

**Bedeutung der Myeloperoxidase für die Herzinsuffizienz in der
MLP defizienten Maus als Modell für eine dilatative
Kardiomyopathie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

an der der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie

Universität Hamburg

Vorgelegt von

Diplom-Biologe Thorben Ravekes

Hamburg, 2014

Erstgutachter:

Prof. Dr. Thorsten Burmester
Biozentrum Grindel
Universität Hamburg

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Stephan Baldus
Herzzentrum
Uniklinik Köln

Tag der Disputation: 17.10.2014

Da steh` ich nun, ich armer Tor,
Und bin so klug als wie zuvor!

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	IV
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Dilatative Kardiomyopathien und Herzinsuffizienz	1
1.1.1 Pathophysiologie der dilatativen Kardiomyopathie	3
1.2 Hereditäre DCM im Tiermodell	9
1.2.1 Kontraktiler Apparat.....	9
1.2.2 Murines Mausmodell für eine DCM	10
1.3 Myeloperoxidase.....	12
1.3.1 Myeloperoxidase und kardiales Remodeling	16
1.3.2 MPO und vaskuläre Funktion.....	17
1.4 Fragestellung der Arbeit	19
2 Material.....	20
2.1 Geräte	20
2.2 Puffer und Lösungen.....	21
2.2.1 Puffer und Lösungen für Proteinbiochemische Methoden.....	21
2.2.2 Puffer und Lösungen für Gentechnische Methoden.....	23
2.2.3 Puffer und Lösungen für physiologische Untersuchungen der Maus	23
2.3 Proteinstandards für Western Blot.....	23
2.4 DNA Standards für die Agarosegelelektrophorese.....	24
2.5 Protein-Inhibitoren.....	24
2.6 Verwendete Antikörper	24
2.6.1 Primärantikörper.....	24
2.6.2 Sekundärantikörper	24
3 Methoden	25
3.1 Protein-biochemische Methoden	25
3.1.1 Proteinaufreinigung aus Gewebe.....	25
3.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	25
3.1.3 Auftrennung von isolierten Proteinen mittels der SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
3.1.4 Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran.....	27
3.1.5 Immunoblotting	28
3.1.6 Ablösen von auf der Nitrocellulosemembran gebundener Antikörper ...	28
3.1.7 Immunfluoreszenz	29
3.1.8 Picrosirius Rot Färbung.....	30
3.1.9 IBA-1 Färbung	31
3.1.10 <i>In vitro</i> Quantifizierung der MPO-Konzentration.....	31
3.2 Gentechnische Methoden.....	33
3.2.1 Arbeiten mit DNA	33
3.2.1.1 DNA-Isolation aus Gewebe.....	33
3.2.1.2 Bestimmen der DNA-Konzentration.....	33
3.2.1.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR).....	33

3.2.1.4	Agarosegelelektrophorese	36
3.2.2	Arbeiten mit RNA	37
3.2.2.1	RNA-Isolation aus Gewebe	37
3.2.2.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	37
3.2.2.3	Reverse Transkription	37
3.2.2.4	Real Time Quantitative PCR (q-PCR)	38
3.3	Arbeiten und Umgang mit Versuchstieren	39
3.3.1	Verwendete Mausgruppen	40
3.3.2	Alter und Geschlecht der eingesetzten Versuchstiere	40
3.3.3	Erzeugung und Beschaffung der Mauslinien	40
3.3.4	Haltung der Versuchsmäuse	40
3.3.5	Organentnahme	41
3.3.6	Echokardiographische Untersuchung der Herzfunktion	41
3.3.7	Katheteruntersuchung zur Ermittlung von linksventrikulären Druck- Volumen-Schleifen	41
3.3.8	Ermittlung des peripher-vaskulären Widerstands	44
3.3.9	Organbad	44
3.3.10	Langendorff-Herz	47
3.3.11	Herstellung von Koronarperfusaten der Versuchstiere	50
3.3.12	Software	50
3.3.13	Statistik	50
3.3.14	Markierung der Versuchsgruppen in den Ergebnisdiagrammen	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Einfluss der MPO Defizienz auf die Herzgeometrie in MLP-KO Mäusen	52
4.2	Einfluss der MPO Defizienz auf die systolische linksventrikuläre Funktion in MLP-KO Mäusen	54
4.3	Auswirkung einer MPO Defizienz auf die diastolische Herzfunktion in MLP-KO Mäusen	57
4.4	Expression von BNP im Myokard von MLP-KO Mäusen in Abhängigkeit der MPO Expression	58
4.5	Effekt von MPO auf das fetale kardiale Genprogramm in MLP defizienten Mäusen	59
4.6	Effekt von MPO auf die Ausprägung ventrikulärer Fibrose in MLP-KO Mäusen	62
4.7	Sekretion und Akkumulation der Myeloperoxidase in MLP-KO Tieren	66
4.8	MPO und die koronarvaskuläre Funktion in MLP-KO Tieren	67
4.9	MPO und die Gefäßfunktion in der systemischen Zirkulation in MLP-KO Tieren	72
5	Diskussion	77
5.1	Einfluss der MPO Defizienz auf die Herzfunktion der MLP-KO Maus	77
5.2	Einfluss der MPO Defizienz auf das kardiale Remodeling in MLP-KO Tieren	80
5.3	MPO und der vaskuläre Phänotyp der MLP-KO Maus	83
5.4	MPO als Ziel einer Therapie gegen Herzinsuffizienz	88
5.5	Ausblick	89

6 Zusammenfassung	91
7 Literaturverzeichnis	93
8 Anhang.....	104
8.1 Liste der experimentellen Daten	104
8.2 Danksagung	108
9 Eidesstattliche Versicherung.....	109

Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
Ad	hinzu
ATII	Angiotensin II
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
d	diastolisch
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Gr	Größe
Hpf	<i>High Power Field</i>
HRP	<i>Horseraddish Peroxidase</i>
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
KO	Knockout
Konz.	Konzentration
MHC	Myosin Schwere Kette
Min	Minuten
MLP	<i>Muscle LIM Protein</i>
MPO	Myeloperoxidase
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
LV	linker Ventrikel
LVID	linksventrikulärer innerer Diameter
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PRSW	<i>Preload Recrutable Stroke Work</i>
PVR	peripher-vaskulärer Widerstand
RT	<i>Real Time</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek	Sekunden
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-Aminoethan
U	<i>Units</i>
UV	ultraviolett
Vol	Volumen
vs.	versus

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Prävalenz der Herzinsuffizienz in der amerikanischen Bevölkerung:.....	2
Abb. 1.2: Interstitielle Fibrose im Ventrikel einer an DCM leidenden Maus:	4
Abb. 1.3: NO induzierte Vasorelaxation:	7
Abb. 1.4: Schematischer Aufbau eines Sarkomers:	10
Abb. 1.5: Herzgeometrie in 10 Wochen alten MLP-KO Mäusen:	11
Abb. 1.6: Quartärstruktur des MPO Dimers:.....	14
Abb. 1.7: Durch MPO katalysierte Redoxreaktionen:.....	15
Abb. 1.8: Effekte von MPO auf die NO-Bioverfügbarkeit im subendothelialen Raum: 18	
Abb. 3.1: Strukturformel des Natriumdodecylsulfat (SDS)	26
Abb. 3.2: Schematische Darstellung eines Aufbaus für das Nassblot-Verfahren:	28
Abb. 3.3: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz:	30
Abb. 3.4: Strukturformel des Sirius Rot Farbstoffs:.....	30
Abb. 3.5: Ergebnis einer MLP-WT/KO Genotypisierungs PCR:	35
Abb. 3.6: Ergebnis einer MPO-WT/KO Genotypisierungs PCR:.....	36
Abb. 3.7: Beispielhafte Darstellung eines RT-PCR Ergebnisses:	39
Abb. 3.8: Physiologische Untersuchungen am Mausherz mit einem Druck-Volumen Konduktanz Katheter:	43
Abb. 3.9: Schematische Darstellung eines Organbads für Aorten:	46
Abb. 3.10: Auswertung einer Organbad Messung für die Endothelabhängige Aortenfunktion in Versuchsmäusen:	47
Abb. 3.11: Schematischer Aufbau zum Kanülieren eines Mausherzens:	49
Abb. 3.12: Schematischer Aufbau eines Langendorff-Systems zur Perfusion eines Mausherzens:	49
Abb. 3.13: Versuchsgruppenlegende	51
Abb. 4.1: Einfluss eines MPO-Knockouts auf die veränderte Herzgeometrie in MLP-KO Mäusen:.....	53
Abb. 4.2: Einfluss einer MPO-Defizienz auf die eingeschränkte systolische LV- Funktion in MLP-KO Mäusen:.....	56
Abb. 4.3: Untersuchung der von Nachlast und Herzgeometrie unabhängigen systolischen LV-Funktion:	57
Abb. 4.4: Diastolische Dysfunktion in MLP-KO und MLP/MPO DKO Tieren:.....	58
Abb. 4.5: Untersuchung der Ausprägung der Herzinsuffizienz in MLP-KO und MLP/MPO DKO Tieren mithilfe des natriuretischen Peptids Typ B (BNP):.....	59
Abb. 4.6: Untersuchungen zum fetalen kardialen Genprogramm im Myokard der MLP- KO Mäuse in Abhängigkeit von MPO:	61
Abb. 4.7: Interstitielle Fibrosierung im linken Ventrikel der MLP-KO Mäuse als Parameter des kardialen Remodelings.....	63
Abb. 4.8: Einfluss einer MPO-Defizienz auf die Makrophagen-Infiltration in den linken Ventrikel der MLP-KO Maus:.....	65
Abb. 4.9: Konzentration von MPO im Blutplasma, ermittelt mithilfe eines Maus-MPO Elisas:.....	66

Abb. 4.10: Erhöhte MPO Deposition in der Koronarzirkulation der MLP-KO Tiere: ...	67
Abb. 4.11: Zusammenhang zwischen eines MPO Knockouts und einer verminderten linksventrikulären Kapillardichte in MLP-KO Tieren:	69
Abb. 4.12: NO-Bioverfügbarkeit im Myokard:	71
Abb. 4.13: Koronarer Perfusionsdruck in MLP-KO Tieren und der Einfluss von MPO auf diesen Parameter:	72
Abb. 4.14: Einfluss der MPO Defizienz auf die endothelabhängige und endothelunabhängige Aortenfunktion:	74
Abb. 4.15: Systemischer vaskulärer Widerstand in MLP-KO Mäusen in Abhängigkeit von MPO:	75
Abb. 4.16: NO-Bioverfügbarkeit in der Aorta:	76

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Herstellung eines für das diskontinuierliche System erforderlichen Sammelgels (4% Acrylamidanteil) und Trenngels (10% Acrylamidanteil).	27
Tab. 3.2: Pipettierschema für die MLP-WT/KO PCR	34
Tab. 3.3: Programm MLP WT	34
Tab. 3.4: Programm MLP-KO	35
Tab. 3.5: Pipettierschema für die MPO-WT/KO PCR	35
Tab. 3.6: Programm MPO WT/KO	36
Tab. 3.7: Pipettierschema für die reverse Transkription	37
Tab. 3.8: Programm für die reverse Transkriptase Reaktion	38
Tab. 3.9: Pipettierschema für die RT PCR	38
Tab. 3.10: Programm für die RT PCR	38
Tab. 3.11: Stufenweise Konzentrationserhöhung von Acetylcholin und Nitroglycerin	46

1 Einleitung

1.1 Dilatative Kardiomyopathien und Herzinsuffizienz

Aufgrund der Körpergröße insbesondere der Säugetiere ist die einfache Diffusion als Grundlage der Versorgung dieser Organismen mit Sauerstoff und Nährstoffen nicht ausreichend. Um dennoch eine optimale Versorgung zu gewährleisten, besitzen Säugetiere hierfür das Herzkreislaufsystem. Begründet durch diese zentral lebenswichtige Funktion haben pathologische Veränderungen in diesem System oft entsprechend drastische Folgen für den Organismus. So sind Erkrankungen des Herzkreislaufsystems oft verbunden mit hoher Mortalität und Morbidität und stellen demnach auch die häufigste Todesursache auf der Welt dar (Roger et al. 2011). Aufgrund dieser Tatsache wird die Behandlung kardiovaskulärer Krankheiten eine große gesellschaftliche und wirtschaftliche Herausforderung.

Die 2006 von der American Heart Association vorgeschlagene Definition für Kardiomyopathien lautet: *„Kardiomyopathien sind eine heterogene Gruppe von Krankheiten des Herzmuskels, die mit mechanischen und/oder elektrischen Funktionsstörungen einhergehen und üblicherweise (aber nicht zwingend) eine unangemessene Hypertrophie oder Dilatation der Herzkammern verursachen. Ihre Ursachen sind vielfältig und häufig genetisch bedingt. Kardiomyopathien begrenzen sich entweder auf das Herz oder sind Teil einer allgemeinen Systemerkrankung, führen oft zu kardiovaskulär bedingten Todesfällen oder einer fortschreitenden Behinderung durch Herzversagen.“* (Maron et al. 2006).

Eine Form der Kardiomyopathien ist die dilatative Kardiomyopathie (DCM) (Klassifizierung nach ICD-10: 142.0). Wie der Name schon andeutet, ist die DCM gekennzeichnet durch eine krankhafte Erweiterung (Dilatation) der Ventrikel und einer systolischen Dysfunktion, was zu einem fortschreitendem Verlust der Auswurfleistung führt (Maron et al. 2006). Wie bei allen Kardiomyopathien ist auch bei der DCM Folge und klinisches Symptom die Herzinsuffizienz, also die Unfähigkeit des Herzens den zur Versorgung des Organismus benötigten Blutfluss zu leisten. Die Herzinsuffizienz zeichnet sich, wie die meisten kardiovaskulären Erkrankungen, durch eine deutliche altersabhängige Prävalenz aus. So leiden beispielsweise fast 10 % der männlichen amerikanischen Bevölkerung im Alter von 60-79 Jahren an Herzinsuffizienz (Lloyd-Jones et al. 2009). Zusätzlich zu der hohen Mortalität gewinnt die Behandlung der DCM

aufgrund des demographischen Wandels in der Bundesrepublik Deutschland hierzulande somit weiter an Bedeutung. Klinisch wird der Grad der Herzinsuffizienz in der NYHA (New York Heart Association) Klassifizierung angegeben. Die Skala reicht von Stufe I bis IV, wobei Stufe I für Beschwerdefreiheit steht, während Stufe IV charakterisiert ist durch Beschwerden des Patienten in Ruhe.

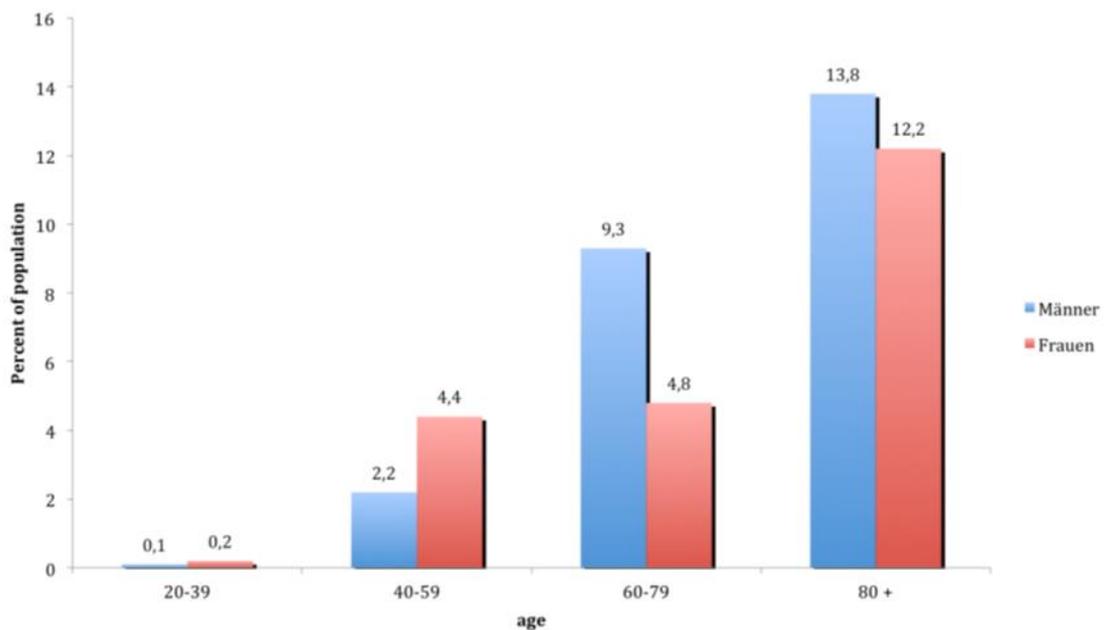


Abb. 1.1: Prävalenz der Herzinsuffizienz in der amerikanischen Bevölkerung: Herzinsuffizienz hat eine deutliche altersabhängige Prävalenz, so sind etwa 10% der männlichen, amerikanischen Bevölkerung im Alter von 60-79 Jahren von diesem klinischen Symptom betroffen. Auch sind Männer häufiger betroffen als Frauen (modifiziert nach (Lloyd-Jones et al. 2009)).

Das Ursachenspektrum der DCM ist vielfältig. Zunächst können enterovirale Infektionen und endokrinologisch-metabolische Prozesse zu einer DCM führen. Hinzu kommen genetische Ursachen. Dabei spielen oft Mutationen in Genen, die strukturelle Proteine codieren, die maßgeblich beteiligt sind an der Generation und Transmission der kontraktilen Kraft innerhalb der Kardiomyozyten, als Ursache einer DCM eine Rolle (Stypmann et al. 2002). Als Beispiele zu nennen sind unter anderem das kardiale β Myosin und das Troponin T (Kamisago et al. 2000). Diese genetischen Faktoren sind mit einem Anteil von bis zu 35% aller diagnostizierten dilatativen Kardiomyopathien die häufigste Ursache dieser Erkrankung (Maron et al. 2006). Sind keine Ursachen erkennbar, so spricht man von einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie.

Neben physiologischen Parametern zur linksventrikulären Herzfunktion wie der Ejektionsfraktion (EF) dient auch das natriuretische Peptid Typ B (BNP) als diagnostischer Marker des klinischen Phänotyps der DCM. Dabei handelt es sich um ein vasoaktives Hormon, das vasodilatativ wirkt und somit die Nachlast des Herzens reduziert. Es stellt damit einen Antagonisten zu vasokonstringierenden Hormonen wie Angiotensin II (ATII) dar. Die Tatsache, dass BNP als diagnostischer Marker für die Ausprägung der DCM geeignet ist, fußt auf dem Erkenntnis, dass BNP bei erhöhter Wandspannung innerhalb des Herzens vermehrt sezerniert wird (Vanderheyden et al. 2004). Diesbezüglich zeigen Studien eine gute Korrelation mit der Menge an in die systemische Zirkulation sezerniertem BNP sowohl mit dem Grad der Krankheitsausprägung (NYHA Klasse) (Maisel et al. 2001), als auch mit der Mortalität bei Herzinsuffizienz (Anand et al. 2003).

1.1.1 Pathophysiologie der dilatativen Kardiomyopathie

Das initiale pathophysiologische Ereignis einer hereditär ausgelösten dilatativen Kardiomyopathie ist oft eine Verminderung der Kontraktionsfähigkeit der Kardiomyozyten, was wiederum zu einer verminderten Auswurfleistung des Herzens führt. Die damit verbundenen hämodynamischen Änderungen sind ein reduzierter systemischer arterieller Druck, ein reduziertes Schlagvolumen und ein reduzierter renaler Blutdruck und führen zu einer Abnahme der Aktivierung von Barorezeptoren im linken Ventrikel, im Sinus caroticus und im Aortenbogen.

Die verminderte Aktivierung der Barorezeptoren hat eine afferente Aktivierung von kardioregulatorischen Zentren im zentralen Nervensystem zur Folge (Schrier and Abraham 1999). Durch die Aktivierung der kardioregulatorischen Zentren kommt es zu einer efferenten Aktivierung des sympathischen Nervensystems, die wiederum eine Erhöhung der systemischen Vasokonstriktion zur Folge hat. Darüber hinaus führt die Aktivierung der kardioregulatorischen Zentren im Gehirn zu einer erhöhten efferenten Ausschüttung des antidiuretischen Hormons Vasopressin (AVP). Vasopressin führt in der Niere zu einer verminderten Ausscheidung von Wasser durch den Urin und zusammen mit dem vermittelten vasokonstringierenden Effekt ist ein erhöhter Blutdruck die Folge eines Anstiegs der AVP Sekretion. Zusätzlich wird aufgrund einer durch die reduzierte Auswurfleistung ausgelösten verminderten Durchblutung der Niere das Renin/Angiotensin/Aldosteron System (RAAS) aktiviert. Dabei wird das Enzym Renin

aus dem juxtaglomerulären Apparats der Niere vermehrt ausgeschieden und katalysiert die Umwandlung von Angiotensinogen in das Dekapeptid Angiotensin I. Angiotensin I wird dann mithilfe des Angiotensin-konvertierenden Enzym gespalten und es entsteht der multifunktionale Effektor Angiotensin II (ATII). Angiotensin II hat über Bindung an den ATII1-Rezeptor im Gefäßsystem eine vasokonstringierende Wirkung. Diese maladaptiven Vorgänge führen zu einer erhöhten Nachlast des Herzens und begünstigen auf diese Weise die Progression einer Herzinsuffizienz.

Darüber hinaus haben diese funktionellen pathologischen Vorgänge dann strukturelle Veränderungen des Myokards zur Folge. Dieser als kardiales Remodeling bezeichnete Prozess ist gekennzeichnet durch eine zunehmend maladaptive Reaktion auf struktureller Ebene auf eine veränderte Herzfunktion. Zunächst wurde kardiales Remodeling als Veränderung des Herzgewebes nach akutem Myokardinfarkt angesehen, wie der Verdünnung der Ventrikelwand im Infarktbereich sowie einer Dilatation des linken Ventrikels (Takano et al. 2003). Es zeigte sich jedoch, dass das kardiale Remodeling bei vielen kardiovaskulären Krankheitsformen zu den charakteristischen pathophysiologischen Vorgängen gehört, unter anderem eben bei den Kardiomyopathien (Mann 1999, Cohn et al. 2000).

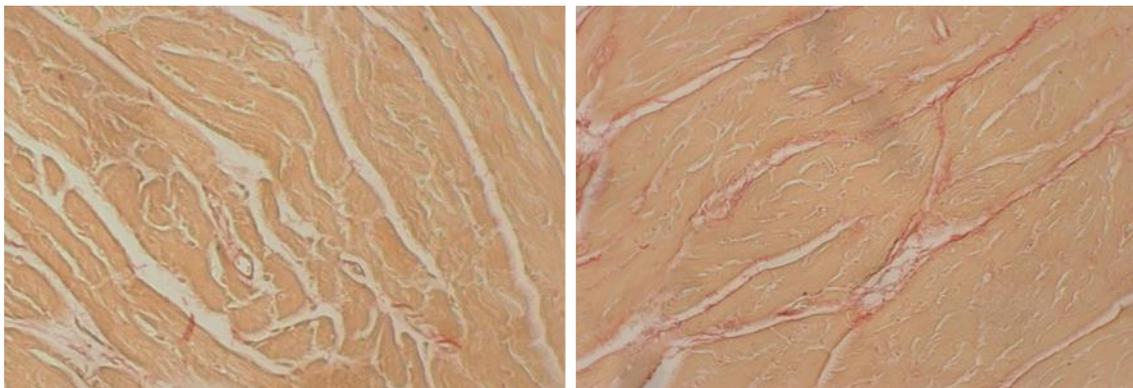


Abb. 1.2: Interstitielle Fibrose im Ventrikel einer an DCM leidenden Maus: Die Abbildungen zeigen Picosirius Rot Färbungen von Ventrikeln einer 10 Wochen alten WT Maus (linkes Bild) und einer Maus mit hereditärer DCM (rechtes Bild). Dabei zeigt sich eine deutliche interstitielle Fibrosierung des Ventrikels in der an DCM leidenden Maus.

Die Progression des kardialen Remodelings ist äußerst komplex. Zunächst finden strukturelle Veränderungen der Kardiomyozyten selbst statt (Takano et al. 2003). So werden die Kardiomyozyten, ausgelöst durch mechanischen Stress und neurohumorale Aktivierung, zunehmend hypertroph. Es zeigte sich, dass die kardiomyozytäre

Hypertrophie verbunden ist mit der Reaktivierung der Expression einiger Gene, die besonders in der embryonalen Entwicklung von Bedeutung sind (Chien et al. 1991). Dieses sogenannte fetale kardiale Genprogramm ist charakterisiert durch eine erhöhte Expression kontraktile Proteine wie dem skeletalen α -Aktin und der Myosin Schwere Kette β , jedoch einer verringerten Expression der Myosin Schwere Kette α , wodurch sich der Quotient aus MHC α/β verringert. Neben den kontraktile Proteinen kommt es auch zu einer erhöhten Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) und einer verringerten Expression der Sarcoplasmatischen/Endoplasmatischen Retikulum Calcium ATPase (SERCA) (Ambler et al. 2008).

Zusätzlich zu den strukturellen Änderungen der Kardiomyozyten ist die Entstehung fibrotischer Areale innerhalb des Herzmuskels ein weiterer Schlüsselfaktor des kardialen Remodelings. Zur Unterstützung und Aufrechterhaltung der kardialen Struktur sind die Kardiomyozyten u.a. in ein Netzwerk von Kollagenfasern eingebettet, wobei von den 29 verschiedenen Kollagentypen in erster Linie das Kollagen Typ I und III aufgrund ihres sehr hohen Anteils an der kardialen Kollagenkomposition (Kollagen Typ I: 80%, Kollagen Typ III: 11%) von Bedeutung sind (de Jong et al. 2011). Die Kollagenfasern sind Teil der extrazellulären Matrix (ECM), deren Proteinkomposition sich bei dem kardialen Remodeling ändert, insbesondere kommt es zu einer maladapтив vermehrten Expression des Kollagens. Die Hauptquelle myokardialen Kollagens sind die Fibroblasten, die etwa 27% der Zellkomposition des Herzens ausmachen (Banerjee et al. 2007). Dabei geht die erhöhte Expression von Kollagen einher mit der Proliferation von Fibroblasten zu Myofibroblasten (Darby and Hewitson 2007). Der erhöhte Kollagengehalt resultiert zum einen in einer Versteifung des Herzens, wodurch die Kontraktion und Relaxation des Herzmuskels gestört ist, zum anderen ist auch die elektrische Reizweiterleitung zwischen den Kardiomyozyten durch Einlagerung von Kollagen beeinträchtigt. In der DCM sind zwei Formen der kardialen Fibrose besonders weit verbreitet, die interstitielle Fibrose, bei der die fibrotischen Areale im Interstitium zwischen Gewebeschichten lokalisiert sind und die perivaskuläre Fibrose (de Jong et al. 2011).

Bei der Entstehung von Fibrose spielt das Angiotensin II eine zentrale Rolle. So ist die ATII vermittelte Aktivierung der vorrangig in Kardiomyozyten exprimierten Angiotensin II Typ 1a Rezeptoren (AT1_a Rezeptor) beteiligt an dem Umbau der extrazellulären Matrix. Dabei sind die genauen Mechanismen noch Gegenstand aktueller Forschung. Es

scheint aber so zu sein, dass Angiotensin II involviert ist in die Proliferation der Fibroblasten zu Myofibroblasten. Auch eine ATII vermittelte erhöhte Expression der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), Schlüsselenzyme bei Änderungen der Proeinkomposition der ECM, ist bekannt (Pons et al. 2011).

Aufgrund der konstringierenden Effekte vermittelt durch die Aktivierung des Sympathikus, des RAAS und einer erhöhten Sekretion von Vasopressin spielt neben den pathophysiologischen Prozessen innerhalb des Herzgewebes auch die vaskuläre Funktion eine bedeutsame Rolle für die Progression von Kardiomyopathien. Somit ist es nicht verwunderlich, dass eine Inhibierung der ATII Kaskade (z.B. ACE-Hemmer) fester Bestandteil der Behandlung von Patienten aller Stadien der aus einer dilatativen Kardiomyopathie resultierenden Herzinsuffizienz (NYHA I-IV) ist.

Für die vaskuläre Funktion von zentraler Bedeutung ist die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO). Dieser einzigartige Signaltransduktor ist charakterisiert durch die Fähigkeit, frei durch Zellmembranen zu diffundieren und, aufgrund seiner äußerst kurzen Halbwertszeit, seine Wirkung nur über kurze Distanzen zu entfalten. Neben der Inhibierung der Thrombozytenaggregation (Randriamboavonjy and Fleming 2005) und Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen (Sato et al. 2000) hat die Wirkung von Stickstoffmonoxid auch eminent vasodilatierenden Charakter. Im vaskulären System wird NO vorrangig über die endothelzellmembran-gekoppelte endotheliale NO-Synthase (eNOS) synthetisiert, dabei wird unter Verbrauch von NADPH und O₂ aus dem Substrat L-Arginin L-Citrullin und NO gebildet (Palmer et al. 1988). Die NO vermittelte Relaxation der glatten Muskelzellen erfolgt über Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC), dem einzig bekannten Akzeptor des NO. Eine anschließende Konzentrationserhöhung des *Second Messengers* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) führt zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK). Die Folgen haben sowohl Calcium (Ca)-abhängigen als auch Ca-unabhängigen Charakter. Die Ca-unabhängige Induktion der Relaxation erfolgt neben der Inhibierung des Mitglieds A der Ras-homologen Genfamilie (RhoA) durch Phosphorylierung (Sauzeau et al. 2000) insbesondere auch über Aktivierung der Myosin-Leichtketten Phosphatase (Wu et al. 1996, Lee et al. 1997), die direkt die Myosin-Leichtkette dephosphoryliert und somit eine Relaxation induziert (Alessi et al. 1992). Die Phosphorylierung des IP3-Rezeptor assoziierten cGMP-Kinase Substrats IRAG führt hingegen zu einer Verringerung der

zytosolischen Ca-Konzentration und somit indirekt zur Relaxation (Schlossmann et al. 2000).

Die Aktivierung der cGK führt parallel zu einer Phosphorylierung am Serin 157 des Vasodilatator stimulierten Phosphoproteins (VASP). Somit ist VASP, obgleich keine direkte oder indirekte Beteiligung an den vasomotorischen Veränderungen durch dieses Protein vorliegt, ein anerkannter biochemischer Marker für die NO-Bioverfügbarkeit im vaskulären System (Sakurai et al. 1992, Housset et al. 1993).

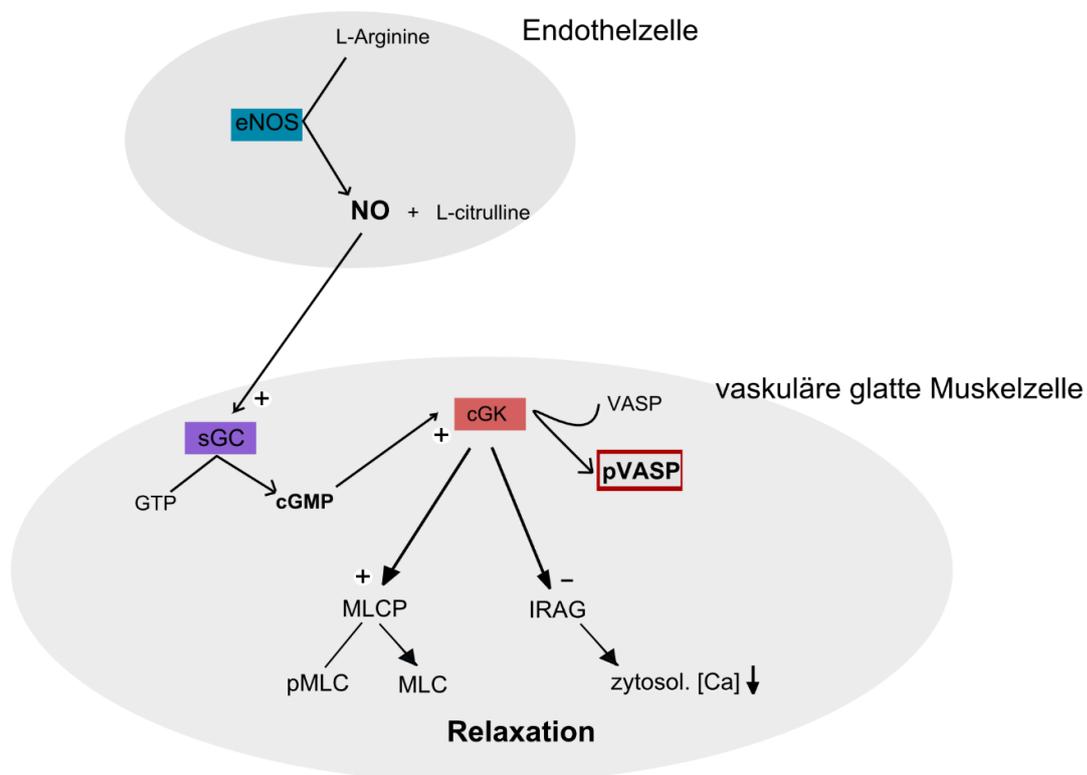


Abb. 1.3: NO induzierte Vasorelaxation: In der Endothelzelle katalysiert die endotheliale NO-Synthase (eNOS) die Bildung von NO durch Bildung von L-Citrullin aus L-Arginin. Anschließend diffundiert das NO frei durch die Zellmembranen und fungiert in vaskulären glatten Muskelzellen als Donor der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Die durch die Aktivierung der sGC induzierte intrazelluläre Erhöhung des *Second Messengers* zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) führt zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinasen (cGK). Die cGK phosphoryliert die Myosin leichte Kette Phosphatase (MLCP), die wiederum die Myosin-Leichtkette dephosphoryliert. Zusätzlich erfolgt eine Phosphorylierung des IP3-Rezeptor assoziierten cGMP-Kinase Substrats (IRAG) und dadurch eine Reduktion der intrazellulären Calcium Konzentration. Beide Mechanismen haben eine vasodilatierende Wirkung. Neben den vasodilatierenden Konsequenzen phosphoryliert die aktivierte cGK auch VASP am Serin 157.

Die endotheliale Dysfunktion ist Bestandteil der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und hat großen Einfluss auf die Morbidität und Mortalität, wodurch sie sich als

prognostischer Faktor dieses klinischen Symptoms eignet (Fischer et al. 2005, Katz et al. 2005). Zentraler mechanistischer Angelpunkt der endothelialen Dysfunktion ist eine Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit. Die Bildung von NO in der Vaskulatur obliegt, wie schon erwähnt, der eNOS, deren Aktivität wiederum durch mechanischen Scherstress ausgelöst wird (Harrison et al. 2006). Durch die verminderte Auswurfleistung bei einer Herzinsuffizienz kommt es zu einer Reduktion des Blutflusses in den peripheren und Konduktanzarterien, wodurch sich der Scherstress reduziert und damit auch die über die eNOS katalysierte Bildung von NO. Ein weiterer Grund für die Reduktion von NO ist die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), denn das Superoxid-Anion (O_3^-) reagiert sehr schnell mit NO unter Bildung von Peroxynitrit. Eine wichtige Quelle reaktiver Sauerstoffspezies im vaskulären System ist die NAD(P)H-Oxidase. Die NAD(P)H-Oxidase wird unter anderem über ATII aktiviert, welches in der Herzinsuffizienz vermehrt gebildet wird. Dadurch kommt es zu vermehrter Bildung des Superoxid-Anions. Eine weitere wichtige Quelle von ROS in der Vaskulatur ist die Xanthinoxidase. Eine erhöhte Aktivität dieses in den Purinmetabolismus eingebetteten Enzyms ist in Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz beobachtet worden (Landmesser et al. 2002). Neben der vermehrten Bildung von ROS ist in der Herzinsuffizienz auch die Aktivität der Superoxid-Dismutase reduziert, wodurch der Abbau des Superoxid-Anions vermindert ist (Landmesser et al. 2002).

Die Folgen der Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit für die Progression der Herzinsuffizienz sind vielfältig. Wie bereits in diesem Text behandelt, führt eine Reduktion der NO-Konzentration zu einer verminderten Vasorelaxation der betroffenen Gefäße. Daraus resultiert eine koronare und systemische Minderperfusion. Die Reduktion der systemischen Perfusion erhöht die Nachlast des Herzens und reduziert damit direkt die Auswurfleistung. Eine erhöhte Konstriktion der Koronargefäße hingegen führt zu einer Minderversorgung des Herzens mit Nährstoffen und Sauerstoff. Neben den Effekten in Zusammenhang mit der Vasomotorik hat eine Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit auch Einfluss auf die Thrombozyten. So ist die Aktivierung, die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten durch NO negativ reguliert. Dadurch wird die Gefahr der Thrombenbildung und damit eines Infarkts in Patienten mit Herzinsuffizienz aufgrund einer reduzierten NO Verfügbarkeit erhöht (Loh et al. 1997, Gibbs et al. 2001, Schafer et al. 2003). NO scheint auch Effekte auf das kardiale Remodeling zu haben, wobei der Mechanismus noch nicht abschließend geklärt ist. Jedoch scheint eNOS eine zentrale

Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass sich eine erhöhte Expression oder Aktivierung der eNOS nach Myokardinfarkt positiv auf die Progression des kardialen Remodelings und damit auf die Herzfunktion auswirkt (Scherrer-Crosbie et al. 2001, Jones et al. 2003, Merx et al. 2004).

Somit hat eine Erhöhung der NO-Bioverfügbarkeit benefiziellen Charakter bezüglich der Progression einer Herzinsuffizienz. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der therapeutische Einsatz von Carvedilol (β -Blocker 3ter Generation) durch Herabsenken des Blutdrucks positive Auswirkungen auf Hospitalisierung und Mortalität von Patienten mit DCM hat (Nishioka et al. 2007). Ein direkter Zusammenhang zwischen Einschränkungen des Endothels und der dilatativen Kardiomyopathie kann durch weitere Studien untermauert werden. So wurde mithilfe einer Studie eine Verschlechterung der Endothel-vermittelten Vasorelaxation der Koronararterien in unter einer DCM leidenden Patienten nachgewiesen (Treasure et al. 1990). Zusätzlich konnte auch im Mausmodell bereits ein Zusammenhang zwischen DCM und einer verschlechterten koronaren Endothelfunktion, vermittelt durch eine reduzierte NO-Verfügbarkeit, gezeigt werden (Drelicharz et al. 2008). Auch der aktuelle Stand der Wissenschaft macht somit deutlich, dass neben den direkten Auswirkungen auf das Herzgewebe auch maladaptive Prozesse auf vaskulärer Ebene, insbesondere der Endothelfunktion, die Progression der DCM vorantreiben.

1.2 Hereditäre DCM im Tiermodell

1.2.1 Kontraktiler Apparat

Um die zentrale Funktion des Herzens, nämlich die Versorgung des Organismus mit Blut, zu ermöglichen, ist es notwendig, dass die Kardiomyozyten chemische Energie in mechanische Kraft in Form von Kontraktion übersetzen. Die Kardiomyozyten besitzen, anders als die Myozyten der gestreiften Skelettmuskulatur, lediglich einen Nukleus und die üblichen Zellorganellen zur Aufrechterhaltung der zellulären Funktion. Da die Kardiomyozyten aufgrund ihrer speziellen Funktion einen hohen Energieverbrauch aufweisen, besitzen sie eine hohe Anzahl an Mitochondrien. Der kontraktile Apparat der Kardiomyozyten besteht aus Myofibrillen, die wiederum aus einer Aneinanderreihung von Sarkomeren als funktionelle Segmente bestehen. Dabei werden die direkt für die

Kontraktion benötigten parallel angeordneten Myosin- und Aktinfilamente durch die Z-Scheiben begrenzt. Die Z-Scheibe besteht aus einer höchstkomplexen Anordnung verschiedenster Proteine. Neben der passiven Transmission der mechanischen Kraft durch die strukturelle Anordnung der Z-Scheibe (Luther 2009) ist eine eminent wichtige Aufgabe der Z-Scheibe die Mechanosensorik, also die Übermittlung der mechanischen Antwort auf eine Dehnung des Muskelgewebes.

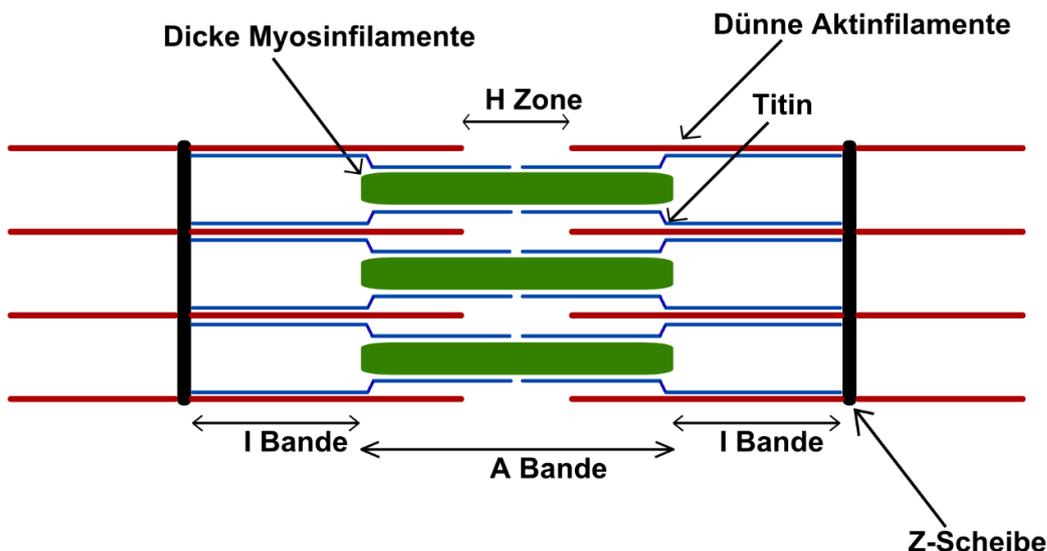


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau eines Sarkomers: Die für die Kontraktion verantwortlichen parallel angeordneten Myosin- und Aktinfilamente werden begrenzt durch die Z-Scheibe. Titin sorgt für eine Verbindung der Myosinfilamente an die Z-Scheibe.

1.2.2 Murines Mausmodell für eine DCM

Aufgrund der zentralen Bedeutung der Z-Scheibe für die Kontraktion ist es nicht verwunderlich, dass der Ursprung hereditärer dilatativer Kardiomyopathien oft in Mutationen von Genen, die Z-Scheibenproteine kodieren, liegt (McNally et al. 2013). Auf dieser Grundlage basiert auch das in dieser Arbeit genutzte Mausmodell. So dient als Modell für die DCM eine *Muscle LIM Protein* (MLP)-KO Maus. Das 194 aa große, Z-Scheiben assoziierte MLP, auch bekannt als *Cysteine Rich Protein* (CSR3) gehört zur Familie der Proteine mit einer oder mehreren LIM-Domänen. Das entsprechende MLP-Gen besteht aus 20.000 Basenpaaren und 6 Exons. Das Protein besitzt zwei LIM-Domänen, jede gefolgt von Glycin reichen Domänen. Die Expression des MLP ist auf gestreifte Muskelzellen begrenzt und herabreguliert im adulten Skelettmuskel, jedoch

nicht in den Kardiomyocyten (Arber et al. 1994), daher zeichnet sich die MLP Maus zwar durch einen kardialen Phänotyp nicht jedoch durch physiologische Einschränkungen im Skelettmuskel aus. Neben der vorrangigen Assoziation mit der Z-Scheibe ist aber auch zytosolische und nukleare Lokalisation beobachtet worden (Buyandelger et al. 2011).

MLP interagiert mit vielen Proteinen des kontraktiven Apparats wie beispielsweise α -Aktinin (Louis et al. 1997) und Telethonin (TCAP) (Knoll et al. 2002) und bildet makromolekulare Strukturen mit seinen Bindungspartnern. Aufgrund dessen hat das MLP ein breites funktionales Spektrum, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt wurden. Neben der Differenzierung von Myozyten (Arber et al. 1994) ist auch bekannt, dass MLP mechanistisch verflochten ist mit der Mechanosensorik in Kardiomyozyten. So interagiert MLP mit der *Integrin Linked Kinase* (ILK), die wichtige funktionelle Bedeutung in der Mechanosensorik hat (Postel et al. 2008). Darüber hinaus ist MLP verlinkt in die β -adrenerger Rezeptor induzierte Signalkaskade (Rockman et al. 1998). Auch eine Beteiligung des MLP an der Stabilität des Zytoskeletts durch Akkumulation an der lateralen Verankerung der Myofibrillen ist nachgewiesen worden (Arber et al. 1997). Daher hat ein Fehlen des MLP eine gestörte Zytoarchitektur und Mechanosensorik der Kardiomyozyten zur Folge, was die Ausprägung eines veränderten kardialen Phänotyps verursacht.

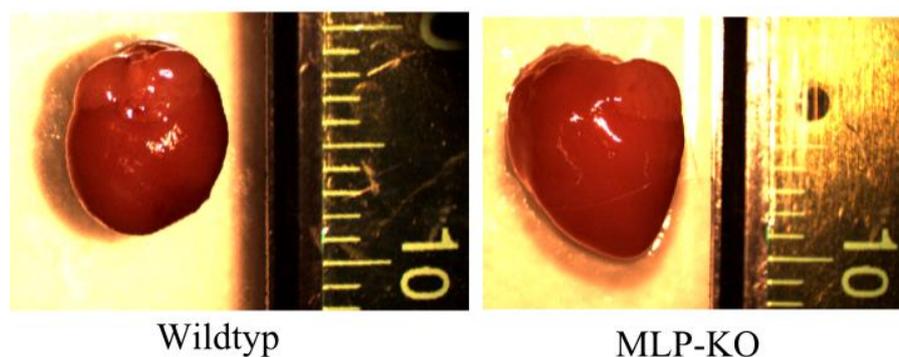


Abb. 1.5: Herzgeometrie in 10 Wochen alten MLP-KO Mäusen: Das Herz einer 10 Wochen alten MLP-KO Maus (rechtes Bild) zeigt eine ausgeprägte Dilatation des Ventrikels im Vergleich zu dem Herzen einer gleichaltrigen WT Maus (linkes Bild).

Bezüglich des kardialen Phänotyps zeigen bereits neugeborene MLP-KO Mäuse Anzeichen myofibrillärer Dysorganisation (Arber et al. 1997). Drei bis vier Wochen nach der Geburt weisen MLP-KO Mäuse eine deutliche Hypertrophie der Herzen auf (Arber

et al. 1997). Eine Dilatation der Ventrikel lässt sich zwar schon ab der 2ten Lebenswoche beobachten, jedoch erst untersuchte 10 Wochen alte Mäuse weisen die charakteristische Erhöhung des Herzgewichts in Abhängigkeit des Körpergewichts auf (Arber et al. 1997). Aufgrund dieser myokardialen Vorgänge entwickelt die MLP-KO Maus sowohl eine systolische linksventrikuläre Funktionseinschränkung als auch eine verschlechterte diastolische Funktion (Lorenzen-Schmidt et al. 2005). Somit entspricht der Phänotyp der MLP-KO Maus einem Krankheitsbild, das der klinischen Entwicklung einer humanen dilatativen Kardiomyopathie gleicht. Auch klinische Studien unterstützen einen Zusammenhang zwischen der Funktionalität des MLP und der dilatativen Kardiomyopathie. Es zeigte sich, dass eine *Missense* Mutation im Exon 2 (T10C) des im humanen MLP-Gens Auslöser einer dilatativen Kardiomyopathie ist (Knoll et al. 2002).

1.3 Myeloperoxidase

Bei der Myeloperoxidase handelt es sich um ein Enzym der Superfamilie der mammalianen Hämperoxidasen (MPO; EC 1.11.2.2). Erstmals beschrieben wurde dieses Enzym in einer Forschungsarbeit von Kjell Agner im Jahre 1958. Aufgrund seiner grünlichen Färbung wurde das Enzym zunächst als Verdoperoxidase bezeichnet. Weitere Arbeiten zeigten, dass das Vorkommen dieses Enzyms der myeloiden Zelllinie vorbehalten ist und somit änderte sich der Name in Myeloperoxidase. Die Expression dieses Enzyms ist hauptsächlich auf die neutrophilen Granulozyten und Monocyten beschränkt (Cowland and Borregaard 1999), wobei die Expression in Monozyten deutlich geringer ist als in neutrophilen Granulozyten. So macht das Enzym MPO 2 bis 5% der Gesamtproteinkomposition in neutrophilen Granulozyten aus (Klebanoff 2005), wodurch dieser Zelltyp die Hauptquelle des MPO darstellt. Die neutrophilen Granulozyten spielen eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunantwort. Kommt es innerhalb des Körpers zu einer Akkumulation von pathogenen Fremddorgansimsen oder Gewebetrümmern, so werden neutrophile Granulozyten als Teil der Immunabwehr über das vaskuläre System zu dem Infektionsherd rekrutiert. Dabei rollen die neutrophilen Granulozyten entlang des Gefäßbetts in Richtung des Blutstroms, um schließlich am Infektionsherd fest an das Endothel zu binden. Zunächst erfolgt dabei eine transiente Adhäsion der Neutrophilen an die Endothelzellen. Dies wird unter anderem ermöglicht durch die erhöhte Expression von P- und E-Selektinen in Endothelzellen. Diese Adhäsionsmoleküle translozieren und akkumulieren an der apikalen Zellmembran der Endothelzellen und ermöglichen durch

Interaktion mit Liganden des neutrophilen Granulozyten, wie beispielsweise dem E-selectin Ligand-1 (ESL-1) und dem P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) eine transiente Adhäsion (Ley et al. 2007, Petri et al. 2008). Durch Interaktionen zwischen Integrinen wie dem CD11b auf der Oberfläche des neutrophilen Granulozyten und dem Interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM1) auf der Oberfläche der Endothelzellen kommt es dann zu einer festen Anbindung der Leukozyten an das Endothel.

Es zeigte sich jedoch, dass auch das von neutrophilen Granulozyten sequestrierte MPO bei der Adhäsion dieser Zellen an die Endothelzellen von entscheidender Bedeutung ist. Die Myeloperoxidase zeichnet sich durch eine sehr argininreiche Aminosäurezusammensetzung aus, wodurch das Protein sehr basisch wird. Dies ist der Grund, warum MPO unter physiologischen Bedingungen eine hochkationische Oberfläche aufweist (isoelektrischer Punkt >10). Diese Eigenschaft ermöglicht es dem MPO, als Bindeglied zwischen Endothelzelle und Leukozyt zu fungieren. So hebt das MPO mithilfe seiner hochkationischen Oberfläche durch Bindung an die anionische Glykokalix der beiden Zelltypen die elektrostatische Abstoßung zwischen Endothelzelle und neutrophilem Granulozyt auf (Klinke et al. 2011). Hat der neutrophile Granulozyt durch Bindung an das Endothel die vaskuläre Umgebung des Entzündungsherds erreicht, beginnen die Immunzellen durch die Gefäßwand an den Ort der Gewebeinfektion zu transmigrieren. Dabei nutzen die Neutrophilen die Junctions zwischen den Endothelzellen (Phillipson and Kubes 2011). Am Infektionsherd angekommen, sind Neutrophile Granulozyten in der Lage, Bakterien zu phagozytieren. Neben der Phagozytose sind die neutrophilen Granulozyten unter bestimmten Bedingungen auch in der Lage Pathogene über die sogenannte NETose zu eliminieren. Dabei wird die neutrophile DNA zusammen mit antimikrobiellen Molekülen wie Proteasen, Histonen aber auch der Myeloperoxidase freigesetzt und es entstehen fangnetzartige Gebilde, die sogenannten NETs, wodurch das Bakterium fixiert wird (Brinkmann et al. 2004).

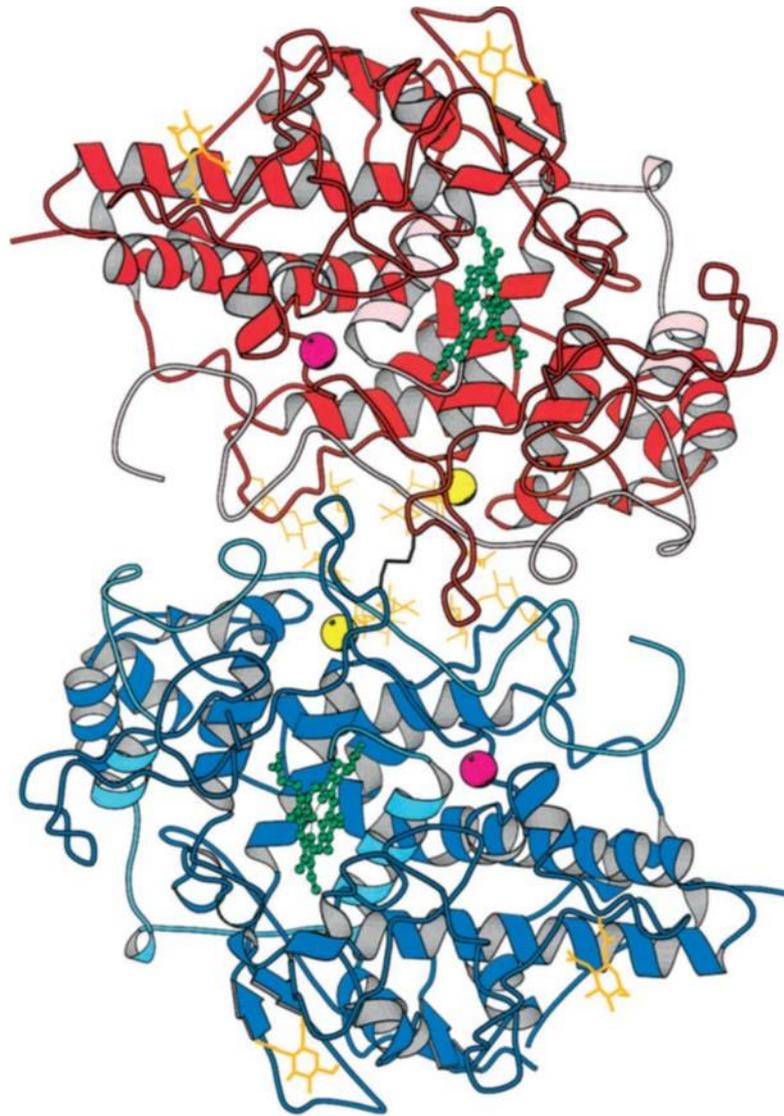


Abb. 1.6: Quartärstruktur des MPO Dimers: Die großen Polypeptide sind in rot und blau farblich markiert, wohingegen die kleineren Polypeptide in hellrot bzw. hellblau dargestellt sind. Das Häm ist grün, Carbohydrat orange, Calcium violett und Chlorid in gelbem Farbton markiert. Die Disulfidbrücke der beiden Untereinheiten ist durch schwarze Färbung gekennzeichnet.

Neben den relevanten nichtkatalytischen Eigenschaften von MPO im Zusammenhang mit der Rekrutierung von Leukozyten besitzt die Myeloperoxidase auch eine bedeutsame katalytische Aktivität. Die aktive Myeloperoxidase besteht aus einem Homodimer aus je 2 schweren α -Untereinheiten und 2 leichten β -Untereinheiten, wobei jedes Monomer aus α - und β Untereinheit ein Häm M als prosthetische Gruppe trägt. Mit dieser prosthetischen Gruppe katalysiert MPO ein breites Spektrum an physiologisch relevanten Redoxreaktionen (siehe Abb. 1.7). Dabei besteht ein komplettes, enzymatisch aktives MPO System aus MPO, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und einem Reduktionsmittel. Physiologisch relevante Reduktionsmittel dieses MPO-Systems sind zumeist Halogen-

Ionen, insbesondere Chlorid-Ionen. In diesem Zusammenhang soll lediglich auf zwei Reaktionen mit besonderer physiologischer Bedeutung eingegangen werden. Zunächst ist die Bildung der hypochlorigen Säure zu nennen, einem äußerst reaktiven Oxidans. Dabei wird MPO durch H_2O_2 oxidiert und somit aktiviert. Eine entsprechende Gegenreaktion, die Reduktion des MPO verläuft unter Oxidation von Chlorid und führt zur Bildung von hypochloriger Säure über den so genannten Halogenierungs-Zyklus. Eine weitere bemerkenswerte Reaktion von MPO ist die Oxidation von NO zu NO_2^- entweder durch direkte Reaktion mit MPO oder vermittelt durch Reaktion von NO mit Radikalen wie dem Tyrosyl-Radikal. Diese Radikal-Intermediate entstehen bei der Reaktion geeigneter leicht oxidierbarer Moleküle mit der oxidierten Form von MPO im so genannten Peroxidase-Zyklus (Abu-Soud and Hazen 2000, Eiserich et al. 2002).

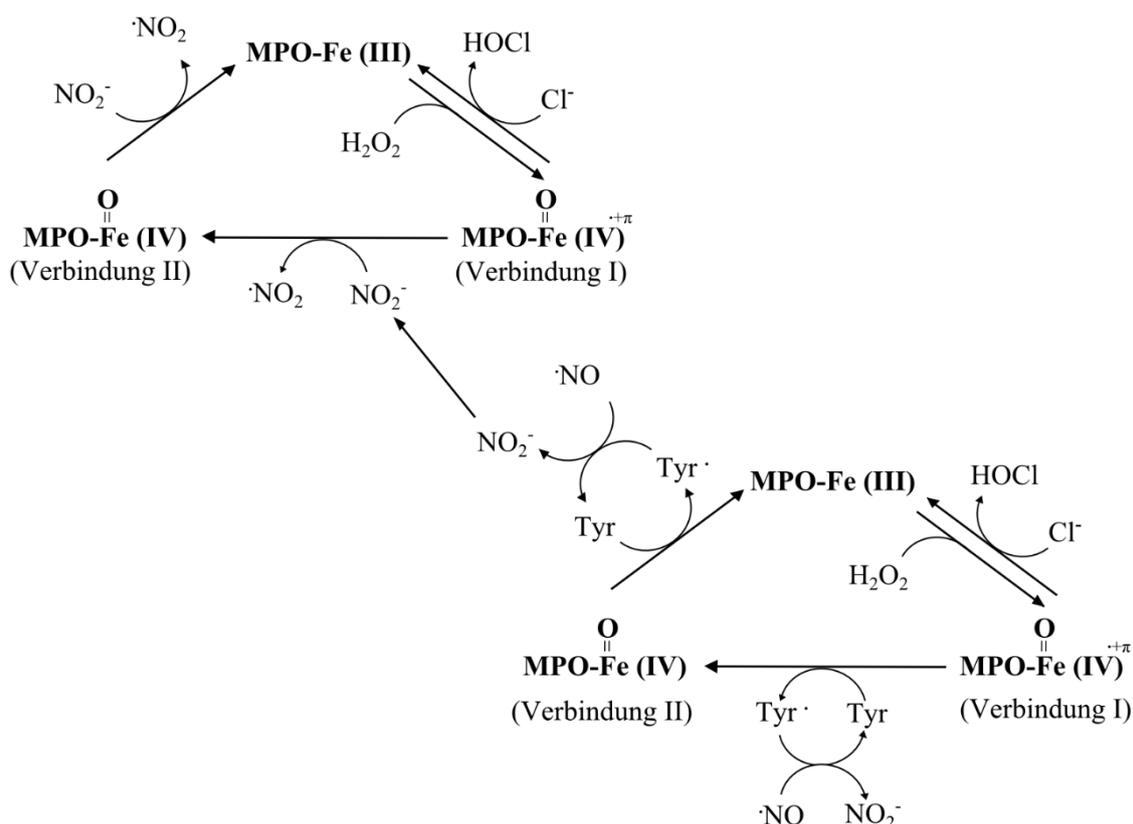


Abb. 1.7: Durch MPO katalysierte Redoxreaktionen: Im Halogenierungszyklus wird MPO zunächst durch Reaktion mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidiert, um dann im Gegenzug durch Oxidation von Chlorid Hypochlorige Säure (HOCl) zu bilden. Im Peroxidase Zyklus reagiert das oxidierte MPO mit leicht oxidierbaren Molekülen wie Tyrosin um Radikal-Intermediate zu bilden, die wiederum mit NO reagieren können.

1.3.1 Myeloperoxidase und kardiales Remodeling

Aufgrund der Eigenschaft von MPO, enzymatisch die stark bakterizid wirkende hypochlorige Säure zu bilden, wurde zu Beginn der Erforschung von MPO diesem eine primär bakterizide Funktion zugesprochen. In den letzten zwei Jahrzehnten jedoch konnte diesem Enzym zudem eine entscheidende Funktion bei chronisch inflammatorischen Prozessen im Zusammenhang mit vielen kardiovaskulären Krankheiten nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass MPO profibrotische Eigenschaften im Vorhofmyokard besitzt. So agiert MPO als Mediator des Vorhofflimmerns. Dies geschieht über die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase 9. Dabei verläuft die Aktivierung dieses eminent wichtigen Enzyms in der Entwicklung von atrialer und ventrikulärer Fibrose über eine MPO vermittelte Oxidierung eines Cysteins in der MMP (Fu et al. 2001). Somit trägt MPO entscheidend zur Vulnerabilität von Vorhofflimmern bei (Rudolph et al. 2010). Darüber hinaus zeigte sich, dass MPO auch Bedeutung in pathologischen Vorgängen innerhalb des ventrikulären Myokards besitzt. So ist MPO involviert in die Progression des linksventrikulären Remodelings nach akutem Myokardinfarkt. Dies erfolgt durch oxidative Inaktivierung des Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) mithilfe von MPO gebildeter hypochloriger Säure. PAI-1 hat durch seine Fähigkeit, die Expression von MMPs zu erhöhen, funktionelle Bedeutung in der Entstehung von Fibrose und damit für das kardiale Remodeling (Takeshita et al. 2004). So führt eine MPO Defizienz in einem Mausmodell für einen akuten Myokardinfarkt zu verminderter Leukozyten-Infiltration und damit verbunden zu einer Verbesserung der reduzierten linksventrikulären Herzfunktion (Askari et al. 2003).

Es konnte zudem ein Zusammenhang zwischen MPO und der Herzinsuffizienz im Patienten aufgezeigt werden. So zeigen Studien, dass Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz erhöhte MPO Plasmaspiegel aufweisen (Rudolph et al. 2007). Darüber hinaus zeigt die Studie, dass die Menge an frei in der peripheren Zirkulation vorkommenden MPO mit der Ausprägung der Herzinsuffizienz, klassifiziert nach NYHA korreliert (Michowitz et al. 2008). Zusammen mit den mechanistischen Verbindungen zwischen MPO und kardialem Remodeling drängt diese Studie die Frage auf, ob ein mechanistischer Zusammenhang zwischen der Myeloperoxidase und dem kardialen Remodeling bei der dilatativen Kardiomyopathie besteht.

1.3.2 MPO und vaskuläre Funktion

Im Zuge erhöhter vaskulärer Inflammation wird das MPO zunächst in der Zirkulation durch die neutrophilen Granulozyten sezerniert, anschließend erfolgt in der Nähe des Infektionsherds die Bindung an das Endothel. Schließlich erfolgt die Transzytose und Akkumulation von MPO in den subendothelialen Raum, also jenen Bereich, den das von NO-Synthasen gebildete NO nach Sequestration aus den Endothelzellen passieren muss, um seine indirekte vasodilatierende Wirkung in den glatten Muskelzellen des Gefäßes zu entfalten. MPO hingegen ist in der Lage die vaskuläre NO-Bioverfügbarkeit zu reduzieren. Dies geschieht auf verschiedenen Ebenen. Zunächst ist MPO in der Lage, NO unter Bildung von NO_2^- zu oxidieren (Abu-Soud and Hazen 2000, Eiserich et al. 2002). Darüber hinaus hat MPO auch indirekten Einfluss auf die NO-Bioverfügbarkeit. So kann, wie oben beschrieben, zum einen NO auch durch von MPO gebildete Radikalintermediate wie Ascorbyl- oder Tyrosyl-Radikale oxidiert werden (Eiserich et al. 2002). Zum anderen führen unter anderem reaktive Stickstoffspezies, wie sie mithilfe von MPO synthetisiert werden, zu einem Entkopplern der NO-Synthase, sodass dieses Enzym anstelle von NO Superoxid synthetisiert wird (Zou et al. 2002). Weiterhin steht auch das durch die Myeloperoxidase gebildete HOCl mit einer Verringerung der NO-Bioverfügbarkeit in Zusammenhang. So reagiert HOCl mit L-Arginin unter Bildung von chlorinierten Produkten, die wiederum die eNOS inhibieren (Zhang et al. 2001). Darüber hinaus führt MPO zu einer Erhöhung der Konzentration von asymmetrischem Dimethylarginins (ADMA), einem potenten Inhibitor der eNOS. Das im Plasma vorkommende ADMA wird durch die Dimethylamino-Dimethylargininhydrolase (DDAH) metabolisiert. Jedoch ist die Aktivität der DDAH aufgrund seiner Sulfhydrylgruppe im reaktiven Zentrum stark beeinflusst durch oxidativen Stress, so wird DDAH durch MPO oxidiert und damit inhibiert (Stuhlinger et al. 2001, van der Zwan et al. 2011, von Leitner et al. 2011).

Die Tatsache, dass MPO durch verschiedene Mechanismen in der Lage ist, Einfluss auf die Menge des NO innerhalb der Zirkulation zu nehmen, versetzt das Enzym in die Lage pathologische Änderungen der endothelabhängigen Gefäßfunktion zu erwirken.

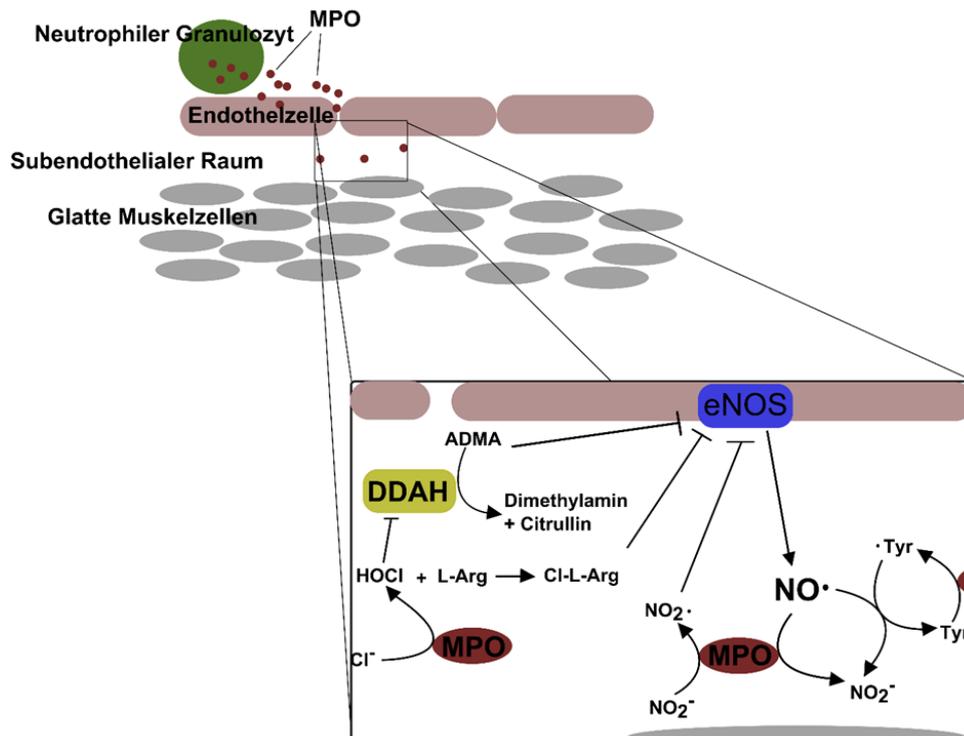


Abb. 1.8: Effekte von MPO auf die NO-Bioverfügbarkeit im subendothelialen Raum: Eine direkte Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit durch MPO erfolgt über Katalyse der Oxidation von NO zu NO_2^\cdot . Die indirekte Reduktion der vaskulären NO-Konzentration findet sowohl durch Oxidation von NO mithilfe von MPO gebildetem Ascorbyl und Tyrosylradikal statt, als auch durch Inhibition der endothelialen NO-Synthese (eNOS). Zum einen führt die Reaktion von eNOS mit von MPO gebildeten reaktiven Stickstoffspezies zur Entkopplung des Enzyms. Weiterhin reagiert durch MPO gebildete hypochlorige Säure mit L-Arginin unter Bildung von chlorinierten Produkten, die wiederum die eNOS inhibieren. Auch ein MPO vermittelter Anstieg der Konzentration des asymmetrischen Dimethylarginins (ADMA) durch Inhibition der Dimethylamino-Dimethylargininhydrolase (DDAH) sorgt für eine Inhibition der eNOS.

Dies wird untermauert durch Untersuchungen in verschiedenen Versuchstiermodellen. An einem murinen Modell für eine akute Endotoxämie, induziert durch Lipopolysaccharid (LPS), konnte gezeigt werden, dass *in vivo* eine MPO Defizienz vor LPS induzierter endothel-vermittelter Verschlechterung der Gefäßfunktion schützt (Eiserich et al. 2002). Des Weiteren konnte ein reduzierender Einfluss von MPO auf die koronare Perfusion in einem porcinen Tiermodell gezeigt werden (Rudolph et al. 2012).

Die Erkenntnis, dass in Patienten mit diagnostizierter Herzinsuffizienz der MPO Plasmaspiegel signifikant erhöht ist (Rudolph et al. 2007, Michowitz et al. 2008) zusammen mit der Eigenschaft von MPO, die NO-Bioverfügbarkeit zu reduzieren, zeigt, dass MPO auch im Rahmen dieser Erkrankung zu einer inflammatorisch bedingten Verschlechterung der Endothelfunktion beitragen kann. So zeigte sich im Patienten eine

negative Korrelation zwischen dem MPO Plasmaspiegel und der Fähigkeit der Gefäße, zu relaxieren (Rudolph et al. 2012).

1.4 Fragestellung der Arbeit

In dieser Dissertation soll nun die Frage überprüft werden, ob und inwieweit das Enzym Myeloperoxidase mechanistisch involviert ist in die Progression einer Herzinsuffizienz, bedingt durch eine hereditäre dilatative Kardiomyopathie im Mausmodell. Dabei soll sowohl ein möglicher Effekt von MPO über die Beeinflussung des myokardialen Remodelings, als auch der vaskulären Funktion untersucht werden. Dies könnte einen Beitrag leisten zur Etablierung eines neuen therapeutischen Ansatzes für die Herzinsuffizienz.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Zentrifugen	5810R	Eppendorf
Brutschränke	Safefrow 188	Euroclone
Sicherheitswerkbänke	Class II Type A/B3	The Baker Company
WB System	PerfectBlue Tank Elektroblotter	Peqlab
SDS Gel Kammer	PerferctBlue TWin	Peqlab
Agarose Gel Kammer	PerfectBlue Gelsystem	Peqlab
Western Blot Imager	Phusion FX Vilber Lourmat	Peglab
UV Tisch	Phusion FX Vilber Lourmat	Peglab
Mirkoskop/ IF-Mikroskop	BZ 9000	Keyence
RT System	CFX 96 RT System	Biorad
Thermocycler	T3 Thermocycler	Biometra
Inkubator	Multiscan FC	Thermo Scientific
Spektrophotometer	Nanodrop 2000c	Thermo Scientific
Datenerfassungssystem	PowerLab data aquisition device	ADInstruments
Peristaltische Pumpe	Reglo Digital	Ismatec
Konduktanz-Katheter	Modell SPR 839	Millar Instruments
Druckmesser	Einweg-Druck-Transducer	Braun
Stromgenerator	peqPOWER E300	Peqlab

2.2 Puffer und Lösungen

2.2.1 Puffer und Lösungen für Proteinbiochemische Methoden

Picrosirius Red Lösung	500 mg ad 500 mL	Sirius Red F3B gesättigt wässrige Pikrinsäure
Proteinlyse-Puffer	0,121 g 4,28 g 0,057 g 0,292 g Ad 50 mL <u>pH 7,5</u>	Tris-HCl Saccharose EGTA EDTA Aqua bidest.
Proteinlyse-Lösung (zum direkten Gebrauch)	10 mL 1 50 µL 50 µL 0	Proteinlysepuffer Tablette Complete PMSF (0,1 M) Triton X 100
10x SDS-PAGE Laufpuffer	30,2 g 144 g 7,44 g 6 g Ad 1000 mL	Tris Glycin EDTA SDS Aqua bidest.
1x SDS-PAGE Laufpuffer	100 mL Ad 1000 mL	10x SDS PAGE Laufpuffer Aqua bidest.
4x Sammelgel-Puffer	30,3 g 1,5 g <u>pH 6,8</u> 2 g Ad 500 mL	Tris (0,5 M) EDTA SDS Aqua bidest.

4x Trenngel-Puffer	90,85 g 1,5 g <u>pH 8,8</u> 2 g Ad 500 mL	Tris EDTA SDS Aqua bidest.
Blotting-Puffer	3,03 g 14,4 g 200 mL Ad 1000 mL	Tris Glycin Methanol Aqua bidest.
10x TBS	24,2 g 80 g Ad 1000 mL <u>pH 7,6</u>	Tris Base NaCl Aqua bidest.
1x TBS-T	100 mL 1 mL Ad 1000 mL	10x TBS Tween-20 Aqua bidest.
Blockpuffer für Western Blot	5 g Ad 100 mL	Magermilchpulver 1x TBS-T
Blockpuffer für Immunhistologie		10% Ziegenserum in 0,1 % Triton X-100/PBS
<i>Stripping</i> Puffer 1	15,1 g Ad 1000 mL <u>pH 2,5</u>	Glycin Aqua bidest.
<i>Stripping</i> Puffer 2	6,057 g Ad 1000 mL <u>pH 7,5</u>	Tris Aqua bidest.

4x Laemmli Probenpuffer	5 mL	0,5 M Tris-HCl pH 6,8
	4 mL	Glycerol
	8 mL	10 % SDS

2.2.2 Puffer und Lösungen für Gentechnische Methoden

TBE Puffer 1x	10,8 g	Tris
	5,5 g	Borsäure
	0,7 g	EDTA
	Ad 1000 mL	Aqua bidest.
2% Agarosegel	2 g	Agarose
	Ad 100 mL	TBE Puffer

2.2.3 Puffer und Lösungen für physiologische Untersuchungen der Maus

Krebs-Henseleit-Solution (10x)	68,4 g	NaCl
	3,48 g	KCl
	1,63 g	KH ₂ PO ₄
	0,14 g	MgSO ₄ ·7H ₂ O
	Ad 1000 mL	Aqua bidest.
Krebs-Henseleit Solution (1x)	100 mL	Krebs-Henseleit-Solution (10x)
	Ad 1000 mL	Aqua bidest.
	2 g	NaHCO ₃
	1,8 g	Glucose
	367 mg	CaCl ₂ ·2H ₂ O

2.3 Proteinstandards für Western Blot

- PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)
- PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific)

2.4 DNA Standards für die Agarosegelelektrophorese

- GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)

2.5 Protein-Inhibitoren

- *cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche)
- *PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche)

2.6 Verwendete Antikörper

2.6.1 Primärantikörper

Für Western Blots

eNOS	Cell Signaling
pVASP/VASP	ImmunoGlobe
GAPDH	Cell Signaling

Für Immunhistologien

CD31	R&D Systems
------	-------------

2.6.2 Sekundärantikörper

Für Western Blots

Anti-Kaninchen, konjugiert	HRP Vector
-------------------------------	------------

Für Immunhistologien

Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488 konjugiert	life technologies
--	-------------------

3 Methoden

3.1 Protein-biochemische Methoden

3.1.1 Proteinaufreinigung aus Gewebe

Um die Proteine aus Gewebe aufzureinigen zu können, muss es zunächst aufgeschlossen werden. Das gefrorene Gewebe wird manuell zermörsert, dabei wird darauf geachtet, dass Mörser und Stößel mithilfe von flüssigem Stickstoff permanent gekühlt sind. Anschließend wird das zermörserte Gewebe in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Proteinlyse-Lösung versetzt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Dabei wird die Suspension alle 15 Minuten gevortext. Anschließend wird diese für 10 Minuten bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Das Proteinlysate befindet sich im Überstand und wird vorsichtig abpipettiert und im Anschluss aliquotiert. Ein Teil des Proteinlysats wird für eine Proteinbestimmung verwendet. Der Anteil, der für Western Blot Analysen verwendet wird, wird mit 4x Laemmli versetzt und für fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wird die Probe bei -80°C weggefroren.

3.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird mithilfe des *Pierce BCA Protein Assay Kits* (Thermo Scientific) gemäß des dem Kit beigelegten Protokoll durchgeführt. Dabei erfolgt die Detektion und Quantifizierung kolorimetrisch. Zunächst reagieren zweiwertige Kupfer-Ionen quantitativ mit Protein und es bilden sich einwertige Kupfer-Ionen, die dann einen Komplex mit der eingesetzten Bicinchoninsäure bilden. Die daraus resultierende Absorption des Komplexes lässt sich bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch auswerten. Für die Proteinbestimmung werden die Proteinlysate zunächst 1:50 in Aqua bidest. verdünnt und anschließend mit der Reaktionslösung für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgt die photometrische Quantifizierung bei 562 nm unter Verwendung einer Standardkurve.

3.1.3 Auftrennung von isolierten Proteinen mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen entlang ihres Molekulargewichts. Dies ist möglich durch den Einsatz des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), einem Monoester der Sulfatsäure. Bei Zugabe bindet SDS mit seiner hydrophoben Alkylketten an die entsprechenden Proteine. Neben einer Denaturierung der Proteine hat dies zur Folge, dass die Eigenladung der Proteine vollständig durch die negative Ladung des SDS überdeckt wird. Da SDS-Proteinkomplexe ein konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis aufweisen, bewegen sich die SDS-Proteinkomplexe umgekehrt proportional zu ihrem Molekulargewicht durch ein elektrisches Feld.

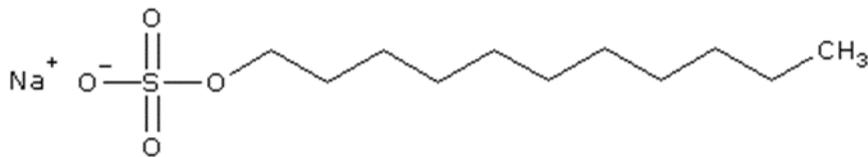


Abb. 3.1: Strukturformel des Natriumdodecylsulfats (SDS)

Die Auftrennung der Proteine erfolgt bei der SDS-PAGE in einem Polyacrylamidgel. Alle für dieses Projekt durchgeführten SDS-PAGES werden mithilfe des diskontinuierlichen Systems durchgeführt. Dabei werden ein Trenngel mit einem Acrylamidanteil von 10% und ein Sammelgel mit einem Acrylamidanteil von 4% verwendet. Das Sammelgel dient dazu, die Probe anzukonzentrieren, während die Proteine im Trenngel entlang ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Nach Gießen des Gels, wird dieses in der mit Laufpuffer gefüllten SDS-Gel-Kammer fixiert und die Proben werden aufgetragen. Anschließend wird eine Spannung von 60 V angelegt bis die Proben das Sammelgel passiert haben. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgt dann bei 100 V.

	Sammelgel	Trenngel
Sammelgelpuffer 4x	4 mL	-
Trenngelpuffer 4x	-	6,8 mL
H ₂ O bidest	8 mL	6,3 mL
Acrylamid (30%)	4 mL	13,8 mL
10% SDS	160 µL	300 µL
10% APS	96 µL	300 µL
Temed	16 µL	13,2 µL

Tab. 3.1: Herstellung eines für das diskontinuierliche System erforderlichen Sammelgels (4% Acrylamidanteil) und Trenngels (10% Acrylamidanteil)

3.1.4 Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran

Um die mithilfe der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine einem immunologischen Nachweis unterziehen zu können, werden sie anschließend elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dies erfolgt durch das NassBlot-Verfahren (siehe Abb. 3.2). Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran erfolgt bei 100 mA für 90 Minuten. Um den Erfolg des Transfers überprüfen zu können, werden die auf der Membran befindlichen Proteine nachfolgend mit Ponceau S angefärbt.

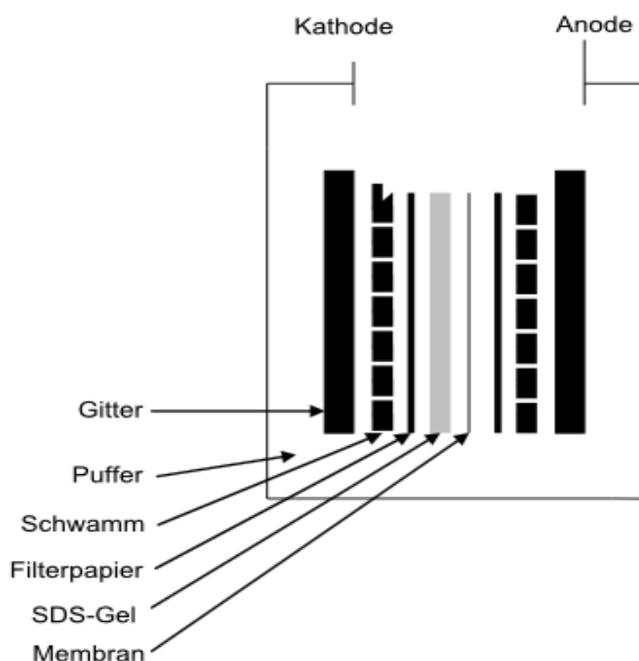


Abb. 3.2: Schematische Darstellung eines Aufbaus für das Nassblot-Verfahren: SDS-Gel und Nitrocellulose-Membran werden von Filterpapier begrenzt, das wiederum mit Schwämmen ummantelt wird. Anschließend wird die Anordnung mit einem Gitter fixiert und in eine mit Blot-Puffer gefüllte Nassblot-Kammer eingeführt und eine Stromstärke von 100 mA angeschlossen.

3.1.5 Immunoblotting

Anhand des Immunoblottings lässt sich eine Aussage über Vorhandensein und relative Menge eines gewünschten Proteins einer Probe treffen. Dabei wird das gesuchte Protein durch den Einsatz spezifischer Antikörper markiert und mithilfe einer chemischen Reaktion quantifiziert. Um die Spezifität der eingesetzten Antikörper zu erhöhen, werden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran unter Einsatz von Milchpulver oder bovinem Serum Albumin abgesättigt. Dafür wird die Membran mit 5% Milch/TBS-T bzw. 3% BSA/TBS-T für 1 h unter ständigem Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation der auf der Nitrocellulose-Membran immobilisierten Proteine mit einem gegen das gesuchte Protein spezifischen Primärantikörper ü.N. bei 4°C. Nach drei 20-minütigen Waschschritten mit TBS-T kommt ein *Horseradish Peroxidase* gekoppelter Sekundärantikörper zum Einsatz. Bei der anschließenden Chemilumineszenzreaktion wird im Puffer enthaltenes Wasserstoffperoxid (H₂O₂) durch die Antikörper-gekoppelte Peroxidase reduziert, während Luminol oxidiert wird. Es wird sowohl das *Amersham ECL PrimeWestern Blotting Detection Reagent* (GE Life Sciences) als auch das *SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific) eingesetzt. Sowohl die Detektion als auch die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgt mithilfe des *Phusion FX Vilber Lourmat* (PeqLab).

3.1.6 Ablösen von auf der Nitrocellulosemembran gebundener Antikörper

Durch das Ablösen der auf dem Blot gebundenen Antikörper besteht die Möglichkeit weitere immunologische Nachweise mit derselben Membran durchzuführen. Dabei wird die Membran zunächst zweimal 20 Minuten in *Stripping* Puffer 1 und anschließend zweimal 20 Minuten in *Stripping* Puffer 2 unter ständigem Rühren inkubiert. Nach einem fünfminütigen Waschschriff mit TBS-T kann die Membran anschließend wieder mit Blockierlösung geblockt und mit gewünschten Antikörpern behandelt werden.

3.1.7 Immunfluoreszenz

Mittels dieser Methode können Proteine in Zellen oder Gewebeschnitten sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. Dabei ist der erste Antikörper spezifisch für das gesuchte Protein, während der zweite Fluorochrom gekoppelte Antikörper die spezies-spezifischen IgGs des ersten Antikörpers erkennt und als Epitop bindet (siehe Abb. 3.3). Für die Immunfluoreszenz wird das Gewebe nach der Entnahme in Tissue-Tek eingebettet und sofort auf flüssigem Stickstoff als Cryoblock schockgefroren. Bis zur Nutzung erfolgt die Lagerung dann bei -80°C . Für die Immunfluoreszenz werden $5\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte des Cryoblocks angefertigt. Anschließend tauen die Schnitte für 5 Minuten bei RT an. Nachfolgend wird das Gewebe auf dem Objektträger für 15 Min mit 3,7 % Formaldehydlösung fixiert. Daraufhin erfolgen drei Waschschrte mit PBS für jeweils fünf Minuten bei Raumtemperatur. Als nächster Schritt wird das Gewebe permeabilisiert. Dafür werden die Schnitte für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einer 0,1 % Triton X-100/PBS Lösung inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wird das Gewebe daraufhin mit 10% Ziegen Serum in 0,1 % Triton X-100/PBS Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wird der Gewebeschnitt mit einem gegen das gesuchte Protein spezifischen Primärantikörper, verdünnt in Blockierlösung, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgen wieder drei Waschschrte mit PBS für jeweils 5 Minuten. Als nächstes wird der Gewebeschnitt mit einem Fluorochrom gekoppelten Sekundärantikörper, der die IgGs des Erstantikörpers spezifisch bindet, ebenfalls für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Auch dieser Antikörper wird in Blockierlösung verdünnt. Daraufhin erfolgen zwei Waschschrte mit PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit. Um die Zellkerne anzufärben wird der Gewebeschnitt daraufhin mit DAPI ($1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ PBS) für 15 Minuten bei RT in Dunkelheit inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrten mit PBS für jeweils fünf Minuten wird der Objektträger schließlich mit *Fluorescence Mounting Medium* (Dako) eingedeckelt und mikroskopiert.

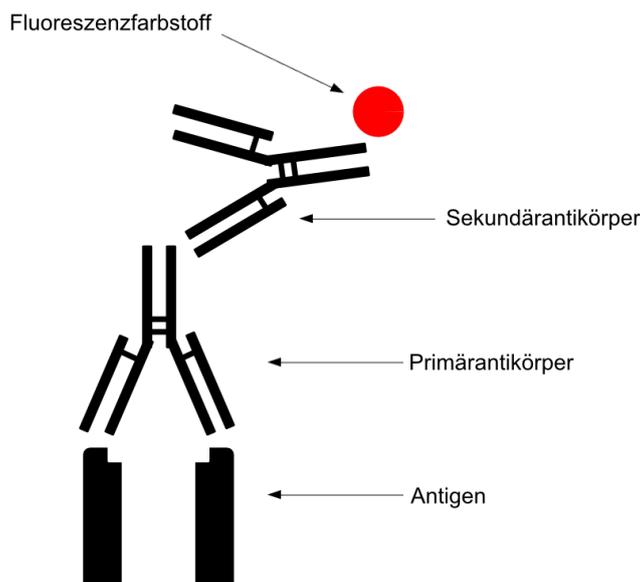


Abb. 3.3: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz: Ein Primärantikörper bindet spezifisch an das zu untersuchende Protein. Ein Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper bindet spezies-spezifisch die IgGs des Primärantikörpers.

3.1.8 Picrosirius Rot Färbung

Mithilfe der Picrosirius Rot Färbung lässt sich Kollagen innerhalb eines Gewebeschnittes anfärben, um Rückschlüsse auf den Grad der Fibrosierung des gewünschten Gewebes ziehen zu können. Kollagenmoleküle sind charakterisiert durch ein hohen Anteil an basischen Aminosäuren, was sie in die Lage versetzt mit dem aziden Azofarbstoff Sirius Rot zu reagieren. Eine Reaktion von Kollagen mit Sirius Rot führt zu einer erhöhten Doppelbrechung parallel angeordneter Kollagenfasern. Dieser Umstand erlaubt es fibrosierte Areale eines Gewebeschnitts unter Verwendung der Durchlichtmikroskopie sichtbar zu machen (Montes and Junqueira 1991).

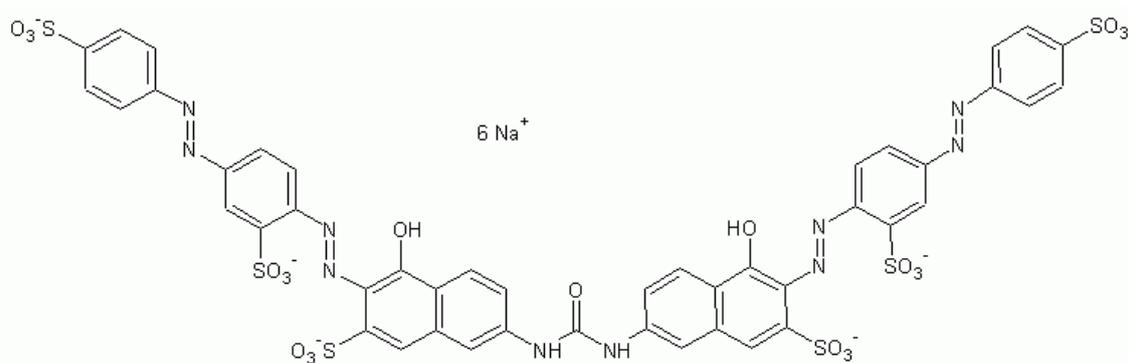


Abb. 3.4: Strukturformel des Sirius Rot Farbstoffs: Durch die sechs Schwefeltrioxid (SO_3^-) Gruppen kann Sirius Rot mit basischen Resten des Kollagens interagieren.

In dieser Arbeit wird die Picrosirius Red Färbung mit Paraffingewebeschnitten durchgeführt. Dafür wird das entnommene Gewebe zunächst für 24 Stunden in Formalin inkubiert, anschließend in PBS überführt, entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit den auf diese Weise erhaltenen Paraffinblöcken werden dann fünf µm dicke Schnitte angefertigt. Für die Färbung müssen die Schnitte zunächst entparaffinisiert werden. Dafür werden diese für 20 Minuten in Xylol inkubiert und daraufhin je eine Minute in zunächst in 100% Ethanol, dann in absteigender Konzentrationsreihe in 95% Ethanol und schließlich in 70% Ethanol inkubiert, um danach für eine Minute in Aqua bidest. inkubiert zu werden. Im weiteren Verlauf erfolgt eine Färbung der Gewebeschnitte mit Weigert's Eisenhämatoxin für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Dann wird der Schnitt mehrmals unter zu wechselndem, warmem Leitungswasser abgespült. Zur Entfärbung des Zytoplasmas wird das Gewebe anschließend in 1% HCl / 96% Ethanol inkubiert und wieder unter zu wechselndem, warmem Leitungswasser abgespült. Anschließend erfolgt die Färbung der Schnitte mittels der Picrosirius Red Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach werden die Schnitte zweimal in 0,5% Essigsäure gewaschen und auf Filterpapier getrocknet. Im Anschluss erfolgt eine Dehydrierung durch dreimaliges Inkubieren in 96% Isopropanol für jeweils 1 Minute bei Raumtemperatur. Zuletzt werden die Gewebeschnitte mit einem lösungsmittelhaltigen Eindeckmittel eingedeckt und mikroskopiert. Die Quantifizierung des Fibrosegrads erfolgt durch Ermittlung der Fibrose-positiven Areale im Ventrikel durch die Software *IVision*.

3.1.9 IBA-1 Färbung

Zur Untersuchung der Makrophageninfiltration in den Ventrikel wurde eine Färbung auf das ionisierte Calcium bindende Adaptermolekül 1 (IBA1) durchgeführt. IBA1 wird spezifisch in Makrophagen exprimiert. Die Färbung erfolgte auf 5 µm dicken Paraffinschnitten und wurde in der Mauspathologie *Facility* des Uniklinikums Hamburg Eppendorf nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgt durch verblindete Zählung der positiv gefärbten Makrophagen im Ventrikel pro Sichtfeld.

3.1.10 *In vitro* Quantifizierung der MPO-Konzentration

Die Menge an MPO im Plasma und im Herzperfusat wird mithilfe des HK210 *Mouse MPO ELISA Kit* (Hycult biotech) nach dem Kit beigefügten Protokoll ermittelt. Bei

diesem ELISA sind die *Wells* mit einem anti-Maus MPO-Antikörper beschichtet, sodass eine Anbindung des in der Probe enthaltenen MPO an das *Well* stattfindet. Anschließend bindet ein *Biotinylated Tracer Antibody* das im *Well* fixierte MPO. Daraufhin bindet ein eingesetztes Streptavidin-Peroxidase Konjugat mit dem *Biotinylated Tracer Antibody* und reagiert mit Tetramethylbenzidin (TMB), was zu einer Oxidation des TMB führt, welches dann eine blaue Färbung entwickelt. Nach Zugabe der Stop-Lösung färbt sich der Reaktionsansatz gelb und absorbiert bei 450 nm Wellenlänge. Diese Absorption kann mithilfe eines Spektrophotometers ermittelt werden. Durch die Verwendung einer Standardkurve kann dann die MPO-Konzentration in den Proben errechnet werden. Bei der Messung von Plasmaproben, werden diese 1:4 verdünnt eingesetzt und anschließend quantifiziert. Die Herzperfusate hingegen werden aufgrund der hohen MPO-Konzentration zuvor 1:8 in PBS verdünnt und anschließend gemessen.

3.2 Gentechnische Methoden

3.2.1 Arbeiten mit DNA

3.2.1.1 DNA-Isolation aus Gewebe

Die DNA-Isolation erfolgt aus Schwanzspitzenbiospien der Versuchstiere. Verwendet wird hierfür das *RNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen). Die Isolation der DNA wurde nach dem dem Kit beigefügten Protokoll durchgeführt.

3.2.1.2 Bestimmen der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wird photometrisch ermittelt. Dabei wird die Absorption bei 260 nm Wellenlänge mithilfe eines Photometers gemessen. Durch das Lambert-beersche Gesetz ist die Adsorption bei 260 nm proportional zur DNA-Menge in der gemessenen Probe. Dabei entspricht ein OD von 1 bei 260 nm einer DNA-Konzentration von 50 µg/mL. Die Reinheit der DNA wird durch den Quotienten A_{260}/A_{280} ermittelt.

3.2.1.3 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Bei der Arbeit mit Knockout-Maus-Linien ist es unablässig, den Genotyp der Individuen zu bestimmen. Für die Genotypisierung kommt die PCR-Methode zum Einsatz. Die PCR liefert die Möglichkeit, einen bestimmten Bereich eines DNA-Doppelstrangs zu amplifizieren. Diese Vervielfältigung erfolgt enzymatisch durch eine eingesetzte DNA-Polymerase. Dabei werden spezifische Primer, welche den zu amplifizierenden Bereich im DNA-Doppelstrang flankieren, eingesetzt. Für die Genotypisierung des MLP-KO wird die *Phusion High Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs) verwendet. Für die Genotypisierung bezüglich des MPO-KO wird der HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) verwendet.

Primer 1	1 µL (Endkonz. 0,5 µM)
Primer 2	1 µL (Endkonz. 0,5 µM)
Phusion Polymerase	0,2 µL (0,02 U/µL)
5x Phusion Puffer	4 µL
dNTP (10mM)	0,4 µL
DNA	5 ng
Aqua bidest.	Ad 20 µL

Tab. 3.2: Pipettierschema für die MLP-WT/KO PCR

Primer für die MLP-WT PCR

- **Stup:** GAA TAG CCT CAG AAA GTG GC
- **W4R:** TGC AGT GGA AAC AGG TCT TGT GG

94°C	2 min
94°C	30 sec
60°C	30 sec
72°C	90 sec
34 Zyklen	
72 °C	7 min
4°C	∞

Tab. 3.3: Programm MLP-WT

Primer für die MLP-KO PCR

- **p9R:** GCA TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG
- **Strev:** TCT CAG GTA GAT CAC AGT TGC

94°C	2 min
94°C	30 sec
61°C	30 sec
72°C	90 sec
34 Zyklen	
72 °C	7 min
4°C	∞

Tab. 3.4: Programm MLP-KO

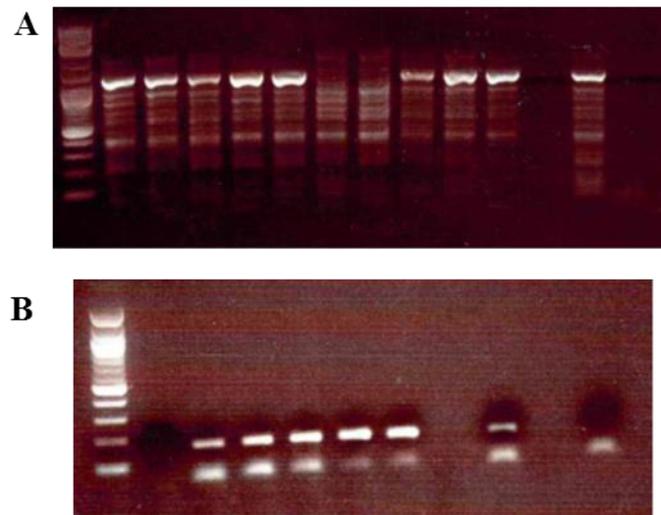


Abb. 3.5: Ergebnis einer MLP-WT/KO Genotypisierung PCR: (A) MLP-WT PCR: Die obere helle Bande zeigt ein Vorhandensein des MLP-WT Allels in der Probe. (B) MLP-KO PCR: Die obere Bande zeigt ein Vorhandensein des MLP-KO Allels in der Probe. Beide Abbildungen zeigen UV-Aufnahmen von mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen.

HotStarTaq Mastermix 2x	15 µL
Primer 1	1 µL
Primer 2	1 µL
DNA	5 ng
Aqua bidest.	Ad 30 µL

Tab. 3.5: Pipettierschema für die MPO-WT/KO PCR

Primer für die MPO-WT PCR

- **MPO 3941:** GTG AAG AAG GAG AAG CGG GTA G
- **MPO 3685:** CTG GAC GCC AGG AGT CAA TCG

Primer für die MPO-KO PCR

- **MPO 3941:** GTG AAG AAG GAG AAG CGG GTA G
- **MPO Neo9:** TCC TCG TGC TTT ACG GTA TCG

94°C	5 min
94°C	30 sec
52°C	1 min
72°C	2 min
35 Zyklen	
72 °C	7 min
4°C	∞

Tab. 3.6: Programm MPO WT/KO

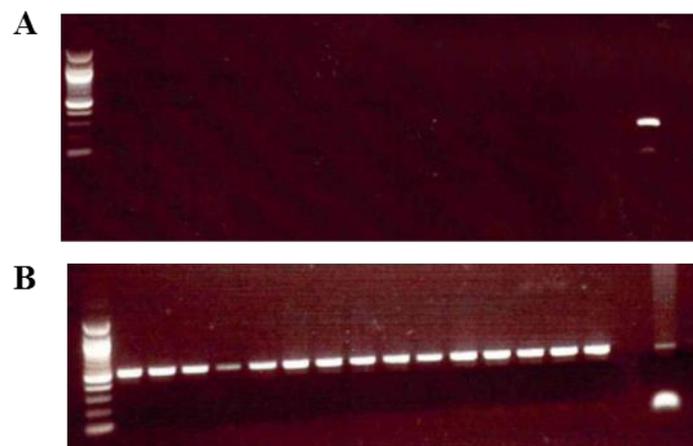


Abb. 3.6: Ergebnis einer MPO-WT/KO Genotypisierungs PCR: (A) MPO-WT PCR: Die helle Bande rechts zeigt ein Vorhandensein des MPO-WT Allels in der Probe. (B) MPO-KO PCR: Die obere Bande zeigt ein Vorhandensein des MPO-KO Allels in den Proben. Beide Abbildungen zeigen UV-Aufnahmen von mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen.

3.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Um den Erfolg der Genotypisierungs-PCR zu überprüfen, werden die amplifizierten DNA Fragmente in einem Agarosegel für eine Stunde bei 100 V aufgetrennt und anschließend das Gel mit dem DNA interkalierenden Farbstoff *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) angefärbt. Anschließend wird das Ergebnis unter UV Bestrahlung dokumentiert.

3.2.2 Arbeiten mit RNA

3.2.2.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Die RNA-Isolation erfolgt aus Ventrikelgewebe der Versuchstiere. Verwendet wird hierfür das *RNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen). Die Isolation der RNA wird exakt nach dem dem Kit beigefügtem Protokoll durchgeführt.

3.2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Wie die DNA-Konzentration wird auch die RNA-Konzentration UV spektrometrisch ermittelt. Dabei wird die Absorption bei 260 nm Wellenlänge mithilfe eines Photometers gemessen. Durch das Lambert-beersche Gesetz ist die Adsorption bei 260 nm proportional zur RNA Menge in der gemessenen Probe. Dabei entspricht ein OD von 1 bei 260 nm eine RNA-Konzentration von 40 µg/mL. Die Reinheit der RNA wird durch den Quotienten A_{260}/A_{280} ermittelt.

3.2.2.3 Reverse Transkription

Um mithilfe der RT-PCR Genexpressionsversuche durchführen zu können, muss die isolierte mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgt mittels des Enzyms reverse Transkriptase. Dabei binden Oligo-(dT)-Primer an die Poly (A)-Schwänze der mRNA und somit wird die gesamte mRNA in cDNA umgeschrieben. Verwendet wird dabei das *High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit* (Applied Bioscience).

10x RT Puffer	2 µL
25x dNTPs (100mM)	0,8 µL
Random Primer	2 µL
Reverse Transkriptase	2 µL
RNA	2 µg

Tab. 3.7: Pipettierschema für die reverse Transkription

25°C	10 min
37°C	120 min
85°C	5 sek
4°C	∞

Tab. 3.8: Programm für die reverse Transkriptase Reaktion

3.2.2.4 Real Time Quantitative PCR (q-PCR)

Bei der quantitativen *Real Time* (q-) PCR handelt es sich um eine Methode zur Quantifizierung der Expression eines gesuchten Gens. Unter Verwendung spezifischer Primer wird die Menge an vorher aus mRNA synthetisierter cDNA ermittelt. Die Detektion der Amplifikation der Zielsequenz erfolgt unter Verwendung des DNA bindenden Farbstoffs SYBR Green. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an dsDNA, was zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität des SYBR Green um das 1000-fache führt. Dabei ist die Erhöhung der Fluoreszenz proportional zu der Menge an dsDNA in der Probe. In dieser Arbeit wird *SsoFast EvaGreen Supermix* (Biorad) zur Anfärbung der DNA verwendet. Für die Amplifikation der gesuchten Zielsequenz werden *Quantitect Primer Assays* (Qiagen) genutzt.

SsoFast EvaGreen	10 µL
Primerpaar	2 µL
cDNA	10 ng
Aqua bidest.	Ad 20 µL

Tab. 3.9: Pipettierschema für die q-PCR

95°C	15 min
94°C	15 sek
55°C	30 sek
72°C	30 sek
35 Zyklen	
4°C	∞
95°C	15 min

Tab. 3.10: Programm für die q-PCR

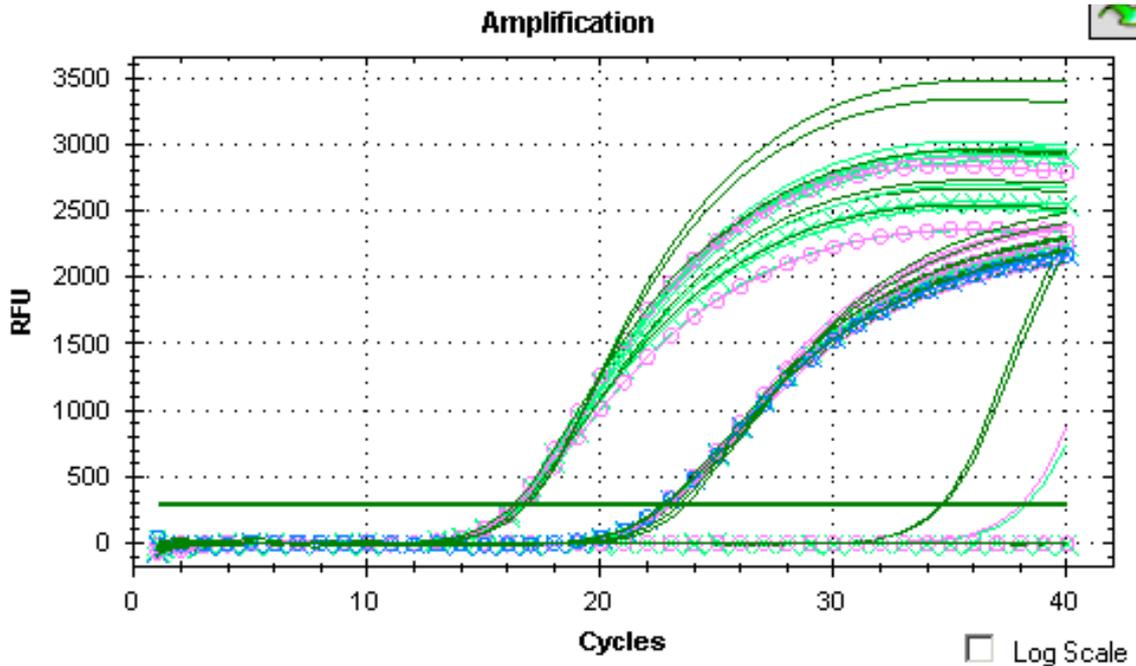


Abb. 3.7: Beispielhafte Darstellung eines q-PCR Ergebnisses: Über das Erreichen des Schwellenwertes (CT-Wert) der cDNA-Amplifikate lässt sich die Menge an entsprechender mRNA berechnen.

Die Quantifizierung der RT-PCR Daten wird unter Einsatz der $\Delta\Delta CT$ Methode durchgeführt (Livak and Schmittgen 2001). Für die Normalisierung der Werte dient die Expression von GAPDH. Dabei werden Unterschiede in der Expression als x-fache Expression angegeben.

3.3 Arbeiten und Umgang mit Versuchstieren

Die Tierexperimentellen Arbeiten dieser Arbeit werden streng nach den Richtlinien der “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health*” durchgeführt. Weiterhin wurde das Studiendesign durch die entsprechende Tierversuchsbehörde durch den Antrag 11/013 („Bedeutung von nitrirten Fettsäuren für die dilatative Kardiomyopathie“) legitimiert.

3.3.1 Verwendete Mausgruppen

Folgende Gruppen werden zur Beantwortung der Projektfrage miteinander verglichen:

Wildtyp (WT)	MLP-WT Nachkommen
MLP-KO Maus	<i>Muscle LIM Protein</i> defiziente Maus
MLP/MPO DKO Maus	<i>Muscle LIM Protein/Myeloperoxidase</i> defiziente Maus
MPO-KO Maus	Myeloperoxidase defiziente Maus

3.3.2 Alter und Geschlecht der eingesetzten Versuchstiere

Alle für die Erzeugung der Ergebnisse in dieser Arbeit benötigten Versuchsmäuse haben ein Alter von 10 Wochen und sind männlichen Geschlechts.

3.3.3 Erzeugung und Beschaffung der Mauslinien

Die MLP-KO Mauslinie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Knöll, Imperial College, British Heart Foundation – Centre for Research Excellence, National Heart and Lung Institute, London zur Verfügung gestellt.

Die MLP/MPO DKO Mauslinie wurde durch Kreuzung der MLP-KO Mäuse mit den bei *Charles River* erhältlichen MPO Tm11us (MPO-KO) Mäusen erzeugt.

3.3.4 Haltung der Versuchsmäuse

Gemäß des Hygienestandards der Tierhaltung werden die Mäuse in IVC-Käfigen, Typ II lang, (Besatzdichte 5 – 8 Mäuse je nach Alter bzw. Gewicht gemäß (2007/526/EG)) gehalten. Die Luftwechselrate/h in den Käfigen beträgt 70 und in den Räumen 8. Die Tierhaltungsräume werden über die zentrale Klimaanlage klimatisiert, die Raumtemperatur beträgt 20-24°C, die relative Luftfeuchtigkeit beträgt 50-70%. Der Lichtzyklus beträgt 12:12 h Tag/Nacht. Die Käfige sind ausgestattet mit Einstreu (FS14 – Fa. Rettenmaier), Futter (1314 FORT – Altromin), autoklaviertes Trinkwasser sowie Nestlets. Sämtliche Materialien werden per Autoklav bzw. H₂O₂-Schleuse eingeschleust.

3.3.5 Organentnahme

Für die Organentnahme wird die Maus zunächst mithilfe von Isofluran und einer Narkosekammer narkotisiert und anschließend für die Inhalationsnarkose auf einer Wärmeplatte fixiert und durch eine Narkosemaske unter Narkose gehalten (1-1,5% Isofluran). Wenn kein Schmerzreiz mehr erkennbar ist (*Toe Pinch Reflex*) wird das Abdomen der Maus kurz unterhalb des Brustkorbs geöffnet und das Zwerchfell durchtrennt. Für die Blutentnahme wird die Vena cava geöffnet und mit einer 1 mL Spritze +10 µL Heparin (rein) aufgenommen und anschließend in einem 1,5 mL Eppi mit 5-7 Heparin Kügelchen für sechs Minuten bei 3.000 g zentrifugiert und das Plasma (Überstand) bei -80°C eingefroren und gelagert. Daraufhin werden Herz und Aorta entnommen und in 4°C kaltem PBS Puffer (+Complete +PhosphoStop) freipräpariert und nachfolgend bei -80°C eingefroren.

3.3.6 Echokardiographische Untersuchung der Herzfunktion

Zur Bestimmung der Herzfunktion wird eine transthorakale Echokardiographie durchgeführt. Dabei können durch Aufnahme und anschließender geometrischer Auswertung von Videosequenzen des Herzens spezifische Parameter für die Herzfunktion errechnet werden. Für die echokardiographische Untersuchung wird die Maus zunächst mit Isofluran (1-2%) anästhesiert und in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert. Für die Echokardiographie wird ein Vevo System (VisualSonics) verwendet. Für die Ermittlung funktionsspezifischer Herzparameter werden die echokardiographischen Aufnahmen im *Brightness Modulation Mode (B-Mode)* dargestellt, wodurch die Echo-Intensität in einen Helligkeitswert umgewandelt wird.

3.3.7 Katheteruntersuchung zur Ermittlung von linksventrikulären Druck-Volumen-Schleifen

Bereits 1957 konnten Burch et al. zeigen, dass die zyklische Ermittlung der Änderungen von Druck und Volumen im Ventrikel während der Kontraktion einen geeigneten Parameter für die Bestimmung der Herzfunktion darstellt (Burch et al. 1957). Etwa 40 Jahre später wurden die ersten Druck-Volumen-Schleifen im Ventrikel von Versuchsmäusen mithilfe von Konduktanzkathetern ermittelt (Georgakopoulos et al. 1998). Heute gehört die Druck-Volumen Analyse unter Einsatz eines Druck-Volumen-

Konduktanz-Katheters zu den Goldstandards für die Ermittlung der systolischen und diastolischen Herzfunktion in kleinen Versuchstieren. Dieser Katheter verfügt an seiner Spitze über Ringe aus Elektroden mit unterschiedlichem Abstand zueinander. Mithilfe dieser Elektrodenringe entsteht ein elektrisches Feld und der Katheter kann durch Veränderungen der Leitfähigkeit zwischen den Elektrodenringen Volumenänderungen der Umgebung ermitteln (s. Abb. 3.8). Die Druckmessung hingegen erfolgt über ein mit piezoelektrischen Kristallen beschichtetes Druckkissen an der Spitze des Katheters. Um Änderungen in Druck und Volumen verfolgen zu können, wird der Katheter mit einem Datenerfassungssystem verbunden.

Zunächst erfolgt eine Analgesie durch subkutane Injektion von Burprenorphin (0,05 mg/kg KG). Anschließend wird die Maus mithilfe von Isofluran und einer Narkosebox narkotisiert. Für die Inhalationsnarkose wird die narkotisierte Maus auf einer Wärmeplatte fixiert, intubiert und beatmet (1-1,5% Isofluran approx. 150/min, Volumen in $\mu\text{l} = \text{KG} \cdot 7$). Dabei wird eine Narkosetiefe gewählt, bei der die Maus eine Herzfrequenz von 400 bis 500 Schlägen pro Minute zeigt. Nun wird die Vena jugularis durch einen Hautschnitt am Hals vorsichtig stumpf freipräpariert und durch einen kleinen Schnitt in das Gefäß ein zentraler Venenkatheter (ZVK) in das Gefäß eingeführt. Der ZVK dient dazu, den Flüssigkeitshaushalt der Maus über die Dauer der Versuchsdurchführung stabil zu halten. So wird der Maus über diesen Katheter zunächst BSA (37°C, 100 μl /30g KG) langsam über den Zeitraum von einer Minute gegeben. Weiterhin wird der Maus zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes durch Verdunstung für den Zeitraum der Operation nach Eröffnung des Abdomens über den zentralen Venenkatheter 0,9 % NaCl-Lösung verabreicht (Fließgeschwindigkeit 1ml/h). Anschließend wird die Arteria carotis nach einem Hautschnitt am Hals stumpf freipräpariert und der Druck-Volumen-Konduktanz-Katheter (Modell SPR 839, Millar Instruments) über die Arteria carotis in den linken Ventrikel eingeführt. Daraufhin wird das Abdomen geöffnet und die Vena cava inferior stumpf freipräpariert. Zunächst erfolgt eine Basalmessung von linksventrikulärem Druck und Volumen. Im Anschluss werden durch eine kurze Okklusion der Vena cava Messungen während einer Reduktion der Vorlast durchgeführt. Da das Konduktionssignal, ermittelt in Volt, in Volumenwerte umgewandelt werden soll, erfolgt eine Salzinjektion, um das Volumen des Myokards vom Volumen in der Kammer zu unterscheiden. Dafür wird eine Hamilton Spritze an den zentralen Venenkatheter angeschlossen und darüber 10 μL 30% NaCl-Lösung in die Vena jugularis appliziert.

Danach erfolgt eine Blutentnahme durch Öffnung der Vena cava. Als letzter Schritt erfolgt eine weitere Kalibration der Konduktanzkatheters bezüglich des ermittelten Volumens. Dafür wird frisches, warmes, heparinisiertes Blut in eine auf 37°C vorgewärmte Kalibrationsküvette überführt und der Druck-Volumen-Konduktanz-Katheter mittig in die Küvette eingeführt, ohne dass dieser in Berührung mit der Küvettenwand kommt. Im Folgenden wird das Signal aufgenommen. Die Datenerfassung der hier gezeigten Versuche erfolgt mithilfe des *PowerLab Data Acquisition Device* (ADInstruments).

Folgende Parameter dieser Arbeit wurden mithilfe dieser Methode erbracht:

1. Preload Recrutable Stroke Work (PRSW)

SW ist definiert als die lineare Regression der *Stroke Work* und des enddiastolischen Volumens.

2. Relaxation Time Constant (Tau, T)

Formel zur Berechnung des Tau: $T = P / (-dP/dt)$ (Bai et al., 2008), wobei P = linksventrikulärer Druck und $-dP/dt = \text{Ventricular Contractility Assessment}$.

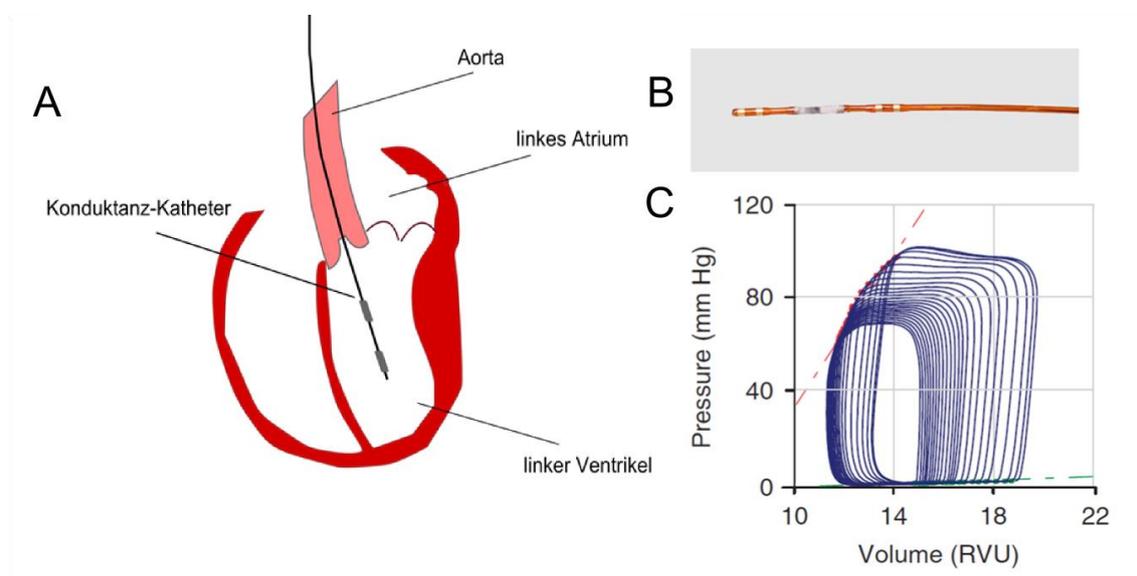


Abb. 3.8: Physiologische Untersuchungen am Mausherz mit einem Druck-Volumen-Konduktanz Katheter: (A) Der Katheter wird über die Arteria carotis und anschließend über die Arteria aorta in den linken Ventrikel eingeführt. (B) Verwendetes Kathetermodell SPR 839 (Millar Instruments) mit den Elektrodenringen an der Spitze. (C) Charakteristische Druck-Volumen-Schleifen einer Konduktanz-Kathetermessung im linken Ventrikel einer Maus, aus (Pacher et al. 2008). Eine Okklusion der Vena cava führt zu einem *Shift* der Druck-Volumen-Schleifen.

3.3.8 Ermittlung des peripher-vaskulären Widerstands

Das Protokoll zur Ermittlung des peripher-vaskulären Widerstands (PVR) ähnelt stark dem Protokoll für die Ermittlungen der Druck-Volumen-Schleifen. Jedoch sind einige Änderungen zu berücksichtigen. So wird an den zentralvenösen Katheter noch ein Druckmesser angeschlossen, um den zentralvenösen Druck zu ermitteln. Wie bei der Ermittlung der Druck-Volumen-Schleifen wird auch hier ein Konduktanz-Katheter Modell SPR 839 (Millar Instruments) in die Arteria carotis eingeführt, jedoch verbleibt dieser in der Arteria carotis, um den mittleren arteriellen Druck (MAD) zu ermitteln. Zunächst wird das Abdomen durch einen Hautschnitt geöffnet, um dann das Zwerchfell zu öffnen und das Herz apikal mit einer Kanüle (Modell: Sterican Gr. 18 0,45 x 25 mm, Braun) zu punktieren. Zudem wird ein weiterer Konduktanz-Katheter Modell SPR 839 (Millar Instruments) über den punktierten Apex in den linken Ventrikel eingeführt, um über die erhaltenen Druck-Volumen-Schleifen das Herzminutenvolumen (*Cardiac Output*) zu ermitteln (*Open Chest Methode*). Die Messungen für den peripher-vaskulären Widerstand erfolgt unter basalen Bedingungen und es ist keine Okklusion der Vena cava vonnöten. Der PVR wird wie folgt berechnet:

1. Peripher-vaskulärer Widerstand (PVR)

Formel zur Berechnung des PVR: $PVR = 80 * (\text{mittlerer Arterieller Druck} - \text{zentralvenöser Druck}) / \text{Herzminutenvolumen}$.

2. Mittlerer arterieller Druck (MAD)

Formel zur Berechnung des MAD: $MAD = \text{Diastolischer Druck} + 1/3 (\text{systemischer Druck} - \text{diastolischer Druck})$.

3.3.9 Organbad

Bei dem Organbad handelt es sich um eine physiologische Methode zur Evaluierung der vaskulären Funktion in Säugetieren *ex vivo*. Diese Methode erlaubt es, sowohl Informationen über die endothelabhängige wie auch die endothelunabhängige Gefäßfunktion zu erhalten. Dafür wird die Relaxationsfähigkeit von vorkonstringierten Aortenstücken als Reaktion auf die vasodilatierenden Reagenzien Acetylcholin und Nitroglycerin gemessen. Es ist bekannt, dass Acetylcholin (Ach) in der Zirkulation durch

Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration die NO-Synthase aktiviert. Auch wird gezeigt, dass ein Entfernen des Endothels die Relaxationsfähigkeit eines Gefäßes in Antwort auf Ach verhindert (Furchgott and Zawadzki 1980). Das vasoreaktive Reagenz Nitroglycerin hingegen setzt direkt NO frei und induziert somit eine endothelunabhängige Gefäßrelaxation. Für diese Organbad-Experimente werden Aortenstücke der Mäuse verwendet. Dafür wird den Mäusen zunächst die Aorta entfernt und diese in einer Petrischale, gefüllt mit Organbad-Puffer, unter Verwendung eines Lichtmikroskops und feinem Operationsbesteck stumpf freipräpariert. Sowohl bei Entnahme als auch bei der Freipräparation der Aorta wird darauf geachtet, das Gewebe nicht mechanisch zu beanspruchen. Anschließend werden die 2-3 mm langen Aortenstücke zwischen zwei nichtkorrodierende Stahltriangeln gespannt und in ein Bad mit 25 mL mit Carbogen begastem physiologischen Puffer platziert, wobei eine Triangel mit einem Kraftabnehmer Modell Tri202PAD (PanLab) verbunden ist und die andere zur Fixierung des Gefäßstücks dient (siehe Abb. 3.9). Um eine Änderung der Vasomotorik der Gefäße zu verfolgen, wird der Kraftabnehmer mit Datenerfassungssystem *PowerLab Data Acquisition Device* (ADInstruments) verbunden. Für die Überprüfung der vasomotorischen Funktion werden die Gefäßstücke zunächst durch Zugabe von 1mL 2M KCl-Lösung vorkonstringiert. Ist kein Anstieg der Konstriktion mehr zu beobachten, folgt ein Waschschrift mit Organbad-Puffer, der wieder zur Relaxation der Gefäßstücke führt. Diese Prozedur wird zweimal wiederholt, wobei der letzte Inkubationsschritt mit KCl über 20 Minuten andauert und anschließend zweimal für 20 Minuten gewaschen wird. Vor dem Einsatz der vasodilatierend wirkenden Substanzen werden die Aortenstücke mit Prostaglandin F₂α (PGF₂α; 15μL, 0,1M) auf eine Kraft von 1,1 g vorkonstringiert, um sie zunächst mit einer stufenweise ansteigenden Ach-Konzentration (Siehe Tab. 3.11) zu relaxieren. Dabei erfolgt die nächste Konzentrationserhöhung erst, wenn die Relaxation des Gefäßes nicht weiter ansteigt. Nach der Relaxation der Gefäße auf Acetylcholin erfolgen wieder jeweils zwei Waschschriffe für je 20 Minuten mit Organbad-Puffer. Im Anschluss erfolgt nach abermaliger Vorkontrinktion der Gefäße mit PGF₂α (15 μL, 0,1M) die Relaxation mit Nitroglycerin. Auch hierbei wird das Gefäß durch stufenweise ansteigende Nitroglycerinkonzentration sukzessive relaxiert (siehe Tab. 3.11). Dabei erfolgt die nächste Konzentrationserhöhung erst, wenn die Relaxation des Gefäßes nicht weiter ansteigt.

Acetylcholin	Nitroglycerin
1nM	1nM
5 nM	5 nM
10nM	10nM
50 nM	50 nM
100 nM	100 nM
500 nM	500 nM
1 μ M	1 μ M
5 μ M	5 μ M
	10 μ M
	50 μ M

Tab. 3.11: Stufenweise Konzentrationserhöhung von Acetylcholin und Nitroglycerin

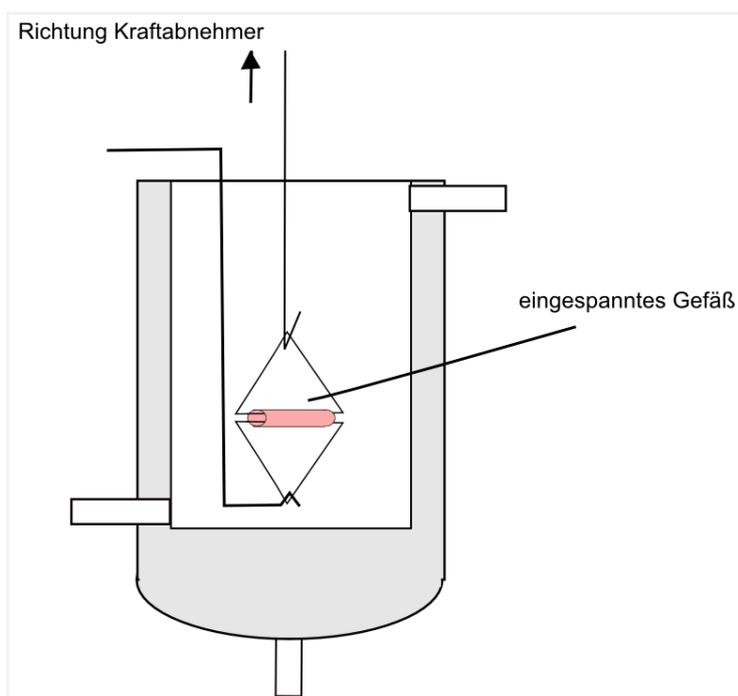


Abb. 3.9: Schematische Darstellung eines Organbads für Aorten: Die Aorta wird zwischen zwei Stahltriangeln eingespannt und die Apparatur dann in einem mit begastem Puffer gefülltem Bad platziert. Zur Erfassung der Vasomotorik wird eine der Triangeln mit einem Kraftabnehmer verbunden.

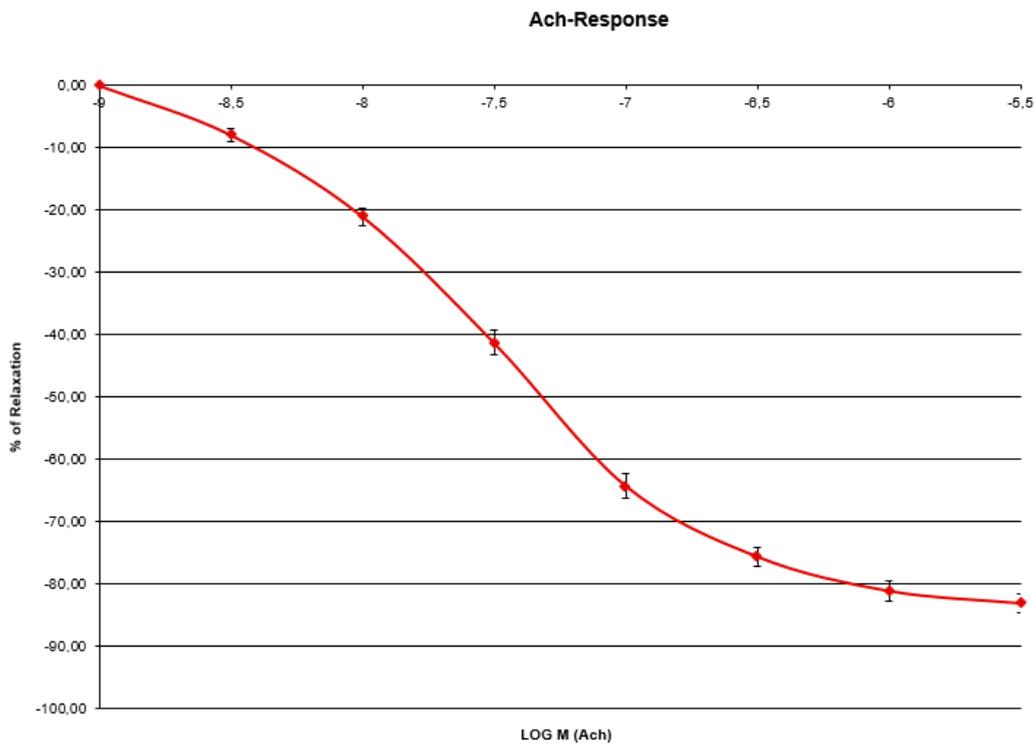


Abb. 3.10: Auswertung einer Organbad Messung für die Endothelabhängige Aortenfunktion in Versuchsmäusen: Gezeigt ist die zunehmende Relaxation des Gefäßstücks in Antwort auf eine zunehmende Acetylcholin-Konzentration. Über den Grad der Dilatation lassen sich Erkenntnisse über die vasomotorische Funktion gewinnen.

3.3.10 Langendorff-Herz

Die von Oskar Langendorff im Jahre 1897 etablierte Methode, isolierte Säugetierherzen retrograd mit einem konstanten Druck zu perfundieren, erlaubte neue Erkenntnisse zur Herzfunktion. Katz et al. modifizierten die Langendorff Methode, indem sie Messungen mit konstantem Fluss durchführten und dabei Druckveränderungen ermittelten (Skrzypiec-Spring et al. 2007). Da die retrograde Perfusion des Säugetierherzens über die Aorta zu einem Verschluss der Aortenklappe führt, verläuft die Perfusion lediglich über die Koronargefäße. Dadurch lassen sich funktionelle Untersuchungen der Koronarzirkulation eines isolierten Herzens durchführen. In diesem Projekt soll der basale Koronardruck ermittelt werden. Dafür wird der Druck oberhalb des retrograd perfundierten Herzens bei einem konstanten Fluss gemessen. Zunächst wird der Maus 10 Minuten vor der Herzentnahme der Gerinnungshemmer Agrata Multidose (35 mg/Kg BW) i.p. appliziert, um eine Artefaktbildung durch Gerinnung des Blutes und Thrombenbildung in der Koronarzirkulation zu verhindern. Zur Herzentnahme wird die Maus wie unter Punkt 3.3.5 beschrieben vorbereitet.

Zunächst wird der Thorax der narkotisierten und auf einer Wärmeplatte fixierten Maus geöffnet, die Vena cava inferior durchtrennt und das Blut mit einer 1 mL Spritze aufgefangen. Daraufhin wird der Brustkorb weit nach kranial geöffnet und die Thymusdrüse entfernt, sodass das Herz frei liegt. Dann wird das linke Atrium des Herzens mit einer sehr feinen Schere vorsichtig entfernt. Anschließend wird das Herz durch Auflegen einer Pinzette vorsichtig in kaudaler Richtung bewegt bis die Aorta deutlich sichtbar wird. Nun wird die Aorta vorsichtig mit Pinzette kurz oberhalb des Herzens gefasst und mit kleiner Schere oberhalb der Pinzette durchtrennt. Das Herz wird entnommen und in eine vorbereitete Petrischale mit einer in Knetmasse fixierten mit Perfusionspuffer gefüllten 1 mL Spritze und der Perfusionskanüle unter dem Mikroskop platziert (siehe Abb. 3.11). Für die Perfusion des Herzens muss nun eine Kanüle in die Aorta eingeführt und fixiert werden. Dafür wird mit einer feinen Pinzette vorsichtig in die Aortenöffnung gefasst und das Gefäß über die Kanüle gezogen und schließlich der vorbereitete Knoten vorsichtig festgezogen (siehe Abb. 3.11). Als Kontrolle, ob das Herz richtig kanüliert wurde, wird das Herz durch leichten Druck auf die Spritze vorsichtig mit Perfusionspuffer perfundiert. Dehnt sich das Herz sichtbar aus, so ist die Kanüle richtig platziert. In der Folge wird das kanülierte Herz mit dem in Abb. 3.12 gezeigten Langendorff-System verbunden und zunächst mit mit Carbogen begastem Perfusionspuffer mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 1 mL/min perfundiert. Nun wird zur Überwachung der Herzfrequenz ein Druck-Volumen-Konduktanz-Katheter über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt. Durch einen Druckmesser oberhalb des perfundierten Herzens kann der koronare Perfusionsdruck ermittelt werden. Sowohl der Druckmesser als auch der Konduktanz-Katheter sind mit dem Datenerfassungssystem *PowerLab Data Acquisition Device* (ADInstruments) verbunden, sodass Änderungen im koronaren Perfusionsdruck und der Herzfrequenz über den gesamten Zeitraum des Versuchs gemessen werden. Für die Perfusionsmessung wird nun die Fließgeschwindigkeit über eine peristaltische Pumpe in Stufen von 0,5 mL/min auf eine finale Fließgeschwindigkeit von 2,5 mL/min gesteigert. Dabei wird darauf geachtet, dass eine Erhöhung der Fließgeschwindigkeit jeweils erst erfolgt, wenn sich der koronare Perfusionsdruck stabilisiert hat.

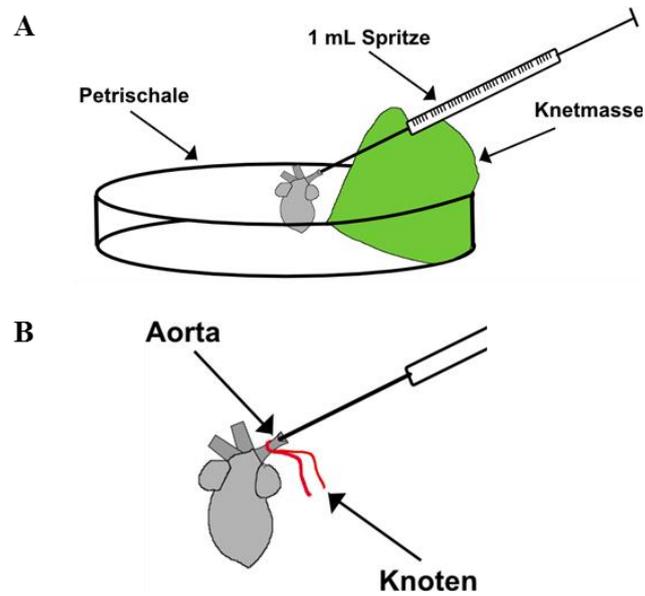


Abb. 3.11: Schematischer Aufbau zum Kanülieren eines Mausherzens: (A) Durch Knetmasse wird eine 1 mL Spritze mit stumpfer Kanüle in einer Petrischale fixiert. (B) Auf der Kanüle wird das Herz über die Aorta aufgefädelt und mit einem Knoten fixiert.

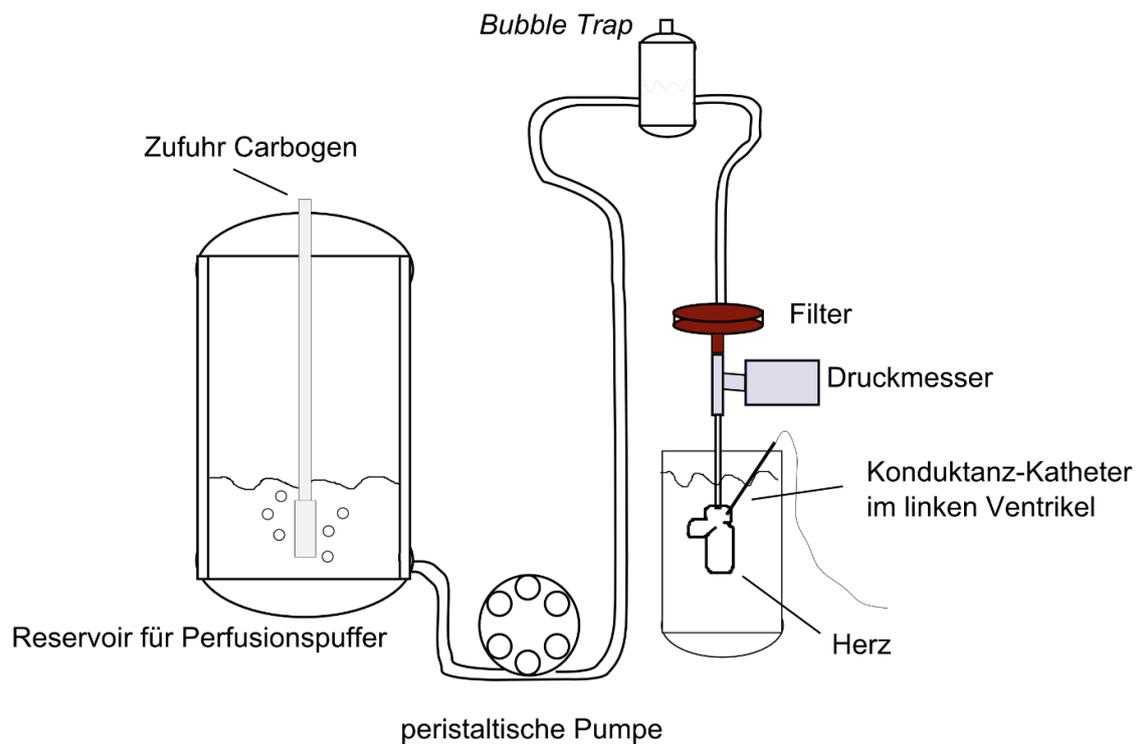


Abb. 3.12: Schematischer Aufbau eines Langendorff-Systems zur Perfusion eines Mausherzens: Über ein Reservoir wird mit Carbogen begaster Puffer auf 37°C erwärmt und das Herz über eine peristaltische Pumpe mit dem Puffer perfundiert. Oberhalb des Herzens befindet sich ein Druckmesser, der den koronaren Perfusionsdruck misst. Oberhalb des Druckmessers wird ein Sterilfilter (Porendurchmesser 0,45 µm) eingesetzt, um Artefakte durch mögliche im Puffer enthaltene Partikel zu verhindern. Ein Druck-Volumen Konduktanz-Katheter wird über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt.

3.3.11 Herstellung von Koronarperfusaten der Versuchstiere

Für die Herstellung von Koronarperfusaten wird das Herz wie unter Punkt 3.3.10 kanüliert (siehe Abb 3.11). Anstatt das Herz jedoch über das Langendorff-System zu perfundieren, wird das Herz zunächst mithilfe einer 1 mL Spritze mit PBS perfundiert. Anschließend erfolgt eine Perfusion des kanülierten Herzens mit 2 mL Heparin Lösung (50 Einheiten/mL PBS) unter Verwendung einer 5 mL Spritze. Das so erhaltene Perfusat wird aufgefangen und das Volumen mit einer Vakuumzentrifuge auf 200 μ L eingengt. Schließlich kann das Herzperfusat für protein-biochemische Methoden genutzt werden.

3.3.12 Software

- IVision
- BZ-II Analyser
- Phusion Software
- Endnote
- SPSS
- Labchart

3.3.13 Statistik

Die Ergebnisse werden als arithmetischer Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angezeigt. Dabei wird als statistisches Verfahren zur Ermittlung der Signifikanz die Varianzanalyse (ANOVA) mit einem LSD post Hoc Test verwendet. Ist dabei $p \leq 0,05$ wird von einer Signifikanz ausgegangen und dies wird in den Abbildungen mit * gekennzeichnet. Ist $p \leq 0,01$ wird dies mit ** gekennzeichnet. Bei einem p-Wert von $\leq 0,001$ wird die Signifikanz mit *** dargestellt.

3.3.14 Markierung der Versuchsgruppen in den Ergebnisdiagrammen

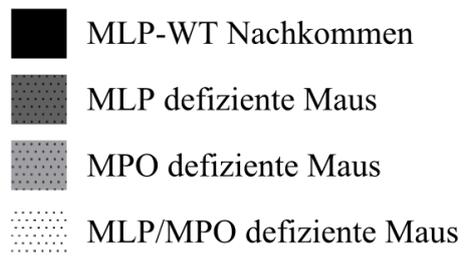


Abb. 3.13: Versuchsgruppenlegende

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss der MPO Defizienz auf die Herzgeometrie in MLP-KO Mäusen

Eines der charakteristischen Merkmale für eine dilatative Kardiomyopathie ist eine deutlich erkennbare Veränderung der Herzgeometrie in Form einer ausgeprägten Dilatation der Ventrikel. Aufgrund der Dysorganisation des Zytoskelletts in MLP-KO Mäusen weisen auch diese Tiere bereits im Alter von 10 Wochen eine deutliche Dilatation der Ventrikel auf (Arber et al. 1997). Da sich diese Arbeit thematisch mit einem möglichen therapeutischen Effekt einer MPO Defizienz auf eine dilatative Kardiomyopathie befasst, sollte zunächst überprüft werden, ob ein Knockout des MPO zu einer Veränderung der Herzgeometrie in MLP-KO Mäusen führt. Bei Betrachtung von Photographien entnommener Herzen von 10 Wochen alten Versuchsmäusen ließ sich diese morphologische Veränderung des Herzens bei der MLP-KO Maus im Vergleich zum Wildtyp augenscheinlich bestätigen (siehe Abb. 4.1 A). Die Betrachtung der Herzen von MLP/MPO DKO Mäusen deutete jedoch an, dass die Dilatation in gleichem Maße ausgeprägt ist wie in den MLP-KO Mäusen.

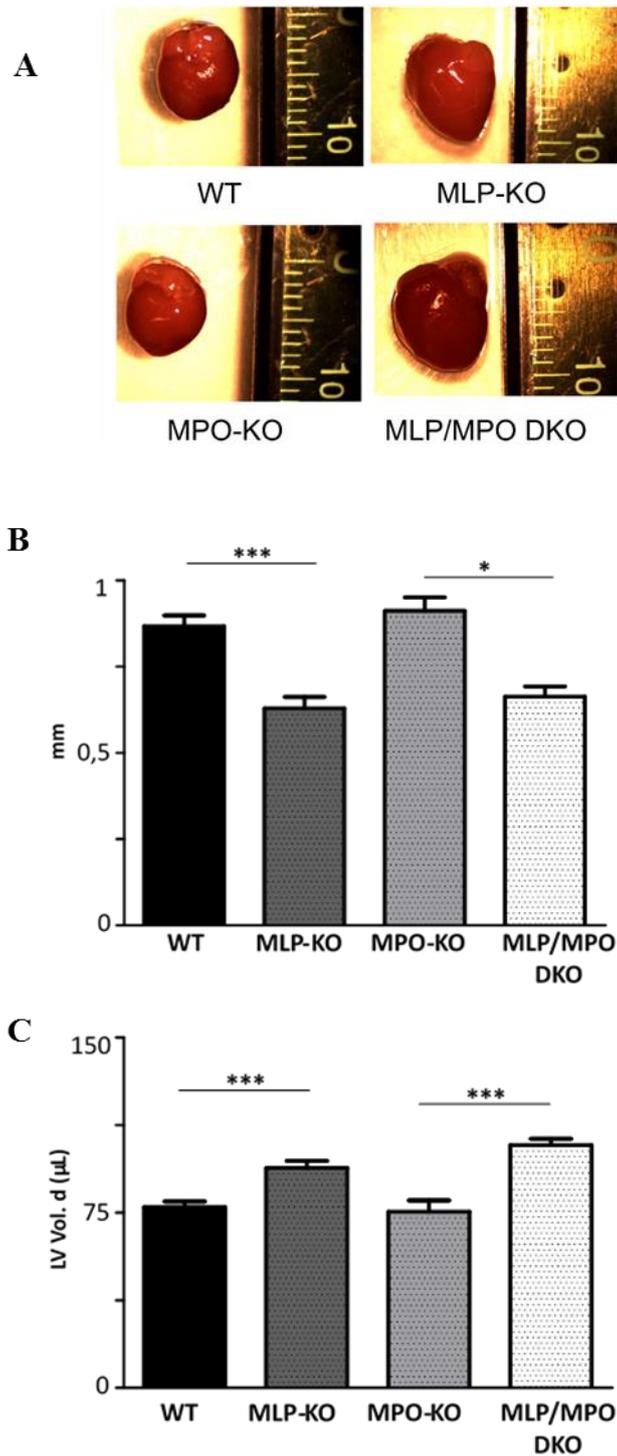


Abb. 4.1: Einfluss eines MPO Knockouts auf die veränderte Herzgeometrie in MLP-KO Mäusen: (A) Repräsentative Bilder entnommener Herzen von 10 Wochen alten Versuchstieren. (B,C) Echokardiographische Untersuchung der Herzgeometrie durch Ermittlung der Dicke der linksventrikulären posterioren Wand (B) und dem diastolischen linksventrikulären Volumen (C). Die für eine DCM charakteristische Dilatation des Ventrikels in MLP-KO Mäusen lässt sich sowohl durch Vergleich der Herzbilder als auch durch Vergleich der echokardiographischen Parameter in gleichem Maße auch in MLP/MPO DKO Tieren beobachten.

Um die Herzgeometrie genauer untersuchen zu können, wurden echokardiographische Untersuchungen der einzelnen Versuchsgruppen durchgeführt. Dafür wurden als herzgeometrische Parameter die Dicke der linksventrikulären, posterioren Wand und das linksventrikuläre Volumen in der Diastole bestimmt. Es zeigte sich eine signifikant erniedrigte Dicke der linksventrikulären posterioren Wand in MLP-KO Mäusen und in gleicher Ausprägung auch in MLP/MPO DKO Mäusen (WT vs. MLP-KO: $0,868 \pm 0,031$ vs. $0,629 \pm 0,033$, $p = 0,000$; WT vs. MLP/MPO DKO: $0,868 \pm 0,031$ vs. $0,663 \pm 0,029$, $p = 0,000$). Weiterhin ist auch eine signifikante Erhöhung des linksventrikulären Volumens in MLP-KO Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ermittelt worden (WT vs. MLP-KO: $77,352 \pm 2,442$ vs. $94,131 \pm 3,028$, $p = 0,001$). Und auch hier war das Ausmaß der Vergrößerung des linksventrikulären Volumens der MLP/MPO DKO Maus vergleichbar mit dem der MLP-KO Maus. Dadurch wurde der augenscheinliche Eindruck der ausgeprägten Herzdilatation sowohl in MLP-KO als auch in MLP/MPO DKO Mäusen im Vergleich zum WT bestätigt (siehe Abb. 4.1).

4.2 Einfluss der MPO Defizienz auf die systolische linksventrikuläre Funktion in MLP-KO Mäusen

Da die Einschränkung der systolischen LV-Funktion eines der funktionellen Hauptmerkmale einer DCM ist, sollte als primärer Endpunkt überprüft werden, ob eine MPO Defizienz zu einer Verbesserung der eingeschränkten linksventrikulären systolischen Herzfunktion in MLP-KO Mäusen führt. Dafür wurden echokardiographische Untersuchungen der Versuchstiere durchgeführt und die als diagnostische Marker für eine DCM und Herzinsuffizienz anerkannten Parameter für die systolische LV-Funktion (Scherrer-Crosbie et al. 2001), die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF) und das *Fractional Shortening* (FS) bestimmt (siehe Abb. 4.2). Bei der Ejektionsfraktion handelt es sich um den Anteil an in der Systole ausgeworfenem Blut im Verhältnis zu dem Gesamtblutvolumen in der Diastole (EF, in %, Formel: $100 * ((LV\ Vol;d - LV\ Vol;s) / LV\ Vol;d)$). Das *Fractional Shortening* hingegen bezeichnet die räumliche Verkürzung des linken Ventrikels während der Systole im Verhältnis zur diastolischen Ausdehnung dieses Ventrikels (FS, in %, Formel: $100 * ((LVID;d - LVID;s) / LVID;d)$).

Bei einem Vergleich der Versuchsgruppen bezüglich dieser Parameter konnte zunächst der funktionelle Phänotyp, nämlich die verminderte systolische LV-Funktion und damit die deutliche Ausprägung einer DCM in der MLP-KO Maus bereits 10 Wochen nach der Geburt bestätigt werden (Arber et al. 1997). So wiesen die MLP-KO Mäuse in diesem Alter sowohl eine signifikant verminderte EF als auch ein signifikant vermindertes FS im Vergleich zu den WT Mäusen auf (EF: WT vs. MLP-KO: $56,056 \pm 0,809$ vs. $24,8 \pm 2,235$, $p = 0,000$; FS: WT vs. MLP-KO: $29,096 \pm 0,542$ vs. $11,482 \pm 1,095$ $p = 0,000$). Äußerst bemerkenswert ist jedoch der Befund, dass ein zusätzlicher MPO-KO der MLP-KO Mäuse des gleichen Alters zu einer moderaten, aber signifikanten Erhöhung der EF und des FS und damit zu einer Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion führte (EF: MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $24,8 \pm 2,235$ vs. $31,022 \pm 1,913$, $p = 0,03$; FS: MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $11,482 \pm 1,095$ vs. $14,751 \pm 0,989$ $p = 0,033$).

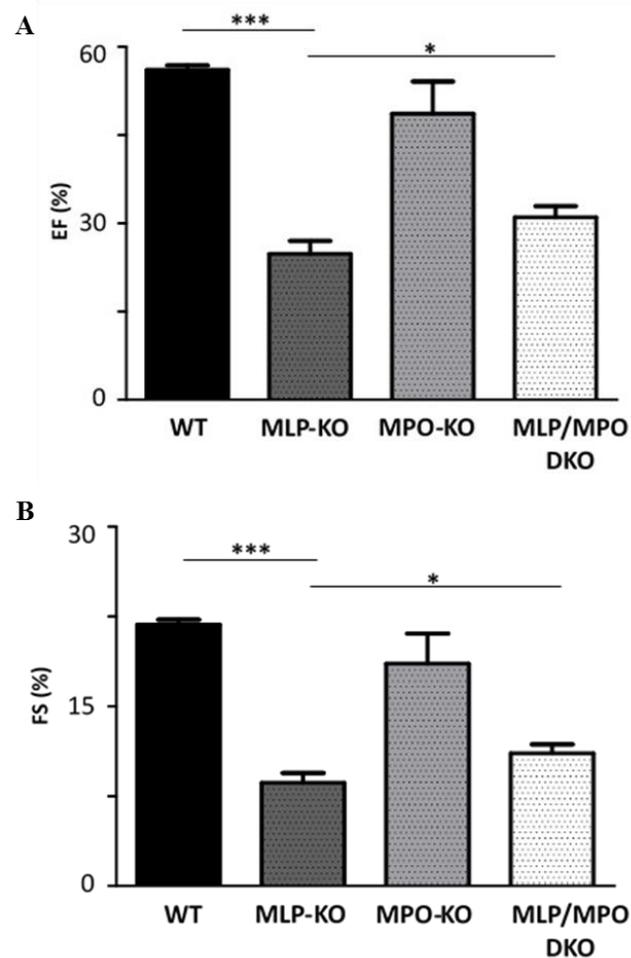


Abb. 4.2: Einfluss einer MPO Defizienz auf die eingeschränkte systolische LV-Funktion in MLP-KO Mäusen: (A) Echokardiographische Untersuchung der Ejektionsfraktion (EF) als Parameter für die systolische LV-Funktion der Versuchsgruppen. (B) Echokardiographische Untersuchung des *Fractional Shortenings* (FS) als Parameter für die systolische LV-Funktion der Versuchsgruppen. Die signifikante Reduktion der systolischen LV-Funktion in MLP-KO Tieren wird durch einen zusätzlichen Knockout des MPO moderat aber signifikant verbessert.

Aufgrund der geringen Größe des Mausherzens und der hohen Schlagfrequenz ist die Aussagekraft der Echokardiographie zur Ermittlung der systolischen LV-Funktion in Mäusen limitiert. Als Goldstandard für die Bestimmung funktionaler Parameter in kleinen Nagetieren gilt die invasive, kathetergestützte Erfassung von Druck-Volumen-Schleifen des linken Ventrikels. Daher sollte neben dem FS und der EF ein weiterer Index für die Systolische Herzfunktion, die *Preload Recrutable Stroke Work* (PRSW), unter Einsatz dieser Methode ermittelt werden (siehe Abb. 4.3). Dieser Parameter ist definiert als die Relation zwischen der *Stroke Work* (SW) und dem enddiastolischem Volumen (EDV) und stellt eine annähernd lineare Funktion dar (Glomer et al. 1985). Neben der genaueren Versuchsmethode bietet dieser Parameter auch weitere Vorteile. So ist PRSW durch die Einheit in Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) anders als die Ejektionsfraktion oder das Fractional Shortening unabhängig von der Herzgröße und damit auch unabhängig von dem Grad der Dilatation des Ventrikels (Burkhoff et al. 2005). Darüber hinaus ist PRSW nicht abhängig von der Nachlast des Herzens, also der Kräfte, die der systolischen Kontraktionskraft entgegenwirken. Liegt eine systolische Dysfunktion vor, die charakteristisch für eine DCM ist, so wird die Steigung der Relation zwischen *Stroke Work* und dem enddiastolischem Volumen reduziert. Als Ergebnis dieses Versuchs zeigte sich, dass die 10 Wochen alte MLP-KO Maus eine signifikant reduzierte PRSW im Vergleich zum Wildtyp aufweist, und somit eine bereits fortgeschrittene Progression der Herzinsuffizienz in diesen Tieren bestätigt wurde (WT vs. MLP-KO: $60,008 \pm 4,647$ vs. $44,09 \pm 3,832$, $p = 0,009$). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass ein Knockout des MPO-Gens in den MLP-KO Tieren wieder zu einer signifikanten Erhöhung der PRSW führte (MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $44,09 \pm 3,832$ vs. $59,616 \pm 3,545$, $p = 0,013$). Da die PRSW nicht durch Änderungen der Herzgeometrie beeinflusst wird, stützt dieses Ergebnis zusammen mit den Analysen zur Ausprägung der Dilatation, dass die Myeloperoxidase zwar involviert ist in die Progression der Herzinsuffizienz, dies jedoch zumindest zu diesem Zeitpunkt anscheinend nicht auf struktureller, sondern vielmehr auf funktioneller Ebene stattfindet.

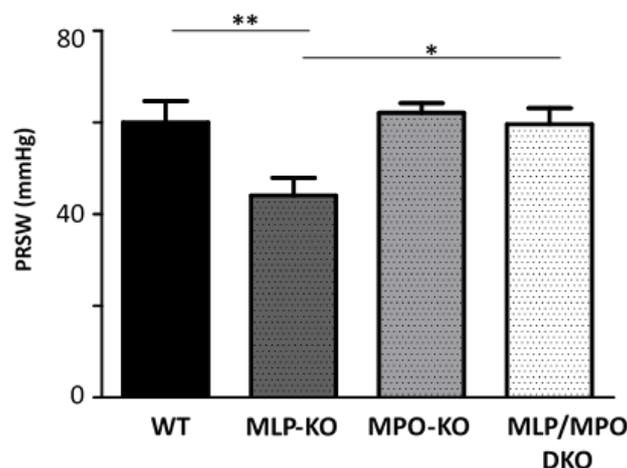


Abb. 4.3: Untersuchung der von Nachlast und Herzgeometrie unabhängigen systolischen LV-Funktion: Ermittlung der *Preload Recruitable Stroke Work* mithilfe eines invasiven kathetergestützten Experiments. Es zeigt sich eine signifikante Reduktion der *Preload Recruitale Stroke Work* in MLP-KO Tieren im Vergleich zu den Wildtyp und den MPO-KO Tieren. Wiederum eine signifikante Erhöhung dieses Parameters ist in den MLP/MPO DKO Tieren zu beobachten.

4.3 Auswirkung einer MPO Defizienz auf die diastolische Herzfunktion in MLP-KO Mäusen

Neben der systolischen LV-Funktion sollte ebenfalls überprüft werden, ob auch die diastolische Funktion des Herzens der MLP-KO Mäuse beeinträchtigt ist und ob MPO involviert ist in diesen Prozess. Bei der diastolischen Funktion des Herzens spricht man von dem Begriff der *Compliance*, die allgemein definiert ist als die Fähigkeit eines Körpers sich auszudehnen. Die kardiale *Compliance* beschreibt den intraventrikulären Druck in Abhängigkeit des Füllvolumens. Für die Aussage über die kardiale *Compliance* ist ein anerkannter Parameter für die Ermittlung der diastolischen Herzfunktion, nämlich die zeitliche Konstante der linksventrikulären isovoluminösen Relaxation (Tau), von großer Bedeutung. Dabei ist Tau weitestgehend unabhängig von der Vorlast des Herzens. Für die Ermittlung von Tau ist eine möglichst exakte Messung des ventrikulären Drucks erforderlich, wie es nur durch invasive kathetergestützte Methoden erbracht werden kann. Deshalb wurde Tau, wie auch schon die *Preload Recruitale Stroke Work*, in den Versuchstieren durch die *in vivo* Ermittlung von Druck-Volumen-Schleifen bestimmt. Die Versuche ergaben eine signifikante Erhöhung des Tau in MLP-KO Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Somit konnte bestätigt werden, dass die MLP-KO Maus auch durch eine Einschränkung der diastolischen Herzfunktion charakterisiert ist (WT vs. MLP-KO: $5,906 \pm 0,823$ vs. $10,119 \pm 0,66$, $p = 0,002$). Darüber hinaus zeigte sich, dass

bezüglich des Tau kein signifikanter Unterschied zwischen MLP-KO Tieren und MLP/MPO DKO Tieren bestand (MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $10,119 \pm 0,66$ vs. $9,948 \pm 0,859$, $p = 0,872$). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass MPO, anders als bei der systolischen LV-Funktion, keinen Einfluss auf die Abnahme der *Compliance* und damit auf die diastolische Dysfunktion in MLP-KO Mäusen hat.

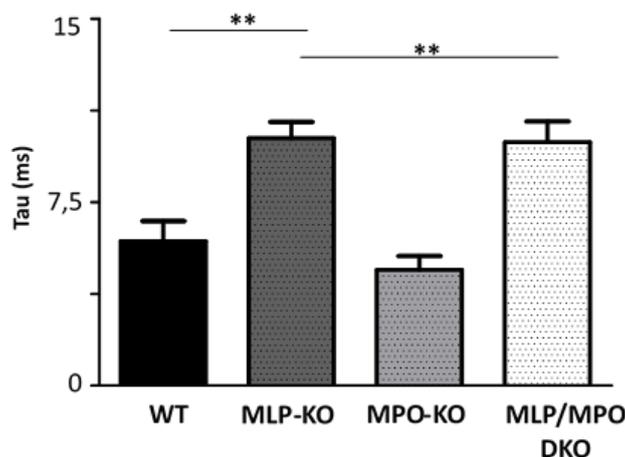


Abb. 4.4: Diastolische Dysfunktion in MLP-KO und MLP/MPO DKO Tieren: Bestimmung der *Relaxation Time Constant* (Tau (T)). Bezüglich des Parameters Tau zeigt eine MPO Defizienz keinen Einfluss auf eine reduzierte diastolische Funktion in MLP-KO Tieren.

4.4 Expression von BNP im Myokard von MLP-KO Mäusen in Abhängigkeit der MPO Expression

Da die Expression des BNP mit erhöhter Wandspannung des Ventrikels korreliert und somit eine indirekte Aussage über die Herzfunktion bietet, sollte mithilfe quantitativer RT-PCR untersucht werden, inwieweit sich die Expression des BNP zwischen den Versuchsgruppen ändert (siehe Abb. 4.5). Es ist bekannt, dass bereits vier Wochen alte MLP-KO Mäuse eine erhöhte Expression des BNP im Myokard aufweisen (Unsold et al. 2012). Auch die hier gezeigten RT-PCR Untersuchungen ergaben eine signifikant erhöhte BNP Expression im Herzgewebe von MLP-KO Tieren im Vergleich zur Gruppe der WT-Versuchstiere (WT vs. MLP-KO: $1,167 \pm 0,431$ vs. $11,058 \pm 4,916$, $p = 0,025$). Bei Vergleich der MLP-KO Mäusen mit den MLP/MPO DKO Mäusen zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied, aber dennoch ein eindeutiger Trend hin zu einer verminderten Expression des BNP, hervorgerufen durch eine MPO Defizienz in MLP-KO Tieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich eine MPO Defizienz positiv auf die Herzinsuffizienz als

klinisches Symptom der DCM auswirkt und untermauert somit die Ergebnisse bezüglich der systolischen LV-Funktion.

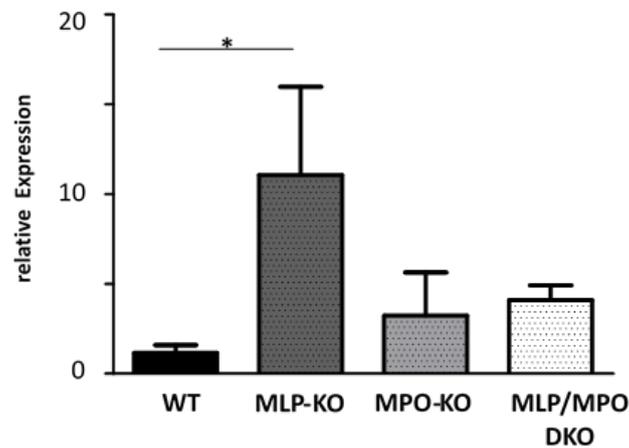


Abb. 4.5: Untersuchung der Ausprägung der Herzinsuffizienz in MLP-KO und MLP/MPO DKO Tieren mithilfe des natriuretischen Peptids Typ B (BNP): Ermittlung der Expression des BNP im Myokard der Versuchsgruppen mithilfe von q-PCR. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression von BNP im Myokard der MLP-KO Tiere verglichen mit dem Wildtyp, während die Expressionsrate in den MLP/MPO DKO Tieren etwa das gleiche Maß aufweisen wie der Wildtyp und die MPO-KO Versuchsgruppe.

4.5 Effekt von MPO auf das fetale kardiale Genprogramm in MLP defizienten

Mäusen

Auf der Suche nach den mechanistischen Ursachen des in dieser Arbeit gezeigten protektiven Effekts der MPO Defizienz auf die verminderte systolische LV-Funktion in der MLP-KO Maus sollte zunächst ein möglicher MPO-abhängiger Effekt auf das kardiale Remodeling in diesem Tiermodell untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist die Reaktivierung des fetalen kardialen Genprogramms ein fester Bestandteil der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz. Auch für die MLP-KO Maus ist die vermehrte Expression von für die Hypertrophie relevanter Proteine bereits beschrieben worden (Arber et al. 1997, Yamamoto et al. 2007). Daher sollte überprüft werden, ob diese Reaktivierung des fetalen Genprogramms in der MLP-KO Maus bestätigt werden kann und ob eine MPO Defizienz Einfluss darauf nimmt. Daher wurden die für das fetale kardiale Genprogramm charakteristischen Parameter ANP, Myosin Schwere Kette (MHC) α und β , der MHC α/β Quotient, skeletales α -Aktin und SERCA mithilfe der quantitativen RT-PCR auf ihre myokardiale Expression untersucht (siehe Abb. 4.6). Es zeigte sich zunächst eine signifikant erhöhte Expression des ANP und des skeletalen α -

Aktins in MLP-KO Mäusen (ANP: WT vs. MLP-KO: $1,9071 \pm 0,672$ vs. $27,91 \pm 8,073$, $p = 0,004$; skeletales α -Aktin: WT vs. MLP-KO: $0,904 \pm 0,093$ vs. $2,27 \pm 0,218$ $p = 0,000$). Mit Bezug auf die Expression von MHC α und β konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT und MLP-KO Maus nachgewiesen werden. Der Quotient aus der Expression von der Myosin schwere Kette α und Myosin Schwere Kette β war zwar nicht signifikant reduziert, es konnte dennoch ein Trend hin zu einer Verringerung des Quotienten in MLP-KO Tieren im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Bezüglich der Expression von SERCA ließ sich jedoch kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen feststellen. Bei einem Vergleich von MLP-KO mit MLP/MPO DKO Tieren zeigte die Expressionsanalyse von MHC β zunächst eine signifikant erniedrigte Expressionsrate in MLP/MPO DKO Mäusen (MHC β : MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $1,301 \pm 0,189$ vs. $0,723 \pm 0,086$, $p = 0,004$). Weiterhin wurde eine signifikante Reduktion der Expression von MHC α in MLP/MPO DKO Mäusen im Vergleich zu den MPO-KO Mäusen festgestellt (MHC α : MLP/MPO DKO vs. MPO-KO: $0,811 \pm 0,121$ vs. $1,334 \pm 0,153$, $p = 0,035$). Somit konnte für den Quotienten Myosin Schwere Kette α/β eine signifikante Erhöhung in den MLP/MPO DKO Mäusen im Vergleich zu den MLP-KO Tieren festgestellt werden (MHC α/β : MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $0,102 \pm 0,019$ vs. $0,17 \pm 0,034$, $p = 0,048$). Bezüglich der Expression von ANP und dem skeletalen α -Aktin jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

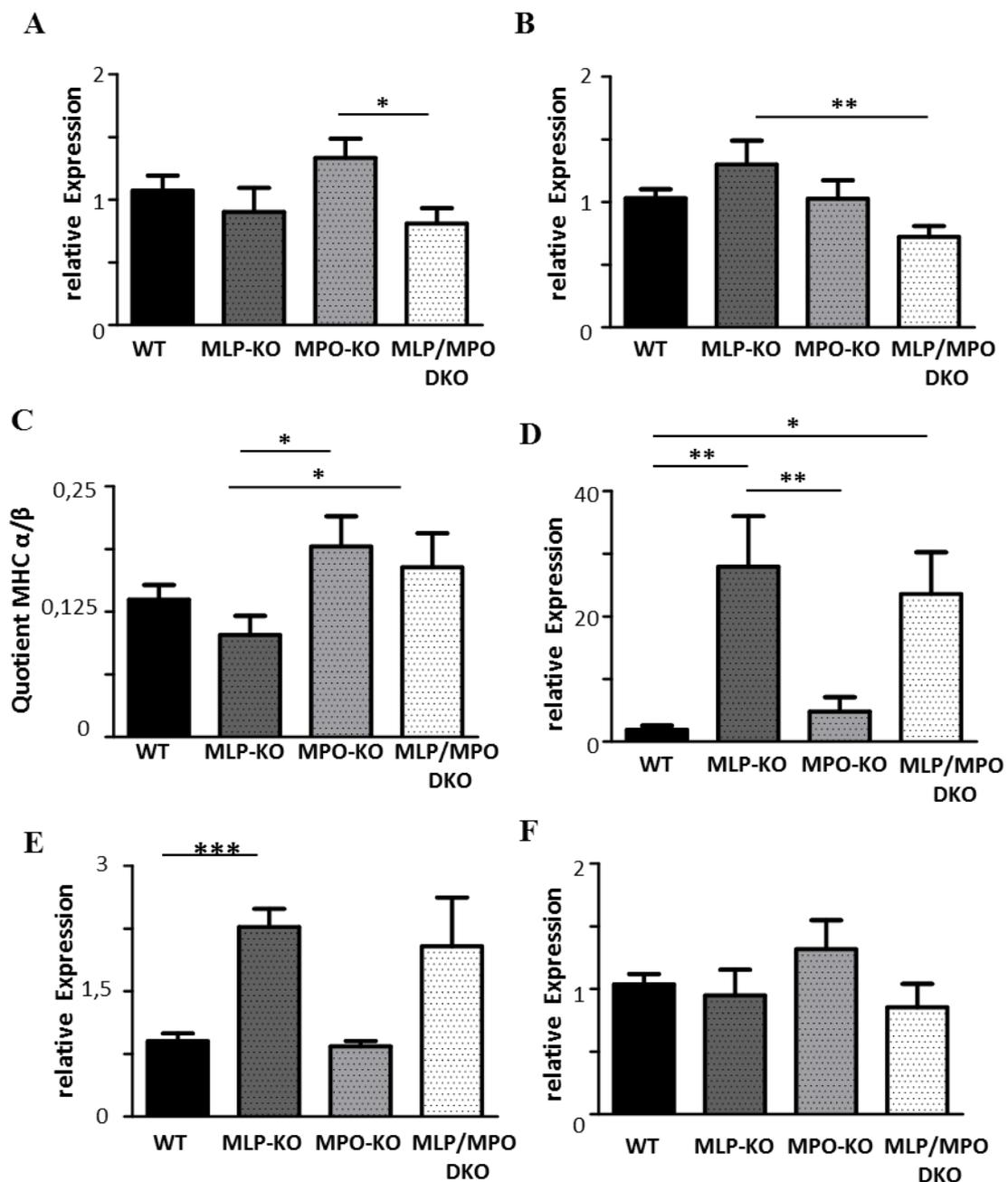


Abb. 4.6: Untersuchungen zum fetalen kardialen Genprogramm im Myokard der MLP-KO Mäuse in Abhängigkeit von MPO: Quantitative Auswertung der q-PCR für (A) MHC α , (B) MHC β , (C) Quotient aus MHC α/β , (D) ANP, (E) skeletales α -Aktin und (F) SERCA. Es zeigt sich ein eindeutiger Hinweis auf eine Aktivierung des fetalen kardialen Genprogramms in den MLP-KO Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. So ist die Expression von ANP und dem skeletalen α -Aktin in MLP-KO Mäusen signifikant erhöht und der Quotient aus MHC α/β zeigt einen Trend hin zu einer Verringerung in MLP-KO Mäusen. Eine zusätzliche MPO Defizienz hingegen führt bezüglich des MHC β zu einer signifikanten Verringerung der Expression in MLP-KO Mäusen. Bezogen auf den Quotienten aus MHC α/β zeigt sich eine signifikante Erhöhung im MLP/MPO DKO Tier im Vergleich zur MLP-KO Maus. Die Expression von SERCA unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen.

4.6 Effekt von MPO auf die Ausprägung ventrikulärer Fibrose in MLP-KO

Mäusen

Neben der Hypertrophie der Kardiomyozyten ist auch der Umbau der ECM ein wichtiger Bestandteil des kardialen Remodelings. Als eine der charakteristischen Kenngrößen des kardialen Remodelings dient der Grad der Fibrosierung des Ventrikels. Aus diesem Grund wurde eine Picosirius Rot Färbung von Paraffin-Schnitten der Ventrikel der Mäuse aus den verschiedenen Versuchsgruppen durchgeführt (siehe Abb. 4.7). Es zeigte sich, wie zu erwarten, eine starke, signifikante Ausprägung der interstitiellen Fibrose im Ventrikel der MLP-KO Maus im Vergleich zum Wildtyp (WT vs. MLP-KO: $0,003 \pm 0,000791$ vs. $0,025 \pm 0,00077$, $p = 0,000$). Diese für eine DCM charakteristische Fibrosierung ließ sich in etwa demselben Ausmaß auch in den MLP/MPO DKO Tieren beobachten (MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $0,025 \pm 0,00077$ vs. $0,024 \pm 0,00241$, $p = 0,806$). Da der Grad der ventrikulären Fibrose einhergeht mit einer gewissen Steifigkeit des Ventrikels deckt sich dieses mit dem Ergebnis, dass eine verminderte diastolische Funktion in MLP-KO Mäusen nicht durch ein Knockout des MPO abgemildert wird.

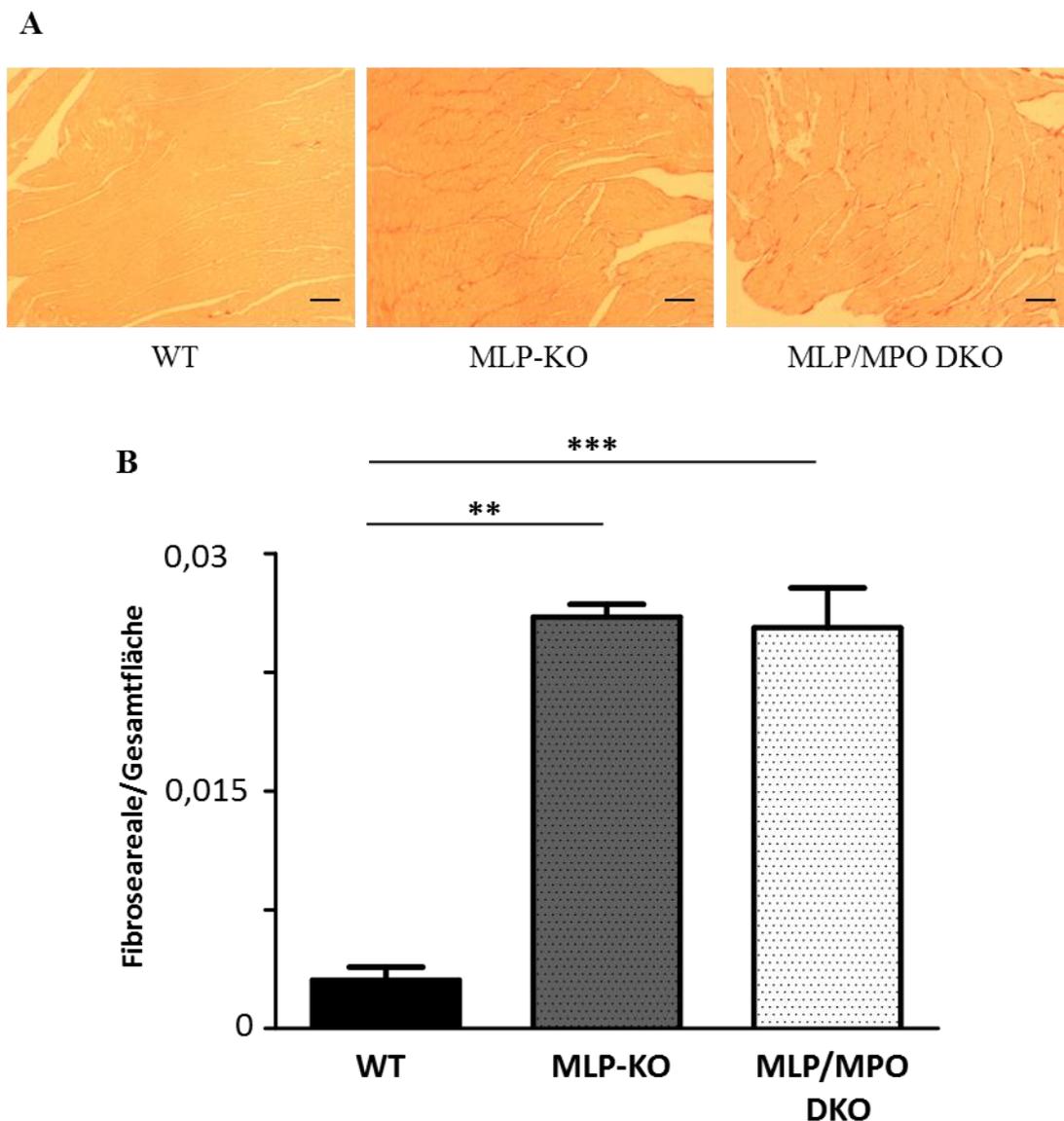


Abb. 4.7: Interstitielle Fibrosierung im linken Ventrikel der MLP-KO Mäuse als Parameter des kardialen Remodelings (A) Repräsentative Bilder einer Picrosirius Rot Färbung des Myokards der Versuchstiere. Der Größenbalken entspricht 400 μm (B) Quantitative Auswertung des Fibrosegehalts des Myokards durch Ermittlung der mithilfe von Picrosirius Rot angefärbten fibrotischen Areale pro Gesamtfläche mithilfe der Ivision Software. Die MLP-KO Mäuse weisen ein deutlich erhöhten Anteil an interstitieller Fibrose im Ventrikel im Vergleich zum Wildtyp auf, ein vergleichbares Maß an Fibrosierung zeigen auch die MLP/MPO DKO Tiere

Auch aufgrund der Tatsache, dass das kardiale Remodeling mit erhöhter Sekretierung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 oder $\text{TNF}\alpha$ korreliert (Pauschinger et al. 2002), sind bei der Progression der dilatativen Kardiomyopathie auch proinflammatorische Prozesse von großer Bedeutung. Kommt es zu einer Zunahme der

Inflammation innerhalb des Ventrikels, so geht dies einher mit der Infiltration von Leukozyten in das Ventrikelgewebe, insbesondere von Makrophagen. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Infiltration von Makrophagen und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz konnte bereits in einem Mausmodell gezeigt werden. So führt eine kardial spezifische Überexprimierung des *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1), einen der Schlüsselzytokine der Makrophageninfiltration zu der Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Niu et al. 2006). Da auch MPO zentrale inflammatorische Bedeutung hat, sollte überprüft werden, inwieweit sich eine erhöhte ventrikuläre Makropageninfiltration in den MLP-KO Tieren nachweisen lässt und ob diese beeinflusst wird durch eine MPO Defizienz. Um das Ausmaß der Makrophageninfiltration zu erfassen, wurde eine IBA-1 Färbung von Ventrikelschnitten durchgeführt (siehe Abb. 4.8). Als Ergebnis zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl an Makrophagen im Ventrikelmyokard von MLP-KO Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Tieren (WT vs. MLP-KO: $1,003 \pm 0,212$ vs. $3,422 \pm 0,699$, $p = 0,006$). Jedoch ließ sich keine signifikante Änderung der Anzahl an Makrophagen im Ventrikelgewebe in MLP/MPO DKO Tieren im Vergleich zu den MLP-KO Tieren feststellen (MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $3,422 \pm 0,699$ vs. $2,998 \pm 0,554$, $p = 0,607$). Zusammen mit den Daten zu der Fibrosierung des Ventrikels legt dieses Ergebnis den Schluss nahe, dass die Beteiligung von MPO an der Progression der dilatativen Kardiomyopathie in der MLP-KO Maus nicht mit einer Verminderung des kardialen Remodelings und einer damit einhergehenden Infiltration von Immunzellen verknüpft ist.

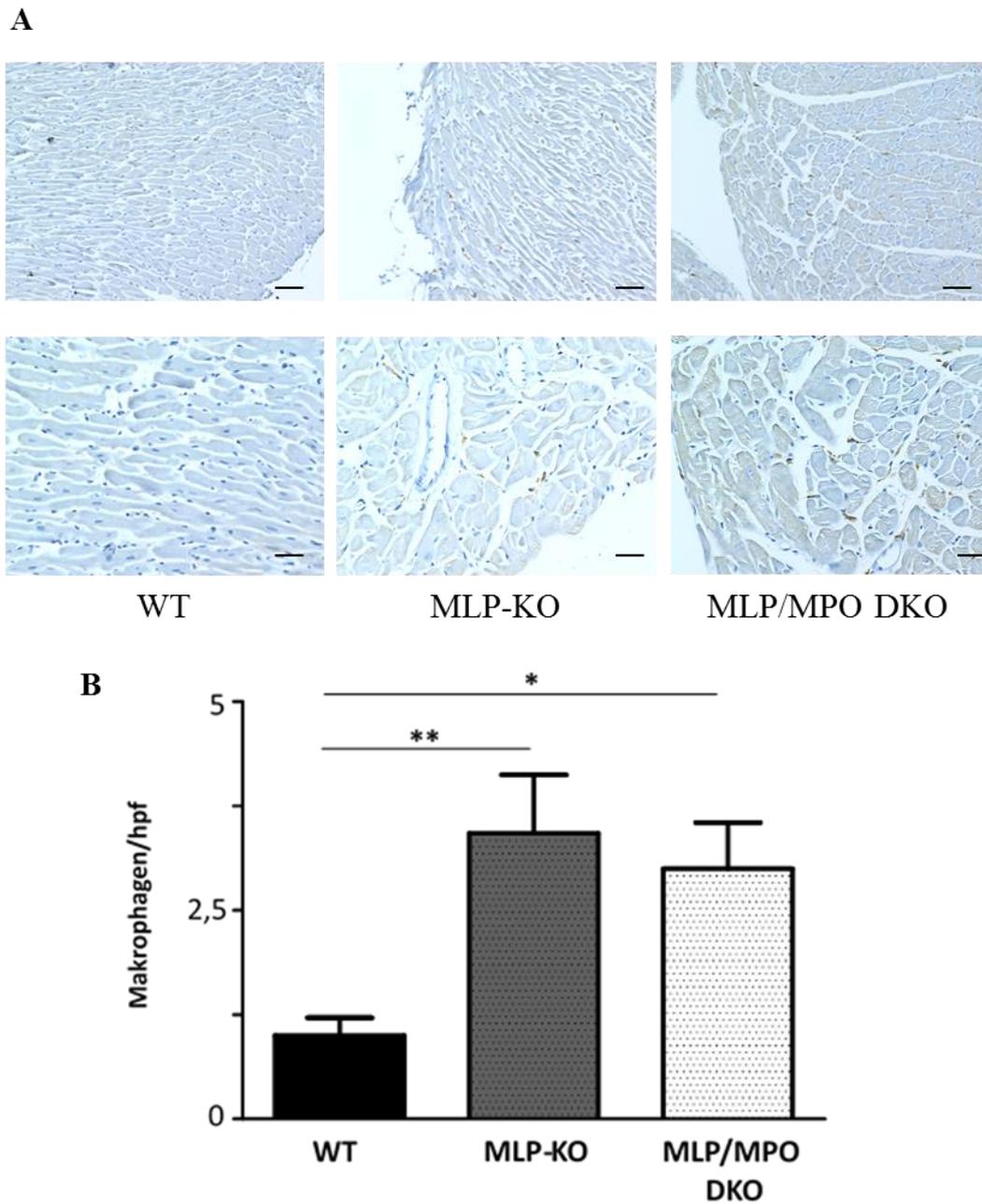


Abb. 4.8: Einfluss einer MPO Defizienz auf die Makrophagen-Infiltration in den linken Ventrikel der MLP-KO Maus: (A) Repräsentative Bilder der IBA-Färbung zur Identifikation der Makrophagen, die durch die Methode braun angefärbt sind. In der oberen Reihe entspricht der Größenbalken 400 μm , in der unteren Reihe entspricht der Größenbalken 200 μm . (B) Quantitative Auswertung der Makrophagenanzahl durch Auszählung der Makrophagen pro Sichtfeld. Ein MLP-KO führt in den Mäusen zu einer signifikanten Zunahme der Makrophageninfiltration in den Ventrikel. Ein zusätzlicher Knockout des MPO-Gens resultiert nicht in einer Verminderung der Makrophagenanzahl im Ventrikel im Vergleich zu der MLP-KO Versuchsgruppe.

4.7 Sekretion und Akkumulation der Myeloperoxidase in MLP-KO Tieren

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich eines Effekts von MPO auf die systolische linksventrikuläre Herzfunktion in der MLP-KO Maus zusammen mit Patientenstudien, die zeigen, dass das Auftreten einer Herzinsuffizienz einhergeht mit erhöhten MPO Plasmaspiegeln (Michowitz et al. 2008) (Rudolph et al. 2007), legen die Vermutung nahe, dass auch bei der MLP-KO Maus die Menge an frei in der systemischen Zirkulation vorkommendem MPO erhöht ist. Daher wurden mithilfe eines MPO-Elisas Plasmaproben bezüglich der MPO-Konzentration untersucht (siehe Abb. 4.9). Es zeigte sich zwar kein signifikanter Unterschied zwischen der MLP-KO Maus und dem Wildtyp, jedoch aber ein leichter Trend hin zu einer erhöhten Konzentration von MPO im Plasma von MLP-KO Mäusen. Aufgrund ihres Genotyps wiesen die MLP/MPO DKO Mäuse keinerlei MPO im Plasma auf.

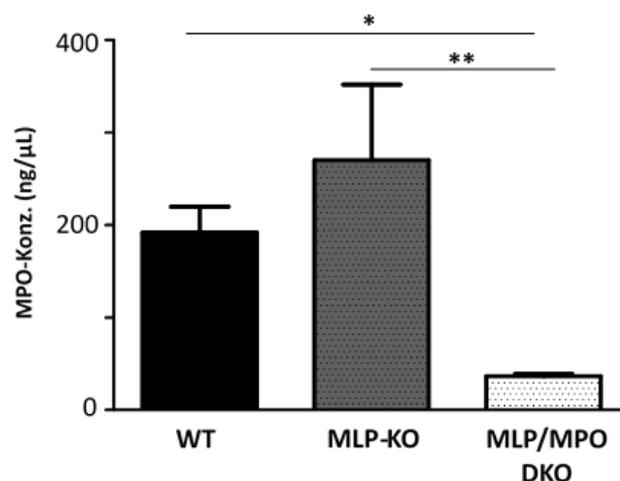


Abb. 4.9: Konzentration von MPO im Blutplasma, ermittelt mithilfe eines Maus-MPO Elisas: Die Plasmalevel des MPO sind in den MLP-KO Tieren im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant erhöht. Aufgrund der Unfähigkeit der MLP/MPO DKO Tiere MPO zu exprimieren lässt sich auch hier kein MPO in der systemischen Zirkulation nachweisen.

In dieser Arbeit wurde eine Beteiligung von MPO an der Progression der Herzinsuffizienz in der MLP-KO Maus nachgewiesen. Da MPO seine pathophysiologischen Eigenschaften oft über Interaktion mit dem Endothel vermittelt, ist zu erwarten, dass eine erhöhte MPO Deposition in der Koronarvaskulatur der MLP-KO Mäuse vorliegt. Daher sollte neben des Levels an freiem in der systemischen Zirkulation vorkommendem MPO auch die Menge an MPO in der koronaren Zirkulation dieser Tiere ermittelt werden (siehe Abb. 4.10). Aufgrund seiner kationischen Oberfläche interagiert MPO mit der Glykokalix der

Endothelzellen und liegt daher zu einem großen Teil am Endothel immobilisiert vor (Klinke et al. 2011). Um die Menge an am Gefäßbett der Koronargefäße gebundenem MPO zu messen, wurden daher die Herzen der Versuchstiere retrograd mit einer Heparinlösung perfundiert. Das Heparin in der Perfusionslösung sorgt durch seine negative Ladung dafür, dass sich das MPO von den Endothelzellen löst und somit frei im aufgefangenen Perfusat vorliegt. In den Untersuchungen konnte eine signifikant erhöhte koronare Deposition von MPO in den MLP-KO Mäusen im Vergleich zum WT ermittelt werden (WT vs MLP-KO: $59,035 \pm 22,306$ vs $129,709 \pm 19,049$, $p = 0,005$). Da MPO vorrangig von neutrophilen Granulocyten ausgeschüttet wird, deutet die im Vergleich zum Wildtyp erhöhte MPO-Konzentration im koronaren Gefäßsystem der MLP-KO Mäuse auf eine erhöhte Aktivierung von neutrophilen Granulocyten zumindest in diesem Teil des Gefäßsystems hin.

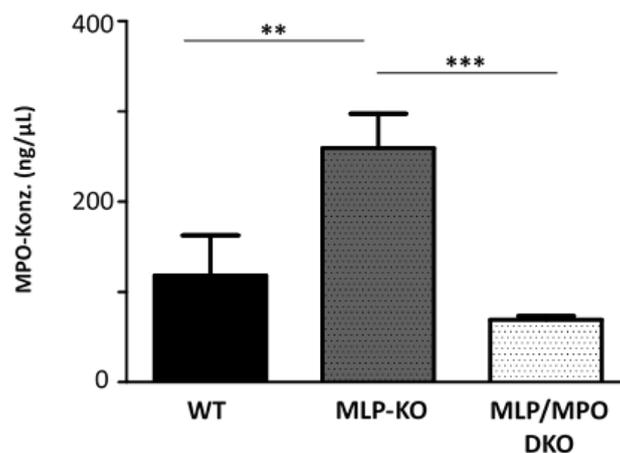


Abb. 4.10: Erhöhte MPO Deposition in der Koronarzirkulation der MLP-KO Tiere: Die Herzen der Mäuse wurden zunächst mit Heparinlösung retrograd über die Aorta perfundiert, um an die Gefäßwand immobilisiertes MPO bei der Messung zu bestimmen. Anschließend wurde die Konzentration von MPO in den Perfusaten mithilfe eines MausMPO Elisas ermittelt. Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Menge an in den Koronargefäßen immobilisiertem MPO in den MLP-KO Mäusen im Vergleich zum WT.

4.8 MPO und die koronarvaskuläre Funktion in MLP-KO Tieren

Eine Verringerung der Kapillardichte im Ventrikel und die daraus resultierenden hämodynamischen Änderungen sind als Bestandteil des vaskulären Phänotyps der dilatativen Kardiomyopathie bereits beschrieben worden (Tsagalou et al. 2008). Daher sollte zur Ermittlung der koronarvaskulären Funktion zunächst überprüft werden, ob dieses vaskuläre Charakteristikum auch in der MLP-KO Maus nachgewiesen werden

kann und, falls dem so ist, ob eine MPO Defizienz darauf Einfluss nimmt. Um Informationen über die Kapillardichte im linken Ventrikel zu erhalten, wurde eine immunhistologische Färbung von Ventrikelschnitten der Versuchstiere unter Verwendung eines anti-CD31 Antikörpers durchgeführt (siehe Abb. 4.11). Das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1 oder CD31) wird in Endothelzellen exprimiert und auf der Oberfläche dieser Zellen lokalisiert. Aufgrund ihres Durchmessers von 5 bis 10 μm sind Kapillaren bei Verwendung eines CD31-Antikörpers leicht von größeren Gefäßen wie Arteriolen oder Arterien zu unterscheiden. Dies wurde bei der Quantifizierung der Kapillardichte berücksichtigt. Als Ergebnis dieses Versuchs zeigte sich eine signifikante Verminderung der Kapillardichte in den MLP-KO Tieren bei einem Vergleich mit dem Wildtyp (WT vs. MLP-KO: $4,688 \pm 0,214$ vs. $3,808 \pm 0,135$, $p = 0,001$). Jedoch ließ sich kein Unterschied bezüglich der Anzahl an Kapillaren zwischen den MLP-KO Tieren und den MLP/MPO DKO Tieren feststellen (MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $3,808 \pm 0,135$ vs. $3,849 \pm 0,127$, $p = 0,866$).

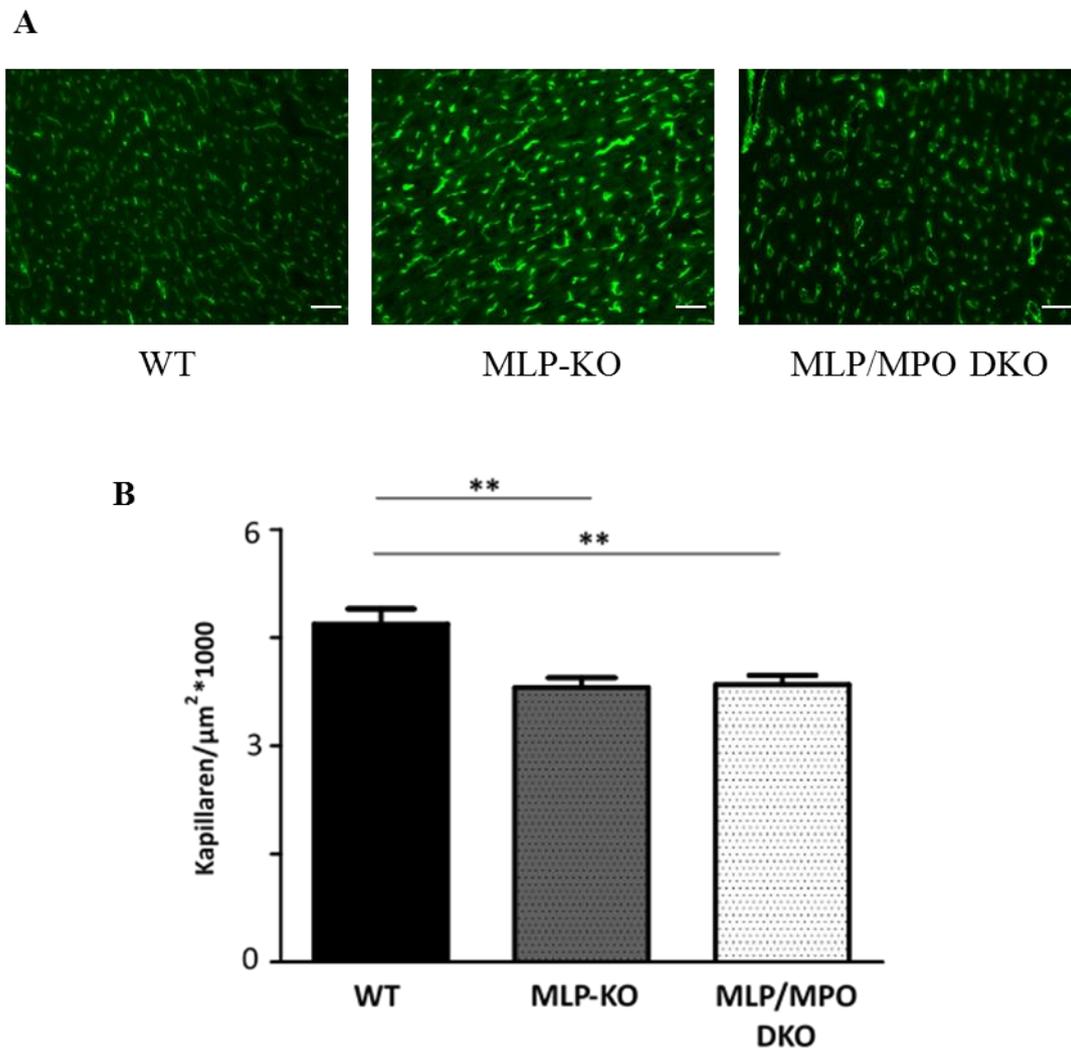


Abb. 4.11: Zusammenhang zwischen eines MPO Knockouts und einer verminderten linksventrikulären Kapillardichte in MLP-KO Tieren: (A) Repräsentative immunhistologische Aufnahmen unter Verwendung eines anti-CD31- Primäantikörpers. Der Größenbalken entspricht 20 μm . (B) Quantitative Auswertung der Kapillardichte der immunhistologischen Aufnahmen unter Mithilfe der Software BZ II Analyser. Die Anzahl der Kapillaren pro Sichtfeld ist in den MLP-KO Mäusen signifikant reduziert, wobei diese verringerte Kapillardichte durch eine MPO Defizienz unverändert bleibt.

Aufgrund der erhöhten koronaren Deposition des MPO in MLP-KO Tieren sollte das Myokardgewebe in Bezug auf die Verfügbarkeit des vasodilativ wirkenden Signalmediators Stickstoffmonoxid (NO) proteinbiochemisch untersucht werden. Als Marker für die NO-Bioverfügbarkeit wurde am Serin 157 phosphoryliertes VASP verwendet. Dabei zeigten die Western Blot Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede in dem Anteil an phosphoryliertem VASP (Ser157) zwischen den Versuchsgruppen, allenfalls einen leichten Trend hin zu einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit im Myokard der MLP-KO Maus (siehe Abb. 4.12). Da in der Vaskulatur

Abb. 4.12: NO-Bioverfügbarkeit im Myokard: (A-C) Repräsentative Western Blot Bilder: (A) Charakteristische Doppelbande eines Blots der mit einem VASP/pVASP spezifischen Primärantikörper behandelt wurde. Die obere Bande entspricht am Ser 157 phosphoryliertem VASP, die untere Bande dem unmodifizierten Protein. (B) eNOS Banden eines Blots behandelt mit einem eNOS spezifischen Primärantikörper (C) GAPDH Western Blot zur Normalisierung der eNOS Signale. (D) Quantitative Auswertung der pVASP-Anteile. (E) Quantitative Auswertung der eNOS Expression, normalisiert auf das Housekeeping Gen GAPDH. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen bezüglich des pVASP Anteils und der Proteinexpression von eNOS.

Die bisher gezeigten Ergebnisse geben den Hinweis darauf, dass die koronare Perfusion in den MLP-KO Mäusen reduziert ist. Zum einen gilt, je größer die Anzahl an Kapillaren im Ventrikel, umso größer ist das Volumen, das genutzt werden kann, um den Druck des durch die Koronararterien fließenden Blutes zu verteilen und somit zu reduzieren. Daher sollte sich der Befund der reduzierten Kapillardichte im Ventrikel der MLP-KO Mäuse in einem erhöhten basalen Perfusionsdruck der Koronararterien niederschlagen. Die Tatsache, dass die MLP-KO Mäuse eine signifikant erhöhte Deposition von MPO in den Koronargefäßen aufweisen, zusammen mit den durch MPO vermittelten vasokonstringierenden Effekten liefert ein weiteres Argument für einen erhöhten koronaren Perfusionsdruck. Des Weiteren gibt dieses Ergebnis den Hinweis darauf, dass der Effekt von MPO auf die Progression der Herzinsuffizienz im MLP-KO Mausmodell möglicherweise verursacht ist durch eine pathologische Änderung der Koronargefäßfunktion, also jener Gefäße, die für die Nähr- und Sauerstoffversorgung des Herzmuskels verantwortlich sind. Daher wurde der koronare Perfusionsdruck des Herzens mithilfe eines Langendorff-Systems ermittelt. Erstaunlicherweise ließ sich dabei jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen feststellen (siehe Abb. 4.13).

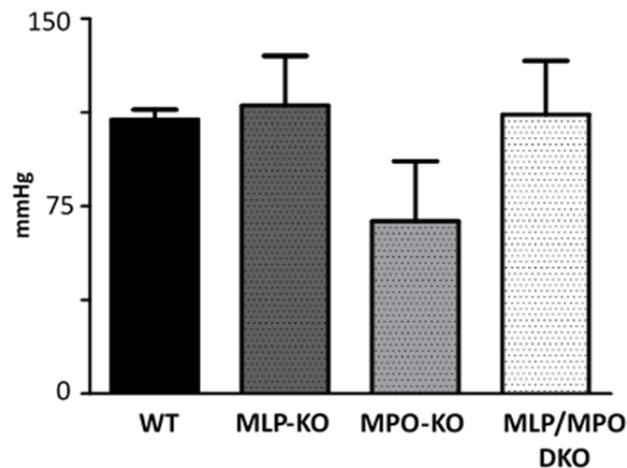


Abb. 4.13: Koronarer Perfusionsdruck in MLP-KO Tieren und der Einfluss von MPO auf diesen Parameter: Der koronare Perfusionsdruck wurde ermittelt durch Perfusion der entnommenen Herzen mit einem Krebs Henseleit Puffer mithilfe eines Langendorff-Systems bei konstantem Fluss unter Verwendung eines Druckmessers oberhalb des aufgehängten Herzens. Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden.

4.9 MPO und die Gefäßfunktion in der systemischen Zirkulation in MLP-KO Tieren

Neben den Untersuchungen zu der koronaren Gefäßfunktion sollte auch ermittelt werden, ob die Dilatationsfähigkeit des systemischen Gefäßsystems in MLP-KO Mäusen beeinträchtigt ist und wenn ja, inwieweit dies bedingt ist durch die Myeloperoxidase. Dafür wurden zunächst *ex vivo* physiologische Untersuchungen mithilfe des Organbads durchgeführt. Das Organbad bietet die Möglichkeit, sowohl die endothelabhängige als auch die endothelunabhängige Funktion der für die Untersuchung verwendeten Gefäße zu ermitteln. In unserem Fall wurde die Aorta, genauer Teile der Aorta thoracica und der weiterführenden Aorta abdominalis verwendet, um eine mögliche reduzierte Dilatationsfähigkeit des vaskulären Systems zu untersuchen. Die Versuche bezüglich der endothelunabhängigen Aortenfunktion zeigten keinerlei Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Dies Ergebnis deutet an, dass Funktion der Tunica media, also der die glatten Gefäßmuskelzellen enthaltenden Schicht des Gefäßes durch die DCM in MLP-KO Tieren zu dem untersuchten Zeitpunkt nicht negativ beeinflusst wurde (siehe Abb. 4.14 B). Anders verhält es sich mit der endothelabhängigen vaskulären Funktion (siehe Abb. 4.14 A). Hierbei ließ sich eine signifikante Reduktion der Dilatationsfähigkeit in den MLP-KO Tieren im Vergleich zum Wildtyp feststellen (WT vs. MLP-KO: $64,242 \pm 2,069$ vs. $37,508 \pm 3,824$, $p = 0,000$). Darüber hinaus zeigt dieser Versuch

bemerkenswerterweise, dass die Unfähigkeit der Expression des MPO-Gens zu einer signifikanten Verbesserung der verschlechterten Endothelfunktion, hervorgerufen durch die DCM, in den MLP-KO Tieren führt (MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $37,508 \pm 3,824$ vs. $53,979 \pm 3,115$, $p = 0,000$). Diese *ex vivo* Methode weist somit eindeutig auf eine verminderte Relaxationsfähigkeit der Aorta in den MLP-KO Tieren hin.

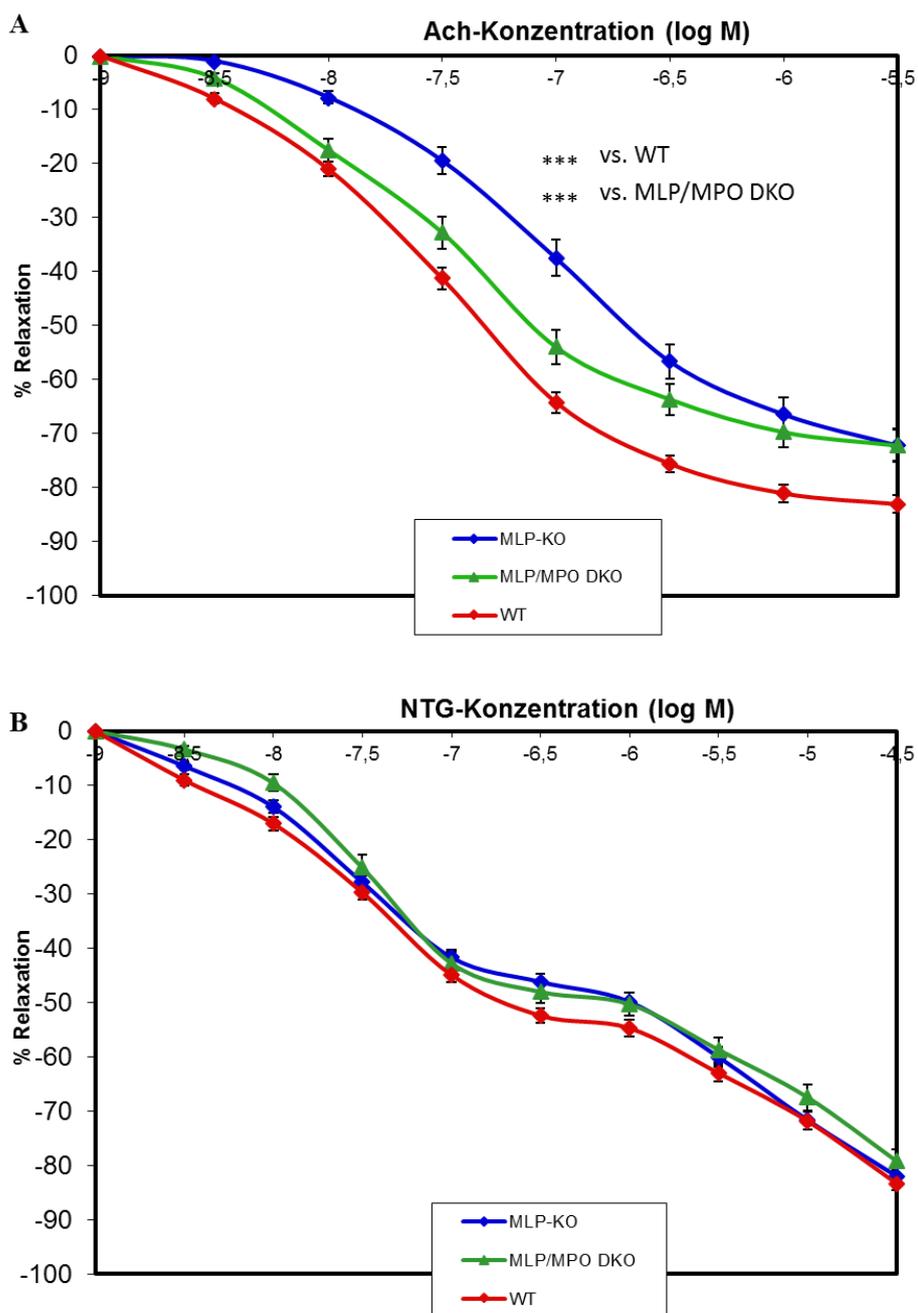


Abb. 4.14: Einfluss der MPO Defizienz auf die endothelabhängige und endothelunabhängige Aortenfunktion: (A) Relaxationskurve der Aortenstücke in Antwort auf eine ansteigende Ach-Konzentration zur Ermittlung der endothelunabhängigen Gefäßfunktion. (B) Relaxationskurve der Aortenstücke in Antwort auf eine ansteigende NTG-Konzentration zur Ermittlung der endothelunabhängigen Gefäßfunktion. Die MLP-KO Mäuse sind charakterisiert durch eine signifikant eingeschränkte endothelabhängige Relaxationsfähigkeit bei einer Ach-Konzentration von 100 nM, die wiederum durch eine MPO Defizienz signifikant verbessert wird. In Bezug auf die endothelunabhängige Gefäßfunktion lässt sich kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen feststellen.

Da es sich bei den Organbad-Versuchen um eine physiologische Messung, die *ex vivo* stattfindet, handelt, sollte zusätzlich überprüft werden, ob sich die Ergebnisse des Organbads bezüglich des peripheren Gefäßsystems auch *in vivo* nachweisen lassen. Hierzu wurde der systemische vaskuläre Widerstand (*Systemic Vascular Resistance*, SVR) mithilfe eines Druck-Volumen-Konduktanz-Katheters ermittelt (siehe Abb. 4.15). Der systemische vaskuläre Widerstand beschreibt den Druck, der aufgewendet werden muss, um Blut entgegen dem vorherrschenden Widerstand durch das periphere Gefäßsystem zu bewegen und ist somit direkt abhängig von der peripheren Gefäßfunktion. Die Versuche ergaben, verglichen mit Wildtyp-Tieren, einen signifikant erhöhten systemischen vaskulären Widerstand in MLP-KO Mäusen (WT vs. MLP-KO: $0,342 \pm 0,034$ vs. $0,59 \pm 0,043$, $p = 0,000$). Der systemische vaskuläre Widerstand in den MLP/MPO DKO Mäusen hingegen war vergleichbar mit dem in WT Mäusen (MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $0,59 \pm 0,043$ vs. $0,351 \pm 0,033$, $p = 0,000$). Zusammen mit den Daten des Organbads zeigt dieses Experiment somit, dass in MLP-KO Mäusen eine Einschränkung der Funktion des periphervaskulären Systems vorliegt und, dass diese wohl vermittelt wird durch eine Dysfunktion im Endothel. Darüber hinaus ist diese endothelabhängige periphervaskuläre Dysfunktion abhängig von dem Vorkommen der Myeloperoxidase.

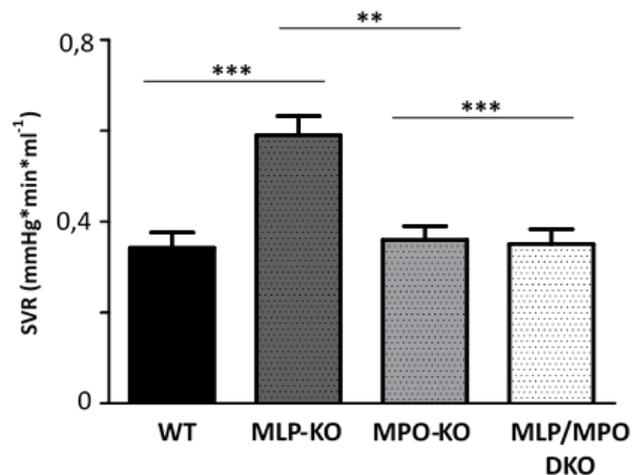


Abb. 4.15: Systemischer vaskulärer Widerstand in MLP-KO Mäusen in Abhängigkeit von MPO: Der systemische vaskuläre Widerstand wird bestimmt durch Ermittlung des mittleren arteriellen Drucks, des zentralvenösen Drucks und des Herzzeitvolumens mithilfe von Konduktanz-Kathetern. Die MLP-KO Mäuse weisen eine signifikante Erhöhung des systemischen vaskulären Drucks auf. Wohingegen sich die anderen Versuchsgruppen nicht voneinander unterscheiden.

Da MPO bekanntermaßen einen reduzierenden Einfluss auf die NO-Bioverfügbarkeit hat, sollte untersucht werden, ob die durch eine MPO Defizienz ausgelöste Abmilderung der endothelabhängigen vaskulären Dysfunktion der Aorta in den MLP-KO Mäusen in einem Zusammenhang mit dieser Eigenschaft des MPO steht. Daher wurde das Aortengewebe mithilfe des Western Blots proteinbiochemisch auf die Menge an phosphoryliertem VASP (Ser157) und eNOS untersucht (siehe Abb. 4.16). Dabei konnte eine signifikante Reduktion des Anteils an phosphoryliertem VASP als Marker für die NO-Bioverfügbarkeit in der Aorta der MLP-defizienten Tiere nachgewiesen werden (WT vs. MLP-KO: $904,172 \pm 285,369$ vs. $169,192 \pm 25,555$, $p = 0,021$). Ein Trend hin zu einer Erhöhung der Menge an NO zeigte das Aortengewebe von MLP/MPO DKO Mäusen im Vergleich zum MLP-KO Tier (MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $169,192 \pm 25,555$ vs. $479,008 \pm 125,517$, $p = 0,866$). Konträr zu diesen Ergebnissen zeichnete sich die MLP-KO Maus durch eine signifikant verstärkte Expression der eNOS in der Aorta im Vergleich zu den Tieren der MLP/MPO DKO Versuchsgruppe aus (MLP-KO vs. MLP/MPO DKO: $2,028 \pm 0,547$ vs. $0,93 \pm 0,244$, $p = 0,046$). Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass der Grund für die endothelabhängige vaskuläre Dysfunktion der Aorta der MLP-KO Tiere eine MPO vermittelte Reduktion der NO- Bioverfügbarkeit ist.

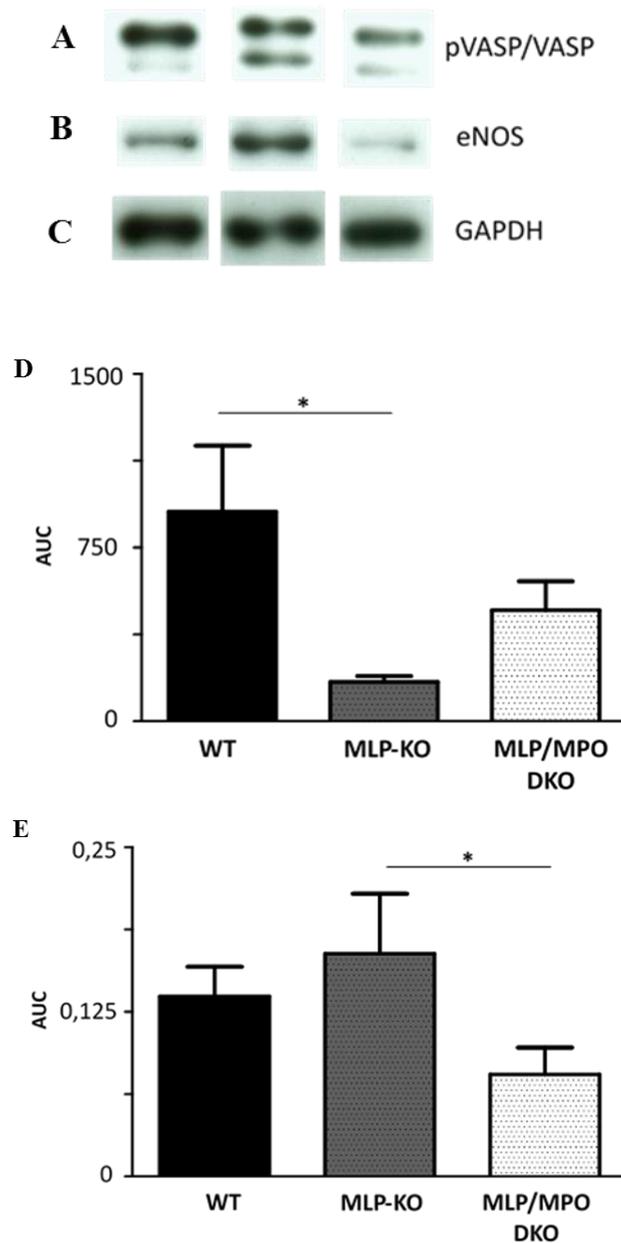


Abb. 4.16: NO-Bioverfügbarkeit in der Aorta: (A-C) Repräsentative Western Blot Bilder: (A) charakteristische Doppelbande eines mit einem VASP/pVASP spezifischen Primärantikörper behandelten Blots (B) Ein mit einem eNOS spezifischen Primärantikörper behandelter Blot. (C) GAPDH Western Blot zur Normalisierung der eNOS Signale. (D) Quantitative Auswertung der pVASP-Anteile in der Aorta. (E) Quantitative Auswertung der eNOS Expression in der Aorta, normalisiert auf das Housekeeping Gen GAPDH. Die NO-Bioverfügbarkeit ist in den Aorten der MLP-KO Tiere signifikant reduziert im Vergleich zum WT, wobei ein zusätzlicher Knockout des MPO wieder ein Trend hin einer Erhöhung des reduzierten pVASP andeutet. Die eNOS Expression wiederum ist in der Aorta der MLP/MPO DKO Tiere verglichen mit den MLP/MPO DKO Tieren signifikant reduziert.

5 Diskussion

Einen ersten Anhaltspunkt für die Verbindung zwischen der Myeloperoxidase und der Progression der Herzinsuffizienz lieferte bereits eine Patientenstudie, die eine Korrelation des MPO Spiegels im Plasma und der Schwere der Herzinsuffizienz aufzeigten (Rudolph et al. 2007). Somit war es Ziel dieser Arbeit, zu überprüfen, ob ein mechanistischer Zusammenhang zwischen dem Enzym Myeloperoxidase und der Progression einer Herzinsuffizienz in einem Mausmodell für eine dilatative Kardiomyopathie (DCM) vorliegt. Als Mausmodell für die DCM wurde in dieser Arbeit die MLP-KO Maus gewählt. Durch erste Untersuchungen mit der MLP-KO Maus konnten Arber et al., 1992 zeigen, dass diese Maus durch die aus dem Knockout des MLP resultierenden genetischen Störungen der kardiomyozytären Zytoarchitektur eine stark dilatierte Ventrikelgeometrie aufweist, die einhergeht mit der als kardiales Remodeling bezeichneten Änderung der myokardialen Struktur und Komposition. Daraus resultiert eine eingeschränkte Herzfunktion. Da die MLP-KO Maus aufgrund dieser kardialen pathologischen Vorgänge einen kardialen Phänotyp zeigt, der sehr ähnlich einer durch eine DCM ausgelösten Herzinsuffizienz im Menschen ist, wird diese Mauslinie inzwischen von vielen Arbeitsgruppen für die Erforschung der dilatativen Kardiomyopathie und der Herzinsuffizienz genutzt. Um mögliche Verbindungen zwischen dem kardialen Phänotyp der MLP-KO Maus und der Myeloperoxidase herauszustellen, wurde eine MLP/MPO DKO Maus eingesetzt und bei funktionellen und molekularbiologischen Untersuchungen mit der MLP-KO Maus verglichen.

5.1 Einfluss der MPO Defizienz auf die Herzfunktion der MLP-KO Maus

Um erste Anhaltspunkte für einen möglichen Einfluss von MPO auf die Progression der Herzinsuffizienz in der MLP-KO Maus zu erhalten, wurde überprüft, ob sich durch einen Knockout des MPO Änderungen in der dilatierten Herzgeometrie der MLP-KO einstellen. Zusätzlich zur makroskopischen Betrachtung der Herzen wurden mithilfe der transthorakalen Echokardiographie das linksventrikuläre Volumen und die Dicke der linksventrikulären posterioren Wand gemessen. Dabei konnte die für eine DCM charakteristische Dilatation in MLP-KO Mäusen bestätigt werden. Interessanterweise zeigte sich weiter, dass eine MPO Defizienz nicht zu Veränderungen in der

Herzgeometrie der 10 Wochen alten MLP-KO Tiere führt. Zu den Ursachen der Dilatation der Ventrikelkammern in der MLP-KO Maus gehören die durch eine Defizienz des *Muscle LIM Proteins* ausgelösten strukturellen Einschränkungen innerhalb der Kardiomyozyten und darüber hinaus der Umbau der kardialen ECM. Wenngleich die Ergebnisse keinen Hinweis auf eine Beteiligung von MPO an den für die Dilatation verantwortlichen Vorgängen geben, wird ein möglicher Zusammenhang zwischen MPO und sowohl der Hypertrophie der Myozyten als auch der Fibrosierung des Ventrikels an späterer Stelle in diesem Text aufgegriffen.

Da die Progression der Herzinsuffizienz ein höchstkomplexer Vorgang ist und die pathologische Ausprägung sich nur zum Teil aus den morphologischen Änderungen manifestiert, sollte, um der Kernfrage dieser Arbeit nachzugehen, anschließend überprüft werden, ob sich ein Effekt der MPO Defizienz auf die für eine DCM charakteristische eingeschränkte systolische LV-Funktion nachweisen lässt. Dafür wurde sich ebenfalls der transthorakalen Echokardiographie bedient. Dabei konnte zunächst die bereits beschriebene eingeschränkte systolische LV-Funktion in 10 Wochen alten MLP-KO Mäusen bestätigt werden. So zeigten die MLP-KO Mäuse eine signifikante Reduktion der linksventrikulären Ejektionsfraktion (EF) und des *Fractional Shortening* (FS). Bemerkenswerterweise zeichnen sich die MLP/MPO DKO Tiere durch eine moderate, aber signifikante Erhöhung dieser für die systolische Herzfunktion charakteristischen Parameter im Vergleich zu den MLP-KO Tieren aus. Aufgrund der Tatsache, dass die Aussagekraft der Echokardiographie zur Erfassung von Parametern der Herzfunktion in kleinen Nagetieren limitiert ist, wurde zusätzlich die als Goldstandard geltende Methode der Ermittlung von Druck-Volumen-Schleifen zur Bestimmung der Herzfunktion eingesetzt. Über die Ermittlung eines weiteren Parameters für die systolische LV-Funktion, die *Preload Recrutable Stroke Work* (PRSW) wurden die Ergebnisse der Echokardiographie bestätigt. So zeigt die MLP-KO Maus eine signifikante Reduktion der PRSW, wohingegen eine MPO Defizienz in diesen Tieren wieder zu einer PRSW führt, die dem WT vergleichbar ist. Neben der höheren Aussagekraft des durch die invasive Druck-Volumen-Messung erhaltenen PRSW bieten diese Parameter noch einen weiteren Vorteil. So ist die *Preload Recrutable Stroke Work*, anders als die hier gezeigten, durch Echokardiographie ermittelten Parameter, unabhängig von der Herzgeometrie (Glower et al. 1985). Somit konnte die Kernhypothese dieser Arbeit bestätigt werden, dass eine MPO Defizienz sich benefiziell auswirkt auf die Einschränkung der systolischen LV-Funktion

in der MLP-KO Maus und somit die Progression der Herzinsuffizienz auch abhängig ist von der Myeloperoxidase. Die Art und Weise, in der MPO mechanistisch eingebettet ist in die Entwicklung der eingeschränkten systolischen LV-Funktion in der MLP-KO Maus, ob auf der Ebene des kardialen Remodelings oder eher vaskulärer Natur, wird weiter unten in dieser Diskussion näher eingegangen.

Patientenstudien zeigen, dass der Charakter einer durch eine DCM ausgelösten Herzinsuffizienz neben der systolischen Dysfunktion auch geprägt ist durch Einschränkungen der diastolischen Funktion (Rihal et al. 1994). Da auch für die MLP-KO Maus eine diastolische Dysfunktion beschrieben wurde (Lorenzen-Schmidt et al. 2005), sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob sich MPO auch auf dieser Ebene mechanistisch beteiligt. Daher wurde ein möglicher Einfluss der MPO Defizienz auf die kardiale *Compliance* untersucht. Dafür wurde durch Katheter-gestützte Messungen linksventrikulärer Druck-Volumen-Schleifen die zeitliche Konstante der linksventrikulären isovolumenösen Relaxation (Tau) ermittelt. Durch eine signifikante Erhöhung dieses Parameters konnte der diastolische Phänotyp der MLP-KO Maus bestätigt werden. Anders als bei der systolischen Funktion zeigte sich hierbei jedoch kein benefizieller Effekt eines MPO-KO auf die eingeschränkte diastolische Funktion in MLP-KO Tieren. Ein Grund für die diastolische Dysfunktion ist eine durch Änderung der zellulären Komposition des Ventrikelmyokards hervorgerufene Steifigkeit des Organs. Dies wird mithilfe der Befunde bezüglich der Fibrosierung zu einem späteren Zeitpunkt in dieser Diskussion näher betrachtet.

Zunächst sollte, um das durch zwei unterschiedliche Verfahren bestätigte Ergebnis einer Verbesserung der systolischen LV-Funktion in MLP/MPO DKO Maus weiter zu untermauern, zusätzlich ein biochemischer Marker für die Ausprägung der Herzinsuffizienz verglichen werden. Ein zentraler diagnostischer Marker für die Herzinsuffizienz sind das biologisch aktive aus 32 Aminosäuren bestehende *Brain Natriuretic Peptide* (BNP) und ein 76 Aminosäuren langes n-terminales Fragment, das nt-proBNP (Hall 2004). Beide entstehen durch posttranslationale Modifikation des in erster Linie im Ventrikelmyokard exprimierten Präkursor-Proteins proBNP. Eine erhöhte Expression des BNP wird ausgelöst durch mechanosensorische Änderungen, die hervorgerufen werden durch eine erhöhte Wandspannung des Herzens. Es zeigte sich eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Erhöhung der BNP Expression in den MLP-KO

Tieren. Ebenfalls zu beobachten war ein Trend hin zu einer Reduktion der BNP Expression in MLP/MPO DKO Tieren.

5.2 Einfluss der MPO Defizienz auf das kardiale Remodeling in MLP-KO Tieren

Nachdem ein Einfluss von MPO auf die systolische LV-Funktion in den MLP-KO Tieren nachgewiesen wurde, sollte überprüft werden, ob dies über die Modulation des kardialen Remodelings verläuft. Durch einen erhöhten mechanischen Stress und einen durch systemische Faktoren ausgelösten Stimulus tritt kompensatorisch eine morphologische Veränderung der Kardiomyozyten in Form einer Hypertrophie ein. Dies wird vermittelt über eine Reaktivierung des fetalen Genprogramms in Kardiomyozyten. Auch wenn die Ergebnisse diesbezüglich nicht ganz einheitlich sind, so gibt die signifikant erhöhte Expression des skeletalen α -Aktin und des ANP in den MLP-KO Mäusen einen deutlichen Hinweis auf eine über Reaktivierung des fetalen kardialen Genprogramms modulierte kardiomyozytäre Hypertrophie. Ebenso führt ein MPO-Knockout zu einer Reduktion der MHC β Expression und damit zu einer Erhöhung des Quotienten MHC α/β . Durch die geringen Differenzen in der relativen Expression sind die Aussagen der Ergebnisse jedoch limitiert. Weiter gilt zu bedenken, dass die Ergebnisse bezüglich des fetalen Genprogramms nur einen limitierten Blick auf die pathophysiologischen Vorgänge innerhalb der Kardiomyozyten während der Progression der Herzinsuffizienz in den MLP-KO Mäusen ermöglichen. Um abschließend zu klären, ob eine MPO Defizienz sich auch positiv auf intrazelluläre Vorgänge in den Kardiomyozyten der MLP-defizienten Tiere auswirkt und damit die Verbesserung der systolischen LV-Funktion auch über eine verbesserte kontraktile Funktion der Kardiomyozyten moduliert wird, sind weitere Untersuchungen vonnöten.

Neben den Einschränkungen des Kardiomyozyten selbst sind auch Änderungen in der Komposition der ECM in Form von der Entstehung fibrotischer Areale ein zentrales Charakteristikum des kardialen Remodelings. Daher sollte festgestellt werden, ob eine MPO Defizienz in der MLP-KO Maus zu einer Reduktion der Fibrose führt. Zunächst konnte so die massive interstitielle Fibrosierung in den MLP-KO Mäusen bestätigt werden. Weiterhin zeigte sich jedoch, dass zu dem untersuchten Zeitpunkt kein Einfluss der MPO Defizienz auf die Entwicklung fibrotischer Areale innerhalb des Ventrikels der 10 Wochen alten MLP-KO Tiere nachzuweisen war. Dieser Umstand erklärt auch, warum kein Effekt einer MPO Defizienz auf die verminderte diastolische Funktion beobachtet

werden konnte, da die diastolische Dysfunktion eng verknüpft ist mit dem Auftreten ventrikulärer Fibrose (Moreo et al. 2009). So führen fibrotische Areale im Ventrikel zu einer gewissen Steifigkeit, die wiederum das Relaxieren des Myokards in der Diastole erschwert. Bemerkenswert sind die Untersuchungen zur Fibrose insofern, als dass ein mechanistischer Zusammenhang zwischen MPO und sowohl atrialer als auch ventrikulärer Fibroseentwicklung in Untersuchungen zur Pathophysiologie des Vorhofflimmerns und des Myokardinfarktes bereits nachgewiesen wurde (Askari et al. 2003, Rudolph et al. 2010). Dabei wirkt MPO auf zentrale Mechanismen ein, die auch bei einer durch hereditäre DCM ausgelösten Fibrosierung von Bedeutung sind. Dabei spielen die Matrix Metalloproteinasen (MMPs) eine Schlüsselrolle. Durch Degradation vieler Komponenten der ECM sind diese Proteasen direkt beteiligt an der Entstehung und Progression von Fibrose und werden durch MPO vermittelte Oxidation eines Cysteinrestes aktiviert (Fu et al. 2001). Dabei ist bekannt, dass das Expressionsschema der MMPs in vielen experimentellen Modellen für Fibrose vergleichbar ist (Tan et al. 2006). Warum also lässt sich in der MLP-KO Maus keine Änderung des Fibrosegrades durch eine MPO Defizienz erkennen?

Eine erhöhte ventrikuläre Kollageneinlagerung hat neben nachteiligen Effekten auch einen stabilisierenden Einfluss auf das Herzgewebe. Wie bei allen Formen der DCM sind auch bei einer DCM, die durch genetische Defekte des Kontraktilen Apparats der Kardiomyozyten ausgelöst wurde, die kinetischen Beanspruchungen des Myokards hoch. Dies könnte bedeuten, dass die Fibroseausprägung im Ventrikel der MLP-KO Maus die aus der gestörten Zytoarchitektur resultierenden kinetischen Beanspruchungen in Teilen kompensiert. Da zumindest in dieser Arbeit kein Einfluss von MPO auf die veränderte Zytoarchitektur in Kardiomyozyten der MLP-KO Mäuse nachgewiesen wurde, wäre daher auch keine Reduktion der Fibrose zu erwarten.

Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass es bereits mit anderen Techniken erfolgreich war, den Fibrosegrad in der MLP-KO Maus signifikant zu reduzieren und damit eine Verbesserung der Herzfunktion zu erreichen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein Knockout des ATII 1a Rezeptors sowohl die Fibrosierung als auch die Ventrikeldilatation in MLP-KO Mäusen reduziert (Yamamoto et al. 2007). Jedoch wurden dabei mit 24 Wochen deutlich ältere Tiere untersucht als in dieser Arbeit. Dieses Erkenntnis spricht für eine andere Erklärung für die fehlende Reduktion der Fibrose in MLP-KO Tieren durch einen MPO-KO, nämlich dass das Alter der Mäuse zum Zeitpunkt

der Untersuchungen mit 10 Wochen zu früh gewählt ist, um strukturelle Änderungen einer MPO Defizienz zu erkennen und diese Mechanismen erst zu einem späteren Zeitpunkt greifen. Am Beispiel des Einflusses von MPO auf die durch einen akuten Myokardinfarkt induzierte Fibrose lässt auch noch eine andere Hypothese zum fehlenden Einfluss einer MPO Defizienz auf die Fibrose in MLP-KO Tieren denkbar erscheinen. So konnte in dem experimentellen Modell für den akuten Myokardinfarkt eine stark erhöhte Konzentration an MPO im Plasma nachgewiesen werden, die wiederum eine vermehrte Sequestration des MPO in das Interstitium wahrscheinlich macht, wo das Enzym dann seine profibrotischen Eigenschaften geltend macht (Askari et al. 2003). In dem hier eingesetzten Mausmodell jedoch konnte lediglich eine moderat erhöhte MPO-Konzentration im Plasma nachgewiesen werden, sodass es denkbar ist, dass in diesem Fall deutlich weniger MPO in das Interstitium des Myokards gelangt und somit die Progression der Fibrose in diesem Tiermodell weniger durch MPO vermittelt wird.

Aufgrund der Tatsache, dass die MLP/MPO DKO Tiere aufgrund des Knockouts des MPO-Gens bereits vor der Entwicklung des veränderten kardialen Phänotyps nicht in der Lage sind, MPO zu exprimieren, lässt sich zumindest sagen, dass ein MPO-KO keinen präventiven Effekt auf die Entwicklung der Fibrose in MLP-KO Mäusen zeigt. Dies deutet an, dass die durch MPO vermittelten Vorgänge an der Entwicklung der ventrikulären Fibrose bei Fehlen von MPO durch andere Mechanismen kompensiert werden. Bekanntermaßen stehen Makrophagen in engem Zusammenhang mit der Fibroseentwicklung (Wynn and Barron 2010). So ist bekannt, dass Makrophagen häufig in direkter Nähe der Kollagen produzierenden Myofibroblasten lokalisiert sind (Ramm et al. 1998, Leicester et al. 2004, Thompson et al. 2008). Dabei erfolgt die Beteiligung der Makrophagen an der Ausbildung der Fibrose zum einen über die Aktivierung von Fibroblasten durch Sekretion des *Transforming Growth Factors β 1* (TGF β 1) und *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) (Wahl et al. 1990, Bonner et al. 1991). Zusätzlich spielen Makrophagen auch unabhängig der Myofibroblastenaktivierung für die Entstehung von Fibrose eine Rolle, und zwar über die Expression und Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (Okuma et al. 2004), die wiederum mitverantwortlich sind für den Umbau der extrazellulären Matrix und damit für die Progression fibrotischer Areale. Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen ein signifikant erhöhtes Maß an Makrophageninfiltration in den MLP-KO Tieren, das in gleichem Maße auch in den MLP/MPO DKO Tieren ausgeprägt ist. Weiterhin zeigen die immunhistologischen

Untersuchungen, dass sich die Makrophagen in den interstitiellen, extrazellulären Bereichen des linken Ventrikels konzentrieren, jene Bereiche, die auch von der Fibrose betroffen sind. Zusammen mit der Tatsache, dass in MLP-KO Mäusen die MPO-Plasmakonzentration nur leicht erhöht ist, ist es somit denkbar, dass die Progression der Fibrose in MLP-defizienten Tieren wenn, dann nur in geringem Maße durch eine Beteiligung der Myeloperoxidase moduliert wird. Gestützt durch das Ergebnis, dass die MPO Defizienz keinen Einfluss auf die charakteristisch veränderte Herzgeometrie in MLP-KO Tieren hat, deuten die Ergebnisse an, dass die Beteiligung von MPO an der verminderten systolischen LV-Funktion in MLP-KO Tieren nicht auf strukturell myokardialer Ebene stattzufinden scheint.

5.3 MPO und der vaskuläre Phänotyp der MLP-KO Maus

Die mögliche Beteiligung von MPO an der Progression kardiovaskulärer Krankheiten beschränkt sich aber nicht auf das kardiale Remodeling. So sind auch bereits zahlreiche Effekte des MPO auf die vaskuläre Funktion beschrieben worden. Aufgrund dieser Eigenschaft des MPO zusammen mit der Tatsache, dass der bisherige Fokus der Forschung an der MLP-KO Maus stark auf Untersuchungen des Myokards lag, sollte in dieser Arbeit eine mögliche vaskuläre Dysfunktion in MLP-KO Mäusen aufgedeckt und daraufhin überprüft werden, ob diese potentielle Dysfunktion über Beteiligung von MPO vermittelt wird. Dafür wurde zunächst ermittelt, ob sich in der Zirkulation der MLP-KO Maus vermehrt MPO nachweisen lässt. Zum einen wurde die Menge an frei in der systemischen Zirkulation vorliegendem MPO gemessen. Wie in diesem Text bereits angeführt, zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied in der MPO-Konzentration zwischen WT und MLP-KO Maus, jedoch ein Trend hin zu einer erhöhten MPO-Konzentration im Blutplasma der MLP-KO Tieren. Dadurch ist anzunehmen, dass auch mehr MPO systemisch am Gefäßbett gebunden ist. Denn es ist bekannt, dass MPO mit dem Endothel interagiert und dann durch verschiedene Mechanismen zu einer endothelialen Dysfunktion beiträgt (Nussbaum et al. 2013). Somit sollte auch ermittelt werden, ob eine erhöhte Konzentration an MPO, das durch Bindung an das Endothel am koronaren Gefäßbett immobilisiert vorliegt, ein Charakteristikum der MLP-KO Maus ist. Dafür wurde mithilfe einer Heparinperfusion die Interaktion von MPO mit dem Endothel der Koronarvaskulatur aufgehoben und das MPO aus der Koronarvaskulatur eluiert. Dabei konnte ein signifikant erhöhtes Level an MPO in der Koronarvaskulatur in dem

hier verwendeten Tiermodell für eine DCM nachgewiesen werden. Natürlich ist dies auch für alle anderen Gefäße in der MLP-defizienten Maus denkbar, wurde jedoch nicht überprüft.

Obgleich kein Effekt auf das kardiale Remodeling nachgewiesen werden konnte, zeigt dieses Ergebnis zumindest, dass MPO im Rahmen der DCM in der MLP-KO Maus vermehrt ausgeschüttet wird. Jedoch ist durch diesen Befund noch nicht geklärt, ob die erhöhte Sequestration von MPO lediglich eine Folge der Pathophysiologie ist oder ob das vermehrte Auftreten von MPO in kausalem Zusammenhang mit der Progression der Herzinsuffizienz steht.

Eine MPO vermittelte endotheliale Dysfunktion in der Koronarvaskulatur hätte eine erhöhte Vasokonstriktion dieser Gefäße zur Folge, was sich wiederum in einem erhöhten koronaren Perfusionsdruck niederschlagen würde. So konnte bereits in einem porcinen Modell gezeigt werden, dass eine Applikation des MPO in den linken Vorhof und anschließender vaskulärer Bindung zu einer verminderten Herzperfusion führt (Rudolph et al. 2012). Neben den inflammatorischen Vorgängen im Gefäß hat auch die myokardiale Kapillardichte Einfluss auf den koronaren Perfusionsdruck. So sollte eine Verringerung der Kapillardichte im Ventrikel zu einem erhöhten Perfusionsdruck der Koronargefäße führen, da bei definiertem koronarem Blutfluss weniger Raum bleibt, auf den sich das Blut verteilen kann. Bezüglich der kardialen Zirkulation ist auch bereits ein Zusammenhang zwischen einer verringerten myokardialen Kapillardichte und der dilatativen Kardiomyopathie gezeigt worden. So zeigen in einer Studie Patienten, die an idiopathischer DCM leiden eine verringerte Kapillardichte und daraus resultierend eine verringerte *Coronary Flow Reserve* (Tsagalou et al. 2008). Ein Grund für die anatomische Disruption der koronaren Mikrovaskulatur bei einer DCM ist unter anderem die Ausprägung interstitieller Fibrose im Ventrikelmyokard (O'Gara et al. 1987). Aufgrund der massiven interstitiellen Fibrose im Ventrikel des hier verwendeten Tiermodells, scheint es denkbar, dass eine Verringerung der Kapillarenanzahl als Folge des kardialen Remodelings im Ventrikel der MLP-KO Mäuse auftritt. Tatsächlich konnte mithilfe immunhistologischer Aufnahmen eine verminderte Kapillardichte im Ventrikel der MLP-KO Maus im Vergleich zum WT beobachtet werden, jedoch keine Änderung der reduzierten ventrikulären Anzahl an Kapillaren durch eine zusätzliche MPO Defizienz in den MLP-KO Mäusen. Aufgrund dieser Befunde wurde in dieser Arbeit auch der koronare Perfusionsdruck der Versuchstiere mithilfe des Langendorff-Systems

untersucht. Jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Im Lichte der Ergebnisse bezüglich der Verringerung der Kapillardichte im Ventrikel und der erhöhten Menge von immobilisiertem MPO in den Koronararterien der MLP-KO Maus hätte man jedoch erwartet, dass der koronare Perfusionsdruck in den MLP-KO Mäusen signifikant erhöht ist. Erklärt werden könnte das Ausbleiben eines messbaren Unterschieds dadurch, dass die Messmethode zur Ermittlung des koronaren Perfusionsdrucks limitiert und die Gefahr einer Artefaktbildung hoch ist. So wird jedes Herz einzeln auf eine Kanüle aufgefädelt und bereits kleine Änderungen bezüglich der Tiefe der Kanüle in der Aorta können sich in großen Änderungen des Drucks widerspiegeln. Auch wird den Tieren zwar der Gerinnungshemmer Agrata Multidose i.p injiziert, dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich durch inadäquate Verteilung des Gerinnungshemmers dennoch Thromben in der Koronarzirkulation bilden, die sich in der Druckmessung niederschlagen.

Da bekannt ist, dass viele der MPO vermittelten pathologischen Effekte auf das Endothel einhergehen mit einer Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit, sollte trotz des negativen Befundes aus der Messung des koronaren Perfusionsdrucks überprüft werden, inwieweit sich die Menge an phosphoryliertem VASP als Marker für die NO-Bioverfügbarkeit in der myokardialen Zirkulation der Versuchsgruppen ändert. Übereinstimmend mit dem Ergebnis zum koronaren Perfusionsdruck zeigen die proteinbiochemischen Untersuchungen zur NO-Bioverfügbarkeit keine signifikanten Unterschiede, allenfalls einen leichten Trend hin zu einer verminderten myokardialen NO-Bioverfügbarkeit in MLP-KO Tieren. Auch Untersuchungen zur myokardialen Expression der eNOS als Hauptquelle vaskulären Stickstoffmonoxids zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Aufgrund der erhöhten Konzentration von MPO in der Koronarvaskulatur wäre jedoch eine Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit in der kardialen Zirkulation der MLP-KO Mäuse zu erwarten gewesen. Dabei gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass in diesem Fall die proteinbiochemische Untersuchung zur NO-Bioverfügbarkeit mit dem gesamten Ventrikelgewebe durchgeführt wurde und somit die Aussagekraft über die NO-Bioverfügbarkeit in der Koronarzirkulation begrenzt ist. Denn es ist bekannt, dass auch die Kardiomyozyten eNOS konstitutiv exprimieren, und NO auch in myokardiale Prozesse außerhalb der Vaskulatur mechanistisch eingebunden ist (Seddon et al. 2007).

Neben den Untersuchungen zur Koronarvaskulatur wurde auch überprüft, ob sich ein Nachlast erhöhender vaskulärer Phänotyp in der MLP-KO Maus zeigt. Durch Organbad-Experimente wurde hierbei sowohl die endothelabhängige wie auch endothelunabhängige Funktion der Aorta überprüft. Dabei konnte für dieses Tiermodell im Alter von 10 Wochen eine verminderte Acetylcholin-induzierte Relaxationsfähigkeit des Gefäßes und damit eine endotheliale Dysfunktion der Aorta nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Einschränkung in den MLP/MPO DKO Tieren weniger ausgeprägt ist und somit eine Beteiligung der Myeloperoxidase an der eingeschränkten Aortenfunktion anzunehmen ist. Interessanterweise zeigte sich jedoch keine endothelunabhängige Einschränkung der vasomotorischen Aortenfunktion in MLP-KO Tieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass in den 10 Wochen alten MLP-KO Tieren zwar Prozesse ablaufen, die eine endotheliale Dysfunktion induzieren, jedoch die Funktion der kontraktilen Zellschicht der Aorta, der *Tunica media*, nicht durch funktionelle Einschränkungen beeinträchtigt wird. Die potenzielle, durch eine MPO vermittelte endotheliale Dysfunktion der Aorta ausgelöste Erhöhung der Nachlast in MLP-KO Maus sollte zusätzlich zu den *ex vivo* Untersuchungen im Organbad durch *in vivo* Versuche bestätigt werden. Dafür wurde der systemische vaskuläre Widerstand in den Versuchstieren durch invasive Messung des mittleren arteriellen Drucks, des zentralvenösen Drucks und des Herzzeitvolumens in den Versuchstieren bestimmt. Dabei zeigte sich eine Erhöhung des systemischen vaskulären Widerstands in MLP-KO Mäusen und darüber hinaus, dass dieser erhöhte Widerstand durch eine MPO Defizienz nihilisiert wird. Der periphere Gefäßwiderstand ist zwar zum größten Teil abhängig von den Arteriolen und weniger von der vaskulären Funktion der Aorta, dennoch wurde auch in der Aorta „stellvertretend“ die NO-Bioverfügbarkeit proteinbiochemisch untersucht, wobei das Ergebnis nicht zwingend der NO-Bioverfügbarkeit in den Widerstandsgefäßen entsprechen muss. Es zeigte sich, anders als im Myokardgewebe, eine signifikante Reduktion der phosphorylierten Form des VASP und damit eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit in den MLP-KO Mäusen im Vergleich zum WT und weiter ein eindeutiger wenn auch nicht signifikanter Trend hin zu einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit durch eine zusätzliche MPO Defizienz in MLP-KO Mäusen. Auch bezüglich der Menge an eNOS in der Aorta zeigen die Versuchsgruppen Unterschiede. So zeigt sich ein Trend hin zu einer vermehrten Expression dieses Enzyms in den MLP-KO Tieren und wiederum eine signifikante Reduktion der Menge an exprimiertem eNOS in Aorten der MLP/MPO DKO Tiere. Dieses Ergebnis deutet an, dass die erhöhte Menge

an eNOS eine Art von Kompensation auf eine endotheliale Dysfunktion in den Aorten der MLP-KO Mauslinie darstellt. Da dennoch eine signifikante Verringerung der NO-Bioverfügbarkeit in Aorten der MLP-KO Mäuse vorliegt, scheint diese Kompensation nicht suffizient zu sein. Die Tatsache, dass zum einen ein Trend zu einer erhöhten NO-Bioverfügbarkeit in MLP/MPO DKO Tieren im Vergleich zu den MLP-KO Tieren erkennbar ist, gleichzeitig jedoch die Menge an eNOS signifikant reduziert ist, deutet an, dass der fehlende NO reduzierende Effekt des MPO in der MLP/MPO DKO Maus dazu führt, dass die Expression der eNOS nicht so stark kompensatorisch heraufreguliert wird. Weiter kann man schlussfolgern, dass somit die Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit und damit die endotheliale Dysfunktion in der MLP-KO Maus zum Teil über MPO vermittelt wird.

In dieser Arbeit ist somit zum ersten Mal ein veränderter vaskulärer Phänotyp der MLP-KO Maus beschrieben worden, der zu einer Erhöhung der Nachlast führt. Weiter zeigte sich, dass MPO mechanistisch involviert ist in diesen Prozess. Da dabei keinerlei Effekt einer MPO Defizienz auf myokardial stattfindende Prozesse beobachtet werden konnte, lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass die durch den MPO-KO erreichte signifikante Verbesserung der systolischen LV-Funktion auch auf benefizielle Effekte im vaskulären System zurückzuführen sind und somit pathophysiologische vaskuläre Vorgänge in der MLP-KO Maus in signifikantem Maße an der verminderten systolischen Herzfunktion in diesem Tiermodell beitragen. Die hier gezeigten Ergebnisse geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass die Verbesserung der reduzierten systolischen LV-Funktion in MLP-KO Mäusen durch die MPO Defizienz über eine Abmilderung der endothelialen Dysfunktion, genauer über eine Erhöhung der vaskulären Verfügbarkeit des für die Vasomotorik eminent wichtigen Signalmediators NO, moduliert wird. Dabei stellt sich die Frage, wie eine über eine MPO Defizienz vermittelte Verbesserung der endothelialen Dysfunktion in der MLP-KO Maus zu einer Verbesserung der Kontraktilität und somit der systolischen Herzfunktion führt? Wie bereits in der Einleitung dargelegt, sind die Effekte einer Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit auf die Pathophysiologie einer Herzinsuffizienz vielfältig. Bezüglich der in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse kann zunächst davon ausgegangen werden, dass die MPO Defizienz die Nachlast in MLP-KO Tieren durch eine erhöhte Relaxationsfähigkeit der Widerstandsgefäße verringert. Die daraus resultierende Erhöhung der Auswurfleistung führt sicher auch zu einer Verbesserung der systolischen Funktion in MLP-KO Mäusen. Eine Minderperfusion des

MLP-KO Herzens konnte zwar nicht direkt nachgewiesen werden, gilt aufgrund der Daten bezüglich der Kapillardichte jedoch zumindest als denkbar. Ein Effekt des MPO-KO auf eine mögliche Minderperfusion des MLP-KO-Herzens kann ebenso nicht nachgewiesen werden. Die Befunde bezüglich der erhöhten MPO-Konzentration in der Koronarperfusion der MLP-KO Mäuse und dem Ergebnis bezüglich der NO-Verfügbarkeit in der Aorta lassen es dennoch denkbar erscheinen, dass es auch in den Koronargefäßen zu einer Abmilderung einer endothelialen Dysfunktion und damit zu einer Verbesserung der Perfusion des Herzens kommt. Nicht untersucht wurde in dieser Arbeit, ob sich eine MPO Defizienz auch direkt verbessernd auf eine reduzierte Fähigkeit der Kontraktion einzelner Kardiomyozyten in MLP-KO Tieren auswirkt. Da die vaskuläre Funktionseinschränkung nur eine Folge der gestörten Funktion der Kardiomyozyten ist und somit nur einen Teil zu der verminderten Herzfunktion beiträgt, lässt sich zumindest erklären, dass der benefizielle Effekt einer MPO Defizienz lediglich zu einer moderaten Verbesserung der Herzfunktion führt.

5.4 MPO als Ziel einer Therapie gegen Herzinsuffizienz

Das Ziel der Erforschung von MPO im Zusammenhang mit pathologischen kardiovaskulären Ereignissen ist sicher eine Therapie, bei der MPO als Angriffspunkt fungiert. Die hier dargelegten Ergebnisse zeigen, dass eine Therapie der Herzinsuffizienz über eine Verbesserung der vaskulären Funktion mithilfe einer Inhibition des MPO durchaus plausibel erscheint und sich somit einordnen würde in die bereits angewendete therapeutische Strategie zur Behandlung von Patienten mit Herzinsuffizienz. So ist die Reduktion der Nachlast Ziel der Therapie aller Stadien einer Herzinsuffizienz. Ein Grund dafür, dass dieser Ansatz so attraktiv ist, ist, dass sich der Effekt der Entlastung des Herzens durch vaskular bedingte Reduktion der Nachlast direkt einstellt, wohingegen eine Therapie, die strukturelle Änderungen des Myokards zum Ziel hat, erst längerfristig seine Wirkung entfaltet.

Bezüglich der potentiellen Therapiemöglichkeit stellt sich auch die Frage, ob eine MPO Defizienz oder Inhibition neben des protektiven Einflusses auf kardiovaskuläre Ereignisse zu einer eingeschränkten Abwehr von pathogenen Fremdorgansimen führt. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass MPO erforderlich ist für die Immunabwehr von *Candida tropicalis*, *Lactobacillus acidophilus* und bestimmten Staphylokokken-Spezies (Lehrer and Cline 1969, Lehrer et al. 1969). Auch in der MPO defizienten Maus konnten

Änderungen der Immunabwehr gegen *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* und *tropicalis* nachgewiesen werden. Ebenso wurde eine verminderte Abwehr einer durch Läsionen des Caecums hervorgerufenen Sepsis in der MPO defizienten Maus ermittelt (Gaut et al. 2001). In der Pathogenabwehr des Menschen weisen die Granulozyten im Vergleich zum murinen Immunsystem weitere in die Resolution einer Infektion involvierten Mediatoren auf (Hirche et al. 2005), sodass sich die Unterschiede zwischen WT und MPO defizienter Maus nur begrenzt auf das humane Immunsystem übertragen lassen. So weisen MPO defiziente Patienten lediglich eine eingeschränkte Immunabwehr im Zusammenhang weiterer Erkrankungen wie der Diabetes auf (Parry et al. 1981, Lanza 1998).

Durch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse konnte die Kernhypothese der Arbeit bestätigt werden, dass MPO involviert ist in die Progression einer durch hereditärer DCM ausgelöster Herzinsuffizienz im MLP-KO Mausmodell. Dadurch untermauern die Ergebnisse dieser Arbeit die Annahme, dass MPO sich neben bereits in diesem Zusammenhang untersuchten anderen Krankheitsformen des kardiovaskulären Apparats wie der Atherosklerose (Shao et al. 2012), dem Vorhofflimmern (Rudolph et al. 2010) und dem akuten Myokardinfarkt (Askari et al. 2003) auch mit dem vielfältigen Gebiet der Herzinsuffizienz mechanistisch in Verbindung bringen lässt. Besonders, da die Herzinsuffizienz als klinisches Symptom die Folge vieler kardiovaskulärer Krankheiten ist, gibt das hier im Tiermodell gezeigte Ergebnis Anlass zu weiteren Studien bezüglich MPO und der Herzinsuffizienz.

5.5 Ausblick

Zunächst muss durch weitere Untersuchungen der vaskuläre Phänotyp der MLP-KO Maus weiter charakterisiert werden. Dabei gilt es zu überprüfen, zu welchem Zeitpunkt sich eine Einschränkung der vaskulären Funktion in MLP-KO Mäusen einstellt, wie dieser Vorgang mechanistisch moduliert wird und wie sich die Einschränkung der vaskulären Funktion im Verlauf der Krankheit weiterentwickelt. So ist es denkbar, dass sich strukturelle Änderungen der für die Kontraktion verantwortlichen Zellschicht des Gefäßes im Verlauf der Krankheit noch ausprägen und MPO möglicherweise mechanistisch in diesen Prozess eingebettet ist. Ferner müssen auch detailliertere Erkenntnisse über den Zusammenhang zwischen MPO und dem vaskulären Phänotyp gewonnen werden. Durch Einsatz verschiedener Untersuchungen gilt es zu klären,

inwieweit die Beteiligung der Myeloperoxidase an der endothelialen Dysfunktion über Reduktion der NO-Bioverfügbarkeit moduliert wird und ob darüber hinaus noch weitere MPO vermittelte Mechanismen involviert sind.

Ebenso ist zu klären, ob und in welchem Maße sich die Progression der Herzinsuffizienz in MLP-KO Mäusen durch ein Knockout des MPO im weiteren Verlauf der Krankheit ändert. Genauer sollte ermittelt werden, ob sich zu einem späteren Zeitpunkt möglicherweise auch ein Effekt auf das kardiale Remodeling einstellt und somit die Verbesserung der eingeschränkten Herzfunktion in MLP-KO Mäusen noch ausweitet. Dafür ist es erforderlich die Anwesenheit und Verteilung von MPO im Myokard zu untersuchen, um herauszufinden, ob MPO auch außerhalb der Gefäße im Interstitium der MLP-KO Mäuse zu finden ist.

Basierend auf den Ergebnissen zur Kapillardichte ist davon auszugehen, dass eine Minderperfusion des Myokards in den 10 Wochen alten MLP-KO Mäusen vorliegt. Daher sollte trotz des Befundes bezüglich des koronaren Perfusionsdrucks die Perfusion des Herzens in MLP-KO Mäuse unter Mithilfe weiterer Methoden genauer untersucht werden. Eine geeignete, bereits etablierte Methode wäre, das Herz mit fluoreszierenden Mikrosphären zu perfundieren und dadurch Informationen über die Perfusion des Herzens zu erlangen (Detter et al. 2007). Da die Minderperfusion einhergeht mit einer Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff, sollte auch geklärt werden, ob und inwieweit die verminderte Kapillardichte und die möglichen vasokonstringierenden Phänomene in der Koronarzirkulation von MLP-KO Mäusen sich in einer myokardialen Hypoxie niederschlagen und ob MPO auch auf dieser Ebene Einfluss nimmt.

Außerdem wäre es interessant zu überprüfen, wie sich eine MPO Defizienz auf anders verursachte Formen der DCM auswirkt. Da MPO zentrale inflammatorische Bedeutung hat, ist es beispielsweise denkbar, dass ein MPO Knockout in einer durch enterovirale Infektionen ausgelösten DCM zu einem anderen Verlauf der Krankheit führt.

Eines der finalen Ziele der Erforschung der Myeloperoxidase im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen ist sicher die Etablierung einer Therapie in Form eines MPO-Inhibitors. Daher gilt zu klären, ob und inwieweit sich ein positiver Effekt durch eine Zugabe eines MPO-Inhibitors erst nach Ausprägung der Krankheit in MLP-KO Mäusen auf den Krankheitsverlauf feststellen lässt.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob ein mechanistischer Zusammenhang zwischen dem Enzym Myeloperoxidase und einer Herzinsuffizienz im Mausmodell besteht. Bei der Myeloperoxidase handelt es sich um ein Enzym der angeborenen Immunantwort, das durch sein Spektrum an physiologisch relevanten Redoxreaktionen Bedeutung in der Progression kardiovaskulärer Erkrankungen hat. Es sollte untersucht werden, ob eine MPO Defizienz benefizielle Auswirkungen auf die Progression der Herzinsuffizienz in der MLP-KO Maus hat. Bei der MLP-KO Maus handelt es sich um ein etabliertes, murines Modell für eine dilatative Kardiomyopathie. Durch das Fehlen des *Muscle LIM Proteins* ist diese Mauslinie charakterisiert durch eine Disruption der kardiomyozytären Zytoarchitektur, was zu einer Dilatation des Ventrikels und gleichzeitig zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten führt. Als Folge dessen weist die Maus bereits im Alter von 10 Wochen eine eingeschränkte systolische und diastolische Herzfunktion auf.

Zunächst konnte dieser veränderte kardiale Phänotyp der MLP-KO Maus bestätigt werden. Bezüglich einer möglichen Beteiligung von MPO an der Herzinsuffizienz zeigte sich jedoch kein Effekt einer MPO Defizienz auf die veränderte Herzgeometrie in MLP-KO Mäusen. Bezüglich der Parameter *Fractional Shortening*, Ejektionsfraktion und *Preload Recrutable Stroke Work* konnte jedoch mithilfe physiologischer Methoden eine Abmilderung der eingeschränkten systolischen LV-Funktion, in MLP-KO durch einen zusätzlichen MPO-KO nachgewiesen werden. Die als kardiales Remodeling bezeichneten intramyokardialen Prozesse sind ein zentrales Charakteristikum der Herzinsuffizienz und maßgeblich beteiligt an der eingeschränkten Herzfunktion. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben jedoch keinen Hinweis darauf, dass eine MPO Defizienz einen Effekt auf das ausgeprägte kardiale Remodeling in der MLP-KO Maus hat. Weder auf intrakardiomyozytärer Ebene, ermittelt durch das Expressionsmuster des fetalen kardialen Genprogramms, noch auf interstitieller Ebene bezüglich der Fibrose und der Infiltration von Immunzellen.

Die vaskuläre Dysfunktion ist Bestandteil der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz und MPO trägt, unter anderem durch Reduktion der vaskulären NO-Bioverfügbarkeit, nachgewiesenermaßen zu einer Einschränkung der vaskulären Funktion bei. Daher wurde auch überprüft, ob eine Einschränkung sowohl des koronarvaskulären Systems als auch der systemischen Zirkulation Bestandteil der Pathophysiologie der MLP-KO Maus ist

und falls ja, ob MPO beteiligt ist an diesem Prozess. Zunächst konnte eine erhöhte Menge an gefäßgebundenem MPO in der Koronarvaskulatur und eine verminderte, ventrikuläre Kapillardichte in MLP-KO Mäusen ermittelt werden, ohne dass jedoch Änderungen in der NO Bioverfügbarkeit oder ein erhöhter koronarer Perfusionsdruck beobachtet wurde. Bezüglich der systemischen Zirkulation zeigten physiologische Messungen, dass die MLP-KO Maus charakterisiert ist sowohl durch eine endotheliale Dysfunktion in der Aorta, als auch durch einen erhöhten systemischen vaskulären Widerstand. Ebenso ist die NO Bioverfügbarkeit signifikant reduziert in Aorten von MLP defizienten Tieren. Eine MPO Defizienz führt zu einer signifikanten Verbesserung dieser funktionellen, vaskulären Einschränkung, sodass es wahrscheinlich ist, dass die Verbesserung der systolischen LV-Funktion durch eine MPO Defizienz ihren Ursprung in einer Verbesserung der eingeschränkten vaskulären Funktion der systemischen Zirkulation in MLP-KO Tieren hat und dies vermittelt wird durch eine Erhöhung der vaskulären Bioverfügbarkeit von NO.

7 Literaturverzeichnis

Abu-Soud, H. M. and S. L. Hazen (2000). "Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase." J Biol Chem **275**(8): 5425-5430.

Alessi, D., L. K. MacDougall, M. M. Sola, M. Ikebe and P. Cohen (1992). "The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1." Eur J Biochem **210**(3): 1023-1035.

Ambler, S. K., Y. K. Hodges, G. M. Jones, C. S. Long and L. D. Horwitz (2008). "Prolonged administration of a dithiol antioxidant protects against ventricular remodeling due to ischemia-reperfusion in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(3): H1303-H1310.

Anand, I. S., L. D. Fisher, Y. T. Chiang, R. Latini, S. Masson, A. P. Maggioni, R. D. Glazer, G. Tognoni, J. N. Cohn and F. T. I. Val-He (2003). "Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT)." Circulation **107**(9): 1278-1283.

Arber, S., G. Halder and P. Caroni (1994). "Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation." Cell **79**(2): 221-231.

Arber, S., J. J. Hunter, J. Ross, Jr., M. Hongo, G. Sansig, J. Borg, J. C. Perriard, K. R. Chien and P. Caroni (1997). "MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure." Cell **88**(3): 393-403.

Askari, A. T., M. L. Brennan, X. Zhou, J. Drinko, A. Morehead, J. D. Thomas, E. J. Topol, S. L. Hazen and M. S. Penn (2003). "Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction." J Exp Med **197**(5): 615-624.

Banerjee, I., J. W. Fuseler, R. L. Price, T. K. Borg and T. A. Baudino (2007). "Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse." Am J Physiol Heart Circ Physiol **293**(3): H1883-1891.

Bonner, J. C., A. R. Osornio-Vargas, A. Badgett and A. R. Brody (1991). "Differential proliferation of rat lung fibroblasts induced by the platelet-derived growth factor-AA, -AB, and -BB isoforms secreted by rat alveolar macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **5**(6): 539-547.

Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch and A. Zychlinsky (2004). "Neutrophil extracellular traps kill bacteria." Science **303**(5663): 1532-1535.

Burch, G. E., J. A. Cronvich, O. Creech and A. Hyman (1957). "Pressure-volume diagrams of the left ventricle of man; a preliminary report." Am Heart J **53**(6): 890-894.

Burkhoff, D., I. Mirsky and H. Suga (2005). "Assessment of systolic and diastolic ventricular properties via pressure-volume analysis: a guide for clinical, translational, and basic researchers." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(2): H501-512.

Buyandelger, B., K. E. Ng, S. Miodic, I. Piotrowska, S. Gunkel, C. H. Ku and R. Knoll (2011). "MLP (muscle LIM protein) as a stress sensor in the heart." Pflugers Arch **462**(1): 135-142.

Chien, K. R., K. U. Knowlton, H. Zhu and S. Chien (1991). "Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response." FASEB J **5**(15): 3037-3046.

Cohn, J. N., R. Ferrari and N. Sharpe (2000). "Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling." J Am Coll Cardiol **35**(3): 569-582.

Cowland, J. B. and N. Borregaard (1999). "The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules." J Leukoc Biol **66**(6): 989-995.

Darby, I. A. and T. D. Hewitson (2007). "Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis." Int Rev Cytol **257**: 143-179.

de Jong, S., T. A. van Veen, H. V. van Rijen and J. M. de Bakker (2011). "Fibrosis and cardiac arrhythmias." J Cardiovasc Pharmacol **57**(6): 630-638.

Detter, C., S. Wipper, D. Russ, A. Iffland, L. Burdorf, E. Thein, K. Wegscheider, H. Reichenspurner and B. Reichart (2007). "Fluorescent cardiac imaging: a novel intraoperative method for quantitative assessment of myocardial perfusion during graded coronary artery stenosis." Circulation **116**(9): 1007-1014.

Drelicharz, L., V. Kozlovski, T. Skorcka, S. Heinze-Paluchowska, A. Jasinski, A. Gebaska, T. Guzik, R. Olszanecki, L. Wojnar, U. Mende, G. Csanyi and S. Chlopicki (2008). "NO and PGI(2) in coronary endothelial dysfunction in transgenic mice with dilated cardiomyopathy." Basic Res Cardiol **103**(5): 417-430.

Eiserich, J. P., S. Baldus, M. L. Brennan, W. Ma, C. Zhang, A. Tousson, L. Castro, A. J. Lusis, W. M. Nauseef, C. R. White and B. A. Freeman (2002). "Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase." Science **296**(5577): 2391-2394.

Fischer, D., S. Rossa, U. Landmesser, S. Spiekermann, N. Engberding, B. Hornig and H. Drexler (2005). "Endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure is

independently associated with increased incidence of hospitalization, cardiac transplantation, or death." Eur Heart J **26**(1): 65-69.

Fu, X., S. Y. Kassim, W. C. Parks and J. W. Heinecke (2001). "Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase." J Biol Chem **276**(44): 41279-41287.

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

Gaut, J. P., G. C. Yeh, H. D. Tran, J. Byun, J. P. Henderson, G. M. Richter, M. L. Brennan, A. J. Lusic, A. Belaouaj, R. S. Hotchkiss and J. W. Heinecke (2001). "Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 11961-11966.

Georgakopoulos, D., W. A. Mitzner, C. H. Chen, B. J. Byrne, H. D. Millar, J. M. Hare and D. A. Kass (1998). "In vivo murine left ventricular pressure-volume relations by miniaturized conductance micromanometry." Am J Physiol **274**(4 Pt 2): H1416-1422.

Gibbs, C. R., A. D. Blann, R. D. Watson and G. Y. Lip (2001). "Abnormalities of hemorheological, endothelial, and platelet function in patients with chronic heart failure in sinus rhythm: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and beta-blocker therapy." Circulation **103**(13): 1746-1751.

Glower, D. D., J. A. Spratt, N. D. Snow, J. S. Kabas, J. W. Davis, C. O. Olsen, G. S. Tyson, D. C. Sabiston, Jr. and J. S. Rankin (1985). "Linearity of the Frank-Starling relationship in the intact heart: the concept of preload recruitable stroke work." Circulation **71**(5): 994-1009.

Hall, C. (2004). "Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP." Eur J Heart Fail **6**(3): 257-260.

Harrison, D. G., J. Widder, I. Grumbach, W. Chen, M. Weber and C. Searles (2006). "Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation." J Intern Med **259**(4): 351-363.

Hirche, T. O., J. P. Gaut, J. W. Heinecke and A. Belaouaj (2005). "Myeloperoxidase plays critical roles in killing *Klebsiella pneumoniae* and inactivating neutrophil elastase: effects on host defense." J Immunol **174**(3): 1557-1565.

Housset, C., D. C. Rockey and D. M. Bissell (1993). "Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin 1." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9266-9270.

Jones, S. P., J. J. Greer, R. van Haperen, D. J. Duncker, R. de Crom and D. J. Lefer (2003). "Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4891-4896.

Kamisago, M., S. D. Sharma, S. R. DePalma, S. Solomon, P. Sharma, B. McDonough, L. Smoot, M. P. Mullen, P. K. Woolf, E. D. Wigle, J. G. Seidman and C. E. Seidman (2000). "Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy." N Engl J Med **343**(23): 1688-1696.

Katz, S. D., K. Hryniewicz, I. Hriljac, K. Balidemaj, C. Dimayuga, A. Hudaihed and A. Yasskiy (2005). "Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure." Circulation **111**(3): 310-314.

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

Klinke, A., C. Nussbaum, L. Kubala, K. Friedrichs, T. K. Rudolph, V. Rudolph, H. J. Paust, C. Schroder, D. Benten, D. Lau, K. Szocs, P. G. Furtmuller, P. Heeringa, K. Sydow, H. J. Duchstein, H. Ehmke, U. Schumacher, T. Meinertz, M. Sperandio and S. Baldus (2011). "Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces." Blood **117**(4): 1350-1358.

Knoll, R., M. Hoshijima, H. M. Hoffman, V. Person, I. Lorenzen-Schmidt, M. L. Bang, T. Hayashi, N. Shiga, H. Yasukawa, W. Schaper, W. McKenna, M. Yokoyama, N. J. Schork, J. H. Omens, A. D. McCulloch, A. Kimura, C. C. Gregorio, W. Poller, J. Schaper, H. P. Schultheiss and K. R. Chien (2002). "The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy." Cell **111**(7): 943-955.

Landmesser, U., S. Spiekermann, S. Dikalov, H. Tatge, R. Wilke, C. Kohler, D. G. Harrison, B. Hornig and H. Drexler (2002). "Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase." Circulation **106**(24): 3073-3078.

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

Lee, M. R., L. Li and T. Kitazawa (1997). "Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase." J Biol Chem **272**(8): 5063-5068.

Lehrer, R. I. and M. J. Cline (1969). "Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection." J Clin Invest **48**(8): 1478-1488.

Lehrer, R. I., J. Hanifin and M. J. Cline (1969). "Defective bactericidal activity in myeloperoxidase-deficient human neutrophils." Nature **223**(5201): 78-79.

Leicester, K. L., J. K. Olynyk, E. M. Brunt, R. S. Britton and B. R. Bacon (2004). "CD14-positive hepatic monocytes/macrophages increase in hereditary hemochromatosis." Liver Int **24**(5): 446-451.

Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky and S. Nourshargh (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." Nat Rev Immunol **7**(9): 678-689.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lloyd-Jones, D., R. Adams, M. Carnethon, G. De Simone, T. B. Ferguson, K. Flegal, E. Ford, K. Furie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, S. Hailpern, M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lackland, L. Lisabeth, A. Marelli, M. McDermott, J. Meigs, D. Mozaffarian, G. Nichol, C. O'Donnell, V. Roger, W. Rosamond, R. Sacco, P. Sorlie, R. Stafford, J. Steinberger, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, N. Wong, J. Wylie-Rosett, Y. Hong, C. American Heart Association Statistics and S. Stroke Statistics (2009). "Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." Circulation **119**(3): 480-486.

Loh, E., M. S. Sutton, C. C. Wun, J. L. Rouleau, G. C. Flaker, S. S. Gottlieb, G. A. Lamas, L. A. Moye, S. Z. Goldhaber and M. A. Pfeffer (1997). "Ventricular dysfunction and the risk of stroke after myocardial infarction." N Engl J Med **336**(4): 251-257.

Lorenzen-Schmidt, I., B. D. Stuyvers, H. E. ter Keurs, M. O. Date, M. Hoshijima, K. R. Chien, A. D. McCulloch and J. H. Omens (2005). "Young MLP deficient mice show diastolic dysfunction before the onset of dilated cardiomyopathy." J Mol Cell Cardiol **39**(2): 241-250.

Louis, H. A., J. D. Pino, K. L. Schmeichel, P. Pomies and M. C. Beckerle (1997). "Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression." J Biol Chem **272**(43): 27484-27491.

Luther, P. K. (2009). "The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling." J Muscle Res Cell Motil **30**(5-6): 171-185.

Maisel, A. S., J. Koon, P. Krishnaswamy, R. Kazenegra, P. Clopton, N. Gardetto, R. Morrissey, A. Garcia, A. Chiu and A. De Maria (2001). "Utility of B-natriuretic peptide as a rapid, point-of-care test for screening patients undergoing echocardiography to determine left ventricular dysfunction." Am Heart J **141**(3): 367-374.

Mann, D. L. (1999). "Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach." Circulation **100**(9): 999-1008.

Maron, B. J., J. A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A. J. Moss, C. E. Seidman, J. B. Young, A. American Heart, H. F. Council on Clinical Cardiology,

C. Transplantation, C. Quality of, R. Outcomes, G. Functional, G. Translational Biology Interdisciplinary Working, E. Council on and Prevention (2006). "Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention." Circulation **113**(14): 1807-1816.

McNally, E. M., J. R. Golbus and M. J. Puckelwartz (2013). "Genetic mutations and mechanisms in dilated cardiomyopathy." J Clin Invest **123**(1): 19-26.

Merx, M. W., E. A. Liehn, U. Janssens, R. Luttkicken, J. Schrader, P. Hanrath and C. Weber (2004). "HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin profoundly improves survival in a murine model of sepsis." Circulation **109**(21): 2560-2565.

Michowitz, Y., S. Kisil, H. Guzner-Gur, A. Rubinstein, D. Wexler, D. Sheps, G. Keren and J. George (2008). "Usefulness of serum myeloperoxidase in prediction of mortality in patients with severe heart failure." Isr Med Assoc J **10**(12): 884-888.

Montes, G. S. and L. C. Junqueira (1991). "The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen." Mem Inst Oswaldo Cruz **86 Suppl 3**: 1-11.

Moreo, A., G. Ambrosio, B. De Chiara, M. Pu, T. Tran, F. Mauri and S. V. Raman (2009). "Influence of myocardial fibrosis on left ventricular diastolic function: noninvasive assessment by cardiac magnetic resonance and echo." Circ Cardiovasc Imaging **2**(6): 437-443.

Nishioka, K., K. Nakagawa, T. Umemura, D. Jitsuiki, K. Ueda, C. Goto, K. Chayama, M. Yoshizumi and Y. Higashi (2007). "Carvedilol improves endothelium-dependent vasodilation in patients with dilated cardiomyopathy." Heart **93**(2): 247-248.

Niu, J., A. Azfer and P. E. Kolattukudy (2006). "Monocyte-specific Bcl-2 expression attenuates inflammation and heart failure in monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)-induced cardiomyopathy." Cardiovasc Res **71**(1): 139-148.

Nussbaum, C., A. Klinke, M. Adam, S. Baldus and M. Sperandio (2013). "Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease." Antioxid Redox Signal **18**(6): 692-713.

O'Gara, P. T., R. O. Bonow, B. J. Maron, B. A. Damske, A. Van Lingen, S. L. Bacharach, S. M. Larson and S. E. Epstein (1987). "Myocardial perfusion abnormalities in patients with hypertrophic cardiomyopathy: assessment with thallium-201 emission computed tomography." Circulation **76**(6): 1214-1223.

Okuma, T., Y. Terasaki, K. Kaikita, H. Kobayashi, W. A. Kuziel, M. Kawasuji and M. Takeya (2004). "C-C chemokine receptor 2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-

induced pulmonary fibrosis by attenuation of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases." J Pathol **204**(5): 594-604.

Pacher, P., T. Nagayama, P. Mukhopadhyay, S. Batkai and D. A. Kass (2008). "Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats." Nat Protoc **3**(9): 1422-1434.

Palmer, R. M., D. S. Ashton and S. Moncada (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature **333**(6174): 664-666.

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

Pauschinger, M., K. Chandrasekharan, J. Li, P. L. Schwimmbeck, M. Noutsias and H. P. Schultheiss (2002). "[Mechanisms of extracellular matrix remodeling in dilated cardiomyopathy]." Herz **27**(7): 677-682.

Petri, B., M. Phillipson and P. Kubes (2008). "The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective." J Immunol **180**(10): 6439-6446.

Phillipson, M. and P. Kubes (2011). "The neutrophil in vascular inflammation." Nat Med **17**(11): 1381-1390.

Pons, M., S. W. Cousins, O. Alcazar, G. E. Striker and M. E. Marin-Castano (2011). "Angiotensin II-induced MMP-2 activity and MMP-14 and basigin protein expression are mediated via the angiotensin II receptor type 1-mitogen-activated protein kinase 1 pathway in retinal pigment epithelium: implications for age-related macular degeneration." Am J Pathol **178**(6): 2665-2681.

Postel, R., P. Vakeel, J. Topczewski, R. Knoll and J. Bakkens (2008). "Zebrafish integrin-linked kinase is required in skeletal muscles for strengthening the integrin-ECM adhesion complex." Dev Biol **318**(1): 92-101.

Ramm, G. A., V. G. Nair, K. R. Bridle, R. W. Shepherd and D. H. Crawford (1998). "Contribution of hepatic parenchymal and nonparenchymal cells to hepatic fibrogenesis in biliary atresia." Am J Pathol **153**(2): 527-535.

Randriamboavonjy, V. and I. Fleming (2005). "Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in platelets: how is it regulated and what is it doing there?" Pharmacol Rep **57 Suppl**: 59-65.

Rihal, C. S., R. A. Nishimura, L. K. Hatle, K. R. Bailey and A. J. Tajik (1994). "Systolic and diastolic dysfunction in patients with clinical diagnosis of dilated cardiomyopathy. Relation to symptoms and prognosis." Circulation **90**(6): 2772-2779.

Rockman, H. A., K. R. Chien, D. J. Choi, G. Iaccarino, J. J. Hunter, J. Ross, Jr., R. J. Lefkowitz and W. J. Koch (1998). "Expression of a beta-adrenergic receptor kinase 1 inhibitor prevents the development of myocardial failure in gene-targeted mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 7000-7005.

Roger, V. L., A. S. Go, D. M. Lloyd-Jones, R. J. Adams, J. D. Berry, T. M. Brown, M. R. Carnethon, S. Dai, G. de Simone, E. S. Ford, C. S. Fox, H. J. Fullerton, C. Gillespie, K. J. Greenlund, S. M. Hailpern, J. A. Heit, P. M. Ho, V. J. Howard, B. M. Kissela, S. J. Kittner, D. T. Lackland, J. H. Lichtman, L. D. Lisabeth, D. M. Makuc, G. M. Marcus, A. Marelli, D. B. Matchar, M. M. McDermott, J. B. Meigs, C. S. Moy, D. Mozaffarian, M. E. Mussolino, G. Nichol, N. P. Paynter, W. D. Rosamond, P. D. Sorlie, R. S. Stafford, T. N. Turan, M. B. Turner, N. D. Wong, J. Wylie-Rosett, C. American Heart Association Statistics and S. Stroke Statistics (2011). "Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association." Circulation **123**(4): e18-e209.

Rudolph, T. K., S. Wipper, B. Reiter, V. Rudolph, A. Coym, C. Detter, D. Lau, A. Klinke, K. Friedrichs, T. Rau, M. Pekarova, D. Russ, K. Knoll, M. Kolk, B. Schroeder, K. Wegscheider, H. Andresen, E. Schwedhelm, R. Boeger, H. Ehmke and S. Baldus (2012). "Myeloperoxidase deficiency preserves vasomotor function in humans." Eur Heart J **33**(13): 1625-1634.

Rudolph, V., R. P. Andrie, T. K. Rudolph, K. Friedrichs, A. Klinke, B. Hirsch-Hoffmann, A. P. Schwoerer, D. Lau, X. Fu, K. Klingel, K. Sydow, M. Didie, A. Seniuk, E. C. von Leitner, K. Szoecs, J. W. Schrickel, H. Treede, U. Wenzel, T. Lewalter, G. Nickenig, W. H. Zimmermann, T. Meinertz, R. H. Boger, H. Reichenspurner, B. A. Freeman, T. Eschenhagen, H. Ehmke, S. L. Hazen, S. Willems and S. Baldus (2010). "Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation." Nat Med **16**(4): 470-474.

Rudolph, V., T. K. Rudolph, J. C. Hennings, S. Blankenberg, R. Schnabel, D. Steven, M. Haddad, K. Knittel, S. Wende, J. Wenzel, T. Munzel, T. Heitzer, T. Meinertz, C. Hubner and S. Baldus (2007). "Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function." Free Radic Biol Med **43**(8): 1189-1196.

Sakurai, T., M. Yanagisawa and T. Masaki (1992). "Molecular characterization of endothelin receptors." Trends Pharmacol Sci **13**(3): 103-108.

Sato, J., K. Nair, J. Hiddinga, N. L. Eberhardt, L. A. Fitzpatrick, Z. S. Katusic and T. O'Brien (2000). "eNOS gene transfer to vascular smooth muscle cells inhibits cell proliferation via upregulation of p27 and p21 and not apoptosis." Cardiovasc Res **47**(4): 697-706.

Sauzeau, V., H. Le Jeune, C. Cario-Toumaniantz, A. Smolenski, S. M. Lohmann, J. Bertoglio, P. Chardin, P. Pacaud and G. Loirand (2000). "Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle." J Biol Chem **275**(28): 21722-21729.

Schafer, A., D. Fraccarollo, S. Hildemann, M. Christ, M. Eigenthaler, A. Kobsar, U. Walter and J. Bauersachs (2003). "Inhibition of platelet activation in congestive heart failure by aldosterone receptor antagonism and ACE inhibition." Thromb Haemost **89**(6): 1024-1030.

Scherrer-Crosbie, M., R. Ullrich, K. D. Bloch, H. Nakajima, B. Nasser, H. T. Aretz, M. L. Lindsey, A. C. Vancon, P. L. Huang, R. T. Lee, W. M. Zapol and M. H. Picard (2001). "Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice." Circulation **104**(11): 1286-1291.

Schlossmann, J., A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G. X. Wang, H. D. Allescher, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann and P. Ruth (2000). "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta." Nature **404**(6774): 197-201.

Schrier, R. W. and W. T. Abraham (1999). "Hormones and hemodynamics in heart failure." N Engl J Med **341**(8): 577-585.

Seddon, M., A. M. Shah and B. Casadei (2007). "Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling." Cardiovasc Res **75**(2): 315-326.

Shao, B., S. Pennathur and J. W. Heinecke (2012). "Myeloperoxidase targets apolipoprotein A-I, the major high density lipoprotein protein, for site-specific oxidation in human atherosclerotic lesions." J Biol Chem **287**(9): 6375-6386.

Skrzypiec-Spring, M., B. Grotthus, A. Szelag and R. Schulz (2007). "Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium." J Pharmacol Toxicol Methods **55**(2): 113-126.

Stuhlinger, M. C., P. S. Tsao, J. H. Her, M. Kimoto, R. F. Balint and J. P. Cooke (2001). "Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine." Circulation **104**(21): 2569-2575.

Stypmann, J., K. Glaser, W. Roth, D. J. Tobin, I. Petermann, R. Matthias, G. Monnig, W. Haverkamp, G. Breithardt, W. Schmahl, C. Peters and T. Reinheckel (2002). "Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6234-6239.

Takano, H., H. Hasegawa, T. Nagai and I. Komuro (2003). "Implication of cardiac remodeling in heart failure: mechanisms and therapeutic strategies." Intern Med **42**(6): 465-469.

Takeishi, K., M. Hayashi, S. Iino, T. Kondo, Y. Inden, M. Iwase, T. Kojima, M. Hirai, M. Ito, D. J. Loskutoff, H. Saito, T. Murohara and K. Yamamoto (2004). "Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cardiomyocytes contributes to cardiac fibrosis after myocardial infarction." Am J Pathol **164**(2): 449-456.

Tan, R. J., C. L. Fattman, L. M. Niehouse, J. M. Tobolewski, L. E. Hanford, Q. Li, F. A. Monzon, W. C. Parks and T. D. Oury (2006). "Matrix metalloproteinases promote inflammation and fibrosis in asbestos-induced lung injury in mice." Am J Respir Cell Mol Biol **35**(3): 289-297.

Thompson, R. W., J. T. Pesce, T. Ramalingam, M. S. Wilson, S. White, A. W. Cheever, S. M. Ricklefs, S. F. Porcella, L. Li, L. G. Ellies and T. A. Wynn (2008). "Cationic amino acid transporter-2 regulates immunity by modulating arginase activity." PLoS Pathog **4**(3): e1000023.

Treasure, C. B., J. A. Vita, D. A. Cox, R. D. Fish, J. B. Gordon, G. H. Mudge, W. S. Colucci, M. G. Sutton, A. P. Selwyn, R. W. Alexander and et al. (1990). "Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy." Circulation **81**(3): 772-779.

Tsagalou, E. P., M. Anastasiou-Nana, E. Agapitos, A. Gika, S. G. Drakos, J. V. Terrovitis, A. Ntalianis and J. N. Nanas (2008). "Depressed coronary flow reserve is associated with decreased myocardial capillary density in patients with heart failure due to idiopathic dilated cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol **52**(17): 1391-1398.

Unsold, B., H. Schotola, C. Jacobshagen, T. Seidler, S. Sossalla, J. Emons, S. Klede, R. Knoll, K. Guan, A. El-Armouche, W. A. Linke, H. Kogler and G. Hasenfuss (2012). "Age-dependent changes in contractile function and passive elastic properties of myocardium from mice lacking muscle LIM protein (MLP)." Eur J Heart Fail **14**(4): 430-437.

van der Zwan, L. P., P. G. Scheffer, J. M. Dekker, C. D. Stehouwer, R. J. Heine and T. Teerlink (2011). "Systemic inflammation is linked to low arginine and high ADMA plasma levels resulting in an unfavourable NOS substrate-to-inhibitor ratio: the Hoorn Study." Clin Sci (Lond) **121**(2): 71-78.

Vanderheyden, M., M. Goethals, S. Verstreken, B. De Bruyne, K. Muller, E. Van Schuerbeeck and J. Bartunek (2004). "Wall stress modulates brain natriuretic peptide production in pressure overload cardiomyopathy." J Am Coll Cardiol **44**(12): 2349-2354.

von Leitner, E. C., A. Klinke, D. Atzler, J. L. Slocum, N. Lund, J. T. Kielstein, R. Maas, R. Schmidt-Haupt, M. Pekarova, O. Hellwinkel, D. Tsikas, L. G. D'Alecy, D. Lau, S. Willems, L. Kubala, H. Ehmke, T. Meinertz, S. Blankenberg, E. Schwedhelm, C. A. Gadegbeku, R. H. Boger, S. Baldus and K. Sydow (2011). "Pathogenic cycle between the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetrical dimethylarginine and the leukocyte-derived hemoprotein myeloperoxidase." Circulation **124**(24): 2735-2745.

Wahl, S. M., N. McCartney-Francis, J. B. Allen, E. B. Dougherty and S. F. Dougherty (1990). "Macrophage production of TGF-beta and regulation by TGF-beta." Ann N Y Acad Sci **593**: 188-196.

Wu, X., A. V. Somlyo and A. P. Somlyo (1996). "Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphate." Biochem Biophys Res Commun **220**(3): 658-663.

Wynn, T. A. and L. Barron (2010). "Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis." Semin Liver Dis **30**(3): 245-257.

Yamamoto, R., H. Akazawa, K. Ito, H. Toko, M. Sano, N. Yasuda, Y. Qin, Y. Kudo, T. Sugaya, K. R. Chien and I. Komuro (2007). "Angiotensin II type 1a receptor signals are involved in the progression of heart failure in MLP-deficient mice." Circ J **71**(12): 1958-1964.

Zhang, C., C. Reiter, J. P. Eiserich, B. Boersma, D. A. Parks, J. S. Beckman, S. Barnes, M. Kirk, S. Baldus, V. M. Darley-Usmar and C. R. White (2001). "L-arginine chlorination products inhibit endothelial nitric oxide production." J Biol Chem **276**(29): 27159-27165.

Zou, M. H., C. Shi and R. A. Cohen (2002). "Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite." J Clin Invest **109**(6): 817-826.

8 Anhang

8.1 Liste der experimentellen Daten

Daten sind gezeigt als Mittelwert \pm Standardfehler und nach Abbildungen geordnet.

Abb. 4.1: Einfluss eines MPO-Knockouts auf die veränderte Herzgeometrie in MLP-KO Mäusen:

LV-PW Dicke (mm):

WT: $0,868 \pm 0,031$, MLP-KO: $0,629 \pm 0,033$, MPO-KO: $0,912 \pm 0,039$, MLP/MPO DKO: $0,663 \pm 0,029$, N=22, 18, 6, 23.

LV-Volumen (μ L):

WT: $77,352 \pm 2,442$, MLP-KO: $94,131 \pm 3,028$, MPO-KO: $75,377 \pm 4,883$, MLP/MPO DKO: $103,907 \pm 2,771$; N= 22, 9, 6, 23.

Abb. 4.2: Einfluss einer MPO Defizienz auf die eingeschränkte systolische LV-Funktion in MLP-KO Mäusen:

EF (%):

WT: $56,056 \pm 0,809$, MLP-KO: $24,8 \pm 2,235$, MPO-KO: $48,633 \pm 5,5$, MLP/MPO DKO: $31,022 \pm 1,913$ N= 5, 18, 6, 23.

FS (%):

WT: $29,096 \pm 0,542$, MLP-KO: $11,482 \pm 1,095$, MPO-KO: $24,732 \pm 3,371$, MLP/MPO DKO: $14,751 \pm 0,989$; N= 5, 18, 6, 23.

Abb. 8.1: Untersuchung der von Nachlast und Herzgeometrie unabhängigen systolischen LV-Funktion:

PRSW (mmHg):

WT: $60,008 \pm 4,647$, MLP-KO: $44,09 \pm 3,832$, MPO-KO: $62,12 \pm 2,037$, MLP/MPO DKO: $59,616 \pm 3,545$; N= 6, 6, 3, 5.

Abb. 4.4: Diastolische Dysfunktion in MLP-KO und MLP/MPO DKO Tieren:

Tau (ms):

WT: $5,906 \pm 0,823$, MLP-KO: $10,119 \pm 0,66$, MPO-KO: $4,735 \pm 0,565$, MLP/MPO DKO: $9,948 \pm 0,859$; N=4, 5, 2, 5.

Abb. 4.5: Untersuchung der Ausprägung der Herzinsuffizienz in MLP-KO und MLP/MPO DKO Tieren mithilfe des natriuretischen Peptids Typ B (BNP):

BNP Expression (relative Expression):

WT: $1,167 \pm 0,431$, MLP-KO: $11,058 \pm 4,916$, MPO-KO: $3,234 \pm 2,398$, MLP/MPO DKO: $4,095 \pm 0,825$; N= 10, 12, 7, 11.

Abb. 4.6: Untersuchungen zum fetalen kardialen Genprogramm im Myokard der MLP-KO Mäuse in Abhängigkeit von MPO:

MHC α Expression (relative Expression):

WT: $1,072 \pm 0,122$, MLP-KO: $0,904 \pm 0,192$, MPO-KO: $1,334 \pm 0,153$, MLP/MPO DKO: $0,811 \pm 0,121$, N= 12, 13, 8, 11.

MHC β Expression (relative Expression):

WT: $1,031 \pm 0,072$, MLP-KO: $1,301 \pm 0,189$, MPO-KO: $1,028 \pm 0,146$, MLP/MPO DKO: $0,723 \pm 0,086$, N= 12, 13, 8, 11.

MHC α/β Quotient:

WT: $0,137 \pm 0,014$, MLP-KO: $0,102 \pm 0,019$, MPO-KO: $0,19 \pm 0,03$, MLP/MPO DKO: $0,17 \pm 0,034$, N= 12, 13, 8, 11.

ANP Expression (relative Expression):

WT: $1,9071 \pm 0,672$, MLP-KO: $27,91 \pm 8,073$, MPO-KO: $4,784 \pm 2,334$, MLP/MPO DKO: $23,57 \pm 6,669$, N= 7, 9, 7, 8.

Skeletales α -Aktin Expression (relative Expression):

WT: $0,904 \pm 0,093$, MLP-KO: $2,27 \pm 0,218$, MPO-KO: $0,841 \pm 0,065$, MLP/MPO DKO: $1,361 \pm 0,199$, N= 11, 12, 7, 8.

SERCA Expression (relative Expression):

WT: $1,036 \pm 0,084$, MLP-KO: $0,948 \pm 0,205$, MPO-KO: $1,318 \pm 0,232$, MLP/MPO DKO: $0,854 \pm 0,188$, N= 11, 12, 7, 8.

Abb. 4.7: Interstitielle Fibrosierung im linken Ventrikel der MLP-KO Mäuse als Parameter des kardialen Remodelings

Fibrose/Gesamtfläche:

WT: $0,003 \pm 0,000791$, MLP-KO: $0,025 \pm 0,00077$, MLP/MPO DKO: $0,024 \pm 0,00241$; N= 3, 3, 4.

Abb. 4.8: Einfluss einer MPO-Defizienz auf die Makrophagen-Infiltration in den linken Ventrikel der MLP-KO Maus:

Makrophagen/hpf:

WT: $1,003 \pm 0,212$, MLP-KO: $3,422 \pm 0,699$, MLP/MPO DKO: $2,998 \pm 0,554$; N= 10, 7, 11.

Abb. 4.9: Konzentration von MPO im Blutplasma, ermittelt mithilfe eines Maus-MPO Elisas:

MPO-Konzentration (ng/ μ L):

WT: $191,94 \pm 27,987$, MLP-KO: $270,054 \pm 81,879$, MLP/MPO DKO: $36,561 \pm 2,494$; N= 7, 5, 4.

Abb. 4.10: Erhöhte MPO Deposition in der Koronarzirkulation der MLP-KO Tiere:

MPO-Konzentration (ng/μL):

WT: $59,035 \pm 22,306$, MLP-KO: $129,709 \pm 19,049$, MLP/MPO DKO: $34,529 \pm 2,103$; N= 3, 4, 7.

Abb. 4.11: Zusammenhang zwischen eines MPO Knockouts und einer verminderten linksventrikulären Kapillardichte in MLP-KO Tieren:

Anzahl Kapillaren/μm*1000:

WT: $4,688 \pm 0,214$, MLP-KO: $3,808 \pm 0,135$, MLP/MPO DKO: $3,849 \pm 0,127$; N= 8, 11, 6.

Abb. 4.12: NO-Bioverfügbarkeit im Myokard:

pVASP/VASP (AUC):

WT: $0,208 \pm 0,009$, MLP-KO: $0,186 \pm 0,011$, MLP/MPO DKO: $0,214 \pm 0,015$; N= 20, 23, 21.

eNOS (AUC):

WT: $0,17 \pm 0,031$, MLP-KO: $0,135 \pm 0,015$, MLP/MPO-KO: $0,134 \pm 0,021$; N= 13, 13, 14.

Abb. 4.13: Koronarer Perfusionsdruck in MLP-KO Tieren und der Einfluss von MPO auf diesen Parameter:

Koronarer Perfusionsdruck (mmHG):

WT: $109,587 \pm 4,003$, MLP-KO: $115,242 \pm 19,888$, MPO-KO: $69,0105 \pm 23,958$, MLP/MPO DKO: $111,649 \pm 21,518$; N= 8, 5, 4, 3.

Abb. 4.14: Einfluss der MPO Defizienz auf die endothelabhängige und endothelunabhängige Aortenfunktion:

% der Relaxation bei 100 nM Ach-Inkubation :

WT: $64,242 \pm 2,069$, MLP-KO: $37,508 \pm 3,824$, MLP/MPO DKO: $53,979 \pm 3,115$; N= 12, 13, 14.

% der Relaxation bei 100 nM NTG-Inkubation:

WT: $44,88 \pm 1,3$, MLP-KO: $41,66 \pm 1,45$, MLP/MPO-KO: $42,74 \pm 2,04$; N= 12, 13, 14.

Abb. 4.15: Systemischer vaskulärer Widerstand in MLP-KO Mäusen in Abhängigkeit von MPO:

SVR (mmHg*min*ml⁻¹):

WT: $0,342 \pm 0,034$, MLP-KO: $0,59 \pm 0,043$, MPO-KO: $0,36 \pm 0,03$, MLP/MPO DKO: $0,351 \pm 0,033$; N= 5, 6, 2, 5.

Abb. 4.16: NO-Bioverfügbarkeit in der Aorta:

pVASP/VASP (AUC):

WT: $904,172 \pm 285,369$, MLP-KO: $169,192 \pm 25,555$, MLP/MPO DKO: $479,008 \pm 125,517$; N= 6, 5, 5.

eNOS (AUC): WT: $1,64 \pm 0,269$, MLP-KO: $2,028 \pm 0,547$, MLP/MPO-KO: $0,93 \pm 0,244$; N= 11, 6, 8.

8.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Baldus danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können und seine Bereitschaft, als Gutachter dieser Dissertation zu fungieren.

Ich danke Frau PD Dr. Rudolph und Herrn PD Dr. Rudolph für die Betreuung dieser Arbeit und für die sehr hilfreichen Gespräche. Frau PD Dr. Tanja Rudolph danke ich weiterhin für die Bereitschaft, Teil der Disputationskommission zu sein.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Burmester für die Betreuung der Arbeit danken.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Ganzhorn für die Übernahme der Position als Disputationsvorsitzender.

Ich danke Frau Dr. Klinke für die intensive Betreuung während der gesamten Zeit der Arbeit. Die zahlreichen inhaltvollen Gespräche haben großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch meinen Kollegen und Freunden Hartwig, Lisa, Denise, Matti, Martin, Gülsah und Christina für die Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Diskussionsfreude und für das freundschaftliche Arbeitsumfeld.

Ich danke meinen Eltern, meiner Verlobten Denise, meinen Geschwistern und Freunden für die Unterstützung, den Rückhalt und das Verständnis, das sie während der gesamten Zeit meiner Arbeit aufgebracht haben.

9 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Thorben Ravekes