UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum Hamburg Cardiovascular Research Center

Prof. Dr. Stefan Blankenberg

Charakterisierung der DLA-1-Maus in Bezug auf die Myeloperoxidase-Aktivität

Dissertation

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

vorgelegt von:

Aurélie Meßner-Schmitt aus Rheine

Hamburg 2015

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)
Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.02.2016
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. K. Sydow
Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. R. Bähring

Inhaltsverzeichnis

A	rbeitsl	hypot	these und Fragestellung	5
1.	Ein	leitu	ng	7
	1.1.	My	eloperoxidase	7
	1.1	.1.	Allgemeines	7
	1.1	.2.	Katalytische Aktivität	8
	1.1	.3.	Tyrosinnitrierung und -chlorinierung	. 10
	1.1	.4.	NO-Oxidation und NO-Bioverfügbarkeit	. 11
	1.1	.5.	Akkumulierung im subendothelialen Raum	. 11
	1.1	.6.	Extrakatalytische Eigenschaften von MPO	. 12
	1.2.	Neı	atrophile Granulozyten	. 13
	1.3.	Die	endotheliale Dysfunktion	. 15
	1.4.	Art	eriosklerose	. 17
	1.4	l.1.	Die Entstehung der Arteriosklerose	. 17
	1.5. Dysft		leutung von MPO für kardiovaskuläre Erkrankungen und für die endotheliale on	. 20
	1.6.	Die	DLA-1-Maus	. 21
	1.7.	Zie	le der Arbeit	. 23
2.	Ma	terial	und Methoden	. 24
	2.1.	Ma	terial	. 24
	2.1	.1.	Reagenzien und Arzneistoffe	. 24
	2.1	.2.	Puffer und Lösungen	. 24
	2.1	.3.	Reaktionskits	. 25
	2.1	.4.	Mauslinien	. 25
	2.1	.5.	Laborgeräte, Apparaturen, Software	. 25
	2.2.	Me	thoden	. 27
	2.2	2.1.	Isolation neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark	. 27
	2.2	2.2.	Isolation neutrophiler Granulozyten aus Vollblut	. 28
	2.2	2.3.	TMB-Assay zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität	. 28
	2.2	2.4.	Chlorinierungs-Assay zur Bestimmung der MPO-Aktivität	. 29
	2.2	2.5.	Messung der Konsumption von NO mittels NO-Elektrode	. 30
	2.2	2.6.	ELISA zur Bestimmung des MPO-Gehalts im Plasma und im Knochenmark.	.31

2.2.7.2.2.8.		2.2.7.	Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit von Aorten im Organbad	31	
		2.2.8.	Statistische Auswertung	33	
3.	Е	ergebnis	sse	34	
	3.1.	. Pero	oxidase-Aktivität von PMN aus Knochenmark und Blut	35	
	3.2	. Chle	orinierungs-Aktivität von PMN aus Knochenmark und Blut	36	
	3.3	. NO-	-Konsumption von PMN aus Knochenmark und Blut	37	
	3.4	. MP	O-Gehalt in PMN aus Knochenmark und Plasma	38	
	3.5	. Kon	ntraktions- und Relaxationsfähigkeit von Aorten im Organbad	39	
4.	D	iskussi	on	42	
	4.1	. Aus	blick	46	
5.	Z	usamm	enfassung	48	
6.	A	bkürzu	ngsverzeichnis	50	
7.	A	bbilduı	ngsverzeichnis	51	
8.	Tabellenverzeichnis				
9.	L	iteratur	verzeichnis	53	
1(). D	anksag	ung	59	
11	1. Lebenslauf6				
12	2. E	idesstat	ttliche Erklärung	61	

Arbeitshypothese und Fragestellung

Im Jahr 2013 verstarben in Deutschland laut dem *Statistischen Bundesamt* insgesamt 893 825 Menschen. Mit etwa 39,7 % gehörten Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen 2013 ^[88]. Aber nicht nur in Deutschland, sondern auch in anderen westlichen Industrieländern sind kardiovaskuläre Erkrankungen seit Jahren die führende Todesursache. Weltweit befasst sich die Forschung mit Nachdruck damit, mehr über Manifestation und Progression kardiovaskulärer Krankheiten heraus zu finden, um mögliche Therapien in diesem Bereich zu entwickeln.

Im weltweit gültigen medizinischen Diagnoseklassifikationssystem, dem *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* (ICD) herausgegeben von der Weltgesundheitsorganisation (WHO), sind diejenigen Krankheiten aufgelistet, die unter anderem als Herz-Kreislauferkrankungen bezeichnet werden. Dazu gehören beispielsweise die Hypertonie, die Ischämischen Herzkrankheiten und die Krankheiten der Arterien, Arteriolen und Kapillaren. All diesen Erkrankungen ist gemein, dass sie zu einem hohen Anteil mit dem Vorhandensein von Arteriosklerose einhergehen. In den Fokus aktueller Forschungen rücken dabei immer mehr jene arteriosklerotischen Mechanismen, die sich nicht nur auf die Struktur der Gefäße auswirken, sondern auch die im Rahmen von vaskulärinflammatorischen Prozessen das humorale Gleichgewicht der Gefäßwand beeinträchtigen.

Im Fokus dieser Arbeit steht das leukozytäre Enzym Myeloperoxidase (MPO). Es ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Allerdings besitzt es nicht nur hilfreiche bakterizide, sondern auch ausgeprägte pro-inflammatorische Eigenschaften und hat damit einen bedeutenden Einfluss auch auf das kardiovaskuläre System. In der Vergangenheit konnte MPO eine entscheidende Schlüsselrolle bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie zum Beispiel der Arteriosklerose nachgewiesen werden. Bei diesen Untersuchungen wurde das Enzym allerdings meist nur in seiner katalytisch-aktiven Form betrachtet. Jüngste Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Baldus gaben jedoch Anlass zu der Annahme, dass allein die Präsenz des Proteins, auch ohne katalytische Aktivität, während inflammatorischer Vorgänge an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt ist [52,60].

Um diesen Sachverhalt genauer zu betrachten, wurde im Auftrag der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Baldus des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf von der Firma "GenOway" eine transgene Maus, die DLA-1-Maus, hergestellt, die durch einen bestimmten Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum der Myeloperoxidase gekennzeichnet ist. Eben an dieser Position auf Chromosom 11 unterscheidet sich das Enzym von all den anderen säugetierspezifischen Peroxidasen und daher können die myeloperoxidase-spezifischen Eigenschaften speziell dort genauer untersucht werden.

Eine erstmalige Charakterisierung dieser transgenen DLA-1-Maus soll nun die Möglichkeit eröffnen, den Einfluss der katalytisch-inaktiven MPO in-vivo zu betrachten. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit ist es zu untersuchen, in wie weit tatsächlich Unterschiede in der Enzymaktivität und weiteren Eigenschaften der transgenen MPO im Vergleich mit Wildtyptieren (WT) und MPO-defizienten Tieren (MPO-/-) bestehen.

Im folgenden Kapitel soll nun ausführlich auf die Myeloperoxidase eingegangen werden. Sie ist nicht nur ein Schlüsselenzym bei der Genese und Progression der Arteriosklerose, sondern trägt auch entscheidend zur endothelialen Dysfunktion bei. Diese wiederum gilt als ein wichtiger Initiator bei der Entstehung zahlreicher kardiovaskulärer Erkrankungen, wie der Arteriosklerose. Danach folgt ein Überblick über polymorphkernige neutrophile Granulozyten, welche die hauptsächlichen MPO-exprimierenden Zellen darstellen und gemeinsam mit MPO eine wichtige Rolle bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion spielen. Die Arteriosklerose gilt zum Beispiel als Ausgangserkrankung für die koronare Herzkrankheit (KHK), die Linksherzinsuffizienz [97] oder auch das Vorhofflimmern [38] und ist somit von besonderer Bedeutung. Ihr Grundverständnis ist die Basis kardiovaskulärer Erkrankungen und auch der kardiovaskulären Forschung, denn trotz aller Fortschritte, die die moderne Medizin bis heute gemacht hat, hat sich die Zahl der jährlichen Herz-Kreislauf-Todesfälle kaum reduziert. Anschließend soll die Besonderheit der transgenen DLA-1-Mäuse vorgestellt und die Ziele dieser Dissertation erläutert werden.

1.1. Myeloperoxidase

1.1.1. Allgemeines

Die Myeloperoxidase ist ein Enzym in neutrophilen Granulozyten, das bei der Regulation von Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle spielt. Myeloperoxidase ist ein 150 Kilodalton (kDa) schweres, homodimeres Hämprotein, dessen Monomere jeweils eine schwere und eine leichte Untereinheit besitzen (Abb. 1). Die Peroxidase-Eigenschaft erhält das Protein durch ein an die schwere Kette kovalent gebundenes Häm-Molekül, das zusätzlich dem Enzym auch eine intensiv grüne Farbe verleiht ^[59]. In der Sekundärstruktur besitzt es auch eine kovalente Sulfonium-Bindung zwischen dem Schwefelatom des Methionin²⁴³ und dem terminalen Kohlenstoff der Vinylgruppe des Pyrrolrings A vor. Hierdurch erfährt das Enzym eine besondere Eigenschaft, die es von den anderen familiären Peroxidasen unterscheidet ^[29, 91]. Es hat hierdurch unter anderem die Fähigkeit Chlorid zur hypochlorigen Säure (HOCl) zu oxidieren, dem wiederum bei der Immunabwehr eine bedeutende Rolle zukommt.

Bei einem physiologischem pH-Wert ist MPO stark kationisch und obwohl das pH-Optimum bei 5,5 liegt, ist das Protein über ein weites pH-Spektrum aktiv bzw. reaktiv [22].

Gespeichert wird das Enyzm hauptsächlich in den primären bzw. azurophilen Granula der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN). Des Weiteren ist MPO zu einem geringen Anteil noch in Monozyten und gewebespezifischen Makrophagen wie Mikroglia und den Pyramidenzellen im Zentralnervensystem und den Kupffer'schen-Sternzellen in der Leber lokalisiert [15, 21, 51].

Die Synthese der MPO findet während der Granulozytenreifung im Knochenmark statt und ist vollendet, bevor die Zellen in die periphere Blutbahn entlassen werden ^[26].

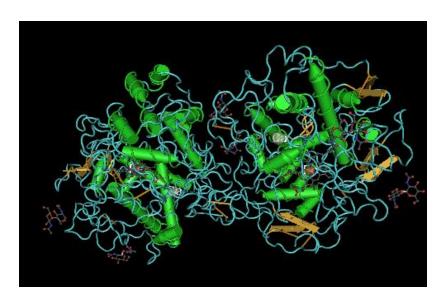


Abbildung 1: Die dreidimensionale Struktur der homodimeren Myeloperoxidase mit hervorgehobenen Hämmolekülen (rot), Alpha-Helices (grün) und Beta-Faltblatt-Strukturen (gelb). Aus Lau, D. et al., Pharm Ther 2006.

1.1.2. Katalytische Aktivität

Zur Katalyse enzymatischer Reaktionen und damit zur Pathogenabwehr benötigt man ein so genanntes MPO-System. Dies besteht aus dem Enzym Myeloperoxidase selbst, Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als Substrat und weiterer oxidierbarer Kosubstrate. H₂O₂ entsteht im aktivierten Granulozyten durch eine Dismutation von Superoxid, welches u.a. das Produkt der NADPH-Oxidase ist ^[17].

Bei der Betrachtung der Ausgangsform des MPO-Systems liegt das Eisen im Häm-Zentrum der nativen MPO als Eisen(III)-Ion vor, das bei Anwesenheit von H₂O₂ oxidiert wird (Abb. 2). Bei dieser Reaktion wird MPO in MPO-Compound I überführt ^[28]. Das MPO-Compound I kann dann weiter als Ausgangsform für eine 2e⁻-Oxidation für Halogenide wie z.B. Chlorid (Cl⁻) dienen. Bei dieser Reaktion entsteht auf direktem Weg als Produkt wieder natives MPO. Da Chlorid in-vivo die höchste Konzentration im Vergleich zu den übrigen Halogeniden hat,

stellt es den wichtigsten Reaktionspartner dar ^[39, 106]. Chlorid kann weiter zur hypochlorigen Säure (HOCl) oxidiert werden. HOCl ist ein agressives Oxidans und wirkt sowohl toxisch auf fremde Mikroorganismen, als auch auf körpereigene Strukturen ^[41, 43].

Eine Alternativreaktion von Compound I zurück zu nativem MPO findet über die Zwischenstufe MPO-Compound II statt (Abb. 2). Dies geschieht durch zwei 1e⁻-Oxidationen mit physiologischen Subtraten wie z.B. aromatischen Aminosäuren. Durch Wasserstoffabstraktion entstehen hier Radikalintermediate (R⁻) [49].

Alternativ dienen auch Ascorbat oder Tyrosin als Reduktionsmittel für das MPO-Compound II-System ^[26]. Insbesondere Tyrosin ist von großem Interesse, da es als Tyrosinradikal zum MPO-vermittelten Verbrauch von Stickstoffmonoxid (NO) beiträgt. Zu einem geringen Teil kann NO selbst direkt mit MPO reagieren und zu Nitrit (NO₂⁻) oxidiert werden ^[1, 26].

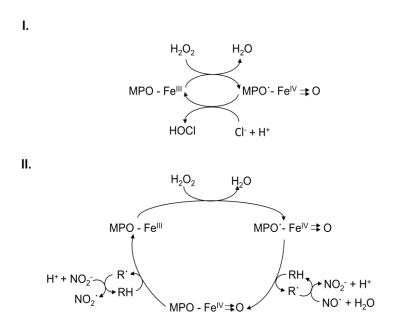


Abbildung 2: MPO-katalysierte Reaktionen 1. I. MPO reduziert H₂O₂ und wird zu Compound I (MPO-FeIV) oxidiert. Durch Oxidation von Cl- zu HOCl wird Compound I wieder zu nativem MPO (MPO-FeIII) reduziert. II. Alternativ zu I. geschieht eine Reduktion des Compound I zu nativem MPO in zwei Schritten mittels zwei 1-e⁻Reaktionen mit oxidierbaren physiologischen Substraten (RH) über Compound II (MPO-Fe^{IV}), wobei durch Wasserstoffabstraktion Radikalintermediate (R') entstehen. Diese können mit NO' und NO₂ reagieren, wobei NO₂ und NO'₂ entstehen. (mod. nach Klinke, A.: Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten (2009)).

1.1.3. Tyrosinnitrierung und -chlorinierung

Wie oben geschrieben kann die Aminosäure Tyrosin als Reduktionsmittel für das Compound II-System dienen. Das hier entstehende Tyrosin-Radikal kann nun NO_2^- zu Stickstoffdioxid $(NO_2\bullet)$ oxidieren. In Anwesenheit von H_2O_2 kann aber auch NO_2^- direkt zu $NO_2\bullet$ oxidiert werden $^{[1,27]}$ (Abb. 3).

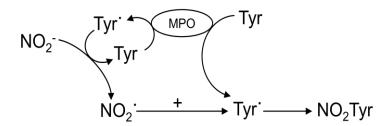


Abbildung 3: MPO-katalysierte Reaktion 2. Die Oxidation von Tyrosin (Tyr) zum Tyrosin-Radikal ist eine mögliche 1-e⁻-Reaktion, die oxidiertes MPO - Compound I über Compound II zurück zu nativem MPO reduzieren kann. Bei der Reaktion von NO 2 mit dem Tyrosin-Radikal entsteht Nitrotyrosin (NO2Tyr). (mod. nach Klinke, A.: Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten (2009)).

NO₂• ist ein instabiles Radikal, das unter anderem zur Lipidoxidation und zur Nitrierung von Proteinen führt [48]. Die Tyrosinnitrierung ist ein Beispiel für eine solche Nitrierung von Proteinen. Das instabile NO2• reagiert also mit einem weiteren Tyrosinradikal, wobei als Produkt der Reaktion Nitrotyrosin (NO₂Tyr) hervorgeht. Die Generierung von NO₂Tyr in entzündetem Gewebe steht demnach im Zusammenhang mit der katalytischen Aktivität von MPO [45, 57, 94]. Der Nachweis von Nitrotyrosin und MPO in koronararteriellen Plagues und auch in Biopsien lungentransplantierter Patienten bestätigt die Annahme, dass NO2Tyr als ein Marker für NO•-assoziierten oxidativen Stress anzusehen ist Diese Proteinmodifikationen gelten aber nicht nur als Marker inflammatorischer Prozesse [27], sondern bewirken auch eine Veränderung der biologischen Eigenschaft der Proteine, die letztendlich zur Beeinträchtigung der natürlichen Funktion des Endothels beitragen können [96]

Wie bereits erwähnt, benutzt das MPO-Compound I unter anderem auch Chlorid um wieder zu nativen, reaktionsbereitem MPO zu werden. Hierbei entsteht aus dem Chlorid HOCl. Aus HOCl können weitere ebenfalls reaktive Oxidantien hervorgehen, wie zum Beispiel molekulares Chlor ^[7, 85]. Dieses kann wiederum zur Mono- und Dichlorierung von Phenolresten, insbesondere von Tyrosin führen, so dass 3-Chloro- und 3,5-Dichlorotyrosin als spezifische Marker der MPO-Aktivität herangezogen werden können ^[24].

1.1.4. NO-Oxidation und NO-Bioverfügbarkeit

Stickstoffmonoxid (NO) wird unter Verbrauch von NADPH von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff produziert. NO gilt mit als stärkster Vasodilatator neben z.B. Histamin. Eine weitere wichtige Eigenschaft ist der antiinflammatorische Effekt des NO [67]. Eine verminderte Synthese oder ein erhöhter Verbrauch von NO stört maßgeblich die Gefäßfunktion und trägt somit entscheidend zur endothelialen Dysfunktion bei, welche maßgebend für die Entstehung der Arteriosklerose ist. Das Enzym Myeloperoxidase greift, wie oben geschildert, an verschiedenen Stellen in den NO-Stoffwechsel ein und reduziert durch dessen Oxidation die Bioverfügbarkeit im Organismus. Im Tiermodell konnte diese wichtige Eigenschaft ex-vivo gezeigt werden [26]. Bei in-vivo-Studien [82] als auch bei Patienten nach myokardialer Ischämie und Reperfusion zeigte sich die reduzierte Bioverfügbarkeit von NO durch eine verminderte vaskuläre Relaxationsfähigkeit bzw. veränderte Hämodynamik [10].

Die hypochlorige Säure, die aus der Reaktion von MPO-Compound I und Chlorid hervorgeht, kann aber auch schon vorher mit Stickstoffatomen der NO-Ausgangsaminosäure Arginin reagieren. Hier entstehen dann chlorinierte Argininspezies, die die NO-Synthase inhibieren und somit die Generierung und damit die Bioverfügbarkeit von NO weiter reduzieren ^[98]. Bei einer Untersuchung der endothelialen Relaxation von Rattenaorten konnte dieser Effekt nachgewiesen werden. Die Relaxation der Aortenringe war aufgrund der verminderten Bioverfügbarkeit bzw. Generierung von NO deutlich verschlechtert ^[101].

1.1.5. Akkumulierung im subendothelialen Raum

Eine besondere Relevanz erhalten die oben geschilderten Reaktionen von MPO mit NO erst aufgrund der Akkumulation von MPO im subendothelialen Raum, den NO nach Produktion in der Endothelzelle auf dem Weg in die Gefäßmedia passieren muss. Die stark positiv geladene MPO bindet nach Sekretion durch die neutrophilen Granulozyten an die negativ geladenen Heparansulfat-Glykosaminoglykane der Endotheloberfläche ^[8]. MPO verbleibt demnach auch nach Transzytose im subendothelialen Raum und akkumuliert nahe dem extrazellulär vorkommenden Matrixprotein Fibronektin, bleibt katalytisch aktiv und kann somit überhaupt einen langen Zeitraum reaktiv sein ^[8].

1.1.6. Extrakatalytische Eigenschaften von MPO

MPO verfügt neben diesen vor allem katalytisch-abhängigen Reaktionen auch über sogenannte extrakatalytische Eigenschaften, die unabhängig von der katalytischen Aktivität sind, indem sie alleine von der Anwesenheit des Enzyms gesteuert werden.

So konnte jüngst gezeigt werden, dass MPO einen direkten Einfluss auf die Rekrutierung von PMN hat ^[52]. Der Mechanismus dahinter ist eine elektrostatische Interaktion zwischen der kationisch-geladenen MPO und der anionisch-geladenen Glykokalyx der PMN. Dieser Effekt wirkt allein durch MPO ^[52]. Eine weitere extrakatalytische Eigenschaft des Enzyms ist, dass MPO katalytisch-unabhängig PMN auch aktivieren kann. Dies geschieht über die Bindung an das Integrin CD11b/CD18 an der Oberfläche von PMN ^[47, 59, 60]. Integrine sind Transmembranproteine ^[2]. Sie bilden essentielle Verbindungen zwischen zwei Zellen, oder, zwischen einer Zelle und der Extrazellulärmatrix aus. Über diese Rezeptorbindung zwischen MPO und PMN wird zum Beispiel eine Aktivierung intrazellulärer Proteintyrosin-Kinasen, eine vermehrte Expression der CD11b-Integrine und eine verstärkte Degranulation bewirkt ^[60]

1.2. Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten zeichnen sich unter anderem durch starke proinflammatorische Eigenschaften aus. Dies ist von besonderem Interesse für die Forschung im Bereich vaskulärinflammatorischer Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems.

Neutrophile Granulozyten gehören zur Familie der Leukozyten, die eine entscheidende Aufgabe in der Abwehr von Krankheitserregern und körperfremden Strukturen übernehmen. Leukozyten gehören zum Teil zur angeborenen (unspezifischen), aber auch zur erworbenen (spezifischen) Immunabwehr und werden weiter in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten unterteilt.

Die Bezeichnung Granulozyt geht auf deutlich anfärbbare Sekretvesikel (Granula) im Zellplasma zurück. Granulozyten werden aufgrund der Morphologie und Anfärbbarkeit dieser Granula weiter in basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten eingeteilt. Die neutrophilen Granulozyten machen einen Gesamtanteil von 50-60% der Leukozyten aus und besitzen einen segmentförmigen Kern, weshalb sie auch als polymorphkernige neutrophile Granulozyten bezeichnet werden. PMN stellen eine der wichtigsten und umfangreichsten zellulären Komponenten der angeborenen Immunabwehr dar.

Müssen Geweberegionen von pathogenen Keimen oder Gewebetrümmern befreit werden, werden PMN mit als erste Immunzellen rekrutiert [87]. Um die entsprechenden Noxen gerichtete eliminieren zu können. werden **PMN** durch Chemotaxine wie Komplementfaktoren, Leukotriene und Chemokine wie IL-8 zum Verlassen der Blutbahn und auch zur Aktivierung stimuliert [42, 99]. Die Fähigkeit der schnellen und gerichteten Fortbewegung bis zum Zielgewebe hin wird Migration genannt und unterliegt komplexen Signalkaskaden. Ebenfalls führen Scherstress oder die Adhäsion an bestimmte Rezeptoren wie z.B. Fibronektin zu einer Aktivierung der PMN. Im Zielgewebe bekämpfen die neutrophilen Granulozyten die Noxen mittels Phagozytose oder Sekretion (Degranulation) mikrobizider Bestandteile. Der Granulozyt lagert sich im Zielgewebe dem zu eliminierenden Keim an und bildet dann Pseudopodien aus, mit denen er den Mikroorganismus umschlingt. Die so gebildeten Phagosomen verschmelzen im Inneren der Zelle mit den enzymhaltigen Granula und die intrazelluläre Verdauung beginnt.

PMN gehen mit einem oxidativen und einem nicht-oxidativen System vor, um Pathogene oder Fremdpartikel zu eliminieren ^[32, 37].

Das oxidative System katalysiert eine Reaktion, die zum Ziel hat, reaktive Sauerstoffspezies herzustellen und freizusetzen (oxidativer Burst). Unter membranärer Rekrutierung und Aktivierung der NADPH-Oxidase wird molekularer Sauerstoff zum Superoxidradikalanion (O_2^-) reduziert. Dieses hochreaktive Superoxidanion ist dabei selbst das Ausgangsprodukt für die Synthese neuer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Beispielsweise entsteht durch eine, von der Superoxid-Dismutase katalysierte, Disproportionierung das deutlich stabilere Wasserstoffperoxid. Das granulozytär vorkommende Enzym Myeloperoxidase benutzt dieses Wasserstoffperoxid zum Beispiel zur Herstellung der zytotoxischen hypochlorigen Säure, mit deren Hilfe Fremdpartikel beseitigt werden können. Weitere ROS entstehen zum Beispiel bei der Atmungskette in Mitochondrien oder durch eine Entkopplung der NO-Synthase [17].

Das nicht-oxidative System setzt sich unter anderem aus den in den spezifischen oder auch als sekundär bezeichneten Granula vorkommenden Enzymen wie Lysozym, Elastase und Cathepsin G zusammen. Die primären bzw. azurophilen Granula gehören ebenfalls zum nicht-oxidativen System der PMN. Diese Granula enthalten, neben Bestandteilen wie antimikrobiellen Enzymen und sauren Hydrolasen, auch Substanzen wie Laktoferrin, Defensine und Myeloperoxidase. Alle mikrobiziden Peptide und Proteasen werden im Granulozyten in unterschiedlichen Granula gespeichert [99] und dienen schließlich der Eliminierung körperfremder Bestandteile.

Bei der Phagozytose kommt es auch stets zur Sezernierung zytotoxischer Bestandteile in den Extrazellularraum, wobei diese dort freigesetzt wiederum Schäden an körpereigenen Strukturen erzeugen können [71, 87].

Wegen dieser unspezifischen Produktion und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in den extrazellulären Raum stehen aktivierte neutrophile Granulozyten nicht nur aufgrund ihrer Rolle in der Immunabwehr, sondern auch wegen ihrer proinflammatorischen Eigenschaften im Fokus der Forschung für das Verständnis der Pathophysiologie zahlreicher vaskulärer Erkrankungen.

Die Bedeutung von MPO in der Abwehr von Mikroorganismen und körperfremden Strukturen ist seit langem bekannt. Klinisch interessant ist dennoch die Untersuchung, dass Patienten mit partiellem oder totalem MPO-Mangel jedoch keine höhere Infektanfälligkeit haben ^[58].

Die Kenntnis über Aufbau, Funktion und einzelne Mechanismen der neutrophilen Granulozyten und ihres Enzyms Myeloperoxidase, ist die Grundlage für das Verständnis, wie es vor allem durch Inflammation ^[92] zur endothelialen Dysfunktion kommt. Im Folgenden soll nun die endotheliale Dysfunktion genauer beschrieben werden und ihre Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose erläutert werden.

1.3. Die endotheliale Dysfunktion

Die Beeinträchtigung der strukturellen und funktionellen Integrität des Gefäßendothels wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Sie ist ein wesentlicher Initiator der Arteriosklerose [92] und ist unter anderem durch eine verminderte vasodilatatorische Kapazität in Folge einer verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid gekennzeichnet [18]. Als zentrale Ursache dieser Beeinträchtigung des Endothels werden die wie oben erläuterten inflammatorischen Prozesse aufgeführt. Jede Störung der vaskulären Homöostase kann dazu führen, dass Endothelzellen vermehrt Leukozytenadhäsionsmoleküle produzieren und diese an ihrer Zelloberfläche präsentieren. Die gesteigerte Expression dann der Leukozytenadhäsionsmoleküle VCAM-1 [19], ICAM-1 [70], E- und P-Selektine [25] bedingen die Leukozytenmigration in die Gefäßwand. Eine vermehrte Ansammlung von Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten in den Gefäßwänden konnte insbesondere bei der Untersuchung von KHK-Patienten nachgewiesen werden [16].

Ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung der Arteriosklerose bleibt aber die Verminderung der Bioverfügbarkeit des Signalmoleküls Stickstoffmonoxid. Es wird hauptsächlich von der, in den Endothelzellen vorkommenden, endothelialen NO-Synthase gebildet. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin, wobei NO entsteht [66]. NO diffundiert aber nicht nur in das Gefäßlumen, um dort als Reaktionspartner zur Verfügung zu stehen, sondern diffundiert auch in die Gefäßwände. In der Media aktiviert es dann die lösliche Guanylatzyklase (sGC) in den glatten Muskelzellen. Die sGC katalysiert eine Reaktion bei der das Signalmolekül Guanosinmonophosphat (cGMP) entsteht, welches eine Relaxation der glatten Muskelzellen indiziert. NO trägt demnach entscheidend zum Gefäßtonus bei, indem es vasodilatierend wirkt. Ein Ungleichgewicht in der Bioverfügbarkeit von NO, sei es in der eigenen Produktion oder in der Verfügbarkeit ihrer Signalmoleküle, kann entscheidend zur Manifestation der endothelialen

Dysfunktion beitragen ^[33, 72]. Stickstoffmonoxid reguliert aber nicht nur den Gefäßtonus, sondern hat auch ausgeprägte antiinflammatorische und antithrombotische Eigenschaften ^[67]. NO verhindert zum einen die Leukozytenadhäsion an das Endothel und zum anderen auch die Migration der Leukozyten in die Gefäßwand ^[56] durch eine verminderte Expression spezifischer chemotaktisch wirkender Zytokine ^[105] und Adhäsionsmoleküle ^[65]. NO kann aber auch antithrombotisch wirken. Die Thrombozytenaktivität reguliert NO, indem es deren Adhäsion und Aggregation am Endothel hemmt ^[23, 73].

Jegliche Schädigung der strukturellen und funktionellen Integrität des Endothels führt letztlich zur endothelialen Dysfunktion. Sie induziert eine Entzündungsreaktion, die, wenn sie von Dauer ist, zu einer Störung der homöostatischen Eigenschaften des Endothels führen kann ^[76]. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie das Rauchen, Hypercholesterinämie oder arterieller Hypertonus führen nachgewiesen zu eben dieser endothelialen Dysfunktion ^[18, 102, 104]. Durch sie kommt es über verschiedenste Mechanismen zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen ^[17]. Eines dieser Sauerstoffradikale ist zum Beispiel das bereits erwähnte Superoxid. Superoxid wird unter anderem im PMN produziert, kann NO oxidieren und generiert dann toxische Oxidantien wie zum Beispiel Peroxinitrit ^[17]. Hier wird also nicht nur die Bioverfügbarkeit von NO reduziert, sondern auch gleichzeitig die Produktion von Stoffen vorangetrieben, die die Gefäßwände strukturell und funktionell beeinträchtigen können. Und diese Beeinträchtigung verschiedenster Ursachen bedingt in hohem Maße die Entstehung der Arteriosklerose, welche klinisch von enormer Bedeutung ist.

1.4. Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist gekennzeichnet durch eine chronisch fortschreitende Degeneration der Gefäße mit progressiven Veränderungen der Gefäßwand mit der Entstehung sogenannter arteriosklerotischer Plaques ^[63]. Als Risikofaktoren, die die Entstehung der Arteriosklerose begünstigen, gelten vor allem arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Übergewicht, Nikotinabusus und Hypercholesterinämie, aber auch nicht beeinflussbare Faktoren wie das Alter, das männliche Geschlecht und die genetische Prädisposition ^[4, 6, 35, 55].

1.4.1. Die Entstehung der Arteriosklerose

Die Pathogenese der Arteriosklerose bzw. die Entwicklung arteriosklerotischer Plaques ist ein komplexer und noch nicht vollständig aufgeklärter Vorgang. Es ist aber bekannt, dass arteriosklerotische Veränderungen eine irreversible Gefäßschädigung bis hin zum vollständigen Gefäßverschluss mit letalem Verlauf nach sich ziehen können [64]. Zum teilweisen Verständnis der Arteriogenese dienen im Wesentlichen zwei Arbeiten, die "Response-to-injury"-Hypothese nach Russel Ross [76] und die "Lipoprotein induced atherosclerosis"-Hypothese nach Leonard Joseph Goldstein [36]. Hier konnte gezeigt werden, dass die Progression der Arteriosklerose nicht nur durch Modifikation von LDL (Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin) in arteriosklerotischen Plaques entsteht, sondern auch, dass die Gefäßschädigung durch Entzündungsreaktionen eine bedeutende Rolle spielt. Die Arteriosklerose ist demnach nicht mehr nur eine reine Cholesterinspeicherkrankheit, da die Forschung der letzten Jahrzehnte zeigen konnte, dass auch Inflammation als zentraler Bestandteil ihrer Pathogenese anzusehen ist und das Zusammenspiel vieler Risikofaktoren die Erkrankung begünstigt [64].

Durch die oben genannten Risikofaktoren kann es zu Mikroverletzungen des Endothels kommen. Adipositas ist auch zum Beispiel eine dieser Risikofaktoren, da hier unter anderem proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden, die das Endothel schädigen können ^[6]. Auch durch lokale mechanische Einwirkungen, wie schwankende Scherkräfte und Wirbelbildung ^[20, 34, 68], kommt es zu einer Druckschädigung des Endothels bzw. der dem Gefäßlumen zugewandten Gefäßschicht, der Intima. Weitere Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie oder arterielle Hypertonie begünstigen ebenfalls mögliche Verwirbelungen des Blutes. Für die vaskuläre Homöostase ist ein intaktes Endothel aber von entscheidender Bedeutung. Kommt es nun zu einer Endothelschädigung werden eine Reihe von gefäßverändernden Prozessen kaskadenartig aktiviert.

Es kommt unter anderem zur Einwanderung von LDL-Partikeln in die Intima. Hier wird das LDL-Cholesterin durch reaktive Spezies, die von den aufgrund der Gefäßschädigung bereits eingewanderten und aktivierten Makrophagen generiert werden, zu oxidiertem LDL modifiziert ^[69]. Die weitere Aufnahme von oxidiertem LDL in die Makrophagen führt zu deren Akkumulation und Bildung von sogenannten Xanthomzellen bzw. Schaumzellen in der Intima ^[46,50]. Aufgrund ihrer histologischen Erscheinung werden diese Schaumzellen als "fatty-streaks" bezeichnet. Die Ingestion von LDL und Cholesterin in den Schaumzellen führt schließlich aber zu mitochondrialer Dysfunktion, Apoptose und Nekrose ^[90]. Es kommt zu einer Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und zellulären Proteasen. Die Folge ist die Einwanderung von weiteren Makrophagen und T-Lymphozyten in das schon geschädigte Endothel. Die zunehmende Rekrutierung und Anreicherung von Makrophagen führt zum Beginn einer zunehmend stenosierenden Plaquesbildung im arteriellen Gefäß ^[62].

Der Plaque ist jetzt durch einen nekrotischen Kern und akkumulierende Makrophagen charakterisiert. Der Kern besteht aus nekrotischen Zelltrümmern, Lipiden und Leukozyten. Aktivierte Makrophagen sezernieren unter anderem den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sowie Interleukine (IL). Eine gesteigerte Aktivität von TNF- α , Interleukin-1 und bestimmten Wachstumsfaktoren bedingen eine Plättchenadhäsivität im Bereich der Läsion [62].

Jede Verletzung des Endothels führt auch zu einer Freilegung subendothelialer Strukturen. Der von Endothelzellen sezernierte von Willebrand-Faktor (vWF), fördert die Anheftung der im Blut zirkulierenden Thrombozyten an die subendothelial gelegenen Kollagenfasern der geschädigten Gefäßwand [79]. Im Bereich der Läsion kommt es nun zu einer Zunahme der Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Thrombozyten besitzen einen membrangelegenen Rezeptor (GPIb), der über den vWF an das Endothel bindet. Im weiteren Verlauf dieser Atherombildung schütten die aggregierten Thrombozyten weitere Zytokine, Wachstumsfaktoren und Thrombin aus. Es kommt zur Formänderung der Thrombozyten und zur Ausbildung einer fibrösen Kappe, die die Plaques stabilisieren [79]. Weiter wird die Einwanderung weiterer Monozyten und glatter Muskelzellen gefördert^[14, 78]. Intra- und extrazelluläre Signalkaskaden begünstigen die Proliferation der aus der Media in die Intima eingewanderten Muskelzellen. Thrombozyten sind weiter in der Lage das Gewebshormon Thromboxan-A2 (TXA₂) zu bilden. Dieses geschieht im aktivierten Thrombozyten durch freie Arachidonsäure. TXA2 wirkt vasokonstriktiv und fördert die weitere Plättchenaggregation.

Die Folge all dieser Mechanismen ist eine Verdickung der Gefäßwand und eine Minimierung des Gefäßdurchmessers durch den arteriosklerotischen Plaque.

In diesem mittlerweile chronischen Stadium der Arteriosklerose können nun aktivierte proteolytische Enzyme zur Zerstörung der stabilisierenden Kappe führen. Zu diesen proteolytischen Enzymen gehören beispielsweise die unter anderem von Schaumzellen produzierten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Sie werden initial als inaktive Proenzym-Vorstufen synthetisiert und anschließend durch posttranslationale Modifikation in ihren aktivierten Zustand überführt ^[74]. Bei der Untersuchung von menschlichen Atheromen fiel ein gesteigerter Abbau von Matrixstuktur auf, der als mögliche Konsequenz der Aktivierung und Freisetzung dieser MMPs zu deuten ist [31]. Weiterhin konnte man in den arteriosklerotischen Plaques von Patienten mit Myokardinfarkt einen gesteigerten Umsatz von TNF-α und neutralen Proteasen finden. Schaumzellen können zusätzlich auch von Zytokinen, wie Interferon-y oder bestimmten Interleukinen aktiviert werden und damit zur Proliferation von MMPs angeregt werden [93]. Die Expression von MMPs kann aber durch High-Density Lipoproteine (HDL) gemindert werden, wohingegen oxidiertes LDL die Expression eher verstärkt [100]. Dieser gesteigerte Abbau der Matrixstruktur der arteriosklerotischen Plaques bzw. ihrer fibrösen Kappen durch proteolytische Enzyme trägt letztendlich zur Generierung von Thromben bei [62].

Jegliche Instabilität bzw. Ruptur des Atheroms fördert die Thrombenbildungen, die dann zu kardiovaskulären Ereignissen, wie Schlaganfällen, Herzinfarkten und Embolien führen können. Diese möglichen akuten Gefäßverschlüsse zeigen den, unter Umständen tödlichen, Verlauf der Arteriosklerose.

Die Entstehung der Arteriosklerose kann zusammenfassend aus heutiger Sicht nicht mehr nur als eine Lipidspeicherkrankheit angesehen werden, vielmehr muss sie jetzt als ein sehr komplexes Zusammenspiel chronischer Entzündungsreaktionen in den Gefäßen verstanden werden, bei der die anfangs genannten Risikofaktoren eine bedeutende Rolle spielen [64, 77].

1.5. Bedeutung von MPO für kardiovaskuläre Erkrankungen und für die endotheliale Dysfunktion

MPO spielt pathophysiologisch eine wichtige Rolle in allen Stadien der Arteriosklerose-Entstehung und wirkt über zahlreiche Mechanismen:

Die aus der MPO-Katalyse hervorgehende hypochlorige Säure oxidiert die low-density Lipoproteine und high-density Lipoproteine [61]. Das stark proarteriosklerotische LDL wird in seiner oxidierten Form bevorzugt von Makrophagen aufgenommen und begünstigt deren Differenzierung zu Schaumzellen [40]. Zusätzlich mindert HOCl die antiarteriosklerotische Wirkung von HDL durch Bindung an das Apolipoprotein A-1 und Blockierung des ABCA1abhängigen reversen Cholesterintransportes [13, 86]. HDL verliert somit seine protektive antiinflammatorische Eigenschaft. Im arteriosklerotischen Plaque führt HOCl durch Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen und Initiierung der Apoptose von eigentlich stabilisierenden Endothelzellen zur Destabilisierung und schließlich zur Ruptur des Atheroms [89]. Katalytisch aktives MPO konnte in arteriosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden, was die Annahme bekräftigt, dass es eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit spielt [21]. Die durch MPO initiierte Oxidation von NO [1] und die durch die Tyrosinnitrierung in ihrer Eigenschaft veränderten Proteine [7], fördern letztendlich die endotheliale Dysfunktion durch eine Beeinträchtigung der natürlichen Funktion des Endothels [26, 82]. Ein weiterer proarteriosklerotischer Mechanismus der MPO ist auch ihr Einfluss auf die Blutplättchenadhäsion und die daraus resultierende Beteiligung an einer Thrombusbildung ^[75].

Die von MPO katalysierten reaktiven Sauerstoffspezies, wie Superoxid oder Peroxinitrit, tragen ebenfalls zur Gewebsverletzung bei und führen somit zu Inflammation und Initiierung der Arteriosklerose [17].

1.6. Die DLA-1-Maus

Die DLA-1-Maus wurde im Jahr 2010 nach Vorgabe der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Baldus von der Firma "GenOway" generiert.

"GenOway" mit Sitz in Lyon, Frankreich, und Hamburg, Deutschland, führt im Kundenauftrag die Generierung von transgenen Maus- und Ratten-Modellen durch. Diese individuellen "evolving" Mausmodelle werden durch eine innovative eigene Technologie des Unternehmens angeboten.

Die Besonderheit der DLA-1-Versuchstiere liegt in einer Punktmutation in der Nähe des aktiven Zentrums der Myeloperoxidase. Ein Aminosäureaustausch von Methionin (Met) nach Threonin (Thr) an Stelle 243 auf Chromosom 11 führt zu einer Änderung und potentiell deutlichen Reduktion der enzymatischen Aktivität des Enzyms (Abb. 4). Dieser Aminosäureaustausch ist deshalb dort gewählt worden, da sich die MPO an dieser Stelle von all den anderen Peroxidasen unterscheidet und hier daher die myeloperoxidase-spezifischen Eigenschaften genau untersucht werden können. Auch ist die Met²⁴³-Mutation in dieser rekombinanten MPO bereits ausführlich in mehreren Studien charakterisiert worden [53, 54, 103].

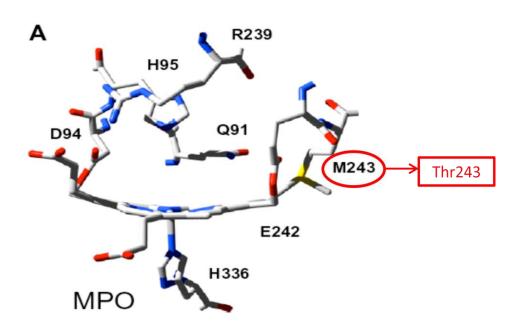


Abbildung 4: MPO-Modell der DLA-1-Maus mit Aminosäureaustausch von Methionin²⁴³ nach Threonin²⁴³. (mod. nach Furtmüller. P.G. et al.: Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases. Arch Biochem Biophys, 2006).

Methionin²⁴³ ist verantwortlich für die MPO-typischen spektralen Eigenschaften, das bedeutet, dass durch die Mutation von Met zu Thr die MPO-spezifische 3-D-Struktur des eingebundenen Häms, das nativ leicht gebogen ist, verloren geht. Dieses führt dann unter anderem zu einem Verlust der ungewöhnlichen magnetischen Zweifarbigkeit der MPO [30, 54, ^{103]}. Die Fähigkeit zur Bildung von HOCl besitzt ebenfalls nur MPO. Andere Peroxidasen dieser Familie können kein Chlorid als Substrat Durch diesen verwenden. Aminosäureaustausch geht nun auch die wichtige MPO-spezifische Fähigkeit der Verwendung von Chlorid zur Bildung von HOCl verloren [54].

MPO hat einen nachgewiesenen bedeutenden Einfluss auf das kardiovaskuläre System. Tiermodelle haben gezeigt, dass MPO das myokardiale Remodeling ^[3, 95] und Kammerrupturen bei Ischämien begünstigt ^[44]. Von besonderer Bedeutung gilt auch die Rolle von MPO als Prognosefaktor beim akuten Koronarsyndrom ^[9], da MPO die Perfusion des Myokards stört und somit die Kammerfunktion stark beeinträchtigen kann ^[10-12]. Auch bei der Entstehung von Vorhofflimmern ^[83] gilt MPO als profibrotischer Mediator. Für all diese Befunde war jedoch immer die katalytische Aktivität von MPO nötig.

Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Baldus gaben jedoch Anlass zu der Annahme, dass die Präsenz des Proteins selbst, auch ohne katalytische Aktivität, proinflammatorische Wirkungen besitzt ^[52, 60].

Diese extrakatalytischen Eigenschaften, zu denen die Rekrutierung der PMN über die elektrostatische Interaktion zwischen der negativ-geladenen Glykokalyx der PMN und der positiv-geladenen Oberfläche der MPO zählt ^[52], oder die Bindung von MPO an das Integrin CD11b/CD18, das eine Aktivierung PMN ^[47, 60] zur Folge hat und damit verbundene Signalkaskaden wie zum Beispiel die deutlich erhöhte Degranulation oder die Erhöhung der CD11b/CD18-Rezeptordichte an der Oberfläche, waren schließlich der Anlass der Arbeitsgruppe, den Auftrag für die DLA-1-Maus zu geben.

Die Verfügbarkeit der transgenen DLA-1-Maus ermöglicht es nun, den Einfluss der katalytischen Aktivität von MPO in-vivo zu untersuchen und somit noch genauer die extrakatalytischen Eigenschaften zu betrachten.

1.7. Ziele der Arbeit

Myeloperoxidase, das hauptsächlich in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten lokalisiert ist und somit zu den leukozytären Enzymen gehört, ist ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Das Enzym besitzt allerdings nicht nur bakterizide, sondern auch pro-inflammatorische Eigenschaften.

Es wurde im Vorfeld dieser Arbeit eine Maus generiert, welche das Enzym mit veränderten, deutlich reduzierten katalytischen Eigenschaften exprimiert.

Mit dieser Arbeit soll diese transgene DLA-1 Maus in Bezug auf ihre Myeloperoxidase-Aktivität charakterisiert werden. Die hier durchgeführten Untersuchungen sollen den Grundstein für weitere Arbeiten legen, die identifizieren sollen, ob nur die Anwesenheit von MPO als zelluläres Protein oder erst die katalytische Aktivität des Enzyms die proentzündlichen Wirkungen bedingen.

Die vorliegende Arbeit soll helfen, das pathophysiologische Verständnis bezüglich vaskulärentzündlicher Prozesse eingehender nachzuvollziehen und somit eventuell als Anregung für die Entwicklung neuer anti-inflammatorischer Therapien dienen.

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien und Arzneistoffe

Bezeichnung	Hersteller	
Albumin Solution (BSA), 35% in DPBS	Sigma (St.Louis, USA)	
Ampuwa®	Fresenius Kabi (Bad Homburg)	
Angiotensin-II-human A-9525	Sigma	
Chlorination inhibitor	Invitrogen (Darmstadt)	
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X (DPBS)	Invitrogen	
N,N-Dimethylformamid	Sigma	
Formaldehyd, 16%	Polysciences Inc., (Warrington, USA)	
HBSS	Invitrogen	
Histopaque-1077	Sigma-Aldrich (München)	
Isofluran (Forene®)	Abott	
Kaliumiodid	Merck KGaA (Darmstadt)	
KNO ₂	Merck KGaA	
Metamizol	Ratiopharm GmbH (Ulm)	
Microscopy Türks Lösung	Merck KGaA	
Natriumchlorid-Lösung 0,9%	B.Braun (Melsungen)	
PAPA-NONOate (NOC-15)	Alexis Biochemicals (Lausen, CH)	
Prostaglandin-F-2α	Sigma	
Protease-Inhibitor Complete	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)	
3'-p-aminophenyl-fluorescein (APF)	Invitrogen	
3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma	
Schwefelsäure H ₂ SO ₄ ≥95%	Carl Roth GmbH & Co.	
Triton X-100	Sigma	
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ 3%	Invitrogen	
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ 30%	Merck KGaA	

2.1.2. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Homogenisierungs-Lösung	1 Tablette Protease-Inhibitor, 10µl Triton X-100 ad	

	10ml Ampuwa	
Erythrozyten-Lyse-Puffer	0,83% NH ₄ Cl, 0,5g KHCO ₃ , EDTA ad Ampuwa	
Phosphat-Puffer (P-Puffer)	99,0 mmol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l CaCl ₂ , 1,2 mmol/l MgSO ₄ , 25,0 mmol/l NaHCO ₃ , 1,0 mmol/l KH ₂ PO ₄ , 11,1 mmol/l D-Glukose; pH 7,35	
Photometer-Puffer	80Mm NAH ₂ PO ₄ , pH 5,5	
Zellpuffer	0,25% bovines Serumalbumin (BSA) in HBSS, steril filtriert	
Zellpuffer	0,25% BSA in DPBS, steril filtriert	
Zellpuffer	0,25% BSA in DPBS/ 1mM EDTA, steril filtriert	

2.1.3. Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
EnzChek® Myeloperoxidase Activity	Invitrogen
Assay Kit	
MPO-ELISA, Maus	Hycult biotechnology

2.1.4. Mauslinien

Bezeichnung	Herkunft
C57BL_6J (Wildtypen)	The Jackson Laboratory (Maine, USA)
DLA-1	genOway (Lyon, Frankreich)
DLA-1 (Wildtypen)	genOway
MPOtm1lus (MPO ^{-/-})	The Jackson Laboratory

2.1.5. Laborgeräte, Apparaturen, Software

Bezeichnung	Firma	
amino-700/600 Nitric Oxide Sensor	Innovative Instruments, Inc. (Florida, USA)	
Apollo 4000 Free Radical Analyzer	World Precision Instruments (Sarasota, USA)	
Apollo 4.1.4	World Precision Instruments	
Eppendorf-Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG (Hamburg)	
Excel MS	Microsoft (Washington, USA)	
Fluorometer, Twinkle LB 970	Berthold Technologies (Bad Wildbad)	
MikroWin2000	Mikrotek GmbH (Overath)	
Mini Spin plus	Eppendorf AG	

MRX Revelation 4.22	Dynex Technologies (Chantilly, USA)
MRX Tc Revelation	Dynex Technologies
Osmotische Minipumpen 1007D, 1002	Alzet (Kalifornien, USA)
UV-1601PC (UV-visible spectrophotometer)	Shimadzu Deutschland GmbH (Duisburg)
UV Probe	Shimadzu Deutschland GmbH

2.2. Methoden

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

2.2.1. Isolation neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark

Die Isolation neutrophiler Granulozyten erfolgte aus dem Knochenmark beider Oberschenkelund Unterschenkelknochen gesunder Mäuse. Nach dem Ausspülen der Knochen mit einer Suspension aus PBS/1mM EDTA, wurde eine erste Zentrifugation bei 350 x g für 7 Minuten durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2ml PBS/EDTA gemischt. Unter Beibehaltung der Phasengrenzen wurde dieser Ansatz vorsichtig auf 2ml Histopaque-1077 pipettiert. Danach wurde für 30 Minuten mit 440 x g bei Raumtemperatur und Bremsenfunktion zentrifugiert. Der Überstand deaktivierter (Thrombozyten und mononukleäre Zellen in Histopaque) wurde sorgsam entfernt und das Pellet in 2ml PBS/0,25% BSA/EDTA aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation von 7 Minuten bei 250 x g, bei der der Überstand verworfen wurde, schloss sich eine Erythrozyten-Lyse mit 0,83% NH₄Cl in ddH₂O+0,5g KHCO₃+EDTA im Verhältnis 1:10 an. Die restlichen Erythrozyten wurden nach 8 Minuten schütteln bei Raumtemperatur und anschließender 7minütiger Zentrifugation bei 350 x g entfernt. Der Überstand wurde nun entfernt und das Pellet in 1ml steril filtriertem PBS mit 0,25% BSA resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Zur Bestimmung der Zellzahl der gewonnenen Granulozyten-Suspension wurde 10µl daraus entnommen und 1:100 mit PBS verdünnt. 10µl dieser Suspension wurde dann in eine Neubauer Zählkammer gegeben.

Mikroskopisch (Vergrößerung x 100) wurden alle vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl folgendermaßen berechnet:

X = Anzahl der gezählten Zellen in allen 4 Quadranten der Neubauer Zählkammer

Y = Anzahl neutrophiler Granulozyten pro ml Suspension

Y = X/4 * 100 (Verdünnungsfaktor) * 10.000

2.2.2. Isolation neutrophiler Granulozyten aus Vollblut

Zur Isolation neutrophiler Granulozyten wurde peripher-venöses Blut der Maus mit einer 1ml-Perfusorspritze abgenommen. Das gesamte Blut wurde im Verhältnis 1:10 mit einer Erythrozyten-Lyse-Lösung aus 0,83% NH₄Cl in ddH₂O + EDTA gemischt und 8 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde eine 7-minütige Zentrifugation bei 300 x g durchgeführt. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet in 2ml PBS/EDTA aufgenommen. Die dann folgenden Isolationsschritte unterscheiden sich nicht von der Isolation neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark. Das Gemisch wurde nun auf 2ml Histopaque-1077 gelegt und wie oben erläutert, zentrifugiert.

Bevor die isolierten Granulozyten in 1ml steril filtriertem PBS/ 0,25% BSA resuspendiert wurden, wurde nochmals eine Erythrozyten-Lyse mit 0,83% NH₄Cl in ddH₂O + EDTA im Verhältnis 1:10 durchgeführt. Das Gemisch wurde dazu 8 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und 7 Minuten bei 350 x g zentrifugiert.

Zum Schluss erfolgte hier wieder eine Bestimmung der Ganulozyten-Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer.

2.2.3. TMB-Assay zur Bestimmung der Peroxidase-Aktivität

Von der auf Eis gelagerten Zell-PBS/BSA-Suspension wurden mehrere Aliquots à 250µl hergestellt, wobei die Zellkonzentration bei den isolierten Knochenmarkszellen 2 Millionen pro Milliliter betragen sollte, bei Blutzellen mindestens 4 Millionen pro Milliliter. Die dazugehörige Rechnung lautet:

Y = 1000ml / neutrophile Granulozyten pro ml Suspension x 2 Millionen (bzw. 4 Millionen)

Das Ergebnis wurde mit PBS/BSA-Zellpuffer auf 1 Milliliter aufgefüllt und konnte bei Bedarf auf mehrere Milliliter erweitert werden. Danach wurde eine Zentrifugation der Aliquots von 7 Minuten bei 400 x g durchgeführt. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 250µl Lysepuffer aufgefüllt, gemischt und einige Zeit auf Eis gestellt. Als nächstes wurde das Photometer gestartet und die dazugehörige Software geöffnet. Für die photometrische Messung wurden Küvetten mit 1ml Fassungsvermögen benutzt. Der Zellpuffer NaH₂PO₄ wurde so in die Küvetten vorgelegt, dass nach Zugabe von TMB (Tetramethylbenzidin), den zu untersuchenden Zellen und zum Schluss von Wasserstoffperoxid, das Volumen genau 1

Milliliter beträgt. Wurde der TMB-Assay aus Knochenmarkszellen bestimmt, so wurde 890µl Zellpuffer vorgelegt, bei PMN aus dem Blut nur 730µl. Anschließend wurde 60µl TMB-Solution (4,8 mg TMB/ml Dimethylformamid) in die Küvette pipettiert und gut durchmischt. Aus den Aliquots mit isolierten PMN aus dem Knochenmark wurden 40µl in das Gemisch gegeben und dann die Küvetten in das Photometer gestellt.

Wurde der TMB-Assay aus isolierten PMN des Blutes gemacht, so wurde je 200μl Probe aus den Aliquots entnommen. Der nachfolgende Schritt musste nun schnell durchgeführt werden. In die im Photometer bereit stehenden Küvetten, wurde 10μl 100μM H₂O₂ pipettiert und anschließend das Programm UV-Probe unverzüglich gestartet. Die Extinktion wurde bei den KM-Zellen für 180 Sekunden, bei den Zellen aus dem Blut für 360 Sekunden gemessen. Einen ersten Hinweis, ob der Versuch erfolgreich war, konnte mittels eines Farbumschwungs in der Küvette festgestellt werden. Wenn MPO unter Zugabe von Wasserstoffperoxid als Enzym aktiv wird, kommt es durch das Tetramethylbenzidin zu einer Blauverfärbung der Probe. Dieser Farbumschwung ist natürlich von der katalytischen Aktivität der MPO in den neutrophilen Granulozyten abhängig.

2.2.4. Chlorinierungs-Assay zur Bestimmung der MPO-Aktivität

Von der auf Eis gelagerter Zell-PBS/BSA-Suspension wurden Aliquots à 250μl hergestellt, wobei die Zellkonzentration bei den isolierten PMN des Knochenmarks 2 Millionen pro Milliliter und bei den isolierten PMN des Blutes mindestens 4 Millionen pro Milliliter betragen sollte. Die Zellen wurden durch 7-minütiges Zentrifugieren mit 400 x g pellettiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Pellets bei -80°C in Stickstoff kurz schock gefroren. Noch bevor die Pellets wieder auftauen konnten, wurden sie in 300μl Lyse-Puffer (DPBS/Protease-Inhibitor) resuspendiert. Der Versuch erfolgte mit dem von InvitrogenTM hergestellten EnzChek® Myeloperoxidase Activity Assay Kit. Als Erstes wurde, die im weiteren Versuch benötigte, frische 5mM H₂O₂-Lösung angesetzt. Dazu wurden 5μl der 3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung mit 870μl 1X PBS vermengt. Als nächstes wurden jeweils 50μl der zu untersuchenden Originalproben auf eine 96-well Microplatte aufgebracht. Mit einer Multipipette wurden dann je 50μl der zuvor hergestellten 2X APF-Lösung dazu gegeben. Um die 2X APF-Lösung herzustellen, wurden 4μl APF und 4μl der frischen 5mM H₂O₂-Lösung in 992μl 1X PBS gelöst.

Anschließend wurde die 96-well Microplatte im Dunkeln für 30 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Um die Reaktion nach der halben Stunde zu stoppen, wurden jeweils 10µl des

Chlorination-Inhibitors in die Proben pipettiert. Die Fluoreszenz der Suspension jedes Wells

wurde im Berthold Fluorometer mit folgendenen Einstellungen bestimmt:

Measurement Sequence: S Fluor Scanning

Excitation Filter: F485 FITC Fluorescein – Slot A2

Emission Filter: F535 FITC Fluorescein – Slot A2

2.2.5. Messung der Konsumption von NO mittels NO-Elektrode

Von der auf Eis gelagerten Zell-PBS/BSA-Suspension wurden wieder Aliquots à 250µl

hergestellt, wobei die Zellkonzentration bei den isolierten PMN aus dem Knochenmark 2

Millionen pro Milliliter betragen sollte, bei den PMN des Blutes mindestens 4 Millionen pro

Milliliter. Anschließend wurden die Granulozyten durch Zentrifugation mit 400 x g für 7

Minuten pelletiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die Pellets wurden nun in je

250ul Lyse-Puffer (DPBS/EDTA, Triton X-100, Protease Inhibitor) resuspendiert. Mit Hilfe

einer NO-Elektrode kann die Konsumption von Stickstoffmonoxid durch MPO gemessen

werden. Zur Bestimmung der enzymabhängigen NO-Konsumption wurden 100µl der

isolierten Granulozyten aus dem Knochenmark, und 400µl der Granulozyten aus dem Blut,

zusammen mit PBS auf 1ml aufgefüllt. Danach wurde 10µl PapaNONOate, dass vorher

1:1000 mit 1mM NaOH verdünnt wurde, hinzugegeben und anschließend wurde die

Elektrode in das Gemisch getaucht. PapaNONOate ist ein NO-Donor, der in konstanter Rate

Stickstoffmonoxid freisetzt. Die Aufzeichnung erfolgte mit der Software Apollo 4.0.1. Zur

Quantifizierung der enzymatischen Aktivität bzw. der Konsumption von NO wurden folgende

Einstellungen gewählt:

Range: 10nA - 100nA

Poise Voltage: Nitric Oxide

Trace: Autotrack

Filter: 6

Nach Einstellung eines Plateaus wurden vorsichtig 5µl H₂O₂ in das Gemisch pipettiert und die

Veränderung der Kurve registriert.

30

2.2.6. ELISA zur Bestimmung des MPO-Gehalts im Plasma und im Knochenmark

Die Menge der murinen MPO aus den neutrophilen Granulozyten des Knochenmarks und des Plasmas wurde mit einem ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent-assay)-Kit quantifiziert: Die Pellets der PMN aus dem Knochenmark wurden mit je 250µl Lyse-Puffer (PBS/EDTA, Triton, Protease-Inhibitor) gemischt und wurden anschließend 1:8 mit Dilutionspuffer verdünnt. Die Plasma-Proben wurden 1:4 mit Probenpuffer verdünnt. Danach wurden die Standardlösung 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 verankert, an den das MPO aus der Proben- und Standardlösung bindet. Die Wells wurden anschließend 4x mit PBS gewaschen und mit einer Lösung eines zweiten, biotinylierten Antikörpers gegen murine MPO gefüllt und wiederum für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, sodass dieser Antikörper nun an das immobilisiert gemachte MPO binden kann. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde Streptavidin-Peroxidase, eine Meerrettichperoxidase, zugegeben. Der Ansatz wurde 1 Stunde inkubiert, um die Bindung des Streptavidin an das immobilisierte Biotin des zweiten Antikörpers zu gewährleisten. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurde Tetramethybenzidin (TMB)-Lösung als Substrat der Meerrettichperoxidase hinzugefügt und 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Oxidation des TMBs, welches durch eine blaue Verfärbung gekennzeichnet ist, wurde durch Zugabe von Zitronensäurelösung gestoppt. Aufgrund des sauren Milieus dieser Lösung tritt eine pH-Wert-Änderung ein, die durch eine gelbe Verfärbung sichtbar ist. Die Absorption der Lösung in den einzelnen Wells wurde bei 450nm gemessen.

2.2.7. Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit von Aorten im Organbad

Für diesen Versuch wurden die Aorten von Wildtyp-, DLA-1- und MPO^{-/-}-Mäusen entnommen. Im Vorfeld wurden jeweils einige Tiere jeder Mauslinie einer Vorbehandlung untergezogen. Es wurden ihnen osmotische Minipumpen (Alzet, Modell 1002) mit einer Pumprate von 0,25 μl/h und einer Pumpdauer von 14 Tagen subkutan implantiert. Die Pumpen waren mit einer Lösung von humanem Angiotensin II befüllt, so dass Pumpraten von 1,5 ng/gKG/min. kontinuierlich erzielt wurden. Für die Implantation der Minipumpen wurden 13 männliche Tiere (WT n=6, DLA-1 n=5, MPO^{-/-} n=2) ausgewählt.

Um die Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit der entnommenen Aorten nun zu bestimmen, wurde die Messung in einem Organbad mit 8 voneinander unabhängigen Organbädern, die jeweils mit 25 ml Phosphat-Puffer gefüllt waren, durchgeführt. Die Puffertemperatur wurde konstant bei 37°C gehalten. Um die natürliche Prostaglandinsynthese zu hemmen, konnte auf die Anwesenheit von Indomethacin (10 µmol/l) nicht verzichtet werden. Jeder Aortenring war ca. 4 mm breit und wurde mit Hilfe zweier durch das Gefäßlumen gezogener Triangeln so in eines der Organbäder eingehängt, dass der Gefäßring an einer Seite fest fixiert und an der anderen Seite mit einem isometrischen Kraftüberträger verbunden war. Ein mit diesem System verbundener Computer registrierte kontinuierlich die vom Aortenring ausgehende Kraft.

Zur Vorbereitung des Experimentes wurden alle Aortengefäße auf den Ruhetonus (1,1 g) äquilibriert, bei dem sie optimal auf die Gabe von Kaliumchlorid (KCl) kontrahieren. Nach KCl-Boli-Gabe und folgender Kontraktion der Gefäßringe, wurden diese in Phosphat-Puffer gewaschen, sodass sich wieder eine Relaxation einstellen konnte. Anschließend wurde eine KCl-Dosiswirkungskurve mit aufsteigenden KCl-Konzentrationen ermittelt.

Nach dieser Voruntersuchung der Aorten wurde im nachfolgenden Versuch die endothelabhängige und die endothelunabhängige Vasodilatation bestimmt. Um die Reaktion der Gefäße auf den endothelabhängigen Dilatator Acetylcholinchlorid (Acetylcholin, Ach) zu messen, wurde vor Beginn eine Vortonisierung mit Prostaglandin-F-2α (PGF) durchgeführt. Es wurden die PGF-Dosierungen so gewählt, dass sie zu 50-70 % der maximalen Kontraktion auf der KCl-Dosiswirkungskurve entsprachen. Die endothelabhängige Relaxation der Aorten wurde nun mit aufsteigenden Konzentrationen von Acetylcholin untersucht. Der Konzentrationsbereich im Organbad lag hier zwischen $10^{-9}\,$ bis $10^{-5,5}\,$ mol/l. Nachdem die Relaxation mit ACh beendet war, wurden die Organbäder zweimal mit Phosphat-Puffer gewaschen und die Aorten für 30 Minuten auf den Ruhetonus zurück äquilibriert. Anschließend wurden die Gefäße erneut mit PGF vorkontrahiert, bevor Relaxationsfähigkeit der Aorten mit dem endothelunabhängigen Vasodilatator Nitroglycerin (NTG) gemessen werden konnte. Hier wurde ein Konzentrationsbereich zwischen 10⁻⁹ bis 10⁻ ^{4,5} mol/l ermittelt.

2.2.8. Statistische Auswertung

Stetige Daten wurden mittels Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung geprüft. Die normalverteilten Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler (MW+/- SEM) angegeben, während nicht-normalverteilte Daten mit Median und Interquartilabständen dargestellt wurden.

Die gesamte Auswertung einschließlich der Überprüfung auf Signifikanz erfolgte mit dem Mehrfachvergleich one-way ANOVA (*analysis of variance*) mit anschließendem LSD posthoc Test. Es wurde diese Varianzanalyse gewählt, da hier der Einfluss einer unabhängigen Variable bei mehr als zwei verschieden Gruppen (hier: drei Maustypen) auf die Ausprägung einer Zufallsvariable untersucht werden kann ^[5].

Ein Wert für p < 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Alle oben genannten statistischen Tests wurden mit Hilfe der Datenanalysesoftware SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Voraussetzung

Als Voraussetzung für die Durchführung der folgenden Versuche gilt eine jeweils ähnliche Anzahl von neutrophilen Granulozyten im Blut und im Knochenmark.

Tabelle 1: Gesamtleukozyten im Blut (Zellen/ml)

Art	Anzahl (n)	Mittelwert	Standardfehler (SEM)	p-Wert
Wildtyp	9	8.472.222	574.780	WT vs. DLA-1 p=0,172
DLA-1	5	6.860.000	1.263937	DLA-1 vs. MPO ^{-/-} p=0,045
MPO ^{-/-}	4	9.818.750	660.127	MPO ^{-/-} vs. WT p=0,284

Tabelle 2: PMN im Knochenmark (Zellen/ml)

Art	Anzahl (n)	Mittelwert	Standardfehler (SEM)	p-Wert
Wildtyp	10	16.760.000	1.070.618	WT vs. DLA-1 p=0,629
DLA-1	9	15.977.777	1.165.173	DLA-1 vs. MPO ^{-/-} p=0,728
MPO ^{-/-}	10	15.415.000	1.127.843	MPO ^{-/-} vs. WT p=0,396

Tabelle 3: PMN im Blut (Zellen/ml)

Art	Anzahl (n)	Mittelwert	Standardfehler (SEM)	p-Wert
Wildtyp	9	7.386.111	1.382.549	WT vs. DLA-1 p=0,557
DLA-1	5	8.730.000	1.875.273	DLA-1 vs. MPO ^{-/-} p=0,563
MPO ^{-/-}	8	7.375.000	1.343.801	MPO ^{-/-} vs. WT p=0,996

3.1. Peroxidase-Aktivität von PMN aus Knochenmark und Blut

Bei der Untersuchung der Peroxidase-Aktivität der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark mittels TMB-Assay wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt beim Vergleich zwischen Wildtyp (WT) und DLA-1 (0,08 +/- 0,01 vs. 0,07 +/- 0,01 ΔAbs./min/2 Mio PMN; p=0,253). Dafür war aber die Peroxidase-Aktivität in Zellen aus MPO^{-/-}-Mäusen signifikant verringert im Vergleich zu WT und DLA-1 (0,02 +/- 0,003 ΔAbs./min/2 Mio PMN vs. WT p<0,001 vs. DLA-1 p=0,003) (Abb. 5).

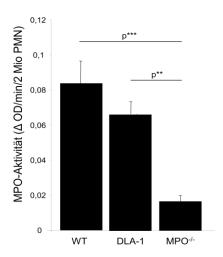


Abbildung 5: Peroxidase-Aktivität von isolierten PMN aus dem Knochenmark bestimmt mittels TMB-Assay. n=6-7. MW +/- SEM. p*<0.05, p**<0.01, p***<0.001.

Betrachtet man den TMB-Assay von PMN aus dem Blut zeigt sich auch kein signifikanter Unterschied zwischen WT und DLA-1 (0,04 +/- 0,01 vs. 0,04 +/- 0,004 ΔAbs./min/4 Mio PMN; p=0,503). Die Peroxidase-Aktivität der PMN der MPO^{-/-} im Vergleich mit WT und DLA-1 ist signifikant niedriger (0,01 +/- 0,002 ΔAbs./min/4 Mio PMN vs. WT p=0,002 vs. DLA-1 p=0,006) (Abb. 6).

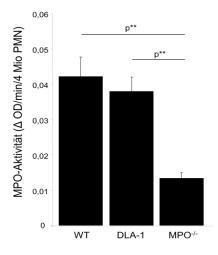


Abbildung 6: Peroxidase-Aktivität von isolierten PMN aus dem Blut bestimmt mittels TMB-Assay. n= 3-4. MW +/-SEM. p*<0.05, p**<0.01, p***<0.001.

3.2. Chlorinierungs-Aktivität von PMN aus Knochenmark und Blut

Einen signifikanten Unterschied im Hinblick auf die Chlorinierungs-Aktivität von MPO ergab die Untersuchung der PMN aus Knochenmark mittels Chlorinierungs-Assay zwischen WT und DLA-1 (179,37 +/- 9,40 vs. 144,90 +/- 4,95 RFI/2 Mio PMN; p=0,013). Diese deutliche Verminderung der Chlorinierungs-Aktivität zeigte sich auch beim Vergleich von DLA-1 und MPO^{-/-}-Mäusen (113,33 +/- 8,21 RFI/2 Mio PMN; p=0,034) und auch bei WT verglichen mit MPO^{-/-} (p<0,001) (Abb. 7).

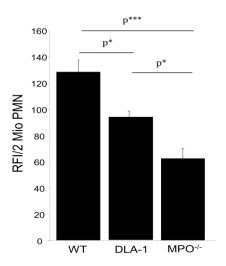


Abbildung 7: Chlorinierungs-Aktivität von isolierten PMN aus Knochenmark gemessen in Relativer Fluoreszenz-Intensität (RFI). n= 3-5. MW +/- SEM. p*<0.05, p**<0.01, p***<0.001.

Bei der Analyse der Neutrophilen aus dem Blut konnte kein signifikanter Unterschied beim Vergleich aller Mauslinien festgestellt werden (WT 77,52 +/- 6,09 vs. DLA-1 68,75 +/- 0,88 RFI/4 Mio PMN; p=0,125 vs. MPO^{-/-} 75,52 +/- 1,53 RFI/4 Mio PMN; p=0,708 und DLA-1 vs. MPO^{-/-} p=0,224) (Abb. 8).

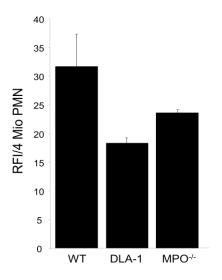


Abbildung 8: Chlorinierungs-Aktivität von isolierten PMN aus Blut gemessen in Relativer Fluoreszenz-Intensität (RFI). n= 3-4. MW +/- SEM. p*<0.05, p**<0.01, p***<0.001.

3.3. NO-Konsumption von PMN aus Knochenmark und Blut

Die Analyse der PMN aus dem Knochenmark mit einer NO-Sonde ergab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Konsumption von NO zwischen WT und DLA-1 (44,44 +/- 6,66 vs. 33,01 +/- 4,61 pA/sec/ml/2 Mio PMN; p=0,119). Nur bei der Betrachtung zwischen WT und MPO^{-/-} (-1,15 +/- 0,46 pA/sec/ml/2 Mio PMN; p<0,01) bzw. DLA-1 und MPO^{-/-} (p=0,01) ergab sich eine deutliche Verminderung der Konsumption und somit ein signifikanter Unterschied (Abb. 9).

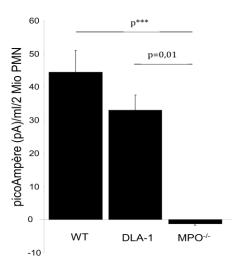


Abbildung 9: NO-Konsumption von PMN aus Knochenmark gemessen mittels NO-Elektrode. n=4. MW +/- SEM. p*<0.05, p**<0.01, p***<0.001.

Eine signifikante Verringerung im Hinblick auf die Konsumption von NO konnte auch bei der Untersuchung der PMN aus dem Blut zwischen WT und DLA-1 (43,06 +/- 10,70 vs. 18,44 +/- 1,11 pA/sec/ml/4 Mio PMN; p=0,031) und WT und MPO^{-/-} (-0,21 +/- 2,02 pA/sec/ml/4 Mio PMN; p=0,003) nachgewiesen werden. Nur zwischen DLA-1 und MPO^{-/-} (p=0,103) ergab sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 10).

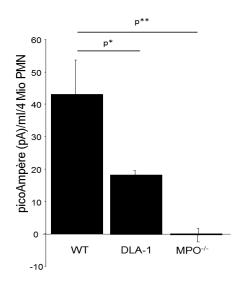


Abbildung 10: NO-Konsumption von PMN aus Blut gemessen mittels NO-Elektrode. n=3-4. MW +/- SEM. p*<0.05, p**<0.01, p***<0.001.

3.4. MPO-Gehalt in PMN aus Knochenmark und Plasma

Die Ergebnisse des MPO-ELISA-Tests mit PMN des Knochenmarks zeigen keinen Unterschied zwischen WT und DLA-1 (1,29 +/-0,19 vs. 1,12 +/- 0,09 ng/ml/2 Mio PMN; p=0,37), aber dafür eine deutliche Abnahme des MPO-Gehalts zwischen WT und MPO-/- (0,15 +/- 0,01 ng/ml/2 Mio PMN; p<0,01) bzw. DLA-1 und MPO-/- (p=0,001) (Abb. 11).

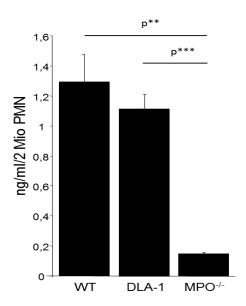


Abbildung 11: MPO-ELISA aus Knochenmark. n= 3-5. MW +/- SEM. p*<0.05, p**<0.01, p***<0.001.

Der ELISA, der aus Plasma durchgeführt wurde, ergab bei der Betrachtung des MPO-Gehalts aller drei Maustypen einen signifikanten Unterschied: WT und DLA-1 (0,39 +/- 0,02 vs. 0,50 +/- 0,18 ng/ml; p=0,002), WT und MPO^{-/-} (0,20 +/- 0,07 ng/ml; p<0,01) und schließlich DLA-1 und MPO^{-/-} (p<0,01) (Abb. 12).

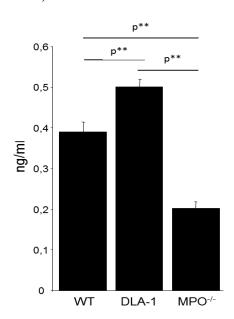


Abbildung 12: MPO-ELISA aus Plasma. n= 4-5. MW +/- SEM. p*<0.05, p**<0.01, p***<0.001.

3.5. Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit von Aorten im Organbad

Um zu überprüfen, ob die verminderte Chlorinierungs-Aktivität und vor allem die verminderte Konsumption von NO durch MPO der DLA-1-Maus im Vergleich zum WT funktionelle Konsequenzen ex-vivo aufweist, wurde die Relaxationsfähigkeit explantierter Aorten ermittelt. Es ist bekannt, dass MPO durch Konsumption von NO diese vermindert. Eine Dosis-Wirkungs-Kurve mit aufsteigender Konzentration von Acetylcholin (Ach) gibt Aufschluss über die endothelabhängige Relaxationsfähigkeit. Es wurde der gesamte Kurvenverlauf auf Signifikanz überprüft und miteinander verglichen. Bei der Betrachtung der drei Maustypen ohne 14-tägige Vorbehandlung mit Angiotensin II konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden (WT vs. DLA-1 p=0,495; WT vs. MPO-/- p=0,802; DLA-1 vs. MPO-/- p=0,392).

Wurde der Versuch zusätzlich mit Angiotensin II, welches in der Maus durch Aktivierung der Leukozyten zu einer MPO-Freisetzung führt, durchgeführt, so zeigte sich, dass nur bei den Aorten der DLA-1+ATII-Tiere im Vergleich mit den MPO-/- +ATII-Tieren eine signifikant schlechtere Relaxation auftritt (p=0,024). Der Vergleich von WT +ATII mit DLA-1+ATII (p=0,137) und WT+ATII mit MPO-/-+ATII (p=0,161) zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 13).

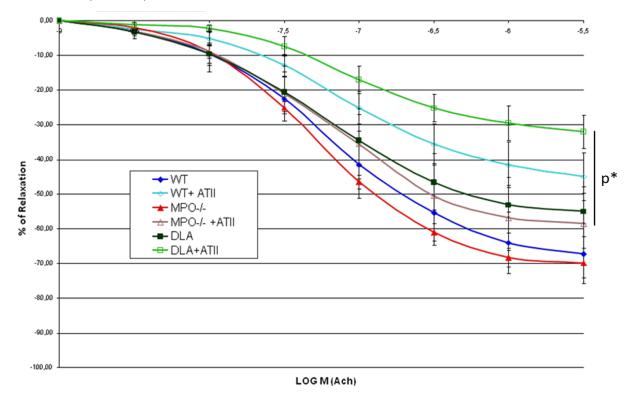


Abbildung 13: Endothelabhängige Relaxationsfähigkeit der Aorten von Tieren ohne Vorbehandlung und mit Angiotensin II (ATII) Vorbehandlung in Reaktion auf aufsteigende Konzentrationen von Acetylcholin. n=2-6. MW +/- SEM. p*<0.05, p**<0.01, p***<0.001.

Ergebnisse

Aus der Kurve geht zudem deutlich hervor, dass alle Tiere, die einer Vorbehandlung mit Angiotensin II unterzogen worden sind, eine verhältnismäßige Verschlechterung ihrer Aortenrelaxation am Ende des Versuches aufweisen (WT vs. WT+ATII Δ -22,23%; DLA-1 vs. DLA-1+ATII Δ -22,94%; MPO-/- vs. MPO-/- +ATII Δ -11,38%). Die ATII-vorbehandelten DLA-1-Mäuse zeigten zwar eine nicht signifikant, aber eine im Trend noch schlechtere Relaxationsfähigkeit als die WT-ATII-Mäuse (Abb. 13).

Ergebnisse

Bei der im Anschluss durchgeführten Untersuchung der endothelunabhängigen Vasodilatation mit Glyceroltrinitrat (NTG) wurde ebenfalls der komplette Kurvenverlauf statistisch untersucht. Die Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied bei Vergleich der drei Maustypen miteinander (WT vs. DLA-1 p=0,897; WT vs. MPO^{-/-} p=0,638; DLA-1 vs. MPO^{-/-} p=0,535).

Auch die Vorbehandlung der Mausaorten mit Angiotensin II konnte keine Differenz provozieren (WT vs. DLA-1 p=0,964; WT vs. MPO^{-/-} p=0,249; DLA-1 vs. MPO^{-/-} p=0,247), was darauf hindeutet, dass keine strukturellen Unterschiede, wie z.B. fibrotische Veränderungen in der Media der verschiedenen Aorten vorliegen (Abb. 14).

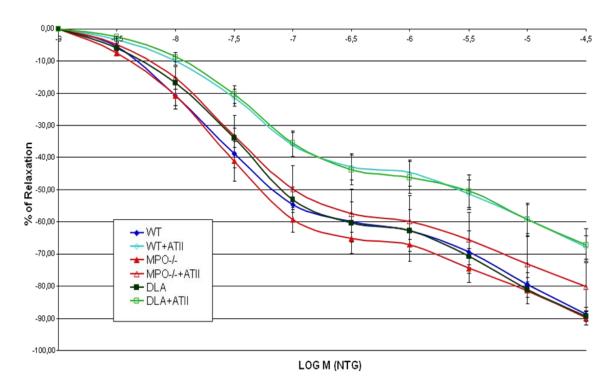


Abbildung 14: Endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit der Aorten von Tieren ohne Vorbehandlung und mit Angiotensin II (ATII) Vorbehandlung in Reaktion auf aufsteigende Konzentrationen von Nitroglycerin. n= 2-12. MW +/-SEM.

Bei einer genaueren Betrachtung der Kurve geht auch hier hervor, dass alle Tiere, die zuvor mit Angiotensin II vorbehandelt worden sind, eine deutliche, aber nicht signifikante Verschlechterung ihrer Aortenrelaxation am Ende des Versuches aufweisen (WT vs. WT+ATII Δ -20,84%; DLA-1 vs. DLA-1+ATII Δ -22,16%; MPO^{-/-} vs. MPO^{-/-}+ATII Δ -9,62%) (Abb. 14).

Wie einleitend erläutert, ist die Besonderheit, die Myeloperoxidase kennzeichnet, die, dass die Hämgruppe nicht nur über zwei Estergruppen mit dem Protein selbst verbunden ist, sondern es besitzt auch eine einzigartige kovalente Sulfonium-Bindung zwischen dem Schwefelatom des Methionin²⁴³ und dem terminalen Kohlenstoff der Vinylgruppe des Pyrrolrings A. Diese Bindung verleiht MPO u.a. die Fähigkeit, Chlorid als Substrat zu nutzen, im Gegensatz zu anderen Peroxidasen, wie zum Beispiel der eosinophilen Peroxidase oder Laktoperoxidase. Daher war genau diese Struktur Ziel des forscherischen Anreizes mit dem Bestreben, die Funktion des Enzyms zu modulieren und die Aminosäurereihenfolge zu verändern. In der Literatur sind neben der Mutation in Threonin, wie bei der hier untersuchten DLA-1-Maus, noch weitere Mutationen in Glutamin und Valin beschrieben worden. Jegliche Mutationen führten im Enzym zu einem mehr oder weniger ausgeprägten Verlust enzymatischer Aktivität und einer Veränderung struktureller Eigenschaften. Kooter et al. (JBC 1999) beschreiben in ihrer Arbeit "The sulfonium Ion Linkage in Myeloperoxidase" [54], dass allen Mutanten gemein ist, dass die Affinität für Chlorid als Reaktionspartner gesunken ist. Alle veränderten Typen zeichnen sich durch den 100% igen Verlust ihrer Chlorinierungseigenschaft aus bzw. eine Reduktion dieser auf 15%, wie bei der Mutation von Methionin zu Threonin [54]. Später bestätigten auch Zederbauer et al. (NPR 2007) diese Ergebnisse und erweiterten die Charakterisierung der Veränderung des Enzyms um spektrale und katalytische Eigenschaften [103]. Hier setzt diese Dissertationsarbeit nun ein. Durch die Versuche sollte erstmals eine Charakterisierung des mutierten Enzyms exprimiert im Säugetier, der transgenen DLA-1-Maus, erfolgen. Diese Charakterisierung beinhaltet die Chlorinierungsaktivität, die Peroxidase-Aktivität, NO-Konsumption und den generellen MPO-Gehalt in den PMN. Inwieweit diese Met243Thr-Mutation auf die Gefäßrelaxationsfähigkeit Einfluss hat, sollte die Versuchsreihe der Endothelfunktionsmessung der murinen Aortenringe beleuchten.

Im Einzelnen lässt sich also diskutieren, ob die in dieser Arbeit erhobenen Resultate bezüglich des Aktivitätsprofils des mutierten Enzyms die Ergebnisse der beiden Forschungsgruppen bestätigen und in wie fern sich charakteristische Eigenschaften des Enzyms in der DLA-1-Maus noch zeigen.

Die Ergebnisse der Messung der Peroxidase-Aktivität im TMB-Assay ergaben, dass die katalytische Aktivität der Myeloperoxidase in der DLA-1-Maus leicht reduziert im Vergleich

zum Wildtyp-Tier ist. Auch wenn diese Reduktion nicht signifikant war – einzige Ausnahme bei der Untersuchung der MPO-Aktivität in den PMN im peripheren Blut – zeigte es somit, dass der Aminosäureaustausch zu Threonin die Peroxidaseaktivität leicht vermindert. Die wichtige Peroxidase-Eigenschaft erhält das Protein durch ein an die schwere Kette kovalent gebundenes Häm-Molekül. Zederbauer et al. konnten bereits zeigen, dass auch Aminosäuretransfere im Bereich der für die Häm-Gruppe bindungsrelevanten Stellen, welche auch die anderen familiären Peroxidase betreffen, zu Aktivitätseinbußen führen [103]. Die ebenfalls untersuchte NO-Konsumption mittels NO-Messelektroden zeigte signifikantere Ergebnisse als die Untersuchung mittels TMB-Assay, obwohl beide Messungen über den Peroxidase-Zyklus geschehen und somit eine Aussage über die Peroxidase-Aktivät vom MPO zulassen. Dies lässt vermuten, dass diese Messverfahren einer unterschiedlichen Spezifität unterliegen.

Einen interessanten Stellenwert nimmt auch die Untersuchung der Chlorinierungseigenschaft des mutierten MPO in der DLA-1-Maus ein. Wie bereits beschrieben hat MPO die Fähigkeit Chlorid zur HOCl zu oxidieren, welcher wiederum bei der Immunabwehr eine wichtige Rolle zukommt. HOCl ist ein aggressives Oxidans und wirkt toxisch auf Mikroorganismen [41]. Doch nicht nur körperfremde Bestandteile werden durch die HOCl oxidiert, sondern auch körpereigene Strukturen [43]. Die hierüber vermittelten proinflammatorischen Eigenschaften beeinflussen die vaskuläre Homöostase und fördern die endotheliale Dysfunktion, indem sie die strukturelle und funktionelle Integrität des Gefäßendothels beeinträchtigen.

Die Ergebnisse zur Chlorinierungsaktivität dieser Arbeit konnten die Resultate der Forschungsgruppen um Kooter et al. und Zederbauer et al. zum Teil bestätigen. Vor allem die Analyse der PMN aus dem Knochenmark zeigte eine signifikante Verminderung der Chlorinierungsfähigkeit der PMN aus DLA-1- und MPO-/--Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Es kann demnach diskutiert werden, dass der Aminosäureaustausch von Methionin zu Threonin an Stelle 243 vor allem die Chlorinierungseigenschaft von MPO beeinflusst [103]. Dies bestätigt, dass die Sulfonium-Bindung des Methionins zum kovalent gebundenen Häm-Molekül die Besonderheit von MPO determiniert, die es von den anderen familiären humanen Peroxidasen unterscheidet.

Dass die signifikante Veränderung der Chlorinierungsfähigkeit nicht wichtig zu sein scheint für die Gefäßfunktion, zeigten die Ergebnisse der Messung der Aortenrelaxation im Organbad. Einen wichtigen pathophysiologischen Stellenwert nimmt hier vielmehr die NO-Konsumption ein, die ebenfalls in dieser Arbeit untersucht wurde. NO gilt wie bereits erläutert als wichtiger Vasodilatator im Organismus. Es bewirkt über eine Signalkaskade eine Relaxation der Muskelzelle in der Gefäßwand. Eiserich et al. (Science 2002) wiesen im Tiermodell ex-vivo bereits nach, dass MPO unter anderem während eines generierten akuten Inflammationsprozesses die Signalkaskade und die gefäßdilatatorische Eigenschaft von NO moduliert ^[26]. Dies geschieht vor allem durch die Akkumulierung im subendothelialen Raum, wo es noch länger katalytisch aktiv bleibt. Die veränderte Gefäßantwort ist also bedingt durch eine katalytische NO-Konsumption durch Radikale, die MPO generiert. Folglich nimmt MPO somit in gewisser Weise direkt Einfluss auf die endotheliale Dysfunktion im Entzündungsprozess, in dem es die Bioverfügbarkeit von NO reguliert bzw. reduziert. Die von Eiserich et al. entnommenen Aortenringe von Wildtyptieren zeigten hier eine verminderte vaskuläre Relaxationsfähigkeit im Gegensatz zu Untersuchungen mit MPO-defizienten Mäusen [26].

Es wäre demnach zu erwarten, dass in der DLA-1-Maus die Aortenrelaxationsfähigkeit besser im Vergleich zu dem Wildtypen ist, da durch die reduzierte katalytische Aktivität die Bioverfügbarkeit von freiem NO zu einer besseren bzw. ausgeprägteren Relaxation hätte beitragen können. Die Datenanalyse aus den Organbädern zeigte aber sogar eine schlechtere Relaxationsfähigkeit der DLA-1-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Einen klinischen Zusammenhang zur Relaxationsfähigkeit von Muskelzellen untersuchten Rudolph et al. 2007. Hier zeigte sich eine Korrelation zwischen erhöhten Plasmaspiegeln von MPO bei Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion, was demnach auch eine Verschlechterung der Relaxationsfähigkeit, hier des Herzmuskels, darstellt [84].

Ein sehr wichtiger Aspekt, der in diesem Zusammenhang ebenfalls diskutiert werden sollte, ist die gleichzeitige Betrachtung der Resultate aus dem ELISA-Testverfahren.

Die Ergebnisse des ELISA aus dem Knochenmark zeigten einen ähnlichen Gehalt von MPO in den PNM von Wildtyptieren und DLA-1-Mäusen. Doch untersuchte man den MPO-Gehalt in den PMN im Plasma zeigte sich gar eine Erhöhung der MPO-Konzentration der DLA-1-Tiere im Vergleich zu den Wildtypen. Das könnte daraus resultieren, dass durch die

Veränderung der DNA-Struktur in der DLA-1-Maus zwar die Fähigkeit der katalytischen Aktivität vermindert worden ist, aber kompensatorisch die Freisetzung bzw. Ausschüttung von MPO in das Plasma erhöht wurde. Das freigesetzte MPO ist wie bereits erläutert weniger katalytisch aktiv, aber dennoch könnte es somit einen Einfluss auf die Gefäßfunktion und die Relaxationsfähigkeit haben und diese verschlechtern, in dem es zum Beispiel wie oben beschrieben das für die Gefäßrelaxation notwendige NO konsumiert und dessen Bioverfügbarkeit somit reduziert und zwar in höherem Maße als dies in der Wildtyp-Maus der Fall ist.

Hier stellt sich nun wieder die Frage, ob und inwiefern nun auch extrakatalytische Mechanismen dazu beitragen, die Gefäßfunktion in den mutierten Mäusen zu beeinflussen.

Klinke A. konnte zeigen, dass MPO einen direkten Einfluss auf die Rekrutierung von PMN hat. Dies geschieht durch eine elektrostatische Interaktion, welche durch das kationisch vorliegende MPO und der anionisch geladenen Glykokalyx auf der Membran der PMN zu Stande kommt. Hier vermittelt also eine elektrostatische Anziehung einen Effekt und nicht durch Katalyse entstandene reaktive Produkte von MPO [52].

Eine weitere extrakatalytische Funktion von MPO passiert durch eine direkte Bindung an ein Oberflächenmolekül auf PMN, das Integrin CD11b/CD18. Hierdurch werden PMN aktiviert, was dazu führt, dass intrazelluläre Signalkaskaden, wie die Phosphorylierung zellulärer Proteine, verstärkt ablaufen oder eine vermehrte Degranulation stattfinden. Zusätzlich kommt es zu einer vermehrten Expression weiterer CD11b-Integrine, sodass MPO synergistisch dazu, diese Wirkung der PMN über einen langen Zeitraum aufrechterhalten kann [47, 59, 60]. Diese extrakatalytischen Eigenschaften machen deutlich, wie MPO Einfluss auf die Rekrutierung und Aktivierung von PMN nimmt und schließlich mit der Akkumulierung dieser direkt zur vaskulären Inflammation und damit endothelialen Dysfunktion beiträgt. Wie bereits geschildert akkumuliert MPO im subendothelialen Raum und bleibt hier nun nicht nur lange katalytisch aktiv [8], sondern provoziert durch die rein elektrostatische Interaktion mit PMN eine vermehrte Produktion und Ausschüttung granulozytärer zytotoxischer Moleküle. Die hier zusätzlich wirkenden pro-inflammatorischen Eigenschaften potenzieren sich allmählich und stören physiologische Funktionen z.B. des Gefäßendothels zunehmend [76].

4.1. Ausblick

Als Konsequenz aus den hier gewonnenen Ergebnissen, vor allem denen aus der Bestimmung der Gefäßrelaxationsfähigkeit, stellt sich die Frage, ob sich die DLA-1-Maus nun wirklich eignet, um zu beurteilen, wie wichtig die katalytischen Eigenschaften im Vergleich zu nichtkatalytischen Eigenschaften sind, da die Peroxidase-Aktivität in den einzelnen Versuchen noch deutlich vorhanden ist.

Es wäre zu überlegen, die Menge an gebundenem MPO in den Aorten vor und nach der Relaxation zu bestimmen und weiter dann nach adhärenten und eingewanderten Leukozyten zu unterscheiden, welches eine Folge der extrakatalytischen Eigenschaften von MPO darstellen würde ^[52].

Weiterhin könnte man den Nachweis der tatsächlichen NO-Bioverfügbarkeit in den Aorten vornehmen, da diese in Abhängigkeit mit der Möglichkeit zur Relaxation steht.

Welche Therapie-Strategien können nun mit Hilfe dieser Arbeit vorsichtig beschrieben werden?

Es wurde ausführlich dargelegt, dass alle Untersuchungen, die zur Charakterisierung der DLA-1-Maus beigetragen haben, nicht signifikant entscheiden lassen, welchen genauen Beitrag nun jeweils katalytische und nicht-katalytische Eigenschaften haben. Diese Unterscheidung stellt eine enorme Bedeutung dar, um klinische Strategien formulieren zu können.

Eine Therapiestrategie, die sich hier nun stellt, wäre, ob es eine Möglichkeit gibt, die mikrobiziden und damit die zur Immunabwehr beitragenden Eigenschaften temporär zu nutzen und gleichzeitig durch zum Beispiel Heparin-artige Moleküle die MPO-Proteine wieder vom Gefäßendothel abzulösen. Somit könnten dann die katalytischen Eigenschaften gedrosselt werden, indem man die Grundlage einer gestörten endothelialen Siganalkaskade wieder entfernt. Die Akkumulierung von MPO im subendothelialen Raum müsste ebenfalls gehemmt werden, damit dann auch die extrakatalytischen Wirkungen, wie beispielsweise eine andauernde Rekrutierung vom PMN, reduziert werden könnten.

Einen vielversprechenden Ansatz zeigen hier Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe T.K.Rudolph. Hier wurde untersucht, dass die Polysaccharide Heparin und auch fraktioniertes

Heparin um die Bindung an Heparan-Glykosaminoglykane an der Oberfläche des Gefäßendothels, welche ebenfalls Zielstruktur von MPO darstellt, konkurrieren. Es wurde einerseits gezeigt, dass das fraktionierte Heparin, Enoxaparin, in der Lage ist einmal gebundenes MPO vom Endothel wieder abzulösen und, durch gemessene erhöhte Bioverfügbarkeit von NO, schließlich zur Verbesserung der endothelialen Funktion beiträgt [80]. Andererseits konnte auch gezeigt werden, dass es bei Patienten mit stabiler KHK durch die Mobilisierung von MPO vom Gefäßendothel durch Heparinisierung zu einer ausgeprägten koronaren Plaquebelastung kommt - ein Beweis, dass MPO einen wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Arteriosklerose spielt [81]. Ein Strategieansatz wäre demnach heparinartige Moleküle zu entwickeln und genauer zu analysieren, die demnach keine gerinnungshemmenden Eigenschaften mehr besitzen, und die eingesetzt werden könnten, um MPO vom Endothel zu lösen, um dann gegen die extrakatalytische Wirkung von MPO anzugehen.

5. Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit hat die transgene DLA-1-Maus in Bezug auf ihre Peroxidase-Aktivität und weitere Eigenschaften wie zum Beispiel die Chlorinierungsaktivität, die Konsumption von NO oder die Relaxations- bzw. Kontraktionsfähigkeit der murinen Aorta, untersucht.

Die Besonderheit der DLA-1-Versuchstiere liegt in einer Mutation in der Nähe des aktiven Zentrums der Myeloperoxidase. Dieser Aminosäureaustausch von Methionin nach Threonin führt zu einer reduzierten enzymatischen Aktivität des Enzyms. Diese Mutation sollte dazu beitragen, Myeloperoxidase-Aktivität gesondert untersuchen zu können, bzw. hier teilweise auszuschalten um detaillierter betrachten zu können, welche Eigenschaften allein von der Präsenz des Proteins, somit extra-katalytisch, abhängig sind. Eine erstmalige Charakterisierung der transgenen DLA-1-Maus sollte nun die Möglichkeit eröffnen, den Einfluss der katalytisch-modifizierten MPO in-vivo zu betrachten.

Das leukozytäre Enzym Myeloperoxidase ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunabwehr durch hilfreiche bakterizide Eigenschaften. Myeloperoxidase ist aber auch als ein Schlüsselenzym bei der Genese und Progression der Arteriosklerose anerkannt, und trägt entscheidend zur endothelialen Dysfunktion bei. Die ausgeprägten pro-inflammatorischen Eigenschaften dieses Enzyms haben einen bedeutenden Einfluss auf das kardiovaskuläre System.

Die durchgeführten Versuche konnten die Arbeit anderer Forschungsgruppen bestätigen, nämlich das die Mutation einen entscheidenden Einfluss auf die katalytische Aktivität hat. Vor allem die Fähigkeit Chlorid zu oxidieren, war auch hier signifikant reduziert. Chlorid dient MPO zur Herstellung von hypochloriger Säure. Diese ist ein bekanntes agressives Oxidans, wirkt toxisch auf fremde Mikroorganismen, aber auch auf körpereigene Strukturen und trägt zum Beispiel durch Chlorinierung verschiedener vaskulärer Bestandteile zu Irritationen des Gefäßendothels bei. Die gestörte Gefäßantwort, die vor allem durch die reduzierte Bioverfügbarkeit des wichtigen vasodilatorisch-wirkenden Stickstoffmonoxids bedingt ist, konnte durch Messung der Relaxations- und Kontraktionsfähigkeit gezeigt werden. All diese Irritationen sind sehr vielschichtig und münden letztlich in eine endotheliale Dysfunktion des Gefäßes, die im weiteren Verlauf endotheliale Inflammation begünstigen und zur Entstehung der Arteriosklerose betragen.

Zusammenfassung

Diese Arbeit muss als vorausgreifende Untersuchung gewertet werden, da sich gezeigt hat, dass trotz des Aminosäureaustausches im Aktiven Zentrum des Enzyms teilweise noch erhebliche katalytische Restaktivität in der transgenen Maus zu finden war. Diese Restaktivität bewirkt, dass keine vollständigen Aussagen darüber zu treffen sind, welche Eigenschaften nun wirklich allein von der Präsenz des Enzyms ohne katalytisch-aktive Fähigkeiten hervorgehen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Ach Acetylcholin

cGMP Guanosinmonophosphat

Cl⁻ Chlorid

DLA-1 Denise-LAu-1

ELISA enzyme-linked immunosorbent essay

eNOS endothelialen NO-Synthase

H₂O Wasser

H₂O₂ Wasserstoffperoxid

HDL High-Density Lipoprotein

HOCl hypochlorige Säure

ICAM-1 intracellular adhesion molecule-1

ICD Classification of Diseases and Related Health Problems

IL InterleukinKCl KaliumchloridkDa Kilodalton

KHK koronare Herzkrankheit LDL Low-Density-Lipoprotein

Met Methionin

MMP Matrixmetalloproteinasen

MPO Myeloperoxidase

MPO -/- Myeloperoxidase Knock-Out

NADPH Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form) NF-κB nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells

NO Stickstoffmonoxid

NO₂ Nitrit

NO₂ Stickstoffdioxid NO₂Tyr Nitrotyrosin

 O_2 . Superoxidradikalanion PGF Prostaglandin-F-2 α

PMN Polymorphkernige neutrophile Granulozyten

R Radikalintermediate

ROS reaktive Sauerstoffspezies sGC lösliche Guanylatzyklase

Thr Threonin

TMB Tetramethylbenzidin TNF- α Tumornekrosefaktor α

TXA₂ Thromboxan-A2

VCAM-1 vascular cell adhesion molecule-1

vWF von Willebrand-Faktor

WHO Weltgesundheitsorganisation

WT Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die dreidimensionale Struktur der homodimeren Myeloperoxidase mit
	hervorgehobenen Hämmolekülen, Alpha-Helices und Beta-Faltblatt-
	Strukturen (Lau, D. et al., Pharm Ther, 2006)
Abbildung 2:	MPO-katalysierte Reaktionen 1. (mod. nach Klinke, A.: Bedeutung der
	Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten, 2009)
Abbildung 3:	MPO-katalysierte Reaktion 2. (mod. nach Klinke, A.: Bedeutung der
	Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten, 2009)
Abbildung 4:	MPO-Modell der DLA-1-Maus mit Aminosäureaustausch von
	Methionin ²⁴³ nach Threonin ²⁴³ . (mod. nach Furtmüller. P.G. et al.:
	Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases.
	Arch Biochem Biophys, 2006)
Abbildung 5:	Peroxidase-Aktivität von isolierten PMN aus dem Knochenmark
	bestimmt mittels TMB-Assay
Abbildung 6:	Peroxidase-Aktivität von isolierten PMN aus dem Blut bestimmt mittels
	TMB-Assay
Abbildung 7:	Chlorinierungs-Aktivität von isolierten PMN aus Knochenmark
	gemessen in Relativer Fluoreszenz-Intensität (RFI)
Abbildung 8:	Chlorinierungs-Aktivität von isolierten PMN aus Blut gemessen in
	Relativer Fluoreszenz-Intensität (RFI)
Abbildung 9:	NO-Konsumption von PMN aus Knochenmark gemessen mittels NO-
	Elektrode
Abbildung 10:	NO-Konsumption von PMN aus Blut gemessen mittels NO-Elektrode
Abbildung 11:	MPO-ELISA aus Knochenmark
Abbildung 12:	MPO-ELISA aus Plasma
Abbildung 13:	Endothelabhängige Relaxationsfähigkeit der Aorten von Tieren ohne
	Vorbehandlung und mit Angiotensin II (ATII) Vorbehandlung in
	Reaktion auf aufsteigende Konzentrationen von Acetylcholin
Abbildung 14:	Endothelunabhängige Relaxationsfähigkeit der Aorten von Tieren ohne
	Vorbehandlung und mit Angiotensin II (ATII) Vorbehandlung in
	Reaktion auf aufsteigende Konzentrationen von Nitroglycerin

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gesamtleukozyten im Blut (Zellen/ml)

Tabelle 4: PMN im Knochenmark (Zellen/ml)

Tabelle 5: PMN im Blut (Zellen/ml)

- 1. Abu-Soud, H.M. and S.L. Hazen, *Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37524-32.
- 2. Alberts, B., Molekularbiologie der Zelle. Wiley-VCH, Weinheim [u.a.], 4. Aufl., edition, 2004.
- 3. Askari, A.T., et al., Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. J Exp Med, 2003. **197**(5): p. 615-24.
- 4. Assmann, G., et al., Coronary heart disease: reducing the risk: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease. Circulation, 1999. **100**(18): p. 1930-8.
- 5. Backhaus, K., Multivariate Analysemethoden. Eine anwendungsorientierte Einführung. 11. überarbeitete Auflage. Springer. Berlin 2006.
- 6. Baker, L., et al., *The role of estrogen in cardiovascular disease*. J Surg Res, 2003. **115**(2): p. 325-44.
- 7. Baldus, S., et al., 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, 2002. **33**(7): p. 1010.
- 8. Baldus, S., et al., Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. J Clin Invest, 2001. **108**(12): p. 1759-70.
- 9. Baldus, S., et al., *Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes*. Circulation, 2003. **108**(12): p. 1440-5.
- 10. Baldus, S., et al., *Myeloperoxidase enhances nitric oxide catabolism during myocardial ischemia and reperfusion*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(6): p. 902-11.
- 11. Baldus, S., et al., Oxypurinol improves coronary and peripheral endothelial function in patients with coronary artery disease. Free Radic Biol Med, 2005. **39**(9): p. 1184-90.
- 12. Bauersachs, J. and A. Schafer, *Endothelial dysfunction in heart failure: mechanisms and therapeutic approaches*. Curr Vasc Pharmacol, 2004. **2**(2): p. 115-24.
- 13. Bergt, C., et al., *The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(35): p. 13032-7.
- 14. Bombeli, T., B.R. Schwartz, and J.M. Harlan, Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIbIIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alphavbeta3 integrin, and GPIbalpha. J Exp Med, 1998. **187**(3): p. 329-39.
- 15. Brown, K.E., E.M. Brunt, and J.W. Heinecke, *Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in Kupffer cells of human liver*. Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2081-8.
- 16. Buffon, A., et al., Widespread coronary inflammation in unstable angina. N Engl J Med, 2002. **347**(1): p. 5-12.
- 17. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.* Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
- 18. Celermajer, D.S., *Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible?* J Am Coll Cardiol, 1997. **30**(2): p. 325-33.
- 19. Cybulsky, M.I., et al., *A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis.* J Clin Invest, 2001. **107**(10): p. 1255-62.

- 20. Dancu, M.B., et al., Asynchronous shear stress and circumferential strain reduces endothelial NO synthase and cyclooxygenase-2 but induces endothelin-1 gene expression in endothelial cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(11): p. 2088-94.
- 21. Daugherty, A., et al., *Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions.* J Clin Invest, 1994. **94**(1): p. 437-44.
- 22. Deby-Dupont G, D.C., Lamy M, *Neutrophil myeloperoxidase revisited: it's role in health and disease.* Intensivmed, 1999. **36**: p. 500-513.
- 23. Diodati, J.G., et al., *Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans*. Circulation, 1998. **98**(1): p. 17-24.
- 24. Domigan, N.M., et al., *Chlorination of tyrosyl residues in peptides by myeloperoxidase and human neutrophils.* J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 16542-8.
- 25. Dong, Z.M., et al., *The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 145-52.
- 26. Eiserich, J.P., et al., *Myeloperoxidase*, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. Science, 2002. **296**(5577): p. 2391-4.
- 27. Eiserich, J.P., et al., Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. Nature, 1998. **391**(6665): p. 393-7.
- 28. Everse, J., *The structure of heme proteins Compounds I and II: some misconceptions.* Free Radic Biol Med, 1998. **24**(7-8): p. 1338-46.
- 29. Fenna, R., J. Zeng, and C. Davey, *Structure of the green heme in myeloperoxidase*. Arch Biochem Biophys, 1995. **316**(1): p. 653-6.
- 30. Furtmuller, P.G., et al., *Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases*. Arch Biochem Biophys, 2006. **445**(2): p. 199-213.
- 31. Galis, Z.S., et al., Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
- 32. Ganz, T., Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(5): p. 390-5.
- 33. Giles, T.D., Aspects of nitric oxide in health and disease: a focus on hypertension and cardiovascular disease. J Clin Hypertens (Greenwich), 2006. **8**(12 Suppl 4): p. 2-16.
- 34. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis.* Am J Pathol, 1999. **155**(1): p. 1-5.
- 35. Goldbourt, U. and H.N. Neufeld, *Genetic aspects of arteriosclerosis*. Arteriosclerosis, 1986. **6**(4): p. 357-77.
- 36. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis*. Metabolism, 1977. **26**(11): p. 1257-75.
- 37. Hampton, M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn, *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing.* Blood, 1998. **92**(9): p. 3007-17.
- 38. Hansson, G.K., A.K. Robertson, and C. Soderberg-Naucler, *Inflammation and atherosclerosis*. Annu Rev Pathol, 2006. 1: p. 297-329.
- 39. Harrison, J.E. and J. Schultz, *Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase*. J Biol Chem, 1976. **251**(5): p. 1371-4.
- 40. Hazell, L.J. and R. Stocker, Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. Biochem J, 1993. **290** (**Pt 1**): p. 165-72.
- 41. Hazen, S.L., et al., *Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis*. J Clin Invest, 1996. **98**(6): p. 1283-9.

- 42. Heit, An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. J Cell Biol, 2002. **159**: p. 91-102.
- 43. Henderson, J.P., 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, 1999. **274**(47): p. 33440-8.
- 44. Heymans, S., et al., *Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases* prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. Nat Med, 1999. 5(10): p. 1135-42.
- 45. Hickman-Davis, J.M., J.R. Lindsey, and S. Matalon, *Cyclophosphamide decreases* nitrotyrosine formation and inhibits nitric oxide production by alveolar macrophages in mycoplasmosis. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6401-10.
- 46. Iuliano, L., et al., Radiolabeled native low-density lipoprotein injected into patients with carotid stenosis accumulates in macrophages of atherosclerotic plaque: effect of vitamin E supplementation. Circulation, 2000. **101**(11): p. 1249-54.
- 47. Johansson, M.W., et al., *Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18)*. J Cell Sci, 1997. **110 (Pt 9)**: p. 1133-9.
- 48. Kettle, A.J., C.J. van Dalen, and C.C. Winterbourn, *Peroxynitrite and myeloperoxidase leave the same footprint in protein nitration*. Redox Rep, 1997. **3**(5-6): p. 257-8.
- 49. Kettle, A.J. and C.C. Winterbourn, *A kinetic analysis of the catalase activity of myeloperoxidase*. Biochemistry, 2001. **40**(34): p. 10204-12.
- 50. Khoo, J.C., et al., Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation. Arteriosclerosis, 1988. **8**(4): p. 348-58.
- 51. Klebanoff, S.J., *Myeloperoxidase*. Proc Assoc Am Physicians, 1999. **111**(5): p. 383-9.
- 52. Klinke, A., et al., *Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces*. Blood. **117**(4): p. 1350-8.
- 53. Kooter, I.M., et al., The Met243 sulfonium ion linkage is responsible for the anomalous magnetic circular dichroism and optical spectral properties of myeloperoxidase. J Biol Inorg Chem, 1999. 4(6): p. 684-91.
- 54. Kooter, I.M., et al., *The sulfonium ion linkage in myeloperoxidase. Direct spectroscopic detection by isotopic labeling and effect of mutation.* J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 26794-802.
- 55. Kronenberg, F., et al., *Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study.* Circulation, 1999. **100**(11): p. 1154-60.
- 56. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
- 57. Lamb, N.J., et al., Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination. Crit Care Med, 1999. **27**(9): p. 1738-44.
- 58. Lanza, F., *Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(10): p. 676-81.
- 59. Lau, D. and S. Baldus, *Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease*. Pharmacol Ther, 2006. **111**(1): p. 16-26.
- 60. Lau, D., et al., Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 431-6.
- 61. Leeuwenburgh, C., et al., Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. J Biol Chem, 1997. **272**(3): p. 1433-6.

- 62. Libby, P., Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. Am J Cardiol, 2000. **86**(8B): p. 3J-8J; discussion 8J-9J.
- 63. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
- 64. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
- 65. Lindemann, S., et al., NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression. Thromb Res, 2000. **97**(3): p. 113-23.
- 66. Marletta, M.A., *Nitric oxide: biosynthesis and biological significance*. Trends Biochem Sci, 1989. **14**(12): p. 488-92.
- 67. Moncada, S. and A. Higgs, *The L-arginine-nitric oxide pathway*. N Engl J Med, 1993. **329**(27): p. 2002-12.
- 68. Nagel, T., et al., Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. J Clin Invest, 1994. **94**(2): p. 885-91.
- 69. Navab, M., et al., *The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL.* J Lipid Res, 2004. **45**(6): p. 993-1007.
- 70. Nie, Q., et al., Inhibition of mononuclear cell recruitment in aortic intima by treatment with anti-ICAM-1 and anti-LFA-1 monoclonal antibodies in hypercholesterolemic rats: implications of the ICAM-1 and LFA-1 pathway in atherogenesis. Lab Invest, 1997. 77(5): p. 469-82.
- 71. Olsson, I. and P. Venge, *The role of the human neutrophil in the inflammatory reaction*. Allergy, 1980. **35**(1): p. 1-13.
- 72. Pepine, C.J., *The impact of nitric oxide in cardiovascular medicine: untapped potential utility.* Am J Med, 2009. **122**(5 Suppl): p. S10-5.
- 73. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium*. Lancet, 1987. **2**(8567): p. 1057-8.
- 74. Rajavashisth, T.B., et al., Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. Circulation, 1999. **99**(24): p. 3103-9.
- 75. Roman, R.M., A.E. Wendland, and C.A. Polanczyk, *Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice*. Arq Bras Cardiol, 2008. **91**(1): p. e11-9.
- 76. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
- 77. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
- 78. Ross, R. and J.A. Glomset, Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. Science, 1973. **180**(93): p. 1332-9.
- 79. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(8): p. 420-5.
- 80. Rudolph, T.K., et al., *Liberation of vessel adherent myeloperoxidase by enoxaparin improves endothelial function*. Int J Cardiol, 2010. **140**(1): p. 42-7.
- 81. Rudolph, T.K., et al., *Liberation of vessel-adherent myeloperoxidase reflects plaque burden in patients with stable coronary artery disease*. Atherosclerosis, 2013. **231**(2): p. 354-8.
- 82. Rudolph, T.K., et al., *Myeloperoxidase deficiency preserves vasomotor function in humans*. Eur Heart J, 2012. **33**(13): p. 1625-34.

- 83. Rudolph, V., et al., *Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation*. Nat Med. **16**(4): p. 470-4.
- 84. Rudolph, V., et al., *Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function.* Free Radic Biol Med, 2007. **43**(8): p. 1189-96.
- 85. Schmitt, D., et al., Leukocytes utilize myeloperoxidase-generated nitrating intermediates as physiological catalysts for the generation of biologically active oxidized lipids and sterols in serum. Biochemistry, 1999. **38**(51): p. 16904-15.
- 86. Shao, B., et al., *Methionine oxidation impairs reverse cholesterol transport by apolipoprotein A-I.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(34): p. 12224-9.
- 87. Smith, J.A., *Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword.* J Leukoc Biol, 1994. **56**(6): p. 672-86.
- 88. Statistisches-Bundesamt, *Zahl der Todesfälle im Jahr 2013 um 2,8 % gestiegen.* Statistisches-Bundesamt-Pressemitteilung Nr. 421 vom 27.11.2014, 2014.
- 89. Sugiyama, S., et al., *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, 2004. **24**(7): p. 1309-14.
- 90. Tabas, I., Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. J Clin Invest, 2002. **110**(7): p. 905-11.
- 91. Taylor, K.L., et al., *Isolation and identification of a protoheme IX derivative released during autolytic cleavage of human myeloperoxidase.* Arch Biochem Biophys, 1995. **316**(1): p. 635-42.
- 92. Trepels, T., A.M. Zeiher, and S. Fichtlscherer, *The endothelium and inflammation*. Endothelium, 2006. **13**(6): p. 423-9.
- 93. Uzui, H., et al., *Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines.* Circulation, 2002. **106**(24): p. 3024-30.
- 94. Van Der Vliet, A., et al., *Myeloperoxidase and protein oxidation in cystic fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(3): p. L537-46.
- 95. Vasilyev, N., et al., Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. Circulation, 2005. **112**(18): p. 2812-20.
- 96. Vissers, M.C. and C. Thomas, *Hypochlorous acid disrupts the adhesive properties of subendothelial matrix.* Free Radic Biol Med, 1997. **23**(3): p. 401-11.
- 97. von Haehling, S., et al., *Inflammatory biomarkers in heart failure revisited: much more than innocent bystanders.* Heart Fail Clin, 2009. **5**(4): p. 549-60.
- 98. von Leitner, E.C., et al., *Pathogenic cycle between the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetrical dimethylarginine and the leukocyte-derived hemoprotein myeloperoxidase*. Circulation, 2011. **124**(24): p. 2735-45.
- 99. Witko-Sarsat, V., et al., *Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects*. Lab Invest, 2000. **80**(5): p. 617-53.
- 100. Xu, X.P., et al., Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. Circulation, 1999. **99**(8): p. 993-8.
- 101. Yang, J., et al., *L-arginine chlorination results in the formation of a nonselective nitric-oxide synthase inhibitor.* J Pharmacol Exp Ther, 2006. **318**(3): p. 1044-9.
- 102. Yudkin, J.S., et al., *C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines*

- originating from adipose tissue? Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(4): p. 972-8.
- 103. Zederbauer, M., et al., *Heme to protein linkages in mammalian peroxidases: impact on spectroscopic, redox and catalytic properties.* Nat Prod Rep, 2007. **24**(3): p. 571-84.
- 104. Zeiher, A.M., et al., Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. Circulation, 1991. **83**(2): p. 391-401.
- 105. Zeiher, A.M., et al., *Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells.* Circ Res, 1995. **76**(6): p. 980-6.
- 106. Zelzer, S., et al., Myeloperoxidase as serum marker for detection of CMV infections and rejections in patients after liver or heart transplantation. Transpl Immunol, 2009. **20**(3): p. 121-6.

10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stephan Baldus für die Chance in seiner Arbeitsgruppe eine Dissertation machen zu dürfen. Die intensive Betreuung, das Vertrauen in das Thema und meine Arbeit und auch die ständige Motivation haben mich sehr darin bestärkt auch in Zukunft der Kardiologie stets verbunden zu bleiben.

Ein ganz großer Dank gilt auch Dr. Anna Klinke, die mir unermüdlich zur Seite stand, sich immer ganz viele Gedanken zu meinem Thema gemacht hat und bei der Begutachtung meiner Arbeit sehr geduldig war. Sie hat mir auch über eine große räumliche Distanz stets die allerbeste fachliche Betreuung und Unterstützung garantiert.

Ich danke ebenfalls all den Kollegen, die mich während meiner ganzen Zeit im Labor fachlich und persönlich unterstützt haben. Für eine ganz besondere Zeit, die ich nie vergessen werde, bedanke ich mich bei Hartwig Wieboldt, Lisa Romane und Denise Lau.

Herzlichen Dank auch an meinen Bruder Florian für die Einführung in eine für mich manchmal unverständliche Materie der Statistik und auch für das kritische Betrachten dieser Arbeit aus einem anderen Blickwinkel heraus.

Bei meinen Eltern, Helmut und Dorothea, und auch bei meinen Geschwistern, Florian und Maya, möchte ich mich ganz besonders bedanken. Ihr habt mich nicht nur bei dieser Doktorarbeit unterstützt, sondern habt mich in allem, dass ich getan habe und tue immer bestärkt und mir auch immer ermöglicht meinen Weg zu gehen.

11. Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

Eidesstattliche Erklärung

12. Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift:	
---------------	--