 15 B) gated. Abb. 15 C zeigt ein Histogramm derselben Färbung mit einer sehr geringen Zahl an CD45-positiven Zellen. In 3 unabhängigen Experimenten ergab sich, dass 5.1 ± 1.4 % der Herzzellen TLR4-positiv waren, davon 0.3 ± 0 % CD45/TLR4-positiv.

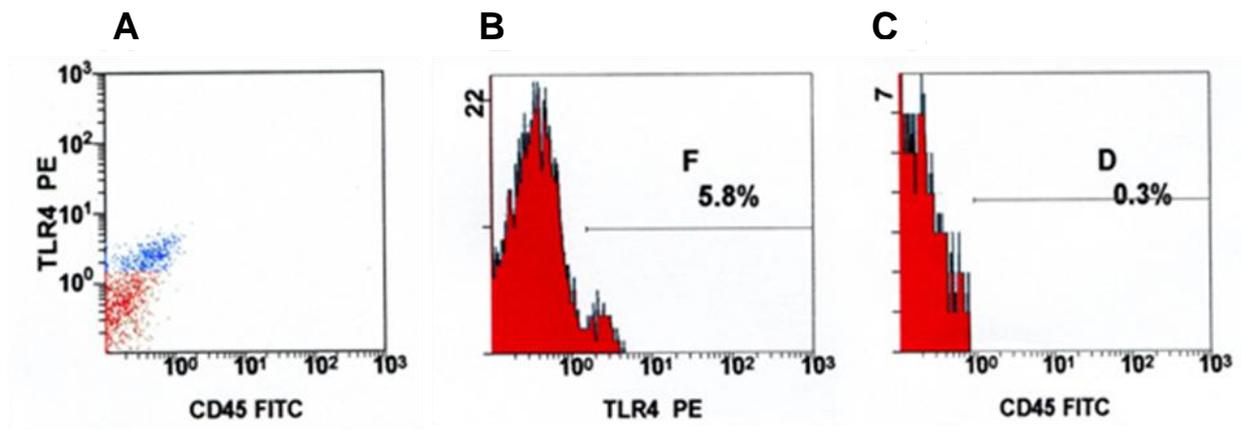


Abbildung 15: Anti-CD45 FITC/ anti-TLR4 PE Doppelfärbung von SHR Herzgewebe nach FACS-Analyse

(A) Die blaue Population ist TLR4-positiv und wurde auf die TLR4-positiven Zellen im Histogramm gated (B).

(C) Das Histogramm derselben Färbung zeigt eine sehr geringe Menge von CD45-positiven Zellen. Als Anteil der TLR4-exprimierenden Zellen im Herzen ergab sich in drei unterschiedlichen Messungen ein Wert von $5.1 \pm 1.4 \%$. $0.3 \pm 0\%$ waren zusätzlich CD45-positiv.

4.2 TLR4 und Gefäßkontraktilität von Widerstandsgefäßen

4.2.1 Überblick

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit dem Einfluss des TLR4 auf die Kontraktilität von Widerstandsgefäßen, d.h. der Verbindung zwischen angeborenem Immunsystem und Mikrozirkulation bzw. der Funktion glatter Muskelzellen und somit auch dem Blutdruck. Auf Basis der Hypothese, dass der TLR4^{-/-} vor der Entwicklung einer Hypertonie geschützt ist, wurde zunächst der Blutdruckverlauf im L-NAME Modell untersucht. Unter L-NAME stieg der mittlere arterielle Blutdruck im WT erwartungsgemäß an, wohingegen er im TLR4^{-/-} stabil blieb. Der basale Blutdruck in unbehandelten WT und TLR4^{-/-} sowie die Kontraktilität auf Noradrenalin und Calcium zeigten hier keinen Unterschied. Unter L-NAME hingegen kontrahierten die Widerstandsgefäße von TLR4^{-/-} signifikant schwächer auf Noradrenalin und Calcium. Im Angiotensin II-Modell stieg der Blutdruck in WT und TLR4^{-/-} gleichermaßen an und im Bezug auf die Gefäßkontraktion war kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu sehen. Histologisch zeigte sich am Herzen eine leichte Zunahme der perivaskulären Inflammation unter L-NAME, allerdings war hierbei kein Quantitätsunterschied bezüglich der entzündlichen Infiltration zwischen WT und TLR4^{-/-} zu erkennen. Das mRNA Expressionsmuster der NADPH-Oxidasen Nox1 bis Nox4 in glatten Muskelzellen von unbehandelten WT-Mäusen zeigte insbesondere eine Expression von Nox4 und damit die Befähigung der VSMC, oxidativen Stress zu erzeugen. Dies ging außerdem mit einer niedrigeren basalen NADPH-Oxidase-Aktivität des TLR4^{-/-} im Vergleich zum WT einher. Oxidativer Stress kann unter anderem zur Oxidation und damit einem Aktivitätsverlust der löslichen Guanylatcylase (sGC) führen, die für die beobachteten Effekte bezüglich der Gefäßkontraktion und Blutdruckentwicklung verantwortlich sein könnte. Eine unterschiedliche mRNA Expression der sGC-Untereinheiten sGC- α und sGC- β konnte mittels RT-PCR ausgeschlossen werden. Mit Hilfe eines cGMP-Immunoassays wurde darauf die cGMP-Produktion in SNP-stimulierten Aorten untersucht. Dabei zeigte sich basal eine höhere sGC-Aktivität des TLR4^{-/-} im Vergleich zum WT. Eine höhere sGC-Aktivität im TLR4^{-/-} war außerdem unter L-NAME zu sehen. Ein unterschiedlicher cGMP-Katabolismus durch die PDE5 in WT und TLR4^{-/-}-Gefäßen lag nicht vor. Um die Bedeutung von oxidativem Stress und eine mögliche Beteiligung der sGC am unterschiedlichen Kontraktionsverhalten von WT und TLR4^{-/-} abschließend zu klären, wurden Mesenterialgefäße von unbehandelten Tieren im Myographen mit dem Peroxidbildner Menadion inkubiert. Dabei stieg die Kontraktilität im WT signifikant an, im TLR4^{-/-} hingegen blieb sie konstant. Im Bezug auf die hämodynamischen Parameter zeigte sich, dass der TLR4^{-/-} ein erniedrigtes Herzgewicht/Körpergewicht, kleinere Kardiomyozyten, mehr Kapillaren im Herzen und ein kleineres Verhältnis von Wanddicke/Lumen der Widerstandsgefäße im Vergleich zum WT hatte.

4.2.2 Blutdruck und Gefäßkontraktilität

Um zunächst eine pathophysiologische Relevanz beim Kontraktionsverhalten der TLR4^{-/-} Widerstandsgefäße zu zeigen, wurde das L-NAME Modell gewählt. L-NAME blockiert die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und wirkt proinflammatorisch (134). Während sich der mittlere Blutdruck in den unbehandelten Tieren nicht unterschied (gemittelter Wert; WT: 102.6±3.0 mmHg, TLR4^{-/-}: 98.9±3.1 mmHg; nicht signifikant), stieg er unter L-NAME-Gabe im WT kontinuierlich an, hingegen war beim TLR4^{-/-} bis auf eine Spitze am ersten Tag der L-NAME-Gabe kein Blutdruckanstieg zu sehen (Abb. 16 A; Endblutdruck (gemittelt über die letzten 3 Behandlungstage) WT vs. TLR4^{-/-}: 114.7±0.8 mmHg vs. 102.3±1.5 mmHg; p≤0.05). Die Herzfrequenz zeigte eine ähnliche Tendenz, blieb aber über den Behandlungszeitraum stabil. Der Unterschied zwischen WT und TLR4^{-/-} war nicht signifikant (Abb. 16 B).

Sowohl die Noradrenalin-induzierte als auch die Calcium-induzierte Kontraktilität war in unbehandelten WT und TLR4^{-/-} Gefäßen identisch (Abb. 17 A und 17 B; Noradrenalin: Endkontraktion WT vs. TLR4^{-/-}: 15.1±0.6 mN/mm vs. 14.8±0.7 mN/mm; Calcium: Endkontraktion WT vs. TLR4^{-/-}: 15.8±0.6 mN/mm vs. 14.8±0.7 mN/mm). Ebenso zeigte sich bei der endothelabhängigen Dilatation auf Acetylcholin in unbehandelten Tieren in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied (Abb. 17 C; maximale Dilatation WT: 52.6±3.9%, TLR4^{-/-}: 44.4±3.8%). Nach zweiwöchiger L-NAME Behandlung hingegen reagierten die Gefäße des TLR4^{-/-} im Vergleich zum WT signifikant schwächer sowohl auf Noradrenalin als auch auf Calcium (Abb. 18 A und 18 B; Noradrenalin: Endkontraktion WT vs. TLR4^{-/-}: 22.5±1.3 mN/mm vs. 16.1±1.2 mN/mm; Calcium: Endkontraktion WT vs. TLR4^{-/-}: 26.6±1.3 mN/mm vs. 20.9±1.2 mN/mm). Im Vergleich zu der unbehandelten Gruppe war die Kontraktion im WT besonders erhöht. Die Dilatation auf Acetylcholin war im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren herabgesetzt, jedoch auch unter L-NAME in WT und TLR4^{-/-} annähernd gleich (Abb. 18 C; maximale Dilatation WT: 37.7±8.1%, TLR4^{-/-}: 37.1±7.3%). Hiermit ließ sich ein Kontraktilitäts- und Blutdruckunterschied allein durch die Pathophysiologie, die sich durch eine L-NAME-Gabe, d.h. durch die Hemmung der eNOS ergibt, ausschließen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Blutdruckunterschied, der sich unter L-NAME-Behandlung zwischen WT und TLR4^{-/-} zeigt, durch eine unterschiedliche Kontraktilität der Widerstandsgefäße vermittelt sein könnte.

Dass der Blutdruck- und Kontraktilitätsunterschied zwischen WT und TLR4^{-/-} tatsächlich L-NAME-spezifisch ist, erklärten die Daten der mit Angiotensin II - behandelten Tiere. Unter Angiotensin II – Infusion stieg der Blutdruck in WT und TLR4^{-/-} gleichermaßen an (Abb. 19 A). Darüber hinaus waren auch die Noradrenalin- und Calcium-abhängige Kontraktion im Vergleich zu den unbehandelten Tieren in beiden Gruppen erhöht, jedoch nicht

unterschiedlich (Abb. 19 B und 19 C; Noradrenalin: Endkontraktion WT vs. TLR4^{-/-}: 19.2±1.5 mN/mm vs. 18.7±1.4 mN/mm; Calcium: Endkontraktion WT vs. TLR4^{-/-}: 21.7±1.9 mN/mm vs. 21.3±1.6 mN/mm).

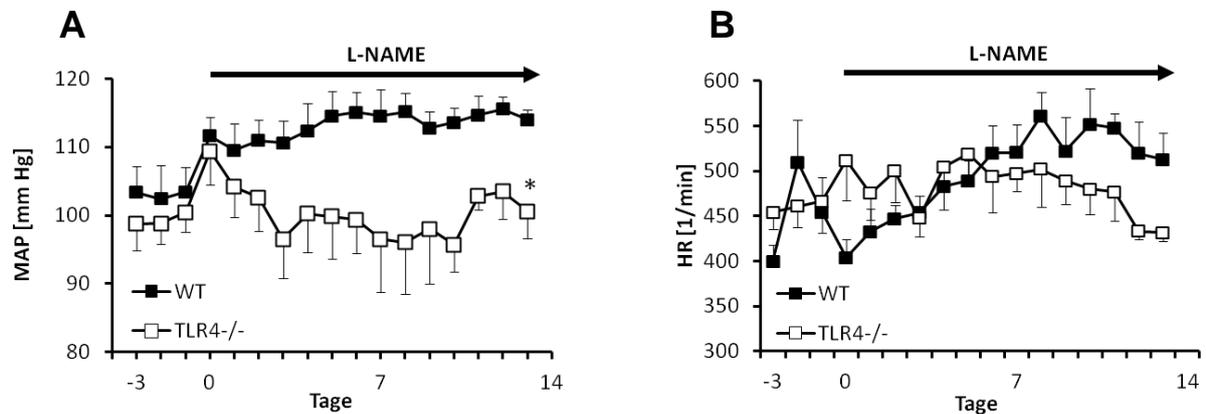


Abbildung 16: Entwicklung von Blutdruck und Herzfrequenz in WT und TLR4^{-/-} unter L-NAME-Behandlung

Im basalen mittleren Blutdruck (MAP) vor Beginn der L-NAME-Behandlung (50 mg/kg/Tag) unterschieden sich WT und TLR4^{-/-} nicht. Unter L-NAME stieg der MAP im WT um ca. 12 mmHg an, im TLR4^{-/-} blieb er konstant (A). Die Herzfrequenz blieb über den Behandlungszeitraum konstant (B) (n=7). *p≤0.05

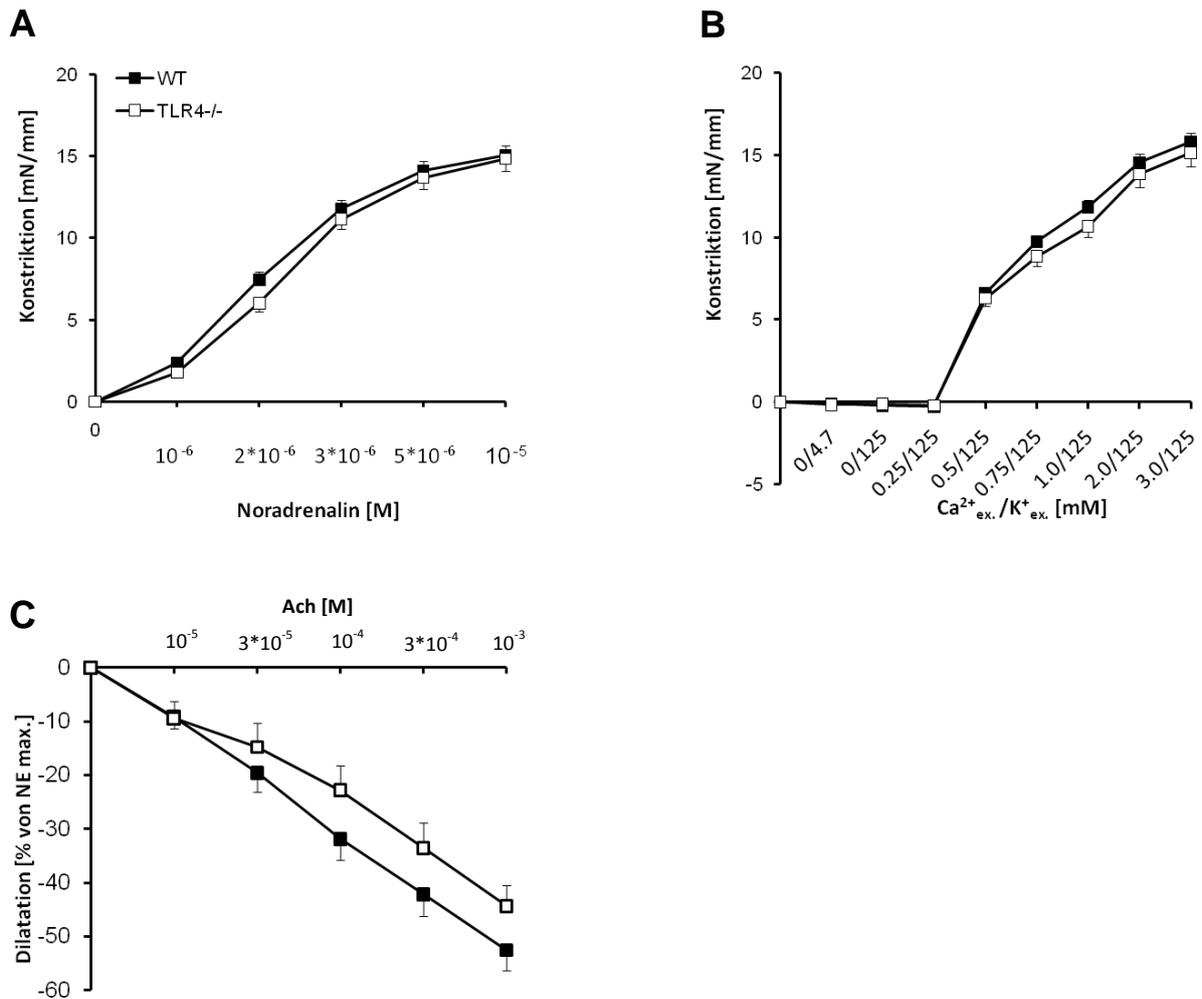


Abbildung 17: Noradrenalin- und Calcium- induzierte Kontraktilität sowie Acetylcholin-abhängige Dilatation in unbehandelten WT und TLR4^{-/-}

Die Noradrenalin-induzierte Kontraktilität (A) und die Calcium-induzierte Kontraktilität (B) der Mesenterialgefäße war in unbehandelten WT und TLR4^{-/-} gleich, ebenso die endothelabhängige Dilatation auf Acetylcholin (C) (n=10).

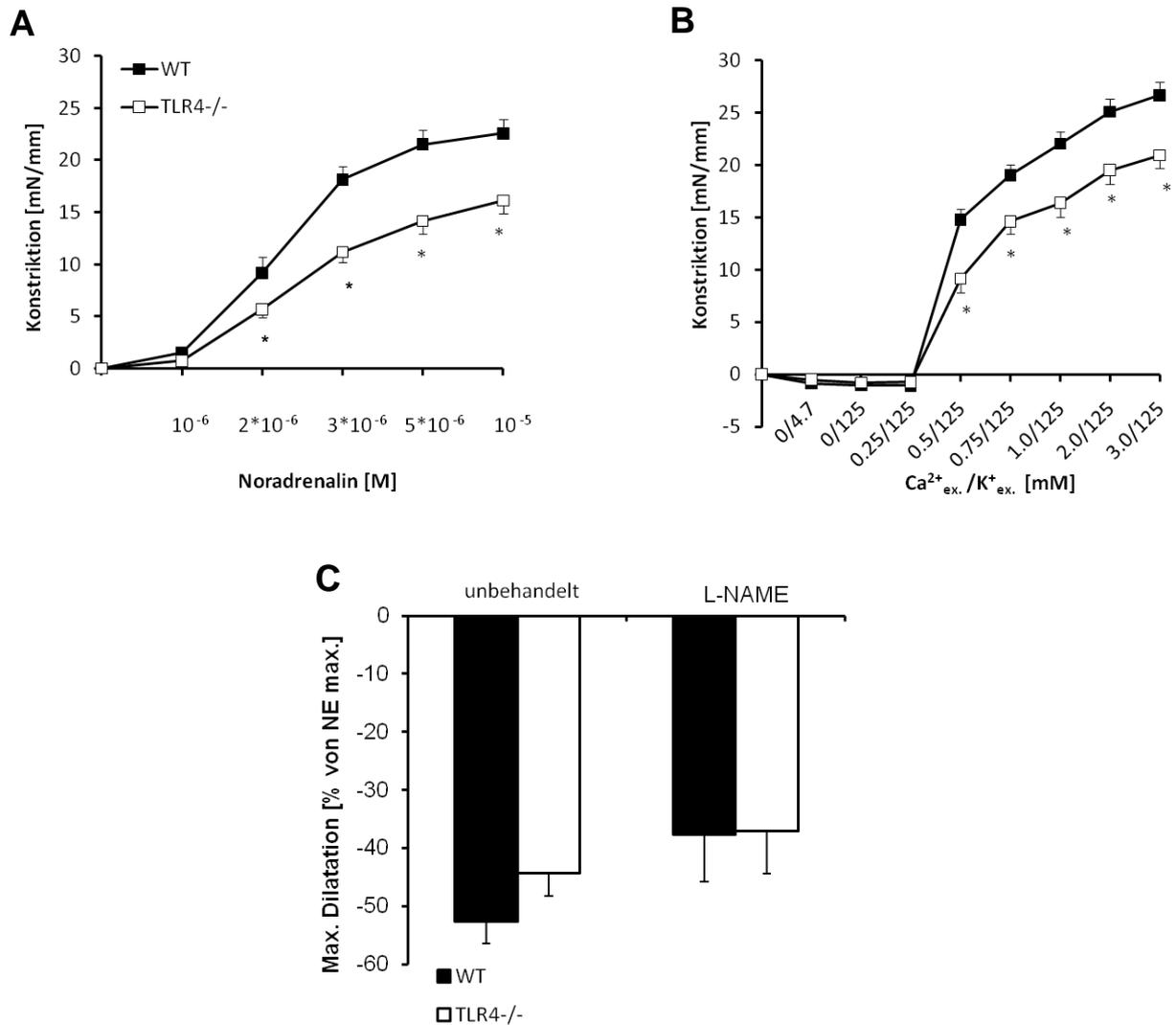


Abbildung 18: Noradrenalin- und Calcium-abhängige Kontraktion in L-NAME-behandelten WT und TLR4^{-/-} sowie Dilatation auf Acetylcholin

Nach L-NAME-Gabe zeigte sich ein Kontraktilitätsunterschied zwischen WT und TLR4^{-/-} sowohl auf Noradrenalin (A) als auch auf Calcium (B). Die Acetylcholin-abhängige Dilatation der Widerstandsgefäße war in WT und TLR4^{-/-} in unbehandelten Tieren und auch unter L-NAME identisch (C) (n=10). *p≤0.05

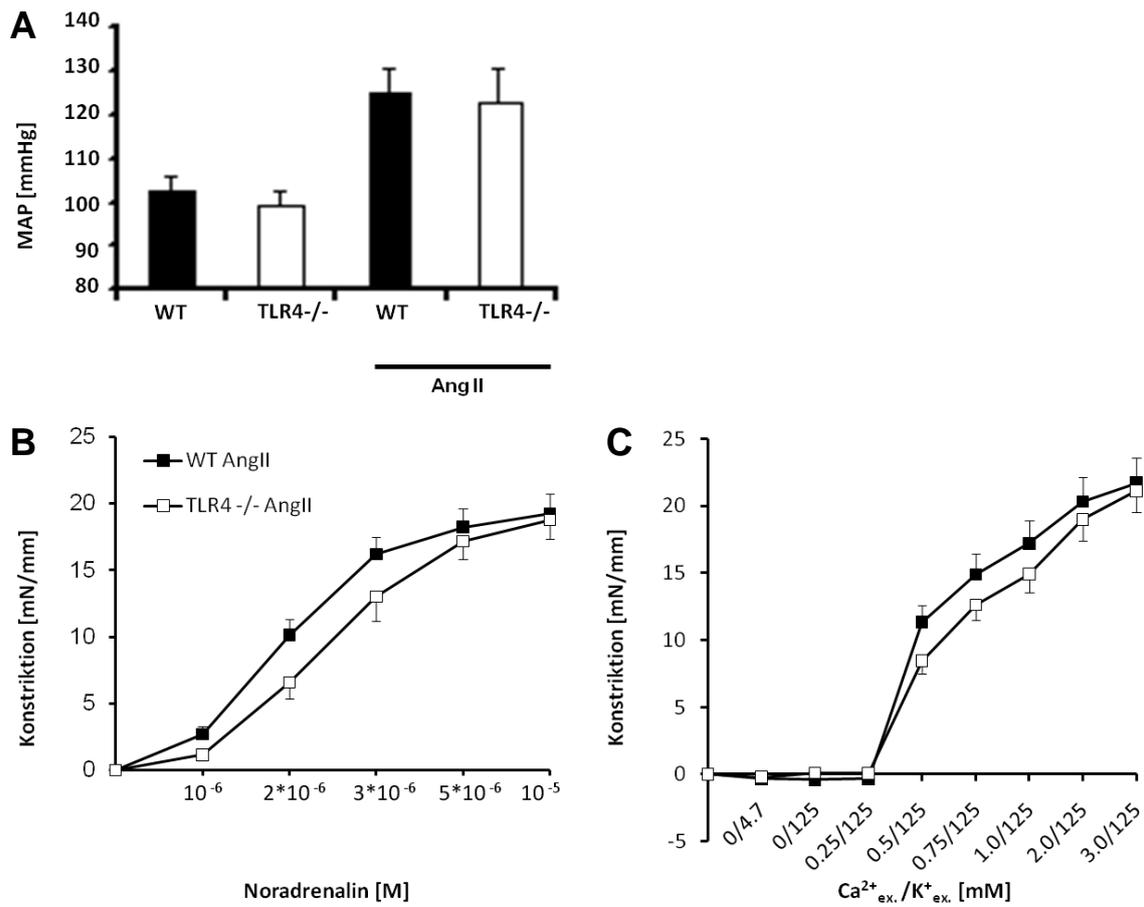


Abbildung 19: Blutdruck und Gefäßkontraktilität unter Angiotensin II in WT und TLR4^{-/-}

Nach Angiotensin II-Infusion zeigte sich kein Blutdruckunterschied zwischen WT und TLR4^{-/-}. Darstellung im Vergleich zur unbehandelten Gruppe (A). Auch die Noradrenalin- und Calcium-induzierte Kontraktion war in beiden Gruppen gleich (B und C) (n=10).

4.2.3 L-NAME-induzierte perivaskuläre Inflammation

Hämatoxylin-Eosin gefärbte Herzschnitte von unbehandelten und L-NAME behandelten WT und TLR4^{-/-} zeigten eine verstärkte perivaskuläre Inflammation nach 2-wöchiger L-NAME-Gabe in beiden Gruppen. Dabei ergab sich allerdings kein Unterschied im entzündlichen Infiltrat zwischen WT und TLR4^{-/-} (Abb. 20). Deshalb wurde angenommen, dass der beobachtete Blutdruck- und Kontraktilitätsunterschied im TLR4-Signalweg der glatten Muskelzellen begründet sein könnte.

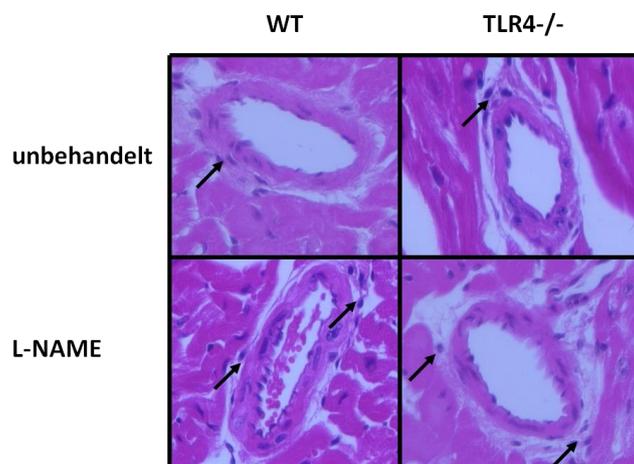


Abbildung 20: Perivaskuläre Inflammation im Herzen von WT und TLR4^{-/-}

Die HE-gefärbten Herzschnitte zeigen das entzündliche Infiltrat in unbehandelten und L-NAME behandelten WT und TLR4^{-/-}.

4.2.4 TLR4 und oxidativer Stress in glatten Muskelzellen

Um einen Zusammenhang zwischen dem Verhalten des TLR4^{-/-} und oxidativem Stress herzustellen, wurde in unstimulierten glatten Muskelzellen von WT und TLR4^{-/-} eine Bestimmung der Superoxid-Anionen-Konzentration durchgeführt. Dabei ergab sich eine signifikant geringere basale ROS-Produktion im TLR4^{-/-} (Abb. 21 A). Zudem wurde in glatten Muskelzellen geprüft, ob ein Expressionsmuster für oxidativen Stress vorhanden ist. Dafür wurde die mRNA Expression der NADPH - Oxidasen Nox1 bis Nox4 in glatten Muskelzellen des WT ermittelt. Nox1 wurde nicht nachweisbar exprimiert, am stärksten war die Expression von Nox4 (Abb. 21 B).

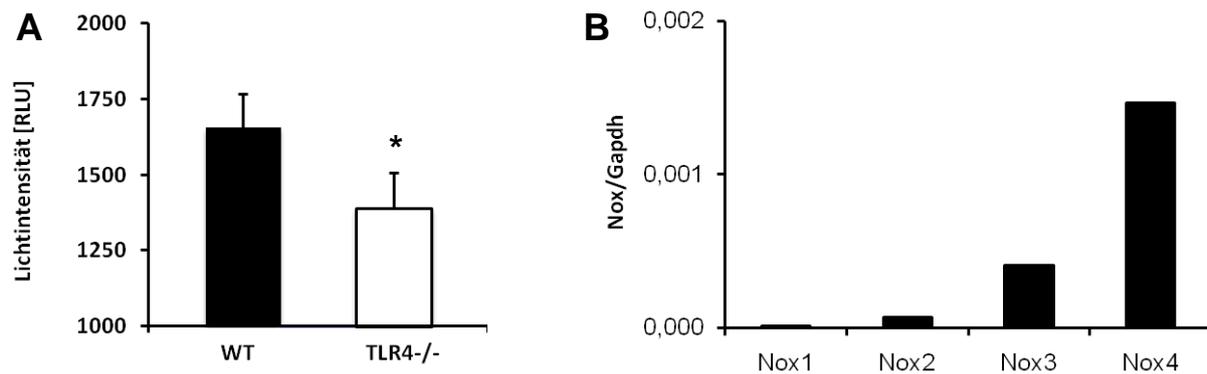


Abbildung 21: Oxidativer Stress in WT und TLR4^{-/-}

(A) Bestimmung der Superoxid-Anionen Konzentration in unstimulierten glatten Muskelzellen von WT und TLR4^{-/-}. Dargestellt ist die basale ROS Reaktivität, die nach 60 min aufgezeichnet wurde (RLU, relative light units) (n=4).

(B) mRNA Expression der NADPH-Oxidasen Nox1 – Nox4 in glatten Muskelzellen von WT (repräsentativ für drei unabhängige Versuche) *p≤0.05

4.2.5 TLR4 und Aktivität der sGC

Da einerseits die Kontraktilität der TLR4^{-/-} Gefäße in den L-NAME behandelten Tieren im Vergleich zum WT erniedrigt war und sich andererseits oxidativer Stress auch auf die Funktion der sGC auswirken kann, wurde in einem cGMP Immunoassay die sGC-Aktivität in Aorten von WT und TLR4^{-/-} untersucht. Dieser Versuch wurde zunächst in unbehandelten WT und TLR4^{-/-} durchgeführt. Die basale cGMP-Produktion war im TLR4^{-/-} ca. um das 1,5-fache im Vergleich zum WT erhöht (Abb. 22 A). Eine erhöhte sGC-Aktivität des TLR4^{-/-} im Vergleich zum WT war auch in den L-NAME-behandelten Tieren zu sehen (Abb. 22 B). Weil ein höherer cGMP Spiegel nach NO-Stimulation auch indirekt durch einen verminderten cGMP-Abbau, insbesondere durch die PDE5, bedingt sein könnte, wurde ebenfalls auf einen unterschiedlichen cGMP-Katabolismus geprüft. Dies wurde mit Hilfe einer Dosis-Wirkungs-Kurve mit dem PDE-Inhibitor IBMX an maximal Calcium-vorkontrahierten Gefäßen (3 mM Ca²⁺) durchgeführt. WT und TLR4^{-/-} Gefäße dilatierten gleich gut auf IBMX (Abb. 22 C). Damit ließ sich ein unterschiedlicher cGMP-Abbau in WT und TLR4^{-/-} ausschließen.

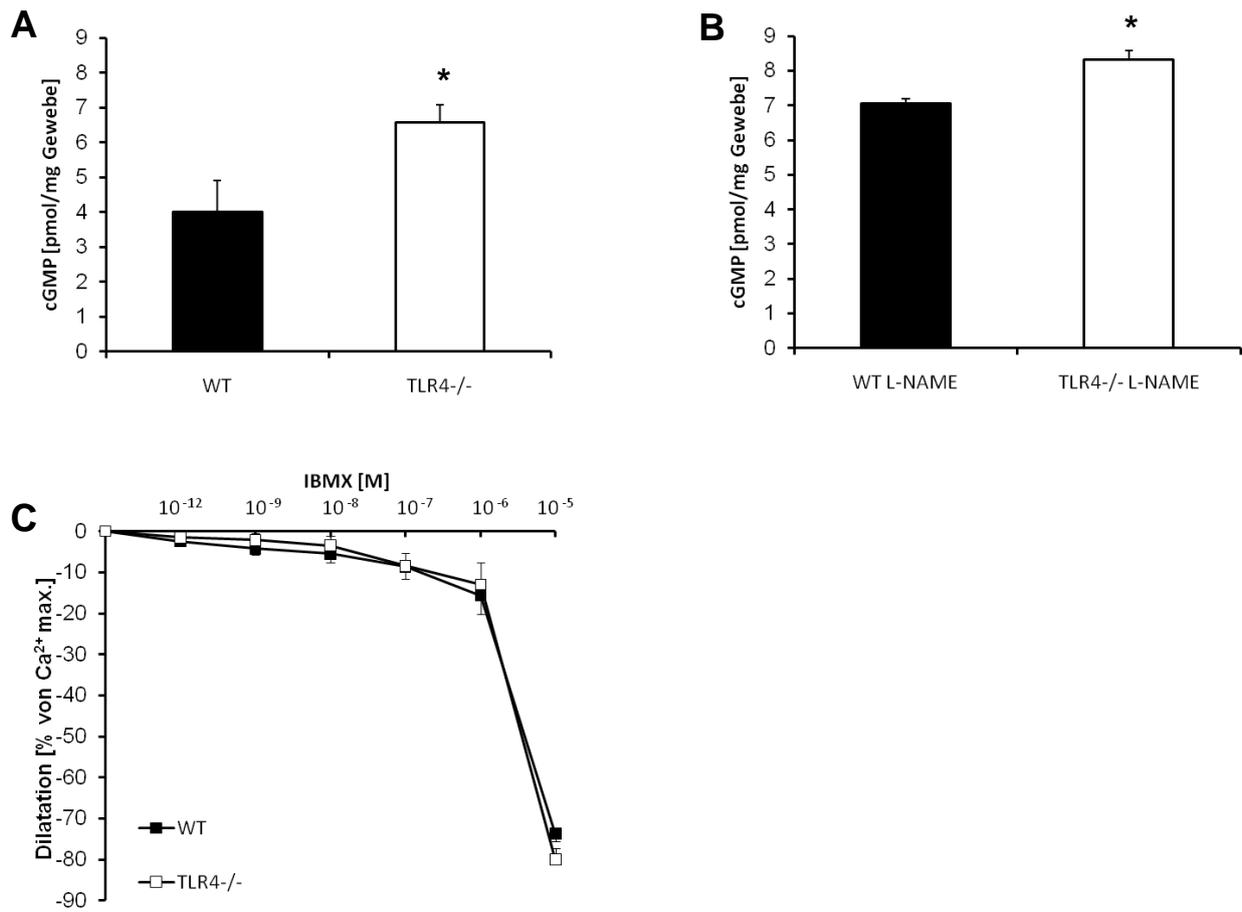


Abbildung 22: sGC-Aktivität im WT und TLR4^{-/-}

Bestimmung der sGC-Aktivität über die cGMP-Produktion von Aorten nach SNP-Stimulation und Ausschluss eines unterschiedlichen cGMP Katabolismus in WT und TLR4^{-/-}.

(A) In unbehandelten TLR4^{-/-} wurde nach SNP-Inkubation mehr cGMP gebildet als in den WT (n=4).

(B) Auch nach 14-tägiger L-NAME-Gabe war die sGC Aktivität im TLR4^{-/-} im Vergleich zur Kontrolle erhöht (n=4).

(C) Die Dilatation vorkontrahierter Gefäße (3 mM Ca²⁺) auf den PDE-Inhibitor IBMX zeigte einen gleichen Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurven für WT und TLR4^{-/-} (n=5). *p≤0.05

4.2.6 Einfluss von oxidativem Stress auf die Kontraktilität von Widerstandsgefäßen im Wildtyp und TLR4^{-/-}

Dass das Einwirken von oxidativem Stress tatsächlich einen Einfluss auf die Aktivität der sGC und damit auch auf die Kontraktilität der Widerstandsgefäße in WT und TLR4^{-/-} haben könnte, zeigten Myograph-Experimente mit dem Peroxidbildner Menadion. Dabei wurde die Calcium-abhängige Kontraktilität vor und nach Inkubation mit Menadion (10 μ M, 20 min) untersucht. Bei den WT Gefäßen nahm die Gefäßkontraktilität nach Stimulation signifikant zu, wohingegen im TLR4^{-/-} keine Änderung im Kontraktionsverhalten beobachtet wurde (Abb. 23).

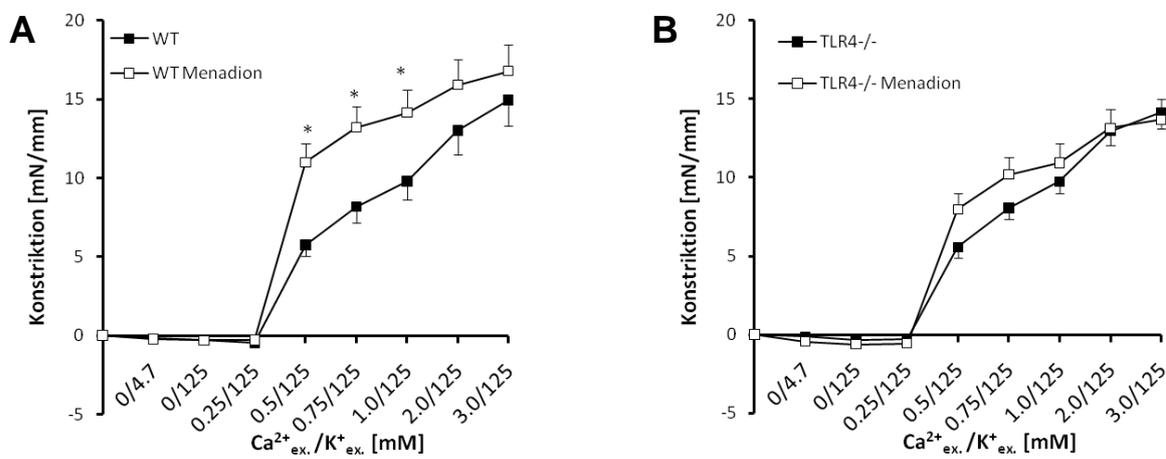


Abbildung 23: Calcium-induzierte Kontraktilität im WT und TLR4^{-/-} vor und nach Inkubation mit Menadion

(A) Nach Inkubation der Widerstandsgefäße mit Menadion (10 μ M, 20 min) in vitro zeigte sich im WT eine signifikante Steigerung der Kontraktilität.

(B) Im TLR4^{-/-} blieb die Gefäßkontraktilität konstant (n=10).

4.2.7 Hämodynamische Parameter

In der unbehandelten Gruppe zeigten die TLR4^{-/-} Tiere ein signifikant niedrigeres Herzgewicht/Körpergewicht im Vergleich zum WT (WT: 5.1 ± 0.4 g/kg, TLR4^{-/-}: 4.3 ± 0.6 g/kg; p≤0.05). Dies resultierte aus einer geringeren Größe der Kardiomyozyten (WT: 8884 ± 1385.2 Einheiten, TLR4^{-/-}: 7297.1 ± 1277.4 Einheiten; p≤0.05). Zudem war die Kapillardichte im Herzen der TLR4^{-/-} Tiere erhöht (WT: 27.3 ± 2.2, TLR4^{-/-}: 39.5 ± 7.1; p≤0.05), was zu einem größeren Wert für das Verhältnis von Kapillaren/Kardiomyozyt führte (WT: 2.5 ± 0.4, TLR4^{-/-}: 3.0 ± 0.6; p≤0.05). Die Mesenterialgefäße des TLR4^{-/-} hatten ein signifikant niedrigeres Wand/Lumen-Verhältnis im Vergleich zum WT (WT: 0.136 ± 0.044, TLR4^{-/-}: 0.067 ± 0.031; p≤0.05) (Tabelle 8).

Auch nach L-NAME-Behandlung war das Herzgewicht/Körpergewicht der TLR4^{-/-} niedriger als in den Kontrollen (WT: 4.6 ± 0.21 g/kg, TLR4^{-/-}: 4.1 ± 0.31 g/kg; p≤0.05), ebenso das Wand/Lumen-Verhältnis (WT: 0.36 ± 0.09, TLR4^{-/-}: 0.22 ± 0.05; p≤0.05). Nach Angiotensin II-Behandlung unterschied sich hingegen nur das Herzgewicht/Körpergewicht, nicht jedoch das Verhältnis von Wand-/Innendurchmesser (HW/BW, WT: 6.3 ± 0.72 g/kg, TLR4^{-/-}: 5.2 ± 0.56 g/kg; p≤0.05; Wand/Lumen, WT: 0.26 ± 0.04, TLR4^{-/-}: 0.24 ± 0.08; nicht signifikant).

	Herz (n=10)				Mesenterialgefäße (n=5)
	HW/BW [g/kg]	Kardiomyozytengröße [Einheiten]	Kapillaren [pro Bild]	Kapillaren/ Kardiomyozyt	Wand-/ Innendurchmesser
WT	5.1 ± 0.4	8884 ± 1385.2	27.3 ± 2.2	2.5 ± 0.4	0.136 ± 0.044
TLR4^{-/-}	4.3 ± 0.6*	7297.1 ± 1277.4*	39.5 ± 7.1*	3.0 ± 0.6*	0.067 ± 0.031*

Tabelle 8: Histologische Auswertung des Herzens und der Mesenterialgefäße in unbehandelten WT und TLR4^{-/-}

Das kleinere Herzgewicht im TLR4^{-/-} ergab sich aus einer kleineren Kardiomyozytengröße. Die Kapillardichte war im TLR4^{-/-} erhöht, dies führte zu einer größeren Anzahl der einen Kardiomyozyten versorgenden Gefäße. Das Verhältnis von Wanddicke/Innendurchmesser war im TLR4^{-/-} erniedrigt. HW/BW (Herzgewicht/Körpergewicht); angegeben ist ± SD.

5. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen zunächst, dass manifester Bluthochdruck mit einer erhöhten TLR4-Expression in hypertrophen Kardiomyozyten einhergeht. Eine Analyse des Zeitverlaufes der TLR4-Expression zeigte außerdem, dass die Hochregulierung des Rezeptors bereits mit dem Beginn eines pathologischen Hochdrucks auftritt. Darüber hinaus weisen die Daten der *in vitro* Stimulation von Herzzellen mit dem endogenen TLR4-Liganden Heparansulfat auch auf eine erhöhte TLR4-Aktivität bei Hypertonie hin. Überraschenderweise ging die Senkung des Blutdrucks mit der therapeutischen Dosis eines ACE-Hemmers nicht mit einem Rückgang der kardialen TLR4-Expression einher. Dieser Effekt ließ sich erst bei einer vielfach höheren Dosis beobachten.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Rolle des TLR4 bei der Kontraktionsregulation von Widerstandsgefäßen und der Entstehung von Bluthochdruck untersucht. Dabei ließ sich beobachten, dass TLR4^{-/-} Tiere vor der Entwicklung eines L-NAME-induzierten Hochdrucks geschützt sind und dass dieser Effekt möglicherweise auf einer erniedrigten Kontraktilität der Gefäße beruht. Außerdem konnte hier eine Beteiligung der sGC, einem Schlüsselenzym bei der Modulation des kontraktiven Apparates in glatten Muskelzellen, und ein Zusammenhang zwischen TLR4 und oxidativem Stress nachgewiesen werden. Schließlich gingen die Eigenschaften des TLR4^{-/-} bezüglich der Gefäßkontraktilität sowie der Hochdruckentwicklung auch mit vorteilhaften hämodynamischen Charakteristika einher.

Literaturdaten belegen, dass insbesondere TLR4 als Bestandteil des angeborenen Immunsystems mit kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden kann. Der Rezeptor wird nach einem Myokardinfarkt in Mäusen verstärkt exprimiert (36) und trägt über die Produktion inflammatorischer Zytokine und über Matrixdegradation zur Entstehung einer Herzhypertrophie bei (135). Es konnte auch gezeigt werden, dass ein eingeschränkt funktionsfähiges TLR4-Gen beim Menschen ein geringeres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen nach sich zieht (52, 53). Die Entstehung von Bluthochdruck wird überdies mit entzündlichen Prozessen in Zusammenhang gebracht (102, 103, 136) und TLR4-Knockout Tiere weisen weniger Schäden in experimentellen Ischämie/Reperfusion-Modellen an Niere und Herz auf als Kontrolltiere (36, 137, 138).

Essentiell für die Blutdruckregulation ist die Kontraktion und Relaxation glatter Muskelzellen in den Widerstandsgefäßen. So zieht hier eine veränderte Funktion, d.h. eine gesteigerte Kontraktilität bzw. eine verminderte Relaxationsfähigkeit, hypertensive Komplikationen wie Herzinfarkt, Schlaganfall und Nierenversagen nach sich (11). Die Kontraktion glatter

Muskelzellen wird durch den kontraktilen Apparat um die Myosin-Leichtkette (MLC-20) gesteuert, deren Phosphorylierungsgrad über die MLCP und die MLCK reguliert wird. Die Aktivität der MLCP kann hierbei durch kleine GTPasen wie RhoA herabgesetzt werden, was zu einer Gefäßkontraktion führt (64). Auf der anderen Seite kann Stickstoffmonoxid (NO), welches z.B. in den Endothelzellen gebildet wird, über die lösliche Guanylatcyclase (sGC) und die Bildung des sekundären Botenstoffes cGMP zu einer MLCP-Aktivierung und damit zu einer Gefäßrelaxation führen (68, 139).

Ziel der Arbeit war es, die TLR4 Expression und Aktivität und damit die Bedeutung des angeborenen Immunsystems bei der Entstehung von Bluthochdruck zu untersuchen und eine Verbindung von TLR4 und Mikrozirkulation, d.h. der Funktion glatter Muskelzellen und der Kontraktilität von Widerstandsgefäßen, zu zeigen.

5.1 Expression und Aktivität von TLR4 bei Bluthochdruck

Immunhistochemisch konnte gezeigt werden, dass die TLR4-Expression im Herzen von erwachsenen SHR sowie im L-NAME Modell bei WKY, d.h. bei manifestem Bluthochdruck, im Vergleich zu normotensiven WKY erhöht war. TLR4 war dabei in beiden Hochdruckmodellen v.a. in den Kardiomyozyten lokalisiert und nur zu einem geringeren Anteil in den infiltrierenden Zellen. Die Färbung der hypertrophen Kardiomyozyten war uneinheitlich über den Gewebequerschnitt verteilt, innerhalb des Zytoplasmas jedoch homogen und intensiv ausgeprägt. Die Befähigung von Kardiomyozyten TLR4-positiv zu werden, wurde zuerst von Frantz et al. am Beispiel des Myokardinfarktes in der Maus beschrieben (36). Er beobachtete hier ebenfalls eine diffuse TLR4-Färbung von Kardiomyozyten, die zum Teil entfernt vom Infarktgebiet auftrat. Auch in Herzschnitten von Patienten mit fortgeschrittener Kardiomyopathie konnte er eine intensive TLR4-Expression von Kardiomyozyten zeigen. Die erhöhte TLR4-Expression in den geschädigten Herzen war hier an eine deutliche Hypertrophie der Kardiomyozyten gekoppelt. Dies bedeutet, dass eine pathologische Vergrößerung der Herzmuskelzellen mit einer TLR4-Hochregulierung einhergehen könnte. Zudem wurde eine proinflammatorische Wirkungsweise von TLR4 für glatte Muskelzellen in atherosklerotischen Koronararterien beschrieben (140). Es existierten jedoch bisher keine Daten zur Entwicklung der TLR4 - Expression bei Bluthochdruck.

Die durchgeführten Western Blots zeigten einen klaren Zeitverlauf der TLR4-Proteinexpression im Herzen bei der Entwicklung einer Hypertonie. Während in jungen, prehypertensiven Ratten kein Unterschied zwischen WKY und SHR gesehen wurde, war die

TLR4-Expression in acht Wochen alten SHR bereits stärker ausgeprägt als in den Kontrolltieren und blieb in Übereinstimmung mit den immunhistochemischen Daten auch bei manifestem Hochdruck bestehen. SHR entwickeln zwischen der fünften und achten Lebenswoche einen spontanen Hochdruck (141). Im L-NAME Modell erfolgte die Hochdruckinduktion über einen Zeitraum von zwei Wochen. Auffällig ist also, dass offenbar nur eine kurze Phase von zwei bis drei Wochen mit erhöhtem Blutdruck notwendig war, um zu einer TLR4-Überexpression zu führen.

Schon in einem sehr frühen Stadium der Hochdruckentwicklung werden inflammatorische Prozesse in Gang gesetzt. Dabei spielen eine verstärkte NF- κ B-Aktivierung und vermehrter oxidativer Stress eine wichtige Rolle. So sind adoleszente SHR bereits anfällig für oxidativen Stress, während prehypertensive Tiere noch kaum reaktive Sauerstoffradikale (ROS) bilden (86). Die Aktivität der Glutathionperoxidase (GPx), welche vor oxidativem Stress schützt, ist beispielsweise ab der achten Lebenswoche in den Nieren von SHR verringert (87). Auch eine signifikante Herzhypertrophie, die mit einer Aktivierung des kardialen Endothelinsystems einhergeht, wird erstmals in dieser Zeitspanne sichtbar (142). Die erhöhte kardiale TLR4-Expression scheint genau in diesen Zeitraum zu fallen. Dabei wurde jedoch auf mRNA Ebene kein Zusammenhang zu den inflammatorischen Markern TNF- α , IL-6 und MCP-1 *in vivo* gefunden; diese wurden in WKY und SHR gleich stark exprimiert. Ebenso zeigte sich in SHR keine messbare Zunahme von TNF- α auf Proteinebene im Herzgewebe mit zunehmendem Alter. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen der *in vitro* Stimulation von SHR Herzzellen mit Heparansulfat. Durch die unterschwellige, chronische Entzündung bei Bluthochdruck werden Zellen und Gewebe geschädigt und dadurch Substanzen freigesetzt, die als endogene TLR4-Liganden zählen (28, 143). Dazu gehört neben den Hitzeschockproteinen HSP60 und HSP70 (29), Fibronectin (32), Hyaluronsäure (144), Fibrinogen und HMGB1 (high-mobility-group box 1) (145) auch Heparansulfat, mit welchem die Zellen von acht Wochen alten WKY und SHR inkubiert wurden um einen ausgeprägten Gewebeschaden zu simulieren (30). Die proinflammatorische Antwort im Hinblick auf die mRNA-Expression von TNF- α und IL-6 war in den SHR signifikant stärker als in den WKY. Dies deutet darauf hin, dass TLR4 in den SHR eine stärkere Entzündungsreaktion auslösen kann, wenn beispielsweise nach einer längeren Phase mit erhöhtem Blutdruck auch ein Gewebeschaden ausgelöst und endogene TLR4-Liganden freigesetzt werden. Es ist ein sich ständig selbst verstärkender Prozess vorstellbar, bei dem fortgeschrittener Hochdruck zu Gewebeschaden, zu einem höheren Spiegel an zirkulierenden TLR-Liganden und somit zu einer Verstärkung der Symptome, Entzündung und zu massiven Schäden am Herzen führt. Den Zusammenhang zwischen TLR4, oxidativem Stress und DAMPs als endogene TLR4-Liganden belegen auch Daten von Tsung

et al. Diese zeigen, dass der TLR4-Signalweg in einem Ischämie/Reperfusion-Modell für die Produktion von ROS und die Freisetzung von HMGB1 als TLR4-Ligand erforderlich ist (145).

Zwischen SHR und WKY gab es weder *in vitro* noch *in vivo* einen Unterschied in der MCP-1 Expression. MCP-1 veranlasst Monozyten dazu, die Blutbahn zu verlassen, in Gewebe einzudringen und sich zu Makrophagen zu differenzieren. Die gleich starke Expression von MCP-1 in WKY und SHR unterstützt die These, dass es tatsächlich die Kardiomyozyten und nicht die Immunzellen sind, die im Herzen TLR4 exprimieren und zur Ausbildung von Bluthochdruck beitragen. Untermauert wurde dieser Befund durch die Tatsache, dass die Milz im Western Blot keine erhöhte TLR4-Dichte in 16 Wochen alten SHR zeigte. Zudem ergab sich durch FACS-Analyse, dass nur ein Bruchteil der TLR4-positiven Zellen im Herzen gleichzeitig den Leukozytenmarker CD45 trug. Dass sich *in vitro* mit Heparansulfat eine ausgeprägte Entzündungsreaktion in Herzzellen von SHR auslösen ließ, *in vivo* aber keine verstärkte Entzündung (TNF- α , IL-6) beobachtet werden konnte, führt zu der Annahme, dass nur hohe Dosen eines TLR4-Liganden die inflammatorische Antwort nach sich ziehen. Bei der Entwicklung von Bluthochdruck in SHR bis zum Alter von 16 Wochen liegt vermutlich eine unterschwellige, sich chronifizierende Entzündungsreaktion mit einem normalen Zytokin-Expressionsmuster im Herzen vor.

Dass Hypertonie mit inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht wird, die auf lange Sicht zu Endorganschäden wie Herzhypertrophie und Herzversagen beitragen, ist ausreichend belegt. Heyen et al. konnten zeigen, dass SHHF (Spontaneously hypertensive heart failure-prone rats) als Modell für die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz, mit steigendem Blutdruck einen zunehmenden Verlust der Herzfunktion aufwiesen. Dieser charakterisierte sich durch ein herabgesetztes Ejektionsvolumen und eine Zunahme der linksventrikulären Masse. Diese funktionellen und strukturellen Veränderungen waren mit erhöhten Spiegeln an zirkulierenden inflammatorischen Markern wie TNF- α und IL-6 verbunden (146). Auch Bergman et al. beobachteten einen Zusammenhang zwischen der TNF- α Sekretion im Herzen und dem pathologisch erhöhten Bluthochdruck in sechs Monate alten hypertensiven Ratten (147). Diese Zusammenhänge finden ihre therapeutische Konsequenz im Einsatz antihypertensiver und gleichzeitig antiinflammatorischer Substanzen wie z.B. Blockern des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) (110, 148). Es stellte sich demnach die Frage, ob der Einsatz eines ACE-Hemmers die durch den Hochdruck verstärkte TLR4-Expression im Herzen rückgängig machen kann. Trotz einer signifikanten Blutdrucksenkung auf Kontrollniveau mit der therapeutischen Dosis von 1 mg/kg/Tag Ramipril ergab sich im L-NAME Modell keine Veränderung im TLR4-Expressionsmuster. Dies steht im Kontrast zu den *in vitro* Studien von Lv et al., bei welchen nach RAS-Blockade mit einer therapeutischen

Dosis des AT₁-Antagonisten Candesartan eine Reduktion der Angiotensin II-induzierten TLR4-Expression in Mesangialzellen nachgewiesen wurde (149). Allerdings zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass eine ultrahohe Dosis von 10 mg/kg/Tag Ramipril sowohl im SHR- als auch im L-NAME-Modell zu einem Rückgang der TLR4-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene führte. Demnach könnte es sich hier um einen Dosis-Effekt handeln. Die Downregulation von TLR4 im Herzen kann dabei nicht allein auf der Erniedrigung des Blutdrucks beruhen, da nur mit einer Dosis, die um ein Vielfaches über der therapeutischen Konzentration lag, ein TLR4 Rückgang zu sehen war. Dies war zudem nicht mit einer Abnahme von TNF- α und MCP-1 verbunden. Dosis-Effekte sind in der Literatur mehrfach beschrieben. Ji et al. zeigten, dass der lipidsenkende Stoff Fenofibrat einen direkten Einfluss auf die TLR4-Expression in Makrophagen hat und die Angiotensin II-induzierte mRNA- und Proteinexpression von TLR4 konzentrationsabhängig beeinflusst (150). Burgess wies einen Vorteil von ultrahohen Candesartan-Dosen bei proteinurischen Nierenerkrankungen nach (151). In diesem Zusammenhang ist ein direkter Effekt eines ACE-Hemmers auf TLR4 denkbar. Eine Möglichkeit dieses Wirkprinzips besser zu testen wäre der *in vivo* Einsatz von TLR4-Antikörpern bzw. TLR4-Blockern. Einige Substanzen wie Eritoran (E5564), und CRX-526 werden bei Sepsis und entzündlichen Darmerkrankungen getestet und zeigen vielversprechende Ergebnisse (115, 152, 153). Allerdings ist die benötigte Menge an Antikörper für eine zweiwöchige Behandlung von Ratten sehr hoch. Dieser Versuch war deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchführbar. In Zukunft könnte der Einfluss von TLR4-Blockern auf den Blutdruck auch an hypertensiven Mäusen getestet werden, um so eine direkte Verbindung zwischen der Entstehung von Hypertonie und dem angeborenen Immunsystem aufzuzeigen.

5.2 Mikrozirkulation und Einfluss von TLR4 auf die Kontraktilität von Widerstandsgefäßen

Zahlreiche Studien beschreiben, dass kardiovaskuläre Erkrankungen nicht nur mit chronisch entzündlichen Prozessen einhergehen, sondern auch durch eine funktionell und strukturell veränderte Mikrozirkulation charakterisiert werden (154, 155). Diese kennzeichnet sich durch eine Zunahme der Wand/Lumen-Dicke und eine arterielle bzw. kapillare Rarifizierung (114). Die Mikrozirkulation ist so bedeutend, da sich kardiovaskuläre Erkrankungen – insbesondere entzündliche Prozesse – als erstes hier manifestieren (114). Den hohen Stellenwert der Mikrozirkulation beweist auch die Entwicklung zahlreicher neuer Methoden zur Bestimmung der Struktur und Funktion von Mikrogefäßen (156).

Inflammationsmarker für das Auftreten einer koronaren Herzkrankheit und eines Myokardinfarktes, d.h. die Folgen einer pathologisch veränderten Mikrozirkulation, sind beispielsweise das C-reaktive Protein (CRP), IL-6 und das Verhältnis von Gesamtcholesterin zu HDL (high density lipoprotein) -Cholesterin (157). So leitet Hypercholesterinämie eine inflammatorische Antwort in den kleinen Blutgefäßen ein, die durch Endothelaktivierung sowie Leukozyten- und Plättchenadhäsion charakterisiert ist (158, 159). Dadurch kann es zum Verstopfen des kapillaren Netzwerkes und zu einer herabgesetzten Perfusion der Kapillaren kommen (160). Wichtig im Zusammenhang mit der Mikrozirkulation und dem angeborenen Immunsystem ist auch ein erhöhter Plasmaspiegel von MRP-8/14 (Myeloid related protein 8/14), einem Protein, das Entzündungsprozesse zum Teil über die Aktivierung von TLR4 steuert und mit dem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse verknüpft ist, indem es Gefäßentzündungen und vaskulären Schaden reguliert (161). Wong et al. zeigten schließlich, dass über pathologische Veränderungen in der Mikrozirkulation der Retina Vorhersagen über das Auftreten einer Hypertonie und von anderen vaskulären Ereignissen wie Schlaganfall getroffen werden können (162).

Eine Veränderung bzw. Verschlechterung der Gefäßreaktivität ergibt sich allgemein durch Einschränkungen in der Endothelzellfunktion, eine herabgesetzte Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid sowie durch einen erhöhten Grad an oxidativem Stress und einem proinflammatorischen Status in den Gefäßen (79). Dies wiederum kann eine verstärkte Kontraktilität bedingen. Pathologische Veränderungen in der Mikrozirkulation können sowohl Ursache als auch Folge eines Hochdrucks sein. So gibt es mehrere Publikationen, die eine Abnahme des Durchmessers von Arteriolen bei Hochdruck beschreiben, etwa Struijker-Boudier et al. (163). Andererseits wird eine veränderte Mikrozirkulation auch bei Krankheiten wie Sklerodermie und hypertropher Kardiomyopathie beschrieben, die nicht mit einem Anstieg des arteriellen Blutdrucks einhergehen. Beispielsweise ist bei prehypertensiven SHR im Alter von vier Wochen bereits das Media/Lumen-Verhältnis in den Mesenterialgefäßen erhöht (164). Es ist also ein Circulus vitiosus vorstellbar, bei welchem Veränderungen in der Mikrozirkulation zu Bluthochdruck beitragen und ihn weiter verstärken (114). In diesem Zusammenhang könnte dem TLR4 auf glatten Muskelzellen als Mediator von entzündlichen und oxidativen Prozessen eine bedeutende Rolle zukommen.

Mit dem Ziel einen Zusammenhang zwischen TLR4, der Funktion glatter Muskelzellen und der Entwicklung von Bluthochdruck in einem pathophysiologisch relevanten Modell aufzuzeigen, wurden zunächst der Blutdruck und die Gefäßkontraktilität unter L-NAME-Gabe in WT und TLR4^{-/-} Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren untersucht. In den unbehandelten Tieren war der mittlere Blutdruck identisch, unter L-NAME-Gabe stieg er im WT über zwei Wochen erwartungsgemäß kontinuierlich an (vgl. (106)), während er im TLR4^{-/-}

stabil blieb. Gefäße von unbehandelten WT und TLR4^{-/-} Mäusen unterschieden sich zudem weder in der Noradrenalin- bzw. Calcium-induzierten Kontraktilität noch der Acetylcholin-abhängigen Dilatation. Im L-NAME Modell hingegen war die Noradrenalin- und Calcium-abhängige Kontraktilität des TLR4^{-/-} im Vergleich zum WT signifikant niedriger. Die Hypothese lautete hierauf, dass der beobachtete Kontraktilitätsunterschied durch eine erniedrigte Aktivität des kontraktiven Apparates in TLR4^{-/-} Tieren hervorgerufen wird und hierin der Schutz vor einer Hochdruckentwicklung begründet sein könnte. Die identische endothelabhängige Dilatation im WT und TLR4^{-/-} deutete zudem darauf hin, dass die primäre Pathophysiologie, die durch L-NAME hervorgerufen wird - d.h. ein Kontraktilitätsunterschied zwischen WT und TLR4^{-/-} allein durch Hemmung der eNOS – nicht beteiligt war. Dieser muss vielmehr in der Aktivität des kontraktiven Apparates begründet sein, zumal auch eine Beteiligung von Makrophagen unwahrscheinlich schien. Histologisch zeigte sich am Herzen zwar eine Zunahme der perivaskulären Inflammation unter L-NAME, allerdings war hierbei kein Quantitätsunterschied bezüglich der Makrophagen zwischen WT und TLR4^{-/-} zu erkennen. Dies ließ vermuten, dass eine unterschiedliche Makrophagenmenge das abweichende Kontraktionsverhalten von WT und TLR4^{-/-} nicht erklären kann. Demnach könnte es einen Bezug zum TLR4-Signalweg in glatten Muskelzellen geben, v.a. da bereits im ersten Teil der Arbeit eine erhöhte TLR4-Expression in den Kardiomyozyten - d.h. ebenfalls in kontraktiven Zellen - von SHR und L-NAME-behandelten WKY gezeigt wurde. Dass die beobachteten Effekte möglicherweise L-NAME spezifisch sein könnten ergab sich aus der Tatsache, dass sowohl der Blutdruck als auch die Noradrenalin- und Calcium-abhängige Kontraktilität unter Angiotensin II im WT und TLR4^{-/-} identisch waren. Der TLR4^{-/-} wies hier also keinen Schutz vor einer Hypertonieentwicklung auf.

Der kontraktile Apparat glatter Muskelzellen um die MLC wird über die MLCP gesteuert. Dabei könnte eine Inaktivierung der TLR4 – Signalweiterleitung zu einer erhöhten MLCP-Aktivität durch Dephosphorylierung der regulatorischen Untereinheit MYPT1, d.h. zu einer Dephosphorylierung der MLC-20 und damit zu einer verminderten Konstriktion von glatten Muskelzellen führen (65). Die Aktivität der MLCP kann über den NO/sGC/cGMP-Signalweg verändert werden wobei NO seinen gefäßerweiternden Effekt über den sekundären Botenstoff cGMP vermittelt, welcher in glatten Muskelzellen von der löslichen Guanylatcyclase gebildet wird (165). Darüber hinaus wird in der Literatur beschrieben, dass chronisch unterschwellige Entzündungsprozesse zu einer erniedrigten NO-Produktion führen (166), was einen niedrigeren cGMP-Spiegel impliziert. In diesem Zusammenhang ist es außerdem wichtig, dass die sGC-Aktivität und damit die cGMP-Produktion durch die Oxidation der sGC vermindert werden kann (167). Durch oxidativen Stress kommt es dabei

zur Blockade der eisenhaltigen Häm-Gruppe an der sGC, wodurch diese nicht mehr durch NO aktiviert werden kann und der NO/sGC/cGMP-Signalweg gestört wird (168).

Mit dem Ziel, eine Beteiligung der sGC an dem beobachteten Kontraktilitätsunterschied zu demonstrieren, wurde zunächst in primären glatten Muskelzellen von unbehandelten Tieren die mRNA Expression der beiden sGC-Untereinheiten sGC- α und sGC- β bestimmt. Diese war in den WT und TLR4^{-/-} Tieren identisch. Da die sGC-Expression, d.h. die Menge des Enzyms, in den beiden Stämmen demnach nicht unterschiedlich war, wurde die sGC-Aktivität in Aorten nach SNP-, bzw. NO-Stimulation, untersucht. Dabei ergab sich in unbehandelten und L-NAME behandelten TLR4^{-/-} eine höhere sGC-Aktivität als im WT. Dies steht beispielsweise im Einklang mit Daten von Zhang et al., die eine erhöhte cGMP-Konzentration in den Thrombozyten von TLR4^{-/-} Mäusen beschreiben (72). Ein unterschiedlicher cGMP-Katabolismus durch die PDE5 (169) konnte ausgeschlossen werden.

Zum Nachweis eines möglichen Zusammenhangs zwischen TLR4 und der Aktivität der sGC, wurde schließlich untersucht, ob glatte Muskelzellen grundsätzlich befähigt sind, oxidativen Stress zu erzeugen. Darüber hinaus wurden die NADPH-Oxidase-Aktivität des TLR4^{-/-} im Vergleich zum WT sowie das Kontraktionsverhalten der Widerstandsgefäße in WT und TLR4^{-/-} Mäusen nach Erzeugung von oxidativem Stress mit Menadion analysiert.

Reaktive Sauerstoffradikale (ROS) sind an der Zellkommunikation, Erregerabwehr und Genexpression aber auch an pathologischen Prozessen beteiligt. Imai et al. beschreiben, dass bei einer akuten Lungenentzündung die Entstehung von oxidativem Stress über den TLR4-TRIF-TRAF6 Pfad eine Schlüsselrolle spielt (95). Auch bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen ist oxidativer Stress beteiligt. Landmesser et al. wiesen nach, dass sich bei Knockout-Mäusen für p47^{phox}, einer Untereinheit der neutrophilen NADPH-Oxidasen (Nox) durch die Gabe von Angiotensin II weder ein Blutdruckanstieg noch eine Zunahme von Sauerstoffradikalen im Gefäßsystem induzieren ließ. Desweiteren reagieren Superoxide mit Stickstoffmonoxid und reduzieren so das NO-Level, was Auswirkungen auf den Gefäßtonus hat (170). Bisher wurde die ROS-Produktion als Folge der TLR-4 Aktivierung hauptsächlich für Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten und Makrophagen beschrieben (171), ist aber auch für glatte Muskelzellen belegt. So wird die TLR4-Expression in VSMC durch die Nox-Aktivierung vermittelt (172). Die sechs Homologe umfassende Familie der NADPH-Oxidasen ist dabei zu einem großen Teil für die Bildung von Superoxiden und reaktiven Sauerstoffradikalen im Gefäßsystem verantwortlich (173-175). Übereinstimmend mit den Literaturdaten (176-178) konnte in der vorliegenden Arbeit

gezeigt werden, dass dabei in den glatten Muskelzellen von WT insbesondere Nox4 exprimiert wird.

Eine Methode oxidativen Stress *in vitro* zu erzeugen ist die Inkubation von Gewebe bzw. Zellen mit dem Radikalbildner Menadion. Der oxidative Stress in Form von Peroxiden entsteht dabei in verschiedenen subzellulären Kompartimenten, insbesondere in den Mitochondrien (179). Wurden Mesenterialgefäße im Myographexperiment mit Menadion inkubiert, so stieg die Kontraktilität im WT anschließend an, im TLR4^{-/-} blieb sie konstant. Dies impliziert, dass die Erzeugung von oxidativem Stress Einfluss auf die Gefäßkontraktilität nehmen kann. Unter der Einwirkung von oxidativem Stress könnte es somit zu einer Beeinträchtigung der sGC und damit zu einer geringeren cGMP-Produktion kommen. Oxidativer Stress könnte demnach über TLR4 die cGMP-Konzentration in VSMC vermindern, dadurch die Gefäßkontraktilität erhöhen und zu Bluthochdruck führen.

In diesem Zusammenhang ist eine Erklärung für die geringere Gefäßkontraktilität und den Schutz vor der Entwicklung einer Hypertonie unter L-NAME beim TLR4^{-/-} möglicherweise darin begründet, dass die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale basal erniedrigt ist, was anhand der herabgesetzten NADPH-Oxidase-Aktivität in glatten Muskelzellen von TLR4^{-/-} im Vergleich zum WT gezeigt wurde. Das könnte dann wie beschrieben eine höhere Aktivität der sGC nach sich ziehen. Unter der eNOS-Blockade durch L-NAME würde dies im TLR4^{-/-} zu einer aktiveren MLCP und damit zu einer weniger starken Gefäßkontraktion führen. Eine reduzierte Gefäßkontraktilität wirkt dabei einem starken Blutdruckanstieg entgegen. Darüber hinaus sind in unbehandelten Tieren kaum sogenannte DAMPs (damage-associated molecular patterns), die als TLR4-Liganden fungieren, vorhanden, weshalb auch kein Unterschied im Kontraktionsverhalten und bezüglich des Blutdruckes zu erwarten wäre. Unter dem stark proinflammatorischen Stimulus von L-NAME hingegen kommt es zu oxidativem Stress, die Liganden werden durch Zell- und Gewebeschaden freigesetzt und vermitteln ihre vasokonstriktiven Effekte über TLR4. Dass diese L-NAME spezifisch zu sein scheinen, ergibt sich möglicherweise aus der Wirkung des unspezifischen NOS-Inhibitors insbesondere auf das angeborene Immunsystem. In der Literatur wird beispielsweise beschrieben, dass neben Endothelzellen auch Makrophagen zur Synthese von NO über das Enzym eNOS in der Lage sind (180). Alveolarmakrophagen können dadurch *in vivo* antientzündlich wirken (181). Bei der Angiotensin II-induzierten Hypertonie hingegen ist vorwiegend die adaptive Immunität involviert. Marvar et al. konnten zeigen, dass T-Lymphozyten wesentlich an der Entwicklung von Angiotensin II-induziertem Blutdruck beteiligt sind (182). Schiffrin beschreibt ebenfalls eine Schlüsselrolle von T-Zellen bei Angiotensin II-, DOCA-Salz- und Dahl-Salz-sensitivem-Hochdruck (54). Dass TLR4 jedoch auch an der Entstehung anderer Hypertoniearten beteiligt sein kann, belegen Ergebnisse

von Young et al. Sie konnten beobachten, dass der TLR4^{-/-} keinen Hypoxie-induzierten Lungenhochdruck entwickelt, da die inflammatorische Antwort auf die Hypoxie in den Lungengefäßen erniedrigt ist (183).

Um festzustellen, ob die erniedrigte Kontraktilität der Widerstandsgefäße im TLR4^{-/-} physiologisch relevant ist, wurden zusätzlich hämodynamische Parameter der beiden Mausstämme untersucht. Die Mesenterialgefäße unbehandelter und L-NAME-behandelter TLR4^{-/-} Mäuse wiesen ein kleineres Verhältnis von Wanddicke/Innendurchmesser auf. Dieses Verhältnis bestimmt den Gefäßwiderstand (184) und wurde bezüglich des kardiovaskulären Risikos als vorteilhaft beschrieben (185). Das kleinere Herzgewicht und die höhere kapillare Dichte im Herzen von TLR4^{-/-} lassen vermuten, dass es unter dem geringeren Gefäßwiderstand im TLR4^{-/-} bei Hochdruck zu einer niedrigeren Herzbelastung kommt. Die Beobachtung, dass der TLR4^{-/-} im Vergleich zum WT ein kleineres Herzgewicht und kleinere Kardiomyozyten aufweisen stimmt damit überein, dass die erhöhte TLR4-Expression bei Bluthochdruck auch mit einer Hypertrophie der Kardiomyozyten einhergeht ((36) und eigene Ergebnisse). Bei Bluthochdruck, insbesondere in SHR, wird außerdem eine kapillare Rarifizierung im Herzen beschrieben (186). Umgekehrt könnte das größere Verhältnis von Kapillaren/Kardiomyozyt im TLR4^{-/-} zu einer besseren Sauerstoffversorgung des Herzens unter Stressbedingungen wie Bluthochdruck beitragen und hier somit ebenfalls einen Vorteil darstellen.

Es sind noch weitere Experimente notwendig, um die Mechanismen der genauen TLR4-Regulierung bei Bluthochdruck zu identifizieren. Dabei wäre wichtig herauszufinden, ob es bei einer beginnenden Hypertonie zunächst zu einer TLR4-Hochregulierung und dann zu Entzündungsreaktionen kommt, oder ob oxidativer Stress und Zellschaden eine TLR4-Überexpression bedingen. Die hier gezeigten Daten stellen lediglich ein Indiz für eine Beteiligung des TLR4 an der Entstehung von Hochdruck dar. Um dies hinreichend abzusichern, müsste geprüft werden, ob eine TLR4-Blockade in hypertensiven Tieren tatsächlich den Blutdruck senken bzw. den Verlauf der Erkrankung abmildern kann. Des Weiteren bleibt zu klären, wie genau TLR4 die sGC in glatten Muskelzellen reguliert und ob ein erhöhter oxidativer Stress über TLR4 tatsächlich den alleinigen Grund für eine veränderte Enzymaktivität darstellt. Eventuell würde hierbei die Aufklärung des Signalpfades helfen, über welchen TLR4 die Gefäß- und Blutdruckeffekte unter L-NAME vermittelt. Im Gegensatz zu den meisten anderen TLR-Rezeptoren, läuft die intrazelluläre TLR4-Signalkaskade wie beschrieben über zwei unabhängige Pfade, d.h. über die Adapterproteine MyD88 oder TRIF (42). TRIF ist dabei für die späte Phase der NF-κB-Aktivierung und die Expression von IFN-β

und IFN-induzierten Genen verantwortlich (30) und wird mit der Entstehung von oxidativem Stress in Zusammenhang gebracht (95). Die Untersuchung des Kontraktilitätsverhaltens der Widerstandsgefäße von L-NAME-behandelten MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} könnte möglicherweise bei der Aufklärung des TLR4-Signalweges helfen.

6. Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Dyslipidämie, Diabetes mellitus und Bluthochdruck sind mit Entzündungsprozessen verbunden, die wiederum zu Endorganschaden und einer veränderten Mikrozirkulation führen. Dabei spielt das angeborene Immunsystem und insbesondere Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) eine wichtige Rolle. So ist bekannt, dass TLR-Gen-Polymorphismen an kardiovaskulären Erkrankungen beteiligt sind (187). Außerdem wurde eine verstärkte TLR4 - Expression tierexperimentell in verschiedenen Ischämie - Reperfusion - Modellen an Herz und Niere beschrieben (36, 137, 138). Dabei gilt eine Beteiligung von TLR4 als Rezeptor für den exogenen Liganden Lipopolysaccharid (LPS) aus gramnegativen Bakterien und für verschiedene endogene Liganden als erwiesen (30). TLR4 wird von Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (30) aber auch von glatten Muskelzellen (140) und Kardiomyozyten exprimiert (188-190). Hier wird der Rezeptor zum Teil für die Produktion von TNF- α , IL-1 β und NO verantwortlich gemacht, was zu Herzschaden und linksventrikulärer Dysfunktion führt. Zudem gilt der NO/sGC/cGMP-Signalweg als wichtiger molekularer Mechanismus für die Steuerung der Gefäßkontraktilität (165). Ziel dieser Arbeit war es, die Beteiligung von TLR4 in Kardiomyozyten bei der Entstehung von Bluthochdruck zu untersuchen. Außerdem sollte die Bedeutung von TLR4 im Hinblick auf das Kontraktionsverhalten glatter Muskelzellen und auf den Einfluss der Entwicklung einer Hypertonie unter L-NAME und Angiotensin II untersucht werden. Betrachtet wurde dabei auch der Zusammenhang mit oxidativem Stress und der Aktivität der sGC. Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden zwei verschiedene Hochdruckmodelle der Ratte (Spontan-Hypertensive Ratte, L-NAME-Modell in WKY) sowie ein Mausmodell herangezogen, das defizient für TLR4 war.

Zunächst konnte mit Hilfe der Immunhistochemie gesehen werden, dass bei manifestem Bluthochdruck in erwachsenen SHR und in L-NAME-behandelten WKY eine TLR4-Überexpression im Herzen vorlag. Der Rezeptor war v.a. in den Kardiomyozyten lokalisiert, was mit Hilfe der FACS-Analyse bestätigt werden konnte. Um die TLR4-Expression während der Entstehung von Bluthochdruck zu untersuchen, wurde daraufhin im Western Blot die TLR4-Proteinmenge im Zeitverlauf betrachtet. Dabei zeigte sich in jungen SHR ein TLR4-Expressionsmuster wie bei normotensiven Tieren, wohingegen es bei adoleszenten Tieren mit Beginn eines signifikant ansteigenden Blutdrucks zu einer Hochregulierung des Rezeptors kam. Übereinstimmend mit dem Ergebnis der *in vitro* Stimulation von Herzzellen mit Heparansulfat, bei der eine verstärkte inflammatorische Antwort insbesondere in den SHR beobachtet wurde, deutet dies auf eine signifikante Rolle des TLR4 bei der Entwicklung eines pathologischen Bluthochdrucks hin. Die Behandlung der hypertensiven Tiere mit einer

therapeutischen Dosis des ACE-Hemmers Ramipril führte unabhängig von einer Reduktion des Blutdrucks und der Herzmasse nicht zu einer Downregulation von TLR4. Eine 10-fach höhere Ramipril-Dosis hingegen zeigte zusätzlich einen Rückgang der TLR4-Dichte. Dies lässt sich über einen Dosis-Effekt und möglicherweise eine direkte Wechselwirkung zwischen dem ACE-Hemmer und TLR4 erklären.

Es ist bereits bekannt, dass TLR4^{-/-} Mäuse vor der Entstehung eines Hypoxie-induzierten Lungenhochdrucks geschützt sind (183). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass der TLR4^{-/-} auch im L-NAME Modell keine Hypertonie entwickelte. Dabei wurde beobachtet, dass die Widerstandsgefäße des TLR4^{-/-} in diesem Modell im Vergleich zum WT eine geringere Noradrenalin- und Calcium-abhängige Gefäßkontraktilität aufwiesen. Interessanterweise waren diese Ergebnisse im Angiotensin II-Modell nicht reproduzierbar. Eine unterschiedliche Menge infiltrierender Entzündungszellen im Herzgewebe konnte ausgeschlossen werden. Neben einer erniedrigten NADPH-Oxidase-Aktivität der glatten Muskelzellen von TLR4^{-/-} Tieren zeigte sich, dass der TLR4^{-/-} im Vergleich zur Kontrolle eine höhere sGC-Aktivität in der Aorta aufwies. Ein unterschiedlicher cGMP-Katabolismus durch die PDE5 lag nicht vor. Weiterhin ergab sich, dass die Widerstandsgefäße von WT Tieren unter Menadion stärker kontrahierten als basal, dies im TLR4^{-/-} jedoch nicht der Fall war. Oxidativer Stress würde also im TLR4^{-/-} mit aktiverer sGC eine weniger starke Kontraktionssteigerung hervorrufen. Insgesamt lassen die Daten vermuten, dass es eine Verbindung zwischen oxidativem Stress, sGC-Aktivität in glatten Muskelzellen, Gefäßkontraktilität und Bluthochdruck gibt. Die höhere Enzymaktivität der sGC im TLR4^{-/-} könnte sich hier aus einem basal niedrigeren oxidativen Stress ergeben. Die Frage, wie TLR4 genau auf die sGC Einfluss nimmt bleibt allerdings offen. Eine Aufklärung des intrazellulären TLR4-Signalweges konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen.

Im Hinblick auf die hämodynamischen Parameter Herzgewicht/Körpergewicht, Kapillaren/Kardiomyozyt und Wanddicke der Mesenterialgefäße/Innendurchmesser ergab sich, dass eine bessere Kapillarisation des Herzens im TLR4^{-/-} möglicherweise zu einer besseren Sauerstoffversorgung führt. Außerdem könnte die geringere Wanddicke der Widerstandsgefäße ebenfalls in Zusammenhang mit der abgeschwächten Gefäßkontraktilität stehen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die Bedeutung von TLR4 bei der Entstehung einer Hypertonie. Um einen direkten Zusammenhang zu demonstrieren, sind weitere Experimente mit dem *in vivo* Einsatz von TLR4-Blockern notwendig. Damit könnte untersucht werden, ob sich so die Entstehung und das Fortschreiten von Bluthochdruck unterbinden lassen. Die dargestellten Experimente mit dem TLR4^{-/-} konnten ferner einen möglichen Zusammenhang

zwischen dem angeborenen Immunsystem, oxidativem Stress, der Kontraktilität von Widerstandsgefäßen und der Entstehung einer Hypertonie aufzeigen. Dabei wurde die erniedrigte Gefäßkontraktilität in L-NAME behandelten TLR4^{-/-} vermutlich durch eine erhöhte sGC-Aktivität vermittelt. In unbehandelten Tieren hatte die höhere sGC-Aktivität keinen direkten Einfluss auf die Kontraktilität und den Blutdruck, jedoch entwickelten TLR4^{-/-} keine Hypertonie unter L-NAME. Weitere Untersuchungen zur genauen Wirkung des TLR4 auf die sGC müssen das Verständnis für die zellulären und molekularen Prozesse bei der Entstehung einer Hypertonie vertiefen. Letztlich könnte auch das Verhalten des TLR4^{-/-} in anderen Hochdruckmodellen Informationen über die Rolle des angeborenen Immunsystems bei der Entstehung von Bluthochdruck geben.

7. Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Klassifikation der Blutdruckstufen nach WHO/ISH 1999 (6)</i>	6
<i>Tabelle 2: Erstantikörper</i>	27
<i>Tabelle 3: Zweitantikörper</i>	27
<i>Tabelle 4: Primer Ratte</i>	27
<i>Tabelle 5: Primer Maus</i>	28
<i>Tabelle 6: Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzgewicht/Körpergewicht in unbehandelten SHR und WKY und in Ramipril-behandelten SHR</i>	51
<i>Tabelle 7: Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzgewicht/Körpergewicht in unbehandelten WKY und nach Behandlung mit L-NAME und Ramipril + L-NAME</i>	56
<i>Tabelle 8: Histologische Auswertung des Herzens und der Mesenterialgefäße in unbehandelten WT und TLR4^{-/-}</i>	70

7.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: TLR4 - Signalweg</i>	11
<i>Abbildung 2: Aufbau eines Widerstandsgefäßes und Prinzip der Muskelkontraktion</i>	14
<i>Abbildung 3: Kontraktiler Apparat in glatten Muskelzellen und Aufbau der löslichen Guanylatcyclase</i>	16
<i>Abbildung 4: Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Entzündung</i>	19
<i>Abbildung 5: Verdünnungsreihe für die Noradrenalin- und Acetylcholin-Dosis-Wirkungskurve zur Bestimmung der Gefäßkontraktilität und -relaxation</i>	33
<i>Abbildung 6: Strukturformel von L-NAME (124)</i>	35
<i>Abbildung 7: Schematische Darstellung des Western Blot</i>	43
<i>Abbildung 8: Aufbau eines Mulvany-Myographen</i>	48
<i>Abbildung 9: Immunhistochemischer Nachweis von TLR4 im Herzen</i>	52
<i>Abbildung 10: TLR4-Protein-Expression im Herzen von erwachsenen, adoleszenten und jungen SHR im Vergleich zu WKY</i>	53

<i>Abbildung 11: In vitro Stimulation von Herzzellen aus SHR und WKY mit Heparansulfat.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 12: Expression von TLR4, TNF-α und MCP-1 in SHR und WKY.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von TLR4 im Herzen von WKY.....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 14: TLR4-Expression im Herzen von L-NAME sowie L-NAME- und Ramipril-behandelten WKY.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 15: Anti-CD45 FITC/ anti-TLR4 PE Doppelfärbung von SHR Herzgewebe nach FACS-Analyse.....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 16: Entwicklung von Blutdruck und Herzfrequenz in WT und TLR4^{-/-} unter L-NAME-Behandlung.....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 17: Noradrenalin- und Calcium- induzierte Kontraktilität sowie Acetylcholin-abhängige Dilatation in unbehandelten WT und TLR4^{-/-}.....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 18: Noradrenalin- und Calcium-abhängige Kontraktion in L-NAME-behandelten WT und TLR4^{-/-} sowie Dilatation auf Acetylcholin.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 19: Blutdruck und Gefäßkontraktilität unter Angiotensin II in WT und TLR4^{-/-}.....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 20: Perivaskuläre Inflammation im Herzen von WT und TLR4^{-/-}.....</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 21: Oxidativer Stress in WT und TLR4^{-/-}.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 22: sGC-Aktivität im WT und TLR4^{-/-}.....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 23: Calcium-induzierte Kontraktilität im WT und TLR4^{-/-} vor und nach Inkubation mit Menadion.....</i>	<i>69</i>

7.3 *Abkürzungsverzeichnis*

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AngII	Angiotensin II
AP	Alkalische Phosphatase
AT1	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cGMP	cyclisches Guanosin-Monophosphat
CRP	C-reaktives Protein
C _T	Threshold Cycle
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DAPase	Diaminopeptidase
DC	Dendritische Zelle
dd	doppel destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F	Kraft (force)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm; Gravitationsbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPx	Glutathionperoxidase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HBSS	Hepes buffered physiological salt solution
HDL	High density lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMGB1	high-mobility group box 1
HR	heart rate
HRP	Meerrettichperoxidase
HS	Heparansulfat
HSP	Heat shock protein
HTN	Hypertonie
HW/KW	Herzgewicht/Körpergewicht
IBMX	Isobutyl-1-methylxanthine
IFN- γ	Interferon gamma
IL-6	Interleukin 6
IRAK	Interleukin-1 receptor-associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
ISH	International Society of Hypertension
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
LDL	Low density lipoprotein
LPB	LPS-binding protein
LRR	Leucin rich repeat
L-NAME	L-Nitro-Arginin-Methylester
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MAP	Mean Arterial Pressure
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MD-2	Lymphozytenantigen 96
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin-Leicht-Ketten-Kinase

MLCP	Myosin-Leicht-Ketten-Phosphatase
mN	milli Newton
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MRP-8/14	Myeloid related protein 8/14
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
MYPT1	Myosin Phosphatase Target Subunit 1
Ncf1	neutrophil cytosolic factor 1
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NLR	Nod-like receptor
NOS	NO-Synthase
Nox	NADPH-Oxidase
NS	nicht signifikant
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PDTC	Pyrollidin Dithiocarbamat
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PG	Peptidoglykane
PGK-1	Phosphoglucokinase-1
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PP1C	Phosphatase 1 catalytic subunit
PRR	Pattern Recognition Receptor
RAS	Renin-Angiotensin-System
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RIG-I	retinoic acid-inducible-gene-I
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RLR	RIG-I-like receptor
RLU	Relative Light Units
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RPM	revolutions per minute
RT-PCR	Real-time PCR
SD	standard deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	standard error of the mean
sGC	Lösliche Guanylatcyclase
SHHF	Spontaneously hypertensive heart failure – prone rats
SHR	Spontan Hypertensive Ratte
SNP	Sodium Nitroprussid
SOA	Superoxid-Anionen
SOD	Superoxid-Dismutase
TAK1	TGF-β-activated kinase 1
TBK1	TANK-binding kinase
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGR	Transgene Renin Ratte
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TIRAP	TIR domain-containing adapter protein
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR-domain- containing adaptor-inducing interferon-β
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cells
WHO	World Health Organization
WKY	Wistar Kyoto Ratte
WT	Wildtyp

8. Literaturverzeichnis

Lehrbücher

Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, M. Schäfer-Korting; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 8. Auflage, 2001

Immunologie – Grundlagen und Wirkstoffe; A. Vollmar, T. Dingermann; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2005

Der Experimentator – Immunologie; W. Luttmann, K. Bratke, M. Küpper, D. Myrtek; Spektrum Verlag, 3. Auflage, 2009

Zitierte Veröffentlichungen

1. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*. 2001;104(22):2746-2753.
2. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA*. 2003;289(1):76-79.
3. Cutler JA. High blood pressure and end-organ damage. *J Hypertens Suppl*. 1996;14(6):S3-6.
4. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005;365(9455):217-223.
5. Strandberg TE, Salomaa VV, Vanhanen HT, Pitkala K, Miettinen TA. Isolated diastolic hypertension, pulse pressure, and mean arterial pressure as predictors of mortality during a follow-up of up to 32 years. *J Hypertens*. 2002;20(3):399-404.
6. 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee. *J Hypertens*. 1999;17(2):151-183.
7. Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, et al. Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation*. 1998;97(1):48-54.
8. Katz AM. Proliferative signaling and disease progression in heart failure. *Circ J*. 2002;66(3):225-231.
9. Vogt M, Strauer BE. Systolic ventricular dysfunction and heart failure due to coronary microangiopathy in hypertensive heart disease. *Am J Cardiol*. 1995;76(13):48D-53D.
10. Hagan PG, Nienaber CA, Isselbacher EM, et al. The International Registry of Acute Aortic Dissection (IRAD): new insights into an old disease. *JAMA*. 2000;283(7):897-903.
11. Kannel WB. Elevated systolic blood pressure as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol*. 2000;85(2):251-255.
12. Tin LL, Beevers DG, Lip GY. Hypertension, left ventricular hypertrophy, and sudden death. *Curr Cardiol Rep*. 2002;4(6):449-457.
13. Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*. 1993;21(4):391-397.
14. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med*. 1996;334(1):13-18.
15. Major cardiovascular events in hypertensive patients randomized to doxazosin vs chlorthalidone: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). ALLHAT Collaborative Research Group. *JAMA*. 2000;283(15):1967-1975.

16. Jafar TH, Schmid CH, Landa M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of nondiabetic renal disease. A meta-analysis of patient-level data. *Ann Intern Med.* 2001;135(2):73-87.
17. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2001;345(12):851-860.
18. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801.
19. McGeer EG, Klegeris A, McGeer PL. Inflammation, the complement system and the diseases of aging. *Neurobiol Aging.* 2005;26 Suppl 1:94-97.
20. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med.* 2000;343(5):338-344.
21. Lemaitre B. The road to Toll. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):521-527.
22. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001;2(8):675-680.
23. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004;5(10):971-974.
24. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature.* 2004;430(6996):257-263.
25. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J.* 2009;420(1):1-16.
26. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:197-216.
27. Hoebe K, Jiang Z, Tabeta K, et al. Genetic analysis of innate immunity. *Adv Immunol.* 2006;91:175-226.
28. Niizeki T, Takeishi Y, Watanabe T, et al. Relation of serum heat shock protein 60 level to severity and prognosis in chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 2008;102(5):606-610.
29. Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol.* 1999;162(6):3212-3219.
30. Arancibia SA, Beltran CJ, Aguirre IM, et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res.* 2007;40(2):97-112.
31. Nozaki N, Shishido T, Takeishi Y, Kubota I. Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice. *Circulation.* 2004;110(18):2869-2874.
32. Brea D, Blanco M, Ramos-Cabrer P, et al. Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(6):1424-1431.
33. Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmuller KH, et al. TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem.* 2006;281(14):9049-9057.
34. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature.* 2005;433(7025):523-527.
35. Hopkins PA, Sriskandan S. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clin Exp Immunol.* 2005;140(3):395-407.
36. Frantz S, Kobzik L, Kim YD, et al. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest.* 1999;104(3):271-280.
37. Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med.* 48(9):1121-1132.
38. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001;413(6857):732-738.
39. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004;303(5663):1526-1529.
40. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000;408(6813):740-745.

41. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(5):353-364.
42. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16(1):3-9.
43. da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21129-21135.
44. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42(2):145-151.
45. Ogier-Denis E, Mkaddem SB, Vandewalle A. NOX enzymes and Toll-like receptor signaling. *Semin Immunopathol*. 2008;30(3):291-300.
46. <http://www2.massgeneral.org/anesthesia/>. *Massachusetts General Hospital - Department of Anesthesia, Critical Care and Pain Medicine* 2011. Accessed 03. September, 2011.
47. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-1695.
48. Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, et al. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(7):1975-1981.
49. Ha T, Hua F, Li Y, et al. Blockade of MyD88 attenuates cardiac hypertrophy and decreases cardiac myocyte apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(3):H985-994.
50. Chen LW, Chang WJ, Chen PH, Liu WC, Hsu CM. TLR ligand decreases mesenteric ischemia and reperfusion injury-induced gut damage through TNF-alpha signaling. *Shock*. 2008;30(5):563-570.
51. Cai WF, Zhang XW, Yan HM, et al. Intracellular or extracellular heat shock protein 70 differentially regulates cardiac remodelling in pressure overload mice. *Cardiovasc Res*. 88(1):140-149.
52. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*. 2004;5(10):975-979.
53. Sales ML, Schreiber R, Ferreira-Sae MC, et al. The functional Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism is associated with lower left ventricular mass in hypertensive women. *Clin Chim Acta*. 411(9-10):744-748.
54. Schiffrin EL. T lymphocytes: a role in hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 19(2):181-186.
55. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007;204(10):2449-2460.
56. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med*. 2002;347(3):185-192.
57. De Ciuceis C, Amiri F, Brassard P, Endemann DH, Touyz RM, Schiffrin EL. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(10):2106-2113.
58. Dilaveris P, Giannopoulos G, Riga M, Synetos A, Stefanadis C. Beneficial effects of statins on endothelial dysfunction and vascular stiffness. *Curr Vasc Pharmacol*. 2007;5(3):227-237.
59. Goligorsky MS. Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(5):F871-880.
60. Joubert-Huebner E. Arterien, Venen und Kapillarnetz - Anatomie und Pathophysiologie. 25.03.2009(<http://www.kardiotechnik.org/Blutgefasssystem.pdf>). Accessed 03. September 2011.

61. <http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/>. Departement de Médecine - Prof. B. Schwaller - Division d'Histologie de l'Université de Fribourg: Muskelapparat - Muskelkontraktion 2005. Accessed 03. September, 2011.
62. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004;84(3):767-801.
63. Miwa K, Fujita M, Sasayama S. Recent insights into the mechanisms, predisposing factors, and racial differences of coronary vasospasm. *Heart Vessels.* 2005;20(1):1-7.
64. Feng J, Ito M, Ichikawa K, et al. Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem.* 1999;274(52):37385-37390.
65. Bolz SS, Vogel L, Sollinger D, et al. Nitric oxide-induced decrease in calcium sensitivity of resistance arteries is attributable to activation of the myosin light chain phosphatase and antagonized by the RhoA/Rho kinase pathway. *Circulation.* 2003;107(24):3081-3087.
66. Wirth A, Benyo Z, Lukasova M, et al. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat Med.* 2008;14(1):64-68.
67. Groneberg D, König P, Wirth A, Offermanns S, Koesling D, Friebe A. Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. *Circulation.* 121(3):401-409.
68. MacDonald JA, Borman MA, Muranyi A, Somlyo AV, Hartshorne DJ, Haystead TA. Identification of the endogenous smooth muscle myosin phosphatase-associated kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2419-2424.
69. Stasch JP, Becker EM, Alonso-Alija C, et al. NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase. *Nature.* 2001;410(6825):212-215.
70. Kauser K, da Cunha V, Fitch R, Mallari C, Rubanyi GM. Role of endogenous nitric oxide in progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(5):H1679-1685.
71. Ogita H, Liao J. Endothelial function and oxidative stress. *Endothelium.* 2004;11(2):123-132.
72. Zhang G, Han J, Welch EJ, et al. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol.* 2009;182(12):7997-8004.
73. Schmidt PM. *Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur NO-unabhängigen Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase* [Dissertation]. Halle-Wittenberg: Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; 2003.
74. Videla LA. Cytoprotective and suicidal signaling in oxidative stress. *Biol Res.* 43(3):363-369.
75. Wu H, Chen G, Wyburn KR, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2007;117(10):2847-2859.
76. Purushothaman S, Renuka Nair R, Harikrishnan VS, Fernandez AC. Temporal relation of cardiac hypertrophy, oxidative stress, and fatty acid metabolism in spontaneously hypertensive rat. *Mol Cell Biochem.* 2011;351(1-2):59-64.
77. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem.* 2002;277(17):15107-15112.
78. Lee KM, Yeo M, Choue JS, et al. Protective mechanism of epigallocatechin-3-gallate against *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial cytotoxicity via the blockage of TLR-4 signaling. *Helicobacter.* 2004;9(6):632-642.
79. Stapleton PA, Goodwill AG, James ME, Brock RW, Frisbee JC. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *J Inflamm (Lond).* 7:54.
80. Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol.* 1997;20(11 Suppl 2):II-11-17.

81. Tanaka M, Sotomatsu A, Yoshida T, Hirai S, Nishida A. Detection of superoxide production by activated microglia using a sensitive and specific chemiluminescence assay and microglia-mediated PC12h cell death. *J Neurochem.* 1994;63(1):266-270.
82. Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1995;6(3-4):205-228.
83. Kozumbo WJ, Trush MA, Kensler TW. Are free radicals involved in tumor promotion? *Chem Biol Interact.* 1985;54(2):199-207.
84. Irani K, Xia Y, Zweier JL, et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science.* 1997;275(5306):1649-1652.
85. Manea A. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell Tissue Res.* 342(3):325-339.
86. Cruzado MC, Risler NR, Miatello RM, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase activity during the development of hypertension: Effect of angiotensin II and role of insulinlike growth factor-1 receptor transactivation. *Am J Hypertens.* 2005;18(1):81-87.
87. Lee SK, Arunkumar S, Sirajudeen KN, Singh HJ. Glutathione system in young spontaneously hypertensive rats. *J Physiol Biochem.* 2010;66(4):321-327.
88. Belia S, Santilli F, Beccafico S, et al. Oxidative-induced membrane damage in diabetes lymphocytes: effects on intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Free Radic Res.* 2009;43(2):138-148.
89. Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens Rep.* 12(2):135-142.
90. Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M. Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 396(4):901-907.
91. Park HS, Chun JN, Jung HY, Choi C, Bae YS. Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2006;72(3):447-455.
92. Patel DN, Bailey SR, Gresham JK, et al. TLR4-NOX4-AP-1 signaling mediates lipopolysaccharide-induced CXCR6 expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;347(4):1113-1120.
93. Sasada M, Pabst MJ, Johnston RB, Jr. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. *J Biol Chem.* 1983;258(16):9631-9635.
94. Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ, Bae YS. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol.* 2004;173(6):3589-3593.
95. Imai Y, Kuba K, Neely GG, et al. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell.* 2008;133(2):235-249.
96. Volpe M, Rubattu S, Gigante B, Romano M, Russo R, Condorelli M. [Cardiovascular risk in arterial hypertension: role of family history]. *Cardiologia.* 1994;39(12 Suppl 1):287-290.
97. Schellings MW, Baumann M, van Leeuwen RE, et al. Imatinib attenuates end-organ damage in hypertensive homozygous TGR(mRen2)27 rats. *Hypertension.* 2006;47(3):467-474.
98. Cervenka L, Wang CT, Mitchell KD, Navar LG. Proximal tubular angiotensin II levels and renal functional responses to AT1 receptor blockade in nonclipped kidneys of Goldblatt hypertensive rats. *Hypertension.* 1999;33(1):102-107.
99. Dworkin LD, Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. Hemodynamic basis for glomerular injury in rats with desoxycorticosterone-salt hypertension. *J Clin Invest.* 1984;73(5):1448-1461.

100. Arnal JF, Warin L, Michel JB. Determinants of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 1992;90(2):647-652.
101. Ribeiro MO, Antunes E, de Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 1992;20(3):298-303.
102. Rodriguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Mezzano S, Vaziri ND. Early and sustained inhibition of nuclear factor-kappaB prevents hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(1):51-57.
103. Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Nava M, et al. Reduction of renal immune cell infiltration results in blood pressure control in genetically hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;282(2):F191-201.
104. Baumann M, Janssen BJ, Hermans JJ, et al. Transient AT1 receptor-inhibition in prehypertensive spontaneously hypertensive rats results in maintained cardiac protection until advanced age. *J Hypertens.* 2007;25(1):207-215.
105. Tanaka K, Yamamoto Y, Ogino K, et al. Cytosolic phospholipase A2alpha contributes to blood pressure increases and endothelial dysfunction under chronic NO inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31(5):1133-1138.
106. Linder AE, Weber DS, Whitesall SE, D'Alecy LG, Webb RC. Altered vascular reactivity in mice made hypertensive by nitric oxide synthase inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46(4):438-444.
107. Neves SR, Machado CR, Pinto AM, Borges AH, Cunha FQ, Camargos ER. Macrophage populations and cardiac sympathetic denervation during L-NAME-induced hypertension in rats. *Histol Histopathol.* 2006;21(8):803-812.
108. Liu P, Xu B, Hock CE. Inhibition of nitric oxide synthesis by L-name exacerbates acute lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion. *Shock.* 2001;16(3):211-217.
109. Kato H, Hou J, Chobanian AV, Brecher P. Effects of angiotensin II infusion and inhibition of nitric oxide synthase on the rat aorta. *Hypertension.* 1996;28(2):153-158.
110. Carretero OA, Oparil S. Essential hypertension : part II: treatment. *Circulation.* 2000;101(4):446-453.
111. Chen R, Iwai M, Wu L, et al. Important role of nitric oxide in the effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor imidapril on vascular injury. *Hypertension.* 2003;42(4):542-547.
112. Wassmann S, Nickenig G. Interrelationship of free oxygen radicals and endothelial dysfunction--modulation by statins. *Endothelium.* 2003;10(1):23-33.
113. Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, et al. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32(7):2057-2064.
114. Levy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HA. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation.* 2001;104(6):735-740.
115. Fort MM, Mozaffarian A, Stover AG, et al. A synthetic TLR4 antagonist has anti-inflammatory effects in two murine models of inflammatory bowel disease. *J Immunol.* 2005;174(10):6416-6423.
116. Oude Nijhuis MM, van Keulen JK, Pasterkamp G, Quax PH, de Kleijn DP. Activation of the innate immune system in atherosclerotic disease. *Curr Pharm Des.* 2007;13(10):983-994.
117. Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* 2006;114(1 Suppl):I270-274.
118. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2007;4(8):444-454.
119. Andreakos E, Foxwell B, Feldmann M. Is targeting Toll-like receptors and their signaling pathway a useful therapeutic approach to modulating cytokine-driven inflammation? *Immunol Rev.* 2004;202:250-265.

120. Pauletto P, Rattazzi M. Inflammation and hypertension: the search for a link. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):850-853.
121. Björkbacka. Multiple roles of Toll-like receptor signaling in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17(5):527-533.
122. Higashimori M, Tatro JB, Moore KJ, Mendelsohn ME, Galper JB, Beasley D. Role of toll-like receptor 4 in intimal foam cell accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31(1):50-57.
123. Paulis L, Zicha J, Kunes J, et al. Regression of L-NAME-induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. *Hypertens Res*. 2008;31(4):793-803.
124. <http://www.sigmaaldrich.com>. *Sigma-Aldrich: L-NAME hydrochloride* 2011. Accessed 03.September, 2011.
125. Wang YX, Martin-McNulty B, da Cunha V, et al. Fasudil, a Rho-kinase inhibitor, attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting apoptosis and proteolysis. *Circulation*. 2005;111(17):2219-2226.
126. Nieves-Cintrón M, Amberg GC, Navedo MF, Molkentin JD, Santana LF. The control of Ca²⁺ influx and NFATc3 signaling in arterial smooth muscle during hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(40):15623-15628.
127. Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, Minami T, Kodama T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12(3):138-142.
128. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-350.
129. Reimann K. *Die durch Urocortin induzierte und durch cAMP vermittelte, kalziumunabhängige Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur der Maus* [Dissertation]. Köln: Zentrum Physiologie und Pathophysiologie - Institut für vegetative Physiologie, Universität zu Köln; 2008.
130. Wang JF, Komarov P, Sies H, de Groot H. Contribution of nitric oxide synthase to luminol-dependent chemiluminescence generated by phorbol-ester-activated Kupffer cells. *Biochem J*. 1991;279 (Pt 1):311-314.
131. Rakusan K, Cicutti N, Kazda S, Turek Z. Effect of nifedipine on coronary capillary geometry in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 1994;24(2):205-211.
132. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 1977;41(1):19-26.
133. <http://www.dmt.dk/>. *DMT Danish Myograph Technology* 2011. Accessed 03.September, 2011.
134. Kung CF, Moreau P, Takase H, Luscher TF. L-NAME hypertension alters endothelial and smooth muscle function in rat aorta. Prevention by trandolapril and verapamil. *Hypertension*. 1995;26(5):744-751.
135. Ha T LY, Hua F et al. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. *Cardiovascular Research*. 2005;68:224-234.
136. Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(22):10045-10048.
137. Pulsikens WP, Teske GJ, Butter LM, et al. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*. 2008;3(10):e3596.
138. Chao W. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(1):H1-12.
139. Friebe A, Schultz G, Koesling D. Stimulation of soluble guanylate cyclase by superoxide dismutase is mediated by NO. *Biochem J*. 1998;335 (Pt 3):527-531.
140. Otsui K, Inoue N, Kobayashi S, et al. Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries. *Heart Vessels*. 2007;22(6):416-422.
141. Zemancikova A, Torok J. Effect of chronic nifedipine treatment on blood pressure and adrenergic responses of isolated mesenteric artery in young rats with developing spontaneous hypertension. *Physiol Res*. 2009;58(6):921-925.

142. Kassin M, Montero MJ, Sevilla MA. Chronic treatment with pravastatin prevents early cardiovascular changes in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2009;158(2):541-547.
143. Kee HJ, Eom GH, Joung H, et al. Activation of histone deacetylase 2 by inducible heat shock protein 70 in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2008;103(11):1259-1269.
144. Campo GM, Avenoso A, Campo S, D'Ascola A, Nastasi G, Calatroni A. Small hyaluronan oligosaccharides induce inflammation by engaging both toll-like-4 and CD44 receptors in human chondrocytes. *Biochem Pharmacol.* 80(4):480-490.
145. Tsung A, Klune JR, Zhang X, et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling. *J Exp Med.* 2007;204(12):2913-2923.
146. Heyen JR, Blasi ER, Nikula K, et al. Structural, functional, and molecular characterization of the SHHF model of heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(5):H1775-1784.
147. Bergman MR, Kao RH, McCune SA, Holycross BJ. Myocardial tumor necrosis factor-alpha secretion in hypertensive and heart failure-prone rats. *Am J Physiol.* 1999;277(2 Pt 2):H543-550.
148. Del Fiorentino A, Cianchetti S, Celi A, Pedrinelli R. Aliskiren, a renin inhibitor, downregulates TNF-alpha-induced tissue factor expression in HUVECS. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 11(4):243-247.
149. Lv J, Jia R, Yang D, Zhu J, Ding G. Candesartan attenuates Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis via TLR4/MyD88 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380(1):81-86.
150. Ji YY, Wang ZD, Liu JT, Liu N. [Inhibitory effect of fenofibrate on angiotensin II-induced toll-like receptor 4 expression, myeloperoxidase activity and expression in RAW264.7 cells]. *Yao Xue Xue Bao.* 2009;44(5):462-467.
151. Burgess E, Muirhead N, Rene de Cotret P, Chiu A, Pichette V, Tobe S. Supramaximal dose of candesartan in proteinuric renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(4):893-900.
152. Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, et al. Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(7):2348-2352.
153. Daubeuf B, Mathison J, Spiller S, et al. TLR4/MD-2 monoclonal antibody therapy affords protection in experimental models of septic shock. *J Immunol.* 2007;179(9):6107-6114.
154. Intengan HD, Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension.* 2001;38(3 Pt 2):581-587.
155. Suematsu M, Suzuki H, Delano FA, Schmid-Schonbein GW. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/endothelial interaction, apoptosis. *Microcirculation.* 2002;9(4):259-276.
156. Struijker-Boudier HA, Rosei AE, Bruneval P, et al. Evaluation of the microcirculation in hypertension and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2007;28(23):2834-2840.
157. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342(12):836-843.
158. Stokes KY, Calahan L, Russell JM, Gurwara S, Granger DN. Role of platelets in hypercholesterolemia-induced leukocyte recruitment and arteriolar dysfunction. *Microcirculation.* 2006;13(5):377-388.
159. Scalia R, Appel JZ, 3rd, Lefer AM. Leukocyte-endothelium interaction during the early stages of hypercholesterolemia in the rabbit: role of P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(7):1093-1100.
160. Stokes KY, Cooper D, Taylor A, Granger DN. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(8):1026-1036.
161. Croce K, Gao H, Wang Y, et al. Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation.* 2009;120(5):427-436.

162. Wong TY, Klein R, Couper DJ, et al. Retinal microvascular abnormalities and incident stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Lancet*. 2001;358(9288):1134-1140.
163. Struijker Boudier HA, le Noble JL, Messing MW, Huijberts MS, le Noble FA, van Essen H. The microcirculation and hypertension. *J Hypertens Suppl*. 1992;10(7):S147-156.
164. Rizzoni D, Castellano M, Porteri E, Bettoni G, Muiesan ML, Agabiti-Rosei E. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. *Am J Hypertens*. 1994;7(2):193-200.
165. Nakamura K, Koga Y, Sakai H, Homma K, Ikebe M. cGMP-dependent relaxation of smooth muscle is coupled with the change in the phosphorylation of myosin phosphatase. *Circ Res*. 2007;101(7):712-722.
166. Valerio A, Cardile A, Cozzi V, et al. TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J Clin Invest*. 2006;116(10):2791-2798.
167. Stasch JP, Schmidt PM, Nedvetsky PI, et al. Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2552-2561.
168. Priviero FB, Webb RC. Heme-dependent and independent soluble guanylate cyclase activators and vasodilation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 56(3):229-233.
169. Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev*. 62(3):525-563.
170. Lassegue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens*. 2004;17(9):852-860.
171. Bae YS, Lee JH, Choi SH, et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ Res*. 2009;104(2):210-218, 221p following 218.
172. Lin FY, Chen YH, Tasi JS, et al. Endotoxin induces toll-like receptor 4 expression in vascular smooth muscle cells via NADPH oxidase activation and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2630-2637.
173. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74(6):1141-1148.
174. Mohazzab KM, Wolin MS. Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol*. 1994;267(6 Pt 1):L815-822.
175. Pagano PJ, Ito Y, Tornheim K, Gallop PM, Tauber AI, Cohen RA. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. *Am J Physiol*. 1995;268(6 Pt 2):H2274-2280.
176. Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart*. 2004;90(5):491-493.
177. Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, et al. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*. 2001;88(9):888-894.
178. Ellmark SH, Dusting GJ, Fui MN, Guzzo-Pernell N, Drummond GR. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res*. 2005;65(2):495-504.
179. Loor G, Kondapalli J, Schriewer JM, Chandel NS, Vanden Hoek TL, Schumacker PT. Menadione triggers cell death through ROS-dependent mechanisms involving PARP activation without requiring apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(12):1925-1936.
180. Gambaryan S, Kobsar A, Hartmann S, et al. NO-synthase-/NO-independent regulation of human and murine platelet soluble guanylyl cyclase activity. *J Thromb Haemost*. 2008;6(8):1376-1384.

181. Miles PR, Bowman L, Rengasamy A, Huffman L. Constitutive nitric oxide production by rat alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1998;274(3 Pt 1):L360-368.
182. Marvar PJ, Thabet SR, Guzik TJ, et al. Central and peripheral mechanisms of T-lymphocyte activation and vascular inflammation produced by angiotensin II-induced hypertension. *Circ Res.*107(2):263-270.
183. Young KC, Hussein SM, Dadiz R, et al. Toll-like receptor 4-deficient mice are resistant to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Exp Lung Res.*36(2):111-119.
184. Smeda JS, Lee RM, Forrest JB. Structural and reactivity alterations of the renal vasculature of spontaneously hypertensive rats prior to and during established hypertension. *Circ Res.* 1988;63(3):518-533.
185. Rizzoni D, Porteri E, Boari GE, et al. Prognostic significance of small-artery structure in hypertension. *Circulation.* 2003;108(18):2230-2235.
186. Sabino B, Lessa MA, Nascimento AR, et al. Effects of antihypertensive drugs on capillary rarefaction in spontaneously hypertensive rats: intravital microscopy and histologic analysis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008;51(4):402-409.
187. Schwartz DA, Cook DN. Polymorphisms of the Toll-like receptors and human disease. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 7:S403-407.
188. Knuefermann P, Nemoto S, Baumgarten G, et al. Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? *Chest.* 2002;121(4):1329-1336.
189. Kapadia S, Lee J, Torre-Amione G, Birdsall HH, Ma TS, Mann DL. Tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest.* 1995;96(2):1042-1052.
190. Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N, Sivasubramanian N, Mann DL, Vallejo JG. In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. *J Infect Dis.* 2001;183(11):1617-1624.

Abstracts

Schneider R., Rusai K., Sollinger D., Heemann U., Baumann M. (2009) A potential link between the innate immune system and hypertension, 14th annual meeting of the ECCR, Nizza, France

Schneider R., Sollinger D., Liskova S., Zicha J., Heemann U., Baumann M. (2009) Innate immunity affects the cardiovascular phenotype, 14th annual meeting of the ECCR, Nizza, France

Eißler R., Schmaderer C., Rusai K., Sollinger D., Lahmer T., Wilde B., Witzke O., Lutz J., Heemann U., Baumann M. (2010) Toll-like receptor 4 distribution and function in hypertensive cardiomyopathy, XLVII ERA-EDTA Congress – II DGfN Congress, Munich, Germany

Eißler R., Liskova S., Zicha J., Schmaderer C., Aoqui C., Chmielewski S., Sollinger D., Witzke O., Lutz J., Heemann U., Baumann M. (2010) TLR4^{-/-} shows advantageous characteristics in a model of L-NAME-induced hypertension, XLVII ERA-EDTA Congress – II DGfN Congress, Munich, Germany

Eißler R., Sollinger D., Chmielewski S., Aoqui C., Liskova S., Zicha J., Bluijssen H., Witzke O., Scherer E.Q., Heemann U., Baumann M. (2010) Erniedrigte MLCP-vermittelte Vasokonstriktion im TLR4^{-/-} durch erhöhte sGC-Aktivität, Nephrologisches Forum München

Originalarbeiten

Eißler R., Schmaderer C., Rusai K., Kühne L., Sollinger D., Lahmer T., Witzke O., Lutz J., Heemann U., Baumann M. (2010), Hypertension augments cardiac Toll-like receptor 4 expression and activity, *Hypertension Research*, 34(5):551-558

Schmaderer C., Eißler R., Seibel S., van Rooijen N., Baumann M. (2010), Blood pressure control: a facelift for macrophages? *Hypertension*.56(2):e23; author reply e24

Eißler R.*, Sollinger D.*, Chmielewski S., Aoqui C., Schmaderer C., Liskova S., Zicha J., Bluijssen H., Witzke O., Benz M., Scherer E., Lutz J., Heemann U., Baumann M. , Role of Toll-like receptor 4 in the modulation of blood pressure and vascular contractility; Manuskript in Arbeit (*geteilte Erstautorschaft)

9. Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Marcus Baumann für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Dr. med. Christoph Schmaderer danke ich für die Hilfe beim Korrekturlesen der Doktorarbeit.

Bei Prof. Dr. Heemann bedanke ich mich für die Aufnahme in seiner Abteilung und die Unterstützung der Arbeit.

Prof. Dr. Biel danke ich für die Übernahme der Betreuung und die Vertretung vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie der LMU.

Mein weiterer Dank gilt allen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, insbesondere Marcel Konhäuser und Anne-Marie Suhr für die Übernahme der Tierexperimente, Dr. med. Daniel Sollinger für die Einweisung am Myographen, Sandra Haderer und Dr. med. Christoph Schmaderer für die Hilfe bei der Immunhistochemie, Louisa Kühne für die Auswertung der FACS-Versuche sowie Dr. med. Krisztina Rusai, Dr. med. Cristiane Aoque und Stefan Chmielewski für die Hilfe bei einigen Versuchen und ihre fortwährende Unterstützung.

Auch Dr. Josef Zicha und Dr. Silvia Liskova von der Akademie der Wissenschaften in Prag danke ich für ihre Hilfe.

10. Lebenslauf

Die elektronische Version der Arbeit enthält keinen Lebenslauf.