

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum Hamburg
Klinik und Poliklinik für Kardiologie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Blankenberg

Markierung humaner Myeloperoxidase zur Detektierung des Fusionsproteins

Dissertation

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

vorgelegt von:

Arso Zahir
aus Kabul

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.01.2016**

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. G. Escherich

*Meinen lieben
Eltern und Großeltern
in Dankbarkeit gewidmet*

„One must learn the science, to practice the art.“

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I-II
1 Einleitung.....	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Ziel dieser Arbeit	2
1.3 Verwendete Methoden	3
1.4 Problemstellung.....	3
1.5 Die Myeloperoxidase (MPO)	4
1.5.1 Allgemeines.....	4
1.5.2 Biosynthese und Prozessierung.....	5
1.5.3 Katalytische Mechanismen	6
1.5.4 Die Rolle der Myeloperoxidase in inflammatorischen Prozessen.....	9
1.6 Mit MPO assoziierte Erkrankungen	10
1.6.1 MPO-Mangel.....	10
1.6.2 Gewebeverletzung	11
1.6.3 Karzinogenese	12
1.6.4 Nieren- und Lungenerkrankungen.....	12
1.6.5 Multiple Sklerose.....	13
1.6.6 Alzheimer- und Parkinson-Erkrankung.....	13
1.6.7 MPO und andere chronisch inflammatorische Erkrankungen	14
1.7 Die Arteriosklerose	14
1.7.1 Arteriosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD)	16
1.8 Biomarker in der Kardiologie	17
1.9 Die Koronare Herzerkrankung.....	18
1.10 Die Rolle von MPO im kardiovaskulären System	20
2 Methodisches Vorgehen.....	24
2.1 Allgemeine Puffer und Lösungen	24
2.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	28
2.1.3 CHO Zellen	33
3 Ergebnisse.....	44
3.1 Das Grün fluoreszierende Protein	44
3.2 Die Polymerase-Kettenreaktion.....	48
3.3 Plasmidkonstruktionen und –präparationen/ Klonierung des Plasmids	48
3.4 Charakterisierung des pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP-Plasmids	52
3.5 Transfektion in CHO- Zellen.....	55
3.6 Proteinaufreinigung und Western Blots/ Proteinbestimmung im BCA Proteinassay	55
3.7 Sequenzierung des Stop-Codons.....	56
3.8 Ortsgerichtete Mutagenese (site-directed mutagenesis)	58
3.9 Erneute Transfektion	59
3.10 Western Blot.....	59
3.11 Fluoreszenzmikroskopie.....	61

3.12	hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein-Aktivitätsmessung.....	63
4	Diskussion und Ausblick.....	66
4.1	Problemstellung und experimenteller Ansatz	66
4.3	Expression in eukaryontischen Zellen	67
4.4	Ausblick und weiterführende Arbeiten	69
5	Zusammenfassung.....	71
6	Abkürzungsverzeichnis	73
7	Abbildungsverzeichnis	78
8	Tabellenverzeichnis	80
9	Literaturverzeichnis	81
10	Danksagung.....	98
11	Anhang.....	99
11.1	Lebenslauf.....	99
11.2	Eidesstattliche Versicherung	102

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Thema der Markierung humaner Myeloperoxidase (MPO) mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) und der Detektierung des Fusionsproteins (MPO-GFP). Zunächst soll eine Einführung in das Thema gegeben und neue Ansätze der Forschung zu MPO kurz dargestellt werden. Anschließend wird das methodische Vorgehen zur Entwicklung eines MPO-GFP Fusionsproteins in tabellarischer Form beschrieben, daran schließlich erfolgt die Darstellung der experimentellen Ergebnisse und die Einordnung in den aktuellen Forschungsstand. Ein Fazit und ein kurzer Ausblick auf mögliche weiterführende Experimente beschließen die Arbeit.

1.1 Hintergrund

Seitdem die Myeloperoxidase vor über 70 Jahren entdeckt wurde, gewinnt sie immer mehr an Bedeutung und beschäftigt zahlreiche Forschungsgruppen. Dieses Hämprotein aus der Gruppe der Peroxidasen hat durch die Bildung von hypochloriger Säure (HOCl) eine bakterizide Wirkung, beeinträchtigt aber darüber hinaus die Funktion körpereigener Strukturen und ist an vielen Signalkaskaden beteiligt (Klebanoff 2005). MPO spielt eine wesentliche Rolle in entzündlichen Prozessen, einschließlich der arteriosklerotischen Plaquebildung und endothelialen Dysfunktion sowie den daraus folgenden Komplikationen wie die Plaqueruptur, Thrombosebildung und das Remodeling (Tavora et al. 2009; Baldus et al. 2001; Eiserich et al. 2002; Fu et al. 2001).

Herz-Kreislauf-Erkrankungen entstehen häufig als Folge von arteriosklerotischen Gefäßveränderungen und laut dem veröffentlichten 4. Bericht der European Society of Cardiology (ESC) und des European Heart Network (EHN) (Weltherztag, 29.09.2012) sind sie die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen. Es ist bekannt, dass erhöhte MPO-Plasmaspiegel zu Störungen des Herz-Kreislauf-Systems führen (Baldus et al. 2003). Ebenso konnten erhöhte Plasmaspiegel von MPO bei Patienten mit einer eingeschränkten linksventrikulären Pumpfunktion des Herzens und bei Patienten mit Vorhofflimmern gefunden werden (Rudolph et al. 2007a, 2010b). In diesem Zusammenhang ist es jedoch bisher noch nicht gelungen,

den exakten Pathomechanismus von MPO im Kontext kardiovaskulärer Erkrankungen vollständig aufzuklären.

Doch MPO steht im Rahmen arteriosklerotischer Mechanismen im besonderen Fokus der medizinischen Forschung, da die MPO-Plasmakonzentration als prognostischer Biomarker für Herz- und Gefäßerkrankungen herangezogen werden kann (Zhang et al. 2001; Winterbourne et al. 2000). In Relation dazu haben Baldus et al. 2003 gezeigt, dass Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom, die mit erhöhten MPO-Plasmaspiegeln in einem Zeitraum eines 6-monatigen *Follow-Up* auffallen, ein erhöhtes Risiko für kardiale Ereignisse aufweisen.

1.2 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser experimentellen Arbeit ist die Herstellung einer GFP-markierten Myeloperoxidase und der biochemischen/enzymatischen Charakterisierung dieses Fusionsproteins. Hieraus resultiert die folgende Hypothese:

H: Herstellung einer GFP- markierten Myeloperoxidase möglich.

Mit dieser experimentellen Dissertation soll die Grundvoraussetzung für daraus folgenden Bestimmungen der (Gewebs-) Verteilung injizierter GFP-MPO *in vivo* im Mausmodell gelegt werden.

Um die Gewebsverteilung applizierter MPO *in vivo* im Mausmodell genau bestimmen und verfolgen zu können, sollte markierte MPO hergestellt werden. Als Fusionsprotein dient hierfür das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Seefeder *Ptilosarcus gurneyi*.

Es gibt zwei Möglichkeiten MPO und GFP zu fusionieren:

1. GFP-MPO (= N-terminal) und
2. MPO-GFP (= C-terminal).

Die C-terminale Region eines Proteins bezeichnet den Teil des Moleküls, der eine Carboxylgruppe (-COOH) aufweist und im Gegensatz dazu besitzt das entgegengesetzte N-terminale Ende eine Aminogruppe (-NH₂) (Brockhaus 1965).

Beiden Signalsequenzen kommt eine wesentliche Bedeutung für die Proteinbiosynthese und posttranslationale Modifikation zu.

MPO wird N-terminal prozessiert, das bedeutet, dass Signalsequenzen während der Reifung zu nativem MPO abgespalten werden. Bei einer N-terminalen Fusionierung wäre somit die Gefahr groß gewesen, dass das MPO verloren gegangen wäre. Bei diesem Projekt wird deshalb C-terminal markiertes MPO hergestellt.

1.3 Verwendete Methoden

Für die Herstellung eines markierten humanen MPO-Gens wird in das schon vorhandene Plasmid pcDNA hMPO (von AG Furtmüller, Wien) das per PCR aus einem pUC18 hGFP-Plasmid amplifizierte GFP kloniert und das Konstrukt zur Vervielfältigung in Laborsicherheitsstämmen des Enterobakterium *E. coli* (DH5 α ; TOP10) transformiert.

Analytische Restriktionsverdau mithilfe von Restriktionsenzymen, Aufreinigung und Sequenzierung der DNA Fragmente nach Separierung mittels Gelelektrophorese und die Ligation sind weitere methodische Verfahren, die hier verwendet werden.

Die korrekten MPO-Marker-Konstrukte werden mittels Nanofektamin in CHO-Zellen (chinese hamster ovary) transfiziert um zu überprüfen, ob MPO-GFP exprimiert wird und fluoresziert. Anhand von Western Blots erfolgt der Proteinnachweis. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wird der TMB assay eingesetzt. In Kapitel 2 wird das methodische Vorgehen in tabellarischer Form ausführlich erklärt.

1.4 Problemstellung

Die Gefahr für das Fehlschlagen der Entwicklung eines GFP-Markers für das in neutrophilen Granulozyten von Säugetieren (Mammalia), einschließlich des Menschen, vorkommende Enzym MPO besteht darin, dass MPO stark positiv und im Gegensatz dazu das Markierungsmolekül GFP nur schwach negativ geladen ist (Kooter et al. 1999). Die positive Ladung von MPO spielt eine bedeutende Rolle für die Interaktion von MPO mit Zellen und deshalb sollte das Markierungsmolekül möglichst wenig Einfluss auf die MPO-Ladung nehmen. Das ist nur bedingt möglich unter Verwendung eines speziellen GFPs, das fast neutral bzw. nur noch schwach

negativ geladen ist. Das für die Experimente verwendete humanisierte GFP stammt aus der Seefeder *Ptilosarcus gurneyi* (Peelle et al. 2001). „Humanisiert“ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Sequenzen, die für die Aminosäure kodieren an den Codongebrauch des Menschen angepasst sind. Das GFP der Seefeder (und nicht wie sonst üblich der Qualle *Aequorea victoria*) wird ausgesucht, da dieses GFP eine relativ neutrale Ladung hat und deshalb die stark positive Ladung der MPO nicht zu sehr verändert. Die stark positive Ladung der MPO spielt vermutlich eine beachtliche Rolle bei den Funktionen der MPO.

1.5 Die Myeloperoxidase (MPO)

1.5.1 Allgemeines

MPO ist ein 150-kDa-Hämprotein, das von neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Mikroglia und Makrophagen exprimiert wird. In den polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) macht es fast 5 % des Gesamtproteins aus und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr aber auch der entzündlichen Gewebeverletzung (Lau und Baldus 2006; Nicholls et al. 2005; Klebanoff et al. 1984).

Das MPO-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 17 (Weil und Rosner et al. 1987) und besteht aus 12 Exons und 11 Introns (Yamada und Hur et al. 1987). Bei MPO handelt es sich um ein kovalent verknüpftes Homodimer, dessen Monomere aus schweren und leichten Ketten aufgebaut sind. An der schweren Untereinheit tragen sie jeweils ein kovalent gebundenes Häm-Molekül mit einem Eisenzentralatom (Lau et al. 2006). Dieser Hämgruppe, die dem Enzym seine grüne Farbe verleiht, kommt ein hoher Stellenwert für die katalytische Aktivität, Struktur und Stabilität zu (Lau et al. 2006; Fenna et al. 1995).

Abbildung 1 veranschaulicht die dreidimensionale Struktur des zu der Gruppe der Peroxidasen gehörenden Häm-Enzyms. MPO ist reich an den proteinogenen α -Aminosäuren L-Arginin und Lysin, die dazu führen, dass MPO einen hohen isoelektrischen Punkte von > 10 besitzt und stark kationisch ist (Lamy et al. 1999).

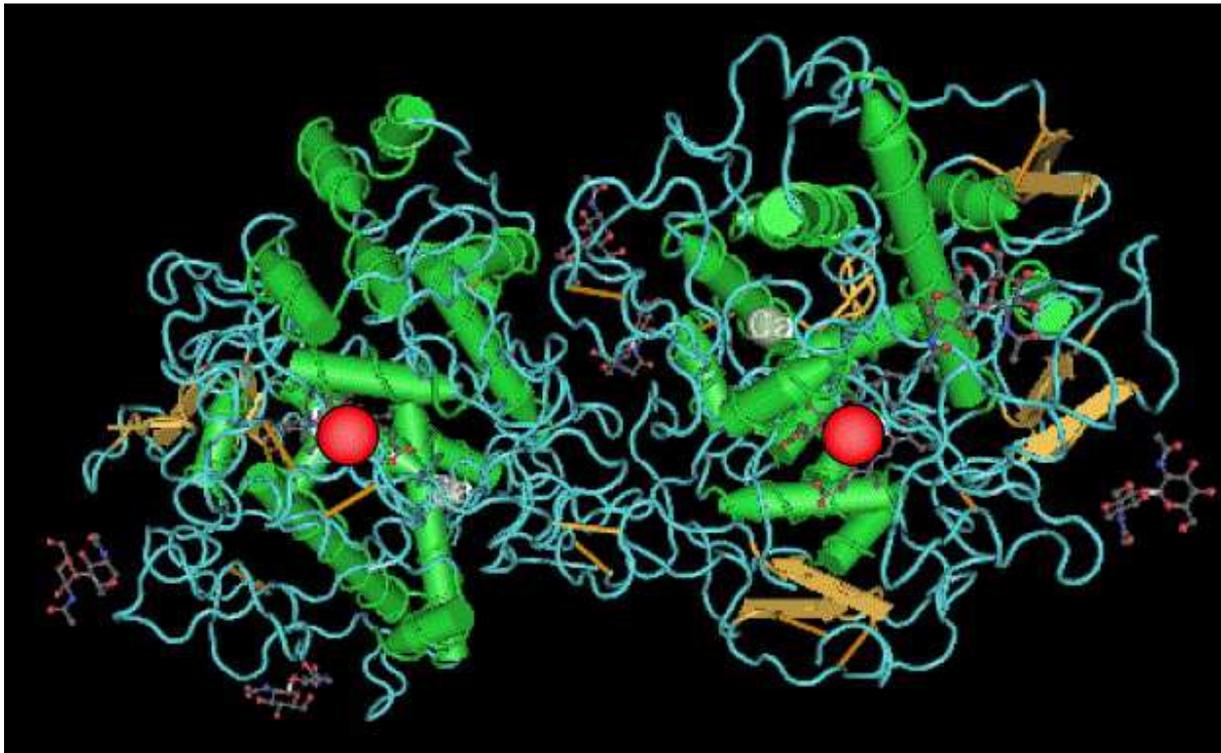


Abb. 1: Die dreidimensionale Struktur eines MPO-Homodimers. Hervorgehoben sind die zentralen Hämgruppen (rot), die α -Helices (grün) und die β -Faltblatt-Strukturen (gelb). Quelle: Lau D. und Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics* 111, 16–26 (2006).

1.5.2 Biosynthese und Prozessierung

Für die Biosynthese der reifen MPO sind mehrere intrazelluläre Prozesse erforderlich. Unterschieden werden zwei Vorstufen der Myeloperoxidase, dazu gehören das vorläufige apoproMPO im rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER), welches durch das Fehlen der Hämgruppe inaktiv ist und das Häm-beinhaltende proMPO, welches die Fähigkeit besitzt, den Golgi-Apparat zu passieren (Nauseef 1986a, 1987b). Durch weitere Prozessierung/proteolytische Modifikation werden die einzelnen proMPO-Monomere mit jeweils einer Hämgruppe zu Dimeren aus zwei schweren und leichten Untereinheiten verknüpft, damit reifes MPO entstehen kann (Koeffler et al. 1985; Olsson et al. 1984). Dementsprechend erfolgt die Synthese von MPO und die posttranslationale Modifikation mit der Häm-Gruppe im rauhen endoplasmatischen Retikulum (ER). Danach gelangt sie in den Golgi-Apparat und wird anschließend in Granula verpackt oder direkt in den Extrazellularraum sezerniert (Baldus et al. 2003). Bis zur Sezernierung verbleibt MPO mit einer Vielzahl von anderen Enzymen wie Lysozym, Kathepsin G, Proteinase 3, Defensine und dem

proteolytischen Enzym Elastase in den azurophilen Granula (Nicholls et al. 2005; Klebanoff 1999).

Im Rahmen von Entzündungsprozessen werden MPO und deren Enzymprodukte aus den neutrophilen Granulozyten in den Extrazellulärraum freigesetzt. Klinische Relevanz hat zum Beispiel eine erhöhte MPO-Konzentration im Plasma als Entzündungsmarker für die Frühdiagnostik bei KHK-Patienten (Baldus et al. 2003; Brennan et al. 2003). Weitere Studien von Baldus et. al. aus 2004 verdeutlichen die proinflammatorischen Eigenschaften von MPO während des „respiratory burst“ direkt am Endothel der Koronararterien (vgl. Abb. 2). Interessanterweise belegen zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten die Rolle der Myeloperoxidase in der Entstehung sowie der Destabilisierung von atherosklerotischen Ablagerungen (Naruko et al. 2002; Sugiyama et al. 2001a, 2004b; Baldus et al. 2001; Fu et al. 2001; Hazen et al.1997).

1.5.3 Katalytische Mechanismen

Durch die enzymatische Bildung von hypochloriger Säure (HOCl) bei der zytotoxischen Abwehr durch neutrophile Granulozyten hat MPO bakterizide Eigenschaften (Eiserich et al. 1998) (vgl. Abb. 2). Wichtig ist aber auch die Wirkung auf die Homöostase der Gefäßwand durch die direkte und indirekte Oxidierung von endothelial-gebildetem Stickstoffmonoxid (NO) (Eiserich et al. 2002).

Durch Zellaktivierung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) wird die reife MPO in Phagosomen sezerniert und auch in den Extrazellulärraum freigesetzt und katalysiert die folgende Reaktion:

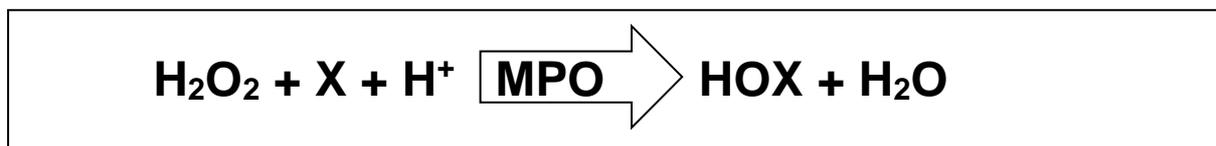


Abb. 2: Die enzymatische Reaktion des Halogenierungs-Zyklus von MPO während des oxidativen Burst der Neutrophilen Granulozyten. Bei dieser Reaktion katalysiert MPO die Oxidation von Halogeniden und Pseudohalogenid-Ionen (X), wie zum Beispiel Chlorid- oder Bromidanionen (Cl⁻, Br⁻), mit Hilfe von Wasserstoffperoxid (H₂O₂). Dabei können Chlor (Cl₂), Brom (Br₂) wie auch Bromchlorid (BrCl) und weiterhin Hypochlorid (HOCl) und Hypobromit (HOBr) entstehen (Klebanoff 2005; Kettle et al. 2001; Hazen et al. 1996).

Hierbei katalysiert die Myeloperoxidase mithilfe von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Chlorid-Ionen zu Hypochlorit-Ionen (OCl^-) bzw. hypochloriger Säure (HOCl) (Lau et al. 2006). Solche reaktiven Sauerstoffverbindungen, die durch das sogenannte MPO-Enzymsystem entstehen, sind für das Abtöten von Bakterien durch phagozytierende Zellen erforderlich (Klebanoff 2005). Das MPO-System setzt sich zusammen aus MPO, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und einem oxidierbaren Kofaktor. Die Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über die katalytischen Mechanismen von MPO (Van Dalen et al. 2000; Eiserich et al. 1998). Neben der MPO-Grundform bestehen weitere Oxidationsstufen des Enzyms, die wichtigsten sind die MPO-I- und MPO-II-Form. H_2O_2 reagiert mit der Ausgangsform von MPO (MPO) zu der kurzlebigen Oxidationsstufe MPO-I. Zur Entstehung von MPO-I führt auch die Reaktion von MPO mit HOCl (Furtmüller et al. 2000). MPO-I oxidiert nicht nur (Pseudo)Halogenide wie Br^- und I^- , sondern auch andere Substrate, wie zum Beispiel Nitrit (NO_2^-), Thiocyanat (SCN^-) und Tyrosin (Arnhold 2001). MPO-II entsteht durch einen einfachen Elektronentransfer aus MPO-I und kann durch eine Reduktionsreaktion in die aktive MPO-Grundform überführt werden. Diese Rückreduzierung zur MPO-Grundform stellt den geschwindigkeitslimitierenden Schritt in dem Zyklus der Peroxidaseaktivität dar (Davies et al. 2008; Furtmüller et al. 2006).

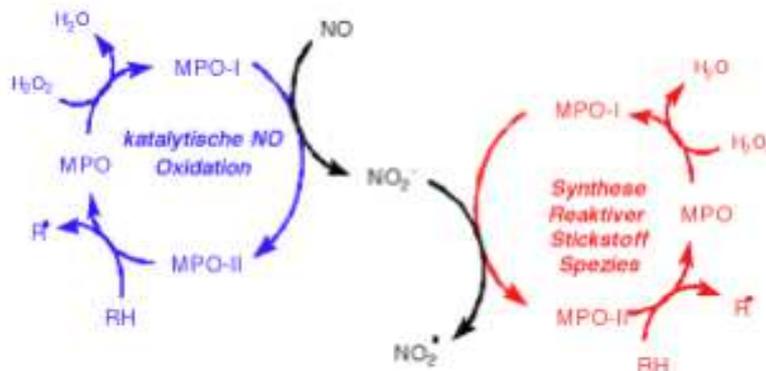


Abb. 3: Der Peroxidase-Zyklus von MPO

MPO katalysiert im Peroxidase-Zyklus die Oxidation u.a. von Stickstoffmonoxid und Nitrit. In Anwesenheit seines wichtigsten Substrates H_2O_2 oxidieren die MPO Formen I und II NO entweder direkt oder über diverse radikale Zwischenprodukte (R^\cdot). Das Produkt der NO Oxidation, Nitrit, dient auch als ein Substrat für MPO und die Oxidation ergibt NO_2 , welches ein Oxidationsmittel ist, das zur potenten Nitrierung von freiem oder gebundenem Tyrosin-Protein führt. NO : Stickstoffmonoxid, NO_2^- : Stickstoffdioxid, NO_2^\cdot : Nitrit, H_2O_2 : Wasserstoffperoxid, R^\cdot : Radikalintermediärprodukte. Quelle: Van Dalen et al. 2000; Eiserich et al. 1998.

Eine besondere physiologische Bedeutung in diesem Zyklus kommt der MPO-I-Form in der Oxidierung von Stickstoffmonoxid (NO) zu Nitrit (NO_2^-) zu (Baldus et al. 2004). Das lipophile NO, welches von der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) durch Abspaltung von der Aminosäure L-Arginin synthetisiert wird, ist in der Lage die Zellmembran zu passieren (vgl. Abb. 4). Als reaktives Radikal und aufgrund seiner hohen Affinität zu Eisen bindet es an die Häm-Gruppe von Enzymen. Auf diese Weise beeinflusst es Signalkaskaden und reguliert den Gefäßtonus (Radomski et al. 1990). So kann das gebildete NO aus der Endothelzelle in die Gefäßmuskelzelle diffundieren und dort das Enzym Guanylatzyklase aktivieren, die wiederum die Synthese des Botenstoffes zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert.

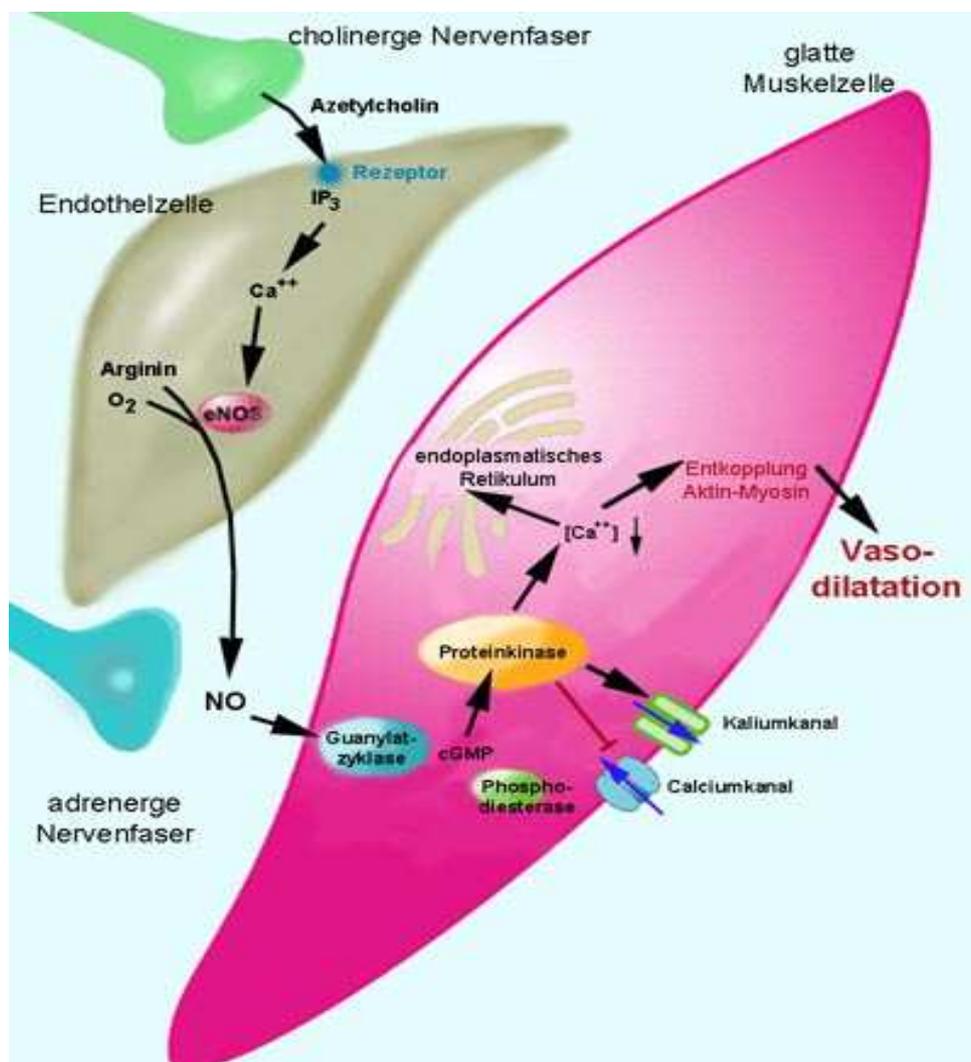


Abb. 4: NO-bedingter Vasodilatationsmechanismus.

Die Stimulierung des Parasympathikus beispielsweise in den Koronararterien (myokardiale Perfusionssteigerung) führt über die Freisetzung von Acetylcholin zur

Aktivierung von IP₃-Rezeptoren (Inositol-1,4,5-trisphosphonat-Rezeptoren) in der Endothelzellmembran, die wiederum eine Erhöhung der intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration bewirken. Dadurch wird die NO-Synthase (eNOS) aktiviert und bildet Stickstoffmonoxid (NO) aus Arginin. Nun kann NO in die glatten Gefäßmuskelzellen diffundieren und dort die Guanylatzyklase aktivieren. Die Guanylylzyklase synthetisiert aus GTP zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), das daraufhin cGMP-spezifische Proteinkinasen anregt und über eine Senkung der Ca⁺⁺-Konzentration eine muskelrelaxierende und vasodilatierende Wirkung erreicht und auf diese Weise die Perfusion steigert. Quelle: Abbildung entnommen aus Hinghofer Szalkay's homepage: www.user.medunigraz.at/helmut.hinghofer-szalkay.

Über die Aktivierung von cGMP-spezifischen Proteinkinasen kommt es dann zu einer verminderten intrazellulären Kalziumkonzentration, die somit zur Vasodilatation führt (Thews et. al. 1999). Neben der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt NO auch zur Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen und der Thrombozytenaggregation (Kubes et. al. 1991; Radomski 1987), weshalb eine Verringerung der NO-Konzentration durch MPO-I Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System hat (Lau et al. 2006). Als antiinflammatorischer Mediator verhindert NO die Proliferation von glatten Muskelzellen und reduziert die Bildung von weiteren reaktiven Sauerstoffverbindungen. Eine Reihe von Medikamenten wirken rezeptorvermittelt über NO auf die glatte Gefäßmuskulatur. Vor allem die vasodilatierende sowie die antithrombotische Wirkung von NO wird beispielsweise bei der Therapie von Angina pectoris-Anfällen und beim akuten Koronarsyndrom (z.B. ISDN, Molsidomin) eingesetzt (Yokota et al. 1986; Osterspey 1983).

1.5.4 Die Rolle der Myeloperoxidase in inflammatorischen Prozessen

In zahlreichen Studien konnte der kausale Zusammenhang zwischen der durch MPO reduzierten NO-Bioverfügbarkeit und endothelialen Dysfunktion gezeigt werden (Vita et al. 2004; Eiserich et al. 2002; Baldus et al. 2001; Cai 2000). Mit der endothelialen Dysfunktion gehen Entzündungsreaktionen einher. Letztendlich können diese Prozesse die Bildung von Arteriosklerose fördern (Galijasevic et al. 2003; Eiserich et al. 2002; Baldus et al. 2001). Patienten mit entzündlichen Erkrankungen weisen erhöhte MPO-Plasmaspiegel auf, weil polymorphkernige Granulozyten während Entzündungsreaktionen aktiviert sind. Das stark kationische MPO kann dann an die

negativ geladene Plasmamembran des Endothels binden. Zusätzlich besteht für MPO die Möglichkeit über Adhäsionsmoleküle wie β_2 -Integrine (CD11b/CD18) an die Membran von zu phagozytierenden Zellen (neutrophile Granulozyten und Monozyten) anzudocken (Klinke et al. 2011; Lau et al. 2005). Von Interesse ist dieses Erkenntnis insbesondere bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit (KHK), denn Daten zeigen, dass erhöhte MPO-Spiegel bei diesen Patienten einen klinisch relevanten Risikofaktor für ein akutes kardiales Ereignis darstellen (Baldus et al. 2003). Des Weiteren tragen MPO-getriggerte inflammatorische Prozesse maßgeblich zum myokardialen Remodeling nach einer Ischämie bei (Vasilyev et al. 2005; Askari et al. 2003; Frangogiannis et al. 2002; Hansen et al. 1995). In Tiermodellen und Patienten mit einer KHK wurde der störende Einfluss von MPO und seinen inflammatorischen Komponenten auf die Perfusion und die Kammerfunktion des Myokards untersucht (Baldus et al. 2005, Askari et al. 2003). Abgesehen davon können die von MPO gebildeten Oxidationsprodukte dann viele Entzündungsreaktionen beeinflussen und die entstandenen freien Radikale während der Immunantwort antimikrobiell wirksam sein (Hampton und Kettle et al. 1998). Der MPO-Gehalt kann also als Maß für die lokale Akkumulation, Infiltration und Aktivität von neutrophilen Granulozyten im Gewebe bestimmt werden (Kettle und Winterbourn 2004; Schoenberg et al. 1995). Zudem ist bekannt, dass MPO auch Einfluss auf die MAPK-abhängigen Signalkaskaden vor allem in Endothel- und Entzündungszellen (Lau und Baldus 2006; Baldus et al. 2001) sowie die Aktivität einiger Enzyme (Metalloproteinasen) und Biomoleküle hat (Zheng et al. 2004).

1.6 Mit MPO assoziierte Erkrankungen

1.6.1 MPO-Mangel

Kommt es aufgrund eines genetischen Defektes des MPO-Gens zu einem partiellen (Häufigkeit von 1:2000) oder vollständigen (Häufigkeit von 1:4000) MPO-Mangel, so zeigen diese Patienten eine leicht erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen (Nauseef 1988; Kitahara et al. 1981; Parry et al. 1981). Insbesondere *Candida*-Infektionen werden häufiger bei Patienten mit MPO-Mangel, welche gleichzeitig die

Stoffwechselerkrankung Diabestes mellitus besitzen, beschrieben (Aratani 2002a, 1999b; Lanza 1998). Allerdings kommen nicht bei allen Patienten Symptome vor, da zur Abwehr von Mikroorganismen auch weitere MPO-unabhängige Mechanismen beteiligt sind (Winterbourn et al. 2000; Nauseef 1988).

Interessanterweise fördert ein Peroxidase-Defekt der neutrophilen Granulozyten die Entstehung von malignen Tumorzellen (Lanza 1998). Im Vordergrund stehen hierbei andauernder oxidativer Stress und die dabei entstandenen karzinogenen Reaktionsprodukte (vgl. Kapitel 1.6.2).

In Hinsicht auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen scheinen MPO-defiziente Individuen im Vergleich zu Referenzgruppen deutlich im Vorteil zu sein, da sie seltener von kardialen Problemen betroffen sind (Kutter et al. 2000). Jedoch scheint die Rolle von MPO in der Genese der koronaren Herzerkrankung komplexer zu sein, denn wiederum Experimente mit MPO-defizienten Mäusen zeigten, dass diese größere arteriosklerotische Plaques aufweisen als Wildtyp-Mäuse (Brennan und Anderson et al. 2001).

Ein MPO-Mangel kann zum Beispiel mithilfe der Durchflusszytometrie oder von automatisierten zytochemischen Analysen nachgewiesen werden (Kutter 1998; Kitahara et al. 1979).

1.6.2 Gewebeverletzung

Die während des oxidativen Bursts vom MPO-System gebildeten Produkte sind bakterizid und viruzid (Baldus und Eiserich et al. 2001a, 2002b; Klebanoff 1999). In den enzymatischen Reaktionen entstehen, wie bereits oben beschrieben, reaktive Sauerstoffverbindungen, sog. Oxidantien. Zusätzlich zur Reaktion im Phagosom des Leukozyten kann MPO während der Phagozytose in den Extrazellulärraum sezerniert werden und nach Bindung an das vaskuläre Endothel durch Transzytose in den subendothelialen Raum gelangen und dort reaktive Moleküle generieren, die eine schädigende Wirkung auf normales umgebendes Gewebe haben (Klebanoff 2005).

Die Zelle kann unter physiologischen Bedingungen diese reaktionsfreudigen Sauerstoffverbindungen mithilfe von schützenden Antioxidantien neutralisieren. Sind diese Schutzmechanismen der Zelle ausgeschöpft, überwiegen Oxidantien wie HOCl u.a., die zu der Entstehung von oxidativem Stress führen (Hampton 1998). Dieses Ungleichgewicht wird für Zellschädigung und -veränderung und somit für einige

Krankheitszustände verantwortlich gemacht (Till et al. 1991; Ward et al. 1983). Hierbei kommt es vor allem an Gefäßen zu Schäden und zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, die die Entstehung der Arteriosklerose fördern und zur Ausbildung von arteriosklerotischen Plaques führen können (Libby et al. 2002; Gordon und Reidy et al. 1990).

1.6.3 Karzinogenese

Chronische Entzündungen sind mit einem hohen Risiko für maligne Erkrankungen assoziiert. Der Grund dafür ist ein andauernder oxidativer Stress, der durch die Akkumulation von aktivierten Phagozyten verursacht wird und zur Zerstörung der DNA in proliferierenden Zellen, Mutationen und Entstehung von Krebserkrankungen führen kann (Weitzman und Gordon 1990).

Es zeigt sich ein Zusammenhang in den von aktivierten Phagozyten produzierten karzinogenen Oxidantien wie beispielsweise HO^\cdot und H_2O_2 und der Entwicklung von malignen Erkrankungen (Marnett 2000). Außerdem entstehen durch das MPO-System karzinogene Reaktionsprodukte wie 5-Chloruracil und 5-Bromuracil, die mit der DNA interagieren und zu Mutationen oder DNA-Strangbrüchen führen können (Henderson et al. 2003). Ebenfalls fördert MPO die Umwandlung bestimmter Prokarzinogene in ihre krebserzeugende Form (Weitzman et al. 1985; Weitberg et al. 1983). Weiterhin bringt ein hoher Anteil MPO-positiver Granulozyten das Enzym mit der akuten myeloischen Leukämie in Verbindung (Kim et al. 2012; Reynolds 1997). Die genauen Pathomechanismen des prokarzinogenen Effekts sind von großem Nutzen und Interesse für die Tumor-Zellforschung.

1.6.4 Nieren- und Lungenerkrankungen

Oxidativer Stress wird nicht nur mit kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht. Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass MPO zu einer Schädigung der glomerulären Membran führen kann und bei Patienten mit bekannter Glomerulonephritis in höherem Anteil im Plasma vorkommt (Xiao et al. 2002; D'Agati et al. 2002). Ein hoher Anteil von MPO und H_2O_2 konnte ebenso im Plasma von Patienten mit einer idiopathischen Lungenfibrose nachgewiesen werden. Hierfür können genetische Ursachen sowie entzündliche Prozesse verantwortlich gemacht werden. Kommt es nämlich zur Aktivierung von Alveolarmakrophagen in der Lunge,

dann werden neutrophile Granulozyten angelockt, die Entzündungsmediatoren wie z.B. MPO sezernieren und entzündliche Reaktionen induzieren (Green et al. 2004). Die Folgen sind vermehrte Bindegewebsbildung, Verwachsungen und Verklebungen von Alveolargewebe bis hin zur Bildung von Narbengewebe. Viele antiinflammatorische und antifibrotische Medikamente, wie beispielsweise der Endothelinantagonist Bosentan, senken die Myeloperoxidasekonzentration und wirken somit entzündlichen Prozessen entgegen (Gamze et al. 2007; Mutsaers et al. 1998; Park et al. 1997).

1.6.5 Multiple Sklerose

MPO wird mit der chronisch-entzündlichen Erkrankung des Zentralnervensystems Multiple Sklerose in Assoziation gebracht (Nagra et al. 1997). Im Vordergrund dieser Erkrankung steht vor allem die Zerstörung der Myelin- und Markscheiden sowie der Verlust von Neuronen und Axonen (Hemmer et al. 2002; Schirmer et al. 2009). Als Ursache für die Demyelinisierung gelten vor allem die von aktivierten mononukleären Effektorzellen wie Makrophagen und Mikroglia exprimierten reaktiven Sauerstoffradikale (Geurts et al. 2008; Misgeld et al. 2006; Benveniste 1997). So ist in den Gewebemakrophagen in und um die entzündlichen Entmarkungsherde im ZNS MPO vorhanden (Benveniste 1997).

1.6.6 Alzheimer- und Parkinson-Erkrankung

Das Vorkommen von MPO in den Mikroglia des Gehirns und die vermehrte Expression des MPO-Gens in Patienten mit der Alzheimer-Erkrankung könnte aufgrund der benachbarten Lage des MPO-Gens zum Beta-Amyloid-Gen verursacht sein. Das verstärkte Auftreten des Beta-Amyloid-Gens kann durch die vermehrte Expression des MPO-Gens induziert sein (Zappia et al. 2004; Reynolds et al. 1999). In den senilen Plaques von Alzheimer-Patienten kommen nämlich fehlerhaft gefaltete Proteine wie das Beta-Amyloid und das Tau-Protein vermehrt vor (Green et al. 2004). MPO spielt ansonsten auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinson-Erkrankung eine mögliche pathologische Rolle. Denn im Gegensatz zum gesunden Nervengewebe ist auch bei dieser Erkrankung MPO im kranken Hirngewebe zu finden (Teismann 2014; Choi et al. 2005).

1.6.7 MPO und andere chronisch inflammatorische Erkrankungen

Im Übrigen werden auch andere chronisch inflammatorische Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis (Fernandes et al. 2012; Stamp et al. 2012; Hallett et al. 2008; Schiller et al. 2003), chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Jacobson et al. 2005; Kruidenier et al. 2003a, 2003b; Robinson et al. 1997) und systemische Vaskulitis (Xiao et al. 2002; D'Agati et al. 2002; Jennette und Falk 1997) mit MPO in Verbindung gebracht. So wird wie bereits beschrieben das MPO-System nicht nur für die Entstehung von hypochloriger Säure (HOCl) in Entzündungsvorgängen verantwortlich gemacht, sondern spielt darüber hinaus eine mögliche Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen.

1.7 Die Arteriosklerose

Unter Arteriosklerose versteht man die Verengung der elastischen und muskulären Arterien durch Einlagerung von Lipiden in die Innenwände. Die Gefäßwand wird durch diese atherosklerotischen Ansammlungen immer mehr verengt bis sie schließlich ihre Elastizität verliert (Libby und Ridker et al. 2002; Mach und Sauty et al. 1999). Diese herdförmigen atherosklerotischen Ansammlungen werden auch Plaques genannt und bestehen aus intra- und extrazellulären Lipiden, glatten Muskelzellen, Kollagen und Proteoglykanen (Libby und Ridker et al. 2002; Stemme und Faber et al. 1995; Faggiotto und Ross 1984).

Eine Folge ist der akute Infarkt durch einen kompletten Gefäßverschluss aufgrund eines Blutgerinnsels (Thrombus), der durch Plaqueruptur einer solchen arteriosklerotischen Ablagerung entsteht (Libby et al. 2000). Die pathologischen Veränderungen der Arteriosklerose spielen sich zunehmend in der inneren Gefäßwand (Intima) und den inneren Schichten der mittleren Gefäßwand (Media) ab. Die Mechanismen zur Entstehung der Arteriosklerose sind nicht definitiv erforscht, zwei Theorien scheinen jedoch sehr schlüssig.

Die erste Hypothese „*Response to injury*“ besagt, dass eine Verletzung der Gefäßwand die Ursache für die Auslösung der Arteriosklerose sei (Ross 1986a, 1993b, 1999c). Herdförmige Gewebeveränderungen (Plaques) seien die Folge von traumatischen, mechanischen, biochemischen oder biophysikalischen Schädigungen

der Endothelzellschicht, woraufhin eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird und es zu einer Proliferation von Mediamyozyten kommt (Libby et al. 2002a, 2006b). Diese Myozyten wandern durch das dysfunktionale Endothel von der Media in die Intima der Gefäßwand und werden dort zur Proliferation angeregt. Zunehmende Lipidakkumulation in diesen glatten Muskelzellen und in Makrophagen und Lymphozyten, die vermehrt aus dem Blut in die Intima migrieren, führt zur Schaumzell- und später dann zur atheromatösen Plaquebildung (Libby und Ridker et al. 2002; Ross 1999; Stemme und Faber et al. 1995).

Ein Mangel an gelöstem Stickstoffmonoxid (NO) ist die Ursache für die Funktionsstörung des Endothels, welches charakteristisch für die Arteriosklerose ist (Lau et al. 2006). Die Funktion von NO und die Pathomechanismen hierzu wurden bereits im Abschnitt "MPO - Katalytische Mechanismen" (vgl. Kapitel 1.5.3) beschrieben. Ein bedeutender Aspekt ist hierbei die Reduktion der NO-Konzentration durch MPO (Eiserich und Baldus et al. 2002; Abu-Soud und Hazen 2000). Der Nachweis von MPO in Plaques belegt die Beteiligung von MPO an Entzündungsprozessen und folglich auch an kardiovaskulären Ereignissen (Mangge 2014; Baldus et al. 2003; Targonski et al. 2003; Libby und Ridker et al. 2002). Die endotheliale Dysfunktion wird durch die Risikofaktoren der Arteriosklerose, auch als kardiovaskuläre Risikofaktoren bekannt, begünstigt (Schettler und Morl 1978). Zu diesen Risikofaktoren zählen (Völzke et al. 2006; De Backer et al. 2003; Meyer 2000; Keil et al. 1998; Assmann et. al. 1997; Kannel 1990):

- Alter
- männliches Geschlecht
- familiäre Veranlagung
- Hyperlipidämie mit hohen LDL und tiefen HDL Werten
- arterielle Hypertonie
- Diabetes mellitus
- Nikotinabusus
- Bewegungsmangel
- Adipositas und
- Stress

Die Beteiligung von inflammatorischen Prozessen in arteriosklerotischem Geschehen gewinnt immer mehr an Bedeutung und konnte durch die endotheliale Dysfunktion im

Anfangsstadium des arteriosklerotischen Prozesses (Trepels 2006; Ross 1999) und die Aktivierung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in den Koronararterien gezeigt werden (Eiserich et al. 2002; Naruko und Ueda et al. 2002; Baldus et al. 2001; Takeshita und Isshiki et al. 1997; De Servi, Mazzone et al. 1995). Umfangreiche Kohortenstudien wie die Framingham-Studie haben statistische Zusammenhänge zwischen diesen Risikofaktoren sowie Umwelteinflüssen und Herz- und Gefäßerkrankungen gezeigt (Fowler und Christakis 2008; Kannel 1990). Die Veränderung des Lebensstils, präventive Vermeidung der Risikofaktoren sowie geeignete Behandlungsmaßnahmen bei bereits vorhandenen Risikofaktoren führen zu einer zunehmenden Senkung des kardiovaskulären Risikoprofils (Ritchey et al. 2014; Perk et al. 2012; Chhatrwalla et al. 2009; Graham et al. 2007; Gebbers 2007; Kolenda 2005).

Bei der von dem amerikanischen Forscher und Nobelpreisträger Joseph Leonard Goldstein etablierten *Lipoprotein-induced-atherosclerosis*-Hypothese wird davon ausgegangen, dass die Ursache für die Initiierung des arteriosklerotischen Geschehens Makrophagen sind, die chemisch modifiziertes oxLDL aufnehmen und sich dadurch in Schaumzellen („foam cells“) umwandeln (Podrez et al. 1999; Fagiotto und Ross 1984). Hierbei wird die Verletzung von Endothelzellen nur als ein Teilschritt in der komplexen Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen gesehen. Der weitere Verlauf ist in beiden Hypothesen identisch. Bis zur vermehrten Bildung der Schaumzellen ist der Prozess der Arteriosklerose umkehrbar (Feig 2014).

MPO ist, wie bereits beschrieben, mit den Vorgängen, die zur Arteriosklerose führen, verbunden. Es spielt eine bedeutende Rolle in der oxidativen Modifizierung von LDL, dem Verbrauch von Stickstoffmonoxid (NO) und der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion und somit der Entstehung von atheromatösen Plaques (Vita et al. 2004; Galijasevic et al. 2003; Eiserich und Baldus et al. 2002; Libby und Ridker et al. 2002; Stemme und Faber et al. 1995).

1.7.1 Arteriosklerose und kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD)

Die Folgen der Arteriosklerose sind schwerwiegend und machen die meisten Todesfälle in den westlichen Ländern aus (Gesundheitsbericht der WHO für Europa 2012). So kann sich eine Gefäßverengung nicht nur in Form einer stabilen Angina

pectoris (Brennan 2003), einer Claudicatio intermittens oder einer Angina abdominalis äußern (Hirsch 2006), sondern bei Plaqueruptur (Nicholls und Hazen 2005) unter anderen in weitaus gravierenderen Symptomen und Erkrankungen wie der instabilen Angina pectoris (Baldus et al. 2003), dem Myokard- und Mesenterialinfarkt und der Transient ischämischen Attacke (TIA) (Davies 1996; Virmani 2002; Friedman 1974). Die weitere Forschung von prognostischen Biomarkern wie der MPO als Marker für Plaquivulnerabilität (Hazen und Heinecke 1997) bleibt in Anbetracht seiner proarteriosklerotischen Eigenschaften attraktiv und kann im klinischen Alltag helfen, Patienten mit einem hohen Risiko für CVD-Ereignisse zu identifizieren und zur Minimierung von kardiovaskulären Erkrankungen beizutragen (Baldus et al. 2003).

1.8 Biomarker in der Kardiologie

Für die Diagnostik eines Herzinfarktes sind bereits einige Biomarker bekannt.

Die meisten kardialen Biomarker sind Proteine, die im Herzgewebe vorkommen und bei einer Minderperfusion (Ischämie) der Kardiomyozyten in das Blut freigesetzt werden. Darüber hinaus können auch Gene, Genprodukte, Zellen oder Enzyme als Biomarker fungieren und in der klinischen Routine eingesetzt werden.

Diese Indikatoren können Hinweise auf das Risiko geben, eine bestimmte Krankheit zu bekommen oder einen krankhaften Prozess nachzuweisen. Hierfür müssen die kardialen Biomarker bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Dazu gehören nicht nur die Herzspezifität und die schnelle Zugänglichkeit des Biomarkers in ausreichenden Konzentrationen über einen längeren Zeitraum, sondern auch die hohe Sensitivität für kardiologische Erkrankungen.

Folgende herzspezifische Marker sind bisher bekannt (Keller und Zeller et al. 2009; Weber und Hamm 2008; Ridker und Brown et al. 2004; Hamm 2002):

- Glycogenphosphorylase BB (GPBB)
- Myoglobin
- Fatty-acid-binding protein (FABP)
- Ischemia modified albumin (IMA)
- Troponin (T,I)
- Creatinkinase-MB (CK/ CK-MB)

- Lactatdehydrogenase (LDH)
- Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

Bevor es während eines akuten Koronarsyndroms zu einer Myokardzellnekrose kommen kann, gehen bestimmte (durch die Myokardischämie ausgelöste) pathophysiologische Schritte voraus. Zu diesen frühzeitigen Mechanismen gehören die Aktivierung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und die Ausschüttung von Enzymen wie MPO aus den Granula (Nauseeff 1998). Ein erhöhter MPO-Plasmaspiegel zeigt eine Granulozytenaktivierung an (Johansson et al. 1997).

Zahlreiche Studien belegen, dass bei Angina pectoris Patienten das Auftreten von hohen MPO-Blutplasmakonzentrationen einen deutlichen Hinweis auf ein künftiges kardiales Ereignis liefert (Nicholls 2011; Brennan 2003). Ein markanter MPO-Anstieg war sowohl in KHK-Patienten (Karakas et al. 2011; Samsamshariat et al. 2011; Pawlus et al. 2010; Ndrepepa 2008; Zhang et al. 2001) als auch in Patienten mit einem ACS zu ermitteln (Liu et al. 2012; Samsamshariat et al. 2011; Sawicki et al. 2011; Marshall et al. 2010; Pawlus et al. 2010; Ndrepepa 2008).

So können mit der MPO-Bestimmung in den Frühstadien eines akuten Myokardinfarktes Patienten identifiziert werden, die noch keine Myokardnekrose erlitten haben. Wenn sich GFP-MPO im Mausmodell in Zukunft etabliert, könnten sie vor allem durch ihre Beteiligung in arteriosklerotischen Prozessen als prognostischer Biomarker für CVD in Frage kommen und möglicherweise Patienten, die gefährdet sind kardiovaskuläre Erkrankungen zu erleiden, vorzeitig detektieren.

1.9 Die Koronare Herzerkrankung

Zu den Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören auch die ischämischen Herzkrankheiten wie z. B. die koronare Herzkrankheit und der Herzinfarkt. Laut dem Gesundheitsbericht der WHO für 2012 machen sie die Haupttodesursache in den westlichen Ländern aus. Die Koronare Herzkrankheit ist eine chronische Erkrankung der Herzgefäße, vorwiegend der Koronararterien, die durch Gefäßablagerungen verengen und schlecht durchblutet werden (Klebanoff 2005). Die Durchblutungsstörung ist meistens durch Arteriosklerose bedingt und führt zu einer verminderten Sauerstoffversorgung des Herzmuskels (Hansson 2006). Es besteht

somit ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Herzmuskel (Wagner 1991). Je nachdem wie viele und welche Herzgefäße von Verengungen betroffen sind, spricht man auch von einer Ein-, Zwei- oder Dreifäßerkrankung. Diese Systemerkrankung der Arterien hat nach Angaben des Statistischen Bundesamts 2013 eine zunehmende Prävalenz und Inzidenz in den höheren Altersklassen.

Die KHK kann sich durch unterschiedliche Symptome wie Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, Herzinfarkt oder plötzlicher Herztod äußern (Erdmann 2000). Ein Kardinalsymptom für die Koronarstenose ist die "Brustenge" oder Angina pectoris (Erdmann 2000), die in eine stabile und instabile Form eingeteilt wird. Demnach wird jede erstmalig („recent onset angina“) und in Ruhe vorkommende („Angina nocturna“) sowie jede an Schweregrad zunehmende Angina pectoris („Crescendoangina“) als eine instabile Angina pectoris bezeichnet. Für das therapeutische Vorgehen hat diese Einteilung eine wichtige Bedeutung. Die Risikofaktoren für die Erkrankung der Herzkranzgefäße sind bereits in dem Abschnitt "Arteriosklerose" (vgl. Kapitel 1.7) aufgeführt und spielen eine entscheidende Rolle für das Erkrankungsrisiko und die Prognose (Meyer 2000).

Um die Diagnose einer koronaren Herzerkrankung stellen zu können, sind neben den anamnestischen Informationen, der körperlichen Untersuchung sowie dem 12-Kanal-EKG auch Laborparameter wichtig. So können in Blutanalysen etablierte Marker wie Troponin T und I, Kreatinkinase-MB und Myoglobin (Galvani und Ferrini et al. 2001) sowie das hochsensitive CRP (hsCRP) (Toss und Lindahl et al. 1997) weitere Anhaltspunkte dafür liefern. Einen Hinweis auf einen Myokardinfarkt geben ebenso kardiale Nekroseparameter wie die hochsensitiven Troponine (Thygesen und Alpert et al. 2012). Immer mehr Beweise wurden für die ursächliche Beteiligung von inflammatorischen Prozessen im Rahmen der KHK geliefert. Dazu gehört z. B. der Anstieg von hsCRP (Heslop et al. 2010; Libby und Ridker et al. 2002; Biasucci und Liuzzo et al. 1999) und von freien Radikalen während des Entzündungsgeschehens und innerhalb von ischämischen Prozessen.

1.10 Die Rolle von MPO im kardiovaskulären System

MPO spielt nicht nur durch ihre Funktion im NO Stoffwechsel, sondern auch durch die Oxygenierung von LDL zu der schädlichen Form oxLDL in der Arterienwand eine wesentliche Rolle in der Atherogenese beim Menschen (Nikpoor et al. 2001; Podrez et al. 1999). Durch die oxidativen Veränderungen von LDL werden seine proatherogenen Eigenschaften gefördert (Wang et al. 2007). Ebenso beeinträchtigt MPO das High Density Lipoprotein (HDL) bei seiner Hauptaufgabe - dem Abtransport von überschüssigem Cholesterin aus den peripheren Geweben zurück zur Leber. Dabei werden Apolipoproteine A-I (Apo A-I), die lipidfreien Vorläufermoleküle des HDL, durch Anreicherung von Chlor- und Nitrotyrosin durch MPO modifiziert und verlieren ihre atheroprotektiven Eigenschaften und fördern proinflammatorische Effekte (Pennathur und Bergt et al. 2004; Nicholls und Zheng et al. 2004).

Des Weiteren konnten MPO und seine Reaktionsprodukte in arteriosklerotischem Material nachgewiesen werden (Hazen 2004). Die Arbeitsgruppe von Zhang stellte 2001 in einer Fall-Kontroll-Studie mit 158 KHK-Patienten und 175 gesunden Probanden in der Kontrollgruppe fest, dass die KHK-Patienten signifikant erhöhte MPO-Plasmakonzentrationen aufwiesen. Der Abbildung 5 ist zu entnehmen, dass erhöhte Leukozytenzahlen und MPO-Blutwerte in Zusammenhang mit atherosklerotischen Prozessen stehen (Zhang et al. 2001).

Auch weitere Studien mit einem größeren Patientenkollektiv haben gezeigt, dass ein MPO-Gradient mit kardiovaskulären Erkrankungen korreliert (Meuwese et al. 2007). Erhöhte MPO-Konzentrationen weisen auf ein signifikant erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen wie die KHK und Patienten mit einem Myokardinfarkt zeigten eine schlechtere Prognose im Fünf-Jahres-Verlauf (Mocatta und Pilbrow et al. 2007; Baldus und Rudolph et al. 2006; Baldus et al. 2003; Baldus und Heeschen et al. 2003). Es konnte in ähnlichen epidemiologischen Studien ein positiver Zusammenhang zwischen der Ausdehnung und Relevanz der Gefäßstenosen und den MPO-Werten beobachtet werden (Duzguncinar und Yavuz et al. 2008).

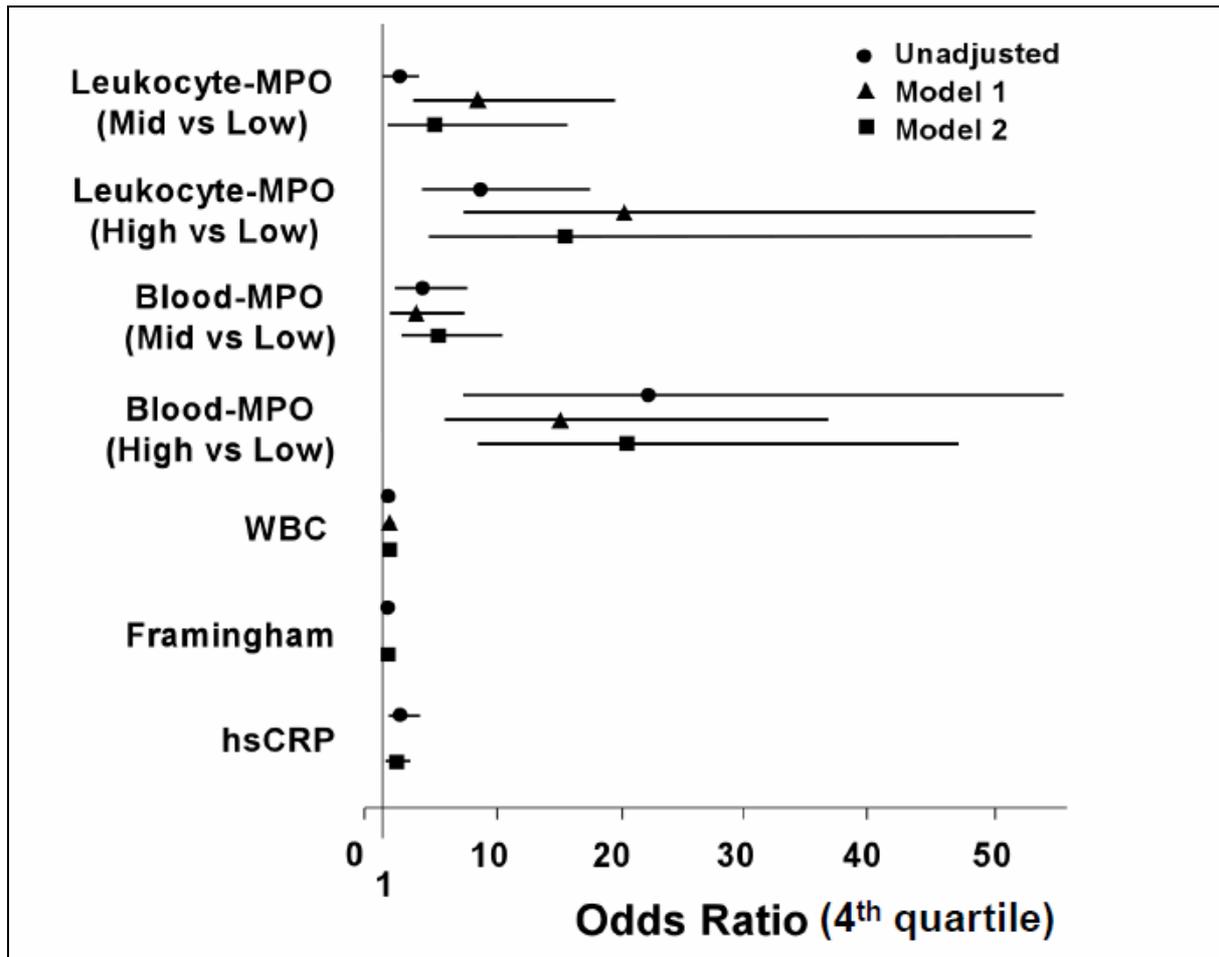


Abb. 5: Darstellung der Odds Ratios für Leukozyten-MPO und Blut-MPO, WBC (white blood cells) und CRP-Spiegel vor (unbereinigt) und nach (Modelle 1 und 2) der Anpassung mit traditionellen Risikofaktoren und FGR (Framingham Risk Score). Leukozyten- und Blut-MPO-Werte sind nicht nur mit einem signifikant erhöhten Risiko für CAD assoziiert ($p < 0,001$), das Risiko für CAD ist im Vergleich zu Patienten mit erhöhten WBC- und CRP-Werten fast 10-fach höher. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass MPO offensichtlich mit der Prävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen korreliert, sich somit zu einem leistungsstarken entzündlichen Marker für Herz-Kreislaufkrankungen entwickelt und weitere Studien erforderlich macht. Quelle: Zhang et al. *JAMA*, 286:2136-42, 2001.

Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe von Stanley L. Hazen zeigen, dass Menschen mit einem genetisch bedingten MPO-Mangel ein wesentlich niedrigeres Risiko für die koronare Herzkrankheit, den Herzinfarkt und -tod beherbergen. Tierversuche mit MPO-*knock-out* Mäusen verdeutlichen jedoch Gegenteiliges. Diese sind nämlich aus bisher unerklärlichen Gründen eher anfälliger dafür arteriosklerotische Plaques auszubilden (Brennan und Anderson et al. 2001). Die Rolle von MPO im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen wird jedoch nicht ausgeschlossen und bleibt weiterhin komplex. Zukünftige Experimente sollen bei der Entwicklung von

vielfersprechenden therapeutischen Maßnahmen beim ACS helfen. MPO hat sich in vielen Studien als Vorhersageparameter für kardiovaskuläre Ereignisse in einem Zeitraum von einem Monat bis einem halben Jahr bei Patienten mit akuter Angina pectoris erwiesen (Baldus und Heeschen et al. 2003; Brennan und Penn et al. 2003). Dieser zeitliche Verlauf und die Assoziation mit den Folgekomplikationen der KHK wie „plötzlicher Herztod oder Myokardinfarkt“ werden in Abbildung 6 graphisch veranschaulicht. Es wird dargestellt, dass erhöhte MPO-Plasmaspiegel einen hohen Vorhersagewert für die Mortalität und den tödlichen Myokardinfarkt in einem Zeitraum nach Vorstellung des Patienten in der Klinik (innerhalb von 24-75 Stunden) und in den nächsten sechs Monaten der Nachbehandlung zeigen. Je höher der gemessene Serumspiegel von MPO, desto höher ist somit das Risiko für ein solches künftiges kardiales Ereignis (Brennan und Penn et al. 2003).

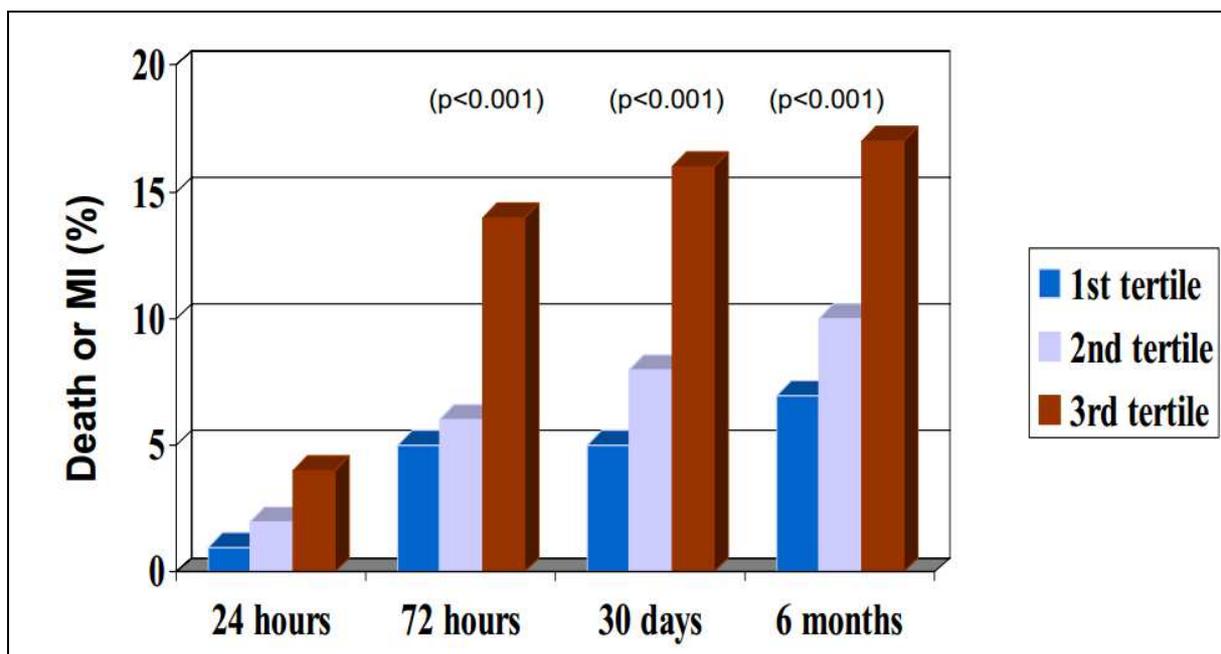


Abb. 6: MPO-Serumspiegel und kardiales Risiko. Die Patienten sind nach ihrem gemessenen MPO-Serumspiegel in drei Gruppen eingeteilt. Der Serumspiegel von MPO ist wie folgt: ≤ 222 g/L (1. Tertile), 223 bis 350g/L (2. Tertile) und > 350 g/L (3. Tertile). Für die ersten 24-Stunden zeigen die kombinierten Endpunkte "Mortalität" und "tödlicher Myokardinfarkt" einen Trend zwischen den MPO-Tertilen ($p = 0,17$). Für die nachfolgenden Verlaufszeitpunkte (72 Stunden, 30 Tage und 6 Monate) zeigten die Ereignisraten signifikante Unterschiede zwischen den MPO-Tertilen ($p < 0,001$). Das kardiale Risiko für ein "tödliches Ereignis" korreliert mit der MPO-Plasmakonzentration. Quelle: Baldus et al., *Circulation*, 108: 1440-5, 2003.

Weiterhin hat MPO auch eine prognostische Bedeutung im Hinblick auf ventrikuläres Remodelling und die LV-Funktion nach einem Myokardinfarkt. Klinische Studien von

Rudolph et al. aus dem Jahre 2007 zeigen eine Korrelation zwischen signifikant erhöhten MPO-Plasmaspiegeln und eingeschränkter LV-Funktion nach einem ischämischen Ereignis.

Zu dem wird MPO mit chronischer Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht. Eine aktuelle Studie zeigt, dass sich in einer Gruppe von 102 Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz im Gegensatz zu der Vergleichsgruppe von 105 gesunden Probanden signifikant erhöhte MPO-Plasmaspiegel nachweisen ließen (Tang 2006). Die Ergebnisse weiterer Untersuchungen belegen, dass erhöhte MPO-Plasmaspiegel mit der Konzentration von anderen inflammatorischen Markern, wie der von B-natriuretischem Peptid (BNP) (Morrow et al. 2008; Mocatta et al. 2007; Khan et al. 2007) und C-reaktivem Protein (CRP) (Heslop et al. 2010) korrelieren.

Somit erfüllt MPO eine wichtige Funktion in Entzündungsprozessen und ist ein pro-arteriosklerotischer und -inflammatorischer Mediator, der in Zukunft zur schnellen und einfachen Diagnosesicherung und Risikostratifizierung bei Patienten mit kardialen Erkrankungen führen könnte. Im Hinblick auf diese vorgestellten Erkenntnisse ergibt sich ein weiterer Forschungsbedarf um die Rolle von MPO im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen zu eruieren.

2 Methodisches Vorgehen

Im Folgenden sind die bei diesen Experimenten verwendeten allgemeinen Substanzen und Puffer sowie Hersteller und Konzentrationen so aufgeführt, dass mit diesen Angaben die Versuche wiederholt werden könnten. Veränderungen und spezielle Pufferlösungen werden hier näher beschrieben.

2.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

Tab. 1: TBE Rezepte, Agarosegel und DNA Marker.

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Hersteller
Rezept TBE	
1x TBE	100 ml 10x TBE + 900 ml H ₂ O Mischen.
10X TBE	800 ml millipore H ₂ O + 9,375 g disodium EDTA (zuerst auflösen) + 108 g Trizma Base + 55g Boric Acid Nach dem Auflösen den pH-Wert bei 8,3 einstellen, anschließend Zugabe von millipore H ₂ O bis 1l erreicht ist. Mischen.
Für Agarosegele	
1 % Agarosegel	1 g Agarose + 100 ml 1x TBE Buffer + 6 µl Ethidiumbromid (mg/ml) Die Agarose wird in dem hergestellten 1x TBE in der Mikrowelle aufgekocht, erst nachdem die Lösung auf ca. 50 °C abgekühlt ist, wird das Ethidiumbromid hinzugegeben

	und das Gel kann dann in die vorbereitete Gelkammer (Gelkamm einsetzen) gegossen werden.
DNA Marker	100 bp DNA ladder (New England Biolabs®) Bestellnummer: N3231L 1 kb DNA ladder (New England Biolabs®) Bestellnummer: N3232L

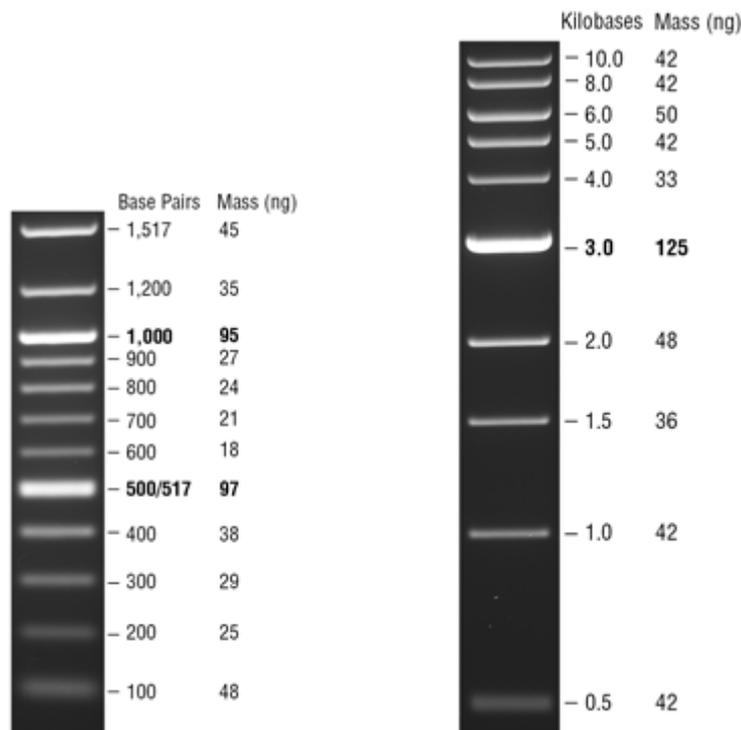


Abb. 7: 100 bp und 1 kb DNA Marker. Die Banden der beiden DNA Marker dienen als Referenzmarkierungen/Referenzgrößen, anhand derer die Länge der Verdau-Banden abgeschätzt werden kann. Quelle: New England Biolabs®.

2.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction) ist eine im Jahre 1983 von dem amerikanischen Chemiker Kary Mullis etablierte Methode zur gezielten in vitro Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen. Außer der hitzestabilen DNA-Polymerasen, die z. B. aus der Archaea-Art *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA Polymerase) aus heißen Quellen gewonnen wird, werden für das Syntheseverfahren die zu kopierenden DNA-Moleküle, Primer und Nukleotide benötigt sowie eine Pufferlösung, in der die Polymerase arbeitet. Die

Amplifikation der DNA-Stücke in einem Thermocycler (programmierbarer Heizblock) beruht auf einer aus drei immer wiederkehrenden Schritten bestehenden Kettenreaktion, nämlich der Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Die einzelnen Schritte hierzu sind in der folgenden Tabelle 2 wiedergegeben.

Durch die Wiederholung eines PCR-Zyklus wird die DNA somit verdoppelt. Mithilfe der Methode der PCR können unter anderen bakterielle und virale Infektionskrankheiten und genetische Erberkrankungen nachgewiesen sowie molekularbiologische Stammbäume aufgestellt werden. Die PCR Technik bietet folglich eine schnelle und unkomplizierte Möglichkeit zur Replikation von DNA-Stücken.

Tab. 2: PCR und Primer.

Für PCR	
20 µl reaction Phusion Pol PCR + DMSO	1 µl 10 µM <i>Not</i> I – GFP + GG (0,5 µM) Primer 1 µl 10 µM GFP – <i>Not</i> I (0,5 µM) Primer 0,25 µl phusion polymerase (F-530L; New England Biolabs®, 2 U/µl) 4 µl 5x Phusion HF buffer 0,4 µl 10 mM dNTPs (jedes 200 µM) 1 µl (= 5 %) DMSO 0,5 µl (0,9 ng) DNA Zugabe von ddH ₂ O bis 20 µl erreicht ist. Zugabe von 5 µl 6x Blue Loading Dye zu Phusion Pol PCR + DMSO nach PCR.
DNA für PCR GFP-DNA	Humanized <i>Ptilosarcus</i> GFP, NanoLight™ Technology, Cat#108 pCMV-h-Pt.GFP (vgl. Abb. 8)
Primer	
für Phusion Pol PCR + DMSO: 1.) <i>Not</i> I – GFP – <i>Not</i> I: 725 nt <i>Not</i> I – GFP + GG	5`-ggg ggc gcggccgc gg atg aac cgc aac gtg ctg aag aac-3` 40nt

	anschließend Zugabe von millipore H ₂ O bis 1l erreicht ist. Dann die Zubereitung von 300 – 400 ml Aliquoten in 500 ml Flaschen vornehmen und autoklavieren.
Ampicillin – A9393	+ 500 µl 50 mg/ml Ampicilin (= 50 µg/ml Endkonzentration) (A9393, Sigma Aldrich) (stock: 50 mg/ml)
LB-Amp agar plates	<p>150 ml Millipore- H₂O + 2,5 g Peptone + 1,25 g Yeast Extract + 2,5 g NaCl + 3,75 g bacto- agar pH-Einstellung im Bereich zwischen 7,0 und 7,5 (mit NaOH) und anschließend Zugabe von millipore H₂O in einer 500 ml Flasche bis 250 ml erreicht ist. Autoklavieren. Auf ca. 55 °C kühlen. Platten gießen unter der (1 l = ca. 80 Platten; 500 ml = ca. 40 Platten; 250 ml = ca. 20 Platten). Platten unter der Sicherheitswerkbank für 1 Stunde trocknen und über Nacht bei Raumtemperatur (23 °C) stehen lassen. Platten bei 4 °C aufbewahren. Platten sind für 2 Wochen bei 2-8 °C haltbar.</p>

2.1.2 *Escherichia coli*

E. coli ist ein gram-negatives Bakterium aus der Familie der Enterobakterien, das von dem Mediziner Theodor Escherich erstmals 1885 beschrieben wurde (Brock et al. 1994). Das Bakterium ist stäbchenförmig, begeißelt und kommt im Darm von Mensch und Säugetieren vor (Chen und Frankel 2005). Es kann sich unter aeroben

und anaeroben Bedingungen vermehren und pathogen oder harmlos sein. Die Übertragung der *E. coli* Bakterien erfolgt fäkal-oral (Levine und Edelman 1984).

Es gibt eine Reihe von *E. coli* Stämmen, die beim Menschen, vor allem in Entwicklungsländern, gastrointestinale Infektionen hervorrufen können (Hahn et al. 2008). Die darmpathogene *E. coli* dient deshalb auch als Indikatorkeim für fäkale Kontamination in Trinkwasser und Lebensmitteln. Ebenso können *E. coli* Bakterien auch der Auslöser für extraintestinale Erkrankungen wie zum Beispiel Harnwegsinfekten, Sepsen, Peritonitiden und Meningitiden sein (Nataro und Kaper 1998).

E. coli ist nicht zuletzt wegen seiner einfachen Kultivierung, aber auch wegen der gut bekannten genetischen Ausstattung beliebt in der Biotechnologie. In den folgenden Versuchen fungiert *E. coli* als Synthesemaschine für die Replikation von rekombinantem GFP-MPO-Plasmid.

Tab. 4: *E. coli* Bakterien, Verdaus und DNA-Aufreinigung sowie Ligation.

Bakterienstamm	<i>Escherichia coli</i> , MAX Efficiency® DH5α™ Competent Cells, Firma: Invitrogen Corporation. Carlsbad, CA.
<i>E. coli</i> Transformation (DH5a)	LB-Amp Platten werden für 1 Stunde bei 37 °C vorgewärmt. <i>E. coli</i> Zellen immer auf Eis aufbewahren. Zugabe von 50 pg DNA zu 100 µl Zellen. Für 15 Minuten auf Eis inkubieren. Zellen für 5 Minuten bei 37 °C einen Hitzeshock verpassen. + 1 ml LB Für eine Stunde bei 37 °C inkubieren. Für 3 Minuten bei 3600rpm abzentrifugieren. Verwerfen des Überschusses. Resuspendieren der Zellen im restlichen LB. Rest (+100 µl LB) auf vorgewärmte Lb-Amp Platten ausstreichen. Bei 37 °C inkubieren.
Preparative digest (Präparativer	0,5 µl BSA

Verdau/Vorverdau)	<p>+ 5 µl restriction buffer + 0,5 µl (20 U/µl)- 2 µl (5 U/µl) Restriktionsenzyme = 10 U + 25 µl PCR Produkt Zugabe von millipore H₂O bis 50 µl erreicht ist. Für 2 Stunden bei 37 °C inkubieren.</p>
Digest midiprep DNA (Verdau midiprep DNA)	<p>4 µl sterile milipore H₂O + 0,1 µl 100x BSA (10 mg/ml) + 0,3 µl Restriktionsenzym (10 U/µl; = ca. 3 U) + 1 µl 10x Restriktionspuffer + 4 µl midiprep DNA</p> <p>Ca. 2 Stunden bei 37 °C inkubieren. Anschließend 10 µl des Verdau mit 2 µl 6x Ladepuffer mischen und auf dem Gel auftragen, Gel an die Spannungsquelle anschließen und ca. 1 Stunde bei 120 V laufen lassen (DNA-Proben laufen von Minus nach Plus).</p>
Digest miniprep DNA (Verdau miniprep DNA)	<p>6,5 µl sterile milipore H₂O + 0,1 µl 100x BSA (10 mg/ml) + 0,3 µl Restriktionsenzym (10 U/µl; = ca. 3 U) + 1 µl 10x Restriktionspuffer Volumen pro Verdau-Ansatz: 8 µl + 2 µl miniprep DNA Dann ca. 30 Minuten bei 37 °C inkubieren.</p> <p>Anschließend 10 µl des Verdau mit 2 µl 6x Ladepuffer mischen und auf dem Gel auftragen, Gel an die Spannungsquelle anschließen und ca. 1 Stunde bei 120 V laufen lassen (DNA-Proben laufen von Minus nach Plus).</p>
DNA Aufreinigung	<p>PCR clean up nach Macherey Nagel, NucleoSpin® Extract II Plasmid DNA Aufreinigung (Mini, Midi) nach</p>

	Macherey Nagel
DNA Fällung mit EtOH (für die Sequenzierung)	<p>200 µl DNA</p> <p>+ 2 µl 3M NaOAc pH 5,5</p> <p>+ 400 µl 100% EtOH (-20 °C), mischen durch Umkippen bis DNA-Klümpchen zu sehen ist. Bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 11000rpm zentrifugieren und den Überstand verwerfen.</p> <p>+ 500 µl 70 % EtOH, gut durchmischen</p> <p>Rückstand lufttrocknen (1 Stunde, Raumtemperatur)</p> <p>+ 100 µl ddH₂O</p> <p>DNA bei 4 °C aufbewahren.</p>
Midi prep PC100 nucleobond	<p>25 ml LB-Amp (100 µg/ml) + Bakterienkolonie über Nacht bei 37 °C und Schütteln kultivieren. Für 15 Min bei 4 °C und 4000rpm zentrifugieren. Nach dem Nucleobond PC100 Protokoll vorgehen.</p> <p>Anschließend DNA mit 5 ml Puffer N5 eluieren und jeweils 1 ml Eluat auf 2 ml Reaktionsgefäße verteilen.</p> <p>Zugabe von 0,7 ml Isopropanol und mischen, nicht vortexen.</p> <p>Die präzipitierte DNA wird dann durch Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 15000rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wird abgenommen und verworfen.</p> <p>Zugabe von 1 ml 70 % Ethanol und durch Zentrifugation (15000 rpm, 10 min, RT) wird die DNA sedimentiert. Rückstand trocknen (min. 30 Minuten lufttrocknen).</p> <p>Zu dem getrockneten Rückstand in jedem 2 ml Reaktionsgefäß 50 µl ddH₂O zugeben und über</p>

	<p>Nacht bei 4 °C im Kühlschrank stellen. Am nächsten Tag alle Reaktionsgefäße vortexen und den Inhalt von diesen jeweils in einem einzigen Reaktionsgefäß überführen, so dass sich im letzten Reaktionsgefäß die gesamte präzipitierte DNA sammelt.</p> <p>Dann folgt die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der dsDNA mittels Photometer:</p> <p>Photometer anschalten, Methode "DNA" wählen. DNA-Lösung (aus Präparation) 1:10 mit ddH₂O verdünnen (6 µl DNA und 54 µl apuwa water, Endvolumen 60 µl)</p> <p>BLANK = 60 µl ddH₂O</p> <p>SAMPLE = 6 µl DNA und 54 µl ddH₂O</p> <p>Verdünnung in Quarzküvetten überführen</p> <p>Bei 260 bzw. 280 nm messen (gegen ddH₂O als Leerwert). Formel zur Berechnung der Reinheit:</p> <p style="text-align: center;">Reinheit = A₂₆₀/ A₂₈₀</p> <p style="text-align: center;">mit</p> <p>A₂₆₀ = gemessene Absorption bei 260 nm</p> <p>A₂₈₀ = gemessene Absorption bei 280 nm</p>
Photometer	Eppendorf® BioPhotometer™, 62739
Restriktionsendonukleasen (<i>NotI</i> , <i>SpeI</i> , <i>XbaI</i> , <i>PstI</i> , <i>HindIII</i> , <i>KpnI</i> , <i>SacI</i>)	New England Biolabs®, Frankfurt (Main)
Ligation von DNA-Fragmenten	<p>3 µl vector DNA</p> <p>+ 9 µl Fragment-DNA</p> <p>+ 3 µl 10x T4 DNA Ligationspuffer (New England Biolabs®)</p> <p>+ 0,5 µl T4-DNA-Ligase</p> <p>Zugabe von steriler millipore-H₂O bis 30 µl erreicht ist.</p>

	Anschließend die <i>E. coli</i> Transformation (DH5a) von 15 µl Ligationsansatz durchführen und + 100 µl und den Rest auf vorgewärmte LB-Amp Platten ausstreichen.
--	--

2.1.3 CHO Zellen

Ovarialzellen aus chinesischen Hamstern sind neben *E. coli* wichtige Mikroorganismen in der Biotechnologie. Sie wurden 1957 von dem Biowissenschaftler Theodore T. Puck aus den Eierstöcken des chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus* entdeckt und kultiviert (Puck et al. 1958). Heute finden sie Verwendung in der Herstellung von rekombinanten Proteinen, Antikörpern und Arzneimitteln (Jayapal et al. 2007).

CHO-Zellen können sich unbegrenzt vermehren und haben eine permanente Lebensdauer, weshalb man von einer immortalisierten Zelllinie spricht. Der Temperaturbereich von ca. 37 °C und ein pH-Wert des Kulturmediums von 7 entsprechen den optimalen Bedingungen für ein ideales Wachstum der Zellen (Gottesman et. al. 1985). Unter diesen Kulturbedingungen wurden die MPO-Marker-Konstrukte in immortalisierte CHO-Zellen transfiziert um rekombinantes GFP-MPO Protein zu exprimieren. Dabei ist stets auf ein steriles Arbeiten unter einer Sterilbank zu achten, um Kontaminationen zu vermeiden.

Tab. 5: CHO-Zellen.

Zelllinie	CHO-K1 „Chinese hamster ovary“-Zellen, ATCC® Nr.: CCL-61™
Medium für CHO-Zellen.	500 ml F12 medium + 50 ml 10 % FBS + 1 ml Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin) + 5 ml 2 mM L-Glutamine Damit die Zellen gute Lebensbedingungen und ausreichend Nährstoffe für ein ungestörtes Wachstum zur Verfügung haben, muss alle 2-3 Tage das Kulturmedium gewechselt werden.
Auftauen der CHO-Zellen	Vorwärmen des Mediums für 30 Minuten im

	<p>Wasserbad (37 °C).</p> <p>Zugabe von 15 ml des vorgewärmten Mediums zu einer T 75 Flasche.</p> <p>Die gefrorenen Zellen auf flüssigem Stickstoff bereitstellen.</p> <p>Dann die Zellen im Wasserbad auftauen (so schnell wie möglich) und zu der T 75 Flasche geben.</p> <p>Die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank wachsen lassen (die Zellen für 24 Stunden nicht bewegen um das Anheften zu ermöglichen).</p>
Brutschrank	Binder GmbH, Deutschland
Füttern der CHO-Zellen	Medium alle 2-3 Tage wechseln. Zur Vermeidung von Kontaminationen wird unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank gearbeitet.
CHO-Zellen Subkultivierung	<p>Subkultivierungsverhältnis von 1:4 einhalten.</p> <p>Vorwärmen des Mediums und PBS im Wasserbad (37 °C) und der Trypsinlösung bei Raumtemperatur (Gefahr von Inaktivierung durch Eigenverdau) für ca. 30 Minuten.</p> <p>2 ml erwärmte 0,25 % Trypsinlösung nach sofortigem Abziehen des alten Mediums und einer mindestens einmaligen Waschung der Zellen mit 10 ml PBS auf die Zellen in der T 75 Flasche geben.</p> <p>Die Flasche verschließen und kurz schwenken, um die Verteilung der Trypsinlösung zu gewährleisten und für 10 Minuten im Brutschrank bei 37 °C stellen.</p> <p>Danach leicht gegen die Flasche klopfen damit sich die Zellen vom Flaschenboden lösen und</p>

	<p>zu der Trypsinlösung und dem leichten Trypsinfilm auf dem Monolayer 8 ml frisches Medium zugeben.</p> <p>Daraufhin durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vorhandene Zellklumpen suspendieren.</p> <p>Dann 2 ml davon entnehmen und in eine neue T 75 Flasche mit 13 ml frischem Medium geben (Subkultivierungsverhältnis 1:4).</p> <p>Diese neue T 75 Flasche bei 37 °C im Brustschrank inkubieren und für 24 Stunden nicht mehr bewegen.</p> <p>Weitere 6 ml Zellen in eine T 75 Flasche mit 12 ml Medium geben und kurz mischen (Gesamtvolumen: 18 ml).</p> <p>Nun von den 18 ml 9 ml entnehmen und in eine T 75 Flasche mit 45 ml frischem Medium zugeben (Gesamtvolumen: 54 ml). Jeweils 3 ml davon pro Well von 3x6-Well Microtiter-Platten verteilen.</p> <p>Anschließend noch 0,5 ml Zellen auf jeweils 8 kleine Petrischalen mit jeweils 4,5 ml frischem Medium verteilen.</p>
--	---

Tab. 6: Transfektion.

Transfektionsmethoden	<ul style="list-style-type: none"> • Nanofectamin PAA Laboratories GmbH, Pasching • ProFection Mammalian Transfection System Technical Manual, Promega • Lipocetamin, Invitrogen™
Nanofectamin-PAA	<p>Einen Tag vor dem Transfektionsversuch werden CHO-Zellen in eine T 75 Flasche, 2x6-Well Platten und 3x2 Kammer-Objektträger ausgesät. Am nächsten Tag erfolgt bei 90-100%</p>

Konfluenz der Zellen die Transfektion wie folgt:
Die DNA und das Nanofektamin sollten auf Raumtemperatur gebracht und die Zellen einmalig mit serumfreiem Medium gewaschen werden (um das serum-haltige Medium zu entfernen).

Die Transfektion erfolgt in den Kammer-Objektträgern mit jeweils 2 und 4 µg DNA nach folgendem Pipettierschema:

1. Reaktionsgefäß	2. Reaktionsgefäß
1.) 100 µl SF-Medium, ohne DNA	100 µl SF-Medium + 7 µl Nanofektamin Transfektionsreagenz
2.) 100 µl SF-Medium + 2 µg hMPO	100 µl SF-Medium + 7 µl Nanofektamin Transfektionsreagenz
3.) 100 µl SF-Medium + 4 µg hMPO	100 µl SF-Medium + 7 µl Nanofektamin Transfektionsreagenz
4.) 100 µl SF-Medium + 2 µg hMPO-GFP	100 µl SF-Medium + 7 µl Nanofektamin Transfektionsreagenz
5.) 100 µl SF-Medium + 4 µg hMPO-GFP	100 µl SF-Medium + 7 µl Nanofektamin Transfektionsreagenz
6.) 100 µl SF-Medium + 4 µg GFP	100 µl SF-Medium + 7 µl Nanofektamin Transfektionsreagenz

Die Lösungen in den Reaktionsgefäßen werden jeweils durch ein langsames einmaliges Pipettieren gemischt.

Die Lösung mit dem Transfektionsreagenz

	<p>Nanofektamin wird zur DNS-Lösung zugegeben, nicht geschüttelt, und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.</p> <p>Das Medium der Zellen in den 6-Well-Platten wird abgesaugt, die Transfektionslösung nach Inkubation tropfenweise auf die Zellen mit frischem Vollmedium verteilt und für 24 bis 72 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.</p> <p>Am folgenden Tag wird beobachtet, ob die mit hMPO-GFP transfizierten Zellen unter dem inversen Fluoreszenzmikroskop leuchten.</p> <p>Für Expressionsanalysen werden die Zellen geerntet und dem Protokoll für Western Blot-Analysen entsprechend aufgearbeitet.</p>
Inverses Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems, 94961

Tab. 7: Proteinbiochemische Methoden und SDS-PAGE Gele.

Proteinbiochemische Methoden	
Zell-Lyse-Puffer für Western-Blot (10X) #9803, Cell Signaling Technology, Inc.	1 ml Zell-Lyse-Puffer (- 21 °C) auftauen und 9 ml steriles ddH ₂ O zugeben
Proteinisolation	<p>Transfizierte Zellen werden mit 2 ml kaltem PBS gewaschen.</p> <p>Dann wird jeweils 400 µl 1x Zell Lyse-Puffer in die 6-Well-Platten gegeben.</p> <p>Die Zellen werden für 5 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend Zellen mittels eines speziellen Zellenabstreifers (25 cm cell scraper, Sarstedt, Inc., USA) von der Unterlage der 6-Well-Platten abkratzen.</p> <p>Das so erhaltene Zelllysate wird in Eppendorfgefäße überführt und auf Eis mit 40 % für 12 sec. in einem Schall-Homogenisator (Sonicator) belassen. Die Zellmembranen</p>

	<p>werden hierbei zerstört.</p> <p>Zuletzt wird das Lysat bei 4 °C für 10 Minuten und 14000 g zentrifugiert.</p> <p>Teilüberstand wird für BCA Protein Assay Kit abgenommen.</p> <p>Den Rest aus allen Eppendorfgefäßen entnehmen + 80 µl 4x Laemmli DTT Probenpuffer. Eppendorfgefäße für 5 min bei 95 °C erwärmen und anschließend bei -20 °C wegfrieren.</p>
<p>4x Protein Probenpuffer = Laemmli Probenpuffer</p> <p>4x Laemmli-DTT Probenpuffer</p>	<p>250 mM Tris-HCl, pH 6,8</p> <p>9,2 % SDS</p> <p>40 % Glycerine</p> <p>0,2 % Bromphenolblau</p> <p>Bei Raumtemperatur (23 °C) aufbewahren.</p> <p>Vor Gebrauch: 900 µl Probenpuffer + 100 µl 1M DTT (= 100 mM) und bei -20 °C aufbewahren.</p>
Schall-Homogenisator (Sonicator)	Bandelin, electronic - SONOPLUS - Laborgeräte MS-L GmbH, UW 2070
Zentrifuge	Eppendorf®, Deutschland
Proteinbestimmung	<p>BCA-Proteinbestimmungs-Kit (BCA Protein Assay Kit, 23225,23227 Pierce®, Thermo scientific)</p> <p>Jeweils 5 µl von dem Lysat zur Proteinbestimmung einsetzen.</p>
Mikroplattenleser, (Proteinkonzentrationsbestimmungs-ELISA)	Microplate Reader, Dynex Technologies, MRX ^{TC} Revelation
SDS-Polyacrylamide-Gelelektrophorese	
Trenngel Puffer, pH 8.8	<p>181,7 g Tris</p> <p>+ 3,0 g EDTA</p> <p>Auf 1Liter mit doppelt destilliertem Millipore-H₂O auffüllen und den pH-Wert mit HCl einstellen.</p>

	+ 4 g SDS
Sammelgel Puffer, pH 6.8	60,6 g Tris, + 3 g EDTA Auf 1 Liter mit doppelt destilliertem Millipore-H ₂ O auffüllen und den pH-Wert mit HCl einstellen. + 4 g SDS
SDS-PAGE Gele	
2 Minigele (Biorad system) = 20 ml Trenngel-Lösung	10 %-gel: 10ml ddH ₂ O, 5 ml Puffer pH 8.8, 5 ml 40 % acrylamid/bisacrylamid dazu: 35 µl TEMED, 100 µl 10 % APS Alles vorsichtig mischen und zwischen die Glasplatten gießen, so dass 2-3 cm für das Sammelgel oben frei bleibt. Oberfläche mit Isopropanol oder Wasser vorsichtig überschichten. Gel für 20-30 min auspolymerisieren lassen (das Gel ist auspolymerisiert = fest, wenn eine klare Linie zwischen Gel und Isopropanol/Wasser zu sehen ist). Isopropanol/ Wasser abschütten.
2 Minigele (Biorad system) = 10 ml Sammelgel-Lösung	4.5 %-gel: 6.4 ml ddH ₂ O + 2.5 ml Puffer pH 6.8 + 1.1 ml 40 % acrylamid/bisacrylamid + 35 µl TEMED + 100 µl 10 % APS Alles vorsichtig mischen und auf das Trenngel geben. Sofort Kamm vorsichtig einsetzen. Gel für 10 min auspolymerisieren lassen. (Zu langes Auspolymerisieren führt zu Verlust an möglichem Taschen-Ladevolumen)
SDS-PAGE Laufpuffer (1x)	3,02 g Tris + 14,40 g Glycine + 0,75 g EDTA Auf 1 Liter mit einfach destilliertem VE-H ₂ O

	<p>auffüllen.</p> <p>+ 1 g SDS</p> <p>Zugabe von 900 ml einfach destilliertes VE-H₂O. + 100 ml 10x SDS-PAGE Laufpuffer</p> <p>Die Proben vorsichtig auftragen und die Marker nicht vergessen. Auf eindeutige Probenreihenfolge achten (nicht gleichen Marker in gleicher Menge in die äußersten Taschen). Bei unterschiedlichen Probemengen Taschen mit 1xLaemmli-sample-Puffer auffüllen.</p> <p>Anschließend das Gel bei 130 V laufen lassen, bis der Blaumarker anfängt aus dem Gel auszulaufen.</p>
--	--

Tab. 8: Western Blot und Antikörper.

Für Western Blot	
1x Blotpuffer	<p>3 g Tris</p> <p>+ 14,4 g Glycine</p> <p>+ 800 ml einfach destilliertes VE-H₂O</p> <p>+ 200 ml Methanol</p> <p>Bei -20 °C für maximal 45 min kühlen.</p>
Tranfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose-Membran (Protran, Whatman) – Nass-Blot-Methode	<p>„Sandwich“ aus</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Western Blot Schaumpad 2. 1 Filterpapier (10cm x 7cm, Whatman) 3. Nitrocellulose Membrane (9cm x 6cm) 4. Gel 5.1 Filterpapier 6. Western Blot Schaumpad <p>Alles in Blotpuffer getränkt.</p> <p>In Blot-Kassette legen, Reihenfolge beachten.</p> <p>Die Blot-Kassette mit der schwarzen Seite gegen die rote Seite (Anode, Pluspol) des Western Blot Einsatzes legen.</p>

	<p>Tank mit Blot-Puffer auffüllen.</p> <p>Blotten für 90 min mit 100 mA pro Gel (Ampere konstant).</p>
Membranen	<p>Mit Ponceau-Färbung auf Transfer der Proteine überprüfen.</p> <p>Kurz mit 1xTBST waschen.</p> <p>Blocken der Membran mit Blockpuffer für 2x30 min.</p>
1x TBST Waschpuffer	<p>900 ml VE-Wasser</p> <p>+ 100 ml 10x TBS</p> <p>+ 1 ml Tween-20 (Achtung zähflüssig: Spitze abschneiden)</p>
10x TBS Waschpuffer	<p>24,2 g Tris-Base,</p> <p>+ 80 g NaCl</p> <p>Die Mischung mit VE-Wasser auf 800 ml auffüllen, den pH-Wert auf 7.6 mit HCl einstellen und mit VE-Wasser auf 1000 ml auffüllen.</p>
Antikörper-Inkubation & Entwicklung	<p>Erster Antikörper (5 µl Anti-MPO; 5 µl Anti-GFP): über Nacht bei 4 °C in 5 ml (kleine Schalen) oder 10 ml (große Schalen) Blockpuffer geben, 1:5000 in Blockpuffer</p> <p>Am nächsten Tag Antikörper-Lösung abkippen, waschen der Membranen: 3x15-20 min mit 1xTBST.</p> <p>Zweiter Antikörper (1 µl Peroxidase Labeled Anti- Rabbit IgG, H + L): 1-2 Stunden bei RT in 10 ml Blockpuffer geben, 1:10000 in Blockpuffer</p> <p>Antikörper-Lösung abkippen.</p> <p>Waschen der Membranen: 3x15-20 min mit 1xTBST.</p>
Entwickeln mit ECL oder ECL-femtoECL-Mischungen	<p>Entwicklermaschine (AGFA, CURIX 60):</p> <p>Lösungen überprüfen und anschalten.</p> <p>Inkubation mit 2 ml ECL-Mischung für 5 min, RT.</p>

	<p>Trocken-tupfen der Membranen. Membranen in lichtdichte Kassetten legen (zwischen Klarsichthüllen). Entwickeln in der Dunkelkammer: Film für 1 min im Dunkeln auflegen und sofort im Dunkeln in die Entwicklermaschine geben. Weiteres Entwickeln je nach Signal.</p>
ECL-Western-Blot-Detektions-Reagenz (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents)	GE Healthcare, RPN 2209
Femto-Western-Blot-Detektions-Reagenz (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate)	Thermo scientific® , 34095
DNA-Leiter	Unstained Protein Ladder, PageRuler™, Fermentas Life Sciences 10 kDa ladder (Life Technologies)
Primärantikörper	Anti-MPO Rabbit pAb, Calbiochem®, Cat. No. 475915 Anti-GFP, N-Terminal, Sigma®, USA, Product Number: G 1544
Sekundärantikörper	Peroxidase Labeled Anti-Rabbit IgG, H + L, Vector Laboratories, PI-1000
Gezielte Mutagenese Mutageneseprimer forward: Mutageneseprimer reverse:	QuikChange® XL Site-Mutagenese-Kit, Agilent Technologies 5'-aggggaagcctccGCGaggccaggttaaggg-3' 5'-cccttacctggcctCGCggaggcttcct-3' 5 µl 10x reaction buffer + 10 ng Template DNA + 1,25 µl Primer forward + 1,25 µl Primer reverse + 1 µl dNTP Mix + 3 µl Quik Solution ddH ₂ O Ad 50 µl

	<p>+ 1 µl PfuUltra High Fidelity DNA polymerase Die Elongationszeit ist von der Größe des Plasmids abhängig.</p> <p>PCR Prozedur:</p> <p>1. 95 °C 60 sek.</p> <p>2. 18 Zyklen:</p> <p> 95 °C 50 sek.</p> <p> 60 °C 50 sek.</p> <p> 68 °C 60 sek./ kb Plasmidlänge</p> <p>3. 68 °C 7 min</p>
MPO-Aktivitätsmessung (MPO-TMB-Assay)	<p>Die folgenden Lösungsansätze werden separat vorbereitet und erst kurz vor der Messung in einer Küvette gemischt.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 80 mM NaH₂PO₄-Buffer, pH 5.4: 552 mg ad 50 ml H₂O • 20 mM Tetramethylbenzidine: 48 mg ad 10 ml Dimethylformamide (frisch angesetzt) • 10 mM H₂O₂: 11 µl 30 % H₂O₂ ad 10 ml H₂O (frisch angesetzt) <p>Für die Messung:</p> <p>x µl sample (in 100 mM NaH₂PO₄/0.1% Triton X-100)</p> <p>930 µl – x µl 80 mM NaH₂PO₄-Buffer</p> <p>+ 60 µl 10 mM TMB</p> <p>Mischen.</p> <p>+ 10 µl 10 mM H₂O₂</p> <p>+ 10 mM H₂O₂ (unmittelbar vor der Messung hinzugeben)</p> <p>Messung bei OD 655 nm for 1 min.</p> <p>→ $\Delta A = OD_{655 \text{ nm}} 1 \text{ min} - OD_{655 \text{ nm}} 0 \text{ min}$</p>

3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse anhand von Tabellen und Abbildungen vorgestellt. Die ausführliche Vorgehensweise zu den einzelnen Experimenten wurde in Kapitel 2 beschrieben.

3.1 Das Grün fluoreszierende Protein

Das GFP ist ein aus 238 Aminosäuren bestehendes Protein, das die Eigenschaft besitzt, durch ein Fluorophor (Tripeptidsequenz Ser₆₅–Tyr₆₆–Gly₆₇) in der Mitte seiner 11 β -Faltblattstrukturen mit blauem oder ultraviolettem Licht grün zu leuchten. Entdeckt hat Osamu Shimomura dieses Protein 1961 in der Qualle *Aequorea victoria* und es ist heute aus der Zellbiologie nicht mehr wegzudenken (Osamu et al. 1962).

Douglas Prasher gelang 1992 die vollständige Sequenzierung des GFPs und damit die Markierung von anderen Proteinen zur Visualisierung von Vorgängen in der Zelle. Die DNA des grün fluoreszierenden Proteins kann an die DNA von anderen Proteinen gekoppelt werden.

Das humanisierte GFP aus der Seefeder *Ptilosarcus gurneyi* (hPtGFP) ist am besten geeignet für die Fusion mit MPO, da es aufgrund seiner relativ neutralen Ladung wenig Einfluss auf die stark positive Ladung der MPO einnimmt. Die Aminosäuresequenz des *Ptilosarcus*-GFP ist an die menschliche Gensequenz angepasst. Fluoreszierende Proteine wie das GFP sind hervorragende Fusionsproteine und dienen als Marker für die Genexpression und Proteinlokalisierung (Kendall und Badminton 1998).

Im Folgenden sind jeweils die Ausgangsplasmidkarten von pUC18 humanized GFP und pcDNA 3.1+ hMPO cDNA schematisch mit ihren einzelnen Komponenten dargestellt (vgl. Abb. 8 und 9). Diese Plasmide besitzen neben den relevanten Genen auch Gene mit einer Antibiotika-Resistenz, die Bakterien mit dem gewünschten Resistenzplasmid überleben lässt. In den eingesetzten Vektoren sind außerdem Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsenzyme und strukturelle Bestandteile enthalten.

In dieser experimentellen Arbeit wurde untersucht, ob die Entwicklung einer aus diesen beiden Plasmiden neu konstruierten Form eines GFP-MPO-Fusionsprotein-

Vektors möglich ist. Es wurde überprüft, ob er von der CHO-Zelle vollständig exprimiert wird und mithilfe von GFP leuchtet. Schließlich fand eine Reihe von zellbiologischen Experimenten zur Erfassung der enzymatischen Aktivität von MPO in dem Fusionsprotein statt.

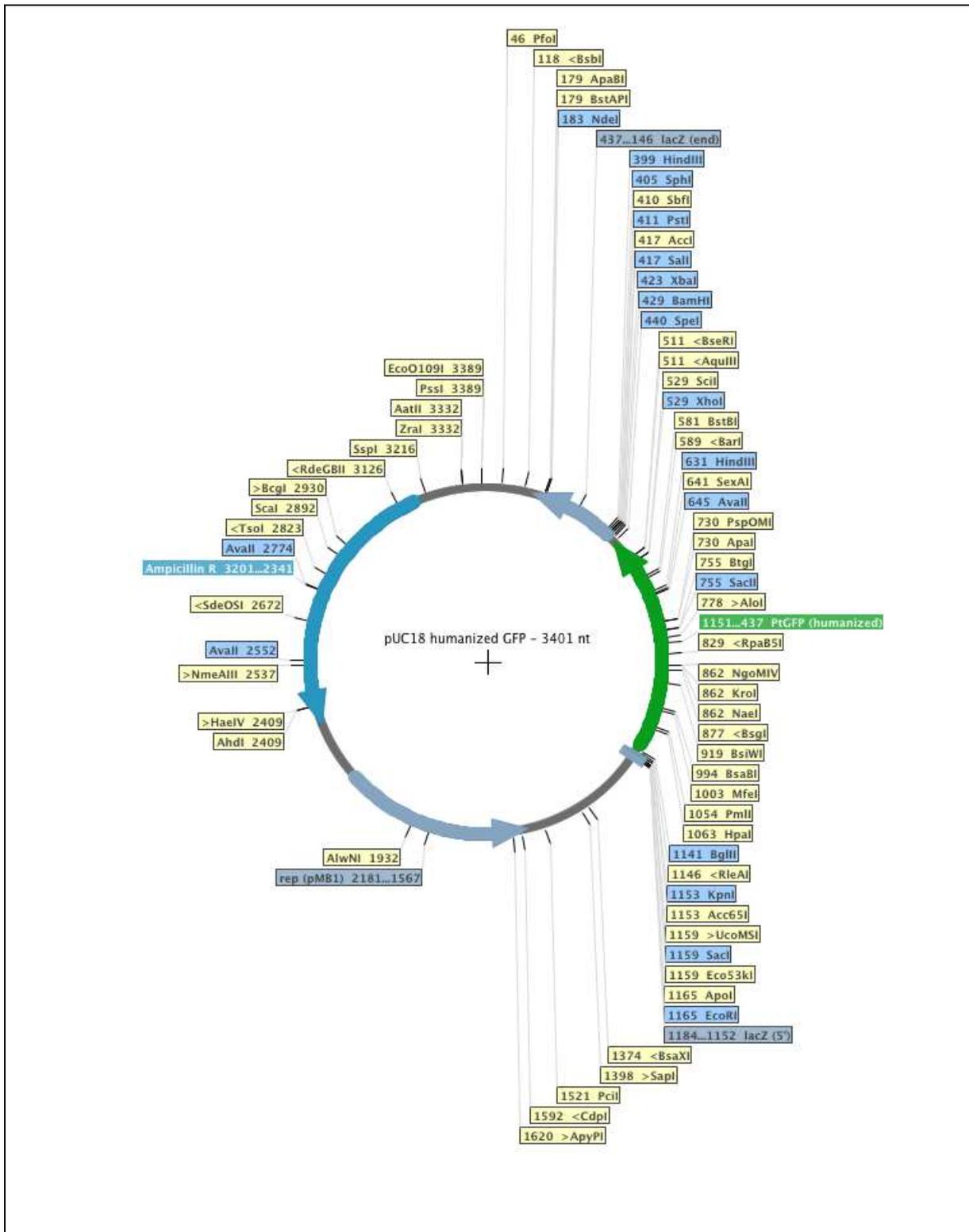


Abb. 8: Die Komponenten des pUC18 humanized GFP-Ausgangsplasmids. Dieses besteht aus 3401nt und enthält neben dem ptGFP in der Expressionskassette ein Ampicillin-Resistenzgen (Amp^r), ein N-terminales für β -Galactosidase kodierendes lac-Z-Gen und einen Replikationsursprung rep (pMB1). Es sind weiterhin Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme *HindIII*, *SphI*, *PstI*, *Sall*, *XbaI*, *BamHI*, *SpeI*, *XhoI*, *KpnI*, *SacI* und *EcoRI* vorhanden.

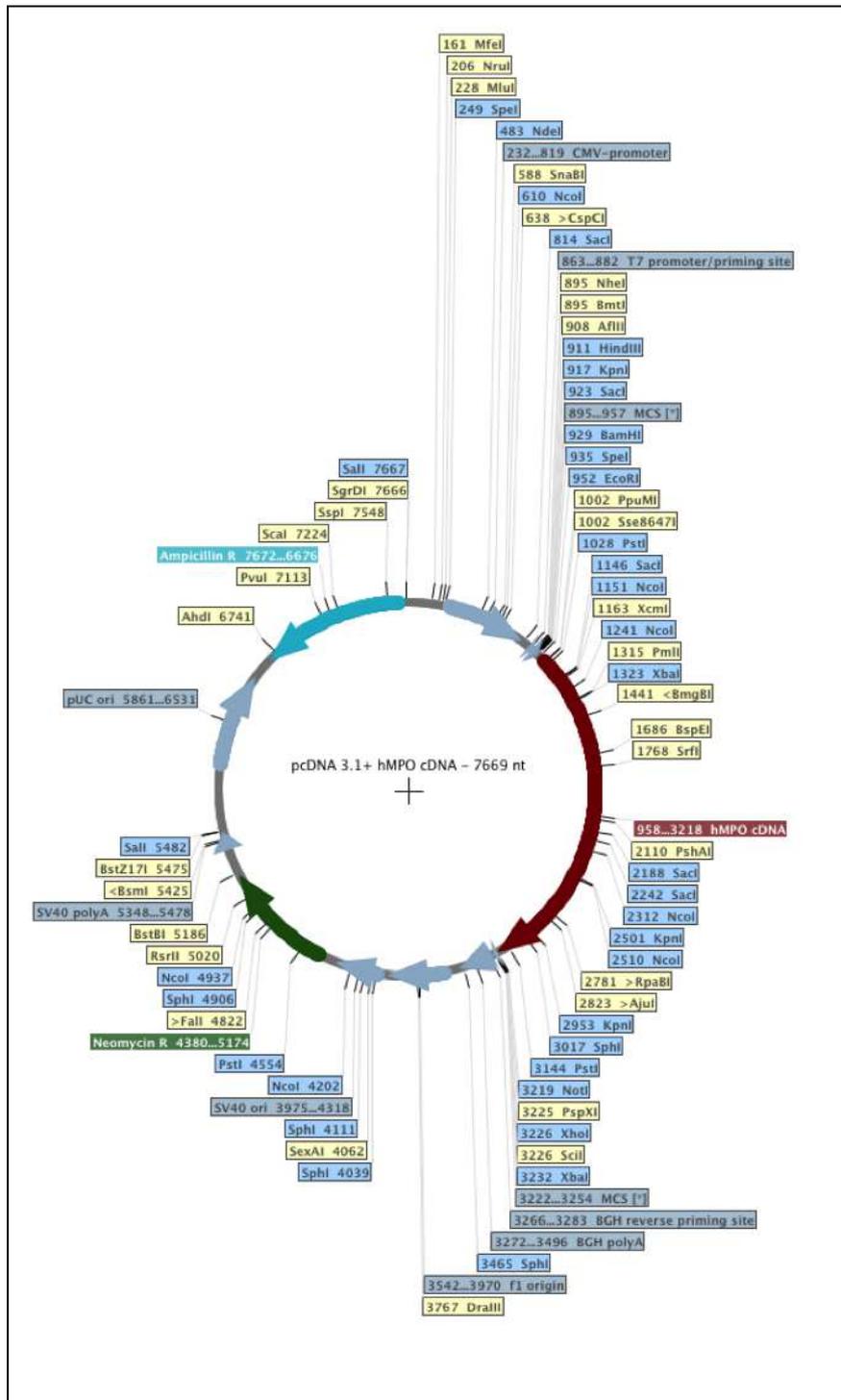


Abb. 9: Restriktionsmappe des Ausgangsplasmids pcDNA 3.1+ hMPO cDNA bestehend aus 7669nt. Auf diesem ringförmigen Vektor sind die hMPO cDNA, ein Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgen sowie Erkennungsstellen für die Restriktionsenzyme *SpeI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *Sall*, *XbaI*, *NotI* anwesend. Außerdem ist pcDNA 3.1+ hMPO cDNA mit einem CMV-Promotor ausgestattet.

3.2 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Phusion Polymerase von der Firma New England Biolabs®, Inc. aus dem Organismus *Pyrococcus furiosus* hat sich nach Durchführung verschiedener PCR-Amplifikationsexperimente als eine geeignete PCR-Pufferlösung herauskristallisiert. Hierfür wurde das Plasmid pUC18 humanized GFP als Matrize eingesetzt. Die Zugabe von 2-8 % DMSO zu dem Reaktionsansatz erleichtert die Vervielfältigung der GC-reichen Template-DNA (Hung et al. 1990), da es die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Matrizen-DNA unterbindet.

Nach PCR-Amplifikation und Auftrennung der gewonnenen DNA über die Agarose-Gelelektrophorese wurde die GFP-Bande von einer Größe von 725nt aus dem Gel isoliert und nach dem PCR clean-up Protokoll nach Macherey-Nagel eluiert (vgl. Abb. 10 und 11). Wie in Abbildung 10 ersichtlich, war in der Gelelektrophorese auch ein unspezifisches Nebenprodukt mit 100 bp aufgetreten. Der Marker ist zum Ablesen der Bandengrößen auch in dieser Abbildung dargestellt.

3.3 Plasmidkonstruktionen und –präparationen/ Klonierung des Plasmids

Das pUC18 humanized GFP-Ausgangsplasmid (vgl. Abb. 8) wurde anschließend durch einen enzymatischen Verdau mit *Not* I an bestimmten Stellen versetzt gespalten, so dass die gewünschte Insert-DNA mit spezifischen, überhängenden Enden (*sticky ends*, klebrige Enden) erzeugt wurde (vgl. Abb. 10, 11 und 12).

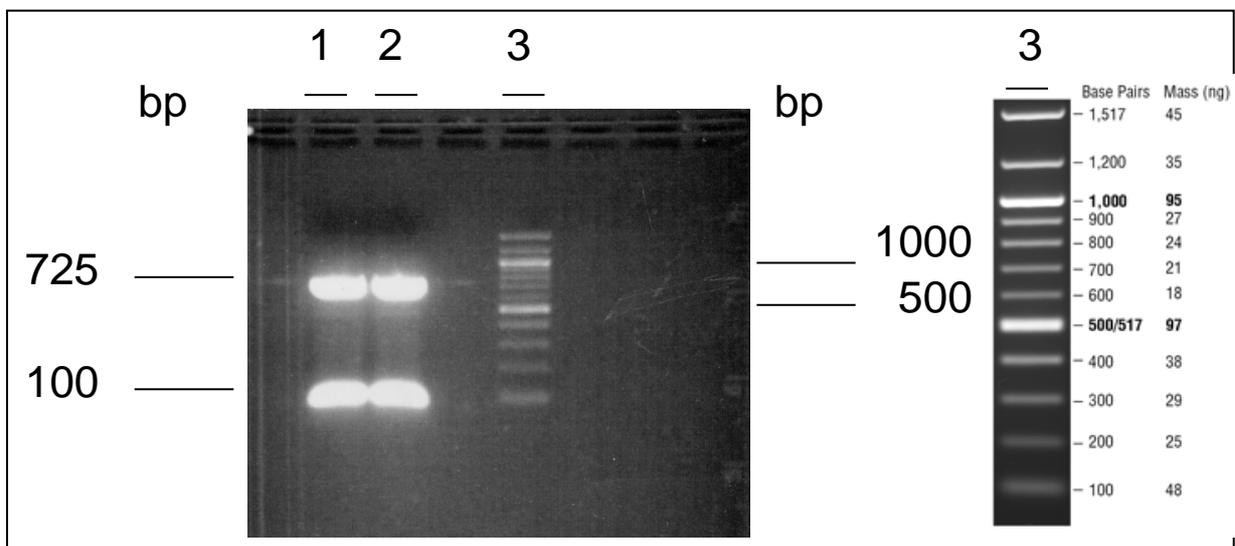


Abb. 10: Gelelektrophoretische Aufnahme des präparativen Verdaus der Template-DNA pUC18 humanized GFP mit der Restriktionsendonuklease *NofI*. Es sind jeweils zwei Banden des präparativen Verdaus bei ca. 100 und 725 bp zu sehen (1 und 2). Die Bande für GFP hat eine Größe von 725nt. Weiterhin ist ein unspezifisches Nebenprodukt mit 100 bp abgebildet. Der Marker ist bei 3 dargestellt. Das Gel läuft 15 min bei 120V. Anschließend wird das Gel unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 366 nm photographiert. Daneben ist ein 100 kb DNA-Leiter dargestellt, welches auf dem Agarosegel zur Abschätzung der Größe von unbekanntem DNA-Molekülen verwendet wird.

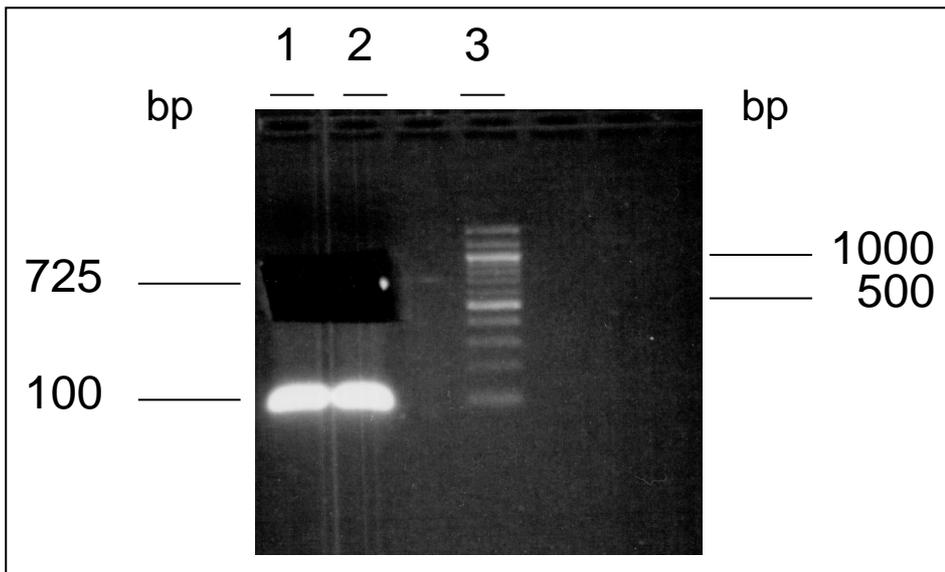


Abb. 11: Die GFP-Banden des präparativen Verdaus nach dem Herausschneiden mit dem Skalpell unter UV-Licht. Die pUC18 humanized GFP-DNA wird aufgereinigt und isoliert.

Um ein rekombinantes DNA-Molekül in der Ligation herstellen zu können, wurde auch die Vektor-DNA hMPO-plasmid (vgl. Abb. 9) mit der gleichen Restriktionsendonuklease behandelt und wies anschließend komplementäre Enden zu der Ziel-DNA auf. Die Abbildung 12 veranschaulicht den Klonierungsvorgang mit der Restriktion und Ligation schematisch.

Die Analyse beider Verdaus erfolgte jeweils nach der Aufreinigung mit dem PCR clean-up kit mittels Agarosegelelektrophorese. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden durch die T4-DNA-Ligase ligiert (Verhältnis 1:3 = Vektor:Insert). Nach der Ligation wurde die Hälfte des Ligationsansatzes in *E. coli* DH5a Bakterien transformiert, in denen die Replikation erfolgte (vgl. Abb. 14).

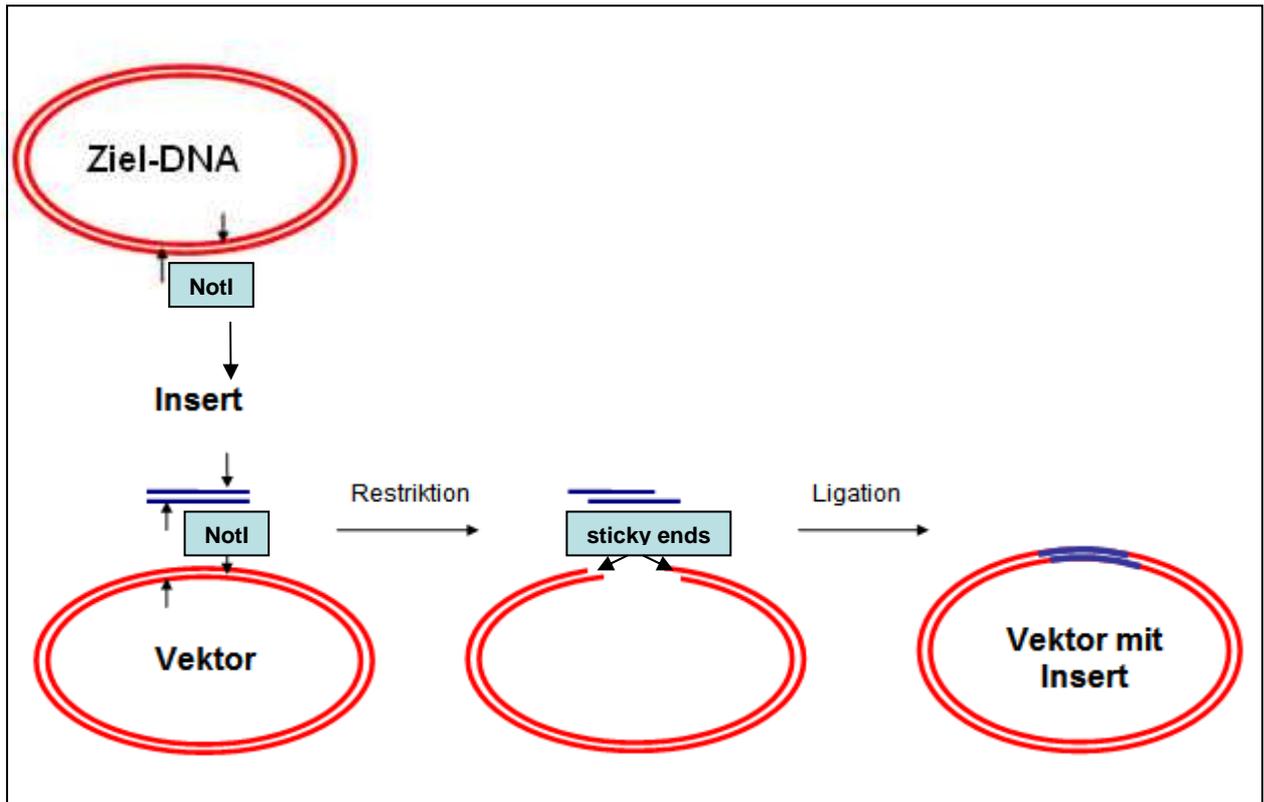


Abb. 12: Schematische Darstellung der Klonierung eines pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP-Plasmids mit Restriktion und Ligation. Die Vektor-DNA und die Ziel-DNA werden mit der gleichen Restriktionsendonuklease *NotI* geschnitten, so dass zueinander komplementäre Enden, sogenannte *sticky ends* entstehen, die wiederum mithilfe der DNA-Ligase kovalent verbunden werden können. Dabei entsteht ein Vektor-Insert-Konstrukt, ein rekombinantes Plasmid pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP (vgl. Abb. 13).

Beide Ausgangsplasmide pUC18 humanized GFP und pcDNA 3.1+ hMPO cDNA (Abb. 8 und 9) werden über die komplementären *sticky ends* zusammengeführt und es entsteht ein rekombinantes Plasmid pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP (vgl. Abb. 13). Das rekombinante pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP-Plasmid enthält gewünschte Eigenschaften, wie die Antibiotika-Resistenz, die zur Selektion von transformierten *E.coli* Bakterien auf antibiotikahaltigen Nährböden führt. Nur die resistenten *E. coli* Bakterien mit dem rekombinanten Plasmid können sich auf dem Ampicillin- und Neomycin-haltigen Nährboden vermehren (vgl. Abb. 14).

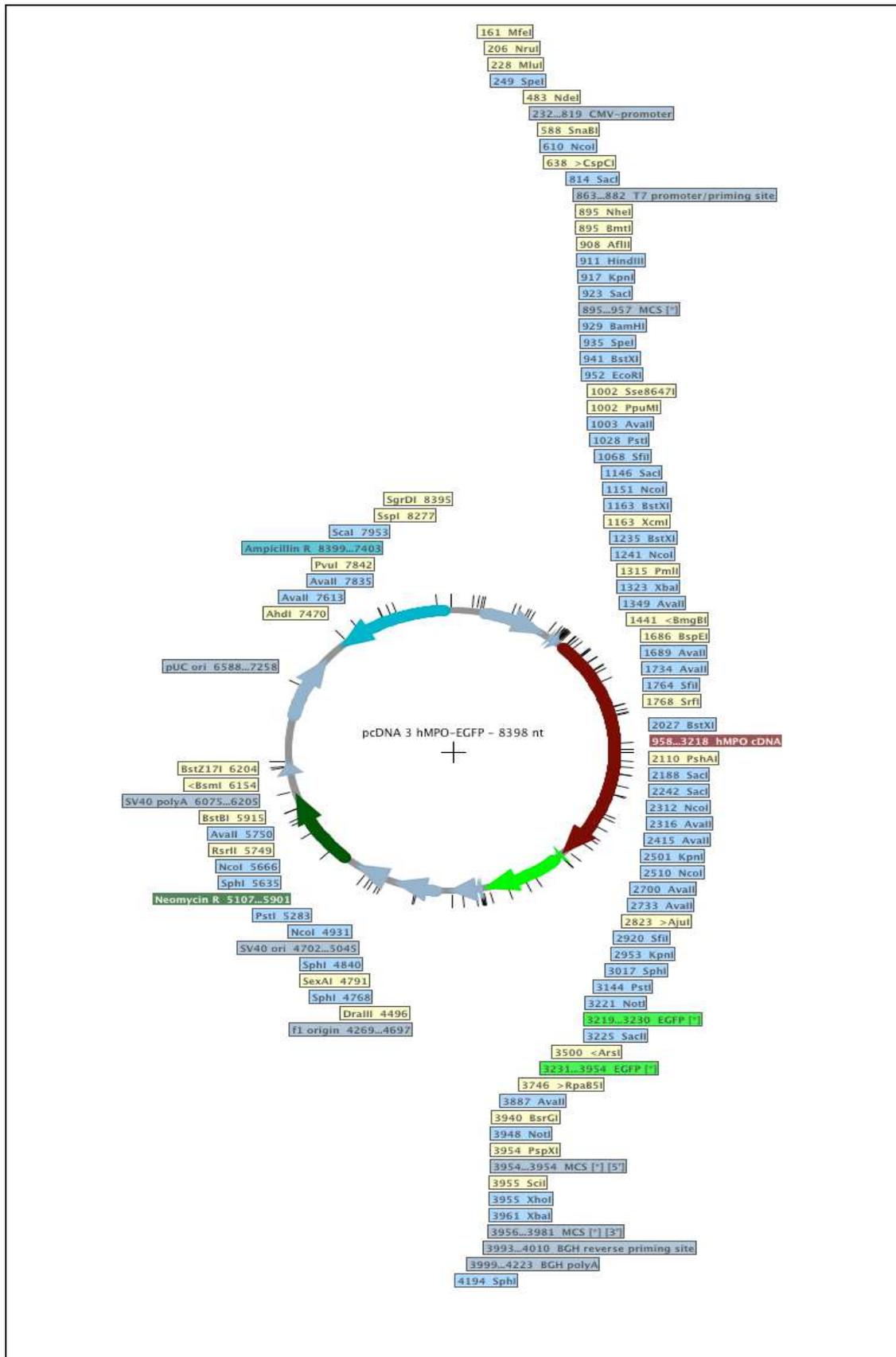


Abb. 13: Restriktionsmappe der pcDNA 3 hMPO-EGFP mit 8398 nt.

Die Ausgangsplasmide pUC18 humanized GFP und pcDNA 3.1+ hMPO cDNA wurden beide mit dem Restriktionsenzym *NotI* an sequenzspezifischen Erkennungsstellen geschnitten und über diese komplementären Sequenzen zu einem Plasmid zusammengefügt. Das hier dargestellte

rekombinante Plasmid enthält somit das Gen für hMPO cDNA und hGFP(pt) und vermittelt den *E. coli* Bakterien einen Selektionsvorteil auf Ampicillin- und Neomycin-haltigen Nährböden.

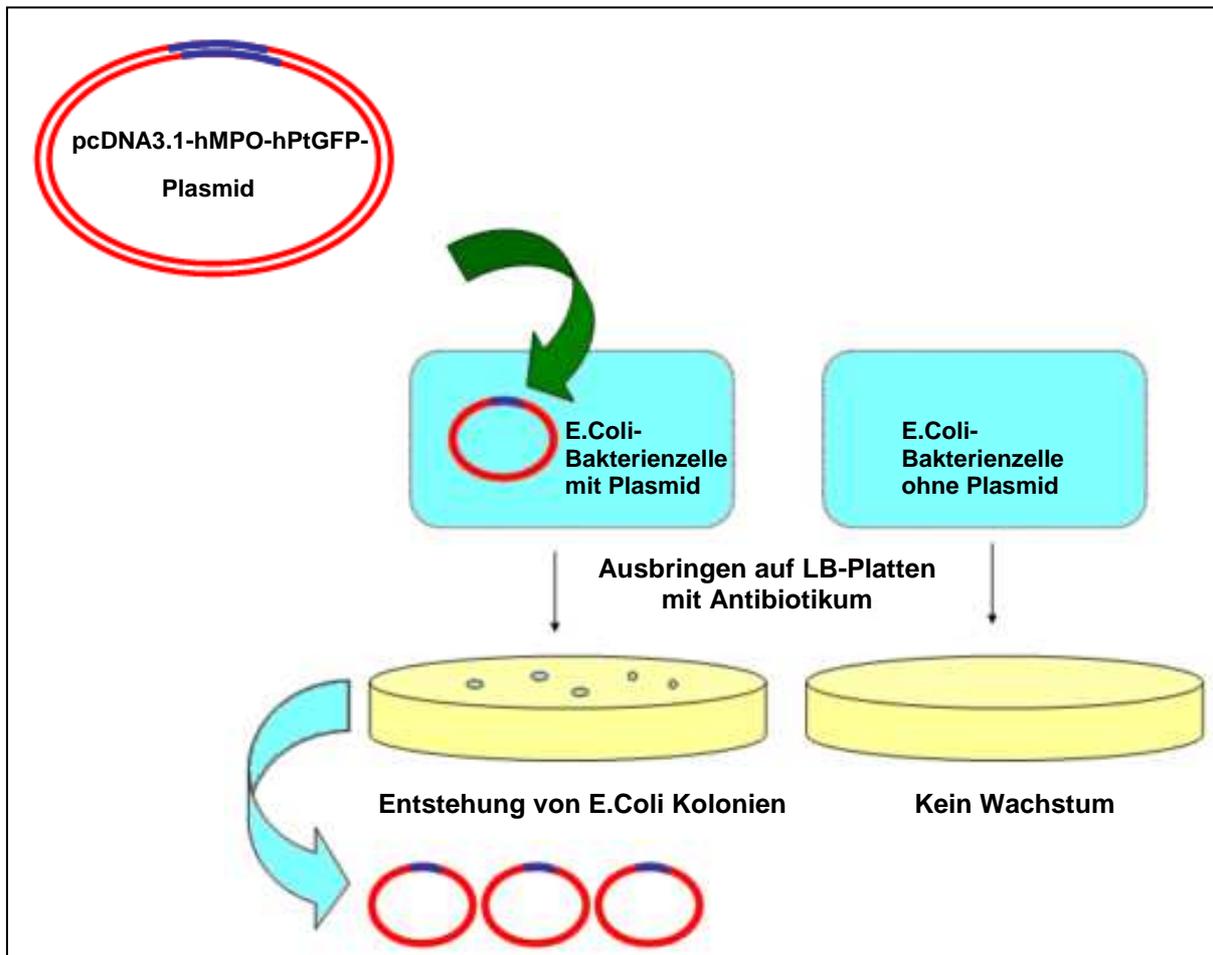


Abb. 14: Schematische Darstellung der Transformation vom rekombinanten pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP-Plasmid in eine *E. coli* Bakterienzelle und anschließender Antibiotika-Selektion auf LB-Platten mit Ampicillin. Die Bakterien, die das Plasmid mit dem Ampicillinresistenzgen aufgenommen haben, besitzen einen Selektionsvorteil gegenüber den Bakterien, denen das Plasmid fehlt. Sie können auf dem Nährboden überleben. Für die Plasmidpräparation können Flüssigmedien mit solchen transformierten *E. coli* Kolonien beimpft werden. Quelle: Abbildung modifiziert nach Wikipedia.

3.4 Charakterisierung des pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP-Plasmids

Nach der Klonierung des rekombinanten hMPO-GFP-Plasmids erfolgte die Charakterisierung der in der Transformation gewonnenen Klone. Für die Analyse des hMPO-GFP-Plasmids ist zunächst dessen Isolierung aus den *E. coli* Bakterien

erforderlich gewesen und anschließend die Restriktionsanalyse sowie die Auftrennung der Plasmid-DNA-Fragmente im Agarosegel.

Es gibt zwei mögliche Konstellationen des rekombinanten hMPO-GFP-Plasmids (vgl. Abb. 13) je nach Orientierung der eingebrachten Insert-DNA. Es ist nicht voraus zu sehen, welche Orientierung nach der Ligation vorliegt. In der richtigen Orientierung werden MPO und GFP in gleicher Richtung abgelesen. Um die richtige Orientierung zu identifizieren, wurden deshalb einzelne Kolonien des in Bakterien transformierten Ligationsansatzes (vgl. Abb. 14) mittels Restriktionsverdau analysiert.

Dafür wurden je 10 Kolonien in 2 ml LB-Amp. Flüssigmedium angeimpft und anschließend Mini-Preps von diesen zehn Flüssigkulturen zur Gewinnung von größeren DNA-Mengen der Ziel-DNA hMPO-hPtGFP durchgeführt. Die Analyse der auf diese Weise erhaltenen DNA erfolgte mit Hilfe von den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XbaI* gleichzeitig, um die Orientierung des GFP-Inserts zu bestimmen. Nach dem vollständigen Verdau der DNA-Präparationen wurden diese mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die Banden des Verdau der Ligationsprodukte von drei Kolonien entsprechen den Erwartungen für das rekombinante Plasmid pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP. Die Klone zwei, drei und sieben zeigen das richtige Verdauemuster und somit GFP in der richtigen Orientierung. Der Abbildung 15 sind die entsprechenden Bandengrößen der amplifizierten DNA-Fragmente erwartungsgemäß auf Höhe von 412 bp sowie bei 2,2 kb und 5,5 kb zu entnehmen. Die oberste Bande stellt das unverdaute Plasmid (Verdau nicht vollständig) und die untere der beiden obersten Banden den linearisierten Vektor dar.

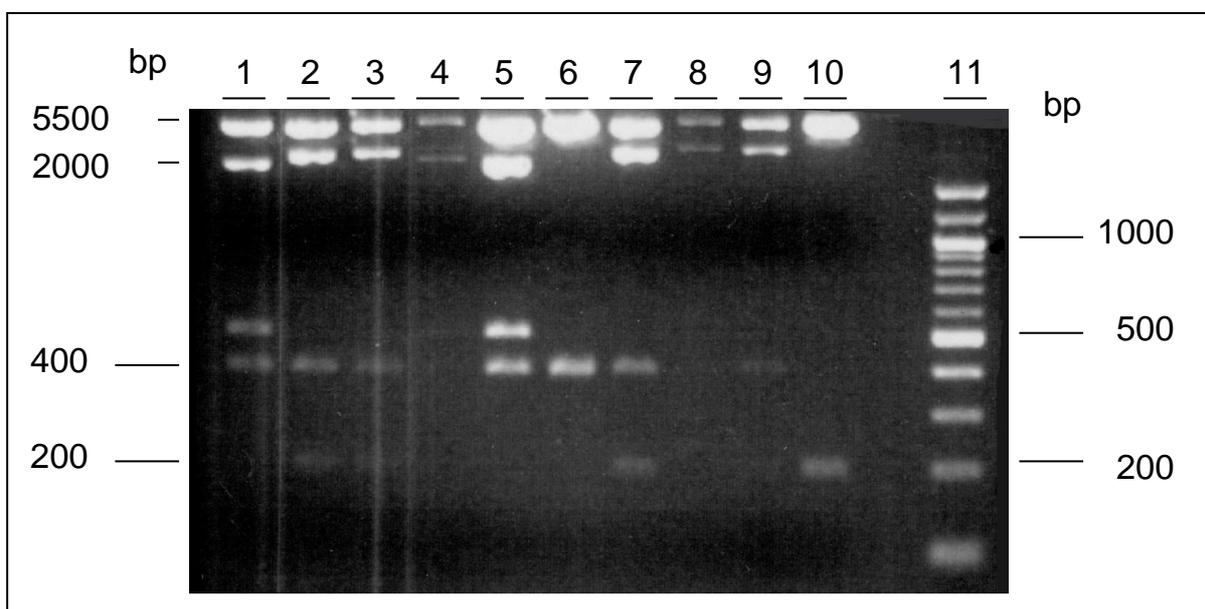


Abb. 15: Die Analyse der Gelelektrophorese ergibt das oben eingefügte Bild. Es sind die Verdaureaktion aller 10 antibiotikaresistenten Kolonien mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *XbaI* dargestellt. Die Kolonien 2, 3 und 7 ergeben das zu erwartende DNA-Fragmentmuster mit Banden bei 5,5 kb, 2,2 kb und 412 bp. Die Bandengröße kann anhand des Markers bei 11 abgelesen werden.

Zur weiteren Überprüfung des geklonten Plasmids pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP aus den drei Kolonien, die dieses gewünschte Ligationsprodukt aufgenommen haben, wurden diese DNA-Präparationen im folgenden Schritt zusätzlich mit drei weiteren Restriktionsendonukleasen (*SpeI*, *PstI* und *KpnI*) verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Restriktionsendonukleasen weisen zwei (*SpeI*, *PstI*) bis drei (*KpnI*) Schnittstellen in der Sequenz des hMPO- und hPtGFP-Gens auf dem rekombinanten Plasmid auf (vgl. Abb. 13).

Nach erfolgreicher Isolierung des gewünschten rekombinanten Plasmids wurde eine große Menge von rekombinanter Plasmid-DNA durch Maxipräparationen isoliert und nach dem Restriktionsverdau mit den Enzymen *SpeI*, *PstI* und *KpnI* anhand der Agarose-Gelelektrophorese auf seine Identität überprüft. Die Abbildung 16 zeigt die analytischen Kontrollverdaue der positiven Klone mit diesen Restriktionsendonukleasen. Jeweils drei Minis (1,2,3; 4,5,6; 7,8,9) entsprechen jeweils den Kolonien 2, 3 und 7. Der Plasmidvektor mit dem gewünschten DNA-Abschnitt wurde somit in ausreichenden Mengen kloniert und stand für die Transfektion in die CHO-Zellen zur Verfügung.

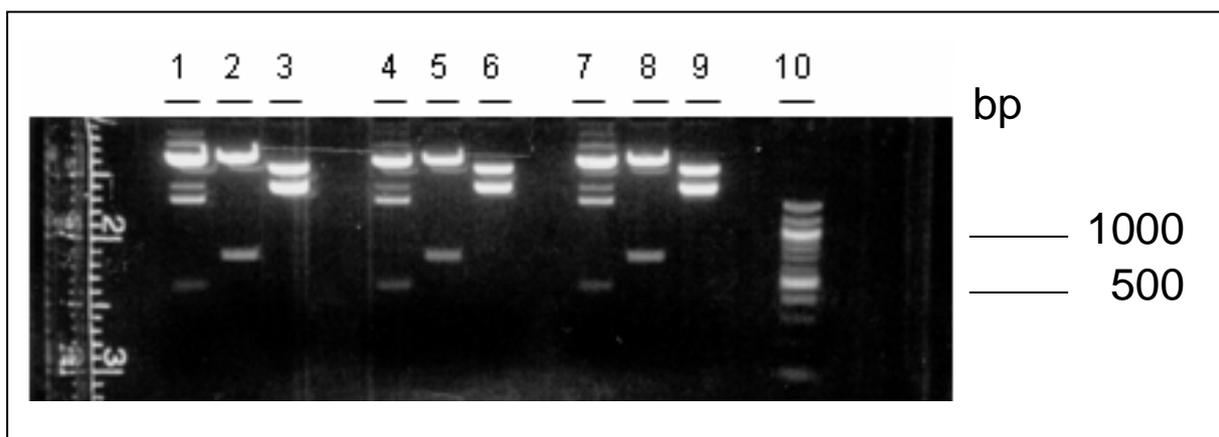


Abb. 16: Ergebnis des Restriktionsverdaus aller drei transformierten Kolonien mit den Restriktionsendonukleasen *KpnI* (1, 4, 7), *SpeI* (2, 5, 8) und *PstI* (3, 6, 9). Die Schnittstellen für *KpnI* ergeben die erwarteten Banden bei 452 bp und 1584 bp. Die Bande der Schnittstellen des Enzyms *SpeI* liegt bei 686 bp und die für *PstI* bei jeweils 2116 bp. Die Minis 1, 2 und 3 stellen die

Kolonie 2 und die bei 4, 5, und 6 die Kolonie 3 und die nächsten drei Minis 7, 8 und 9 entsprechen der Kolonie 7. Der Marker ist für die Größenbestimmung bei Nr. 10 dargestellt.

3.5 Transfektion in CHO-Zellen

Für die Expression des Fusionsproteins pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP wurden Ovarialzellen aus chinesischen Hamstern transfiziert. Die CHO-Zellen wurden unter sterilen Kulturbedingungen im Vollmedium mit einer Konfluenz von ca. 90 % für die Transfektion in sterilen 6-Well-Platten vorbereitet. Mehrere verschiedene chemische Transfektionsverfahren, wie die Calcium-Phosphat-Präzipitation, Lipo- und Nanofektamin-Technik erforderten zahlreiche Anläufe mit verschiedenen DNA- und Transfektionslösungsmengen zur Ermittlung der für die CHO-Zellen effizientesten Transfektionsbedingungen mit den besten Ergebnissen. Die Transfektion mit hMPO-hPtGFP war erfolgreich, allerdings wurde nur MPO exprimiert und kein GFP.

3.6 Proteinaufreinigung und Western Blots/ Proteinbestimmung im BCA Proteinassay

Zur Freisetzung der Bestandteile aus der Zelle wie die zytoplasmatischen Proteine, wurde die mechanische Lyse angewendet. Hierfür wurden die Zellen mithilfe eines Homogenisators zerkleinert und die Proteine von Zellorganellen durch Zentrifugation isoliert. Die quantitative, photometrische Bestimmung des von den transfizierten Zellen produzierten Zielproteins MPO und hMPO-hPtGFP erfolgte nach der BCA-Methode nach Lowry. Bei dieser Farbreaktion reagieren Proteine mit den zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Kupferionen und diese reagieren wiederum mit der Bicinchoninsäure zu einem violetten Komplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm. Somit konnte die zu bestimmende Proteinkonzentration ausgewertet werden.

Für die Eichkurve wurde im Vergleich zu der unbekanntem Menge an Protein Rinderserumalbumin mit bekannter Konzentration verwendet. Im nächsten Schritt erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe über die sogenannte SDS-PAGE (sodium-dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelectrophorese). Anschließend wurden die Proteinbanden dann erfolgreich auf eine Blotmembran übertragen (engl.

blotting) und mit Hilfe von den im Materialteil beschriebenen Antikörpern identifiziert (Immundetektion).

3.7 Sequenzierung des Stop-Codons

Nach diesen anfänglichen Schwierigkeiten bei mehrmaligen Transfektionsversuchen und jeglichem Fehlen des GFP-Signals, wurde das hMPO-hPtGFP-Genprodukt zur Übernacht-Sequenzierung zu der Firma GATC Biotech AG nach Konstanz geschickt und es wurde gezeigt, dass hinter dem hMPO-Gen ein Stop-Codon (TAG) folgt. Durch das Stop-Codon zwischen MPO und GFP konnte möglicherweise das GFP nicht abgelesen werden (vgl. Abb. 17).

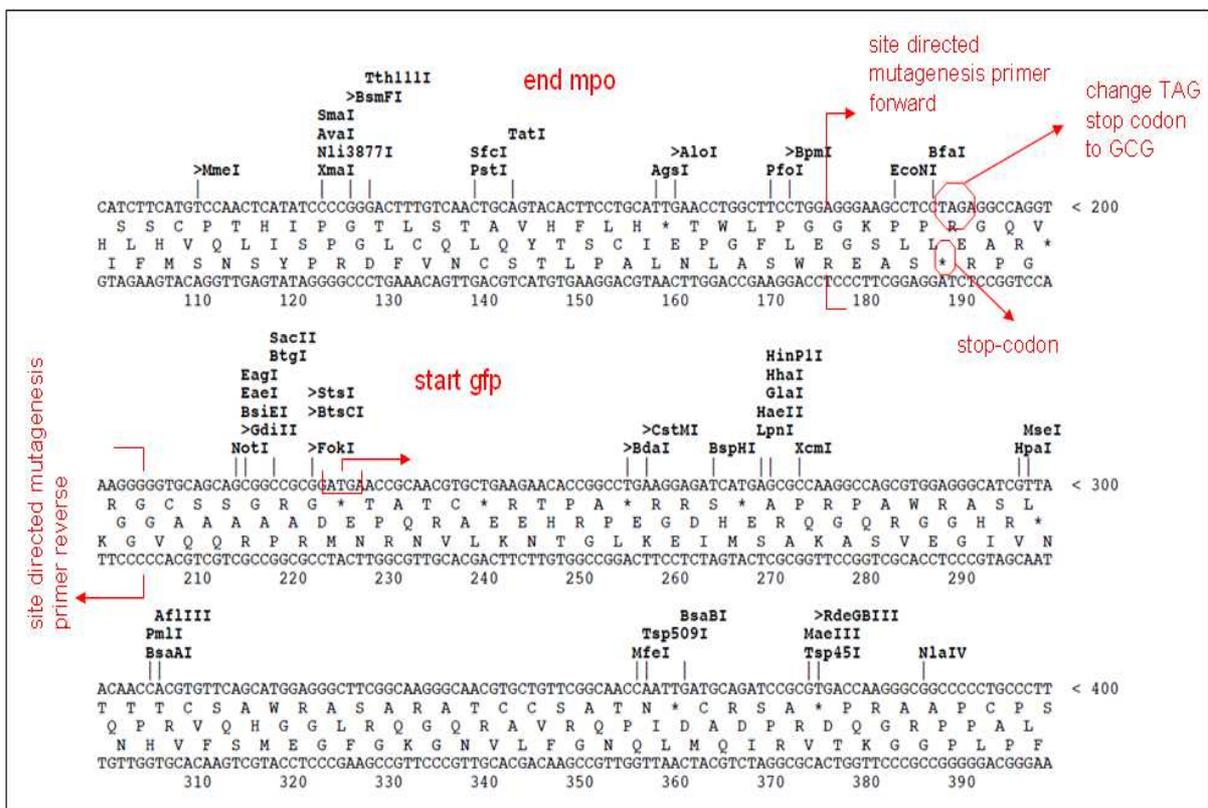


Abb. 17: Sequenz aus der Restriktionskarte vom hMPO-hPtGFP-Plasmid zur Analyse der DNA-Abschnitte. Es wird ersichtlich, dass ein Stop-Codon (TAG) vorhanden ist, welches das Ablesen der DNA durch Restriktionsenzyme unterbricht. Transfektionsversuche mit dieser DNA sind gescheitert. Durch gezielte Mutagenese mittels QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit konnte das Stop-Codon entfernt und das Basentriplett TAG ("amber") durch GCG ersetzt werden (vgl. Abb. 19).

Die Abbildung 18 zeigt einen Western Blot vom pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein, welches noch das Stop-Codon zwischen MPO und GFP enthält.

Erkennbar ist das am Bandenmuster, denn es ist kein 30kDa-Shift des pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP-Fusionsproteins ersichtlich. Nach erfolgreicher Mutagenese sieht man in der nächsten Western Blot Abbildung 21 den 30kDa-Shift dagegen deutlich.

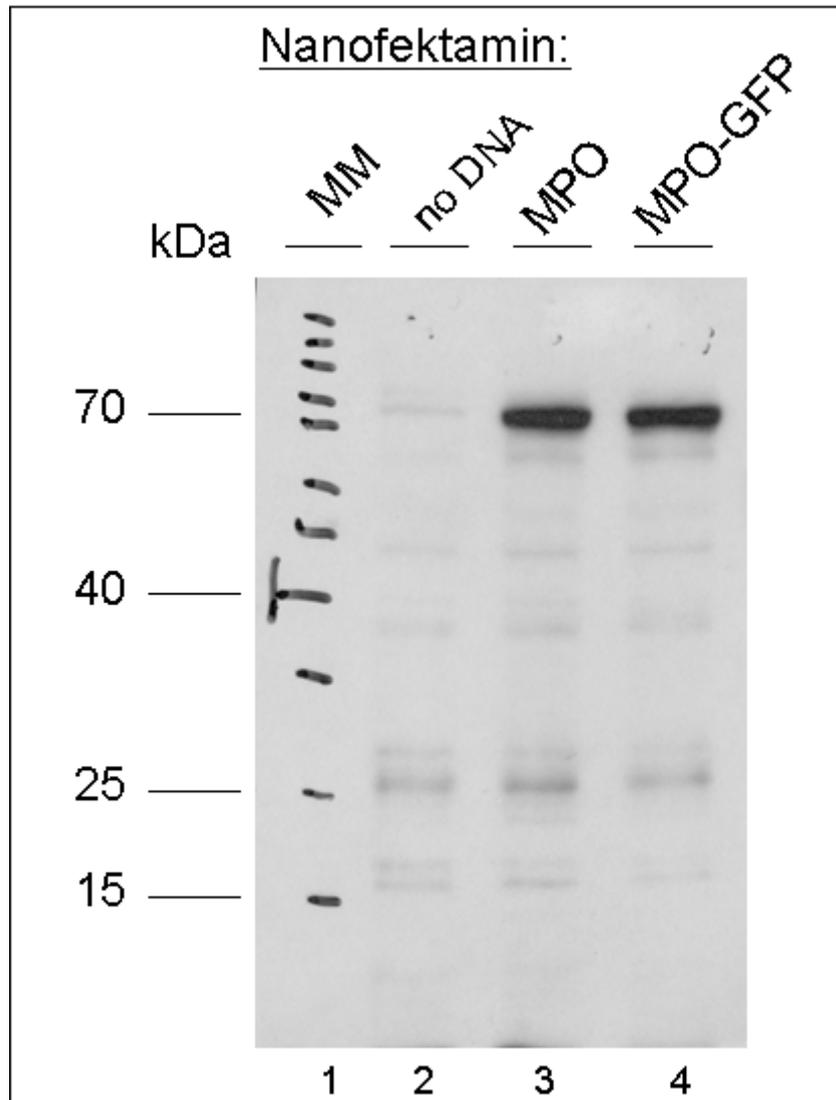


Abb. 18: Darstellung von Proteinen aus den ohne DNA, mit MPO-GFP und nur mit MPO transfizierten Zellen im Western Blot mit einem MPO-Antikörper. Die Zellen sind nach der Nanofektamin-Methode transfiziert worden. Der Western Blot zeigt unter Verwendung des MPO-Antikörpers Banden bei ca. 75 kDa (3, 4). Diese Banden stimmen mit denen des MPO-Proteins überein. Ein GFP-Signal ist im Fusionsprotein hMPO-hPtGFP nicht zu sehen (4). Je höher die Konzentration der DNA, desto dunkler scheint die jeweilige Bande. Die Belichtungszeit für diese Abbildung betrug 15 Sekunden.

3.8 Ortsgerichtete Mutagenese (site-directed mutagenesis)

Die ortsgerichtete Mutagenese des rekombinanten Plasmids erfolgte mit dem QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies. Dieses Verfahren ermöglicht das gezielte Einführen bzw. Entfernen von einzelnen Nukleinbasen in bekannte Gene des Ausgangsplasmids. Zunächst wurde hierfür die Amplifikation des ursprünglichen Plasmids mit der DNA-Polymerase in mehreren PCR-Zyklen mit mutagenisierten Primern durchgeführt.

Anschließend erfolgte der Verdau mit der Restriktionsendonuklease *Dpn* I, die nur methylierte DNA schneidet und somit die Beseitigung des methylierten maternalen Stranges, welches ein internes Stop-Codon (TAG) enthält, herbeiführt. Nach der Mutagenese wurde die mutierte Plasmid-DNA ohne das Stop-Codon in *E. coli* Bakterien transformiert und auf Agarplatten mit ampicillinhaltigen Nährmedien ausplattiert (vgl. Abb. 14).

Auf diese Weise konnte also mithilfe der Mutagenese das Stop-Codon für die folgenden Transfektionsversuche entfernt werden, so dass beide Gene wie ein einziges Gen abgelesen wurden und die Transfektion endlich funktionieren konnte (vgl. Abb. 19).

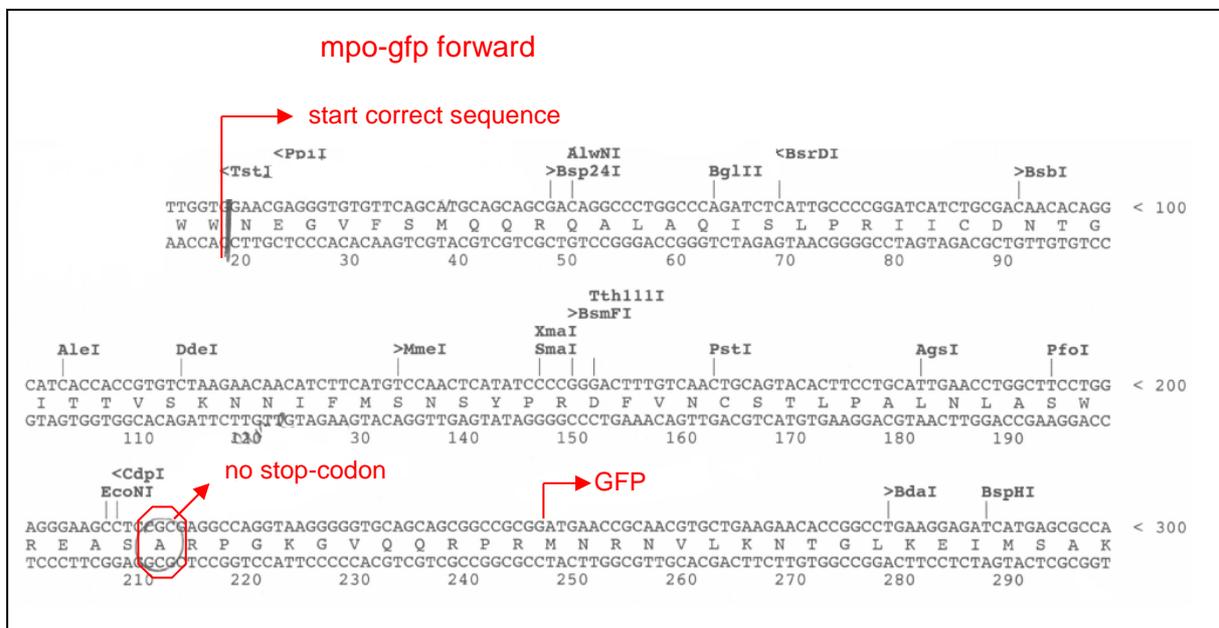


Abb. 19: Sequenz aus der Restriktionskarte vom hMPO-hPtGFP-Plasmid nach der gezielten Mutagenese. Das Stop-Codon wurde durch das Basentriplett GCG ausgetauscht. Durch diese gezielte Veränderung der DNA kann das Gen als eine Sequenz abgelesen werden.

3.9 Erneute Transfektion

Als die geeignetste Methode hat sich das Nanofektamin Einschussverfahren erwiesen mit den abgestimmten Lösungsansätzen wie bereits in Kapitel 2 beschrieben.

3.10 Western Blot

Der Erfolg der Transfektion wurde mittels Elektrophorese und Western Blot sowie Immunzytochemie ausgewertet. Nach 48 Stunden wurden die transfizierten CHO-Zellen geerntet, lysiert und die Proteine denaturiert. Als nächstes erfolgte die Auftrennung der Proteine elektrophoretisch auf diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele (sodium-dodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese), anschließend wurden diese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran gebロットet, um dann immunzytochemisch mit spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen identifiziert zu werden. Als Antikörper wurden Kaninchen Anti-MPO und Anti-GFP eingesetzt.

Die folgenden Western Blot Abbildungen 20 und 21 sind von den mit der Nanofektamin Methode transfizierten Zellen. Die CHO-Zellen wurden jeweils mit der Transfektionslösung ohne DNA, mit MPO oder GFP und mit dem hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein nach Entfernen des Stop-Codons transfiziert. Das Bandenmuster zeigt, dass jeweils Signale von MPO bzw. GFP als singuläre Proteine vorhanden, jedoch nicht im hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein vollständig nachweisbar sind. In den Abbildungen ist jeweils die Markerbande zur Kontrolle der Bandengrößen dargestellt. Die Transfektion mit der Lipofektaminlösung war nicht erfolgreich.

Die Western Blot Abbildung 20 lässt erkennen, dass das hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein ein anderes Auftrennungsverhalten zeigt als das MPO alleine – und zwar läuft es so, als ob es 30 kDa größer wäre, was es aufgrund des GFPs (26.9 kDa) auch ist (Yang et al. 1996). Die monoklonale MPO-Bande beträgt somit 90 kDa und die des hMPO-hPtGFP-Fusionsproteins 120 kDa. Somit ist anzunehmen, dass die Expression des hMPO-hPtGFP-Fusionsproteins erfolgreich war und im Immunoblot nachweisbar ist.

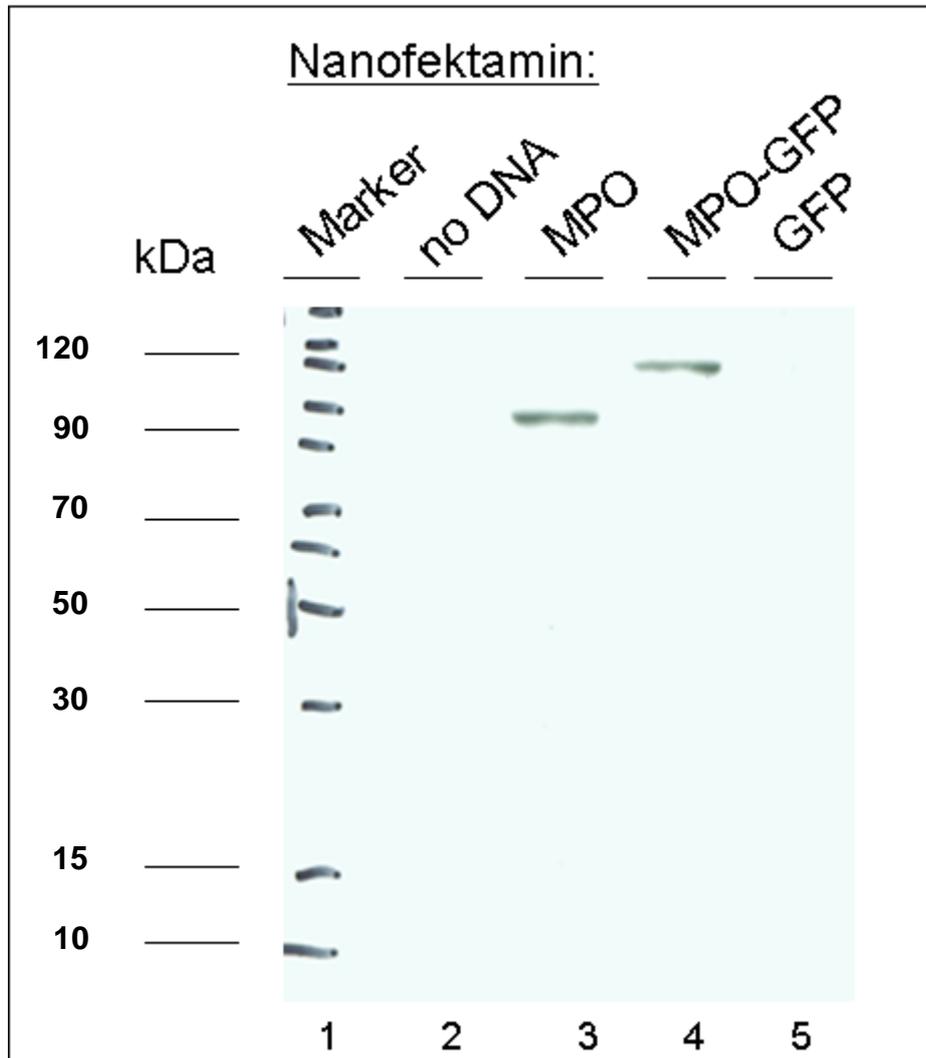


Abb. 20: Das Ergebnis des Western Blots nach Behandlung der Membran mit Anti-MPO. Die MPO-Bande liegt bei 90 kDa (3). Im Fusionsprotein ist diese MPO-Bande bei 120 kDa ersichtlich (4). Die Größenzuordnung erfolgt anhand des Markers links der Graphik (1).

CHO-Zellen, die nur mit dem GFP (ohne MPO) transfiziert waren, dienten als Kontrolle für die Transfektion und erwartungsgemäß zeigte sich, dass das GFP prinzipiell exprimiert wird und mit dem GFP-Antikörper nachgewiesen werden kann. Die Bande des GFPs ist bei ca. 30 kDa in Abbildung 21 sichtbar.

Allerdings verdeutlicht diese Abbildung auch, dass der Nachweis von GFP im Fusionsprotein im Western Blot anhand des GFP-Antikörpers nicht gelingt, denn es ist kein GFP-Signal im hMPOhPtGFP-Fusionsprotein vorhanden. Das an die MPO fusionierte GFP scheint nicht bzw. nur teilweise vollständig oder nicht korrekt exprimiert bzw. gefaltet zu werden. Dieses Ergebnis wird von den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 23 und 24 unterstützt, denn es sind nur wenige, vereinzelt leuchtende Zellen zu sehen.

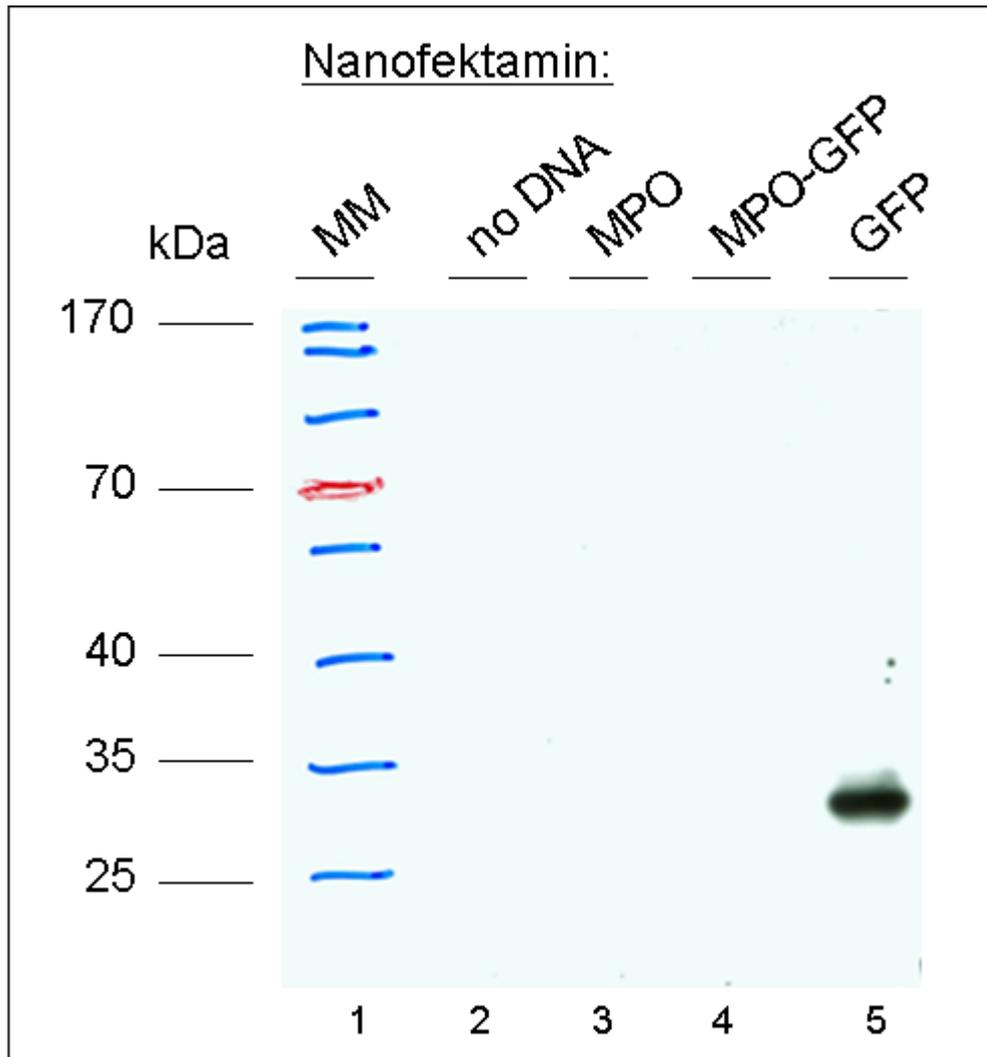


Abb. 21: Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine im Western Blot. Die Detektion der Proteine erfolgte mithilfe eines GFP-Antikörpers. Die GFP-Bande, die bei ca. 30 kDa zu erkennen ist, wird im Fusionsprotein durch den Antikörper nicht erkannt. Das Molekulargewicht der Proteine ist links in kDa dargestellt.

3.11 Fluoreszenzmikroskopie

Nach 12 bis 48 Stunden wurden die mit hMPO-hPtGFP-Plasmid transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf GFP-Signal untersucht. Hierbei haben nur die wenigsten Zellen gelehuchtet. Die transfizierten Zellen besitzen die Eigenschaft zu fluoreszieren, da es in den Zellen zur Genexpression des Markerproteins GFP, welches im Fusionsprotein verankert ist, kommt. Aufgrund des starken MPO-Blot Signals vom hMPO-hPtGFP-Fusionsproteins ist anzunehmen, dass das Protein eigentlich in ausreichender Menge exprimiert wird, allerdings scheint deren Faltung

problematisch zu sein. Die Abbildungen 22 bis 24 zeigen beispielhaft fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion.

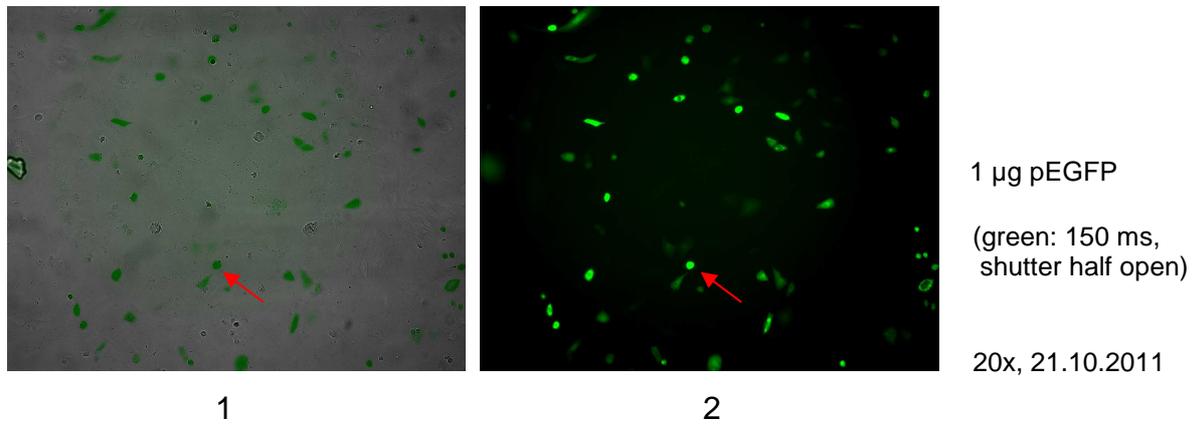


Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-exprimierenden CHO-Zellen. Diese wurden mit 1 µg GFP transfiziert und nach 12 bis 24 Stunden aufgrund der Fluoreszenz des GFPs visualisiert. Die roten Pfeile zeigen auf eine grün fluoreszierende CHO-Zelle.

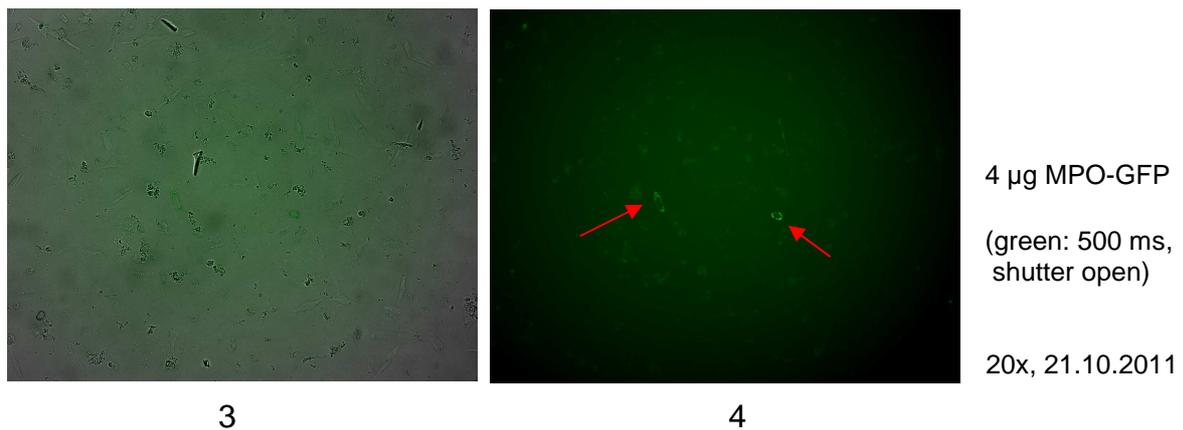
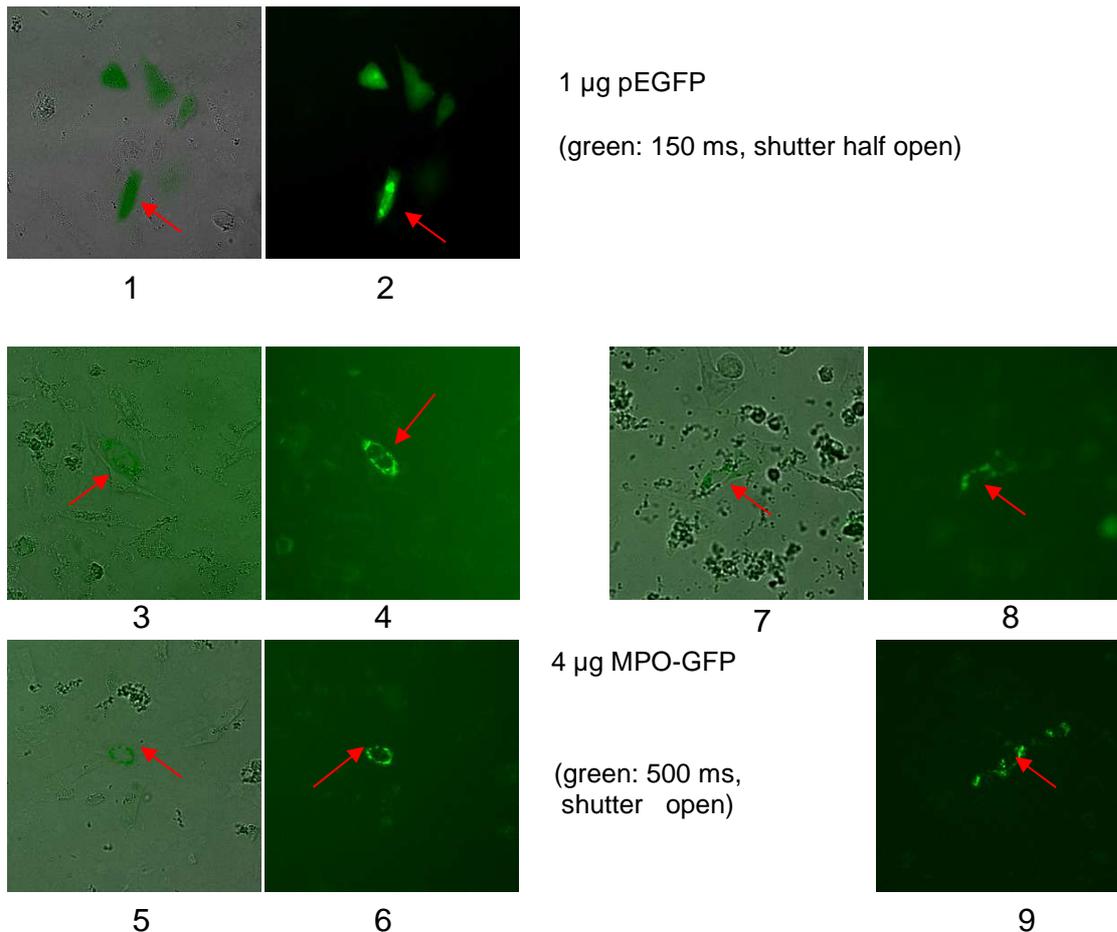


Abb. 23: CHO-Zellen 48 Stunden nach der Nanofektamin-Transfektion mit 4 µg pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP-Plasmid unter dem Fluoreszenzmikroskop. Nur einzelne Zellen fallen durch ihre stärkere Fluoreszenz auf (rote Pfeile), obwohl viele transfizierte Zellen unter dem Mikroskop in Bild 3 zu sehen sind. Der rote Pfeil zeigt auf zwei grün leuchtende Zellen, die MPO-GFP vermutlich exprimieren (4).



20x, 21.10.2011

Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung der mit GFP-transfizierten CHO-Zellen gegenüber den mit dem hMPO-hPtGFP-Plasmid transfizierten CHO-Zellen. Die Zellen wurden kultiviert und vorbehandelt wie in Kapitel 3.1.3 für CHO-Zellen beschrieben. Zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (2, 4, 6, 8, 9) sind jeweils deckungsgleiche mikroskopische Aufnahmen (1, 3, 5, 7) nebeneinander dargestellt. Auf dem Bild 2 sieht man kräftig leuchtende CHO-Zellen (roter Pfeil), die mit pEGFP transfiziert sind. Im Gegensatz dazu fallen nur einzelne mit 4 μg hMPO-hPtGFP-Plasmid transfizierte Zellen grün leuchtend unter dem Fluoreszenzmikroskop (4, 6, 8, 9) auf.

3.12 hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein-Aktivitätsmessung

Das TMB Assay ist ein enzymatischer Aktivitätsassay, welches zur Erfassung der spezifischen Aktivität vom MPO-Enzym und dem Fusionsprotein hMPO-hPtGFP eingesetzt wurde. Hierbei wird mit Hilfe des farblosen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid eine Farbreaktion mit einem Absorptionsmaximum bei 655 nm erreicht (vgl. Abb. 25). In Abbildung 25 sind die Küvetten zur

Aktivitätsmessung von MPO, vom hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein und einer Kontrollgruppe ohne DNA unmittelbar vor der photometrischen Bestimmung abgebildet.

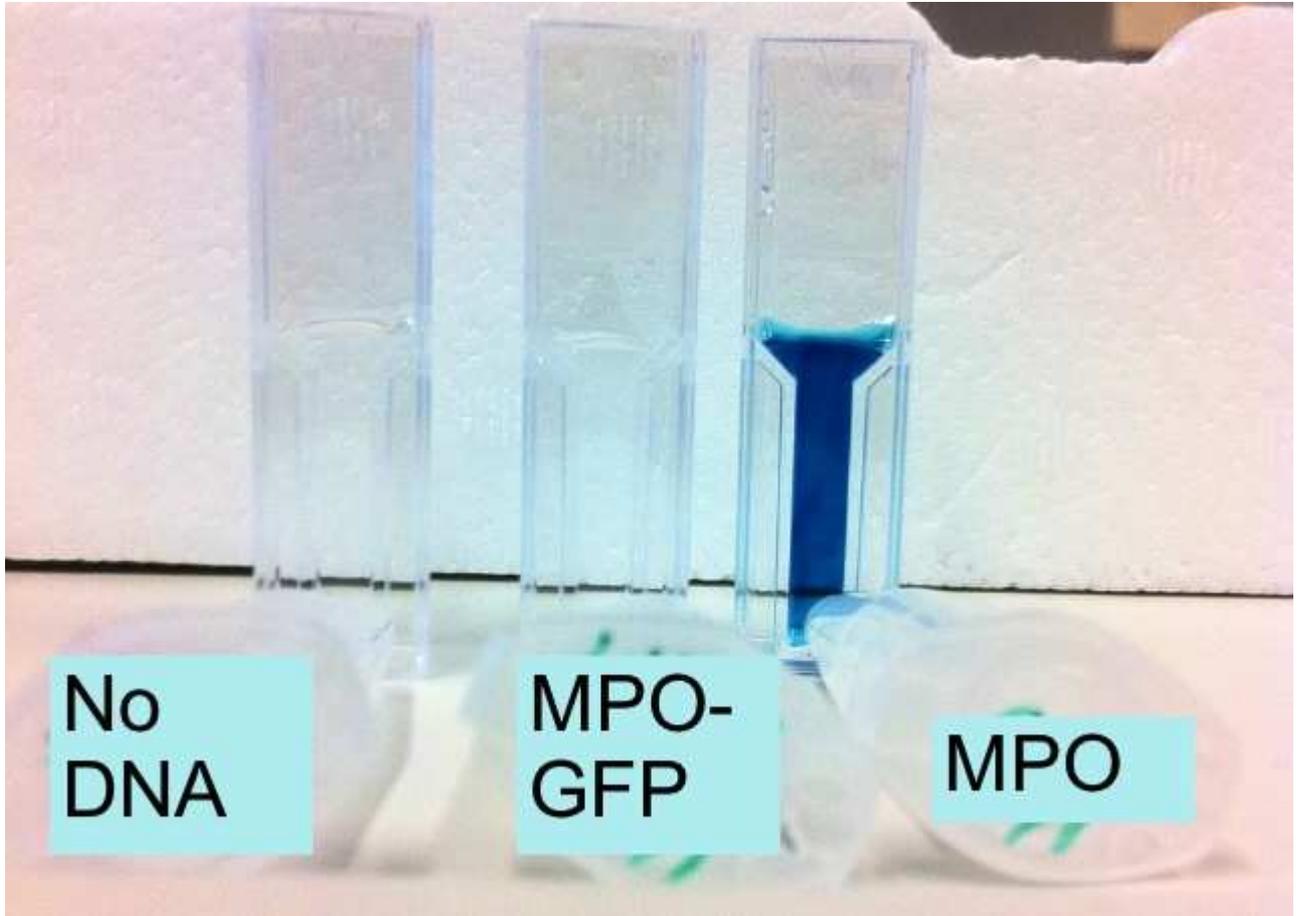


Abb. 25: Küvetten zum Messen der Extinktion (OD) vom MPO-Enzym und hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein sowie einer Kontrollgruppe bei einer Wellenlänge von 655 nm. Die in Kapitel 2 (Tabelle 8) beschriebenen Lösungsansätze zum MPO-TMB-Assay werden separat vorbereitet und erst kurz vor der Messung in einer Küvette gemischt. Durch die Farbreaktion kann photometrisch die Aktivität von Enzymen ermittelt werden.

Es erfolgte eine MPO-Aktivitätsmessung mit dem TMB-Assay. In der graphischen Darstellung in Abbildung 26 ist die Extinktion bei 655 nm gegen die Zeit aufgetragen und anhand der Steigung lässt sich die kinetische Aktivität errechnen. Es zeigte sich kaum MPO-Aktivität im hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein ($0,017 \Delta A/\text{min}$). Im Gegensatz dazu konnte ein erhöhter Aktivitätsspiegel für das monoklonale MPO von $0,048 \Delta A/\text{min}$ (100 %) gezeigt werden. In der Kontrollgruppe ist entsprechend keine kinetische Aktivität zu vermerken ($0,015 \Delta A/\text{min}$).

Das Ergebnis dieser Untersuchung belegt, dass das hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein nicht enzymatisch aktiv ist. Erwartungsgemäß hätte das Fusionsprotein eine ähnliche Aktivität wie das monoklonale MPO zeigen müssen, allerdings ist die Aktivität vergleichbar mit der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 26).

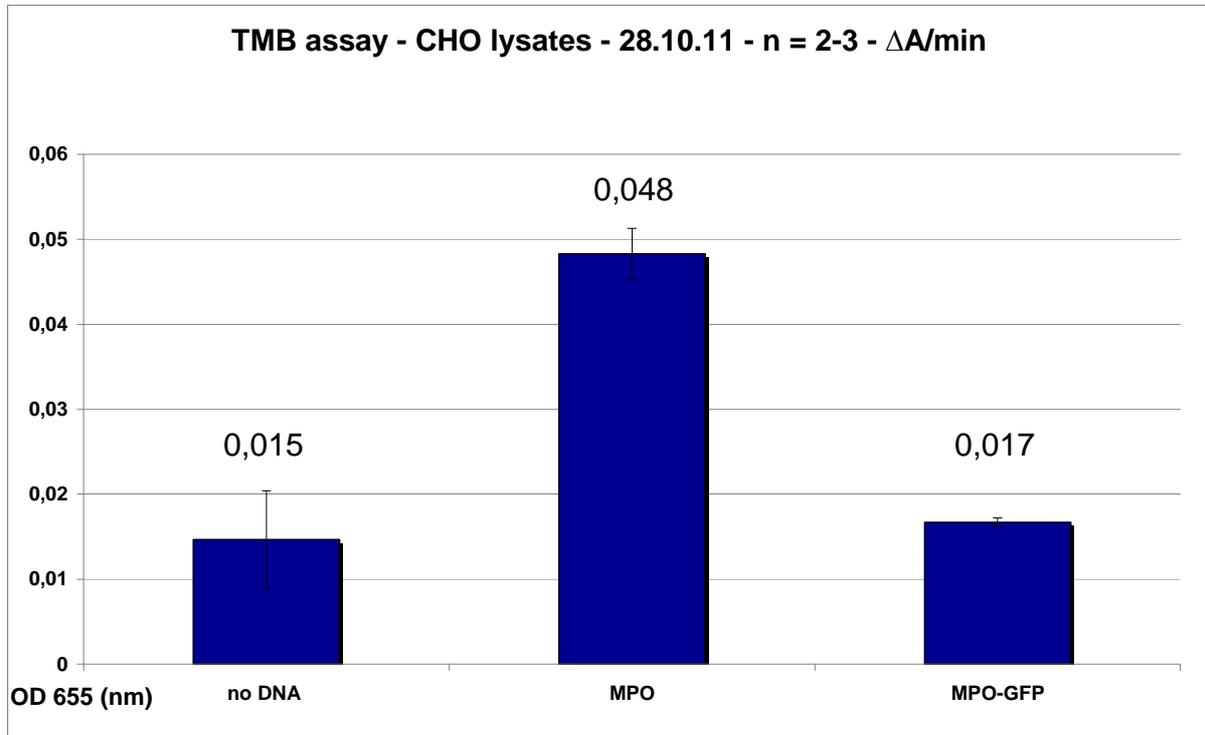


Abb. 26: TMB Assay Säulendiagramm der CHO-Zellen Lysate. In dieser Darstellung ist auf der X-Achse die Absorption bei 655 nm versus die Zeit auf der Y-Achse aufgetragen. Das monoklonale MPO zeigt eine deutliche Aktivität von 0,048 $\Delta A/\text{min}$ (100 %) während für das hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein keine Aktivität zu vermerken ist (0,017 $\Delta A/\text{min}$). Die Lysate ohne DNA (Kontrolle) zeigen auch keine stärkere Absorption (0,015 $\Delta A/\text{min}$). Der Aktivitätsbalken des funktionstüchtigen hMPO-hPtGFP-Fusionsproteins hätte ähnlich hoch sein sollen wie die des monoklonalen MPOs. Mittelwert \pm Standardabweichung. OD: optische Dichte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen insgesamt, dass die Herstellung eines hMPO-hPtGFP-Fusionsproteins, ihre Transformation in *E. coli* Bakterienzellen und Transfektion in CHO-Zellen gelungen ist. Nach Entfernen des Stop-Codons konnte das hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein auch exprimiert werden wie es sich im MPO-Western Blot zeigte, allerdings ist kein GFP-Signal vorhanden. Zusätzlich bleibt die mittels TMB Assay photometrisch bestimmte Aktivität des MPOs im hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein aus.

4 Diskussion und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in Produktion und Charakterisierung eines hMPO-ptGFP-Fusionsproteins aus CHO-Zellen, welches ein Teilprojekt in meiner Arbeitsgruppe der Experimentellen Kardiologie im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf war. Im Folgenden soll die Bedeutung der wichtigen Erkenntnisse dargestellt und in den aktuellen Forschungsstand eingefügt werden.

4.1 Problemstellung und experimenteller Ansatz

Bisher sind nur wenige Studien veröffentlicht, die sich mit der Entwicklung einer rekombinanten Myeloperoxidase beschäftigen. Es sind bislang keine Studien zu Markierungsversuchen des Enzyms publiziert. Das Enzym kommt in neutrophilen Leukozyten vor und spielt wegen seiner bakteriziden Wirkung eine wichtige Bedeutung in der unspezifischen Immunabwehr (Klebanoff et al. 1984). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Blutspiegel von MPO und dem Risiko für schwerwiegende unerwünschte kardiale Ereignisse gibt (Baldus et al. 2003; Brennan et al. 2003). MPO trägt wesentlich zur Plaquevulnerabilität bei (Nicholls und Hazen 2005) und die chlorierten Verbindungen, die bei von MPO katalysierten Reaktionen entstehen, erlauben Aussagen über die Krankheitsprogression. Eine MPO-GFP-Verbindung ist ein sehr sinnvolles Konstrukt um ein wertvolles Werkzeug für die experimentelle Forschung zu generieren. Es wäre dadurch möglich die Lokalisation von MPO z.B. in der Maus in verschiedenen Krankheitsmodellen leichter zu analysieren und neue Erkenntnisse hinsichtlich der Therapiemaßnahmen zu gewinnen. Aktuell steht vor allem die Entwicklung von therapeutisch nützlichen MPO-Inhibitoren im Mittelpunkt des Interesses, denn spezifische und potente MPO-Inhibitoren könnten das Risiko an Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu erleiden, minimieren (Malle et al. 2007). Bekannte MPO-Inhibitoren wie die Lipidsenker werden in der Therapie der Risikofaktoren von Arteriosklerose erfolgreich eingesetzt (Stenvinkel et al. 2006; Zhou et al. 2006; Kumar und Reynolds 2005).

In dieser Arbeit wurde MPO mit dem Fusionsprotein GFP markiert. Das MPO wurde an das C-terminale Ende des GFPs fusioniert und das daraus resultierende hMPO-

hPtGFP-Plasmid in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Auf diese Weise konnten die hMPO-ptGFP Konstrukte vervielfältigt werden, so dass sie alle identisch mit der Ausgangsvektor-DNA waren. Die Transfektion erfolgte in einer eukaryotischen Zellreihe, einer chinesischen Hamster-Eierstock-Zellreihe (CHO-Zellen). Im Einzelnen folgten weitere Untersuchungsmethoden wie z.B. die Proteinbestimmung, Westernblotanalysen, Immunfluoreszenz- und Aktivitätsassays zur Detektierung des Fusionsproteins. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Expression des hMPO-hPtGFP-Fusionsproteins im Western Blot zwar nachgewiesen werden konnte, aber in vivo in Zellen keine bzw. kaum GFP-Fluoreszenz ersichtlich ist. Die enzymatische Aktivität von MPO ist durch die Fusion mit GFP auch verloren gegangen. Als Ursache dafür kommen Faltungsprobleme in Frage, die sowohl das fehlende GFP-Signal als auch die fehlende MPO-Aktivität erklären. Insgesamt kann dieses Konstrukt leider nicht für weitere in-vivo-Untersuchungen verwendet werden. Sinnvoll ist ein anderer Ansatz zur Verbesserung der Fusionierung mit MPO.

4.2 Expression in eukaryontischen Zellen

Eukaryontische Wirtszellen sind für die funktionelle Expression von solchen eukaryontischen Proteinen geeignet, die eine spezifische posttranslationale Modifikation benötigen. So sind CHO-Zellen (Mack et al. 1998; Nibbs et al. 1997; Samson et al. 1996) mit dem hMPO-hPtGFP-Konstrukt transfiziert worden. Der Erfolg der Nanofektamin-Transfektion konnte fluoreszenzmikroskopisch bestimmt werden. Es waren einige leuchtende CHO-Zellen zu sehen, die das rekombinante Gen aufgenommen und exprimiert haben. Da nicht alle Zellen geleuchtet haben, sondern nur einzelne, kann man davon ausgehen, dass vermutlich nur einige der hMPO-hPtGFP-Konstrukte funktional waren. Fusionierungsversuche von MPO mit anderen fluoreszierenden Proteinen wie zum Beispiel Cyan Fluorescent Protein (CFP) müssten in Zukunft unternommen werden, um zu sehen, ob diese MPO-Fusionsproteine funktionieren.

Auf der anderen Seite kann es auch sein, dass die posttranslationale Proteinmodifikation (PTM) in den CHO-Zellen zu mistranslatierten Proteinen geführt hat. Falsch gefaltete Polypeptidketten und fehlerhafte Proteinmodifikationen führen zu Proteinen, die ihre vorgesehene Funktion nicht erfüllen können. So ist es möglich, dass das stark kationisch geladene MPO in Kombination mit dem positiv geladenen

GFP falsch gefaltet wird. Die meisten Fusionsproteine sind entweder negativ geladen oder neutral (Dr. D. Lau – persönliche Kommunikation) und durch die Interaktion mit anders geladenen Proteinen kann es zu falschen Proteinfaltungen kommen.

Um die Auswirkungen der Posttranslationalen Proteinmodifikationen genauer einschätzen zu können, sind in Zukunft weitere Transfektionsversuche in andere eukaryontische Zellen wie z.B. in HEK-293 (human embryonic kidney)-Zellen nötig (Zaballos et al. 1999; Yamagami et al. 1994). Weitere Transfektionsmethoden wie z.B. physikalische Verfahren (Mikroinjektion) sind ebenfalls in Erwägung zu ziehen um die Transfektionseffizienz zu erhöhen. In dieser Arbeit konnten nach erfolgter Nanofektamin-Transfektion mehrere grün leuchtende CHO-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ersichtet (vgl. Abb. 23 und 24) und der Proteingehalt im BCA Proteinassay in den transfizierten Zellen erfolgreich bestimmt werden. Im weiteren Verlauf zeigte sich in den Western-Blot Analysen, dass das GFP zwar exprimiert wurde, da die MPO-Bande im Fusionsprotein um 30 kDa (Größe des GFPs) höher lief als die des Kontrollproteins, jedoch das GFP nicht durch den GFP-Antikörper nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 20).

Denkbar wäre, dass aufgrund eines Protein-Prozessierungsproblems das GFP von MPO abgespalten und in den CHO-Zellen teilweise abgebaut wird. Es ist deshalb auch vorstellbar, dass MPO in der CHO-Zelle aktiv wird und durch seine schädlichen Produkte wie HOCl zum Abbau von GFP führt bzw. dessen Genexpression verhindert. Jedoch belegen die Ergebnisse der hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein-Aktivitätsmessung mit TMB diesen Zusammenhang nicht, denn das hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein zeigte keine enzymatische Aktivität. Die genauen Mechanismen und Vorgänge in der Zelle sind hierzu bislang unklar und bieten daher mögliche Schwerpunkte für die zukünftige Forschung. Es wäre für weitere Studien sehr interessant zu untersuchen, ob der Einbau von GFP am Anfang der Proteinsequenz von MPO (N-Terminal) und die Überprüfung und Validierung des rekombinanten hPtGFP-hMPO auf seine Eigenschaften in transfizierten eukaryotischen Zellen eventuell erfolgversprechender sind. Eine weitere Möglichkeit der Markierung von MPO besteht in der Kopplung von bestimmten Gruppen der MPO-Untereinheiten mit radioaktiven Verbindungen. Eine solche Herangehensweise setzt aufwendige Methoden und bedenkliches Arbeiten mit Radionukliden voraus.

4.3 Ausblick und weiterführende Arbeiten

Aus den Ergebnissen dieser Dissertation zur Markierung humaner Myeloperoxidase zur Detektierung des Fusionsproteins kann man Vermutungen anstellen, weshalb das Fusionsprotein nicht (ausreichend) exprimiert und nachgewiesen werden konnte. Unter dem Fluoreszenzmikroskop waren nämlich einige mit dem hMPO-hPtGFP-Plasmid erfolgreich transfizierte und grün leuchtende Zellen wie in den Fluoreszenzmikroskopaufnahmen in Abbildung 22 bis 24 ersichtlich. Möglicherweise war die Anzahl der erfolgreich transfizierten Zellen zu gering, so dass kein Bandensignal ersichtlich war. Denkbar ist am ehesten, dass die Faltung des Proteins in seine definierte räumliche Struktur nicht fehlerfrei erfolgte. Fehlgefaltete Proteine sind nicht funktionsfähig und können nicht detektiert werden bzw. aktiv sein.

So konnte das hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein zwar exprimiert werden, aber durch die fehlerhafte dreidimensionale Faltung verliert GFP seine Eigenschaft zu leuchten und durch diese Veränderung der Struktur kann das Epitop auf GFP, welches normalerweise durch anti-GFP-Antikörper identifiziert wird, nicht mehr erkannt werden. Diese Konformationsänderung könnte ebenfalls dazu führen, dass MPO im hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein nicht mehr aktiv sein kann. Der genaue Prozess der Proteinfaltung und der Aminosäureabfolge ist nicht abschließend geklärt, eventuell kommt es aufgrund der ungewöhnlich hohen Menge an positiv geladenen Aminosäuren in MPO zu einer Inaktivierung des Enzyms. Da aber die positiv geladenen Aminosäuren in MPO für seine enzymatische Aktivität wichtig sind, ist diese Begründung eher unwahrscheinlich. Es könnte aber auch sein, dass das relativ neutral geladene GFP die Gesamt-Ladung des hMPO-hPtGFP-Fusionsproteins verändert und dadurch die Faltung von MPO verändert ist, so dass das aktive Zentrum nicht mehr richtig gefaltet wird.

Vorstellbar ist auch ein schneller Abbau des GFPs aus dem Fusionsprotein in den CHO-Zellen, so dass keine Expression des Proteins möglich ist, aber diese Vermutung wird anhand der Western Blot Ergebnisse, die zeigen, dass das hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein um 30 kDa höher läuft, widerlegt. Das hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein wird gebildet, aber vermutlich nicht richtig dreidimensional gefaltet. Welche Mechanismen genau hinter diesen Beobachtungen stecken, ist noch unzureichend geklärt und könnte die wissenschaftliche Grundlage für neue Doktorarbeiten bilden.

Weiterhin ist anzunehmen, dass MPO durch seine Eigenschaften und Funktion als Fusionsprotein ungeeignet ist. Es gibt Proteine, deren Faltung vor allem für die Aktivität bzw. Funktion wichtig ist und sie deshalb nicht als Fusionsprotein exprimiert werden können. Da es sich dabei um ein negatives Ergebnis handelt, gibt es kaum Literatur dazu.

Schlussfolgernd lässt sich somit feststellen, dass das rekombinante hMPO-hPtGFP-Konstrukt nicht funktionell und somit nicht geeignet ist für weitere Analysen von MPO. Aus diesen Gründen haben wir davon abgesehen experimentelle Untersuchungen in Zellen und im Mausmodell durchzuführen und das rekombinante Protein auf seine weiteren Funktionen zu überprüfen. Sinnvoller erscheint hier die genaue Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen und Vorgänge von MPO (ohne GFP) auf zellulärer Ebene, die bislang auf diese Weise noch nicht gegeben sind, aber in Zukunft möglich sein könnten.

Viele weitere neue Fragestellungen und Erkenntnisse ergeben sich aus dieser Arbeit. Zunächst kann man annehmen, dass das MPO ein nicht zu fusionierendes Protein ist und folglich neue Methoden und Überlegungen für die Charakterisierung und Funktionsanalyse sowie für den Einsatz im Mausmodell in Betracht gezogen werden müssen. Weiterhin ist es wichtig, dass die Eigenschaften von MPO genau untersucht werden, um Aussagen über die Funktion machen zu können und mehr über seine Beteiligung in zellulären Prozessen zu erfahren. Die hier versuchte Fusion von MPO mit GFP ist leider nicht funktionell. Andere Marker, wie z.B. Protein A, 6xHis, Flag etc. könnten aufgrund ihrer Größe (alle kleiner als 30 kDa) möglicherweise zum Erfolg führen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende experimentelle Arbeit beschreibt zum ersten Mal die Herstellung eines rekombinanten hMPO-hPtGFP-Fusionsproteins in einer CHO-Zelllinie. In einer bisher veröffentlichten Studie von Nicole Moguevsky et al. 1991 wird rekombinantes MPO im Vergleich zu natürlichem Enzym lediglich auf seine Eigenschaften und biologische Aktivität untersucht.

In dieser Arbeit konnte MPO mit GFP fusioniert und anschließend in *E. coli* Bakterienzellen kloniert werden. Die so hergestellten hMPO-hPtGFP-Konstrukte wurden in CHO-Zellen transfiziert und von einzelnen Zellen exprimiert. Als grün leuchtende Einheiten waren sie unter dem Fluoreszenzmikroskop darstellbar.

Das Enzym Myeloperoxidase, welches in den Granula von Neutrophilen und geringfügig auch in Monozyten gespeichert ist, hat einen bedeutenden Einfluss auf den Gefäßtonus sowie die Myokardperfusion und es spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen und in verschiedenen inflammatorischen und atherosklerotischen Prozessen. Es ist ein sehr komplex aufgebautes Protein und besitzt Eigenschaften, die die Markierung des Enzyms erschweren. Ein Grund hierfür könnte die stark positive Ladung von MPO sein, die wiederum von Bedeutung ist für die regelrechte Faltung des Hämproteins. Die meisten Fusionsproteine sind negativ geladen. Das GFP, welches in dieser Arbeit als Fusionsprotein dient, hat zumindest eine neutrale Ladung. Dennoch entsteht bei der Markierung von MPO mit GFP eine Kombination, die als ungeeignet anzunehmen ist.

Das hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein wird exprimiert, allerdings ist das GFP floureszenzmikroskopisch nicht nachweisbar und MPO zeigt keine enzymatische Aktivität. Rekombinant markiertes MPO könnte weiteren Aufschluss über die Funktion von MPO geben. So könnte rekombinant markiertes MPO ex vivo auf Zellen gegeben und die Aufnahme von MPO in die Zellen verfolgt werden. Weiterhin könnte es in Mäuse injiziert, die Lokalisation im Endothel/Gefäß beobachtet und die Auswirkungen lokal untersucht werden. Das hMPO-hPtGFP-Konstrukt dient eher der Aufklärung der Lokalisation und Funktion von MPO als der Etablierung als Biomarker.

Zusammenfassend kann man aus den Ergebnissen dieser experimentellen Arbeit schließen, dass die anfänglich aufgestellte Hypothese der Herstellung einer GFP-markierten Myeloperoxidase teilweise gelungen ist, da MPO-GFP zwar von CHO-

Zellen exprimiert wird, aber leider das GFP nicht nachweisbar und die MPO nicht enzymatisch aktiv ist. In hierauf folgenden Experimenten könnte MPO idealerweise so markiert sein, dass es für die Beobachtung von zuvor unsichtbaren Prozessen, in denen das Hämprotein in der Zelle verwickelt ist, eingesetzt wird.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACS	(Acute coronary syndrome) akutes Koronarsyndrom
AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
BSA	(bovine serum albumin) Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
BNP	B-natriuretisches Peptid
BrCl	Bromchlorid
Br ₂	Brom
Br ⁻	Bromidanion
BCA	Bicinchoninsäure
Bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius (Einheit)
ca.	circa
Ca ⁺⁺	Kalzium-Ionen
CAD	(Coronary Artery Disease) koronare Herzerkrankheit
CFP	(Cyan Fluorescent Protein) cyan fluoreszierendes Protein
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHO	(Chinese Hamster Ovary) chinesische Hamsterovarialzellen
CK	Kreatinkinase
CK-MB	Kreatinkinase-MB (Muscle, Brain), herzspezifisch
Cl ⁻	Chloridanion
Cl ₂	Chlor
CMV	Cytomegalievirus
-COOH	Carboxygruppen

CRP	C-reaktives Protein
CVD	(Cardiovascular Disease) kardiovasculäre Erkrankung
ddH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
dl	Deziliter (Einheit)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	(Enhanced chemiluminescence) ECL- Detektionsreagenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHN	European Heart Network
EKG	Elektroardiogramm
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
ESC	European Society of Cardiology
EtOH	Ethanol
FABP	Fatty acid-binding protein
FBS	(Fetal bovine serum) fetales Kälberserum
FGR	Framingham Risk Score
g	Gramm (Einheit)
GFP	(Green Fluorescing Protein) Grün fluoreszierendes Protein
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPBB	Glykogenphosphorylase BB
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff

HDL	High-Density-Lipoproteine
HEK-293	(human embryonic kidney)-Zellen
HF buffer	High-Fidelity-Puffer
HLP	Hyperlipoproteinämie
HOBr	Hypobromit
HOCl	hypochlorige Säure, Hypochlorid
hPtGFP	Grün fluoreszierendes Protein aus <i>Ptilosarcus gurneyi</i>
hsCRP	hochsensitives C-reaktives Protein
Ig G	Immunglobulin G
IMA	Ischämie modifiziertes Albumin
IP3-Rezeptoren	Inositol-1,4,5-trisphosphonat- Rezeptoren
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilodalton (Einheit)
kg	Kilogramm (Einheit)
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter (Einheit)
LB-Amp.	(lysogeny broth) Nährmedium mit Ampicillin
LB-Medium	(lysogeny broth) Nährmedium
LDL	Low-Density-Lipoprotein
µg	Mikrogramm (Einheit)
µl	Mikroliter (Einheit)
µM	Mikromolar (Einheit)
mg	Milligramm (Einheit)
mg/ml	Milligramm pro Milliliter (Einheit)
min	Minuten (Einheit)
ml	Milliliter (Einheit)
mm	Millimeter (Einheit)
mM	Millimolar (Einheit)
MPO	Myeloperoxidase
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat

NaOAc	Natriumacetat
-NH ₂	Aminogruppe
nm	Nanometer (Einheit)
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₂	Stickstoffdioxid
O ₂ ⁻ Superoxid	Dioxid(1-)-Anion
OBr ⁻	Hypobromit-Ionen
OCl ⁻	Hypochlorit-Ionen
OD	Optische Dichte
oxLDL	oxidiertes Low-Density-Lipoprotein
PBS	(phosphate buffered saline) phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	(Polymerase Chain Reaction) Polymerase-Kettenreaktion
pH	pH-Wert
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
PTM	posttranslationale Proteinmodifikation
rep	Replikationsursprung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	revolutions per minute – Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
sek.	Sekunden (Einheit)
SF-Medium	(serum-free) serumfreies Medium
sog.	sogenannte
Taq	Thermus aquaticus (Bakterium)
TBE-Puffer	TRIS (Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan)-Borat (Anion)

	der Borsäure)-EDTA
	(Ethylendiamintetraessigsäure)-Puffer
TBST	(Tris-Buffered Saline) Tris-gepufferte Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIA	Transitorisch ischämische Attacke
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem/unter anderen; und andere
U/ μ l	Units pro Mikroliter (Einheit)
V	Volt (Einheit)
VE-H ₂ O	(„voll entsalztes Wasser“) destilliertes Wasser
Vgl.	Vergleiche
WBC	white blood cells
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die dreidimensionale Struktur eines MPO-Homodimers.	5
Abbildung 2: Die enzymatische Reaktion des Halogenierungs-Zyklus von MPO während des oxidativen Burst der Neutrophilen Granulozyten.....	6
Abbildung 3: MPO und seine Reaktionen.	7
Abbildung 4: NO-bedingter Vasodilatationsmechanismus.	8
Abbildung 5: Darstellung der Odds Ratios für Leukozyten-MPO und Blut-MPO, WBC (white blood cells) und CRP-Spiegel vor (unbereinigt) und nach (Modelle 1 und 2) der Anpassung mit traditionellen Risikofaktoren und FGR (Framingham Risk Score).....	21
Abbildung 6: MPO-Serumspiegel und kardiales Risiko.	22
Abbildung 7: 100 bp und 1 kb DNA Marker.....	25
Abbildung 8: Die Komponenten des pUC18 humanized GFP-Ausgangsplasmids.....	46
Abbildung 9: Restriktionsmappe des Ausgangsplasmids pcDNA 3.1+ hMPO cDNA bestehend aus 7669nt.	47
Abbildung 10: Gelelektrophoretische Aufnahme des präparativen Verdaus der Template-DNA pUC18 humanized GFP mit der Restriktionsendonuklease <i>NotI</i>	48/49
Abbildung 11: Die GFP-Banden des präparativen Verdaus nach dem Herausschneiden mit dem Skalpell unter UV-Licht.	49
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Klonierung eines pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP- Plasmids mit Restriktion und Ligation.	50
Abbildung 13: Restriktionsmappe der pcDNA 3 hMPO-EGFP mit 8398 nt.	51
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Transformation vom rekombinanten pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP-Plasmid in eine <i>E. coli</i> Bakterienzelle und anschließender Antibiotika-Selektion auf LB-Platten mit Ampicillin.....	52
Abbildung 15: Die Analyse der Gelelektrophorese ergibt das oben eingefügte Bild.	53/54
Abbildung 16: Ergebnis des Restriktionsverdaus aller drei transformierten Kolonien mit den Restriktionsendonukleasen <i>KpnI</i> (1, 4, 7), <i>SpeI</i> (2, 5, 8) und <i>PstI</i> (3, 6, 9).	54/55

Abbildung 17: Sequenz aus der Restriktionskarte vom hMPO-hPtGFP-Plasmid zur Analyse der DNA-Abschnitte.....	56
Abbildung 18: Darstellung von Proteinen aus den ohne DNA, mit MPO-GFP und nur mit MPO transfizierten Zellen im Western Blot mit einem MPO-Antikörper.	57
Abbildung 19: Sequenz aus der Restriktionskarte vom hMPO-hPtGFP-Plasmid nach der gezielten Mutagenese.	58
Abbildung 20: Das Ergebnis des Western Blots nach Behandlung der Membran mit Anti-MPO.	60
Abbildung 21: Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine im Western Blot.	61
Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-exprimierenden CHO-Zellen.....	62
Abbildung 23: CHO-Zellen 48 Stunden nach der Nanofektamin-Transfektion mit 4 µg pcDNA3.1-hMPO-hPtGFP-Plasmid unter dem Fluoreszenzmikroskop.	62
Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Darstellung der mit GFP-transfizierten CHO-Zellen gegenüber den mit dem hMPO-hPtGFP-Plasmid transfizierten CHO-Zellen.	63
Abbildung 25: Küvetten zum Messen der Extinktion (OD) vom MPO-Enzym und hMPO-hPtGFP-Fusionsprotein sowie einer Kontrollgruppe bei einer Wellenlänge von 655 nm.....	64
Abbildung 26: TMB Assay Säulendiagramm der CHO Lysate.	65

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TBE Rezepte, Agarosegel und DNA Marker.	24-25
Tabelle 2:	PCR und Primer.	26-27
Tabelle 3:	LB-Nährmedium..	27-28
Tabelle 4:	<i>E. coli</i> Bakterien, Verdauung und DNA-Aufreinigung sowie Ligation..	29-33
Tabelle 5:	CHO-Zellen..	33-35
Tabelle 6:	Transfektion.....	35-37
Tabelle 7:	Proteinbiochemische Methoden und SDS-PAGE Gele.	37-40
Tabelle 8:	Western Blot und Antikörper.....	40-43

9 Literaturverzeichnis

Abu-Soud HM and Hazen SL. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem*, 275:5425–5430, 2000.

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

Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Dinauer MC, Maeda N, and Koyama H. Critical role of myeloperoxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J Infect Dis*, 185:1833–1837, 2002.

Arnhold, J, Furtmüller, Paul G: Redox properties of the couple compound I/native enzyme of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Eur J Biochem*, 268:5142-5148, 2001.

Askari AT, Brennan ML, Zhou X, Drinko J, Morehead A, Assmann G, Schulte H, Cullen P: New and classical risk factors – the Münster heart study (PROCAM). *Eur J Med Res*, 2:237–42, 1997.

Askari AT, Brennan ML, Zhou X, Drinko J, Morehead A, Thomas JD, Topol EJ, Hazen SL, Penn MS. Myeloperoxidase and Plasminogen Activator Inhibitor 1 Play a Central Role in Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. *J. Exp. Med.* 197, 615–624, 2003.

Baldus S, Eiserich JP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, Ma W, Tousson A, White R, Bullard DC, Brennan ML, Lusis AJ, Moore KP, and Freeman BA. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest*, 108:1759-1770, 2001.

Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM. Eiserich JP, Munzel T, Simoons ML, and Hamm CW. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 108(12):1440–1445, 2003.

Baldus S, Heitzer T, Eiserich JP, Lau D, Mollnau H, Ortak M, Petri S, Goldmann B, Duchstein HJ, Berger J, Helmchen U, Freeman BA, Meinertz T, Münzel T. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 15; 37(6):902-11, 2004.

Baldus S, Köster R, Chumley R, Heitzer T, Rudolph V, Mir OA, Warnholtz A, Staude HJ, Thuncke F, Koss K, Berger J, Meinertz T, Freeman BA, Münzel T. Oxypurinol improves coronary and peripheral endothelial function in patients with coronary artery disease. *Free Radical Biology and Medicine* 39, 1184– 1190, 2005.

Baldus S, Rudolph V, Roiss M, Ito W, Rudolph T, Eiserich J, Sydow, K, Lau D, Szoecs K, Klinke A, Kubala L, Berglund L, Schrepfer S, Deuse T, Haddad M, Risius

T, Klemm H, Reichenspurner H, Meinertz, T. "Heparins increase endothelial nitric oxide bioavailability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase." *Circulation*, 113(15):1871-1878, 2006.

Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med*, 75, 165-73, 1997.

Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, et al. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation*, 99:855-60, 1999.

Brennan ML, Anderson MM, Shih DM, Qu XD, Wang X, Mehta AC, Lim LL, Shi W, Hazen SL, Jacob JS, Crowley JR, Heinecke JW, and Lusis AJ. Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. *J Clin Invest*, 107:419-430, 2001.

Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlan ES, Topol EJ, Nissen SE, and Hazen SL. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med*, 349: 1595-1604, 2003.

Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, and Parker J. *Biology of Microorganisms*. Seventh Edition. Prentice Hall, Inc., Englewood Cliffs, USA, 1994.

Brockhaus ABC Chemie, VEB F. A. *Brockhaus Verlag Leipzig*. S. 1031-1033, 1965.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 10; 87(10):840-4, 2000.

Chen HD and Frankel G. "Enteropathogenic Escherichia coli: unravelling pathogenesis." *FEMS Microbiol Rev*, 29(1): 83-98, 2005.

Chhatriwalla AK, Nicholls SJ, Wang TH, Wolski K, Sipahi L, Crowe T, Schoenhagen P, Kapadia S, Tuzcu EM, Nissen SE. Low levels of low-density lipoprotein cholesterol and blood pressure and progression of coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 53:1110-1115, 2009.

Choi DK, Pennathur S, Perier C, Tieu K, Teismann P, WuDC, Jackson-Lewis V, Vila M, Vonsattel JP, Heinecke JW, and Przedborski S. Ablation of the inflammatory enzyme myeloperoxidase mitigates features of Parkinson's disease in mice. *J Neurosci*, 25: 6594-6600, 2005.

D'Agati V. Antineutrophil cytoplasmic antibody and vasculitis: much more than a disease marker. *J Clin Invest*, 110(7): 919-921, 2002.

Davies MJ, Hawkins CL, Pattison DI, and Rees MD. Mammalian heme peroxidases: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*, 10: 1199-1234, 2008.

Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation*, 94(8):2013-2020, 1996.

De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancina G, Manger Cats V, Orth-Gomér K, Perk J, Pyörälä K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, Wood D; Third Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. Executive summary. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. 3rd Joint Task Force of European and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice. *Eur Heart J*, 24: 1601–10, 2003.

De Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Mazzucchelli I, Fossati G, Gritti D, Angoli L, Specchia G. "Clinical and angiographic correlates of leukocyte activation in unstable angina." *J Am Coll Cardiol*, 26(5): 1146-1150, 1995.

Deby-Dupont G, Deby C, Lamy M. Neutrophil myeloperoxidase revisited: it's role in health and disease. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, Volume 36, Issue 6, pp 500-513, 1999.

Der Europäische Gesundheitsbericht 2012: Ein Wegweiser zu mehr Wohlbefinden. WHO, 2014.

Duzguncinar O, Yavuz B, Hazirolan T, Deniz A, Tokgozoglu SL, Akata D, Demirpence E. Plasma myeloperoxidase is related to the severity of coronary artery disease. *Acta Cardiologica*, 63(2), 147-152, 2008.

Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, and van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*, 391: 393–397, 1998.

Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Luscis AJ, Nauseef WM, White CR, and Freeman BA. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science*, 296: 2391–2394, 2002.

Erdmann E. Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 295 – 353, 2000.

Faggiotto A and Ross R. "Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque." *Arteriosclerosis*, 4(4): 341-356, 1984.

Feig JE: High-density lipoprotein and atherosclerosis regression: evidence from preclinical and clinical studies. *Circ Res*, 3; 114(1):205-13, 2014.

Fenna R, Zeng J, Davey C. Structure of the Green Heme in Myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.*, 316(1):653-6, 1995.

Fernandes RM, da Silva NP, Sato EI, Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 32(6):1605-9, 2012.

Fowler JH and Christakis NA: Dynamic spread of happiness in a large social network: longitudinal analysis over 20 years in the Framingham Heart Study. *BMJ*, 337:a2338, 2008.

Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, Shan K, Aggeli C, Reardon M, Letsou GV, Espada R, Ramchandani M, Entman ML, Zoghbi WA. Active Interstitial Remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J. Am. Coll. Cardiol*, 39: 1468-1474, 2002.

Friedman GD, Klatsky AL, and Siegelau AB. The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 290(23):1275–1278, 1974.

Furtmüller PG, Burner U, Jantschko W, Regelsberger G, Obinger C The reactivity of myeloperoxidase compound I formed with hypochlorous acid. *Redox Rep*, 5, 173–178, 2000.

Furtmüller PG, Zederbauer M, Jantschko W, Helm J, Bogner M, Jakopitsch C, and Obinger C. Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. *Arch Biochem Biophys*, 445: 199–213, 2006.

Galijasevic, S, Saed GM, Diamond MP und Abu-Soud HM. Myeloperoxidase upregulates the catalytic activity of inducible nitric oxide synthase by preventing nitric oxide feedback inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 14766-14771, 2003.

Galvani M, Ferrini D, Ghezzi F, Ottani F. "Cardiac markers and risk stratification: an integrated approach." *Clin Chim Acta*, 311(1): 9-17, 2001.

Gamze K, Mehmet HM, Deveci F, Turgut T, Ilhan F, Ozercan I. Effect of bosentan on the production of proinflammatory cytokines in a rat model of emphysema. *Exp Mol Med*, 39(5):614-20, 2007.

Gebbers JO. Atherosclerosis, cholesterol, nutrition, and statins – a critical review. *Ger Med Sci*, 5, 2007.

Geurts JJ, Barkhof F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 7: 841-51, 2008.

Gordon D, Reidy MA, Benditt, EP & Schwartz SM. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 87, 4600–4604, 1990.

Gottesman S, Trisler P, Torres-Cabassa AS. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-12: characterization of three regulatory genes. *J.Bacteriol.*, 162:1111-1119, 1985.

Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R, u. a. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary: European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. Fourth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *Eur Heart J*, 28(19):2375-2414, 2007.

Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, and Heinecke JW. Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 90: 724–733, 2004.

Gui T, Shimokado A, Sun Y, Akasaka T, and Muragaki Y. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators of inflammation*. Volume 2012, 14 pages, 2012.

Hahn H, Kaufmann S HE, Schulz TF, Suerbaum S. Medizinische Mikrobiologie Und Infektiologie. 6. Auflage. Springer, ISBN 978-3-540-46359-7, S. 241f, 2008.

Hallett MB and Williams AS. Stopping the traffic: a route to arthritis therapy. *Eur J Immunol*, 38: 2650–2653, 2008.

Hamm, C. "Acute coronary syndrome: the struggle for the best in risk stratification and therapy." *Eur Heart J*, 23(14): 1074-1076, 2002.

Hampton MB, Kettle AJ, and Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92: 3007–3017, 1998.

Hansen PR. Inflammatory alterations in the myocardial microcirculation. *J. Mol Cell. Cardiol.*, 30:2555–2559, 1998.

Hansson GK, Robertson AK, and Soderberg-Naucler C. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, 1:297–329, 2006.

Hazen SL and Heinecke JW. 3-chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest.*, 99: 2075-2081, 1997.

Hazen SL, Hsu F, Heinecke JW. P-Hydroxyphen-ylacetaldehyde ist he major product of L-tyrosine oxidation by activated human phagocytes. *J Biol Chem*, 271: 1861-1867, 1996.

Hazen SL: Myeloperoxidase and Plaque Vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 24(7):1143-6, 2004.

Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, 3: 291-301, 2002.

Henderson JP, Byun J, Takeshita J, and Heinecke JW. Phagocytes produce 5-chlorouracil and 5-bromouracil, two mutagenic products of myeloperoxidase, in human in-inflammatory tissue. *J Biol Chem*, 278: 23522–23528, 2003.

Heslop CL, Frohlich JJ, Hill JS. Myeloperoxidase and C-reactive protein have combined utility for long-term prediction of cardiovascular mortality after coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*, 55:1102-9, 2010.

Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager M A, Jonathan. ACC/AHA 2005 practice guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop

Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease). *Circulation*, 113: e463–654, 2006.

Hung T, Mak K, and Fong K. A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, 18(16), 4953, 1990.

Jacobson K, Mundra H, Innis SM. Intestinal responsiveness to experimental colitis in young rats is altered by maternal diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 289: G13-20, 2005.

Jayapal KP, Wlaschin KF, Yap MGS, Hu W-S. Recombinant protein therapeutics from CHO cells - 20 years and counting. *Chem. Eng. Prog.*, 103(7):40-47, 2007.

Jennette JC and Falk RJ. Small-vessel vasculitis. *N Engl J Med*, 337: 1512–1523, 1997.

Johansson MW, Patarroyo M, Oberg F, Siegbahn A, and Nilsson K. Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha m beta 2 integrin (mac-1, cd11b/cd18). *J Cell Sci*, 110 (Pt 9):1133–1139, 1997.

Kannel WB: CHD risk factors: a Framingham study update. *Hosp Pract*, 25: 119–27, 1990.

Karakas M, Koenig W, Zierer A, Herder C, Rottbauer W, Baumert J, Meisinger C, Thorand B. Myeloperoxidase is associated with incident coronary heart disease independently of traditional risk factors: results from the MONICA/KORA Augsburg study. *J Intern Med*, 271:43-50, 2011.

Keil U, Liese AD, Hense HW, Filipiak B, Döring A, Stiebert J, Löwel H: Classical risk factors and their impact on incident non-fatal and fatal myocardial infarction and all-cause mortality in southern Germany. Results from the MONICA Augsburg cohort study 1984–1992. *Eur Heart J*, 19: 1197–207, 1998.

Keller T, Zeller T, Peetz D, Tzikas S, Roth A, Czyz E, Bickel C, Baldus S, Warnholtz A, Fröhlich M, Sinning CR, Eleftheriadis MS, Wild PS, Schnabel RB, Lubos E, Jachmann N, Genth-Zotz S, Post F, Nicaud V, Tiret L, Lackner KJ, Münzel TF, and Blankenberg S. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. *N Engl J Med.*, 361(9):868-877, 2009.

Kendall JM und Badminton MN. *Aequorea victoria* bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends Biotechnol*, 16, 216-224, 1998.

Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kettle AJ, Clark BM, and Winterbourn CC. Superoxide converts indigo carmine to isatin sulfonic acid: implications for the hypothesis that neutrophils produce ozone. *J Biol Chem*, 279: 18521–18525, 2004.

Khan SQ, Kelly D, Quinn P, Davies JE, Ng LL. Myeloperoxidase aids prognostication together with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in high-risk patients with acute ST elevation myocardial infarction. *Heart*, 93:826-31, 2007.

Kim Y, Yoon S, Kim SJ, Kim JS, Cheong JW, Min YH. Myeloperoxidase Expression in Acute Myeloid Leukemia Helps Identifying Patients to Benefit from Transplant. *Yonsei Med J.*, 53(3):530-536, 2012.

Kitahara M, Eyre HJ, Simonian Y, Atkin CL, and Hasstedt SJ. Hereditary myeloperoxidase deficiency. *Blood*, 57: 888– 893, 1981.

Kitahara M, Simonian Y, Eyre HJ. Neutrophil myeloperoxidase: a simple, reproducible technique to determine activity. *J Lab Clin Med*, 93(2):232-7, 1979.

Klebanoff SJ, Waltersdorff AM, Rosen H. Antimicrobial activity of myeloperoxidase. *Methods Enzymol.*, 105: 399-403, 1984.

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

Klebanoff, S.J. "Myeloperoxidase." *Proceedings of the Association of American Physicians* 111, 383–389, 1999.

Klinke A, Nussbaum C, Kubala L, Friedrichs K, Rudolph TK, Rudolph V, Paust HJ, Schröder C, Benten D, Lau D, Szocs K, Furtmüller PG, Heeringa P, Sydow K, Duchstein HJ, Ehmke H, Schumacher U, Meinertz T, Sperandio M, and Baldus S. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood*, 117 (4), 2011.

Koeffler HP, Ranyard J, and Pertcheck M. Myeloperoxidase: its structure and expression during myeloid differentiation. *Blood*, 65: 484–491, 1985.

Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med*, 189: 865-70, 1999.

Kolenda KD. Sekundärprävention der koronaren Herzkrankheit: Effizienz nachweisbar. *Deutsches Ärzteblatt* 102/2005, A1889, 2005.

Kooter IM, Moguilevsky N, Bollen A, Van der Veen LA, Ottoi C, Dekker HL, Wever R. The Sulfonium Ion Linkage in Myeloperoxidase. Direct spectroscopic detection by isotopic labeling and effect of mutation. *J. Biol. Chem.*, 274: 26794-26802, 1999.

Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, and Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol.*, 201: 28–36, 2003.

Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB, and Verspaget HW. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol.*, 201: 17–27, 2003.

Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 88:4651-4655, 1991.

Kumar AP, Reynolds WF. Statins downregulate myeloperoxidase gene expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.*, 331(2):442-51, 2005.

Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, and Gothot A. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit? *Acta Haematol.*, 104: 10–15, 2000.

Lanza F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med*, 76(10):676-81, 1998.

Lau D & Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 111, 16–26, 2006.

Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, Gehling UM, Brummer J, Rudolph V, Münzel T, Heitzer T, Meinertz T, and Baldus S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with cd11b/cd18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(2):431–436, 2005.

Levine MM and Edelman R. "Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis." *Epidemiol Rev*, 6: 31-51, 1984.

Libby P. "Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization." *Am J Cardiol.*, 86(8B): 3J-8J; discussion 8J-9J, 2000.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. "Inflammation and atherosclerosis." *Circulation*, 105(9): 1135-1143, 2002.

Libby, P. "Inflammation and cardiovascular disease mechanisms." *Am J Clin Nutr*, 83(2): 456S-460S, 2006.

Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, and Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.*, 343:1139–47, 2000.

Lindahl B, Venge P, Wallentin L, Troponin T. Identifies patients with unstable coronary artery disease who benefit from long-term anti-thrombotic protection. *JACC*, 29(1):43–8, 1997.

Liu C, Xie G, Huang W, Yang Y, Li P, Tu Z. Elevated Serum Myeloperoxidase Activities are Significantly Associated with the Prevalence of ACS and High LDL-C Levels in CHD Patients. *J Atheroscler Thromb*, 19(5):435-43, 2012.

Mach F, A Sauty, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P and Luster AD. "Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells." *J Clin Invest*, 104(8): 1041-1050, 1999.

Mack M, Luckow B, Nelson PJ, Cihak J, Simmons G, Clapham PR, Signorel N, Marsh M, Stangassinger M, Borlat F, Wells TN, Schlöndorff D and Proudfoot AE. "Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity." *J Exp Med*, 187(8): 1215-24, 1998.

Malle E, Furtmüller PG, Sattler W and Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br. J. Pharmacol.*, 152, 838-854, 2007.

Mangge H. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. *World J Cardiol.*, 6(6):462-77, 2014.

Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21: 361–370, 2000.

Marshall CJ, Nallaratnam M, Mocatta T, Smyth D, Richards M, Elliott JM, Blake J, Winterbourn CC, AJ, McClean DR. Factors influencing local and systemic levels of plasma myeloperoxidase in ST-segment elevation acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 106:316-22, 2010.

Meuwese MC, Stroes ES, Hazen SL, van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub RG, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk prospective population study. *J Am Coll Cardiol.*, 50: 159-165, 2007.

Meyer J. in *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. 5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 297 – 302, 2000.

Misgeld T, Kerschensteiner M. In vivo imaging of the diseased nervous system. Miura M, Fu X, Zhang QW, Remick DG, and Fairchild RL. Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol*, 159: 2137–2145, 2001.

Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, Senthilmohan R, Frampton CM, Richards AM, Winterbourn CC. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 49:1993-2000, 2007.

Moguilevsky N, Garcia-Quintana Ljacquet A, Tournay C, Fabry L, Piérard L, Bollen A. Structural and biological properties of human recombinant myeloperoxidase produced by Chinese hamster ovary cell lines. *Eur J Biochem.*, 197: 605–614, 1991.

Morrow DA, Sabatine MS, Brennan ML, de Lemos JA, Murphy SA, Ruff CT, Rifai N, Cannon CP, Hazen SL. Concurrent evaluation of novel cardiac biomarkers in acute coronary syndrome: myeloperoxidase and soluble CD40 ligand and the risk of recurrent ischaemic events in TACTICS-TIMI 18. *Eur Heart J*, 29:1096-102, 2008.

Mutsaers SE, Foster ML, Chambers RC, Laurent GJ, McAnulty RJ. Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 18(5):611-9, 1998.

Naruko T, M Ueda, Haze K, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh A, Komatsu R, Ikura Y, Ogami M, Shimada Y, Ehara S, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*, 106: 2894-2900, 2002.

Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, Smith RA, Nelson JR, and Reynolds WF. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 78: 97–107, 1997.

Naruko T, Ueda M, Haze K, et al. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*, 106:2894–2900, 2002.

Nataro JP and Kaper JB. "Diarrheagenic Escherichia coli." *Clin. Microbiol. Rev.*, 11(1): 142-201, 1998.

Nauseef WM. Myeloperoxidase biosynthesis by a human promyelocytic leukemia cell line: insight into myeloperoxidase deficiency. *Blood*, 67: 865–872, 1986.

Nauseef WM. Posttranslational processing of a human myeloid lysosomal protein, myeloperoxidase. *Blood*, 70: 1143–1150, 1987.

Nauseef WM. Myeloperoxidase deficiency. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2(1):135-58, 1988.

Nauseef WM. Insights into myeloperoxidase biosynthesis from its inherited deficiency. *J Mol Med*, 76(10):661-8, 1998.

Ndrepepa G, Braun S, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A, and Kastrati A. Myeloperoxidase level in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes. *Eur J Clin Invest*, 38: 90–96, 2008.

Nibbs RJ, Wylie SM, Pragnell IB and Graham GJ. "Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein- 1alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5." *J Biol Chem*, 272(19): 12495-504, 1997.

Nicholls SJ and Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(6):1102–1111, 2005.

Nicholls SJ, Tang WH, Brennan D, Brennan ML, Mann S, Nissen SE, Hazen SL. Risk prediction with serial myeloperoxidase monitoring in patients with acute chest pain. *Clin Chem*, 57:1762-70, 2011.

Nikpoor B, Turecki G, Fournier C, Th eroux P, Rouleau GA. A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians. *Am Heart J*, 142: 336-339, 2001.

Olsson I, Persson AM, and Stromberg K. Biosynthesis, transport and processing of myeloperoxidase in the human leukaemic promyelocytic cell line HL-60 and normal marrow cells. *Biochem J*, 223: 911–920, 1984.

Osamu S, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell and Comparative Physiol.*, 59: 223-239, 1962.

Osterspey A, Jansen W, Tauchert M, Schell V, Fuchs M, Hombach V, Hilger HH. Hämodynamische Wirkung von Molsidomin bei Akutgabe und Langzeitmedikation. *Med Welt*, 34: 523-528, 1983.

Park SH, Saleh D, Giaid A Increased Endothelin-1 in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis and the Effect of an Endothelin Receptor Antagonist. *Am J Respir Crit Care Med.*, 156:600–608, 1997.

Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, and Richar WJ. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med*, 95: 293–301, 1981.

Pawlus J, Holub M, Kozuch M, Dabrowska M, Dobrzycki S. Serum myeloperoxidase levels and platelet activation parameters as diagnostic and prognostic markers in the course of coronary disease. *Int J Lab Hematol*, 32:320-8, 2010.

Peelle B, Gururaja TL, Payan DG, Anderson DC. Characterization and use of green fluorescent proteins from *Renilla mulleri* and *Ptilosarcus guernyi* for the human cell display of functional peptides. *J Protein Chem*, 20(6):507-19, 2001.

Pennathur S, Bergt C, Shao B, Byun J, Kassim SY, Singh P, Green PS, McDonald TO, Brunzell J, Chait A, Oram JF, O'Brien K, Geary RL, and Heinecke JW. Human athero-sclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem*, 279: 42977–42983, 2004.

Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Z, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, Cifkova R, Deaton C, Ebrahim S, Fisher M, Germano G, Hobbs R, Hoes A, Karadeniz S, Mezzani A, Prescott E, Ryden L, Scherer M, Syväne M, Scholte op Reimer WJ, Vrints C, Wood D, Zamorano JL, Zannad F. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*, 33:1635–1701, 2012.

Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, and Hazen SL. Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest*, 103:1547–1560, 1999.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2):229-33, 1992.

Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.*, 108(6):945-956, 1958.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 8567:1057-1058, 1987.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:5193-7, 1990.

Reynolds WF, Chang E, Douer D, Ball ED, Kanda V. An allelic association implicates myeloperoxidase in the etiology of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 90, 2730-2737, 1997.

Reynolds WF, Rhees J, Maciejewski D, Paladino T, Sieburg H, Maki RA, and Masliah E. Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender specific risk for Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 155: 31–41, 1999.

Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL.. "Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events." *Circulation*, 109(25 Suppl 1): IV6-19, 2004.

Ritchey MD, Wall HK, Gillespie C, George MG, Jamal A. Million hearts: prevalence of leading cardiovascular disease risk factors--United States, 2005-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*, 63(21):462-7, 2014.

Robinson CE, Kottapalli V, D'Astice M, Fields JZ, Winship D, and Keshavarzian A. Regulation of neutrophils in ulcerative colitis by colonic factors: a possible mechanism of neutrophil activation and tissue damage. *J Lab Clin Med*, 130: 590–602, 1997.

Ross R. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol*, 143:987-1002, 1993.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis — an update. *N Engl J Med*, 314:488-500, 1986.

Ross, R. Atherosclerosis — an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340: 115-126, 1999.

Rudolph V, Rudolph TK, Hennings JC, Blankenberg S, Schnabel R, Steven D, Haddad M, Knittel K, Wende S, Wenzel J, Münzel T, Heitzer T, Meinertz T, Hübner C, Baldus S. Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic Biol Med.*, 43(8):1189-96, 2007.

Rudolph V, Goldmann BU, Bös C, Rudolph TK, Klinke A, Friedrichs K, Lau D, Wegscheider K, Haddad M, Meinertz T, Baldus S. Diagnostic value of MPO plasma levels in patients admitted for suspected myocardial infarction. *Int J Cardiol.*, 1-5, 2010.

Samsamshariat SZ, Basati G, Movahedian A, Pourfarzam M, Sarrafzadegan N. Elevated plasma myeloperoxidase levels in relation to circulating inflammatory markers in coronary artery disease. *Biomark Med*, 5:377-85, 2011.

Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G and Parmentier M. "Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene." *Biochemistry*, 35(11): 3362-7, 1996.

Sawicki M, Sypniewska G, Kozinski M, Gruszka M, Krintus M, Obonska K, Pilaczynska-Cemel M, Kubica J. Diagnostic efficacy of myeloperoxidase for the detection of acute coronary syndromes. *Eur J Clin Invest*, 41:667-71, 2011.

Schettler G and Morl H. "Etiology and pathogenesis of arteriosclerosis." *Naturwissenschaften*, 65(3): 130-136, 1978.

Schiller J, Fuchs B, Arnhold J, and Arnold K. Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases: molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Curr Med Chem*, 10: 2123– 2145, 2003.

Schirmer L, Albert M, Buss A, Schulz-Schaeffer WJ, Antel JP, Bruck W, Stadelmann C. Substantial early, but nonprogressive neuronal loss in multiple sclerosis (MS) spinal cord. *Ann Neurol*, 66: 698-704, 2009.

Schoenberg MH, Poch B, Moch D, Marzinzig M, Marzinzig E, Mattfeldt T, Gruber H, Beger HG: Effect of acadesine treatment on postischemic damage to small intestine. *Am J Physiol*, 269: H1752-H1759, 1995.

Stamp LK, Khalilova I, Tarr JM, Senthilmohan R, Turner R, Haigh RC, Winyard PG and Kettle AJ. Myeloperoxidase and oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 51 (10):1796-1803, 2012.

Statistisches Bundesamt (<https://www.destatis.de/DE/Startseite.html>) – Todesursachen in Deutschland 2013.

Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, and Hansson GK. "T-Lymphocytes from Human Atherosclerotic Plaques Recognize Oxidized Low-Density-Lipoprotein." *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(9): 3893-3897, 1995.

Stenvinkel P, Rodriguez-Ayala E, Massy ZA, Qureshi AR, Barany P, Fellstrom B, Heimbürger O, Lindholm B, and Alvestrand A. Statin treatment and diabetes affect myeloperoxidase activity in maintenance hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1: 281–287, 2006.

Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, and Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol*, 158: 879–891, 2001.

Sugiyama S, Kugiyama K, Aikawa M, Nakamura S, Ogawa H, Libby P. Hypochlorous Acid, a Macrophage Product, Induces Endothelial Apoptosis and Tissue Factor Expression. Involvement of Myeloperoxidase-Mediated Oxidant in Plaque Erosion and Thrombogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1309–1314, 2004.

Takeshita S, Isshiki T, Ochiai M, Ishikawa T, Nishiyama Y, Fusano T, Toyozumi H, Kondo K, Ono Y, Sato T. Systemic inflammatory responses in acute coronary syndrome: increased activity observed in polymorphonuclear leukocytes but not T lymphocytes. *Atherosclerosis*, 135:187–192, 1997.

Tang WH, Brennan ML, Philip K, Tong W, Mann S, Van Lente F, and Hazen SL. Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*, 98: 796–799, 2006.

Targonski PV, Bonetti PO, Pumper GM, Higano ST, Holmes DR Jr, and Lerman A. Coronary endothelial dysfunction is associated with an increased risk of cerebrovascular events. *Circulation*, 107: 2805–289, 2003.

Tavora F, Ripple M, Li L and Burke AP. Monocytes and neutrophils expressing myeloperoxidase occur in fibrous caps and thrombi in unstable coronary plaques. *BMC Cardiovascular Disorders*, 9: 27-33, 2009.

Teismann P. Myeloperoxidase in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. *Dtsch Med Wochenschr.*, 139(3):99-102, 2014.

Thews G, Mutschler E, & Vaupel P. Mechanismen der kurzfristigen Blutdruckregulation. *Pathophysiologie des Menschen*, S. 241-243, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1999.

Thomas JD, Topol EJ, Hazen SL, and Penn MS. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Exp Med*, 197: 615–624, 2003.

Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for Universal Definition of Myocardial Infarction; Authors/Task Force Members Chairpersons, Thygesen K, Alpert JS, White HD; Biomarker Subcommittee, Jaffe AS, Katus HA, Apple FS, Lindahl B, Morrow DA; ECG Subcommittee, Chaitman BR, Clemmensen PM, Johanson P, Hod H; Imaging Subcommittee, Underwood R, Bax JJ, Bonow JJ, Pinto F, Gibbons RJ; Classification Subcommittee, Fox KA, Atar D, Newby LK, Galvani M, Hamm CW; Intervention Subcommittee, Uretsky BF, Steg PG, Wijns W, Bassand JP, Menasche P, Ravkilde J; Trials & Registries Subcommittee, Ohman EM, Antman EM, Wallentin LC, Armstrong PW, Simoons ML; Trials & Registries Subcommittee, Januzzi JL, Nieminen MS, Gheorghide M, Filippatos G; Trials & Registries Subcommittee, Luepker RV, Fortmann SP, Rosamond WD, Levy D, Wood D; Trials & Registries Subcommittee, Smith SC, Hu D, Lopez-Sendon JL, Robertson RM, Weaver D, Tendera M, Bove AA, Parkhomenko AN, Vasilieva EJ, Mendis S; ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), Bax JJ, Baumgartner H, Ceconi C, Dean V, Deaton C, Fagard R, Funck-Brentano C, Hasdai D, Hoes A, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, McDonagh T, Moulin C, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Torbicki A, Vahanian A, Windecker S; Document Reviewers, Morais J, Aguiar C, Almahmeed W, Arnar DO, Barili F, Bloch KD, Bolger AF, Botker HE, Bozkurt B, Bugiardini R, Cannon C, de Lemos J, Eberli FR, Escobar E, Hlatky M, James S, Kern KB, Moliterno DJ, Mueller C, Neskovic AN, Pieske BM, Schulman SP, Storey RF, Taubert KA, Vranckx P, Wagner DR. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 16;60(16):1581-98, 2012.

Till, GO, Johnson R, Kunkel R and Ward PA. Intravascular activation of complement and acute lung injury: dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites, *J. Clin. Invest.*, 76, 517-27, 1991.

Tjio HJ, Puck TT. Genetics of somatic mammalian cells. II. chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J. Exp. Med.*, 108(2):259-271. PMID 13563760, 1958.

Trepels T, Zeiher AM, and Fichtlscherer S. The endothelium and inflammation. *Endothelium*, 13(6):423–429, 2006.

Van Dalen CJ, Winterbourn CC, Senthilmohan R et al. Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase. Implications for nitration and hypochlorous acid production at sites of inflammation. *J Biol Chem*, 275: 11638-11644, 2000.

Vasilyev N, Williams T, Brennan ML, Unzek S, Zhou X, Heinecke JW, Spitz DR, Topol EJ, Hazen SL, and Penn MS. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation*, 112: 2812–2820, 2005.

Virmani R, Burke AP, Farb A, and Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis*, 44(5):349–356, 2002.

Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, Penn MS, Keaney JF Jr, and Hazen SL. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation*, 110: 1134-1139, 2004.

Völzke H, Neuhauser H, Moebus S, Baumert J, Berger K, Stang A, Ellert U, Werner A, Döring A. Rauchen: Regionale Unterschiede in Deutschland. *Dtsch Arztebl*, 103(42): A-2784, 2006.

Wagner J. Praktische Kardiologie; für Studium, Klinik und Praxis. 2. Auflage, de Gruyter, Berlin, New York: 242 – 260, 1991.

Wang Z, Nicholls SJ, Rodriguez ER, Kummu O, Horkko S, Barnard J, Reynolds WF, Topol EJ, DiDonato JA, and Hazen SL. Protein carbamylation links inflammation, smoking uremia and atherogenesis. *Nat Med*, 13: 1176–1184, 2007.

Ward PA, Till GO, Kunkel R and Deauchamp C. Evidence for role of hydroxyl radical complement and neutrophil-dependent tissue injury. *J. Clin. Invest.*, 72, 789-801, 1983.

Weber M and Hamm C. "Novel biomarkers--the long march from bench to bedside." *Eur Heart J*, 29(9): 1079-1081, 2008.

Weil SC, Rosner GL, Reid MS, Chisholm RL, Farber NM, Spitznagel JK, and Swanson MS. cDNA cloning of human myeloperoxidase: decrease in myeloperoxidase mRNA upon induction of HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84: 2057–2061, 1987.

Weitberg AB, Weitzman SA, Destrempe M, Latt SA, and Stossel TP. Stimulated human phagocytes produce cytogenetic changes in cultured mammalian cells. *N Engl J Med*, 308: 26–30, 1983.

Weitzman SA, Weitberg AB, Clark EP, and Stossel TP. Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 227: 1231–1233, 1985.

Weitzman SA and Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood*, 76: 655–663, 1990.

Winterbourn CC and Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*, 29: 403–409, 2000.

Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, Maeda N, Falk RJ, and Jennette JC. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest*, 110: 955–963, 2002.

Yamada M, Hur SJ, Hashinaka K, Tsuneoka K, Saeki T, Nishio C, Sakiyama F, and Tsunasawa S. Isolation and characterization of a cDNA coding for human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*, 255: 147–155, 1987.

Yamagami S, Tokuda Y, Ishii K, Tanaka H, Endo N. "cDNA cloning and functional expression of a human monocyte chemoattractant protein 1 receptor." *Biochem Biophys Res Commun*, 202:1156-1162, 1994.

Yang F, Moss LG, Phillips GN Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 14(10):1246-51, 1996.

Yip HK, Sun CK, Chang LT, Wu CJ. "Strong correlation between serum levels of inflammatory mediators and their distribution in infarct-related coronary artery." *Circ J*, 70(7): 838-845, 2006.

Yokota M, Tsunekawa A, Miyahara T, Kamihara S, Kitamura J, Noda S, Koide M, Tsuzuki M, Sotobata I. Effects of isosorbide-5-mononitrate on exercise-induced hemodynamic changes in angina pectoris. *Am J Cardiol*, 58: 53-58, 1986.

Zaballos A, Gutiérrez J, Varona R, Ardavín C, Márquez G Cutting edge. Identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *J Immunol*, 162:5671–5675, 1999 .

Zappia M, Manna I, Serra P, Cittadella R, Andreoli V, La Russa A, Annesi F, Spadafora P, Romeo N, Nicoletti G, Messina D, Gambardella A, Quattrone A. Increased risk for *Alzheimer* disease with the interaction of MPO and A2M polymorphisms. *Archives of neurology*, 61(3):341-4, 2004.

Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA*, 286:2136-42, 2001.

Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmitt D, Fu X, Thomson L, Fox PL, Ischiropoulos H, Smith JD, Kinter M and Hazen SL. Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest*, 114:529-541, 2004.

Zhou T, Zhou SH, Qi SS, Shen XQ, Zeng GF, Zhou HN. The effect of atorvastatin on serum myeloperoxidase and CRP levels in patients with acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta*, 368:168–172, 2006.

10 Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank all denjenigen Menschen, die mir während dieser Doktorarbeit immer stets zur Seite standen und hilfreiche Unterstützung geleistet haben, damit diese Arbeit zustande kommen konnte.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Stephan Baldus für die interessante Themenstellung und die wertvollen Ratschläge sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Experimentellen Kardiologie in Campus Forschung im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) richten.

Auch möchte ich mich bei seinem tollen Team und meinen Ansprechpartnern Dr. rer. nat. Anna Klinkke und Dr. rer. nat. Denise Lau für die tolle Betreuung und die vielen Anregungen für das Gelingen meines Forschungsprojekts bedanken.

Mein Dank geht an dieser Stelle auch an Lisa Remane und Hartwig Wieboldt, die mir mit ihren Erfahrungen jederzeit tatkräftig zur Seite standen und mich immer unterstützt haben. Ich hatte eine tolle Zeit mit Euch im Labor!

Des Weiteren möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Großeltern Ghulam Gaus und Aziza Quaderie, meinen Eltern Abdullatif und Farida Zahir und meinen Geschwistern Abdullah, Negina und Mazihullah Zahir bedanken, die mich in allen meinen Lebensbereichen bestärken und immer für mich da sind und deshalb widme ich Ihnen diese Arbeit.

Meinen lieben Freunden danke ich für ihre Geduld und die erforderliche Abwechslung während dieser Doktorarbeit. Für das kritische Lesen und die liebevolle Unterstützung danke ich besonders Iris Hoffmann und Vivien Ziller.

11 Anhang

11.1 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11.2 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg, den

Unterschrift:.....