

Aus dem Department Chemie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,  
Universität Hamburg

# Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten

vorgelegt von Anna Klinke  
Hamburg 2009

Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
der Universität Hamburg  
Angefertigt im *Cardiovascular Research Center*,  
Universitäres Herzzentrum Hamburg

1. Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Duchstein  
2. Gutachter: PD Dr. S. Baldus  
Datum der Disputation: 15.05.2009

Meinen Großeltern Josef und Hedwig Klinke

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1	Einführung . . . . .	4
2.2	Das Endothel . . . . .	5
2.2.1	Aufbau des Blutgefäßes . . . . .	5
2.2.2	Merkmale des Endothels . . . . .	6
2.2.3	Funktion des Endothels . . . . .	6
2.3	Wesentliche Mediatoren der Entzündung . . . . .	7
2.4	Der Neutrophile Granulozyt . . . . .	9
2.5	Migration neutrophiler Granulozyten . . . . .	12
2.5.1	Extravasation . . . . .	12
2.5.2	Chemotaxis . . . . .	14
2.5.3	Signalkaskaden, die der Migration zugrunde liegen . . . . .	15
2.6	Pathophysiologische Bedeutung neutrophiler Granulozyten für das kardiovaskuläre System . . . . .	16
2.7	Myeloperoxidase . . . . .	19
2.7.1	Katalytische Aktivität und Pathogenabwehr . . . . .	20
2.7.2	Extramikrobizide Eigenschaften der MPO . . . . .	23
2.7.3	Extrakatalytische Eigenschaften der MPO . . . . .	26
2.7.4	Hypothese zum Einflusses der MPO auf die Adhäsion und Migration neutrophiler Granulozyten . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>28</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
4.1	Material . . . . .	29
4.1.1	Reagenzien und Arzneistoffe . . . . .	29
4.1.2	Puffer und Lösungen . . . . .	31
4.1.3	Antikörper . . . . .	32
4.1.4	Reaktionskits . . . . .	33

4.1.5	Zelllinien und Kulturmedia . . . . .	33
4.1.6	Mauslinien . . . . .	33
4.1.7	Laborgeräte, Apparaturen und Software . . . . .	33
4.2	Methoden . . . . .	35
4.2.1	Isolation neutrophiler Granulozyten . . . . .	35
4.2.2	Kultivierung humaner Umbilikalvenen-Endothelzellen . . . . .	36
4.2.3	Adhäsionsstudien neutrophiler Granulozyten an Matrixproteine . . . . .	37
4.2.4	Adhäsionsstudien neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen . . . . .	37
4.2.5	Quantifizierung der NO- und MPO-abhängigen ICAM-1-Expression auf Endothelzellen . . . . .	38
4.2.6	Migrationsanalyse im <i>Ibidi-<math>\mu</math>-Slide</i> . . . . .	39
4.2.7	Analyse des F-Aktin Gehalts in neutrophilen Granulozyten mittels Immunzytochemie . . . . .	43
4.2.8	Analyse des F-Aktin Gehalts in neutrophilen Granulozyten mittels Fluorometrie . . . . .	44
4.2.9	Analyse des F-Aktin Gehalts in neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie (FACS) . . . . .	44
4.2.10	Immunzytochemische Färbung von Oberflächen-assoziiertem MPO und CD11b auf PMN . . . . .	45
4.2.11	Hepatische Ischämie bei der Maus . . . . .	46
4.2.12	Intraportale Injektion bei der Maus . . . . .	48
4.2.13	Quantifizierung von PMN in Leberpräparaten mittels immunhistochemischer AEC-Färbung . . . . .	48
4.2.14	Herstellung von Homogenaten der Leberproben . . . . .	49
4.2.15	Proteinbestimmung . . . . .	50
4.2.16	ELISA zur Bestimmung des MPO-Gehalts der Leberproben . . . . .	50
4.2.17	Statistik . . . . .	51
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>52</b>
5.1	Bedeutung der MPO für die Adhäsion neutrophiler Granulozyten . . . . .	52
5.1.1	Einfluss der MPO auf die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Fibronectin und Endothelzellen . . . . .	52
5.1.2	Analyse der ICAM-1 Expression auf Endothelzellen in Abhängigkeit von NO $\cdot$ und MPO . . . . .	54
5.2	Charakterisierung der MPO-abhängigen Motilität neutrophiler Granulozyten <i>in-vitro</i> . . . . .	56
5.2.1	Chemotaxis neutrophiler Granulozyten im <i>Ibidi-Slide</i> . . . . .	56
5.2.2	Einfluss der MPO auf Morphologie und intrazelluläre Signalkaskaden der neutrophilen Granulozyten . . . . .	60

5.2.3	Charakterisierung der Energie- und Ladungsabhängigkeit der MPO-induzierten Motilität neutrophiler Granulozyten . . . .	64
5.3	Charakterisierung der MPO-abhängigen Motilität neutrophiler Granulozyten <i>in-vivo</i> . . . . .	68
5.3.1	Modell der hepatischen Ischämie und Reperfusion . . . . .	68
5.3.2	Modell der intraportalen Injektion . . . . .	70
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
6.1	Bedeutung der MPO für die Adhäsion . . . . .	73
6.2	Bedeutung der MPO für die Chemotaxis . . . . .	74
6.2.1	Interpretation der Beobachtungen im Chemotaxis-Modell . .	75
6.3	Bedeutung elektrostatischer Interaktion für die Motilität neutrophiler Granulozyten . . . . .	76
6.4	Modulation der Granulozyten-Motilität durch MPO <i>in-vivo</i> . . . . .	77
6.4.1	Die Bedeutung des CD11b-Integrins . . . . .	78
6.4.2	Einfluss der katalytischen Aktivität der MPO . . . . .	79
6.4.3	MPO-abhängige Apoptose . . . . .	79
6.4.4	Bedeutung MPO-abhängiger Plasmin-Verfügbarkeit . . . . .	80
6.5	Bedeutung der Arbeit für das Verständnis der Pathophysiologie vasculärer Inflammation . . . . .	80
6.6	Bedeutung der Arbeit für zukünftige therapeutische Strategien . . .	82
6.7	Ausblick . . . . .	84
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>86</b>
	<b>Appendices</b>	<b>105</b>

# Kapitel 1

## Zusammenfassung

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind wichtige Protagonisten der angeborenen Immunantwort mit der Fähigkeit zur Migration und Extravasation - einer notwendigen Voraussetzung zur Pathogenabwehr. Anhaltende oder dysregulierte Migration der Granulozyten jedoch trägt zur Entwicklung vaskulär-inflammatorischer Prozesse bei und ist somit kausal verknüpft unter anderem mit der Pathophysiologie der koronaren Herzkrankheit, der Herzinsuffizienz und von Reperfusionsschäden nach Ischämie. Die Migration der Granulozyten ist bisher etabliert als eine durch Chemotaxine induzierte, komplexe, energieabhängige Kaskade aus endotheliale Rollen, Adhäsion, Aktivierung, Diapedese und chemotaktischer Motilität.

Die Aktivierung der PMN geht einher mit der Sezernierung der leukozytären Peroxidase Myeloperoxidase (MPO), welche aufgrund der Generierung mikrobizider Spezies primär als granulozytärer Effektor der Pathogenabwehr betrachtet wurde. In jüngerer Zeit rückten zunehmend auch pro-inflammatorische Eigenschaften des Enzyms in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses:

So bindet MPO mit hoher Affinität an die Gefäßwand und akkumuliert im subendothelialen Raum, wo das Enzym katalytisch aktiv verbleibt. Ferner bindet MPO an die Oberfläche der PMN selbst, was zu deren Aktivierung führt. Entsprechend entstand die Hypothese, dass MPO die Migration neutrophiler Granulozyten modulieren könnte.

*In-vitro*-Studien brachten durch MPO induzierte, stark gerichtete Chemotaxis

der PMN hervor, welche von der katalytischen Aktivität des Enzyms losgelöst war. Dieses Phänomen war unabhängig von intrazellulären Signalkaskaden, zytoskeletären Rearrangements sowie jeglicher energieabhängiger Vorgänge. Es unterlag vielmehr elektrostatischer Interaktion zwischen der kationischen MPO und der anionischen Granulozyten-Oberfläche in Abhängigkeit des Integrins CD11b.

Hepatische Ischämie mit anschließender Reperfusion im Mausmodell brachte signifikant stärkere Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Leber der Wildtyp-Maus als in der MPO-defizienten Maus hervor. Die intraportale Injektion von MPO provozierte in der Wildtyp-Maus deutliche hepatische Granulozyten-Infiltration, die in der CD11b-defizienten Maus ausblieb.

Diese Daten identifizieren eine bisher nicht gekannte, chemoattraktive Eigenschaft der MPO und zeigen gleichzeitig einen neuen Mechanismus granulozytärer Motilität auf.

Damit wird die Bedeutung der MPO für vaskulär inflammatorische Prozesse maßgeblich erweitert, wirkt das vaskulär akkumulierte Enzym doch nicht nur durch katalytische Mechanismen, sondern provoziert durch Attraktion der Granulozyten, die ihrerseits zytotoxische Mediatoren hervorbringen, noch eine Potenzierung seiner pro-inflammatorischen Eigenschaften.

## Summary

Migration of polymorphonuclear neutrophils (PMN) is a key mechanism of innate immunity and plays an important role in host defense. It is accepted that migration of PMN is a principal prerequisite of vascular-inflammatory processes and is causally linked to a broad range of disease including coronary artery disease, ischemia/reperfusion injury and heart failure.

So far, PMN migration is primarily viewed to be a chemokine-induced cascade of neutrophil rolling, adhesion, spreading, diapedesis and chemotactic agitation.

PMN activation implies the sequestration of myeloperoxidase (MPO), a heme protein catalyzing the generation of microbicidal species. Having long been regarded as a central protagonist in host defense, the enzyme's proinflammatory rather than its microbicidal properties attract increasing attention.

Given that MPO avidly binds to the vessel wall on the one hand and binds to



the neutrophil surface on the other, it was hypothesized that MPO is also capable of modulating neutrophil migration.

The investigation of neutrophil chemotaxis *in-vitro* revealed MPO-induced and highly directed PMN-motility, which proved to be independent of the enzyme's catalytic activity and irrespective of intracellular, energy-consuming signaling cascades. In fact, MPO-mediated motility appeared to reflect electrostatic interactions between the cationic MPO and the anionic neutrophil surface with contribution of the neutrophil integrin CD11b.

A mouse model of hepatic ischemia with subsequent reperfusion revealed significantly enhanced neutrophil accumulation in liver tissue of wildtype-mice in comparison to MPO-deficient mice. Furthermore, intraportal injection of MPO induced profoundly increased hepatic neutrophil infiltration in wildtype-mice, whereas CD11b-deficient mice exhibited no effect of MPO.

These data not only disclose a so far unrecognized, chemoattractive property of MPO, but also depict a so far undescribed mechanism of neutrophil motility.

Thus, the attraction of neutrophils to the vessel wall extends the impact of MPO on vascular inflammation and further extends the enzyme's proinflammatory properties.

# Kapitel 2

## Einleitung

### 2.1 Einführung

Das komplexe und dynamische System der Blutgefäße dient der Regulation der Homöostase des Organismus. Das Herz-Kreislauf-System wurde erstmals beschrieben im Jahr 1628 von dem englischen Arzt William Harvey und ist seitdem ständiger Fokus wissenschaftlicher Forschung. Störungen der Gefäßfunktion sind assoziiert mit zahlreichen Krankheitsbildern - darunter bilden kardiovaskuläre Erkrankungen den Großteil. Nach Berechnungen des *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC, versterben beispielsweise an der koronaren Herzkrankheit (KHK) jedes Jahr 7 Millionen Menschen.

Vielfach beteiligt an der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen sind atherosklerotische Prozesse, welche ischämische und thromboembolische Komplikationen verursachen können.

Die zugrunde liegende Pathophysiologie ist trotz intensiver Forschung noch nicht ausreichend verstanden. Immer mehr Beachtung erlangen entzündliche Vorgänge, die sowohl die strukturelle als auch humorale Integrität der Gefäßwand beeinflussen. Die Aufklärung der vaskulär-inflammatorischen Mechanismen und ihrer Ursachen ist von großer Bedeutung für die Entwicklung therapeutischer Strategien in diesem Bereich.

## 2.2 Das Endothel

Für das Verständnis vaskulärer Erkrankungen ist es notwendig, die Anatomie und Physiologie des Gefäßes und speziell des Endothels zu erfassen:

### 2.2.1 Aufbau des Blutgefäßes

Das vaskuläre System zeigt je nach Zugehörigkeit zum Hochdrucksystem, Niederdrucksystem oder zur Mikrozirkulation Variationen in Funktion und Anatomie. Grundsätzlich aber liegt anatomisch ein dreischichtiger Aufbau zugrunde. Die innere Schicht, die *Tunica intima*, besteht aus einem einschichtigen Endothel mit aufliegender Basalmembran, *Lamina propria* und der fenestrierten *Membrana elastica interna*. *Lamina propria* und *Elastica interna* werden großteilig aus Bindegewebe, welches von extrazellulären Matrixproteinen (ECM) wie Kollagen und Fibronectin durchsetzt ist, gebildet. Die zweite Schicht, die *Tunica media*, gliedert sich in eine vielschichtige Zone glatter Muskelzellen und die *Membrana elastica externa*. Die Muskelschicht, die die Gefäßweite reguliert, ist wiederum mit Kollagen und

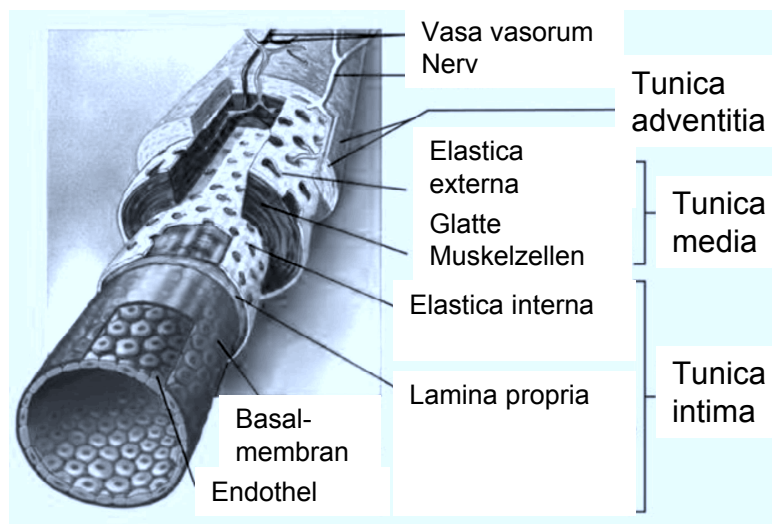


Abbildung 1: **Schematische Darstellung des Aufbaus eines Blutgefäßes.** Modifiziert nach McGraw-Hill Companies / Rutgers, The State University of New Jersey.

Elastin durchsetzt. Auch die *Tunica adventitia* oder *Externa* besteht aus Bindegewebe, hauptsächlich aus Kollagen, und verbindet das Gefäß mit umliegendem

Gewebe. In dieser Schicht verlaufen Nerven und bei größeren Gefäßen die *Vasa vasorum*, die das Gefäß selbst versorgen. Die Kapillaren der Mikrozirkulation sind fast ausschließlich auf ein Endothel, welches der Basalmembran aufsitzt, die von Pericyten umkleidet wird, beschränkt.

### 2.2.2 Merkmale des Endothels

Das Endothel wird von lediglich einer Zellschicht gebildet, die je nach Lokalisation kontinuierlich, fenestriert oder diskontinuierlich aufgebaut sein kann. Ein kontinuierliches Endothel lässt eine selektive Molekülpassage zu, während ein fenestriertes auch für größere Moleküle durchlässig ist und ein diskontinuierliches Endothel sogar die Passage von Zellen erlaubt [136].

Auf der luminalen Seite präsentiert die Endothelzelle konstitutiv oder fakultativ zahlreiche verschiedene Oberflächenmoleküle, von denen hier nur einige erwähnt werden sollen. Eine große Gruppe dieser Moleküle wird repräsentiert durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), die nach Aktivierung bestimmte intrazelluläre Signalkaskaden initiieren. Hierzu gehören Mechanorezeptoren, die die Scherspannung im Gefäß registrieren und Rezeptoren für Signalmoleküle wie Wachstumsfaktoren und Zytokine. Eine weitere wichtige Gruppe bilden die Adhäsionsmoleküle. Dazu gehören die P- und E-Selektine, die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Zell/Zell-Adhäsionen vermitteln können. Weiterhin kann die Adhäsion  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig von Proteinen der Immunglobulin-Superfamilie kommuniziert werden. Hierzu gehören das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), das vaskuläre Adhäsionsmolekül (VCAM) und das Thrombozyten/Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1 (PECAM-1). Außerdem tragen die Endothelzellen, wie zahlreiche andere eukaryotische und prokaryotische Zellen auch, eine Glykokalix bestehend aus kovalent an Membranproteine und Membranlipide gebundenen Polysacchariden [136, 1, 117].

### 2.2.3 Funktion des Endothels

Schon die komplexe Ausstattung der Endothelzelle lässt erahnen, dass ihr zahlreiche Funktionen zukommen. So hat das Endothel zunächst eine Barrierefunktion und kontrolliert sowohl Stoff- als auch Zellaustausch. Weiterhin vermitteln die Endothelzellen die Ausbildung neuer Gefäße, die so genannte Angiogenese. Durch

Produktion und Expression spezieller Mediatoren und Oberflächenmoleküle ist das Endothel außerdem an der Modulation der Blutgerinnung beteiligt.

Eine weitere, zentrale Aufgabe ist die Regulation des Gefäßtonus durch Produktion der Vasokonstriktoren Angiotensin II und Endothelin und der Dilatatoren Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (NO $\cdot$ ) [136]. Dabei ist NO $\cdot$  ein Mediator, dem hier besondere Beachtung zukommen soll. Die intrazelluläre NO-Synthase, die durch Stimulation durch u.a. Acetylcholin, Serotonin, oder über Mechanorezeptoren aktiviert wird, katalysiert die Desaminierung von Arginin und dadurch die Freisetzung von NO $\cdot$ . Stickstoffmonoxid ist ein bioaktives Radikal mit einer Halbwertszeit von etwa 5-20 Sekunden und ist aufgrund seiner Lipophilie zur Diffusion durch Zellmembranen befähigt. Es besitzt eine hohe Affinität zu Eisen und bindet an die Häm-Gruppe von Enzymen, z.B. der Guanylatzyklase, was zu deren Aktivierung führt. Diffundiert NO $\cdot$  aus der Endothelzelle durch den subendothelialen Bereich bis in die glatte Muskelzelle, wird hier die Guanylatzyklase aktiviert, die die Produktion des *Messenger*-Moleküls cyclisches GMP (cGMP) katalysiert. Dieses veranlasst über die Aktivierung der Proteinkinase-I die Relaxation des glatten Gefäßmuskels und damit die Dilatation des Gefäßes [66, 120]. Neben diesem Mechanismus besitzt NO $\cdot$  bakterizide Eigenschaften, es wirkt inhibitorisch auf die Aggregation von Thrombozyten und die Proliferation glatter Muskelzellen und auf die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle [120, 83]. Somit ist NO $\cdot$  insgesamt als anti-inflammatorischer Mediator zu betrachten.

Damit ist eine weitere wichtige Funktion des Endothels aufgeführt, nämlich die Modulation inflammatorischer Prozesse. Die Endothelzelle kann nicht nur durch Generierung von NO $\cdot$ , sondern auch durch Produktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und durch Expression von Adhäsionsmolekülen das Verhalten benachbarter Zellen, Thrombozyten oder Leukozyten im Entzündungsverlauf steuern.

## 2.3 Wesentliche Mediatoren der Entzündung

Die Entzündung ist definiert als komplexe Reaktion auf eine durch endogene oder exogene Noxen hervorgerufene Gewebeschädigung mit dem Ziel, das schädigende Agens zu eliminieren oder in der Wirkung zu begrenzen. Die klassischen Kardi-

nalsymptome dieser Reaktion sind Rötung, Schwellung, Überwärmung, Schmerz und gestörte Funktion des Gewebes. Diese Symptome werden prinzipiell durch Infiltration der betroffenen Region von Plasma und Leukozyten verursacht.

Exogene Initiatoren dieser Mechanismen können Viren, Bakterien, Fremdpartikel, Allergene und toxische Substanzen sein [105]. Diese provozieren im Gewebe residente Makrophagen und Mastzellen zur Produktion inflammatorischer Mediatoren. Endogene Initiatoren werden produziert von geschädigtem oder auf andere Weise dysreguliertem Gewebe. Dieses geht mit der Dekompartimentalisierung der Zellen und der Freisetzung intrazellulärer Bestandteile nekrotischer Zellen einher. Ein weiterer zentraler Moment ist die Verletzung des Endothels, die den Kontakt plasmatischer Bestandteile mit subendothelialer Matrix erlaubt. Eine Schlüsselrolle nimmt hierbei der Hagemannfaktor (Faktor XII) ein, der durch Interaktion mit Kollagenen aktiviert wird und konsekutiv proteolytische Kaskaden initiiert [102].

Diese genannten initiativen Mechanismen stoßen die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren an. Dazu gehören vasoaktive Amine wie Histamin und Serotonin, vasoaktive Peptide wie Bradykinin, Komplementfaktoren, Lipidderivate wie Leukotriene, Zytokine, Chemokine und proteolytische Enzyme [105]. Diese Mediatoren wirken auf Gefäßwand, Leukozyten und Thrombozyten und veranlassen vermehrte Permeabilität des Endothels, Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und CD11b-Integrinen und die Aktivierung und gegebenenfalls Attraktion der Zellen. Die betroffenen Zellen produzieren ihrerseits pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine. Außerdem kommt es zur Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS). Stickstoffmonoxid, Bradykinin und Histamin bewirken ausgeprägte Vasodilatation, die, synergistisch mit steigender Viskosität des Blutes durch Gerinnung und Exsudation, zur Verlangsamung des Blutstromes führt. Dies verursacht eine hydrodynamisch vermittelte Margination der zellulären Fraktionen des Blutes an das Endothel und begünstigt die Extravasation von Granulozyten und Monozyten. Im Gewebe nehmen Granulozyten und Makrophagen dann Bakterien, Zelltrümmer oder Fremdpartikel auf, bauen sie ab und setzen proteolytische Enzyme und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei, welche zytotoxisch auf potentielle Pathogene wirken, aber auch eigene Zellen des Organismus schädigen können. Besonders Makrophagen setzen dabei die zentralen Zytokine Interleukin-1

(IL-1) und Tumornekrosefaktor-alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ) frei, die u.a. den Transkriptionsfaktor  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  aktivieren, der wiederum die Genregulation pro-inflammatorisch beeinflusst.

Eine erfolgreiche Entzündungsreaktion endet mit einer Makrophagen-vermittelten Reparaturphase [105].

## 2.4 Der Neutrophile Granulozyt

Zentrale Protagonisten des Entzündungsgeschehens sind die neutrophilen Granulozyten. Sie gehören zur Population der Leukozyten, die nach ihrem lichtmikroskopischen Erscheinungsbild in die drei Gruppen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten eingeteilt wurde. Granulozyten enthalten zahlreiche Lysosomen und Sekretionsvesikel (Granula) und werden anhand dessen Morphologie und Anfärbereigenschaft weiter eingeteilt in eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten. Die neutrophilen Granulozyten werden aufgrund ihres segmentförmigen Kerns als *polymorphkernige neutrophile Granulozyten* (PMN) bezeichnet. Der Anteil der PMN an gesamten Leukozyten beträgt 50-65%.

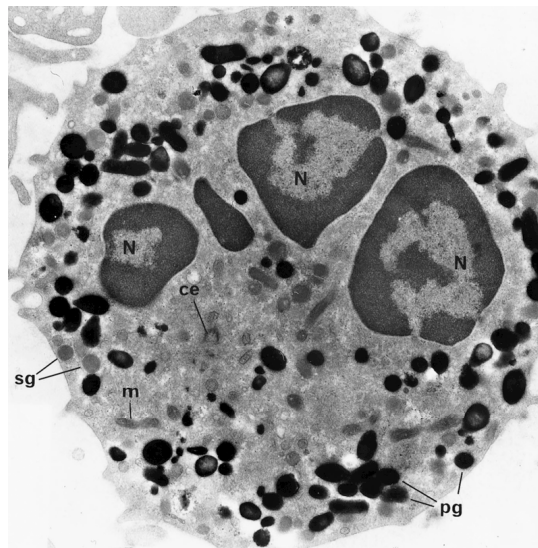


Abbildung 2: **Elektronenmikroskopische Aufnahme eines neutrophilen Granulozyten.** pg=azurophile Granula, sg=spezifische Granula, N=Nukleus, ce=Centriole, m=Mitochondrium. Aus Witko-Sarsat et al., Lab Invest 2000.

Die Aufgabe dieser Zellspezies ist die unspezifische Elimination von Pathogenen, Fremdpartikeln und Gewebetrümmern, wodurch sie ein zentraler Effektor der angeborenen Immunantwort ist. Die PMN sind die ersten Immunzellen, die betroffene Regionen infiltrieren [131]. Um dies zu gewährleisten, sind sie von komplexer Anatomie und Physiologie. Sie sind befähigt, die Zirkulation zu verlassen und sich extraluminal zur entsprechenden Noxe zu bewegen, um diese zu phagozytieren oder durch Sekretion mikrobizider Bestandteile zu bekämpfen. Die Zelle bedient sich zweier mikrobizider Strategien: einer oxidativen und einer nicht-oxidativen [52, 50]. Das oxidative System katalysiert die Generation toxischer Oxidantien unter Konsum molekularen Sauerstoffs (*oxidativer Burst*), der nach membranärer Rekrutierung und Aktivierung der NADPH-Oxidase zum Superoxidradikalanion ( $O_2^-$ ) reduziert wird. Aus diesem gehen konsekutiv weitere reaktive Sauerstoffspezies (ROS), vor allem durch spontane Dismutation Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), hervor. Wasserstoffperoxid dient dem granulozytären Enzym Myeloperoxidase zur Generierung der zytotoxischen hypochlorigen Säure (HOCl). Zusätzlich bringen die Xanthin-Oxidase, die Atmungskette in Mitochondrien oder eine entkoppelte NO-Synthase ROS hervor [22]. Zu dem nicht-oxidativen System gehören eine Reihe mikrobizider Peptide und Proteasen wie Gelatinasen, Elastase und Cathepsin G. Die Proteine werden im Granulozyten in verschiedenen Granula, in spezifischen, tertiären oder auch Gelatinase-Granula, azurophilen Granula und sekretorischen Vesikeln, gespeichert [148].

Um sich der passiven Zirkulation zu entziehen und mit der Gefäßwand zu interagieren, präsentieren PMN verschiedene Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Dazu gehören zum einen die Selektine, transmembranäre Glykoproteine, von denen P-Selektin und vor allem L-Selektin von Granulozyten exprimiert wird. Gleichzeitig ist der Selektin-Rezeptor PSGL1 (P-selectin-glycoprotein-ligand-1) konstitutiv auf der Zelloberfläche vorhanden. Des Weiteren stellen Integrine eine wichtige Gruppe der leukozytären Adhäsionsmoleküle dar, von denen mehrere verschiedene Familien existieren. Eine davon, die CD18-Integrine, beschreibt leukozytenspezifische, heterodimere, transmembranäre Glykoproteine mit einer  $\alpha$ -Untereinheit (CD11) und einer  $\beta$ -Untereinheit (CD18). Es sind verschiedene  $\alpha$ -Untereinheiten bekannt, sodass sich wiederum mehrere Mitglieder dieser Familie ergeben: CD11a/CD18 (LFA-1), CD11b/CD18 (Mac-1), CD11c/CD18 (p150,95)



und CD11d/CD18, von denen CD11a/CD18 und CD11b/CD18 die neutrophilen Hauptintegrine darstellen. Während CD11a/CD18 vorwiegend mit dem endothelialen Adhäsionsmolekül ICAM-1 interagiert, hat CD11b/CD18 neben ICAM-1 noch eine Vielzahl weiterer Liganden, darunter verschiedene Matrix-Proteine (Fibronectin, Fibrinogen oder Kollagen), Komplementfaktoren (C3bi), den Gerinnungsfaktor X und die neutrophilen Proteine Elastase und Myeloperoxidase [30, 56, 108].

Die Fähigkeit der Integrine, ihre Liganden zu binden, hängt vom Aktivierungszustand der Granulozyten ab. Im passiven Zustand der Zelle befinden sich die Integrine in einem „low-affinity-state“ mit niedriger Ligandenaffinität. Durch Stimulation der Zellen durch inflammatorische Mediatoren verändert sich die Konformation und es kommt zur *Cluster*-Bildung der CD18-Integrine, einem „high-affinity-state“ mit erhöhter Bindungsfähigkeit (*Inside-Out-Signaling*). Außerdem folgen bei den CD11b/CD18-Integrinen der Ligandenbindung eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden (*Outside-In-Signaling*), die den Aktivierungszustand der Leukozyten weiter erhöhen.

Neben den Integrinen sind zahlreiche weitere Rezeptoren für die Initiierung intrazellulären *Signalings* verantwortlich: Toll-like Rezeptoren vermitteln die zelluläre Reaktion auf bakterielle und Hefezellbestandteile und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) kommunizieren die Antwort auf Zytokine und Chemokine [148].

Ist ein bestimmtes Reizmuster vorhanden, provoziert dies den Granulozyten zur Phagozytose des Pathogens. Es bildet sich ein Phagosom aus, in das die Inhalte der Granula und die Produkte des *oxidativen Bursts* sezerniert werden. Da parallel hierzu als auch Phagozytose-unabhängig die Sequestration dieser Bestandteile in den extrazellulären Raum stattfindet, konfrontiert der Granulozyt seine Umgebung mit zytotoxischen Substanzen, die bei unzureichendem Schutz durch u.a. Antioxidantien Schäden an körpereigenen Strukturen erzeugen können [131, 114]. Außerdem produziert der Granulozyt pro-inflammatorische Zytokine, vor allem Leukotrien-B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) und den *Platelet-activating-factor* (PAF) [74]. Diese gegensätzlichen Mechanismen der potenten Pathogenabwehr und gleichzeitigen Konfrontation des Wirts mit zytotoxischen und pro-inflammatorischen Molekülen verleihen dem neutrophilen Granulozyten einen bivalenten Charakter, welcher die

Wichtigkeit seiner Erforschung besonders unterstreicht.

## 2.5 Migration neutrophiler Granulozyten

Die Notwendigkeit, die Zirkulation zu verlassen, um Fremdorganismen oder Zelldetritus aufzusuchen, erfordert von den neutrophilen Granulozyten die Fähigkeit zur schnellen und gerichteten Fortbewegung. Der gesamte Prozess, angefangen von der Margination an die Gefäßwand bis zum Erreichen der Zielregion wird als *Migration* umschrieben, ein Ablauf, der sich aus diversen einzelnen Prozessen zusammensetzt [94]. Sie beinhalten Adhäsion, Aktivierung, Transmigration und Chemotaxis der PMN und unterliegen der Kontrolle komplexer, intrazellulärer Signalkaskaden.

Die prinzipiellen Stimuli der Granulozyten zur Migration sind inflammatorische Mediatoren, die als *Chemotaxine* bezeichnet werden, darunter Komplementfaktoren, Leukotriene, N-formylierte Peptide und Chemokine. Chemokine sind eine Gruppe kleiner Proteine (75-125 Aminosäuren) mit konservierter Tertiärstruktur und definiert angeordneten Cysteinresten, die Leukozyten zu einer gerichteten Bewegung provozieren. Besonders relevant für neutrophile Granulozyten ist die Familie der CXC-Chemokine wie IL-8. Chemotaxine vermitteln ihre Wirkung auf Leukozyten über GPCRs.

### 2.5.1 Extravasation

Der erste Schritt der leukozytären Migration ist die Margination an die Gefäßwand, dessen Mechanismus im Verlauf der Entzündung zuvor bereits beschrieben wurde (siehe 2.3). Der konsekutive Schritt ist das so genannte *Rollen* der Granulozyten, welches durch Selektine (siehe 2.4) vermittelt wird. Die granulozytären P- und L-Selektine und die endothelialen P- und E-Selektine interagieren mit ihren entsprechenden Rezeptoren, was nicht in einer festen Bindung resultiert, sondern vielmehr in einem durch Scherstress vorangetriebenen *Entlangrollen* auf dem Endothel. Dies gewährleistet den Kontakt des Leukozyten mit Zytokinen und Chemokinen, die, gebunden an Polysaccharidreste der endothelialen Glykokalix, den PMN präsentiert werden. Durch diesen Stimulus wird die Oberflächenexpression und Aktivierung der CD11a- und CD11b-Integrine provoziert, die dann mit ICAM-1 und VCAM-1

der Endothelzellen interagieren und zu fester Bindung der PMN führen [109].

Selten passieren die Zellen dann sofort die endotheliale Barriere, sondern wandern vielmehr auf dem Endothel entlang bis zu einer für die *Diapedese* geeigneten Stelle [94]. Diese Fortbewegung wird ebenfalls durch Integrine vermittelt, indem durch ihre Deaktivierung Bindungen gelöst werden und an anderer Stelle Integrine für neue Bindungen aktiviert werden [4].

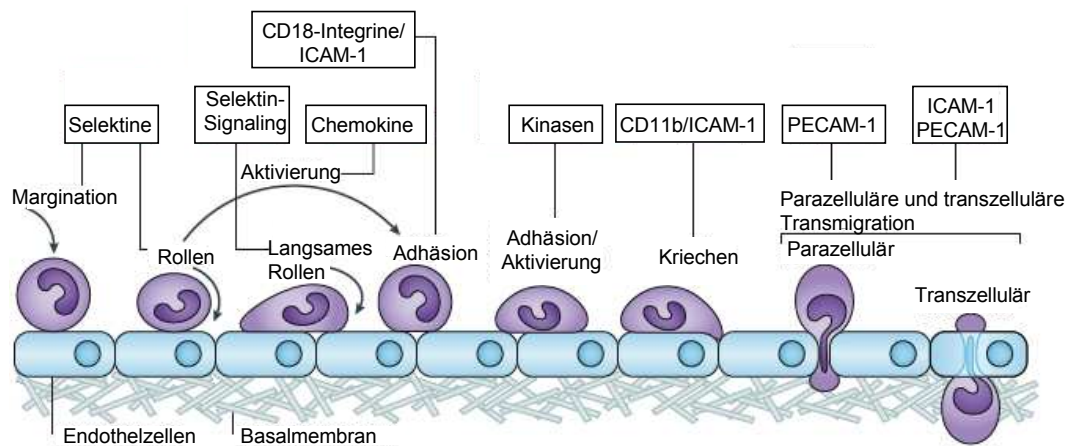


Abbildung 3: **Schematische Darstellung der migratorischen Kaskade eines neutrophilen Granulozyten und der an den einzelnen Phasen beteiligten Mediatoren.** Modifiziert nach Ley et al., Nat Immun 2007.

Zur Diapedese kann sich der Granulozyt einer parazellulären oder einer transzellulären Route bedienen. Der parazelluläre Weg geht einher mit der vorübergehenden Trennung inter-endothelialer Kontakte. Es wird angenommen, dass die CD11b-ICAM-1-Interaktion die Endothelzelle stimuliert, diese vor allem durch VE-Cadherine gebildeten Kontakte zu lösen und Rezeptoren für den Granulozyten, diesmal vor allem PECAM-1, vermehrt in den Bereich der Zellzwischenräume zu rekrutieren. Dadurch wird ein adhäsiver, haptotaktischer Gradient erzeugt, der die PMN durch die Zell-*Junctions* führt. Für den transzellulären Weg wird angenommen, dass die Endothelzelle ICAM-1 Moleküle in Bereichen akkumuliert, die sehr reich an *Caveolen*, bestimmten Membraneinstülpungen, sind. Die Zelle kann diese *Caveolen* zu vesikulo-vakuolären Organellen zusammenfassen und dem Granulozyten so einen intrazellulären Kanal bilden [94].

### 2.5.2 Chemotaxis

Im extraluminalen Raum wandern die Neutrophilen dann in Richtung der jeweiligen Noxe. Sie orientieren sich dabei an einem Konzentrationsgradienten von Chemotaxinen, der durch interstitielle Diffusion dieser Moleküle entsteht und so den Infektionsherd markiert. Die durch einen Gradienten einer diffusionsfähigen Substanz gelenkte Bewegung einer Zelle wird als Chemotaxis bezeichnet. Die Granulozyten sind in der Lage, einen Gradienten von  $< 1\%$  pro Zelllänge zu detektieren und zwischen *End-target* und *intermediären* Chemotaxinen zu unterscheiden, um definieren zu können, wo sich der inflammatorische Auslöser befindet [61]. Zu den *End-target* Chemotaxinen zählen N-formylierte Peptide und Komplementfaktoren, während z.B. Interleukin-8 (IL-8) und Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) zu den intermediären Stimuli gehören.

Die extravasale Fortbewegung wird ermöglicht durch einen synchronisierten Prozess zytoskellärer Rearrangements und Adhäsion an die umgebende Matrix. Dabei weist die sonst sphärische Zelle eine Polarisierung auf und bildet am vorderen Ende ein hervorstehendes *Lamellipodium*, während das hintere Ende *Uropodium* genannt wird [107, 154]. Das Lamellipodium wird ausgebildet durch die schnelle Formation von Aktin-Filamenten. Die Zelle rekrutiert sowohl vermehrt Chemotaxin-Rezeptoren an diesen Pol, um die Sensitivität gegenüber entsprechenden Gradienten zu erhöhen, als auch Integrine, um die Stärke der Bindung zur Matrix zu vergrößern. Am Uropodium dagegen wird durch gegenteilige Mechanismen die Sensitivität und die Bindungsfestigkeit erniedrigt [154, 65]. Insgesamt sind während der Fortbewegung im Vergleich zur Adhäsion nur wenige Adhäsionsmoleküle beteiligt. Eine komplexe Dynamik der Aktin-Filamente sorgt für sukzessives Strecken und Kontrahieren des Zellkörpers, welches synergistisch mit Loslösen und Neuknüpfen der adhäsiven Kontakte in einem „Kriechen“ der Zelle auf dem umgebenden Substrat resultiert [4].

Die zytoskelläre Dynamik ist damit unerlässlich für die Motilität des Granulozyten. Das hierfür wichtigste Strukturprotein Aktin ist im passiven Granulozyten zu 70% in monomerer Form (G-Aktin) und zu 30% als Polymer (Filament-Aktin oder F-Aktin) zu finden. Jedes Aktin-Filament besitzt ein Plus- und ein Minus-Ende, an dem ATP-abhängig mit Beteiligung zahlreicher Begleitproteine Polyme-

risation bzw. Depolymerisation stattfinden kann. Ein chemotaktischer Reiz provoziert innerhalb weniger Sekunden eine Verdopplung des F-Aktin Gehalts [23, 26].

### 2.5.3 Signalkaskaden, die der Migration zugrunde liegen

Das vielschichtige Verhaltensmuster des migrierenden Granulozyten ist nur möglich durch ein fein gesteuertes System intrazellulärer Signalkaskaden, die eine Ligandenbindung der membranständigen Chemotaxinrezeptoren und Adhäsionsmoleküle in zelluläre Reaktionen übersetzen. Dieses Netz von Signalkaskaden ist bisher noch nicht vollständig entschlüsselt. Insbesondere die Beteiligung der Integrine ist zwar unumstritten, aber noch nicht verstanden. Man weiß, dass das *Outside-In-Signaling* der Integrine mit den *Downstream*-Signalkaskaden der GPCRs der Chemotaxine kommuniziert [154, 73]. Außerdem induziert der Chemokin-Kontakt ein *Inside-Out-Signaling* und aktiviert die CD11b-Integrine [4]. Für die Kontrolle der Aktin-Polymerisation sind einige zentrale intrazelluläre Mediatoren etabliert: Die Stimulation des GPCRs aktiviert die Phosphatidylinositol 3-kinase PI3K, welche die Bildung des Signalmoleküls Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat ( $\text{PIP}_3$ ) katalysiert [95]. Dieses aktiviert direkt oder über den Guanosinnukleotid-Exchange-Faktor *Vav* Mitglieder der Familie der Rho-GTPasen, insbesondere Rac2 und Cdc42, die eine zentrale Rolle in der Kaskade spielen [113]. Sie bilden einen Komplex mit den Proteinen der *Wiskott-Aldrich-Syndrome*-Familie WAVE und WASp und mit Arp2/3 und Profilin, die an Aktinfilamente binden und die Polymerisation kontrollieren (Abb. 4) [154, 134].

Weiterhin beschrieben ist eine Beteiligung von Myosin/Aktin-abhängigen Prozessen, die während der Fortbewegung eine Kontraktion am Uropodium und damit das Loslösen des hinteren Pols von der Matrix ermöglichen [149]. Auch dieser Mechanismus scheint vermittelt durch Rho-GTPasen (Abb. 4).

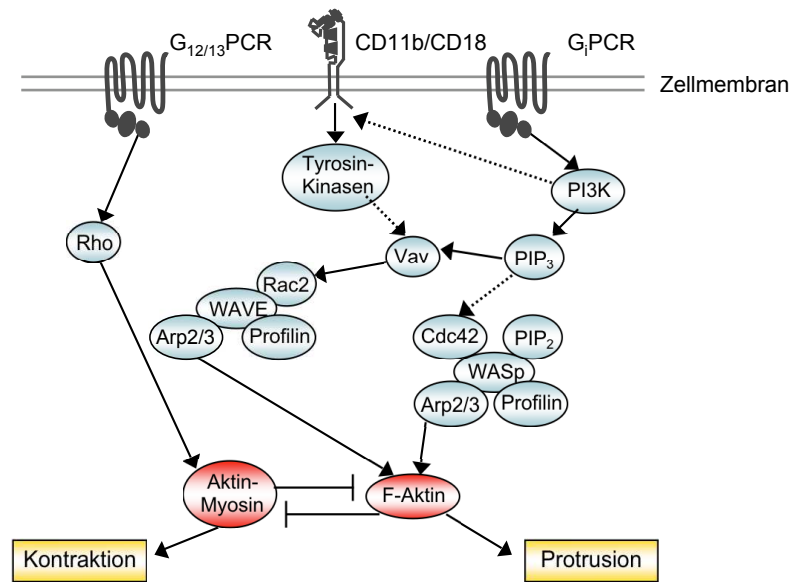


Abbildung 4: **Intrazelluläre Signalkaskade der leukozytären Zytoskellettdynamik.** G<sub>12/13</sub>-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G<sub>12/13</sub>PCR) und G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G<sub>i</sub>PCR) steuern synergistisch mit CD11b-Integrinen F-Aktin-Polymerisation und Aktin-Myosin vermittelte Kontraktion. Nach Zhelev et al., Ann Biomed Eng 2002 und Xu et al., Cell 2003.

## 2.6 Pathophysiologische Bedeutung neutrophiler Granulozyten für das kardiovaskuläre System

Die häufigste Ursache vieler kardiovaskulärer Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit (KHK) oder vieler Formen der Herzinsuffizienz ist die Atherosklerose [54]. Sie ist gekennzeichnet durch Akkumulation von Lipiden und fibrösen Elementen in der Tunica intima der Arterienwand, die dort so genannte *Atherome* oder *atherosklerotische Plaques* ausbilden [97]. Proliferierende glatte Muskelzellen und Matrixproteine, vor allem Kollagene, bilden eine fibröse Kappe über den Atheromen aus. Die wachsenden Plaques verursachen eine Verringerung des Lumenquerschnitts des Gefäßes und bedingen damit sowohl Störungen des laminaren Flussprofils, was zu Schäden des Endothels führen kann, als auch Störungen der Organperfusion bis hin zu Myokardinfarkt oder Schlaganfall. Stabile Atherome

verursachen häufig keinerlei Symptome und provozieren diese akuten ischämischen Ereignisse vielmehr durch thromboembolische Komplikationen, die aus der Erosion oder Ruptur der fibrösen Kappe hervorgehen [28, 140].

Etablierte Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose sind vor allem Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Nikotinabusus, wobei besonders die Lipide lange Zeit als eigentliche Verursacher proklamiert wurden. Heute ist dagegen die Beeinträchtigung der strukturellen und funktionellen Integrität des Endothels, die so genannte *endotheliale Dysfunktion*, unbestritten als wichtiger Initiator der Atherosklerose akzeptiert [137]. Sie ist charakterisiert durch alterierte humorale Eigenschaften des Endothels und besonders durch eine eingeschränkte Bioverfügbarkeit von NO $\cdot$  [22].

Als zentrale Ursache der endothelialen Dysfunktion sind heute inflammatorische Mechanismen etabliert [137].

Während Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten für die Pathophysiologie der Atherosklerose lange akzeptiert sind, wurde den neutrophilen Granulozyten zunächst in Anbetracht ihres Fehlens in stabilen atherosklerotischen Plaques wenig Bedeutung zugesprochen. Es finden sich jedoch zunehmend Hinweise dafür, dass neutrophile Granulozyten ganz wesentlich die Homöostase der Gefäßwand alterieren und so als Effektoren des inflammatorischen Geschehens pathophysiologische Prozesse induzieren [74]. So sind besonders granulozytäre Enzymsysteme verantwortlich für die verminderte Bioverfügbarkeit von NO $\cdot$ : Zum einen spielt die Reaktion der beiden Radikale NO $\cdot$  und Superoxid (O $_2^{\cdot-}$ ) zu Peroxynitrit (ONOO $^-$ ) eine zentrale Rolle in der Depletierung des NO $\cdot$ . Als Quelle des Superoxids dient vor allem die NADPH-Oxidase der PMN und in untergeordneter Bedeutung die endotheliale NADPH-Oxidase, die Xanthin-Oxidase, entkoppelte NO-Synthase, Enzyme des Arachidonsäurestoffwechsels und die Atmungskette der Mitochondrien aktivierter Leukozyten und Endothelzellen [22] (siehe 2.4). Zum anderen wird NO $\cdot$  Myeloperoxidase-vermittelt oxidiert (siehe 2.7.1). Neben der enzymatischen oder ROS-abhängigen, oxidativen Degradierung von NO $\cdot$  resultiert seine verringerte Verfügbarkeit aus verminderter eNOS-Expression [146] oder einem Mangel an eNOS-Substrat beziehungsweise ihrer Kofaktoren [119].

Die beeinträchtigte endotheliale Funktion, sowohl systemisch als auch insbesondere in der koronaren Zirkulation, korreliert positiv mit systemisch-inflamma-

torischen Markern wie CRP und IL-6 [40, 39, 41]. Sie ist nicht nur assoziiert mit der KHK, sondern auch ein prädiktiver Marker dafür [62].

Inflammatorische Mechanismen provozieren des Weiteren nicht nur die Initiation, sondern auch die Progression atherosklerotischer Prozesse, indem sie die Erosion und Ruptur der Atherome veranlassen [140]. In instabilen Plaques sind im Gegensatz zu stabilen nicht nur Lymphozyten und Makrophagen, sondern besonders auch neutrophile Granulozyten zu finden. Durch Sekretion von ROS und proteolytischen Enzymen und durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen tragen sie maßgeblich zur Destruktion der stabilisierenden Matrixproteine bei [96, 47, 110].

Der Anstoß der entzündlichen Ereignisse in der Gefäßwand ist bisher noch ungenügend verstanden. Es werden hierfür oxidierte Lipoproteine postuliert, als auch beispielsweise Urat- und Pyrophosphatkristalle [123]. Die relevanten Mechanismen differieren von klassischen Entzündungsprozessen, die eine definierte Noxe wie Pathogene oder Verletzungen implizieren (siehe 2.3). Für die chronische Inflammation der Gefäße, die in der Regel nicht aus einer akuten Entzündung hervorgeht, wurde der Begriff der „Para-Inflammation“ geprägt [105]. Sie ist im Gegensatz zur akuten Inflammation niedrig-gradig und als Noxen werden unspezifisierend „Dysregulation“ und „Malfunktion“ des Gewebes genannt, die zu einer homöostatischen Imbalance führen.

Doch auch akute vaskulär-pathophysiologische Geschehen unterliegen dem Einfluss der Inflammation und der neutrophilen Granulozyten. PMN scheinen direkt beteiligt am Auftreten akuter koronarer Ereignisse [110]. So korrelieren die Zahlen zirkulierender Leukozyten mit dem Risiko des Myokardinfarktes [46, 82]. Weiterhin wurde in Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine ausgeprägte Aktivierung der Granulozyten in den Koronararterien beobachtet [21].

Des Weiteren leisten inflammatorische Prozesse und insbesondere neutrophile Granulozyten einen maßgeblichen Beitrag zum Reperfusionsschaden nach Ischämie. Die Reperfusion nach eingeschränkter oder fehlender Blutzufuhr, z.B. nach Myokardinfarkt, ist zwar zur Erhaltung des Gewebes unbedingt notwendig, initiiert aber eine inflammatorische Kaskade, die das betroffene Areal schädigt (*Reperfusionsschaden*). Einwandernde Granulozyten tragen durch Sekretion von Zytokinen, Proteasen, ROS und Vasokonstriktoren maßgeblich dazu bei [45, 53, 44]. Außer-



dem sind sie beteiligt am so genannten „No-Reflow-Phänomen“ nach Ischämie. Das bedeutet, dass die Granulozyten in der Mikrozirkulation die gewebserhaltende Reperfusion behindern, da sie nach Aktivierung an Flexibilität verlieren und so die Kappilaren obstruieren [3, 2]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass eine Granulozyten-Depletion den Reperfusionsschaden deutlich verringert [124, 72, 99].

Trotz der Erkenntnisse zur Bedeutung der neutrophilen Granulozyten für die Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen scheiterte bisher die Suche nach einer erfolgreichen Granulozyten-spezifischen therapeutischen Strategie in diesem Bereich [74, 32].

## 2.7 Myeloperoxidase

Ein bedeutsamer Mediator granulozytärer Funktionen und gleichzeitig kardiovaskulär-inflammatorischer Erkrankungen ist die leukozytäre Peroxidase Myeloperoxidase (MPO). MPO ist ein 150 kDa schweres, homodimeres Hämprotein, dessen Monomere aus einer schweren und einer leichten Untereinheit zusammengesetzt sind und ein an die schwere Kette kovalent gebundenes Häm-Molekül tragen, welches dem Protein eine intensiv grüne Farbe verleiht [87]. Myeloperoxidase bildet zusammen mit der Lactoperoxidase, der eosinophilen Peroxidase und der thyroiden Peroxidase die Familie der Säugetier-spezifischen Peroxidasen. Myeloperoxidase besitzt zusätzlich zu den Peroxidase-typischen kovalenten Bindungen zwischen Protein und Häm eine kovalente Sulfoniumionen-Bindung zwischen dem Schwefelatom des Met<sup>243</sup> und dem terminalen Kohlenstoff der Vinylgruppe des Pyrrolringes A. Hierdurch werden dem Enzym spezifische Eigenschaften, wie die Fähigkeit, Chlorid als Substrat nutzen zu können, verliehen, die MPO von den anderen Mitgliedern der Familie differenziert [38, 135].

Die wesentliche Lokalisation der MPO im Organismus sind die azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten, in denen das Enzym bis zu 5% der Gesamttrockenmasse der Zellen ausmacht. Daneben ist es zu geringeren Anteilen auch in Monozyten und einigen Spezies Gewebe-residenter Makrophagen, als auch in hepatischen Kupfferzellen und Mikroglia im ZNS zu finden [27, 79].

Das Enzym dient den Zellen zur Katalyse reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RNS) und damit zur Pathogenabwehr. Es ist reich an Arginin und Lysin,

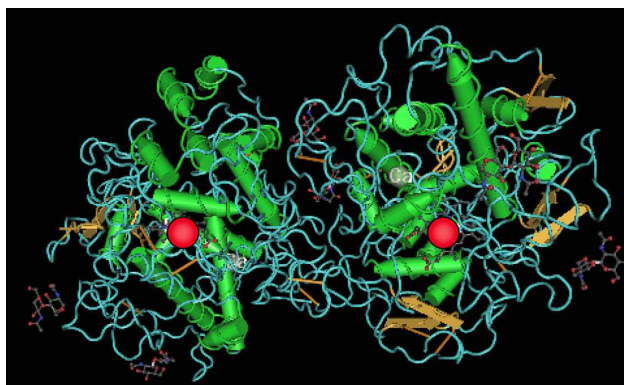


Abbildung 5: **Dreidimensionale Struktur der homodimeren Myeloperoxidase mit hervorgehobenen Häm-Molekülen (rot), Alpha-Helices (grün) und Beta-Faltblatt-Strukturen (gelb).** Aus Lau et al., Pharm Ther 2006.

weshalb es von basischem Charakter und bei physiologischem pH-Wert stark kationisch ist mit einem isoelektrischen Punkt von 9,2. Das pH-Optimum des Enzyms beträgt 5,5, trotzdem ist es aber über ein weites pH-Spektrum aktiv [29].

### 2.7.1 Katalytische Aktivität und Pathogenabwehr

Zur Katalyse enzymatischer Reaktionen ist ein vollständiges, so genanntes *MPO-System* notwendig, welches neben dem Enzym selbst noch Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) als Substrat und ein geeignetes, oxidierbares Kosubstrat beinhaltet. Wasserstoffperoxid, welches im aktiven Granulozyten vorwiegend aus der Dismutation von durch die NADPH-Oxidase in das Phagosom sezerniertem Superoxid hervorgeht, wird zunächst in einem  $2\text{e}^-$ -Übergang zu Wasser reduziert. Dabei wird das Enzym in einen intermediären, radikalischen Komplex überführt, die so genannte *Compound-I*. Ein Elektron dieser Reaktion stammt dabei vom  $\text{Fe}^{\text{III}}$  der Häm-Gruppe, welches zu  $\text{Fe}^{\text{IV}}$  oxidiert wird, während das zweite Elektron vom Porphyringerüst oder einer benachbarten aromatischen Aminosäure stammt, sodass hier ein Radikal entsteht. Ein Sauerstoffatom des  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird bei der Reaktion mit einer dativen Doppelbindung an das  $\text{Fe}^{\text{IV}}$  gebunden [76, 36].

Die *Compound-I* kann sowohl in einem  $2\text{e}^-$ - als auch in zwei  $1\text{e}^-$ -Übergängen zum nativen MPO zurückreagieren, wobei entsprechende Kosubstrate oxidiert werden (Abb. 6). Für die direkte Reduktion von *Compound-I* zu MPO kann sich

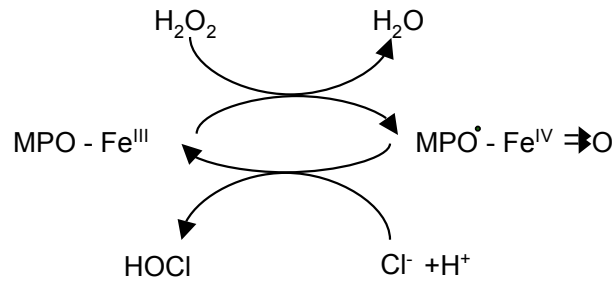
das Enzym Halogeniden, Pseudohalogeniden oder Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) bedienen. Die höchste Affinität besteht dabei zu Iodid, während Chlorid ( $\text{Cl}^-$ ) auf Grund der höheren physiologischen Konzentration den wesentlichen Reaktionspartner darstellt [43, 57]. Dieses wird oxidiert zu hypochloriger Säure ( $\text{HOCl}$ ), einem starken Oxidans und somit toxischen Molekül gegenüber Bakterien, Viren, Pilzen, Protozoen und Helminthen, gleichzeitig aber auch gegenüber körpereigenen Strukturen. Aus  $\text{HOCl}$  können weitere ebenfalls reaktive Oxidantien wie Singulett-Sauerstoff, Hydroxylradikale, oder in Gegenwart von überschüssigem  $\text{Cl}^-$  molekulares Chlor ( $\text{Cl}_2$ ) hervorgehen [60, 63]. Letzteres reagiert u.a. mit primären Aminen zu Mono- und Dichloraminen, die zu Aldehyden degradieren, einer stabileren Spezies, die die oxidative Kapazität auch in weitere Entfernungen zum Granulozyten protrahieren kann [59, 80]. Ebenso kommt es zur Mono- und Dichlorierung von Phenolresten, insbesondere von Tyrosin, so dass 3-Chloro- und 3,5-Dichlorotyrosin als spezifische Marker der MPO-Aktivität herangezogen werden [31]. Wird Nitrit als Kosubstrat für die  $2 e^-$ -Reduktion von MPO benutzt, entsteht das nitrierende Agens Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ).

Alternativ hierzu geschieht die Rückreduktion der MPO aus *Compound-I* in zwei Schritten zunächst über die Reduktion der radikalischen Struktur zu *Compound-II*, die unfähig zur Reaktion mit Halogeniden ist. Vielmehr werden in diesen beiden Schritten diverse geeignete Reduktionsmittel wie Ascorbat oder aromatische Aminosäuren oxidiert, aus denen Radikalintermediate hervorgehen, die dann wiederum weiter reagieren [103] (Abb. 6). Auch Superoxid dient zur Regenerierung der nativen MPO aus *Compound-II* [77, 78].

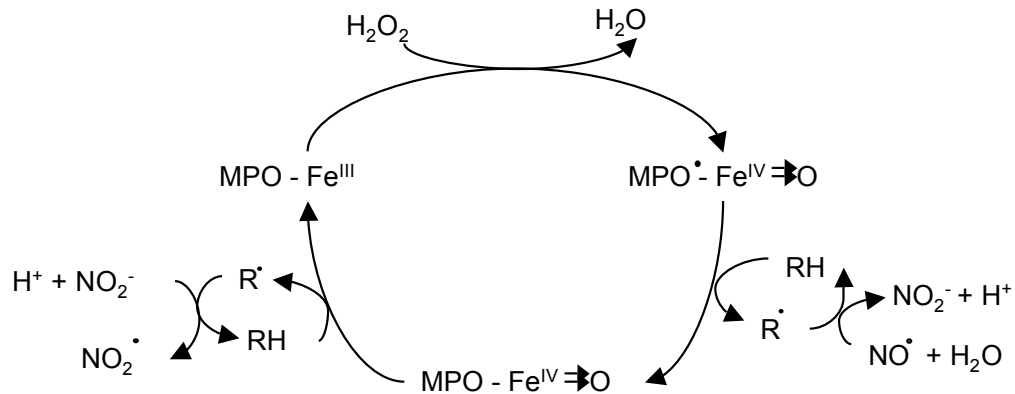
Weitere wichtige Reaktionspartner für die  $1 e^-$ -Reduktionen sind  $\text{NO}^\cdot$  und  $\text{NO}_2^-$  [33]. Sie können von MPO direkt als Reaktionspartner genutzt werden, unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlicher ist jedoch die Reaktion mit den durch MPO generierten Zwischenprodukten. Stickstoffmonoxid wird so zu  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_2^-$  zu Stickstoffdioxid ( $\text{NO}_2^\cdot$ ) oxidiert, welches wiederum ein reaktives Radikal und damit ein nitrierendes Agens darstellt [138, 34]. So gilt auch 3-Nitrotyrosin als Marker der MPO-Aktivität mit lediglich geringerer Spezifität als das chlorierte Addukt.

Die Generierung dieser ROS und RNS ist, wie schon erwähnt, eine potente mikrobizide Strategie der Immunzellen. In der jüngeren Vergangenheit wurde allerdings angezweifelt, dass das MPO-System unbedingt erforderlich für eine suf-

I.



II.



III.

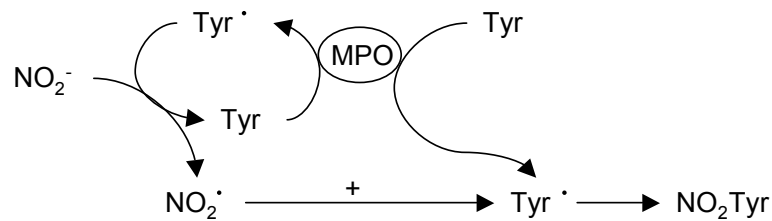


Abbildung 6: **MPO-katalysierte Reaktionen.** **I.** MPO reduziert in einer 2-e<sup>-</sup>-Reaktionen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und wird oxidiert zu *Compound-I* (MPO•-Fe<sup>IV</sup>). Diese wird wiederum zu MPO reduziert durch Oxidation von Cl<sup>-</sup> zu HOCl. **II.** Alternativ zu I. geschieht die Reduktion der *Compound-I* zu MPO in zwei 1-e<sup>-</sup>-Reaktionen mit oxidierbaren physiologischen Substraten (RH) über *Compound-II* (MPO-Fe<sup>IV</sup>), wobei durch Wasserstoffabstraktion Radikalintermediate (R•) entstehen. Diese können mit NO• und NO<sub>2</sub><sup>-</sup> reagieren, wobei NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO<sub>2</sub>• entstehen. **III.** Die Oxidation von Tyrosin (Tyr) zum Tyrosin-Radikal ist eine mögliche 1-e<sup>-</sup>-Reaktion. Aus der Reaktion von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> mit dem Tyrosin-Radikal geht Nitrotyrosin (NO<sub>2</sub>Tyr) hervor.

fiziente Pathogenabwehr ist, eine Frage, die noch umstritten bleibt [80].

*In-vitro* wurde gezeigt, dass MPO zur Abwehr von *Lactobacillus acidophilus*, bestimmten Staphylokokken-Spezies und *Candida tropicalis* notwendig ist [92, 93]. Außerdem weisen MPO-defiziente Mäuse erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Candida albicans*-Infektionen [6], gegenüber pulmonalen Infektionen durch *C. albicans*, *tropicalis* und *Pseudomonas aeruginosa* [7] und gegenüber Sepsis nach Läsionen des Caecums auf [51]. Die intraperitoneale Injektion des Bakteriums *Klebsiella pneumoniae* führte in der MPO-defizienten Maus zu einer erheblich erhöhten Mortalitätsrate (> 65%) gegenüber der Wildtyp-Maus (< 10%) [64]. Die Anfälligkeit der MPO-defizienten Maus gegenüber anderen Keimen wie *Staphylokokkus aureus* entspricht der des Wildtyps, so dass MPO also zur Abwehr bestimmter, jedoch nicht aller Keime notwendig ist.

Die Daten der Studien in der Maus lassen aber nur begrenzt eine Einschätzung der Situation im Menschen zu. Die humanen Granulozyten sind mit einigen potenten Mediatoren, darunter Defensine und das *Bactericidal Permeability-increasing Protein* (BPIP), ausgestattet, die in der Maus nicht zu finden sind [64]. Die MPO-Defizienz beim Menschen, die mit einer Inzidenz von 1:2000 bis 1:4000 auftritt, führt lediglich zu erhöhter Infektanfälligkeit in Verbindung mit weiteren Erkrankungen wie der Diabetes [115, 86]. Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse begann die Suche nach vielmehr extramikrobiziden Eigenschaften von MPO.

### 2.7.2 Extramikrobizide Eigenschaften der MPO

Seitdem potentiellen extramikrobiziden Eigenschaften der MPO Beachtung geschenkt wird, ist sie zunehmend akzeptiert als wichtiger Mediator vaskulär-inflammatorischer Erkrankungen. Heute ist bekannt, dass MPO einen relevanten Beitrag leistet zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion, zur Generierung atherogener Lipoproteine und Initiation von Atheromen, zur Plaqueruptur und zu gestörtem ventrikulären Remodeling [111].

Ein wichtiger Schritt zu dessen Erkenntnis war der Befund, dass MPO in pathophysiologisch-relevantem Ausmaß NO<sup>•</sup> oxidiert [33]. Damit reduziert das Enzym die Bioverfügbarkeit dieses wichtigen vasoaktiven und anti-inflammatorischen Moleküls, was sich sowohl im Tiermodell *ex-vivo* [33], *in-vivo* (Wipper et al., un-

veröffentlichte Daten) als auch im Patienten nach myokardialer Ischämie und Reperfusion [13] in verminderter vaskulärer Relaxationsfähigkeit bzw. veränderter Hämodynamik äußerte. Eine zentrale Voraussetzung zur MPO-vermittelten NO-Konsumption ist die räumliche Nähe des Enzyms zum sehr kurzlebigen NO-Radikal. MPO bindet nach Sezernierung aus aktivierten PMN mit hoher Affinität an die Gefäßwand und akkumuliert konsekutiv in der subendothelialen Matrix [11]. Die Bindung erfolgt vornehmlich aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen an Heparan-Glykosaminoglykane auf der Oberfläche der Endothelzellen, von denen MPO durch transzytotische Mechanismen in den subendothelialen Raum transportiert wird. Eben dieser Raum muss auch von dem endothelial generierten NO $\cdot$  auf dem Weg in die Tunica media passiert werden.

MPO zeigt hier eine besondere Affinität zum ECM-Protein Fibronectin, welches daher favorisiertes Ziel oxidativer Veränderungen durch MPO ist [11]. Das für diese Reaktionen relevante MPO-generierte Oxidans ist in der Gefäßwand neben HOCl NO $_2$ , welches durch Oxidation von NO $\cdot$  hier vermehrt gebildet wird und bevorzugt zur Entstehung von Chloro- und Nitrotyrosin führt (siehe 2.7.1) [10, 20].

Diese posttranslationalen Proteinmodifikationen sind aber nicht nur Marker der inflammatorischen Prozesse, sondern bedingen auch eine Alternierung der biologischen Funktion der Proteine [141], die zur Beeinträchtigung der Endothelfunktion beiträgt. Darüber hinaus vermindert die HOCl-vermittelte Chlorierung von L-Arginin, dem Substrat der NO-Synthase, deren Aktivität und trägt so zusätzlich zur verminderten NO-Bioverfügbarkeit bei [151].

Die MPO-generierte HOCl wurde weiterhin als Oxidans der Lipoproteine LDL und HDL identifiziert [89, 58]. Chloriniertes und nitriertes LDL wird bevorzugt von Makrophagen aufgenommen, die dadurch zu proatherogenen Schaumzellen differenzieren. Die Anwesenheit von MPO und dessen Oxidationsprodukten in Atherosomen und die Kolo-kalisation mit Lipid-gefüllten Makrophagen konnte mehrfach nachgewiesen werden [110, 27, 133, 132]. Das Apolipoprotein-A1 ist ebenfalls von der Oxidation betroffen, was zu einem gestörten Cholesteroltransport führt [116].

Makrophagen, die üblicherweise bei der Differenzierung aus Monozyten MPO verlieren, werden durch den Wachstumsfaktor GM-CSF zur Erhaltung oder Expression von MPO provoziert und können so selbst HOCl generieren [133]. HOCl trägt im atherosklerotischen Plaque durch Aktivierung der MMP-7 und durch Initi-

ierung der Aktivierung und Apoptose von Endothelzellen, als auch ihrer Ablösung von der Matrix zur Destabilisierung und Ruptur des Atheroms bei [132].

Die Generierung toxischer Aldehyde durch MPO-vermittelte Chlorierung von  $\alpha$ -Aminosäuren wurde mit einer verstärkten linksventrikulären (LV) Dilatation und einer verschlechterten LV-Funktion in MPO-kompetenten im Vergleich zu MPO-defizienten Mäusen nach Myokardinfarkt in Verbindung gebracht [139]. Außerdem konnte eine Korrelation erhöhter MPO-Plasmaspiegel mit eingeschränkter LV-Funktion in Patienten gefunden werden [126].

Jüngste Untersuchungen konnten darüber hinaus einen mechanistischen Zusammenhang zwischen MPO und der Vulnerabilität für die Rhythmusstörung Vorhofflimmern aufzeigen (Rudolph et al., unveröffentlicht).

Neben dieser Vielzahl an Befunden zur Kontribution der MPO an inflammatorischen und atherogenen Prozessen wurde das Enzym als unabhängiger prädiktiver Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert. Zum einen scheinen MPO-defiziente Personen mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit eine kardiovaskuläre Erkrankung zu entwickeln als MPO-kompetente [84]. Zum anderen korrelieren hohe MPO-Plasmaspiegel mit endothelialer Dysfunktion, bestimmt durch Flussabhängige Dilatation der A. brachialis [142]. Während Koronarangiographie ermittelte, erhöhte MPO-Konzentrationen im Plasma und in Leukozyten waren positiv assoziiert mit dem Vorkommen einer KHK [152]. Bei Patienten mit Angina pectoris konnten initial gemessene, hohe MPO-Plasmaspiegel als unabhängiger Prädiktor für das frühe Risiko für myokardiale Ischämien identifiziert werden [19]. Ebenfalls zeigten sich gesteigerte MPO-Spiegel in Patienten mit akutem Koronarsyndrom als unabhängiger Prädiktor für ein erhöhtes Risiko eines kardialen Ereignisses innerhalb eines 6-monatigen *Follow-Up* Zeitraums [12]. Bemerkenswerter Weise wurden erhöhte MPO-Spiegel auch in offenbar gesunden Patienten als unabhängiger prädiktiver Marker für das Auftreten einer KHK in einem *Follow-Up* Zeitraum von 8 Jahren aufgedeckt [106]. Die beschriebenen Befunde lassen bisher zum großen Teil noch die Erkenntnis vermissen, ob MPO hier kausal beteiligt ist oder nur als Marker vermehrter Aktivierung der Granulozyten fungiert.

### 2.7.3 Extrakatalytische Eigenschaften der MPO

Als potentieller Mechanismus der vaskulär-proinflammatorischen und proatherogenen Eigenschaften der MPO wird maßgeblich dessen katalytische Aktivität, also die Katalyse der Oxidation von NO<sup>·</sup> und der Produktion reaktiver Spezies proklamiert. Es konnten aber erstmalig auch extrakatalytische Eigenschaften der MPO aufgedeckt werden. Es wurde gezeigt, dass CD11b-Integrine auf der Zelloberfläche neutrophiler Granulozyten Rezeptoren für MPO darstellen, über welche MPO den Aktivierungszustand der Zellen modulieren kann [88]. So resultiert die Interaktion von MPO mit Granulozyten in einer deutlichen Erhöhung der Phosphorylierung mehrerer zellulärer Proteine, in der Aktivierung intrazellulärer Proteintyrosin-Kinasen, in verstärkter Degranulation und außerdem in vermehrter Expression der CD11b-Integrine.

Weiterhin scheint MPO unabhängig der katalytischen Aktivität die biologische Funktion der Endothelzelle zu manipulieren, nachdem es nicht nur im Bereich der Membran und des Zytosols der Zellen akkumuliert, sondern auch in den Zellkern transportiert wird: Das Protein verändert das Genexpressionsprofil von Endothelzellen. So ließ sich die positive Regulation eines an der Angiogenese und Vasokonstriktion beteiligten Proteins nachweisen, nämlich des Endothelin-Rezeptors Typ B. Inwieweit die darüber hinaus nachzuweisende vermehrte Proliferation und Migration von Endothelzellen in Gegenwart von MPO Endothelin-Rezeptor Typ B vermittelt ist, ist Gegenstand gegenwärtiger Untersuchungen (Lau et al., unveröffentlichte Daten).

### 2.7.4 Hypothese zum Einflusses der MPO auf die Adhäsion und Migration neutrophiler Granulozyten

Der aktuelle Stand der Forschung vermittelt zahlreiche Erkenntnisse zur vaskulär-pathophysiologischen Bedeutung der MPO. Der erhebliche prädiktive Wert und die Korrelation von MPO-Konzentrationen in Plasma und Leukozyten mit kardiovaskulären Erkrankungen lässt vermuten, dass längst nicht das gesamte Spektrum der MPO-vermittelten Funktionen aufgedeckt ist. Gerade der Bereich der extrakatalytischen Eigenschaften der MPO ist bisher nur wenig untersucht.

Die Affinität des Proteins zu CD11b-Integrinen neutrophiler Granulozyten und



zur Oberfläche der Endothelzelle und die CD11b-abhängige Aktivierung der Granulozyten provozierte die Hypothese, dass MPO die Adhäsion der PMN an das Endothel und/oder die Migration dieser Zellen modulieren könnte.

Andere Arbeitsgruppen konnten *in-vitro* MPO als Vermittler der CD11b-abhängigen Bindung von Granulozyten an Plastikoberflächen beschreiben [71].

In einem Tiermodell des akuten Myokardinfarktes durch Ligatur einer Koronararterie, des Ramus interventricularis anterior, wurde beobachtet, dass am dritten Tag nach Infarkt MPO-defiziente Mäuse eine signifikant geringere myokardiale Infiltration von Leukozyten aufwiesen als MPO-kompetente Tiere [9].

Eine Untersuchung der renalen Granulozyten-Infiltration nach Ischämie zeigte nach 24-stündiger Reperfusion ebenfalls signifikant niedrigere Granulozytenzahlen in der MPO-defizienten Maus im Vergleich zum Wildtyp [104]. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Beobachtungen ist bisher gänzlich unverstanden.

# Kapitel 3

## Zielsetzung

Myeloperoxidase ist ein leukozytäres Enzym mit nicht nur mikrobiziden, sondern auch vaskulär pro-inflammatorischen Eigenschaften. Zusätzlich zu enzymatisch vermittelten Prozessen tragen auch extrakatalytische Eigenschaften der MPO zu einer Störung der Gefäßfunktion bei. Die Zytokin-artige Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch die Interaktion der MPO mit CD11b-Integrinen resultiert in gesteigerter Degranulation, Superoxidproduktion und Integrin-Expression der Zellen.

Diese Arbeit soll untersuchen, ob MPO auch die Migration neutrophiler Granulozyten beeinflusst. Die granulozytäre Migration ist nicht nur kritische Voraussetzung der Pathogenabwehr, sondern auch ein zentraler Mechanismus vaskulär inflammatorischer Prozesse.

Die vorliegende Arbeit zielt darauf, die Bedeutung der MPO für die granulozytäre Adhäsion und Chemotaxis *in-vitro* und die hepatische Infiltration in einem Mausmodell *in-vivo* zu charakterisieren.

Somit soll das Verständnis extrakatalytischer und pro-inflammatorischer Eigenschaften der MPO maßgeblich erweitert werden, um einen Beitrag zur Aufklärung der Pathophysiologie vaskulärer Inflammation und damit zur möglichen Entwicklung neuer anti-inflammatorischer Therapie-Strategien zu leisten.

# Kapitel 4

## Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Reagenzien und Arzneistoffe

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Merck (Darmsatdt)
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Invitrogen (Karlsruhe)
3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)	Sigma (Deisenhofen)
(-)-Blebbistatin	Sigma
Bovines Serumalbumin	Sigma
Cathepsin-G	Calbiochem (Darmstadt)
Cytochalasin D	Sigma
Dako Faramount Aqueous Mounting Medium	Dako (Glostrup, DK)
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako
4',6-Diamidino-2-phenylindol (Dapi)	Sigma
2-Deoxy-D-glucose	Sigma
Dextran-Blau	Sigma
Dextran von leuconostoc mesenteroides	Sigma
Diethanolamin	Sigma
N,N-Dimethylformamid	Sigma

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Essigsäure	Merck
Fibrinogen von humanem Plasma	Sigma
Fibronektin von humanem Plasma	Invitrogen
Fötale Kälberserum	Gibco (Karlsruhe)
Fötale Rinderserum	Gibco
Formaldehyd	Tousimis (Rockville, MD, USA)
Gelatine	Sigma
Hämalaun nach Mayr, sauer	Sigma
HBSS	Invitrogen
Heparin-Natrium 25000-ratiopharm	Ratiopharm (Ulm)
Histopaque-1077	Sigma
Interferon- $\gamma$	Pepto-Tech (Hamburg)
Interleukin-8 (IL-8)	Pepto-Tech
Ketamin Gräub	AniMedica (Senden-Bösensell)
LY 294002	Calbiochem
Macrophage-Inflammatory-Protein-2 (MIP-2)	Pepto-Tech
Maus-Serum	Sigma
Metamizol	Ratiopharm
Murines Serumalbumin (MSA)	Calbiochem
Myeloperoxidase (MPO), human	Planta Natural Products (Wien, A)
Myeloperoxidase M243T, rekombinant (mutMPO)	generiert von Prof. Obinger, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Wien, A
Myeloperoxidase, murin	generiert von P. Heeringa, Groningen, NL
Myeloperoxidase-Inhibitor (4-Aminobenzoessäurehydrazid, ABAH)	Calbiochem
Natriumchlorid-Lösung, 0,9%	BBraun (Melsungen)
Natriumazid	Sigma
N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)	Sigma

Bezeichnung	Hersteller
PAPA-NONOat	Cayman
Para-Nitrophenylphosphat	Sigma
PBS	Invitrogen
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma
Protamin	
Protease-Inhibitor Complete	Roche (Mannheim)
Rompun 2% (Xylazin)	Bayer (Leverkusen)
Sepahrose Beads: Glutathion Sepharose High Performance, HiTrap SP HP (Sulfopropyl-konjugiert), HiTrap Q HP (quaternäres Ammoniumsalz-konjugiert)	GE Healthcare (Uppsala, S)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma
TNF- $\alpha$	Pepro-Tech
Triton X-100	Sigma
Trypsin-EDTA	Sigma
Ziegenserum	Sigma

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Diethanolaminpuffer 1M	97ml Diethanolamin, 100mg MgCl <sub>2</sub> , 0,2g Natriumazid ad 1 Liter Aqua dem., pH 9,8
Homogenisierungs-Puffer	121mg Tris-HCl, 4,28g Saccharose, 57mg EGTA, 292mg EDTA ad 50ml Aqua bidest., pH 7,5,
Homogenisierungs-Lösung	1 Tablette Protease-Inhibitor, 50 $\mu$ l Triton X-100 ad 10ml Homogenisierungs-Puffer
Natriumacetatpuffer pH 5,0	28,75ml Essigsäure (konz.), 41,015g Natriumacetat ad 1 Liter Aqua dem., pH 5,0
Zellpuffer	0,25% bovines Serumalbumin in HBSS, sterilfiltriert

### 4.1.3 Antikörper

Bezeichnung Primäre Antikörper	Spezifität	Spezies des Spender-tiers	Hersteller
CD11a, anti-human ( <i>blocking</i> )	monoklonal	Maus	BioLegend (San Diego, CA, USA)
CD11b, anti-human/Mouse ( <i>blocking</i> )	monoklonal	Ratte	BD Biosciences (Heidelberg)
CD11b, anti-human (IHC)	monoklonal	Maus	Sigma
ICAM-1, anti-human	monoklonal	Maus	Sigma
LY-6G-Neutrophile, anti-Mouse	monoklonal	Ratte	HyCult biotechnology (Uden, NL)
MPO, anti-human	polyklonal	Kaninchen	Calbiochem

Bezeichnung Sekundäre Antikörper	Konjugat	Spezies des Spender-tiers	Hersteller
IgG, anti-Mouse	Alkalische Phosphatase	Ziege	Sigma
Alexa Fluor 488 anti-Rabbit	Alexa Fluor 488	Ziege	Molecular Probes (Invitrogen)
Alexa Fluor 594 anti-Mouse	Alexa Fluor 594	Ziege	Molecular Probes
IgG, anti-Rat	Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Kaninchen	Dako

Bezeichnung Sekundäre Antikörper	Konjugat	Spezies des Spender- tiers	Hersteller
IgG, anti-Rabbit	Meerrettich- Peroxidase (HRP)	Ziege	VectorLabs (Peterbo- rough, UK)

#### 4.1.4 Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
Pierce BCA-Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
MPO ELISA, Maus	HyCult biotechnology

#### 4.1.5 Zelllinien und Kulturmedia

Bezeichnung	Firma
Humane Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVEC)	Cambrex (Verviers, Belgien)
Basalmedium (EBM)	Cambrex
Supplement-Kit (+EBM = Growth- Medium (EGM))	Cambrex

#### 4.1.6 Mauslinien

Bezeichnung	Herkunft
C57bl6/J	The Jackson Laboratory (Maine, USA)
MPO <sup>tm1lus</sup> /J	The Jackson Laboratory
Itgam <sup>tm1Myd</sup> /J	The Jackson Laboratory

#### 4.1.7 Laborgeräte, Apparaturen und Software

Bezeichnung	Firma
Casy-Counter, Casy 1	Schärfe System (Reutlingen)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
CCD-Kamera, Retiga 1300	QImaging (Surrey, BC, Canada)
FACS Canto	BD Biosciences
Fluorometer, Twinkle LB 970	Berthold (Bad Wildbad)
Fluoreszenzmikroskop, DMLB	Leica (Solms)
Invers-Mikroskop, CK2	Olympus (Hamburg)
Manual-Tracking-Tool, Chemotaxis-Tool für ImageJ	Integrated Biodiagnostics (München)



## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Isolation neutrophiler Granulozyten

Zur Isolation neutrophiler Granulozyten wurde peripher-venöses Blut gesunder Spender mit einer 50ml-Perfusorspritze abgenommen, in der Heparin-Natrium vorgelegt war (Endkonzentration 20IE/ml). Die Isolation erfolgte nach Eiserich und Kollegen [34]. Hierzu wurde das heparinisierte Blut 1:1 mit einer Lösung von Dextran (45mg/ml 0,9% NaCl) gemischt. Nach einer 30-minütigen Sedimentationsphase der mit Dextran gefüllten Erythrozyten, basophilen und eosinophilen Granulozyten wurde der Überstand (Plasma mit Leukozyten, Thrombozyten und restlichen Erythrozyten) unter Erhaltung der Phasengrenze vorsichtig auf 15 ml Histopaque-1077 pipettiert. Der Ansatz wurde für 30 Minuten mit 600 x g und deaktivierter Bremsenfunktion zentrifugiert. Der Überstand (Thrombozyten und mononukleäre Zellen in Histopaque) wurde verworfen. Zur Entfernung restlicher Erythrozyten aus dem Pellet wurde dieses mit 6ml Aqua bidest. einige Sekunden resuspendiert zur hypotonen Lyse der Erythrozyten und dann in 0,9% NaCl-Lösung aufgenommen. Zur Pellettierung der neutrophilen Granulozyten wurde anschließend für 10 Minuten mit 350 x g zentrifugiert und der Überstand wiederum verworfen. Das Pellet wurde in 1ml steril filtriertem HBSS mit 0,25% BSA (Zellpuffer) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die Viabilität der PMN wurde durch Trypan-Blau-Ausschluss bestimmt. 1 $\mu$ l der Zellsuspension wurde für 5 min mit einer Lösung von Trypan-Blau (5mg/ml) inkubiert, welches intakte Zellmembranen nicht passieren kann und anschließend mikroskopisch kontrolliert. Die Viabilität der Zellsuspension in % ergibt sich aus der Anzahl nicht gefärbter Zellen dividiert durch die die Gesamtzellzahl im Gesichtsfeld multipliziert mit 100%. Die Viabilität betrug stets 94-99%.

Zur Bestimmung der Zellzahl der gewonnenen Suspension wurde 1 $\mu$ l entnommen, 1:100 verdünnt und 10 $\mu$ l dieser Suspension in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Mikroskopisch (Vergrößerung x 100) wurden alle 4 Quadranten der Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl der Suspension wie folgt berechnet:

X = Anzahl Zellen in 4 Quadranten der Zählkammer

Y = Anzahl Zellen/ml Suspension

$Y = X/4 * 10^6$  Inkubationen der PMN erfolgte stets, falls nicht anders aufgezeigt, bei  $30^{\circ}C$  unter leichtem Schütteln (350 rpm).

### 4.2.2 Kultivierung humaner Umbilikalvenen-Endothelzellen

Das Aussähen und Passagieren der humanen Endothelzellen erfolgte in einer Laminar-Flow-Bank zur Gewährleistung steriler Bedingungen nach den Angaben des Anbieters (Cambrex). Zunächst wurden t-75-Zellkulturflaschen mit 1% Gelatine-Lösung beschichtet. Dazu wurden 5ml der steril filtrierten Lösung in die Flasche gegeben, der Überstand wieder abgenommen und die Flasche für 1 Stunde in der Bank belassen.

Dann wurde diese mit 14 ml Endothelzellkultur-Medium (EGM) befüllt und zur Sättigung des Mediums mit  $CO_2$  in den Brutschrank gestellt.

Die humanen Umbilikalvenen-Endothelzellen (HUVECs) wurden kryokonserviert von der Firma Cambrex erworben und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Aussähen wurden eine Ampulle mit  $\geq 500000$  Zellen für 30 Sekunden im  $37^{\circ}C$  warmen Wasserbad aufgetaut und der Inhalt in 1ml EGM ( $37^{\circ}C$ ) suspendiert. Die Zellsuspension wurde in die vorbereitete Zellkulturflasche gegeben, gleichmäßig verteilt und die Flasche für 24 Stunden im Brutschrank belassen. Danach wurde das Medium in der Flasche alle 2 Tage erneuert, bis die Zellen einen konfluenten Zellrasen bildeten.

Zum Passagieren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit 2ml Trypsin-EDTA Lösung überschichtet und für 1 Minute in den Brutschrank gegeben. Das Trypsinieren wurde gestoppt durch Zugabe von 1ml fötalem Rinderserum. Durch Klopfen der Flasche wurden die Zellen vollständig vom Boden abgelöst und die Suspension in ein 50ml Falcontube überführt. Die Zellen wurden durch 3-minütiges Zentrifugieren mit 1000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium mit einer Verdünnung zur ursprünglichen Konzentration von 1:3 bis 1:4 wieder aufgenommen und in mit Gelatine beschichtete t-75-Kulturflaschen, 6-Well-Platten oder 96-Well-Platten zur weiteren Kultivierung gegeben.

### 4.2.3 Adhäsionsstudien neutrophiler Granulozyten an Matrixproteine

Zur Untersuchung des Effektes von MPO auf die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Fibronectin wurden 96-*Well*-Platten für 2 Stunden mit Fibronectin ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ) allein oder mit Fibronectin und MPO ( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beschichtet und anschließend mit PBS gewaschen.

Neutrophile Granulozyten (2 Millionen / ml Zellpuffer) wurden teilweise mit MPO ( $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 20 Minuten inkubiert und anschließend wurde je  $200\mu\text{l}$  der Zellsuspension in ein Well der beschichteten Platte gegeben. Nach 5 Minuten wurden nicht gebundene Zellen mit dem Überstand verworfen und die gebundenen Granulozyten mit 3,7% Formaldehyd für 10 Minuten fixiert. Die Platte wurde dann 1 Mal mit PBS gewaschen und die fixierten Zellen mit Dapi ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach 2-maligem Waschen wurde die Fluoreszenz mittels Fluorometer gemessen. Die Einstellungen des Fluorometers wurden wie folgt gewählt:

Anregungswellenlänge 355nm, Emissionswellenlänge 460nm

Scan-Modus: Messung von 100 Punkten/*Well*

### 4.2.4 Adhäsionsstudien neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen

HUVECs der Passagen 3 bis 8 wurden in 6-*Well*-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Adhäsionsstudie wurden diese dann 2 Mal mit warmem HBSS gewaschen und mit 1ml Basalmedium (EBM) pro Well bedeckt, zu dem in einigen Fällen MPO ( $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder die Cytokine TNF- $\alpha$  ( $300\text{U}/\text{ml}$ ), Interferon- $\gamma$  ( $250\text{U}/\text{ml}$ ) und Interleukin-8 ( $0,2\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gegeben waren. Die Zellen wurden so für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Neutrophile Granulozyten wurden zu je 4 Millionen in  $1500\mu\text{l}$  HBSS suspendiert, wenn angezeigt mit MPO ( $20\mu\text{g}$ ) versetzt und 20 Minuten unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Granulozyten durch Zentrifugieren mit  $800 \times g$  für 5 Minuten pellettiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in HBSS resuspendiert und in 4 Aliquots geteilt. Die

Endothelzellen wurden mit HBSS gewaschen und die Granulozyten-Suspension wurde in die Wells gegeben. Nach leichtem, 5-minütigen Schütteln wurde 137 $\mu$ l des Überstandes abgenommen und mit je 13 $\mu$ l 37%igem Formaldehyd versetzt, um die Zellen zu fixieren. Es wurde jede Bedingung jeweils in drei Wells parallel durchgeführt, wofür drei Aliquots eines Ansatzes benutzt wurden. Das vierte Aliquot wurde sofort mit Formaldehyd fixiert und später zur Normalisierung der Zellzahl der jeweiligen Bedingung herangezogen.

Die fixierten Zellen der Überstände und der Kontrolle wurden mit dem Casy-Counter gezählt.

Der relativ kurze Zeitraum von 5 Minuten für die Ausbildung der Bindung wurde gewählt, da vermieden werden sollte, dass durch Interaktion der PMN mit den HUVECs neue endotheliale oder granulozytäre Adhäsionsmoleküle exprimiert werden und dadurch ein MPO-unabhängiger Effekt auftritt.

#### **4.2.5 Quantifizierung der NO- und MPO-abhängigen ICAM-1-Expression auf Endothelzellen**

Um zu untersuchen, ob MPO die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf Endothelzellen moduliert, wurden HUVECs der Passagen 3 bis 8 in 96-Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden 2 Mal mit HBSS gewaschen und dann wie folgt behandelt:

MPO 5 $\mu$ g/ml oder

MPO 5 $\mu$ g/ml + PAPA-NONOat 400 $\mu$ M

in 100 $\mu$ l EBM, 37°C, 30 Minuten.

Dann wurde teilweise zusätzlich TNF- $\alpha$  (300U/ml) hinzu gegeben und weitere 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Währenddessen wurde nach 30 Minuten erneut PAPA-NONOat in einer Endkonzentration von 400 $\mu$ M zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 1 Mal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten unspezifische Bindungsstellen mit 5%igem fötalem Rinderserum (FBS) in HBSS bei 37°C blockiert. Dann wurde ein Antikörper zur Markierung von ICAM-1 zugegeben (anti-ICAM-1, 10 $\mu$ g/ml HBSS/5% FBS). Nach 30 Minuten wurde 4 Mal mit PBS gewaschen und die Zellen wurden mit Sekundärantikörper versetzt (anti-Maus IgG, 1:1000 in HBSS/5% FBS), der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt

war. Wiederum nach 30 Minuten wurden die Zellen 5 Mal mit PBS gewaschen und die Wells mit  $100\mu\text{l}$  einer frisch zubereiteten Lösung von Para-Nitrophenylphosphat in Diethanolaminpuffer (pH 9,8) gefüllt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Die Phosphatase-katalysierte Dephosphorylierung zum gelb gefärbten Para-Nitrophenol wurde dann mit 3M NaOH gestoppt und die Absorption der gelb verfärbten Lösung jedes Wells bei  $405\text{nm}$  vermessen. Die Absorption eines Ansatzes ohne den Erstantikörper diente als Kontrollwert für die Hintergrundabsorption und wurde von den übrigen Messwerten subtrahiert.

#### 4.2.6 Migrationsanalyse im *Ibidi- $\mu$ -Slide*

Zur Analyse der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten diente das *Mikroslide*-Modell der Firma Ibidi (Integrated Biodiagnostics, München), wobei das  $\mu$ -Slide I mit Ibitreat-Beschichtung verwandt wurde.

##### Das *Ibidi $\mu$ -Slide* Modell

Das  *$\mu$ -Slide I* enthält zwei Reservoirs, die durch einen  $50\text{mm}$  langen,  $0,4\text{mm}$  hohen und  $5\text{mm}$  breiten Kanal miteinander verbunden sind. In diesem Modell lässt sich durch Füllen des Kanals mit einer Flüssigkeit und anschließender unilateraler Applikation einer zweiten Flüssigkeit ein Gradient erzeugen, der nach Berechnungen des Herstellers je nach Größe der gelösten Moleküle bei  $20^\circ\text{C}$  30 bis 120 Minuten lang stabil verbleibt. Die Bewegung der Zellen soll in dem Bereich  $x$  des

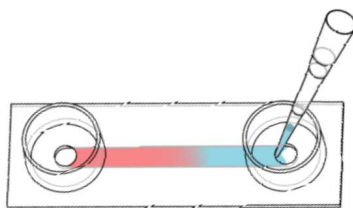


Abbildung 7: **Ibidi- $\mu$ -Slide I, Integrated Biodiagnostics.** Im Kanal des *Slides* kann mit zwei verschiedenen Flüssigkeiten ein stabiler Gradient erzeugt werden.

steilsten Gradienten erfolgen, der sich mittels eingebrachtem Volumen der zweiten Flüssigkeit und Kanalgeometrie wie folgt berechnen lässt:

$$x = \frac{3}{2} * \frac{V}{(h * w)},$$

wobei  $x$ =Position im Kanal gemessen ab der Öffnung in mm,  $V$ = eingebrachtes Volumen in  $\text{mm}^3$ ,  $h$ = Kanalhöhe in mm,  $w$ = Kanallänge in mm

Die Anwendbarkeit dieser Berechnung wurde vom Hersteller mittels fluoreszierender Beads bestätigt, wobei sich ein stabiler Gradientenbereich um  $x$  mit der Breite von ca 1,5mm ergab.

Für das hier gewählte Modell wurde das Volumen von  $30\mu\text{l}$  der Lösung von potentiell chemoattraktiven Faktor gewählt, was einen Observationsbereich  $x$  von  $3/2 * 30\text{mm}^3 / (0,4\text{mm} * 5\text{mm}) = 22,5\text{mm}$  ergibt. Durch Anfärben der Flüssigkeit mit Dextran-Blau wurde dieser Bereich visuell bestätigt. Für MPO als Chemotaxin wurde allerdings die Überlegung angestellt, dass das Protein aufgrund seiner starken Affinität u.a. zu Fibrinogen, mit welchem hier der Kanal beschichtet wurde, sofort an die Oberfläche bindet und daher nur sehr wenig Protein bis zum Punkt von 22,5mm in den Kanal vordringt, sodass eventuell eine kleinere Distanz für den Observationsbereich in Betracht gezogen werden muss. Diese Überlegung wurde wie folgt bestätigt:

Der Kanal des *Slides* wurde mit Zellpuffer gefüllt. Dann wurde von einer Seite (von rechts)  $30\mu\text{l}$  einer Lösung von  $20\mu\text{g}$  MPO/ml Zellpuffer eingebracht, während auf der anderen Seite des Kanals gleichzeitig  $30\mu\text{l}$  Flüssigkeit abgenommen wurden. Dann wurde von links sehr langsam eine Lösung von  $60\mu\text{l}$  Tetramethylbenzidin-Lösung (TMB, 4,8mg/ml Dimethylformamid) und  $100\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $80\text{mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  Puffer appliziert. MPO-I, welches aus der Reaktion von MPO und  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht, reagiert mit TMB zu MPO-II und weiter zu MPO, wobei TMB zu einem blau gefärbten Produkt oxidiert wird. Bei erster Blauentwicklung im *Mikroslide* wurde dieser Punkt ( $x=18\text{mm}$ ) des Kanals ausgemessen und im Folgenden als Observationsbereich für MPO-abhängige Zellbewegung festgelegt.

### Experimentelles Protokoll

Der Kanal des *Mikroslides* wurde mit Fibrinogen ( $250\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2h, RT) beschichtet und anschließend mit Zellpuffer wiederholt von beiden Seiten gewaschen. PMN wurden in Zellpuffer zu 1 Millionen/ml verdünnt und wenn indiziert mit einer der folgenden Reagenzien inkubiert:

Anti-CD11a Antikörper,  $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$ , 45min

Anti-CD11b Antikörper, 0,5 $\mu$ g/ml, 45min  
 4-Amino-Benzoesäurehydrazid (ABAH), 10 $\mu$ M, 5min  
 (-)-Blebbistatin (100 $\mu$ M, 30min)  
 Cytochalasin D (1 $\mu$ M, 30min)  
 LY 294002 (200 $\mu$ M, 2h)  
 Natriumazid/2-Deoxy-Glucose (je 50mM, 1h)  
 Protamin (20, 100, 250, 500 $\mu$ g/ml, 2min)

Diese Suspension wurde dann in das *Ibidi-Slide* appliziert und den Zellen 5 min Zeit gegeben, an die Oberfläche zu binden. Dann wurde 30 $\mu$ l einer Lösung von MPO (120nM falls nicht anders aufgezeigt), Interleukin-8 (IL-8, 25nM), Cathepsin-G (120nM) oder humanem Serumalbumin (120nM), jeweils versetzt mit entsprechenden Antikörpern, Inhibitoren und Reagenzien, langsam wie oben für MPO beschrieben in den Kanal pipettiert. Anschließend wurde der Gradientenbereich für 20min lichtmikroskopisch beobachtet (x 200).

### **Sepharose-*Beads***

In einigen Experimenten wurden statt der PMN Glutathion-, Sulfopropyl- oder mit quaternärem Ammoniumsalz konjugierte Sepharose-Beads verwendet. Die *Beads* wurden 4 Mal mit PBS gewaschen, 1:200 in Zellpuffer verdünnt, wie oben für PMN beschrieben in den Kanal des *Ibidi-Slides* appliziert und das Experiment wie für PMN beschrieben durchgeführt. Der Beobachtungszeitraum betrug anstatt 20 in diesem Fall 30 Minuten.

### ***Time-Lapse* Mikroskopie und Auswertung**

Zu Beginn des Beobachtungszeitraumes (t=0) wurde mittels an das Mikroskop gekoppelter CCD Kamera und IPLab-Software ein Bild aufgenommen. Dann wurde für 20min mit Hilfe der *Time-Lapse* Funktion der Software ein *Stack* von Bildern mit einem Zeitabstand von je 30s erzeugt. Danach wurde erneut ein Einzelbild aufgenommen (t=20). Das t=0 Bild wurde mit Hilfe der Adobe-Photoshop Software invertiert und das t=20 Bild halbtransparent als zweite Ebene darüber gelegt. Zellen wurden als gerichtet migriert beurteilt, wenn sie sich in den Bereich < 180° in Richtung der ansteigenden Konzentration bewegt hatten. Die gesam-

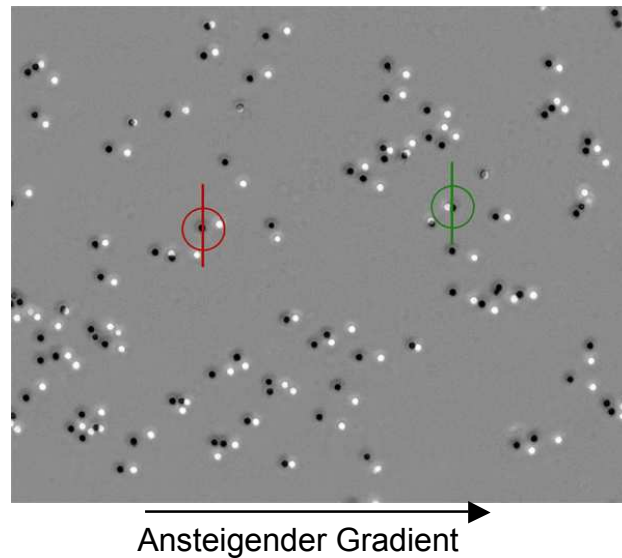


Abbildung 8: **Darstellung der Auswertung der Versuche im Ibidi-Slide.** Übereinandergelagerte Bilder der neutrophilen Granulozyten zu Beginn (schwarz) und zum Endpunkt (weiss) des Beobachtungszeitraumes. Rot: PMN bewegte sich im Winkel  $< 180^\circ$  in Richtung des ansteigenden Gradienten, Grün: PMN bewegte sich nicht in Richtung des ansteigenden Gradienten. ( $\times 200$ ).

ten Zellen eines Bildes wurden so kategorisiert und der Prozentsatz an gerichtet bewegten aller PMN errechnet. Aus dem erzeugten *Stack* erfolgte ein manuelles *Tracking* der Zellen mit Hilfe des *Manual Tracking Tools* für ImageJ. So konnten zurückgelegte Wege der einzelnen Zellen nachgezeichnet und die jeweiligen x- und y-Koordinaten evaluiert werden. Die positive x-Richtung entsprach hierbei der Richtung der ansteigenden Konzentration der applizierten Lösung. Diese Koordinaten wurden mit Hilfe des *Chemotaxis Tools* für ImageJ ausgewertet und in einen Plot transferiert. Aus diesem konnten zurückgelegte Distanz, Geschwindigkeit, und *x-forward-migration Index* (Bewegung in x-Richtung ( $\mu\text{m}$ )/zurückgelegte Strecke ( $\mu\text{m}$ )) berechnet werden.



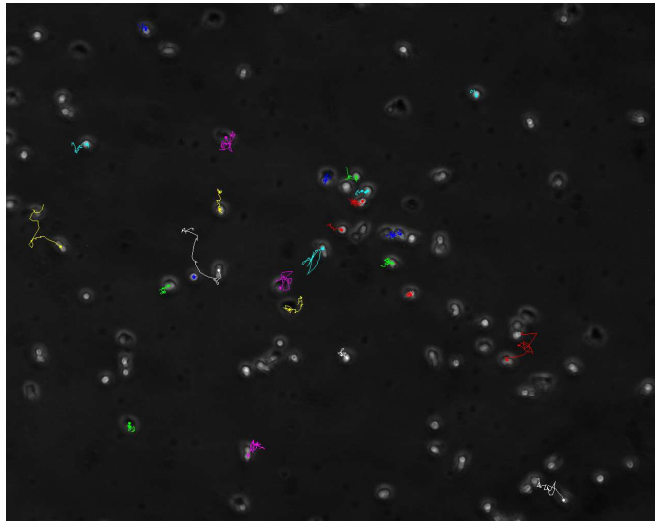


Abbildung 9: **Darstellung des Trackings der zurückgelegten Strecken der neutrophilen Granulozyten aus dem Stack der Time-Lapse-Mikroskopie.** ( $\times 200$ ).

#### 4.2.7 Analyse des F-Aktin Gehalts in neutrophilen Granulozyten mittels Immunzytochemie

Um die potentielle MPO-abhängige Modulation des intrazellulären Gehaltes an Filamentaktin (F-Aktin) sichtbar zu machen, wurden *2-Chamber-Slides* mit Fibronectin ( $50\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2h, RT) beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde 1ml einer Suspension neutrophiler Granulozyten ( $1\text{mio}/\text{ml}$  Zellpuffer) in eine Kammer des *Slides* gegeben. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und dann die ungebundenen PMN mit dem Überstand verworfen. Auf die gebundenen Zellen wurde  $500\mu\text{l}$  Zellpuffer gegeben. Dann wurde vorsichtig  $300\mu\text{l}$  MPO ( $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ) oder fMLP ( $50\text{nM}$ ) in eine Ecke der Kammern pipettiert, sodass ein Gradient dieser Substanz entstehen konnte. Nach 1min wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 3,7% methanolfreiem Formaldehyd für 10 Minuten fixiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen durch eine 0,1%ige Lösung von Triton X-100 in PBS für 5 Minuten permeabilisiert und darauf hin wiederum 2 Mal gewaschen. Danach wurden für 30 Minuten mit 1%igem BSA in PBS unspezifische Bindungsstellen geblockt und daraufhin mit Alexa Fluor 488 Phalloidin ( $5\text{U}/\text{ml}$  in 1% BSA/PBS) für 20 Minuten zur Färbung des F-Aktins inkubiert. Die Kammern wurden 2 Mal mit PBS gewaschen und mit Dako-Einbettmedium und

Deckglas verschlossen.

#### **4.2.8 Analyse des F-Aktin Gehalts in neutrophilen Granulozyten mittels Fluorometrie**

Um die potentielle MPO-abhängige Modulation des intrazellulären Gehaltes an F-Aktin zu quantifizieren, wurden je 2 Millionen neutrophile Granulozyten in 1ml HBSS suspendiert. In einigen Fällen wurde die Suspension zunächst für 10 Minuten bei 37°C mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA, 1nM) inkubiert, um die Zellen in einen Zustand höherer Reaktionsbereitschaft zu versetzen. Dann wurden diese durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 800 x g pellettiert, 1 Mal mit HBSS gewaschen, erneut zentrifugiert und in HBSS resuspendiert. Anschließend wurden die PMN entweder mit MPO (5µg/ml), fMLP (10µM) oder IL-8 (0,2µg/ml) versetzt und 60 Sekunden, 10 Minuten oder 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Fixierung der Zellen wurde methanolfreies Formaldehyd zugegeben mit einer Endkonzentration von 3,7% und nach 10 Minuten 2 Mal gewaschen. Dann wurde für 5 Minuten mit 0,1% Triton-X100 permeabilisiert, wiederum 2 Mal gewaschen und zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen 1% BSA/PBS zugegeben. Nach 10 Minuten wurden die Zellen dann mit Alexa Fluor 488 Phalloidin (5U/ml PBS/1% BSA) versetzt und 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Zur Messung der Fluoreszenz wurden die Zellen dann erneut 2 Mal gewaschen, das Pellet in 250µl PBS aufgenommen und je 100µl in Wells einer 96-Well-Platte transferiert. Die Fluoreszenz der Suspension jedes Wells wurde im Fluorometer mit folgenden Geräteeinstellungen bestimmt:

Anregungswellenlänge 485nm, Emissionswellenlänge 535nm

*Scan* Modus: Messung von 100 Punkten/*Well*

#### **4.2.9 Analyse des F-Aktin Gehalts in neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie (FACS)**

Zur Analyse des F-Aktin Gehalts mittels Durchflusszytometrie wurde 300µl einer Suspension neutrophiler Granulozyten (1mio/ml Zellpuffer) in ein FACS-Röhrchen gegeben. Dann wurde MPO (Endkonzentration 20µg/ml), IL-8 (Endkonzentration 0,2µg/ml) oder Zellpuffer als Negativkontrolle dazu gegeben. Das Röhrchen wurde

für 30, 60 oder 120 Sekunden in einem 37°C warmen Wasserbad geschüttelt und anschließend sofort mit methanolfreiem Formaldehyd (Endkonzentration 3,5%) für 15 Minuten fixiert. Die Röhrchen wurden dann zum Waschen der Zellen mit PBS aufgefüllt, die Zellen mit 300 x g 7 Minuten zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Zum Permeabilisieren wurde das Pellet in 0,1% Triton X-100 in PBS resuspendiert. Nach 5 Minuten wurde erneut wie beschrieben gewaschen. Zur Färbung des intrazellulären F-Aktins wurde mit 200µl Alexa Fluor 488 Phalloidin (5U/ml in 1% BSA/PBS) oder zur Kontrolle nur mit Puffer für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde das Pellet in 200µl PBS aufgenommen.

Zur Quantifizierung des Fluoreszenzsignals wurden ein FACS Canto Zytometer herangezogen. Dazu wurden die neutrophilen Granulozyten zunächst im Scattergramm anhand ihrer Größe und Granularität identifiziert und mit einem Gate markiert. Es wurden folgende Einstellungen gewählt:

*Forward Scatter*: 106

*Side Scatter*: 418

*FITC*: 324

Dann wurden 30000 *Events* gezählt und die mittlere Fluoreszenzintensität dieser *Events* ermittelt.

#### **4.2.10 Immunzytochemische Färbung von Oberflächen-assoziiertem MPO und CD11b auf PMN**

Um den Einfluss des alkalischen pH-Wertes auf die Bindung von MPO an die Oberfläche der neutrophilen Granulozyten zu evaluieren, wurden PMN ( $2 \cdot 10^6$ /ml) entweder in Zellpuffer (pH 7,4) oder in Zellpuffer alkalisiert auf einen pH-Wert von 9,2 für 20 Minuten mit 20µg/ml MPO inkubiert. Die Suspension wurde dann zweimal mit dem jeweiligen Puffer gewaschen (Zentrifugation 10 min, 350 x g), in Zellpuffer (pH 7,4) aufgenommen und je 1 ml der Suspension in Fibronektinbeschichtete Kammern eines *2-Chamber-Slides* gegeben. Nach 5 min wurde der Überstand verworfen und die adhärennten Zellen mit 4%igem Formaldehyd für 20 Minuten fixiert. Nach wiederholtem Waschen wurden die Zellen mit 10%igem Ziegen serum versetzt und nach 2 Stunden mit Antikörpern gegen MPO und CD11b

versehen (Rabbit-anti-MPO, 1:1000, Mouse-anti-CD11b, 1:200, über Nacht, 4°C). Nach wiederholtem Waschen wurde für 1 Stunde mit Sekundärantikörpern inkubiert (Alexa Fluor 488 anti-Rabbit, Alexa-Fluor 594 anti-Mouse, 1:100). Die Anfärbung der Kerne erfolgte mit DAPI (1µg/ml, 15 min). Die Präparate wurden mit Dako-Einbettmedium eingebettet.

#### 4.2.11 Hepatische Ischämie bei der Maus

Alle tierexperimentellen Methoden wurden begutachtet vom Tierschutzbeauftragten der Universität Hamburg und erhielten die offizielle Genehmigung der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit – Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen – der Stadt Hamburg.

Die hepatische Ischämie mit anschließender Reperfusion wurde provoziert in Wildtypmäusen (WT) der Inzuchtlinie C57BL/6J und MPO-defizienten Mäusen (MPO<sup>-/-</sup>) mit gleichem genetischen Hintergrund mit der Linienbezeichnung MPO<sup>tm1lus</sup>/J.

##### Die MPO<sup>tm1lus</sup>/J Maus

Die MPO<sup>-/-</sup>-Maus wurde von Aldons Lulis an der University of California, LA, erzeugt. Sie ist kommerziell bei *The Jackson Laboratory* erhältlich. Die Mauslinie ist homozygot für die Mutation und es wird kein MPO Genprodukt, also weder mRNA noch Protein, erzeugt. Die Leukozytenzahlen sowie die leukozytäre Produktion von Superoxid unterscheiden sich nicht vom Wildtyp. Allerdings weisen Monozyten und neutrophile Granulozyten keinerlei Peroxidaseaktivität und Hypochloritproduktion auf.

##### Experimentelles Protokoll

20-30 g schwere, männliche WT und MPO<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Ketamin (120mg/kg KG) und Xylazin (16mg/kg KG) anästhesiert. Wenn das Testen auf Schmerzreize negativ ausfiel, wurde das Tier auf einer 40°C warmen Heizplatte fixiert. Die Bauchseite der Maus wurde desinfiziert und das Abdomen durch Laparotomie eröffnet. Intestinum und Abdomen wurden ständig mit warmer NaCl-Lösung feuchtgehalten. Anschließend wur-

de der Blutfluss der linken Äste von V.portae und A.hepatica mittels atraumatischer Gefäßklemme unterbrochen, um im linken Lappen und im L. quadratus eine Ischämie zu provozieren. Das Abdomen wurde mit feuchter, steriler Kompresse abgedeckt und gegen Auskühlen mit Alufolie bedeckt. Nach 90 Minuten wurde die Klammer wieder entfernt und so die Reperfusion eingeleitet. Der Schnitt wurde mit 5-0 Faden verschlossen und die Maus erhielt eine subkutane Injektion von 200mg/kg KG Metamizol in 300 $\mu$ l NaCl-Lösung zur Analgesie und Flüssigkeitssubstitution. Bis zum Erwachen wurden die Mäuse auf einer Wärmeplatte gehalten und erhielten nach 2 Stunden noch einmal Metamizol in NaCl-Lösung. Nach 20

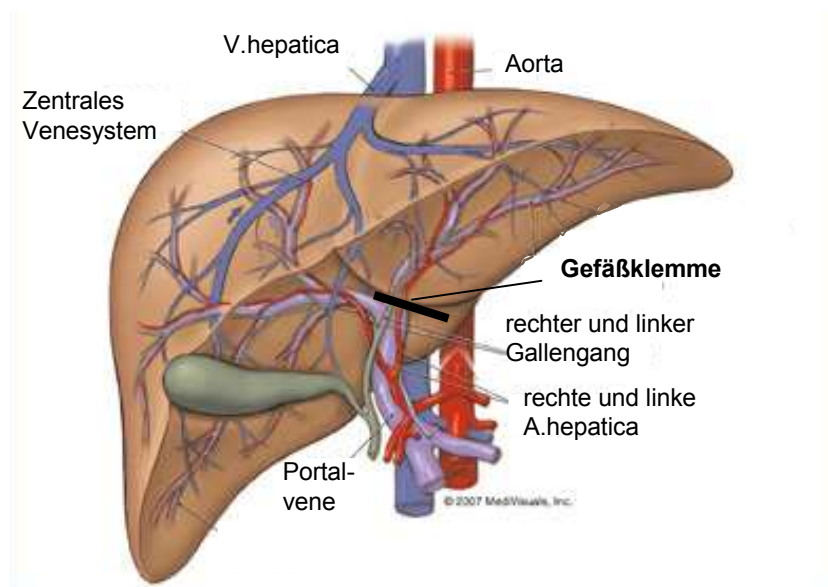


Abbildung 10: **Schematische Darstellung der Ausführung der hepatischen Ischämie.** Eine Gefäßklemme ligiert die linken Äste von Portalvene, A. hepatica und Gallengang. Modifiziert nach MediVisualsInc.

Stunden wurde eine erneute Anästhesie vorgenommen und das Abdomen der Maus eröffnet. Um die Leber zu perfundieren, wurde zunächst die V.cava superior durchtrennt, dann die Portalvene punktiert und langsam 1ml PBS injiziert, wobei sich die Leber deutlich hell färbte. Die betroffenen Leberlappen wurden entnommen und teils in 4% Formaldehydlösung gegeben zur Erstellung von Paraffinschnitten, teils in OCT-Medium gebettet und langsam über flüssigem Stickstoff gefroren und teils in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 4.2.12 Intraportale Injektion bei der Maus

Die intraportale Injektion wurde vorgenommen bei WT und CD11b-defizienten Mäusen (CD11b<sup>-/-</sup>) der Linie Itgam<sup>tm1Myd</sup>/J.

#### Die Itgam<sup>tm1Myd</sup>/J Maus

Die CD11b<sup>-/-</sup>-Maus wurde von Tanya Mayadas an der Harvard Medical School erzeugt und ist bei *The Jackson Laboratory* erhältlich. Sie ist homozygot für die Mutation und die neutrophilen Granulozyten zeigen das völlige Fehlen von CD11b-Protein. Somit sind einige Eigenschaften der PMN moduliert. Sie zeigen verminderten oxidativen *Burst* und eine verminderte Fähigkeit zur Phagozytose opsonierter Partikel. Außerdem sind vermehrte PMN-Zahlen im Peritoneum nach induzierter Peritonitis zu finden, die Tiere sind weniger anfällig gegenüber zerebralem Reperfusionsschaden und zeigen weniger Extravasation der PMN nach Chemokininfusion.

#### Experimentelles Protokoll

Die Tiere wurden anästhesiert und laparotomiert wie unter 4.2.11 beschrieben. Dann wurde mit einer 30-Gauge Kanüle die V.mesenterica superior punktiert und 200 $\mu$ l einer sterilen Lösung von jeweils 2 $\mu$ g murinem MPO, murinem Serumalbumin oder murinem *Macrophage-inflammatory-protein-2* (MIP-2) injiziert. Die Punktionsstelle wurde für eine Minute mit sterilem Wattetupfer abgedrückt, um eine Blutung zu unterbinden. Anschließend wurden die Tiere behandelt wie unter 4.2.11 beschrieben. Allerdings erfolgte die Entnahme der Lebern bereits nach 2 Stunden nach Operation.

### 4.2.13 Quantifizierung von PMN in Leberpräparaten mittels immunhistochemischer AEC-Färbung

Aus den OCT-Blöcken der Leberproben wurden mittels Kryotom 3 $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt, dabei wurden aus 2 Blöcken, die pro Tier präpariert waren, je 5 Schnitte aus verschiedenen Ebenen erstellt. Diese wurden nach folgendem Protokoll gefärbt:

Die Schnitte wurden aufgetaut und für 5 Minuten bei RT in Aceton fixiert. Dann wurden sie in PBS gewässert und mit Primärantikörper gegen ein granulocytäres Oberflächenprotein für 1 Stunde inkubiert (Rat-anti-Mouse-Ly6G, 1:40 in PBS). Nach 3-maligem Waschen wurde die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes durch 15-minütige Inkubation mit 0,075% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung blockiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Inkubation mit Sekundärantikörper (Rabbit-anti-Rat IgG, HRP-konjugiert, 1:100 in 3% Mausserum) für 30 Minuten und wiederum nach wiederholtem Waschen die Inkubation mit Tertiärantikörper (Goat-anti-Rabbit IgG, HRP-konjugiert, 1:500 in 3% Mausserum) für 30 Minuten. Zur Farbentwicklung wurde als Substrat der Meerrettichperoxidase 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) verwendet. Dazu wurden die Schnitte mit 0,2mg/ml AEC und 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Natriumacetatpuffer pH 5,0 versetzt. Die Rot-Braun-Färbung der Präparate wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und nach 5 bis 15 Minuten durch 2-maliges Spülen mit Leitungswasser gestoppt. Das Gewebe wurde mit Hämalaun-Lösung nach Mayer für 30s und anschließendem Spülen in Leitungswasser gegengefärbt. Die Schnitte wurden zuletzt in Dako-Einbettmedium eingebettet.

Zur Quantifizierung der in der Leber akkumulierten PMN wurden diese in 30 bis 50 Gesichtsfeldern (*high-power-fields*, *hpf*, Vergrößerung x 600) pro Tier mikroskopisch ausgezählt. Die Gesichtsfelder wurden zufällig ausgewählt. Dabei wurden in Schnitten des Ischämie-Modells Bereiche, die histologisch eindeutig als nicht betroffen auffielen (keine nekrotischen Gewebeveränderungen, keine Veränderung der Kernmorphologie), ausgespart.

#### **4.2.14 Herstellung von Homogenaten der Leberproben**

Die tiefgefrorenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerrieben und in einem ebenfalls mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Eppendorf-*Tube* mit kalter Homogenisierungs-Lösung versetzt. Das Homogenat wurde anschließend für eine Stunde unter mehrmaligem Vortexen auf Eis inkubiert, um alle membranären Fraktionen aufzuspalten. Darauf folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 10000 rpm und 4 °C, um das unlösliche Material zu pellettieren. Das Pellet wurde verworfen. 20 µl des Überstandes wurden für eine Proteinbestimmung abgenommen. Restliches Material wurde einer ELISA-Analyse zugeführt.

### 4.2.15 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration des Leberhomogenates erfolgte mittels Pierce BCA-Protein-Assay-Kits nach Angaben des Herstellers:

Die Homogenate wurden zunächst 1:30 in Homogenisierungspuffer verdünnt. Dann wurde 25 $\mu$ l dieser Verdünnung und je 25 $\mu$ l einer Lösung von bovinem Serumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0 – 250 $\mu$ g/ml als interner Standard in Duplikat in die *Wells* einer 96-*Well*-Platte gegeben. Dazu wurde dann 200 $\mu$ l des zuvor angesetzten Arbeitsreagenzes gegeben, bestehend aus alkalischer, Tartrathaltiger Bicinchoninsäure-Lösung und Kupfersulfat-Lösung. Die Platte wurde 30 Minuten abgedeckt bei 37°C inkubiert, sodass in einer Biuret-Reaktion das Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>1+</sup> reagieren kann, welches dann mit der Bicinchoninsäure einen blau gefärbten Chelatkomplex formt. Die Intensität der Färbung wurde dann durch Messung der Absorption bei 562nm quantifiziert. Durch das Erstellen einer Standardkurve konnte dann die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

### 4.2.16 ELISA zur Bestimmung des MPO-Gehalts der Leberproben

Die Menge der murinen MPO in den Leberhomogenaten wurde mit einem ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent-assay)-Kit nach Angaben des Herstellers quantifiziert:

Die Proben wurden 1:20 mit Probenpuffer verdünnt und die Standardlösungen und die verdünnten Proben in die *Wells* einer Mikrotiterplatte pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auf dem Boden der Mikrotiterplatte ist ein Antikörper gegen murine MPO immobilisiert, an den das MPO aus der Proben- und Standardlösung bindet. Die *Wells* wurden gewaschen und mit einer Lösung eines zweiten, biotinylierten Antikörpers gegen murine MPO gefüllt und wiederum 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, sodass der Antikörper an das nun immobilisierte MPO binden kann. Nach erneutem Waschen wurde mit Streptavidin konjugierte Meerrettichperoxidase zugegeben. Der Ansatz wurde 1 Stunde inkubiert, um die Bindung des Streptavidin an das immobilisierte Biotin zu gewährleisten. Nach wiederholtem Waschen wurde Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung als Substrat der Meerrettichperoxidase addiert und 30 Minuten inkubiert.



Die Oxidation des TMBs, welche ein blau gefärbtes Produkt ergibt, wurde durch Zugabe von Zitronensäurelösung gestoppt, wodurch sich der Ansatz aufgrund der pH-Wert-Änderung gelb färbt. Die Absorption der Lösung in den einzelnen *Wells* wurde bei 450nm vermessen und die MPO-Konzentration durch Bezug auf die erstellte Standardkurve berechnet.

### 4.2.17 Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Es erwiesen sich alle generierten Daten als normal verteilt.

Die Daten werden präsentiert als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Es erfolgte der Vergleich der Daten durch ungepaarten *Studentschen T-Test* bzw. *Anova-Analyse*. Ein Unterschied mit einem p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant bewertet.

# Kapitel 5

## Ergebnisse

### 5.1 Bedeutung der MPO für die Adhäsion neutrophiler Granulozyten

#### 5.1.1 Einfluss der MPO auf die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Fibronectin und Endothelzellen

Vor dem Hintergrund, dass MPO sowohl an Matrixproteine und an Glykosaminoglykane auf der Oberfläche der Endothelzelle auf der einen Seite [11], als auch auf der anderen Seite an die Glykokalix [15] und die CD11b-Integrine [88] der neutrophilen Granulozyten bindet, wurde untersucht, ob MPO die Adhäsion der PMN an Fibronectin oder Endothelzellen zu vermitteln vermag. Dazu wurden entweder die Granulozyten oder die entsprechende Matrix - Fibronectin-beschichtete Zellkulturplatten oder Endothelzellmonolayer - mit MPO beladen und das Ausmaß der Bindung der PMN quantifiziert.

Die Beladung Fibronectin-beschichteter Zellkulturgefäße mit MPO hatte keinen Einfluss auf den Anteil der nach 5 Minuten adhärenen Granulozyten (für 60nM  $p=0,07$ , für 120nM  $p=0,29$ ). Analog dazu konnte auch die Inkubation der PMN mit MPO ihre Adhäsion an Fibronectin nicht signifikant beeinflussen ( $p=0,05$ ) (Abb. 11).

Die Untersuchungen an humanen Endothelzellen ließen einen heterogenen Effekt der MPO erkennen: Eine 4-stündige Inkubation konfluenten Endothelzellen

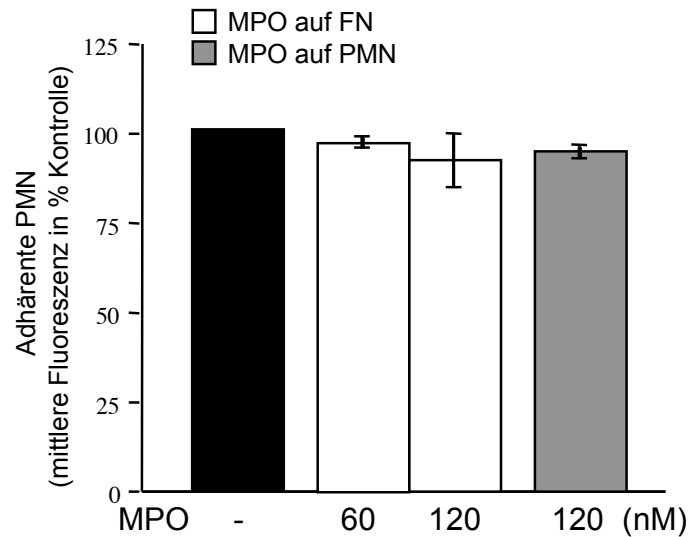


Abbildung 11: **Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Fibronektin (FN)**. Fibronektin (MPO auf FN) oder PMN (MPO auf PMN) wurden mit MPO beladen und anschließend die adhären PMN fluorometrisch quantifiziert. Kontrolle 100% = adhären PMN ohne MPO. n=3-5, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

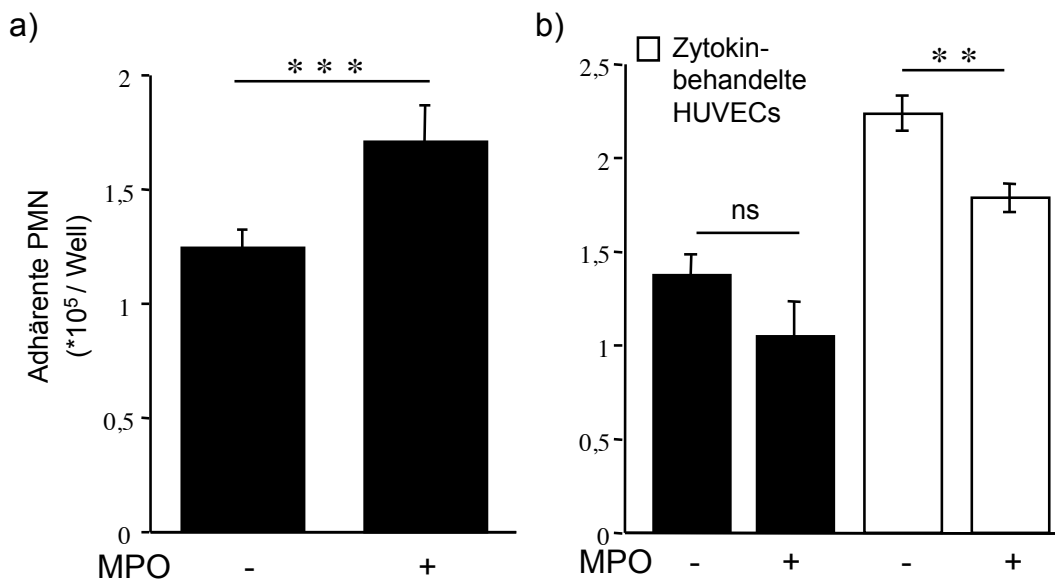


Abbildung 12: **Adhäsion neutrophiler Granulozyten an HUVECs**. (a) HUVECs wurden für 4h mit MPO (+) behandelt. n=5 (b) PMN wurden für 20min mit MPO (+) behandelt, HUVECs wurden für 4h mit Zytokin-Cocktail inkubiert (Zytokin-behandelte HUVECs). n=3. Well=9,6cm<sup>2</sup>. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

mit MPO bewirkte einen signifikanten Anstieg der adhärenz verbleibenden Granulozyten von  $1,22 \pm 0,08 \cdot 10^5$  auf  $1,69 \pm 0,17 \cdot 10^5$  / *Well* ( $9,6 \text{ cm}^2$ ) ( $p=0,00094$ ) (Abb. 12 a).

Die MPO-Beladung der PMN verringerte die Anzahl gebundener Zellen leicht, jedoch nicht signifikant ( $p=0,14$ ), während die vorangehende Aktivierung der Endothelzellen mit den Zytokinen  $\text{TNF-}\alpha$ , Interferon- $\gamma$  und IL-8 dagegen eine signifikante Verminderung der Bindungsfähigkeit MPO-behandelter PMN bewirkte ( $2,23 \pm 0,09 \cdot 10^5$  vs  $1,78 \pm 0,08 \cdot 10^5$  / *Well*,  $p=0,019$ ) (Abb. 12 b).

Damit lässt sich insgesamt keine schlüssige Aussage treffen über den Einfluss der MPO auf die Bindung der Granulozyten an Matrixproteine oder das Endothel.

### 5.1.2 Analyse der ICAM-1 Expression auf Endothelzellen in Abhängigkeit von $\text{NO}^\cdot$ und MPO

In Ergänzung zu den unter 5.1.1 beschriebenen Adhäsionsstudien wurde untersucht, ob MPO nicht durch direkte Interaktion, sondern vielmehr über das endotheliale Adhäsionsmolekül ICAM-1 einen Einfluss auf die Bindung der Granulozyten ausübt. Dazu wurden zwei Hypothesen getestet: a) MPO induziert direkt die endotheliale Oberflächenexpression von ICAM-1. b) MPO induziert die endotheliale Oberflächenexpression von ICAM-1 durch Konsumption von  $\text{NO}^\cdot$ , da  $\text{NO}^\cdot$  die Zytokin-induzierte endotheliale Expression des Adhäsionsmoleküls inhibiert [17]. Es wurden nach dem Prinzip eines ELISAs die ICAM-1-Moleküle auf der Oberfläche eines konfluenten HUVEC-Monolayers quantifiziert. Eine 2,5-stündige Inkubation der Endothelzellen mit MPO (30nM) konnte keine Veränderung der Menge des Oberflächen-ständigen ICAM-1 provozieren, sodass Hypothese ‚a‘ verworfen wurde.

Die Behandlung der Zellen mit dem Zytokin  $\text{TNF-}\alpha$  (300U/ml) steigerte die Oberflächenexpression von 100 auf  $440,6 \pm 84,5\%$  ( $p=0,034$ ). Wurde 30 Minuten vor und 30 Minuten nach der  $\text{TNF-}\alpha$ -Zugabe der NO-Donor PAPA-NONOat (Ammoniopropyl-n-propylamino-diazeniumdiolat,  $400 \mu\text{M}$ ) hinzu gegeben, stieg die Expression lediglich noch auf  $137,6 \pm 18,3\%$  ( $p=0,18$  vs. ctrl) an. Anschließend wurde parallel zur ersten PAPA-NONOat-Dosis zusätzlich MPO in den Zellkulturüberstand gegeben. Dies erfolgte unter der Annahme, dass die oxidative Konsumption

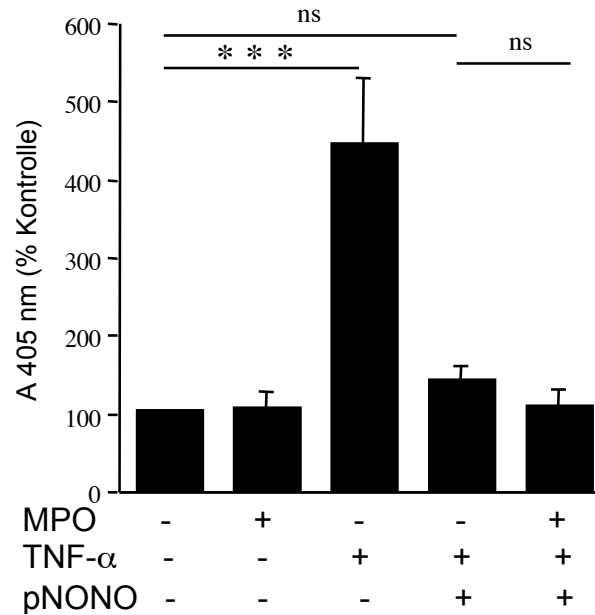


Abbildung 13: **ICAM-1-Expression auf HUVECs.** pNONO=PAPA-NONOat. Kontrolle 100% = Absorption der unbehandelten HUVECs. n=3-5. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

von NO $\cdot$  einen Anstieg der Oberflächenexpression bewirkt. Dies ließ sich jedoch nicht bestätigen, da es zu keiner vermehrten Expression von ICAM-1 kam (Abb. 13).

Eine ausreichende Aktivität des MPO-Systems während des Experiments wurde vorausgesetzt, da die Zytokin-Provokation der Endothelzelle zu genügender Superoxidproduktion und damit zu ausreichender Bereitstellung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt. Eine zur Kontrolle zusätzlich vorgenommene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis, sodass die Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass MPO die endotheliale ICAM-1-Oberflächenexpression nicht moduliert.

## 5.2 Charakterisierung der MPO-abhängigen Motilität neutrophiler Granulozyten *in-vitro*

### 5.2.1 Chemotaxis neutrophiler Granulozyten im *Ibidi-Slide*

Das *Ibidi- $\mu$ -Slide* I erlaubt es, das Verhalten von Zellen in einem definierten Gradienten einer löslichen Substanz zu untersuchen. Somit kann die Fähigkeit zur Chemotaxis der Zellen bzw. die chemotaktische Potenz eines Stoffes analysiert werden. Die Etablierung der Methode wurde angelehnt an eine Arbeit von Schymeinsky und Kollegen [128] (siehe 4.2.6).

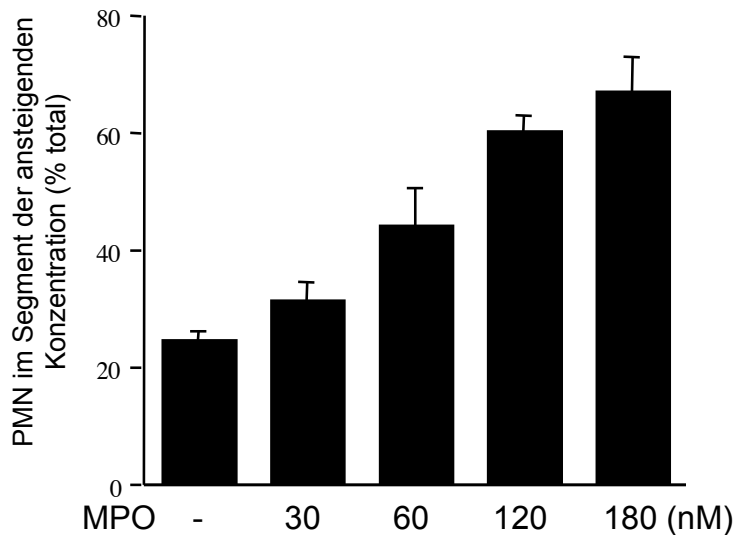


Abbildung 14: **MPO-konzentrationsabhängige gerichtete Motilität neutrophiler Granulozyten im *Ibidi-Slide*.** % PMN der gesamten PMN im Gesichtsfeld (% total), die sich nach 20-minütiger Beobachtung in Richtung aufsteigender MPO-Konzentration bewegt haben.  $n=4-6$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die unilaterale Applikation einer Lösung von MPO in den mit Granulozyten gefüllten Kanal des *Ibidi-Slides* führte innerhalb des 20-minütigen Beobachtungszeitraumes zu einer Bewegung der Zellen im Bereich des steilsten Gradienten in Richtung der ansteigenden MPO-Konzentration. Der Anteil sich gerichtet bewegendender Zellen von der Gesamtheit der Zellen im mikroskopischen Gesichtsfeld (*PMN im Segment der ansteigenden Konzentration*) stieg mit zunehmender Konzentration der applizierten MPO-Lösung an (Abb. 14). Eine gesteigerte

te, zufällig auftretende Aktivierung der PMN vor Applikation in das *Slide* führte jeweils zu verminderter Bewegung in Richtung MPO (Daten nicht gezeigt). Der Anteil gerichteter Zellen in Gegenwart von MPO (120nM) war mit  $59,6 \pm 2,8\%$  signifikant höher als in Gegenwart des Proteins HSA (humanes Serumalbumin,  $24,8 \pm 1,7\%$ ,  $p=2,2 \cdot 10^{-12}$ ), des ebenfalls kationischen, granulozytären Enzyms Cathepsin G (CathG, 120nM,  $36,5 \pm 6,0\%$ ,  $p=0,021$ ) und des Chemokins IL-8 (25nM,  $40,2 \pm 1,8\%$ ,  $p=0,001$ ) (Abb. 15 a). Eine Zugabe des MPO-Inhibitors 4-Amino-

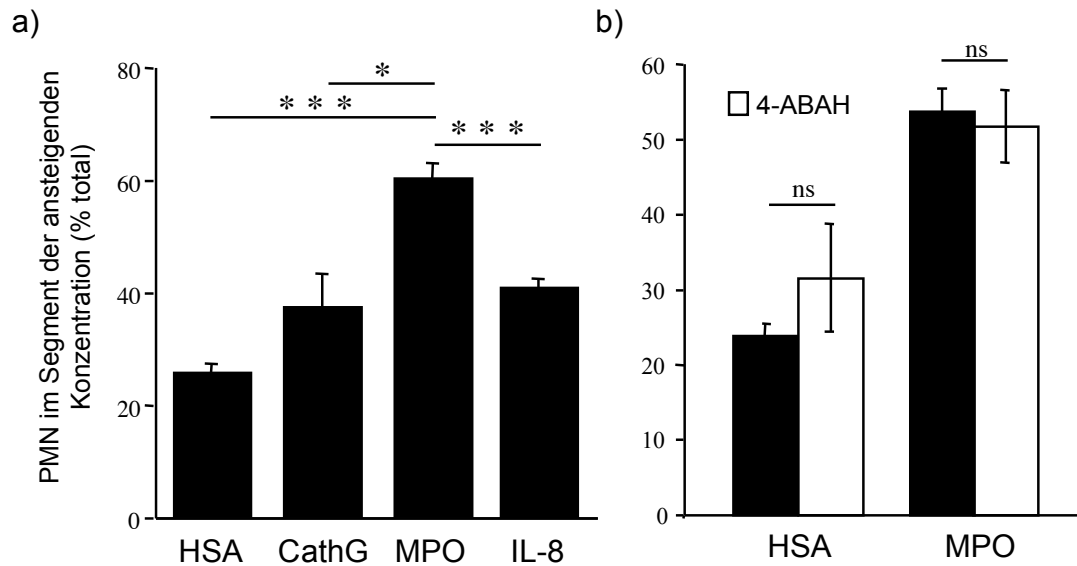


Abbildung 15: **Gerichtete Motilität neutrophiler Granulozyten im Ibidi-Slide.** **(a)** Motilität in Richtung humanen Serumalbumins (HSA, n=19), Cathepsin G (Cath G, n=3), MPO (n= 34) und Interleukin-8 (IL-8, n=9). **(b)** Motilität in Gegenwart des MPO-Inhibitors 4-Aminobenzoesäurehydrazid (4-ABA) n=3-4. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

benzoesäurehydrazid (4-ABHA) hatte keinen Einfluss auf die MPO-induzierte Bewegung der Granulozyten ( $p=0,89$ ), was darauf hindeutet, dass der beobachtete Effekt unabhängig der katalytischen Aktivität des Enzyms auftrat (Abb. 15 b).

Diese Annahme wurde verifiziert durch die Beobachtung, dass die rekombinante MPO-Mutante M243T, die durch den Austausch des Häm-assoziierten Methionins<sup>243</sup> (siehe 2.7) gegen ein Threonin ihre katalytische Aktivität verliert [150], den Anteil der directional bewegten Zellen ebenfalls im Vergleich zu HSA signifikant auf  $47,5 \pm 4,2\%$  steigerte ( $p=2,98 \cdot 10^{-6}$ ) (Abb. 16).

Um die Beteiligung der CD11b-Integrine an der MPO-vermittelten Motilität

zu untersuchen, wurden die Granulozyten vor Applikation in das *Ibidi-Slide* für 45 Minuten mit einem Antikörper gegen das CD11b-Integrin behandelt. Dadurch sank der Anteil gerichtet wandernder Zellen in Gegenwart von MPO von  $59,6 \pm 2,8\%$  auf  $35,6 \pm 2,6\%$  ( $p=0,001$ ) und in Gegenwart der mutanten MPO von  $47,5 \pm 4,2\%$  auf  $32,6 \pm 3,5\%$  ( $p=0,026$ ). Interessanter Weise hatte der Antikörper auf die IL-8-

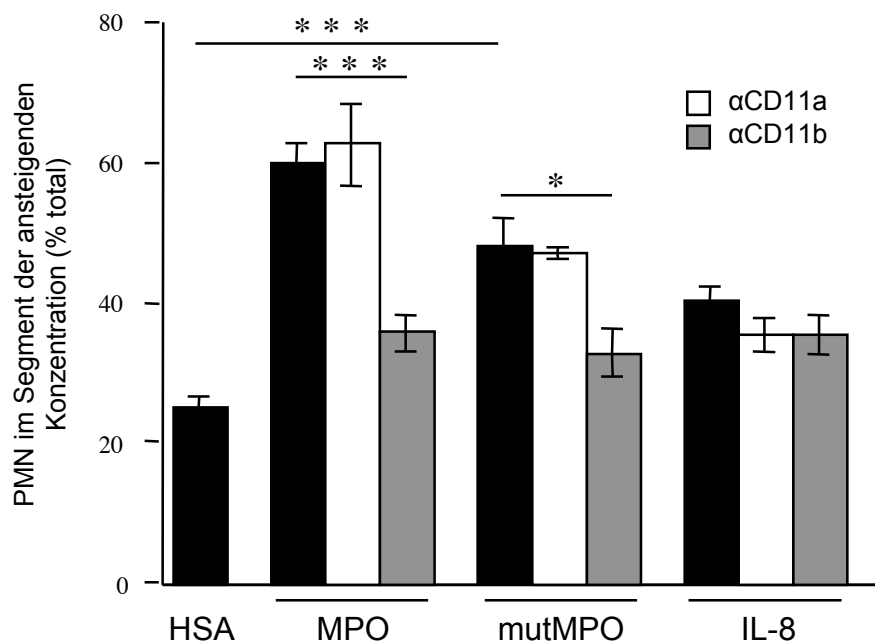


Abbildung 16: **Motilität neutrophiler Granulozyten im Ibidi-Slide in Richtung HSA (n=19), MPO (n=34), mutanter, rekombinanter MPO M243T (mutMPO, n=9) und IL-8 (n=9).** PMN wurden mit Antikörper gegen CD11a ( $\alpha$ CD11a, n=3-9) oder gegen CD11b ( $\alpha$ CD11b, n=6) inkubiert. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

induzierte Migration keinen signifikanten Effekt. Die Vorbehandlung der Zellen mit einem Antikörper gegen CD11a-Integrine beeinflusste die Motilität in keinem Fall signifikant, was darauf hindeutet, dass speziell das CD11b-Integrin für die Vermittlung der MPO-induzierten Motilität notwendig ist (Abb. 16).

Zur detaillierten Charakterisierung der Granulozyten-Bewegung im *Ibidi-Slide* wurde die zurückgelegte Strecke von je 20 Zellen eines Experiments mittels geeigneter Software visualisiert und in einen Plot übertragen, in dem die positive x-Richtung den ansteigenden Gradienten beschreibt (Abb. 17 a). Die Strecken der PMN, die im ansteigenden Gradienten-Segment enden, sind in rot dargestellt.



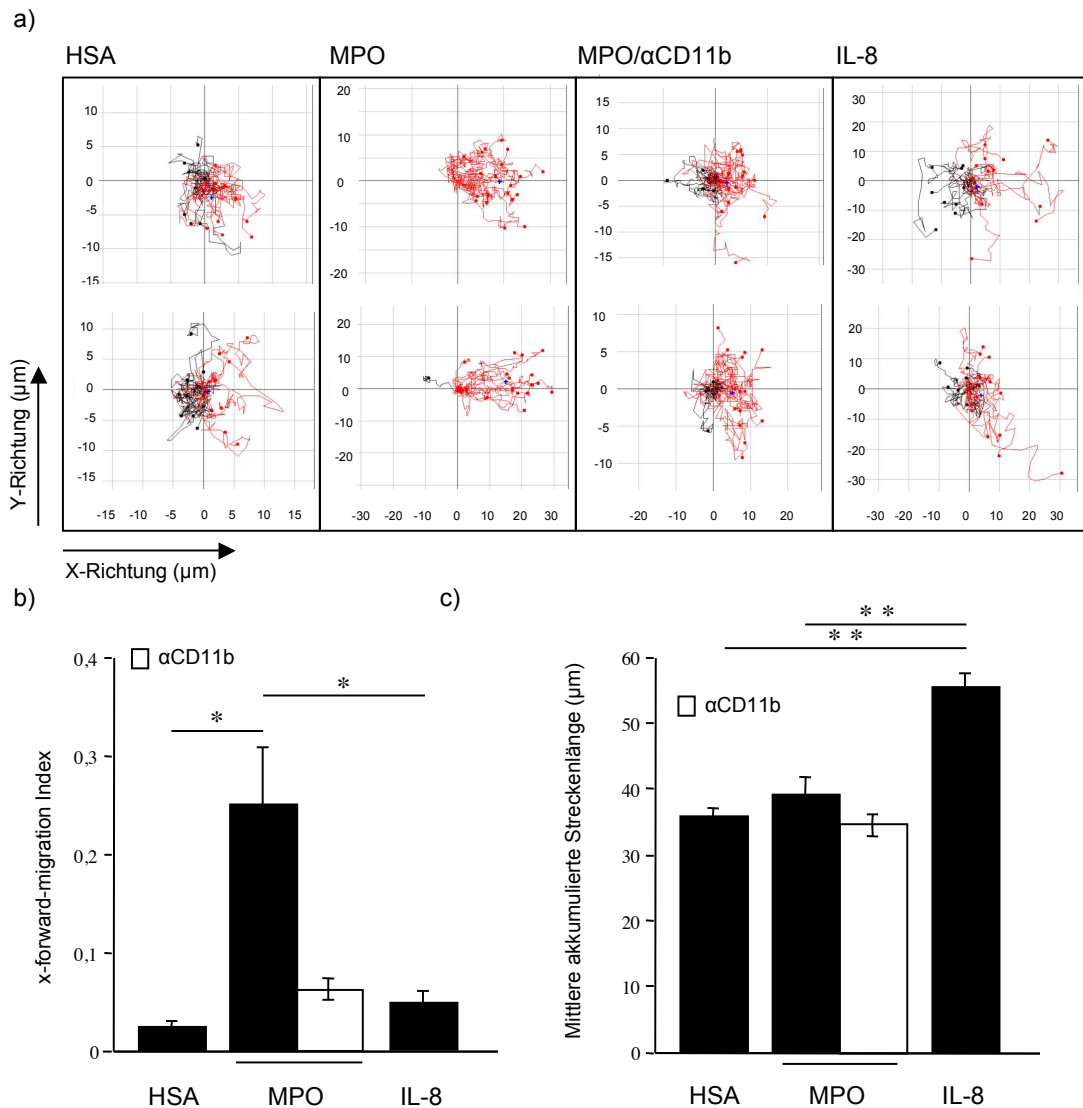


Abbildung 17: **Analyse der von neutrophilen Granulozyten im Ibidi-Slide zurückgelegten Strecken.** (a) Transformation der zurückgelegten Strecken in einen Plot mit Startpunkt jeder Strecke  $x=0$ ,  $y=0$ . Positive x-Richtung entspricht Richtung der ansteigenden Konzentration. Rot=Bewegung in Richtung ansteigender Konzentration.  $n=20$  PMN/Plot (b) *x-forward-migration Index* (x-Wert / mittlere akumulierte Distanz) als Maß für die Direktionalität der Bewegung ( $n=3-4$  Plots). (c) Mittlere akkumulierte Distanz der zurückgelegten Strecken aus  $n=3-4$  Plots. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Aus diesen Plots ließ sich die mittlere akkumulierte Streckenlänge in  $\mu\text{m}$  und der *x-forward-migration Index* (x-Wert/mittlere akkumulierte Streckenlänge), ein Maß für die Direktionalität der Bewegung [75], ermitteln. Während IL-8-exponierte Granulozyten mit  $55,1 \pm 2,2 \mu\text{m}$  im Mittel die längste Distanz zurücklegten (HSA  $35,3 \pm 1,1 \mu\text{m}$ ,  $p=0,0012$ , MPO  $38,5 \pm 2,8 \mu\text{m}$ ,  $p=0,007$ ) (Abb. 17 b), präsentierte sich die Bewegung der Zellen in Gegenwart von MPO am stärksten gerichtet ( $p=0,02$  vs HSA,  $p=0,03$  vs IL-8) (Abb. 17 c).

Diese Daten zeigen, dass MPO konzentrationsabhängig, losgelöst der katalytischen Aktivität und in Abhängigkeit der CD11b-Integrine eine directionale Motilität der neutrophilen Granulozyten induziert.

### 5.2.2 Einfluss der MPO auf Morphologie und intrazelluläre Signalkaskaden der neutrophilen Granulozyten

Während der Chemotaxis-Experimente im *Ibidi-Slide* war auffällig, dass die Zellen in Gegenwart von IL-8, nicht aber von MPO, deutlich veränderte Morphologie im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen. Eine Relief-Kontrast Aufnahme, die eine annähernd dreidimensionale Darstellung erlaubt, lässt diese Unterschiede in der Zellmorphologie gut sichtbar werden (Abb. 18). Die morphologische Modulation

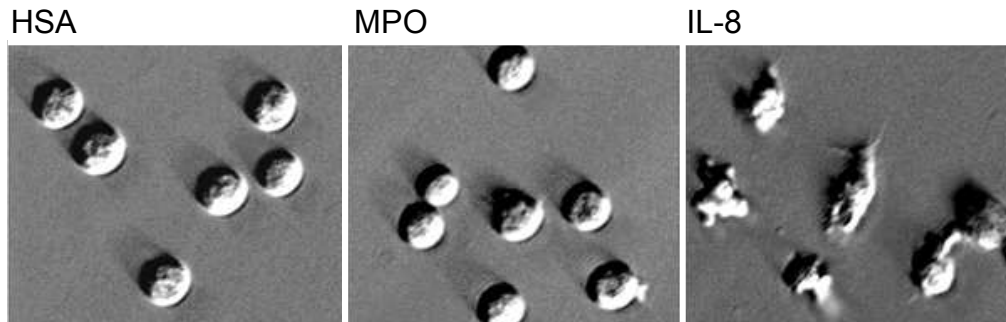


Abbildung 18: **Relief-Kontrast-Aufnahme neutrophiler Granulozyten im Ibidi-Slide in Gegenwart von HSA, MPO oder IL-8.**  $\times 400$ .

ist ein etablierter Phänotyp des migrierenden Granulozyten, da die klassische chemotaktische Bewegung mit einer durch intrazelluläre Signalkaskaden gesteuerten

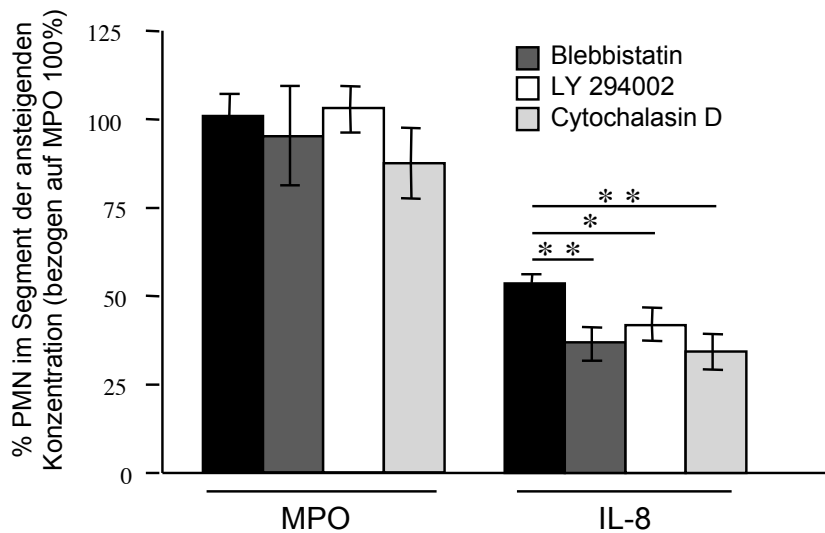


Abbildung 19: **Motilität neutrophiler Granulozyten im Ibbidi-Slide nach Vorbehandlung der PMN mit Inhibitoren des Myosin II (Blebbistatin), der PI3-Kinase (LY 294002) und der Aktin-Polymerisation (Cytochalasin D).** n=3-5, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Zytoskelle-abhängigen Polarisierung der Zelle unter Ausbildung eines Lamellipodiums und eines Uropodiums einhergeht (siehe 2.5).

Um diese ungewöhnliche Beobachtung der sphärisch verbleibenden, sich bewegendenden Zellen zu erklären und zu untersuchen, ob die beobachtete Motilität der Zellen trotzdem typischen intrazellulären Prozessen unterliegt, wurden die Granulozyten mit verschiedenen Inhibitoren behandelt: Blebbistatin inhibiert Myosin II, welches an der Kontraktion der Zelle am Uropodium beteiligt ist. LY 294002 ist ein Inhibitor der PI-3-Kinase, die in der Signalkaskade der Chemotaxis eine zentrale Rolle einnimmt. Cytochalasin D letztendlich hemmt die Dynamik der Aktin-Filamente, die Voraussetzung für die aktive Bewegung der PMN ist (siehe jeweils 2.5). Alle drei Stoffe konnten die Chemotaxis der Granulozyten zu IL-8 signifikant vermindern (Blebbistatin  $p=0,004$ , LY 294002  $p=0,025$ , Cytochalasin D  $p=0,0018$ ), hatten aber keinerlei Wirkung auf die MPO-induzierte Motilität (Abb. 19).

Um eine Beteiligung F-Aktin-abhängiger Prozesse direkt auszuschließen, wurde der intrazelluläre F-Aktin-Gehalt der Granulozyten analysiert.

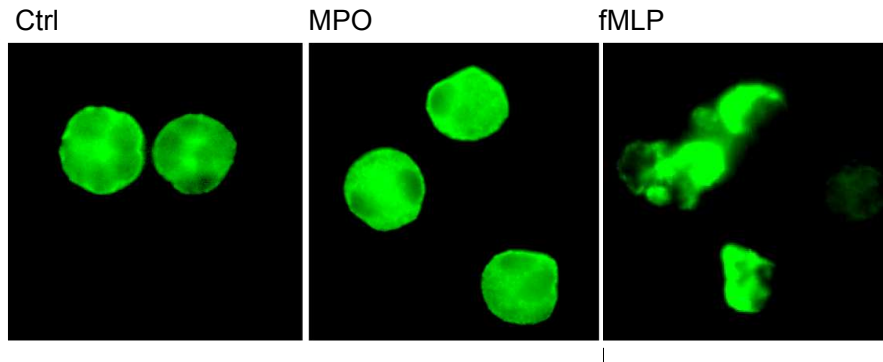


Abbildung 20: **Immunzytochemische Analyse des F-Aktin-Gehalts neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit MPO oder fMLP.**  $\times 630$ .

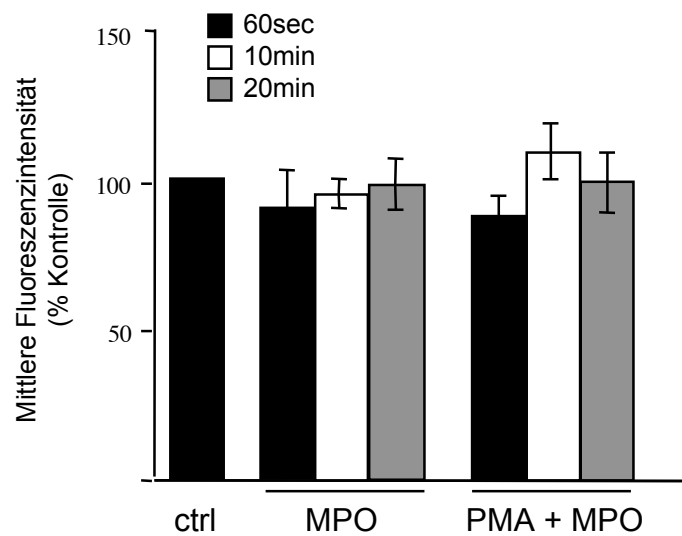


Abbildung 21: **Fluorometrische Analyse des F-Aktin-Gehalts neutrophiler Granulozyten.** PMN wurden für 60sec, 10min oder 20min mit MPO stimuliert. Zum *Priming* der PMN wurden diese für 10min mit PMA vorbehandelt. Fluoreszenz der PMN ohne Stimulation = Kontrolle 100%.  $n = 3-4$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Die immunzytochemische Färbung des F-Aktins in Fibronectin-gebundenen PMN zeigte keinen Effekt der Behandlung mit MPO, während Zellen, die mit dem Chemotaxin fMLP versetzt wurden, eine Akkumulation der Immunreaktivität aufwiesen (Abb. 20).

Die Quantifizierung des intrazellulären F-Aktins mittels Fluorometrie ergab ebenfalls keine Veränderung nach MPO-Inkubation der Zellen für 60 Sekunden, 10 und 20 Minuten. Auch eine 10-minütige Vorbehandlung mit einer geringen Menge (1nM) von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), welches durch Aktivierung der Proteinkinase C die Reaktionsbereitschaft der Granulozyten erhöht (*Priming*), ergab keine signifikanten MPO-abhängigen Effekte (Abb. 21).

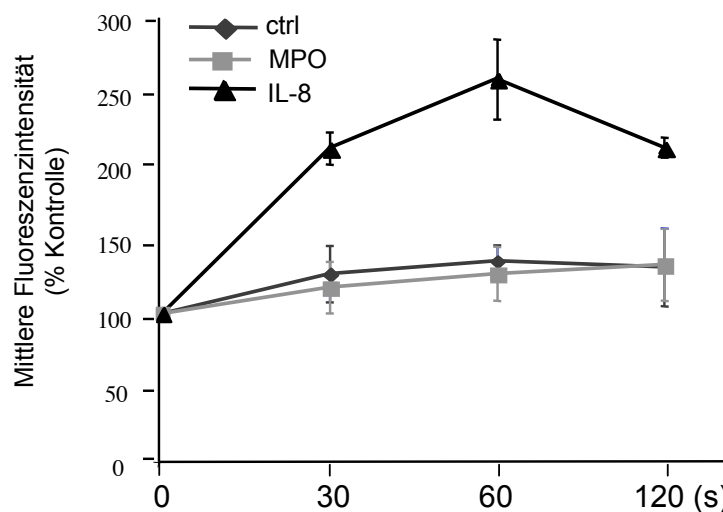


Abbildung 22: **Quantifizierung des F-Aktin-Gehalts neutrophiler Granulozyten mittels Durchflusszytometrie (FACS).** PMN wurden für 30, 60 oder 120sec mit MPO oder IL-8 inkubiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von je 30000 PMN wurde ermittelt, MFI un behandelter PMN = Kontrolle 100%. n=3-4, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Da die Methode der Fluorometrie nur begrenzte Sensitivität besitzt, wurde zusätzlich die Durchflusszytometrie (FACS) zur Quantifizierung eingesetzt. Hiermit wurde die mittlere Fluoreszenz nicht-behandelter, MPO-behandelter und IL-8-inkubierter Granulozyten nach F-Aktin-Färbung ermittelt. Es zeigte sich ein IL-8-induzierter Anstieg des F-Aktin-Gehalts mit einem Maximalwert bei 60 s von

257,9±26,9% des Kontrollwertes (Abb. 22).

Doch auch mit dieser Methode konnte kein MPO-abhängiger Effekt beobachtet werden, sodass geschlossen werden kann, dass MPO die für die aktive Fortbewegung des Granulozyten notwendige Polymerisation von Aktin nicht induziert. Diese Daten belegen die Unabhängigkeit der MPO-vermittelten granulozytären Motilität von Chemotaxis-typischen Signalkaskaden und zytoskellären Rearrangements.

### 5.2.3 Charakterisierung der Energie- und Ladungsabhängigkeit der MPO-induzierten Motilität neutrophiler Granulozyten

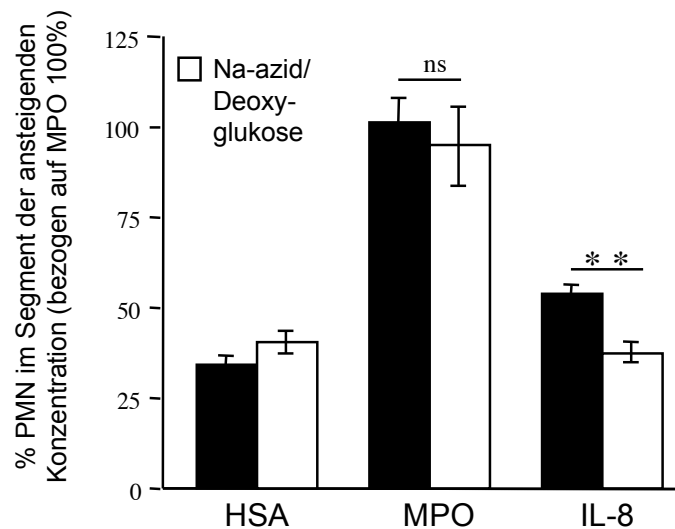


Abbildung 23: **Inhibition des Energiemetabolismus neutrophiler Granulozyten im Ibidi-Slide.** Motilität der PMN in Richtung HSA, MPO oder IL-8 nach Vorbehandlung mit Natrium-Azid und 2-Deoxyglukose. n=3-6, Mittelwerte ± SEM.

Vor dem Hintergrund der bisherigen Erkenntnisse entstand die Hypothese, dass die beobachtete Motilität ohne aktive Beteiligung der Granulozyten auftritt und vielmehr einer elektrostatischen Interaktion zwischen der kationischen MPO und der negativ geladenen Granulozytenoberfläche unterliegt.

In der Tat führte eine 1-stündige Behandlung der PMN mit einem Gemisch aus Natriumazid und 2-Deoxyglukose, welches die mitochondriale Respiration und

die Glykolyse und somit den Energiemetabolismus der Zelle inhibiert [24], zu einer signifikanten Verringerung der IL-8-abhängigen Chemotaxis von  $53,0 \pm 2,3$  auf  $36,8 \pm 4,8\%$  (bezogen auf MPO=100%,  $p=0,0021$ ), jedoch nicht der MPO-vermittelten Motilität ( $p=0,76$ ) (Abb. 23).

Darüber hinaus bewirkte die Alkalisierung des Zellpuffers im Chemotaxisexperiment auf einen pH-Wert von 9,2 eine Senkung der MPO-induzierten Motilität auf  $23,4 \pm 2,1\%$  ( $p=0,0003$ ) und damit auf das Niveau der Kontrolle (Abb. 24). Der

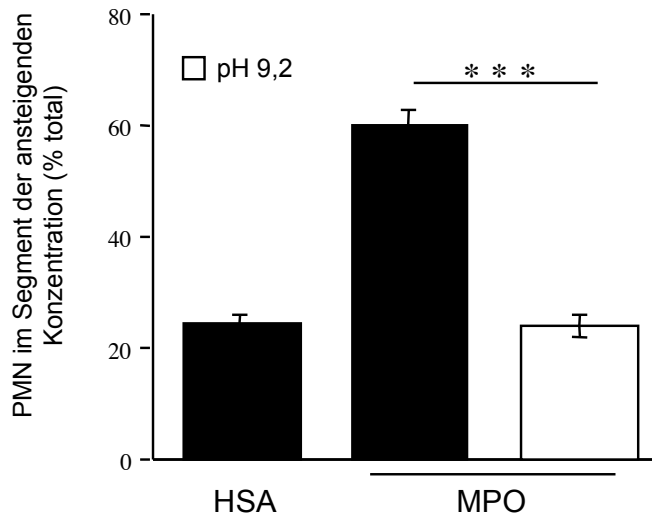


Abbildung 24: **Motilität neutrophiler Granulozyten im Ibidi-Slide in Abhängigkeit des isoelektrischen Punktes der MPO.** Das Experiment wurde entweder bei pH 7,4 (schwarze Säulen) oder bei pH 9,2 (weiße Säule) durchgeführt.  $n=3$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM.

pH-Wert von 9,2 entspricht dem isoelektrischen Punkt der MPO und lässt diese somit ungeladen sein. Eine immunzytochemische Analyse zeigte darauf hin, dass Granulozyten, welche bei dem pH-Wert von 9,2 mit MPO inkubiert wurden, deutlich weniger Immunreaktivität für MPO aufwiesen als bei einem pH-Wert von 7,4 mit MPO behandelte (Abb. 25). Diese Beobachtung ist als Ausdruck einer verminderten Bindung der MPO an die PMN und speziell die Integrine zu verstehen. Eine unter beiden Bedingungen gleich starke Immunreaktivität für CD11b belegte, dass die Integrine im alkalischen Milieu nicht zerstört waren, sondern strukturell intakt blieben.

Um den Einfluss der elektrostatischen Interaktion weiter zu bestätigen, wurde das

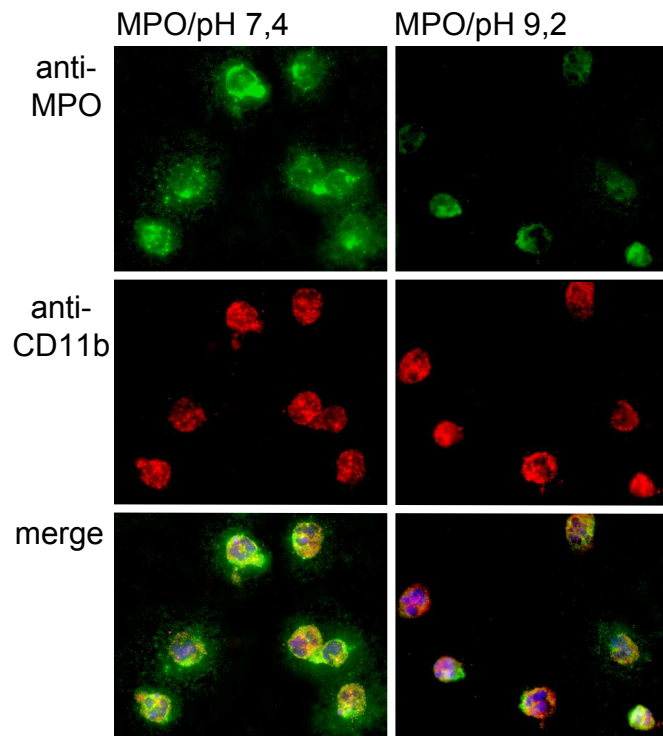


Abbildung 25: **Immunzytochemische Analyse der Oberflächen-assoziierten MPO und des CD11b-Integrins neutrophiler Granulozyten.** PMN wurden entweder bei pH 7,4 oder bei pH 9,2 mit MPO inkubiert. Grün: MPO, Rot: CD11b. x 630.

ebenfalls stark kationische Protein Protamin zum Zellpuffer gegeben unter der Vorstellung, dass ein Überschuss positiv geladener Moleküle im Versuchsansatz den Ladungs-Gradienten der MPO zerstört. Tatsächlich induzierte Protamin mit ansteigender Konzentration von 20 bis 500 $\mu$ g/ml eine Verminderung der Chemotaxis von 100 auf 12,6 $\pm$ 2,9% (Abb. 26).

Diese Befunde der Beteiligung elektrostatischer Kräfte führten zu der Überlegung, dass ein Körper mit negativ geladener Oberfläche ähnliches Verhalten wie die Granulozyten im Chemotaxis-Experiment zeigen müsste. Zur Untersuchung dieser Hypothese dienten geladene Sepharose-*Beads*, deren durchschnittlicher Durchmesser von 34 $\mu$ m sich in ähnlicher Größenordnung derer neutrophiler Granulozyten (12-15 $\mu$ m) befindet. Glutathion- (GSH-) konjugierte *Beads*, wel-



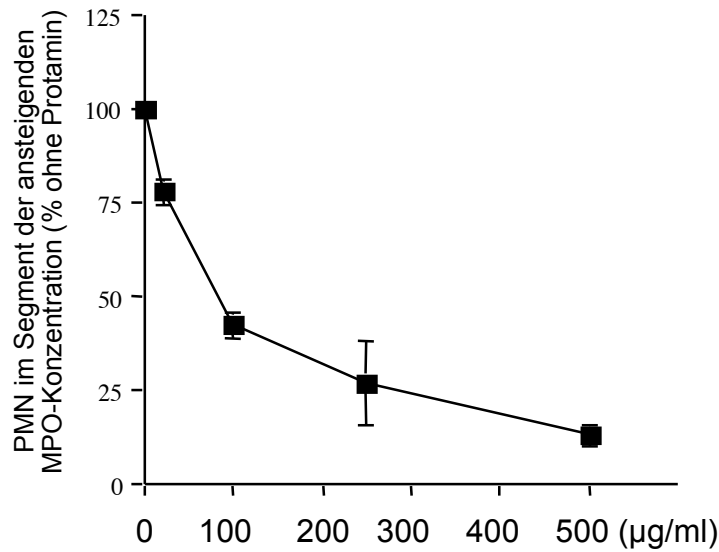


Abbildung 26: **Motilität neutrophiler Granulozyten im Ibidi-Slide in Richtung MPO in Gegenwart von Protamin.** Protamin wurde in ansteigender Konzentration zum Versuchsansatz gegeben.  $n=3$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM.

che bei physiologischem pH-Wert negative Ladung tragen, zeigten ohne MPO-Zugabe während des 30-minütigen Beobachtungszeitraums keine Bewegung (0%), während MPO eine konzentrationsabhängige, gerichtete Bewegung der *Beads* von  $20,54 \pm 5,4\%$  bei 120nM MPO,  $34,98 \pm 4,1\%$  bei 360nM MPO und  $47,25 \pm 3,8\%$  bei 480nM MPO induzierte (Abb. 27 a). Weitere anionische *Beads*, diesmal konjugiert mit einer Sulfopropyl-Gruppe, zeigten ebenfalls gerichtete Motilität in Gegenwart von 360nM MPO von  $16,27 \pm 2,9\%$ . Durch Konjugation eines quaternären Ammoniumsalzes positiv geladenen *Beads* bewegten sich nur zu  $1,3 \pm 0,7\%$  ( $p=0,007$ ) (Abb. 27 b).

Diese Ergebnisse belegen eindrücklich, dass allein elektrostatische Kräfte für die Initiierung einer Bewegung negativ geladener Körper in Richtung MPO genügen.

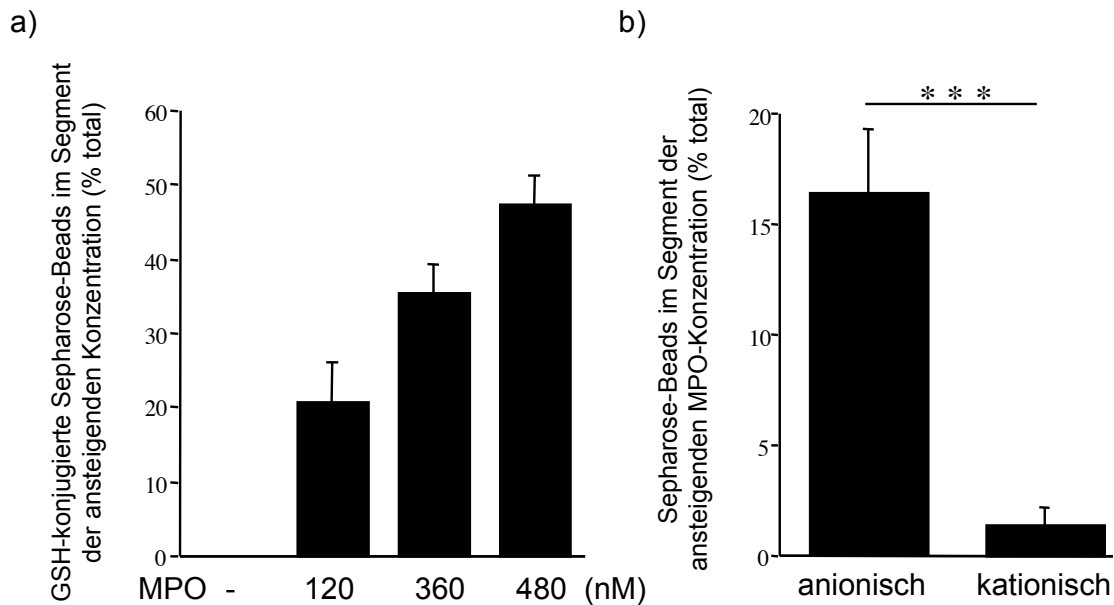


Abbildung 27: **Direktionale Motilität geladener Sepharose-Beads im Ibidi-Slide.** (a) Bewegung anionischer, Glutathion-konjugierter Sepharose-Beads in Richtung ansteigender Konzentrationen von MPO. (b) Bewegung anionischer, Sulfopropyl-konjugierter und kationischer, mit quaternärem Ammoniumsalz konjugierter Sepharose-Beads in Richtung MPO. n=3, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 5.3 Charakterisierung der MPO-abhängigen Motilität neutrophiler Granulozyten *in-vivo*

Für die Einschätzung der pathophysiologischen Relevanz der *in-vitro* Daten schien es wichtig zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse im komplexen System eines lebenden Organismus bestätigen lassen. Hierzu wurde als Versuchstier die Maus gewählt. Aufgrund ihrer für die geplanten Modelle in der Literatur gut charakterisierten Eigenschaften [68, 67] und günstiger operativer Erreichbarkeit wurde die Leber als Zielorgan für die Versuche herangezogen.

#### 5.3.1 Modell der hepatischen Ischämie und Reperfusion

Die Ischämie mit anschließender Reperfusion initiiert im betroffenen Organ eine inflammatorische Kaskade, die in der Leber in einer etwa 6-stündigen Akut-

phase mit Zytokin- und ROS-Produktion und einer anschließenden Subakutphase mit vorherrschender Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Gewebe resultiert, die ihr Maximum zwischen 12 und 24 Stunden erreicht [68]. Die dabei aktivierten Granulozyten sezernieren MPO, welches konsekutiv in der Leber akkumuliert. Die Akkumulation der MPO konnte durch Analyse des Leberhomogenates mittels ELISA bestätigt werden (Abb. 28 a). Ob MPO kausal an der

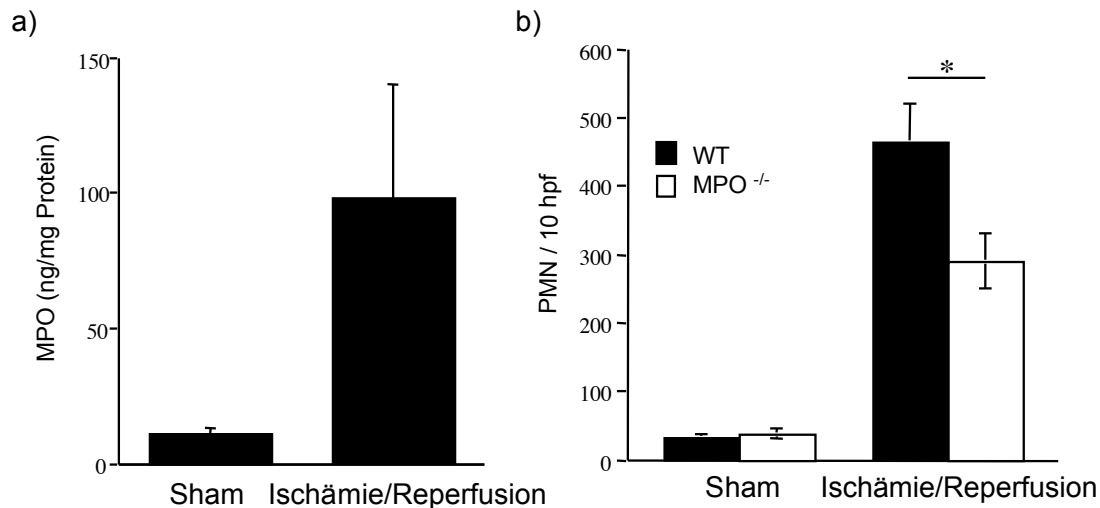


Abbildung 28: **Hepatische Ischämie und Reperfusion im Mausmodell.** (a) MPO-Akkumulation im Leberhomogenat der Wildtyp-Maus nach *Sham*-Operation oder hepatischer Ischämie und Reperfusion. (b) Immunhistochemisch quantifizierte hepatische Infiltration neutrophiler Granulozyten in der Wildtyp- und MPO<sup>-/-</sup>-Maus nach *Sham*-Operation (n=5-8) oder Ischämie und Reperfusion (n=9-10). *hpf* = *High-power-field*: Gesichtsfeld in 600-facher Vergrößerung. Mittelwerte ± SEM.

hepatischen Granulozyteninfiltration beteiligt ist, sollte durch den Vergleich von Wildtyp- (WT) mit MPO-defizienten (<sup>-/-</sup>)-Mäusen geklärt werden. In der Literatur wird für die Ischämie im Mittel eine Dauer von 30 bis 90 Minuten gewählt. Um die hämodynamische Belastung während der Prozedur und das anschließende Trauma so gering wie möglich zu halten, wurde durch Verschließen nur der linken Äste von V. portae und A. hepatica eine partielle Ischämie der Leber vorgenommen. Nach einigen Pilotversuchen mit WT-Tieren erwies sich eine Ischämiedauer von 90 Minuten und eine Reperfusionszeit von 20 Stunden als geeignete Bedingung zur Provokation ausreichender Infiltration von Granulozyten.

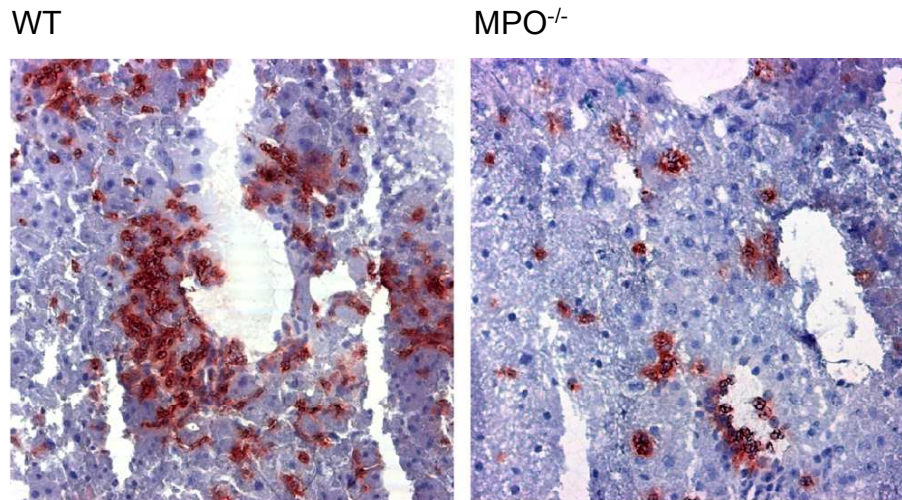


Abbildung 29: **Immunhistochemische Färbung hepatisch akkumulierter neutrophiler Granulozyten (rot-braun) nach Ischämie und Reperfusion in Wildtyp- und MPO<sup>-/-</sup>-Maus.** x 200.

Die Anzahl der akkumulierten Granulozyten wurde durch Auszählen der immunhistochemisch angefärbten PMN (Abb. 29) in 30-50 mikroskopischen Gesichtsfeldern (*hpf*=*high power field*, x 600) in Schnitten aus mindestens 3 verschiedenen Regionen der betroffenen Leberlappen eines Tieres ermittelt. In den WT-Mäusen resultierte die Ischämie und Reperfusion (IR) in einem Anstieg der Granulozytenzahl pro 10 *hpf* von  $28,3 \pm 6,6$  in *sham*-operierten Mäusen auf  $460,3 \pm 57,5$  in IR-Tieren. *Sham*-operierte Mäuse waren zwar einer Laparotomie, aber keiner IR unterzogen worden. In den MPO<sup>-/-</sup>-Mäusen dagegen waren signifikant weniger PMN in den Leberschnitten nachzuweisen ( $p=0,027$ ), hier stieg die Zahl nur von  $35,8 \pm 6,8$  auf  $287,5 \pm 40,0$  PMN/10 *hpf* (Abb. 28 b). Diese Beobachtungen machen deutlich, dass MPO kausal an der hepatischen Granulozyten-Infiltration nach IR beteiligt ist.

### 5.3.2 Modell der intraportalen Injektion

Zusätzlich zum Modell der IR, in dem MPO nicht alleiniger Auslöser der Granulozyten-Infiltration, sondern nur Kontributor neben diversen anderen inflammatori-

schen Mediatoren ist, wurde ein Modell gewählt, welches einen direkten Effekt des Proteins impliziert: Murine MPO wurde in die V. mesenterica superior injiziert, die in die V. portae und damit in die Leber mündet. Aufgrund der bekannten, hohen Affinität der MPO zu Matrixproteinen und zum Endothel kann von einer Immobilisation eines Großteils der MPO in der Leber, die durch die feine Verzweigung der Sinusoiden eine große Oberfläche bietet, ausgegangen werden. Um zu evaluieren, ob die CD11b-Integrine an der potentiellen Infiltration neutrophiler Granulozyten beteiligt sind, wurden die Studien zusätzlich zu WT- auch mit CD11b-defizienten Mäusen durchgeführt. Die Injektion von  $2\mu\text{g}$  muriner MPO

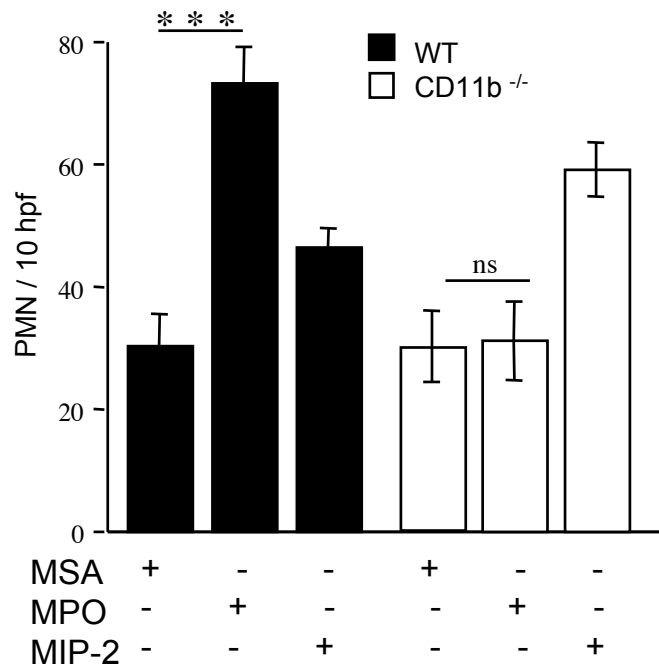


Abbildung 30: **Hepatische Infiltration neutrophiler Granulozyten in der Wildtyp- und CD11b<sup>-/-</sup>-Maus.** Die Akkumulation der PMN nach intraportaler Injektion von murinem Serumalbumin (MSA), murinem MPO oder *Macrophage-Inflammatory-Protein-2* (MIP-2) wurde immunhistochemisch quantifiziert. *Hpf* = *high-power-field*: Gesichtsfeld in 600-facher Vergrößerung. n= 6-8, Mittelwerte  $\pm$  SEM.

resultierte nach 2 Stunden im WT in einer Akkumulation von  $72,6 \pm 5,9$  PMN pro 10 *hpf*. Murines Serumalbumin (MSA) als Kontrollprotein provozierte eine signifikant geringere Infiltration ( $29,6 \pm 5,2$ ,  $p=0,0001$ ). In der CD11b<sup>-/-</sup>-Maus war ein völliges Ausbleiben dieses MPO-abhängigen Anstiegs zu beobachten ( $p=0,89$ )

(Abb. 30).

Um zu kontrollieren, ob CD11b<sup>-/-</sup>-Granulozyten in diesem Modell trotz ihrer Defizienz generell die Fähigkeit zur hepatischen Infiltration besitzten, wurde das Chemokin *Macrophage-inflammatory-protein-2* (MIP-2) in die V. mesenterica injiziert. Bemerkenswerter Weise stieg die Anzahl hepatisch akkumulierter PMN in der CD11b<sup>-/-</sup>-Maus auf 58,6±4,6 pro 10 *hpf* und damit stärker an als im WT (45,8±3,2 PMN/10 *hpf*) (Abb. 30). Die Ergebnisse belegen, dass MPO CD11b-

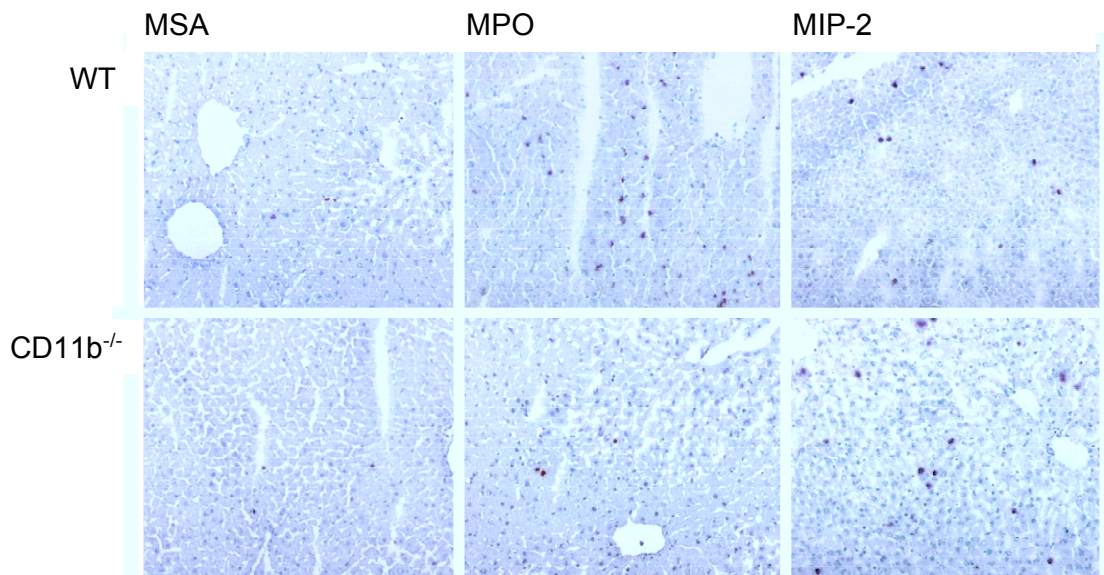


Abbildung 31: **Immunhistochemische Färbung hepatisch akkumulierter neutrophiler Granulozyten (rot-braun) nach intraportaler Injektion von MSA, MPO oder MIP-2 in der Wildtyp- oder CD11b<sup>-/-</sup>-Maus. × 200.**

abhängig die Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Leber der Maus induziert.

# Kapitel 6

## Diskussion

Diese Arbeit identifiziert das Enzym Myeloperoxidase erstmals als Chemotaxin neutrophiler Granulozyten und zeigt dabei einen bisher nicht bekannten Mechanismus der granulozytären Motilität auf. Im Folgenden sollen wichtige Befunde interpretiert und diskutiert und das Ergebnis in den Kontext der aktuellen Forschung eingebettet werden.

### 6.1 Bedeutung der MPO für die Adhäsion

Das initiale Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der Bedeutung der MPO für die Migration neutrophiler Granulozyten. Die Adhäsion der PMN an die Gefäßwand ist eine kritische Voraussetzung und ein Initiator der Extravasation der Zellen und damit ein Bestandteil der Migration. Vor dem Hintergrund der Beobachtungen, dass MPO mit hoher Affinität an Heparan-Glykosaminoglykane (GAGs) der endothelialen Oberfläche [11], an die granulozytäre Glykokalix [15] und an CD11b-Integrine bindet und außerdem die Oberflächenexpression dieser Integrine verstärkt [88], entstand die Hypothese, dass MPO als Verbindungselement zwischen ihren Interaktionspartnern - Gefäßwand und Granulozyt - fungieren könnte. Additiv könnte die MPO-induzierte, vermehrte Präsentation von CD11b die granulozytäre Adhäsion positiv verändern.

Die Beobachtung der gesteigerten Bindung der Granulozyten an MPO-beladene Endothelzellen (Abb. 12 a) kann als Ausdruck dessen interpretiert werden, dass

unstimulierte PMN und ruhende Endothelzellen keine natürliche Affinität zueinander besitzen, sondern vielmehr das Endothel basal einen anti-adhäsiven Charakter aufweist [37, 5]. Dieser resultiert zum einen aus einer geringen konstitutiven Expression von Adhäsionsmolekülen. Zum anderen wirkt die negativ geladene Glykokalix der beiden Zellspezies einer Interaktion entgegen. Das auf den GAGs immobilisierte MPO könnte diesen anti-adhäsiven Charakter nivellieren, indem es sich als Rezeptor für das granulozytäre CD11b-Integrin präsentiert und außerdem die elektrostatische Interaktion der Zellen erleichtert.

Der Befund dagegen, dass die MPO-Beladung der PMN ihre Adhäsion an durch Zytokine aktivierte Endothelzellen deutlich vermindert (Abb. 12 b), legt den Schluss nahe, dass die Stärke der Bindung zwischen CD11b und ICAM-1, welches durch Zytokin-Exposition in bedeutender Menge exprimiert wird, der Stärke der Bindung zwischen CD11b-assoziiertem MPO und den GAGs überwiegt. Die Konkurrenz von MPO mit ICAM-1 resultiert also in verminderter Fähigkeit zur Adhäsion des Granulozyten auf stark aktiviertem Endothel.

Es verbleibt ungeklärt, wie sich die Adhäsion nach gleichzeitiger Aktivierung der Endothelzellen, MPO-Beladung der PMNs und der HUVECs verhält.

Die endgültige Schlussfolgerung, ob diese Eigenschaften der MPO zur Induktion der Granulozyten-Infiltration *in-vivo* beitragen oder ohne Bedeutung sind, kann hier nicht gezogen werden. Der Zusammenhang zwischen Adhäsion und Migration ist weniger simpel als vielmehr hochkomplex, da zwar die Ausbildung aber auch das Loslösen von Bindungen für die Motilität des Granulozyten notwendig ist [4].

## 6.2 Bedeutung der MPO für die Chemotaxis

Mit dem *Ibidi-Slide* wurde ein Modell gewählt, welches die Untersuchung der chemotaktischen Eigenschaften der MPO erlaubt. Damit unterscheidet sich diese Methode vom Modell der *Boyden-Chamber* und der *Transwell*-Untersuchung, die klassischer Weise zur Studie der Chemotaxis herangezogen werden [121, 118]. Diese Systeme implizieren gleichzeitig den Prozess der Transmigration, so dass nicht zwischen beiden Phänomenen unterschieden werden kann. Mit dem Fokus auf reine Chemotaxis im *Ibidi*-Modell war es möglich, einen völlig neuen Mechanismus der Chemotaxis aufzudecken.



### 6.2.1 Interpretation der Beobachtungen im Chemotaxis-Modell

Die Studien im Chemotaxis-Modell zeigten eine MPO-induzierte, gerichtete Motilität der Granulozyten, die unabhängig der katalytischen Aktivität des Enzyms und unabhängig zytoskellärer Rearrangements und Energie-konsumierender Prozesse der PMN auftrat. Die Experimente mit ungeladener MPO und dem kationischen Protein Protamin indentifizierten elektrostatische Interaktionen zwischen MPO und den PMN als Auslöser der Motilität. Dieser Mechanismus wurde durch Versuche mit anionischen und kationischen Sepharose-*Beads* nachdrücklich belegt. Die Blockade der CD11b-Integrine legte weiterhin deren Einfluss an der Interaktion dar.

Diese Daten führen zur Annahme des folgenden Mechanismus: MPO bindet nach Applikation in den Kanal des *Ibidi-Slides* mit hoher Affinität an die Fibrinogen-beschichtete Oberfläche (siehe 4.2.6). Die so immobilisierte MPO übt durch elektrostatische Kräfte eine Anziehung auf die PMN aus, die sich aufgrund geringer ausgeprägter Bindung zum Fibrinogen in Richtung MPO bewegen. Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass ein erhöhter Aktivitätszustand der Granulozyten, der eine Festigung der Bindung zum Fibrinogen veranlasst, in einer verringerten Bewegung in Richtung MPO resultierte (siehe 5.2.1).

Die Assoziation der MPO mit der Oberfläche neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit elektrostatischer Kraft ist in der Literatur beschrieben [15]. Verantwortlich für die bei physiologischem pH-Wert positive Ladung der MPO ist ihr Reichtum an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, während die negative Ladung der Granulozytenoberfläche maßgeblich durch Sialinsäurereste der Glykokalix bedingt ist [5].

Die Experimente mit geladenen Sepharose-*Beads* belegen, dass allein die elektrostatische Interaktion zwischen MPO und einem Körper mit negativer Oberflächenladung eine Bewegung desselben induzieren kann. Dies könnte folglich bedeuten, dass MPO *in-vivo* zur Attraktion und Akkumulation aller zellulären Fraktionen des Blutes führen kann. Es ist jedoch anzunehmen, dass MPO zwar die Infiltration aller zur Migration befähigten Zellen, nicht aber der nicht-migrierenden Zellen wie Erythrozyten und Thrombozyten induziert. Denn es ist wahrscheinlich,

dass zur vollständigen migratorischen Kaskade *in-vivo* noch aktive Mechanismen der Zellen, wie Rezeptor-Interaktionen und morphologische Alterationen, beitragen.

Die elektrostatische Anziehung scheint *in-vitro* zwar ausreichend, aber dennoch auch hier nicht alleiniger Mechanismus der Motilität zu sein: Das stärker kationische, granulozytäre Protein Cathepsin G ( $IP > 11$ ) war nicht befähigt, eine Bewegung in gleichem Ausmaß wie MPO zu induzieren (Abb. 15 a). Scheinbar stellt die Interaktion der MPO mit den CD11b-Integrinen einen additiven Mechanismus dar, der zusätzlich zur elektrostatischen Kraft die Bewegung der Zellen ermöglicht. An dieser Stelle bleibt ungeklärt, ob auch diese Interaktion elektrostatischer Wechselwirkung unterliegt. Das CD11b-Integrin lässt in seiner Aminosäuresequenz keine Häufung saurer Aminosäuren erkennen, trägt aber eine Glykosylierung großteilig negativ geladener Zuckerreste: Eine Analyse der durch Hydrazinolyse gewonnenen Oligosaccharide von CD11/CD18-Integrinen zeigte einen Anteil saurer Oligosaccharide von 44% auf [8]. Auch ist vorstellbar, dass MPO die CD11b-Interaktion mit der Fibrinogen-beschichteten Oberfläche gerade so moduliert, dass keine zu starke Immobilisierung des Granulozyten stattfindet und somit die Motilität begünstigt wird.

### **6.3 Bedeutung elektrostatischer Interaktion für die Motilität neutrophiler Granulozyten**

Bereits vor mehr als 30 Jahren wurden elektrostatische Kräfte im Zusammenhang mit leukozytärer Chemotaxis untersucht [49]. Der Kontakt mit Chemotaxinen induziert, wahrscheinlich durch membranäre Ionentransferprozesse, eine Verringerung der negativen Oberflächenladung der PMN. Diese Tatsache wurde als kritische Voraussetzung für die chemotaktische Motilität der Granulozyten postuliert. Im Bewusstsein der anti-adhäsiven Qualität der negativ geladenen Glykokalix der beteiligten Zellen diente als Erklärung für diese Beobachtung die verbesserte Fähigkeit zur Interaktion mit dem Gewebe, auf dem die Zelle sich fortbewegt [48, 127]. Wie unter 6.1 beschrieben bedarf es dabei keiner festen Adhäsion, sondern vielmehr fein gesteuerter Interaktion [4].

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die selektive Entfernung der negativ geladenen Sialinsäurereste der Glykokalix der Granulozyten ihren Kontakt mit den Endothelzellen erleichterte [48]. Außerdem wurde beobachtet, dass Fraktionen kationischer, granulozytärer Proteine sowie ein kationisches Tripeptid im Gegensatz zu ungeladenen Proteinfractionen und einem ungeladenen Tripeptid die Chemotaxis der PMN induzierten [127, 112]. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde im Zusammenhang dieser Befunde nicht untersucht.

Einen weiteren Hinweis zum Zusammenhang leukozytärer Motilität und elektrostatischer Interaktion bietet die so genannte *Elektrotaxis* [98, 42]: Neutrophile Granulozyten und zahlreiche weitere Zellspezies zeigen in einem gleichgerichteten elektrischen Feld eine directionale Bewegung. Diese Motilität zeigte sich *in-vitro* in einem äußeren elektrischen Feld wiederum nach Entfernung der Sialinsäurereste deutlich vermindert, was eine Abhängigkeit der Bewegung von der negativen Oberflächenladung der Zellen belegte. Endogen entsteht ein elektrisches Feld beispielsweise durch die Verletzung einer epithelialen Barriere, die eine Störung der transepithelialen Potentialdifferenz bewirkt. Die Elektrotaxis trägt physiologisch zur Zellmigration bei der Wundheilung, Wachstumsprozessen und der neuronalen Orientierung bei [153]. Bisher wird aber angenommen, dass diesen Prozessen aktive Mechanismen der migrierenden Zellen zugrunde liegen. Möglicherweise liefert diese Arbeit erstmals Hinweise für passive Mechanismen.

## 6.4 Modulation der Granulozyten-Motilität durch MPO *in-vivo*

Für die Untersuchung der MPO-vermittelten granulozytären Motilität *in-vivo* wurden Wildtyp-Mäuse, MPO-defiziente und CD11b-defiziente Mäuse herangezogen. Es erfolgte entweder die Ligatur der linken Äste von A. hepatica und Portalvene oder die Injektion von MPO in die V. mesenterica superior, die in die Portalvene mündet. Die A. hepatica und die Portalvene treten gemeinsam mit dem Gallengang durch die Leberpforte in das Organ ein und verzweigen sich dort bis zu kapillären Sinusoiden. Die Sinusoiden sind die Bereiche des Stoffaustauschs und sind durch ein diskontinuierliches Endothel vom *Disse-Raum*, dem Bereich, der die Hepatozyten

umgibt, getrennt. Dieses Endothel erlaubt die unselektive Passage von Molekülen und gegebenenfalls auch zellulären Bestandteilen. Studien anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass die hepatische Infiltration neutrophiler Granulozyten maßgeblich im Bereich der Sinusoiden stattfindet [68, 25]. Die injizierte oder von aktivierten Granulozyten sezernierte MPO kann nicht nur an das Endothel, sondern auch ungehindert an Hepatozyten und Matrixproteine im Disse-Raum binden. Damit kann MPO nicht nur einen abluminalen Gradienten ausbilden, sondern auch einen kationischen „Teppich“ über endotheliale und subendotheliale Bereiche legen, der dessen anti-adhäsive Eigenschaften neutralisiert. Dies resultiert scheinbar in der deutlichen Granulozyten-Infiltration in der postischämischen und der MPO-infundierten Leber der WT-Maus.

#### 6.4.1 Die Bedeutung des CD11b-Integrins

Die ausbleibende hepatische PMN-Infiltration in der CD11b<sup>-/-</sup>-Maus belegt in Analogie zu den *in-vitro*-Beobachtungen die notwendige Beteiligung der CD11b-Integrine für den MPO-vermittelten Effekt. Die Integrine sind in der aktuellen Literatur als Mediatoren der Migration akzeptiert [65, 147, 143, 130]. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass die Integrine für den Prozess der endothelialen Diapedese zwar notwendig sind, die extravasale Fortbewegung der Zellen jedoch behindern, indem sie die PMN zu sehr immobilisieren [85, 18]. Dieses Phänomen könnte die Beobachtung der verstärkten PMN-Akkumulation nach MIP-2-Injektion in der CD11b<sup>-/-</sup>-Maus im Vergleich zum Wildtyp erklären. So können scheinbar in diesem Modell die Granulozyten, die keine CD11b-Integrine besitzen, das Gewebe leichter infiltrieren als CD11b-kompetente PMN. Dem entgegen zeigen sich die Integrine aber für die MPO-vermittelte Akkumulation notwendig. Dies deutet darauf hin, dass die MPO-Integrin-Interaktion synergistisch zu der postulierten elektrostatischen Kraft wirkt. Gleichzeitig scheint MPO den zu adhäsiven Charakter der Integrine zu modulieren und begünstigt so die Motilität der PMN nach intraportaler Injektion und nach IR.

### 6.4.2 Einfluss der katalytischen Aktivität der MPO

Die Ergebnisse der *in-vitro*-Experimente belegen die Unabhängigkeit der MPO-induzierten PMN-Motilität von katalytischer Aktivität des Enzyms. Es kann angenommen werden, dass dieser Mechanismus auch *in-vivo* für die hepatische Granulozyten-Infiltration verantwortlich ist. Die Notwendigkeit des CD11b-Integrins unterstützt diese These.

An dieser Stelle ist jedoch einzuwenden, dass die Experimente eine Beteiligung der katalytischen Eigenschaften der MPO nicht ausschließen können. Gerade in der postischämischen Leber wurde im Tiermodell beobachtet, dass ROS-vermittelte Verletzungen und damit verbundenes Anschwellen des Endothels sowie durch Aktivierung der Granulozyten induzierte verringerte Flexibilität dieser in einem mechanischen „Einfangen“ (*Trapping*) der PMN in den Sinusoiden resultiert [69, 70]. Ein Beitrag der MPO zum PMN-*Trapping* durch Katalyse der Produktion von HOCl und Peroxynitrit ist zwar nicht nachgewiesen, aber dennoch vorstellbar.

Außerdem nimmt die verfügbare NO-Konzentration Einfluss auf die sinusoidale PMN-Akkumulation [100, 144]. NO antagonisiert in der postischämischen Leber die durch vermehrt produzierte Vasokonstriktoren bedingte Tonuserhöhung der Arteriolen und garantiert so die Aufrechterhaltung des Flusses in der Mikrozirkulation. Die MPO-vermittelte NO-Konsumption könnte die Reduktion des Flusses und damit wiederum das PMN-*Trapping* und eine Begünstigung der PMN-Interaktion mit dem Endothel provozieren.

### 6.4.3 MPO-abhängige Apoptose

Ein weiterer Mechanismus, der möglicherweise als Kontributor der hier beschriebenen *in-vivo* Beobachtungen diskutiert werden muss, ist die Verminderung der granulozytären Apoptose durch MPO. Eine aktuelle Studie belegt, dass MPO CD11b-Integrin-vermittelt intrazelluläre Mechanismen aktiviert, die apoptotische Signalkaskaden verhindern und somit die Lebensdauer aktivierter Granulozyten verlängern [35]. Es konnte in Abhängigkeit dieses Mechanismus eine Prolongation des inflammatorischen Prozesses durch MPO im Tiermodell nachgewiesen werden. Damit ist vorstellbar, dass MPO auch in den Modellen der hepatischen Granulozyten-Infiltration die Lebenszeit der infiltrierten Granulozyten verlängert

und somit im Gewebe mehr Zellen auffindbar sind.

Ein Einfluss der Apoptose bleibt hier aber ungeklärt, gerade da generell die Bedeutung der MPO für die Apoptose noch nicht endgültig aufgedeckt ist. Noch nicht veröffentlichte Arbeiten mit Wildtyp- und MPO-defizienten Mäusen zeigen beispielsweise konträre Ergebnisse, indem deutlich verstärkte Apoptose der Granulozyten in Abhängigkeit von MPO nachgewiesen werden konnte (Kubala et al., unveröffentlichte Daten).

#### **6.4.4 Bedeutung MPO-abhängiger Plasmin-Verfügbarkeit**

Es existiert weiterhin die Vermutung, dass verringerte Leukozyten-Infiltration in MPO-defizienten Mäusen durch verringerte Plasmin-Verfügbarkeit begründet ist [9]. Nach chronischer LAD-Ligatur wurde in der MPO<sup>-/-</sup>-Maus eine geringere myokardiale Infiltration von Leukozyten nachgewiesen als in der WT-Maus. Ebenfalls wurde in der MPO<sup>-/-</sup>-Maus eine geringere Aktivität der Serinproteinase Plasmin und eine höhere Aktivität deren Inhibitors *Plasminogen-activator-inhibitor-1* (PAI-1) gezeigt. In diesem Zusammenhang wurde angenommen, dass eine durch verminderte Plasmin-Aktivität schwächere inflammatorische Reaktion im Infarktgewebe den Granulozyten weniger Anlass zur Infiltration des Gewebes bietet. Es wurde postuliert, dass MPO selbst keine Rekrutierung der Zellen bewirkt. Eine Beteiligung dieses Mechanismus an den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen wurde nicht untersucht und kann somit weder belegt noch ausgeschlossen werden.

### **6.5 Bedeutung der Arbeit für das Verständnis der Pathophysiologie vaskulärer Inflammation**

Vor dem Hintergrund der Erkenntnis, dass neutrophile Granulozyten eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion und damit in der Entstehung vieler Erkrankungen einnehmen (siehe 2.6), ist es von hoher Relevanz zu verstehen, welche Initiatoren und Mediatoren die Einwanderung der Zellen in die Gefäßwand bedingen. Im Gegensatz zur akuten Inflammation, die Auslösern

wie Pathogenen oder mechanischer Verletzung des Gewebes unterliegen kann, ist für die chronische, vaskuläre Entzündung keine klare Noxe zu erkennen (siehe 2.3). Vielmehr liegt hier ein multifaktorieller Prozess vor.

Der erhebliche prädiktive Wert hoher MPO-Plasmaspiegel und die deutliche Korrelation der MPO-Akkumulation in Plasma und Gewebe mit kardiovaskulären Erkrankungen provozierte nun in jüngerer Zeit vielfach die Annahme einer kausalen Beteiligung der MPO.

Diese Arbeit zeigt einen Mechanismus auf, durch den MPO durch die Initiierung der Motilität und Akkumulation neutrophiler Granulozyten kausal zu vaskulärer Inflammation und somit endothelialer Dysfunktion beitragen könnte. Die Bewertung der vorangehenden Beobachtung, dass MPO subendothelial in der Gefäßwand akkumuliert [11], muss nun erweitert werden - wirkt MPO hier doch nicht nur durch enzymatische Mechanismen, sondern provoziert durch Attraktion der Granulozyten, die ihrerseits zytotoxische Mediatoren hervorbringen, noch eine Potenzierung ihrer pro-inflammatorischen Eigenschaften.

Außerdem könnte diese Arbeit eine Erklärung für einen gerade initiativen Mechanismus der Entstehung der endothelialen Dysfunktion liefern. Die Beobachtung der erhöhten Präsenz von MPO im Plasma bei Abstinenz anderer inflammatorischer Marker [142, 12, 106] ermöglicht diese Einschätzung. So könnte MPO den PMN die Infiltration der Gefäßwand ohne eine Beteiligung anderer inflammatorischer Mediatoren gewähren. Eine Extravasation wäre also denkbar, obwohl das „nicht-inflammatorische“ Endothel keine Adhäsionsmoleküle exprimiert und keine Verletzungen aufweist, weshalb es nach bisherigem Wissen kein Substrat zur Migration der Granulozyten bietet. Es könnte vermutet werden, dass die MPO-vermittelte Motilität für diese subtilen Vorgänge zu Beginn der Entwicklung einer Dysregulation des Endothels von hoher Relevanz ist und weniger für Prozesse akut Pathogen-vermittelter Entzündung. Denn der Phänotyp der MPO-Defizienz beschreibt eine geringere Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen, nicht aber eine verminderte Granulozyten-Akkumulation am Ort einer Infektion.

Unterstützend zeigte sich zum einen in den Adhäsionsstudien dieser Arbeit eine deutliche MPO-vermittelte Steigerung der PMN-Bindung auf „nicht-inflammatorischen“ Endothelzellen (Abb. 12 a). Zum anderen war in den Chemotaxis-Studien im *Ibidi-Slide* zu beobachten, dass PMN, die vor Versuchsanfang bereits aktiviert

waren, in geringerem Maß auf MPO reagierten als ruhende PMN (siehe 5.2.1). Sicherlich ist die hepatische Ischämie auch ein Modell, welches einen Synergismus zahlreicher Faktoren, wie auch der Aktivierung von Endothel und PMN, impliziert. Um festzustellen, unter welchen Bedingungen *in-vivo* die MPO-vermittelte Motilität der PMN die höchste Relevanz besitzt, wären weitere Versuchsreihen notwendig.

## 6.6 Bedeutung der Arbeit für zukünftige therapeutische Strategien

Die Migration und Extravasation neutrophiler Granulozyten ist ein zentrales Ereignis inflammatorischer Prozesse und leistet einen relevanten Beitrag akut zum Reperfusionsschaden und chronisch zur Initiierung und Progression endothelialer Dysfunktion. Daher ist es von hoher Wichtigkeit, therapeutische Strategien zu entwickeln, die diesen Mechanismus kontrolliert inhibieren. Diverse Maßnahmen in diesem Bereich konnten in Tiermodellen positive Ergebnisse hervorbringen: Die Depletion neutrophiler Granulozyten mittels Chemotherapeutika, Antisera gegen Granulozyten oder Granulozytenfiltern führte zur Reduktion postischämischer Arrhythmien [81], zu vermindertem *No-Reflow* nach myokardialer Ischämie [129] und zur Verkleinerung des Infarktareals [124]. Weiterhin existieren Bemühungen, die Interaktion der Granulozyten mit der Gefäßwand durch Antikörper gegen CD18- und speziell CD11b-Integrine, endotheliale und granulozytäre Selektine und gegen ICAM-1 zu blockieren. Dadurch konnte die Infiltration von Granulozyten nach Myokardinfarkt vermindert, die Größe des Infarktareals verringert und die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion eingeschränkt werden [145, 90, 91, 101].

Trotz dieser Erfolge unterliegen diese Methoden relevanten Schwächen: Die Depletion der Granulozyten beeinflusst immer auch andere Zellspezies und führt zur Aktivierung diverser pro-inflammatorischer Kaskaden [74]. Die Applikation von Antikörpern zur Modulation der PMN-Endothel-Interaktion kann zum einen die Aktivierung der beteiligten Zellen provozieren. Zum anderen ist der Erfolg dieser Methode limitiert durch kurze Halbwertszeit der Antikörper und die systemische Generierung von Antikörpern gegen die applizierten Antikörper [74]. Während zur



Therapie entzündlicher Erkrankungen wie der Multiplen Sklerose und der Psoriasis viel versprechende klinische Studien der Phasen 2 und 3 beschrieben sind, waren solche Studien im Bereich der Ischämie/Reperfusion, nämlich Insult und Myokardinfarkt, bisher enttäuschend [55].

Diese Arbeit identifiziert MPO als einen potentiellen Ansatzpunkt zur Verminderung der Granulozyten-Infiltration. Auch bezüglich MPO sind bisher keine gezielten Therapiemöglichkeiten vorhanden. Es existieren aber Bemühungen der pharmazeutischen Industrie, spezifische MPO-Inhibitoren für die klinische Anwendbarkeit verfügbar zu machen. Aufgrund dieser und vorangehender Arbeiten wird jedoch deutlich, dass Therapeutika zur Blockade der katalytischen Aktivität der MPO die pro-inflammatorischen Eigenschaften des Proteins nicht vollständig erfassen könnten. Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die Inhibition der MPO-Aktivität eine Beeinträchtigung der Immunantwort und eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einigen Erregern bedeuten könnte. Es ist zwar noch nicht eindeutig untersucht, ob eine ererbte MPO-Defizienz signifikant häufiger zur Inzidenz von Infektionen oder zu einer stärkeren Ausprägung von Infekten führt (siehe 2.7.1). Möglich ist jedoch, dass die scheinbar intakte Immunantwort teilweise aus Adaptationsmechanismen während der Ausbildung des Immunsystems im Kindesalter resultiert. Eine Blockade der Aktivität des Enzyms im erwachsenen Menschen kann also phänotypisch von angeborener Immundefizienz variieren. Basierend auf dieser Arbeit avanciert die Inhibition der elektrostatischen Interaktion der MPO mit dem Endothel und den neutrophilen Granulozyten als eine adäquate Möglichkeit zur Modulation der MPO-vermittelten Granulozyten-Infiltration. Ein solches Therapeutikum unterbände nicht vollständig MPO-abhängige Mechanismen der Immunantwort, sondern erhielte sowohl die Pathogen-vermittelte, Chemokin-induzierte Migration der PMN, als auch deren MPO als mikrobizides Instrument. Einen viel versprechenden Ansatz für diese Strategie liefern Befunde, dass die polyanionischen Polysaccharide Heparin und fraktioniertes Heparin mit endothelialen Heparan-Glykosaminoglykanen um die Bindung mit MPO konkurrieren und dieses von endothelialen Strukturen loslösen [14, 125]. Weiterhin könnten vielleicht polykationische Substanzen, wie das hier *in-vitro* verwendete Protamin, zur Verminderung der Interaktion der MPO mit den Granulozyten *in-vivo* getestet werden.

## 6.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit provozieren eine Reihe weiterführender Fragestellungen:

Zunächst sollen die detaillierten Charakteristika der elektrostatischen Interaktion noch weiter beleuchtet werden, um die zugrunde liegenden Mechanismen der MPO-induzierten Motilität vollends aufzuklären. Die Alteration der negativen Oberflächenladung der Granulozyten durch enzymatische Abspaltung der Sialinsäurereste kann Aufschluss über die Beteiligung der Ladung der granulozytären Glykokalix geben. Berechnungen der Stärke der Interaktion zwischen MPO und Granulozyten unter Flussbedingungen [16] können Aussagen über den Einfluss der MPO auf Granulozyten-Margination und Adhäsion unter Scherstress ermöglichen.

Weiterhin soll untersucht werden, ob die beobachteten Mechanismen auch für andere Blutzellspezies, besonders für die am atherosklerotischen Geschehen maßgeblich beteiligten Monozyten, gelten und ob MPO ihre Infiltration in verschiedene Gewebe *in-vivo* induzieren kann.

Um die hier postulierte Unabhängigkeit der Motilität von katalytischer Aktivität der MPO *in-vivo* zu bestätigen, ist geplant, eine transgene Maus einzusetzen, die statt muriner MPO humane, mutante M243T MPO exprimiert, welche, wie in 5.2.1 beschrieben, keine katalytische Aktivität besitzt. Falls die MPO-vermittelte Granulozyten-Infiltration unabhängig enzymatischer Mechanismen abläuft, sollte die Durchführung der hepatischen Ischämie/Reperfusion-Versuche ebenso starke Infiltration von Granulozyten in der transgenen Maus provozieren wie im Wildtyp. Die Generierung der MPO M243T Maus wird zurzeit im Auftrag der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Außerdem soll belegt werden, dass die *in-vivo* stattfindende, MPO-vermittelte Infiltration der PMN analog zu den *in-vitro*-Beobachtungen unabhängig intrazellulärer Signalkaskaden und zytoskellärer Beteiligung auftritt. Hierzu sollen Mäuse herangezogen werden, deren Granulozyten eine Defizienz der Rac-2-GTPase aufweisen, die zentral an der Steuerung intrazellulärer Signalkaskaden der Migration beteiligt ist. So weisen Rac-2-defiziente Mäuse eine deutlich eingeschränkte Chemotaxin-abhängige Migration der Granulozyten auf [122]. Eine intraportale Injektion von MIP-2 sollte in dieser Maus also eine verminderte hepatische

PMN-Akkumulation im Vergleich zur WT-Maus provozieren, während nach MPO-Injektion jedoch keine Einschränkung der Infiltration zu beobachten sein sollte.

Letztendlich soll aufgedeckt werden, welche Schritte der migratorischen Kaskade *in-vivo* von MPO moduliert werden. Die Methode der intravitalen Mikroskopie von Gefäßen der Mikrozirkulation, z.B. des Mesenteriums, der Maus oder Ratte lässt die Beobachtung der Granulozyten *in-situ* zu. Aktive als auch mutante, inaktive MPO kann intravenös appliziert und in der Gefäßwand mittels fluoreszierenden Antikörpers sichtbar gemacht werden. So ist es möglich zu beobachten, ob ebenfalls fluoreszierend markierte Leukozyten vermehrt auf dem Endothel rollen, vermehrt adhären sind oder vielmehr die Transmigration oder die subendotheliale, chemotaktische Motilität verstärkt auftritt. Diese Untersuchungen werden helfen, die Bedeutung von MPO für die Migration von Granulozyten unter komplexen physiologischen Bedingungen zu beurteilen.

# Literaturverzeichnis

- [1] Bruce Alberts. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 4. Aufl.. edition, 2004.
- [2] G. Ambrosio and I. Tritto. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J*, 138(2 Pt 2):S69–75, 1999.
- [3] G. Ambrosio, H. F. Weisman, J. A. Mannisi, and L. C. Becker. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation*, 80(6):1846–1861, 1989.
- [4] S. I. Anderson, N. A. Hotchin, and G. B. Nash. Role of the cytoskeleton in rapid activation of cd11b/cd18 function and its subsequent downregulation in neutrophils. *J Cell Sci*, 113 ( Pt 15):2737–2745, 2000.
- [5] N. Anzai, A. Gotoh, H. Shibayama, and H. E. Broxmeyer. Modulation of integrin function in hematopoietic progenitor cells by cd43 engagement: possible involvement of protein tyrosine kinase and phospholipase c-gamma. *Blood*, 93(10):3317–3326, 1999.
- [6] Y. Aratani, H. Koyama, S. Nyui, K. Suzuki, F. Kura, and N. Maeda. Severe impairment in early host defense against candida albicans in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun*, 67(4):1828–1836, 1999.
- [7] Y. Aratani, F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, K. Suzuki, N. Maeda, and H. Koyama. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J Infect Dis*, 182(4):1276–1279, 2000.

- [8] M. Asada, K. Furukawa, C. Kantor, C. G. Gahmberg, and A. Kobata. Structural study of the sugar chains of human leukocyte cell adhesion molecules cd11/cd18. *Biochemistry*, 30(6):1561–1571, 1991.
- [9] A. T. Askari, M. L. Brennan, X. Zhou, J. Drinko, A. Morehead, J. D. Thomas, E. J. Topol, S. L. Hazen, and M. S. Penn. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Exp Med*, 197(5):615–624, 2003.
- [10] S. Baldus, J. P. Eiserich, M. L. Brennan, R. M. Jackson, C. B. Alexander, and B. A. Freeman. Spatial mapping of pulmonary and vascular nitrotyrosine reveals the pivotal role of myeloperoxidase as a catalyst for tyrosine nitration in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med*, 33(7):1010, 2002.
- [11] S. Baldus, J. P. Eiserich, A. Mani, L. Castro, M. Figueroa, P. Chumley, W. Ma, A. Tousson, C. R. White, D. C. Bullard, M. L. Brennan, A. J. Lusis, K. P. Moore, and B. A. Freeman. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ecm proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest*, 108(12):1759–1770, 2001.
- [12] S. Baldus, C. Heeschen, T. Meinertz, A. M. Zeiher, J. P. Eiserich, T. Munzel, M. L. Simoons, and C. W. Hamm. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*, 108(12):1440–1445, 2003.
- [13] S. Baldus, T. Heitzer, J. P. Eiserich, D. Lau, H. Mollnau, M. Ortak, S. Petri, B. Goldmann, H. J. Duchstein, J. Berger, U. Helmchen, B. A. Freeman, T. Meinertz, and T. Munzel. Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 37(6):902–911, 2004.
- [14] S. Baldus, V. Rudolph, M. Roiss, W. D. Ito, T. K. Rudolph, J. P. Eiserich, K. Sydow, D. Lau, K. Szocs, A. Klinke, L. Kubala, L. Berglund, S. Schrepfer, T. Deuse, M. Haddad, T. Risius, H. Klemm, H. C. Reichenspurner, T. Meinertz, and T. Heitzer. Heparins increase endothelial nitric oxide bio-

- availability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase. *Circulation*, 113(15):1871–1878, 2006.
- [15] N. Bangalore and J. Travis. Comparison of properties of membrane bound versus soluble forms of human leukocytic elastase and cathepsin g. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 375(10):659–666, 1994.
- [16] S. K. Bhatia, M. R. King, and D. A. Hammer. The state diagram for cell adhesion mediated by two receptors. *Biophys J*, 84(4):2671–2690, 2003.
- [17] W. L. Biffl, E. E. Moore, F. A. Moore, and C. Barnett. Nitric oxide reduces endothelial expression of intercellular adhesion molecule (icam)-1. *J Surg Res*, 63(1):328–332, 1996.
- [18] K. M. Blake, S. O. Carrigan, A. C. Issekutz, and A. W. Stadnyk. Neutrophils migrate across intestinal epithelium using beta2 integrin (cd11b/cd18)-independent mechanisms. *Clin Exp Immunol*, 136(2):262–268, 2004.
- [19] M. L. Brennan, M. S. Penn, F. Van Lente, V. Nambi, M. H. Shishehbor, R. J. Aviles, M. Goormastic, M. L. Pepoy, E. S. McErlean, E. J. Topol, S. E. Nissen, and S. L. Hazen. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med*, 349(17):1595–1604, 2003.
- [20] M. L. Brennan, W. Wu, X. Fu, Z. Shen, W. Song, H. Frost, C. Vadseth, L. Narine, E. Lenkiewicz, M. T. Borchers, A. J. Lusis, J. J. Lee, N. A. Lee, H. M. Abu-Soud, H. Ischiropoulos, and S. L. Hazen. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem*, 277(20):17415–17427, 2002.
- [21] A. Buffon, L. M. Biasucci, G. Liuzzo, G. D’Onofrio, F. Crea, and A. Maseri. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med*, 347(1):5–12, 2002.
- [22] H. Cai and D. G. Harrison. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 87(10):840–844, 2000.

- [23] L. Cassimeris, H. McNeill, and S. H. Zigmond. Chemoattractant-stimulated polymorphonuclear leukocytes contain two populations of actin filaments that differ in their spatial distributions and relative stabilities. *J Cell Biol*, 110(4):1067–1075, 1990.
- [24] A. M. Cheng, S. W. Morrison, D. X. Yang, and S. J. Hagen. Energy dependence of restitution in the gastric mucosa. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281(2):C430–438, 2001.
- [25] J. G. Chosay, N. A. Essani, C. J. Dunn, and H. Jaeschke. Neutrophil margination and extravasation in sinusoids and venules of liver during endotoxin-induced injury. *Am J Physiol*, 272(5 Pt 1):G1195–1200, 1997.
- [26] T. D. Coates, R. G. Watts, R. Hartman, and T. H. Howard. Relationship of f-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils. *J Cell Biol*, 117(4):765–774, 1992.
- [27] A. Daugherty, J. L. Dunn, D. L. Rateri, and J. W. Heinecke. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, 94(1):437–444, 1994.
- [28] M. J. Davies. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. the paul dudley white lecture 1995. *Circulation*, 94(8):2013–2020, 1996.
- [29] Lamy M Deby-Dupont G, Deby C. Neutrophil myeloperoxidase revisited: it’s role in health and disease. *Intensivmed*, 36:500–513, 1999.
- [30] Z. M. Ding, J. E. Babensee, S. I. Simon, H. Lu, J. L. Perrard, D. C. Bullard, X. Y. Dai, S. K. Bromley, M. L. Dustin, M. L. Entman, C. W. Smith, and C. M. Ballantyne. Relative contribution of lfa-1 and mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol*, 163(9):5029–5038, 1999.
- [31] N. M. Domigan, T. S. Charlton, M. W. Duncan, C. C. Winterbourn, and A. J. Kettle. Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils. *J Biol Chem*, 270(28):16542–16548, 1995.
- [32] A. Dove. Cd18 trials disappoint again. *Nat Biotechnol*, 18(8):817–818, 2000.

- [33] J. P. Eiserich, S. Baldus, M. L. Brennan, W. Ma, C. Zhang, A. Tousson, L. Castro, A. J. Lusis, W. M. Nauseef, C. R. White, and B. A. Freeman. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular no oxidase. *Science*, 296(5577):2391–2394, 2002.
- [34] J. P. Eiserich, M. Hristova, C. E. Cross, A. D. Jones, B. A. Freeman, B. Halliwell, and A. van der Vliet. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature*, 391(6665):393–397, 1998.
- [35] D. El Kebir, L. Jozsef, W. Pan, and J. G. Filep. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through cd11b/cd18 integrins and prolongs inflammation. *Circ Res*, 103(4):352–359, 2008.
- [36] J. Everse. The structure of heme proteins compounds i and ii: some misconceptions. *Free Radic Biol Med*, 24(7-8):1338–1346, 1998.
- [37] J. Fehr, R. Moser, D. Leppert, and P. Groscurth. Antiadhesive properties of biological surfaces are protective against stimulated granulocytes. *J Clin Invest*, 76(2):535–542, 1985.
- [38] R. Fenna, J. Zeng, and C. Davey. Structure of the green heme in myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*, 316(1):653–656, 1995.
- [39] S. Fichtlscherer, S. Breuer, V. Schachinger, S. Dimmeler, and A. M. Zeiher. C-reactive protein levels determine systemic nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J*, 25(16):1412–1418, 2004.
- [40] S. Fichtlscherer, C. Heeschen, and A. M. Zeiher. Inflammatory markers and coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol*, 4(2):124–131, 2004.
- [41] S. Fichtlscherer, G. Rosenberger, D. H. Walter, S. Breuer, S. Dimmeler, and A. M. Zeiher. Elevated c-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 102(9):1000–1006, 2000.



- [42] E. I. Finkelstein, P. H. Chao, C. T. Hung, and J. C. Bulinski. Electric field-induced polarization of charged cell surface proteins does not determine the direction of galvanotaxis. *Cell Motil Cytoskeleton*, 64(11):833–846, 2007.
- [43] H. Fliss. Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leukocyte oxidants. *Mol Cell Biochem*, 84(2):177–188, 1988.
- [44] N. G. Frangogiannis, C. W. Smith, and M. L. Entman. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 53(1):31–47, 2002.
- [45] N. G. Frangogiannis, K. A. Youker, and M. L. Entman. The role of the neutrophil in myocardial ischemia and reperfusion. *EXS*, 76:263–284, 1996.
- [46] G. D. Friedman, A. L. Klatsky, and A. B. Siegelau. The leukocyte count as a predictor of myocardial infarction. *N Engl J Med*, 290(23):1275–1278, 1974.
- [47] Z. S. Galis, G. K. Sukhova, M. W. Lark, and P. Libby. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 94(6):2493–2503, 1994.
- [48] J. I. Gallin. Degranulating stimuli decrease the neagative surface charge and increase the adhesiveness of human neutrophils. *J Clin Invest*, 65(2):298–306, 1980.
- [49] J. I. Gallin, J. R. Durocher, and A. P. Kaplan. Interaction of leukocyte chemotactic factors with the cell surface. i. chemotactic factor-induced changes in human granulocyte surface charge. *J Clin Invest*, 55(5):967–974, 1975.
- [50] T. Ganz. Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes. *Proc Assoc Am Physicians*, 111(5):390–395, 1999.
- [51] J. P. Gaut, G. C. Yeh, H. D. Tran, J. Byun, J. P. Henderson, G. M. Richter, M. L. Brennan, A. J. Lusis, A. Belaaouaj, R. S. Hotchkiss, and J. W. Heinecke. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(21):11961–11966, 2001.

- [52] M. B. Hampton, A. J. Kettle, and C. C. Winterbourn. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9):3007–3017, 1998.
- [53] P. R. Hansen. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 91(6):1872–1885, 1995.
- [54] G. K. Hansson, A. K. Robertson, and C. Soderberg-Naucler. Inflammation and atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, 1:297–329, 2006.
- [55] J. M. Harlan and R. K. Winn. Leukocyte-endothelial interactions: clinical trials of anti-adhesion therapy. *Crit Care Med*, 30(5 Suppl):S214–219, 2002.
- [56] E. S. Harris, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, and G. A. Zimmerman. The leukocyte integrins. *J Biol Chem*, 275(31):23409–23412, 2000.
- [57] J. E. Harrison and J. Schultz. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem*, 251(5):1371–1374, 1976.
- [58] S. L. Hazen and J. W. Heinecke. 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(9):2075–2081, 1997.
- [59] S. L. Hazen, F. F. Hsu, A. d’Avignon, and J. W. Heinecke. Human neutrophils employ myeloperoxidase to convert alpha-amino acids to a battery of reactive aldehydes: a pathway for aldehyde generation at sites of inflammation. *Biochemistry*, 37(19):6864–6873, 1998.
- [60] S. L. Hazen, F. F. Hsu, D. M. Mueller, J. R. Crowley, and J. W. Heinecke. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *J Clin Invest*, 98(6):1283–1289, 1996.
- [61] B. Heit, S. Tavener, E. Raharjo, and P. Kubes. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol*, 159(1):91–102, 2002.

- [62] T. Heitzer, T. Schlinzig, K. Krohn, T. Meinertz, and T. Munzel. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 104(22):2673–2678, 2001.
- [63] J. P. Henderson, J. Byun, and J. W. Heinecke. Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes produces 5-chlorocytosine in bacterial rna. *J Biol Chem*, 274(47):33440–33448, 1999.
- [64] T. O. Hirche, J. P. Gaut, J. W. Heinecke, and A. Belaaouaj. Myeloperoxidase plays critical roles in killing klebsiella pneumoniae and inactivating neutrophil elastase: Effects on host defense. *J Immunol*, 174(3):1557–1565, 2005.
- [65] B. J. Hughes, J. C. Hollers, E. Crockett-Torabi, and C. W. Smith. Recruitment of cd11b/cd18 to the neutrophil surface and adherence-dependent cell locomotion. *J Clin Invest*, 90(5):1687–1696, 1992.
- [66] L. J. Ignarro, J. N. Degnan, W. H. Baricos, P. J. Kadowitz, and M. S. Wolin. Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta*, 718(1):49–59, 1982.
- [67] H. Jaeschke. Vascular oxidant stress and hepatic ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Res Commun*, 12-13 Pt 2:737–743, 1991.
- [68] H. Jaeschke. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284(1):G15–26, 2003.
- [69] H. Jaeschke, A. Farhood, M. A. Fisher, and C. W. Smith. Sequestration of neutrophils in the hepatic vasculature during endotoxemia is independent of beta 2 integrins and intercellular adhesion molecule-1. *Shock*, 6(5):351–356, 1996.
- [70] H. Jaeschke and C. W. Smith. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol*, 61(6):647–653, 1997.

- [71] M. W. Johansson, M. Patarroyo, F. Oberg, A. Siegbahn, and K. Nilsson. Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha m beta 2 integrin (mac-1, cd11b/cd18). *J Cell Sci*, 110 ( Pt 9):1133–1139, 1997.
- [72] S. R. Jolly, W. J. Kane, B. G. Hook, G. D. Abrams, S. L. Kunkel, and B. R. Lucchesi. Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion. *Am Heart J*, 112(4):682–690, 1986.
- [73] S. L. Jones, U. G. Knaus, G. M. Bokoch, and E. J. Brown. Two signaling mechanisms for activation of alphas beta2 avidity in polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem*, 273(17):10556–10566, 1998.
- [74] J. E. Jordan, Z. Q. Zhao, and J. Vinten-Johansen. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 43(4):860–878, 1999.
- [75] K. Kessenbrock, L. Frohlich, M. Sixt, T. Lammermann, H. Pfister, A. Bateman, A. Belaouaj, J. Ring, M. Ollert, R. Fassler, and D. E. Jenne. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J Clin Invest*, 2008.
- [76] A. J. Kettle, C. J. van Dalen, and C. C. Winterbourn. Peroxynitrite and myeloperoxidase leave the same footprint in protein nitration. *Redox Rep*, 3(5-6):257–258, 1997.
- [77] A. J. Kettle and C. C. Winterbourn. Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimizes the production of hypochlorous acid. *Biochem J*, 252(2):529–536, 1988.
- [78] A. J. Kettle and C. C. Winterbourn. The influence of superoxide on the production of hypochlorous acid by human neutrophils. *Free Radic Res Commun*, 12-13 Pt 1:47–52, 1991.
- [79] S. J. Klebanoff. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*, 111(5):383–389, 1999.
- [80] S. J. Klebanoff. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*, 77(5):598–625, 2005.

- [81] E. R. Kofsky, P. L. Julia, G. D. Buckberg, J. E. Quillen, and C. Acar. Studies of controlled reperfusion after ischemia. xxii. reperfusate composition: effects of leukocyte depletion of blood and blood cardioplegic reperfusates after acute coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 101(2):350–359, 1991.
- [82] J. B. Kostis, D. Turkevich, and J. Sharp. Association between leukocyte count and the presence and extent of coronary atherosclerosis as determined by coronary arteriography. *Am J Cardiol*, 53(8):997–999, 1984.
- [83] P. Kubes, M. Suzuki, and D. N. Granger. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(11):4651–4655, 1991.
- [84] D. Kutter, P. Devaquet, G. Vanderstocken, J. M. Paulus, V. Marchal, and A. Gothot. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit ? *Acta Haematol*, 104(1):10–15, 2000.
- [85] T. Lammermann, B. L. Bader, S. J. Monkley, T. Worbs, R. Wedlich-Soldner, K. Hirsch, M. Keller, R. Forster, D. R. Critchley, R. Fassler, and M. Sixt. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453(7191):51–55, 2008.
- [86] F. Lanza. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med*, 76(10):676–681, 1998.
- [87] D. Lau and S. Baldus. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther*, 111(1):16–26, 2006.
- [88] D. Lau, H. Mollnau, J. P. Eiserich, B. A. Freeman, A. Daiber, U. M. Gehling, J. Brummer, V. Rudolph, T. Munzel, T. Heitzer, T. Meinertz, and S. Baldus. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with cd11b/cd18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(2):431–436, 2005.
- [89] C. Leeuwenburgh, M. M. Hardy, S. L. Hazen, P. Wagner, S. Oh-ishi, U. P. Steinbrecher, and J. W. Heinecke. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem*, 272(3):1433–1436, 1997.

- [90] D. J. Lefer, D. M. Flynn, and A. J. Buda. Effects of a monoclonal antibody directed against p-selectin after myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol*, 270(1 Pt 2):H88–98, 1996.
- [91] D. J. Lefer, S. M. Shandelya, Jr. Serrano, C. V., L. C. Becker, P. Kuppusamy, and J. L. Zweier. Cardioprotective actions of a monoclonal antibody against cd-18 in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 88(4 Pt 1):1779–1787, 1993.
- [92] R. I. Lehrer and M. J. Cline. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to candida infection. *J Clin Invest*, 48(8):1478–1488, 1969.
- [93] R. I. Lehrer, J. Hanifin, and M. J. Cline. Defective bactericidal activity in myeloperoxidase-deficient human neutrophils. *Nature*, 223(5201):78–79, 1969.
- [94] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7(9):678–689, 2007.
- [95] Z. Li, H. Jiang, W. Xie, Z. Zhang, A. V. Smrcka, and D. Wu. Roles of plc-beta2 and -beta3 and pi3kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*, 287(5455):1046–1049, 2000.
- [96] P. Libby. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 91(11):2844–2850, 1995.
- [97] P. Libby. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917):868–874, 2002.
- [98] F. Lin, F. Baldessari, C. C. Gyenge, T. Sato, R. D. Chambers, J. G. Santiago, and E. C. Butcher. Lymphocyte electrotaxis in vitro and in vivo. *J Immunol*, 181(4):2465–2471, 2008.
- [99] M. R. Litt, R. W. Jeremy, H. F. Weisman, J. A. Winkelstein, and L. C. Becker. Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation*, 80(6):1816–1827, 1989.

- [100] P. Liu, K. Yin, R. Nagele, and P. Y. Wong. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxy-nitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 284(3):1139–1146, 1998.
- [101] X. L. Ma, D. J. Lefer, A. M. Lefer, and R. Rothlein. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 86(3):937–946, 1992.
- [102] Guido Majno and Isabelle Joris. *Cells, tissues, and disease : principles of general pathology*. Oxford Univ. Press, New York, NY [u.a.], 2. edition, 2004.
- [103] L. A. Marquez, H. B. Dunford, and H. Van Wart. Kinetic studies on the reaction of compound ii of myeloperoxidase with ascorbic acid. role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem*, 265(10):5666–5670, 1990.
- [104] R. A. Matthijssen, D. Huugen, N. T. Hoebbers, B. de Vries, C. J. Peutz-Kootstra, Y. Aratani, M. R. Daha, J. W. Tervaert, W. A. Buurman, and P. Heeringa. Myeloperoxidase is critically involved in the induction of organ damage after renal ischemia reperfusion. *Am J Pathol*, 171(6):1743–1752, 2007.
- [105] R. Medzhitov. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203):428–435, 2008.
- [106] M. C. Meuwese, E. S. Stroes, S. L. Hazen, J. N. van Miert, J. A. Kuivenhoven, R. G. Schaub, N. J. Wareham, R. Luben, J. J. Kastelein, K. T. Khaw, and S. M. Boekholdt. 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(2):159–165, 2007.
- [107] T. J. Mitchison and L. P. Cramer. Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 84(3):371–379, 1996.

- [108] A. Mocsai, E. Ligeti, C. A. Lowell, and G. Berton. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the src family kinases fgr and hck. *J Immunol*, 162(2):1120–1126, 1999.
- [109] C. Murdoch and A. Finn. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, 95(10):3032–3043, 2000.
- [110] T. Naruko, M. Ueda, K. Haze, A. C. van der Wal, C. M. van der Loos, A. Itoh, R. Komatsu, Y. Ikura, M. Ogami, Y. Shimada, S. Ehara, M. Yoshiyama, K. Takeuchi, J. Yoshikawa, and A. E. Becker. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*, 106(23):2894–2900, 2002.
- [111] S. J. Nicholls and S. L. Hazen. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(6):1102–1111, 2005.
- [112] D. W. Nitzan, W. Pruzanski, S. Saito, and N. Ranadive. Modulation of locomotor activity of polymorphonuclear cells by cationic substances and cationic lysosomal fractions from human neutrophils. *Inflammation*, 9(4):375–387, 1985.
- [113] C. D. Nobes and A. Hall. Rho gtpases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*, 144(6):1235–1244, 1999.
- [114] I. Olsson and P. Venge. The role of the human neutrophil in the inflammatory reaction. *Allergy*, 35(1):1–13, 1980.
- [115] M. F. Parry, R. K. Root, J. A. Metcalf, K. K. Delaney, L. S. Kaplow, and W. J. Richar. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med*, 95(3):293–301, 1981.
- [116] D. Q. Peng, G. Brubaker, Z. Wu, L. Zheng, B. Willard, M. Kinter, S. L. Hazen, and J. D. Smith. Apolipoprotein a-i tryptophan substitution leads to resistance to myeloperoxidase-mediated loss of function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(11):2063–2070, 2008.



- [117] J. S. Pober. Warner-lambert/parke-davis award lecture. cytokine-mediated activation of vascular endothelium. physiology and pathology. *Am J Pathol*, 133(3):426–433, 1988.
- [118] P. D. Ponath, J. Wang, and H. Heath. Transwell chemotaxis. *Methods Mol Biol*, 138:113–120, 2000.
- [119] S. Pou, W. S. Pou, D. S. Bredt, S. H. Snyder, and G. M. Rosen. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 267(34):24173–24176, 1992.
- [120] M. W. Radomski, R. M. Palmer, and S. Moncada. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2(8567):1057–1058, 1987.
- [121] J. E. Rice and L. P. Bignold. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes in whole blood in the 'sparse-pore' polycarbonate (nuclepore) membrane/boyden chamber assay. *J Immunol Methods*, 149(1):121–125, 1992.
- [122] A. W. Roberts, C. Kim, L. Zhen, J. B. Lowe, R. Kapur, B. Petryniak, A. Spaetti, J. D. Pollock, J. B. Borneo, G. B. Bradford, S. J. Atkinson, M. C. Dinauer, and D. A. Williams. Deficiency of the hematopoietic cell-specific rho family gtpase rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity*, 10(2):183–196, 1999.
- [123] K. L. Rock and H. Kono. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol*, 3:99–126, 2008.
- [124] J. L. Romson, B. G. Hook, S. L. Kunkel, G. D. Abrams, M. A. Schork, and B. R. Lucchesi. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, 67(5):1016–1023, 1983.
- [125] T. K. Rudolph, V. Rudolph, A. Witte, A. Klinke, K. Szoecs, D. Lau, T. Heitzer, T. Meinertz, and S. Baldus. Liberation of vessel adherent myeloperoxidase by enoxaparin improves endothelial function. *Int J Cardiol*, 2008.

- [126] V. Rudolph, T. K. Rudolph, J. C. Hennings, S. Blankenberg, R. Schnabel, D. Steven, M. Haddad, K. Knittel, S. Wende, J. Wenzel, T. Munzel, T. Heitzer, T. Meinertz, C. Hubner, and S. Baldus. Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic Biol Med*, 43(8):1189–1196, 2007.
- [127] T. M. Schaack, A. Takeuchi, I. Spilberg, and R. H. Persellin. Alteration of polymorphonuclear leukocyte surface charge by endogenous and exogenous chemotactic factors. *Inflammation*, 4(1):37–44, 1980.
- [128] J. Schymeinsky, C. Then, and B. Walzog. The non-receptor tyrosine kinase syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. *J Cell Physiol*, 204(2):614–622, 2005.
- [129] F. M. Sheridan, I. M. Dauber, I. F. McMurtry, E. J. Lesnefsky, and L. D. Horwitz. Role of leukocytes in coronary vascular endothelial injury due to ischemia and reperfusion. *Circ Res*, 69(6):1566–1574, 1991.
- [130] C. W. Smith, S. D. Marlin, R. Rothlein, C. Toman, and D. C. Anderson. Cooperative interactions of lfa-1 and mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest*, 83(6):2008–2017, 1989.
- [131] J. A. Smith. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol*, 56(6):672–686, 1994.
- [132] S. Sugiyama, K. Kugiyama, M. Aikawa, S. Nakamura, H. Ogawa, and P. Libby. 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*, 24(7):1309–1314, 2004.
- [133] S. Sugiyama, Y. Okada, G. K. Sukhova, R. Virmani, J. W. Heinecke, and P. Libby. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol*, 158(3):879–891, 2001.

- [134] T. Takenawa and H. Miki. Wasp and wave family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci*, 114(Pt 10):1801–1809, 2001.
- [135] K. L. Taylor, F. Strobel, K. T. Yue, P. Ram, J. Pohl, A. S. Woods, and Jr. Kinkade, J. M. Isolation and identification of a protoheme ix derivative released during autolytic cleavage of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*, 316(1):635–642, 1995.
- [136] Gerhard Thews, Ernst Mutschler, and Peter Vaupel. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen : 135 Tabellen*. Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart, 5., völlig neu bearb. und erw. aufl.. edition, 1999.
- [137] T. Trepels, A. M. Zeiher, and S. Fichtlscherer. The endothelium and inflammation. *Endothelium*, 13(6):423–429, 2006.
- [138] A. van der Vliet, J. P. Eiserich, B. Halliwell, and C. E. Cross. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. a potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem*, 272(12):7617–7625, 1997.
- [139] N. Vasilyev, T. Williams, M. L. Brennan, S. Unzek, X. Zhou, J. W. Heinecke, D. R. Spitz, E. J. Topol, S. L. Hazen, and M. S. Penn. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation*, 112(18):2812–2820, 2005.
- [140] R. Virmani, A. P. Burke, A. Farb, and F. D. Kolodgie. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis*, 44(5):349–356, 2002.
- [141] M. C. Vissers and C. Thomas. Hypochlorous acid disrupts the adhesive properties of subendothelial matrix. *Free Radic Biol Med*, 23(3):401–411, 1997.
- [142] J. A. Vita, M. L. Brennan, N. Gokce, S. A. Mann, M. Goormastic, M. H. Shishehbor, M. S. Penn, Jr. Keaney, J. F., and S. L. Hazen. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation*, 110(9):1134–1139, 2004.

- [143] C. Wang, H. Hayashi, R. Harrison, B. Chiu, J. R. Chan, H. L. Ostergaard, R. D. Inman, J. Jongstra, M. I. Cybulsky, and J. Jongstra-Bilen. Modulation of mac-1 (cd11b/cd18)-mediated adhesion by the leukocyte-specific protein 1 is key to its role in neutrophil polarization and chemotaxis. *J Immunol*, 169(1):415–423, 2002.
- [144] Y. Wang, W. R. Mathews, D. M. Guido, A. Farhood, and H. Jaeschke. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock*, 4(4):282–288, 1995.
- [145] A. S. Weyrich, X. Y. Ma, D. J. Lefer, K. H. Albertine, and A. M. Lefer. In vivo neutralization of p-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest*, 91(6):2620–2629, 1993.
- [146] J. N. Wilcox, R. R. Subramanian, C. L. Sundell, W. R. Tracey, J. S. Pollock, D. G. Harrison, and P. A. Marsden. Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(11):2479–2488, 1997.
- [147] T. Willeke, K. Scharffetter-Kochanek, P. Gaehtgens, and B. Walzog. A role for beta2 integrin (cd11/cd18)-mediated tyrosine signaling in extravasation of human polymorphonuclear neutrophils. *Biorheology*, 38(2-3):89–100, 2001.
- [148] V. Witko-Sarsat, P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*, 80(5):617–653, 2000.
- [149] J. Xu, F. Wang, A. Van Keymeulen, P. Herzmark, A. Straight, K. Kelly, Y. Takuwa, N. Sugimoto, T. Mitchison, and H. R. Bourne. Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils. *Cell*, 114(2):201–214, 2003.
- [150] M. Zederbauer, P. G. Furtmuller, B. Ganster, N. Moguilevsky, and C. Obinger. The vinyl-sulfonium bond in human myeloperoxidase: impact on compound i formation and reduction by halides and thiocyanate. *Biochem Biophys Res Commun*, 356(2):450–456, 2007.

- [151] C. Zhang, C. Reiter, J. P. Eiserich, B. Boersma, D. A. Parks, J. S. Beckman, S. Barnes, M. Kirk, S. Baldus, V. M. Darley-USmar, and C. R. White. L-arginine chlorination products inhibit endothelial nitric oxide production. *J Biol Chem*, 276(29):27159–27165, 2001.
- [152] R. Zhang, M. L. Brennan, X. Fu, R. J. Aviles, G. L. Pearce, M. S. Penn, E. J. Topol, D. L. Sprecher, and S. L. Hazen. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *Jama*, 286(17):2136–2142, 2001.
- [153] M. Zhao, B. Song, J. Pu, T. Wada, B. Reid, G. Tai, F. Wang, A. Guo, P. Walczysko, Y. Gu, T. Sasaki, A. Suzuki, J. V. Forrester, H. R. Bourne, P. N. Devreotes, C. D. McCaig, and J. M. Penninger. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-oh kinase-gamma and pten. *Nature*, 442(7101):457–460, 2006.
- [154] D. V. Zhelev and A. Alteraifi. Signaling in the motility responses of the human neutrophil. *Ann Biomed Eng*, 30(3):356–370, 2002.

# Appendices

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
BSA	Bovines Serumalbumin
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
fMLP	N-Formyl-Met-Leu-Phe
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
Hpf	<i>High-Power Field</i>
HSA	Humanes Serumalbumin
HUVEC	Humane Umbilikalvenen-Endothelzelle
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IR	Ischämie / Reperfusion
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-density Lipoprotein
LV	Linksventrikulär
MIP-2	<i>Macrophage-inflammatory-protein-2</i>
MPO	Myeloperoxidase
MSA	Murines Serumalbumin
mutMPO	mutante Myeloperoxidase
PAPA NONOat	Ammoniopropyl-n-propylamino-diazeniumdiolat
PECAM-1	Thrombozyten / Endothelzell-Adhäsionsmolekül-1
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TNF	Tumornekrosefaktor
U	<i>Units</i>
V.	Vena
VCAM	Vaskuläres Adhäsionsmolekül
ZNS	Zentrales Nervensystem

## R- und S-Sätze

Stoffname	Symbol	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC)	T	25-36/37/38	26-45
(-)-Blebbistatin	Xn	20/21/22- 36/37/38	26-36/37
Cathepsin-G	B		22-24/25
Cytochalasin D	T	25-63	36/37-45
4',6-Diamidino-2-phenylindol (Dapi)	Xi	36/37/38	26-36
Diethanolamin	Xn	22-38-41-48/22	26-36/37/39-46
N,N-Dimethylformamid	T	61-20/21-36	53-45
Essigsäure	C	10-35	23-26-45
Formaldehyd	T	23/24/25-34-40- 43	26-36/37/39-45
Histopaque-1077	Xn	42/43	23-36/37-45
Natriumazid	T+	46-26/27/28-32-5	45-36/37/39-22
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Xi	38	36/37
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Xi	36/37/38	26-36
Triton X-100	Xn, N	22-41-51/53	26-36/39-61



---

# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Name Anna Klinke  
Geboren 11.02.1980  
Geburtsort Paderborn

## Schule

1986 – 1990 Grundschule zu Wünnenberg  
1990 – 1999 Privates Mauritius-Gymnasium zu Büren  
06/1999 Abitur

## Studium

1999 – 2004 Westfälische Wilhelms-Universität zu Münster, Pharmazie  
08/2001 1. Staatsexamen  
10/2003 2. Staatsexamen  
11/2003 – 04/2004 Pharmazeutische Biologie und Phytochemie, WWU Münster  
05/2004 – 10/2004 Adler Apotheke, Heidelberg  
12/2004 3. Staatsexamen

## Approbation

01/2005 Münster

## Berufliche Tätigkeit

01/2005 – 03/2005 Aatal-Apotheke, Bad Wünnenberg

---

## Promotion

04/2005 – 05/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Cardiovascular Research Center, Universitäres Herzzentrum Hamburg, Anfertigung einer Dissertation: Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten

26. Mai 2009

---

## Publikationen

Diese Dissertation soll als folgende Originalarbeit veröffentlicht werden:

(eingereicht bei Nature Medicine 10/2008):

Klinke, A., Lau, D., Kubala, L., Benten, D., Friedrichs, K., Rudolph, V., Szocs, K., Rudolph, T.K., Sydow, K., Heeringa, P., Furtmüller, P.G., Meinertz, T., Baldus, S.

„Myeloperoxidase electrostatically directs neutrophils“.

Akzeptierte *Abstracts*:

– MPO directs Neutrophil Migration via CD11b/CD18 Integrins,

A. Klinke, D. Lau, L. Kubala, K. Szocs, S. Baldus; SFRBM's 14th Annual Meeting, November 2007, Washington DC.

– MPO directs Neutrophil Migration via binding to CD11b/CD18 Integrins, A. Klinke, D. Lau, K. Szocs, K. Sydow, T. Meinertz, S. Baldus; DGK 74. Jahrestagung, April 2008, Mannheim.

Eingeladener Vortrag:

Regulation of Neutrophil Motility by Myeloperoxidase, 6th International Human Peroxidase Meeting, April 2009, Chapel Hill, NC

---

## Versicherung an Eides statt

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten

am Universitären Herzzentrum Hamburg Eppendorf unter der Leitung von Herrn PD Dr. S. Baldus und der Betreuung von Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein aus dem Department Chemie, ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den 26.05.2009

Anna Klinke

---

## Danksagung

Bei Herrn PD Dr. S. Baldus bedanke ich mich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung, die Möglichkeit der internationalen wissenschaftlichen Kommunikation, das Vertrauen in meine Arbeit und die ständige Motivation.

Herrn Prof. Dr. H.-J. Duchstein danke ich herzlich für die fachliche Betreuung, die große Unterstützung und Hilfe auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene, für die Begutachtung meiner Arbeit, sowie für gesellige Stunden in seinem Arbeitskreis.

Großer Dank gilt meinen Kollegen und Freunden Eike von Leitner, Denise Lau, Kati Szoecs, Hartwig Wieboldt, Karsten Sydow, Daniel Benten und Birgit Hirsch-Hoffmann für wissenschaftlichen Austausch, viel Unterstützung und eine tolle gemeinsame Zeit.

Bei Dr. L. Kubala aus Brno in der Tschechischen Republik möchte ich mich bedanken für wertvolle wissenschaftliche Kooperation.

Prof. Dr. P. Heeringa aus Groningen in den Niederlanden danke ich für die freundliche Bereitstellung der murinen Myeloperoxidase und Prof. Dr. P.G. Furtmüller aus Wien in Österreich für die nette Bereitstellung mutanter Myeloperoxidase und für fachliche Hilfe diesbezüglich.

Herzlicher Dank gilt meinem Bruder Olaf Klinke für die mühevollen Einführung in LaTeX und die Hilfe bei Layout und Setzen und Liesbeth Haaks für ihre diesbezügliche Geduld.

Von Herzen danken möchte ich meinen Geschwistern Christina Schrick und Olaf Klinke und meinen Eltern Ulrich und Ilse Klinke für die uneingeschränkte Unterstützung jeglicher Art, viele wegweisende Diskussionen und dass sie immer für mich da waren und sind. Meinen Eltern danke ich ganz besonders dafür, dass sie mir auf allen Ebenen ermöglicht haben, den Weg zu gehen, den ich ging und gehe.

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Kai Friedrichs für viel fachlich wertvolle Hilfe, kritisches Lesen dieser Arbeit, produktive Diskussionen, immer währende uneingeschränkte Unterstützung und die Hilfe, nicht den klaren Blick für das Wesentliche der Wissenschaft und Menschlichkeit zu verlieren und für viel Humor.