

Aus dem Herzzentrum der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. St. Baldus

Die Bedeutung der Myeloperoxidase für die Rekrutierung splenischer Monozyten im Rahmen einer akuten myokardialen Ischämie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Immanuel Erdmann
aus Kempen

promoviert am 04. Dezember 2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. M. Adam
2. Gutachter: Professor Dr. rer. nat. G. F. Sengle

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.¹

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Dr. Vera Peters
Herr Dr. Martin Mollenhauer

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Die in dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir selbst mit Unterstützung von Frau Peters durchgeführt worden.

Vor Beginn meiner Arbeit erfolgte eine Einarbeitung in die Arbeiten in der Zellkultur, sowie in die Arbeiten mit Proteinen und Nukleinsäuren durch Herrn Simon Grimm und durch Frau Nadja Kulesza. Die Operationen und Organentnahmen an den Versuchstieren sind von Herrn Simon Grimm durchgeführt worden. Die Probenaufbereitung sowie die Durchführung der durchflusszytometrischen Versuche und des ELISA erfolgten gemeinsam durch mich und Frau Peters. Das Protokoll zur Probenaufbereitung wurde uns von der AG Winkels unseres Labors zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung und Stimulation der Monozyten-Zelllinie sowie die Migrations-Assays habe ich selbstständig durchgeführt, wobei ich teilweise von Frau Peters unterstützt wurde. Die Versuche mit Nukleinsäuren und Proteinen (Western-Blot Analysen, RNA-Isolation, qPCR) habe ich nach entsprechender Einarbeitung selbst durchgeführt. Die statistische Auswertung mittels GraphPad Prism übernahm Frau Peters mit Unterstützung von Herrn Mollenhauer und mir.

Die Isolation der extrazellulären Vesikel mittels Ultrazentrifugation und Größenausschluss-Chromatographie habe ich ebenfalls selbstständig durchgeführt. Bei der Entwicklung des Isolationsprotokolls habe ich Unterstützung von Frau Peters und Herrn Dr. Daniel Bachurski erhalten. Die Nanopartikel-Tracking Analyse wurde von Herrn Bachurski durchgeführt und die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte durch die CECAD Imaging Facility der Universität zu Köln. Die Untersuchung des Proteoms der extrazellulären Vesikel mittels Massenspektrometrie wurde durch Herrn Dr. Jan-Wilm Lackmann von der Proteomics Core Facility der Universität zu Köln durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 16.07.2024

Unterschrift:

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben und zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Zunächst danke ich Herrn Dr. Martin Mollenhauer und Herrn PD Dr. Matti Adam für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Planung des Projektes.

Ich danke Frau Dr. Vera Peters für die Anleitung bei zahlreichen Experimenten, die Geduld bei meinen Nachfragen und für eine großartige Zusammenarbeit vom ersten Brainstorming bis hin zur gemeinsamen Publikation.

Außerdem danke ich allen technischen Assistentinnen und Assistenten der AG Baldus, insbesondere jedoch Simon Grimm, Nadja Kulesza und Christina Vosen, für die Einarbeitung in die Methoden und für die unersetzbare, technische Unterstützung bei meinen Versuchen

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Daniel Bachurski für die Unterstützung bei der Erstellung des Isolationsprotokolls und für die Hilfe bei der Einarbeitung in das Gebiet der extrazellulären Vesikel.

Ebenfalls danken möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der AG Baldus sowie der AG Winkels für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Ganz besonders danke ich David und Wibke für die Unterstützung in frustrierenden Zeiten und für das gegenseitige Mut machen in unseren Kaffeepausen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die schon mein ganzes Leben für mich da ist, immer hinter mir steht und deren Liebe und Unterstützung mich zu demjenigen gemacht hat, der ich heute bin. Diese Arbeit wäre ohne euch niemals möglich gewesen. Danke an Mama, Papa, Hannah, Elias und Jonathan.

Ich danke allen meinen Freundinnen und Freunden, die mein Leben bereichern und schöner machen. Danke an Isa, Olli, Konsti, Jan und viele mehr.

Und danke an Hanna. Für dein Korrekturlesen, deine Geduld und dafür, dass du an meiner Seite bist.

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern Georg und Renate Erdmann

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. ZUSAMMENFASSUNG	14
2. EINLEITUNG	16
2.1. Epidemiologie und gesundheitsökonomische Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen	16
2.2. Der akute Myokardinfarkt	17
2.2.1. Definition	17
2.2.2. Klinik und Diagnostik	18
2.2.3. Therapie und Prognose	19
2.2.4. Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes	21
2.2.5. Die Rolle der Monozyten	22
2.3. Die Myeloperoxidase	26
2.3.1. Aufbau und Funktion	26
2.3.2. Die Myeloperoxidase bei kardiovaskulären Erkrankungen	29
2.4. Extrazelluläre Vesikel	30
2.5. Vordaten aus unserem Labor	34
2.6. Zielsetzung dieser Dissertation	37
3. MATERIAL UND METHODEN	38
3.1. Material	38
3.1.1. Verwendete Kits und Assays	38
3.1.2. Verwendete Geräte	38
3.1.3. Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	40
3.2. In vivo Experimente	42
3.2.1. Myokardinfarkt-Modell mittels permanenter LAD Ligatur	42
3.2.2. Immunzellen-Durchflusszytometrie	43
3.2.3. MPO-Plasma-ELISA	45
3.3. In vitro Experimente	46
3.3.1. Kultivierung humaner THP-1 Monozyten	46
	6

3.3.2.	Stimulation der THP-1 Monozyten	46
3.3.3.	Migrations-Assay	46
3.3.4.	Genexpressionsanalysen	47
3.4.	Isolation und Charakterisierung Myokardinfarkt-assoziiertes EV	49
3.4.1.	Ultrazentrifugation	49
3.4.2.	Transmissionselektronenmikroskopie	51
3.4.3.	Nanopartikel Tracking Analyse	51
3.4.4.	Western Blot Analysen	51
3.4.5.	Größenausschluss-Chromatographie	54
3.4.6.	Micro BCA-Assay	55
3.4.7.	Mikropartikel-basierte Durchflusszytometrie der SEC-Fraktionen	56
3.5.	Massenspektrometrische Untersuchung der EV	57
4.	ERGEBNISSE	58
4.1.	MPO-Plasma-Level sind bei Wildtyp-Mäusen nach Myokardinfarkt erhöht	58
4.2.	Die Mobilisation splenischer Monozyten nach myokardialer Ischämie ist bei MPO ^{-/-} -Mäusen reduziert.	58
4.3.	Inkubation mit MPO und H ₂ O ₂ erhöht die Expression des Chemokinrezeptors CCR2 in THP-1 Monozyten	61
4.4.	MPO verstärkt die Migration von THP-1 Monozyten in vitro	62
4.5.	Effektivität des EV-Isolationsprotokolls	64
4.5.1.	Visualisierung der EV-Größenverteilung nach Ultrazentrifugation mittels TEM und NTA	64
4.5.2.	Nachweis von EV-Markerproteinen mittels Western-Blot Analysen	65
4.5.3.	Nachweis endothelialer und neutrophiler Oberflächenmarker in den EV-Suspensionen	66
4.5.4.	Reduktion der Proteinkontamination nach SEC	66
4.5.5.	Nachweis zahlreicher EV-assoziiertes Proteine in den EV-enthaltenden SEC-Fraktionen	69
5.	DISKUSSION	71
5.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	71
5.2.	Die Mobilisation splenischer Ly6C ^{high} -Monozyten ist teilweise über MPO vermittelt	72
5.3.	MPO verstärkt die Migration humaner THP-1 Monozyten in vitro durch Induktion des Chemokin-Rezeptors CCR2	74

5.4. Eine Kombination aus differenzieller Ultrazentrifugation und Größenausschluss-Chromatographie ermöglicht die Proteom-Analyse Myokardinfarkt-assoziiertes extrazellulärer Vesikel	77
5.5. Limitationen und Ausblick	79
5.6. Fazit	81
6. LITERATURVERZEICHNIS	82
7. ANHANG	94
7.1. Proteine der EV-Proben	94
7.2. Abbildungsverzeichnis	106
7.3. Tabellenverzeichnis	108
8. VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	109

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ADP	Adenosin-Diphosphat
ALIX	ALG2-interagierendes Protein X
BCA	Bicinchoninsäure-Assay
Br ⁻	Bromid
BSA	Bovines Serumalbumin
CABG	Coronary Artery Bypass Graft
CAD	Coronary Artery Disease
CCL7	CC-Chemokinrezeptor-Ligand 7
CCR2	CC-Chemokinrezeptor 2
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA (Desoxyribonukleinsäure)
Cl ⁻	Chlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C _t	Threshold Cycle
CX3CR1	C-X3-C-Motif Chemokin-Rezeptor
DAMP	Damage Associated Molecular Patterns
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EKG	Elektrokardiogramm
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ESC	European Society of Cardiology
EV	Extrazelluläre Vesikel
FMC	First medical contact
g	G-Zahl = rcf = relative Zentrifugalkraft
G	Gauge (Maß für die Größe von Kanülen und Spritzen)
GMP	Granulozyten/Monozyten-Progenitorzellen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
h	Stunde
HBSS	Hanks balancierte Salzlösung
HDL	High Density Lipoprotein
HOCl	Hypochlorige Säure
hs-cTn	high-sensitivity cardiac troponin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
ISEV	International Society for Extracellular Vesicles
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
L	Liter
LAD	Left Anterior Descending Artery
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	Molar
mA	Milliampere

MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinasen
MCP	Monozyten-Chemoattraktor-Protein
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MDP	Monozyten/Dendritische Zellen-Progenitorzellen
Mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
MISEV	Minimal information for studies of extracellular vesicles
mL	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MMR	Makrophagen-Mannose-Rezeptoren
MPO	Myeloperoxidase
MPO ^{-/-}	Myeloperoxidase-Knockout
MPS	Mononukleär-phagozytäres System
NaCl	Natriumchlorid
NET	Neutrophil extracellular traps
NF- κB	Nukleärer Faktor Kappa B
NMH	Niedermolekulares Heparin
NR4A1	Nukleärer Rezeptor 4A1
ns	nicht signifikant
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitors
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Percutaneous coronary intervention

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDF	Portable Document Format
PFA	Paraformaldehyd
PPP	Platelet-poor Plasma
PRR	Pattern Recognition Receptors
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBC	Red Blood Cell
Rcf	Relative centrifugal force
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative PCR
SCN ⁻	Thiocyanat
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SEC	Size Exclusion Chromatography
SEM	Standard Error of the Mean
SGLT2	Sodium-Glucose-Co-Transporter 2
STEMI	ST-Segment Elevated Myocardial Infarction
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TIF	Tagged Image File
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TSG	Tumor Susceptibility Gene
UC	Ultrazentrifugation

UFH	Unfraktioniertes Heparin
V	Volt
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Der akute Myokardinfarkt ist eine Erkrankung mit hoher Morbidität und Mortalität, welche mit schwerwiegenden Gefahren für das Individuum und hohen Kosten für die Gesellschaft verbunden ist. Trotz vielversprechender Fortschritte in Diagnostik und Therapie sind weiterhin hohe Sterbezahlen und Hospitalisationsraten aufgrund von Folgeerkrankungen wie der Herzinsuffizienz zu verzeichnen. Bei einem Myokardinfarkt kommt es durch Sauerstoffmangel zu einer Unterversorgung des Myokards mit konsekutivem myokardialen Zellschaden. Anschließend folgt eine sterile Inflamationsreaktion mit Einwanderung zahlreicher Immunzellen in das Myokard. Diese Immunreaktion geht, obwohl zur Bildung einer Myokardnarbe erforderlich, mit teilweise überschießendem Zellschaden und verschlechterter Prognose einher. Bisherige Therapieansätze mit Modulation der inflammatorischen Aktivität zeigten sich vielversprechend, gingen aber mit teils schwerwiegenden Nebenwirkungen einher. Für das leukozytäre Enzym Myeloperoxidase (MPO) ist eine Beteiligung an den Entzündungsvorgängen nach einem Myokardinfarkt, sowie der Migration von Immunzellen nachgewiesen worden.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Bedeutung der MPO für die Rekrutierung der splenischen Monozyten nach einem Myokardinfarkt aufzuklären. Hierfür wurde ein murines Infarktmodell verwendet und mit Daten aus der Zellkultur ergänzt. In Wildtyp (WT)-Mäusen konnte nach einem Myokardinfarkt eine signifikant erhöhte Plasmakonzentration von MPO nachgewiesen werden. Eine durchflusszytometrische Analyse der Leukozyten von Milz und Herz ergab eine signifikant höhere Anzahl an Ly6C^{high}/CCR2⁺-Monozyten in der Milz von MPO^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen bei gleichzeitig geringerer Anzahl dieser Monozyten im Myokard einen Tag nach LAD-Ligatur. Analysen der RNA-Expression von THP-1-Monozyten ergaben eine signifikant höhere Expression des CCR2-Rezeptors nach Stimulation mit MPO und H₂O₂ und Migrations-Assays zeigten, dass nach Stimulation mit MPO bzw. MPO und H₂O₂ zudem eine höhere Migration entlang eines MCP-1-Gradienten erfolgte. Aufgrund zunehmender Hinweise auf die Bedeutung von extrazellulären Vesikeln (EV) für die Monozyten-Migration nach einem Myokardinfarkt wurde weiterhin ein Protokoll zur Isolation und anschließenden massenspektrometrischen Untersuchung von Plasma-EV entwickelt. Durch die Kombination aus Ultrazentrifugation und Größenausschluss-Chromatographie gelang eine Reduktion der Proteinkontamination bei gleichzeitigem Nachweis zahlreicher EV-assoziiierter Proteine in der Massenspektrometrie. Hierbei wurden unter anderem Proteine mit Bedeutung für den Energiestoffwechsel und die Zellmigration nachgewiesen.

Zusammenfassend wurde Evidenz für die Rolle der MPO als Mediator der Monozyten-Migration nach einem Myokardinfarkt über die Regulation des CCR2-Rezeptors gefunden. Eine Modulation der Immunreaktion mittels MPO-gerichteter Therapie könnte eine mögliche

Therapieoption nach einem Myokardinfarkt darstellen. Das etablierte EV-Isolationsprotokoll ermöglicht die massenspektrometrische Untersuchung Myokardinfarkt-assoziiierter Plasma-EV. Potentielle Unterschiede in der Zusammensetzung von WT- und MPO^{-/-}-EV können so in nachfolgenden Untersuchungen identifiziert werden.

2. Einleitung

2.1. Epidemiologie und gesundheitsökonomische Bedeutung kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit rund 17,9 Millionen Todesfällen pro Jahr bereits seit vielen Jahren die häufigste Todesursache weltweit ¹. Zu den häufigsten Entitäten der Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen gehört neben der chronischen, koronaren Herzkrankheit auch der akute Myokardinfarkt, welcher mit 4,4 % die vierthäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland darstellt ². Mit einer vollstationären Hospitalisationsrate von 235 pro 100.000 Einwohnern, einer Mortalitätsrate von 48,1 pro 100.000 Einwohnern und einer altersabhängigen Letalitätsrate von bis zu 45% stellt er eine der schwerwiegendsten Akuterkrankungen dar ^{2,3}. Neben gefährlichen Akutkomplikationen wie Klappenvitien, Herzrhythmusstörungen oder Ventrikelseptumrupturen ist insbesondere die Entstehung einer chronischen Herzinsuffizienz eine häufige Folge des Myokardinfarktes ⁴⁻⁷. Im Rahmen des Krankenhausaufenthaltes entwickeln 4-28 % der Patienten eine solche und selbst bei Patienten, die nach einem Myokardinfarkt ohne Herzinsuffizienz aus dem Krankenhaus entlassen werden, entsteht sie bei 20-30 % innerhalb eines Jahres nach dem initialem Ereignis ^{4,8,9}. Die Herzinsuffizienz wiederum ist in Deutschland der häufigste Grund für eine Krankenhauseinweisung und geht ihrerseits mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher ^{10,11}. Zusätzlich zu den Gefahren eines Myokardinfarktes und seiner Folgen für das Individuum ist er auch gesundheitsökonomisch relevant. So beliefen sich allein die Kosten für die Behandlung des akuten Myokardinfarktes in Deutschland im Jahr 2020 bereits auf rund 2,8 Milliarden Euro und aufgrund der Komplikationen und Folgeerkrankungen kommen anschließend noch weitaus höhere Kosten auf das Gesundheitssystem zu ¹². Hier sind beispielhaft die Kosten für die Behandlung der Herzinsuffizienz zu nennen, welche im selben Jahr bei rund 7,4 Milliarden Euro lagen. Auch insgesamt stellen die kardiovaskulären Erkrankungen in Deutschland mit rund 56,7 Milliarden Euro, entsprechend rund 13,1 % der gesamten Gesundheitskosten, die Gruppe mit den höchsten Gesundheitskosten pro Jahr dar. Aufgrund der stetig alternden Bevölkerung werden diese Zahlen in den nächsten Jahren voraussichtlich weiter steigen ^{12,13}.

2.2. Der akute Myokardinfarkt

2.2.1. Definition

Im pathologischen Sinne bezeichnet ein Myokardinfarkt den durch eine anhaltende Ischämie verursachten myokardialen Zelltod¹⁴. Im klinischen Kontext wird der Myokardinfarkt laut der europäischen Gesellschaft für Kardiologie (European Society of Cardiology, ESC) durch das Vorhandensein einer akuten myokardialen Schädigung, nachgewiesen mittels kardialer Biomarker, in einem klinischen Setting mit Evidenz für eine akute myokardiale Ischämie definiert^{15,16}. Als Biomarker werden die kardialen Troponine I und T empfohlen und für ihren Nachweis insbesondere die Verwendung hochsensitiver Assays (high-sensitivity cardiac troponin, hs-cTn). Zusätzlich zur akuten myokardialen Schädigung muss mindestens eines der folgenden Kriterien vorliegen: Ischämie-verdächtige Symptomatik, typische Veränderungen im Elektrokardiogramm (EKG) wie zum Beispiel ST-Strecken-Hebungen oder die Entwicklung pathologischer Q-Zacken, bildgebender Nachweis des Verlustes vitalen Myokards oder regionaler Wandbewegungsstörungen, oder der Nachweis intrakoronarer Thromben in der Autopsie beziehungsweise während einer Koronarangiographie^{14,15,17}. Je nach Ursache kann der akute Myokardinfarkt klinisch in fünf Typen eingeteilt werden, welche in Abbildung 1 dargestellt sind¹⁵. Typ 1 wird auch als klassischer Myokardinfarkt bezeichnet, welcher sich durch Ruptur oder Erosion einer atherosklerotischen Plaque manifestiert. Beim Typ 2 liegt ein Missverhältnis von Sauerstoffangebot und -bedarf vor, welches zum Beispiel bei tachykarden Herzrhythmusstörungen oder einer Anämie auftreten kann. Der Typ 3 hingegen bezeichnet einen Myokardinfarkt, welcher vor einem potenziellen Nachweis von Biomarkern bereits zum Tode geführt hat. Der mit einer perkutanen Koronarintervention (percutaneous coronary intervention, PCI) assoziierte Myokardinfarkt Typ 4 wird unter anderem nach zeitlichem Auftreten weiter in die Typen 4a, 4b und 4c unterteilt, wohingegen der Typ 5 einen Myokardinfarkt bezeichnet, welcher im Rahmen einer koronar-arteriellen Bypass-Operation auftritt.

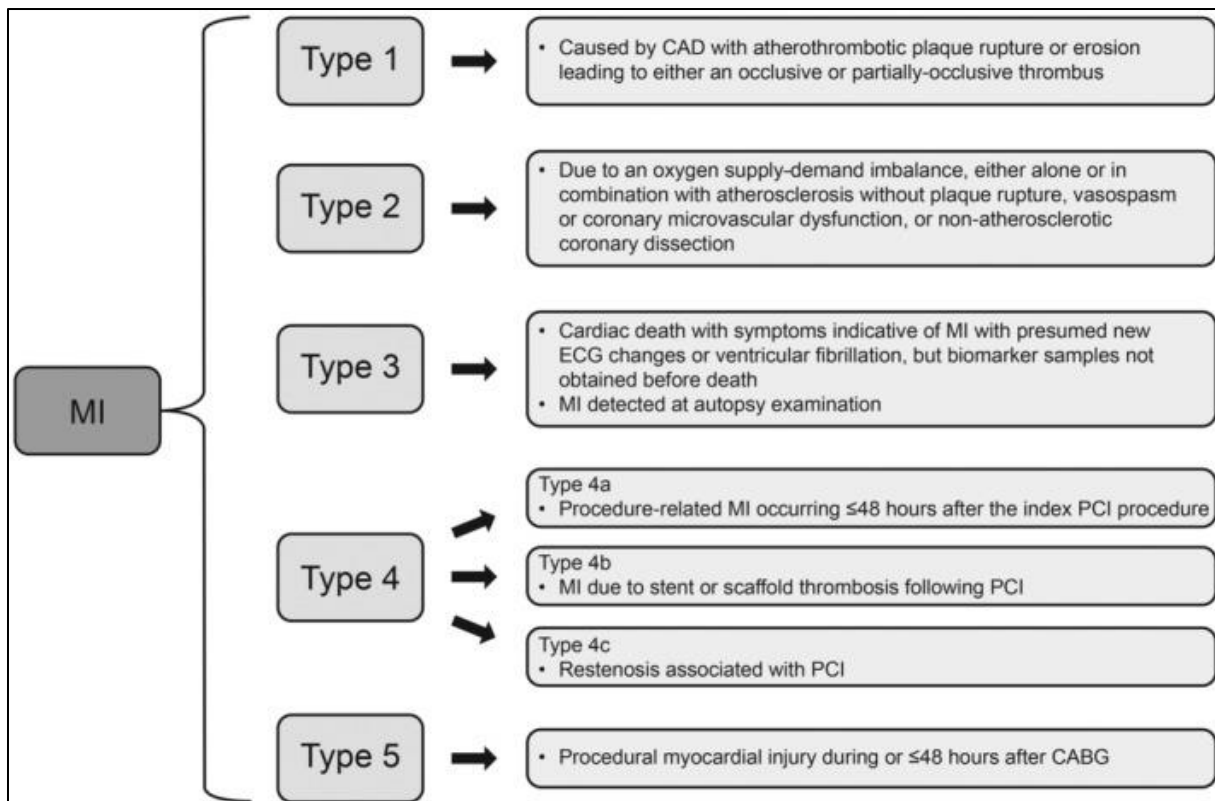


Abbildung 1: Klinische Einteilung des Myokardinfarktes in fünf Typen ¹⁸. CAD= coronary artery disease, CABG= coronary artery bypass graft, ECG= electrocardiogram, MI= myocardial infarction, PCI= percutaneous coronary intervention

2.2.2. Klinik und Diagnostik

Zu den klassischen Symptomen eines akuten Myokardinfarktes zählen plötzlich einsetzende, intensive und anhaltende Schmerzen, welche vorwiegend retrosternal lokalisiert sind, jedoch unter anderem in den linken Arm, die linke Schulter, den Hals, den Unterkiefer oder auch in den Oberbauch ausstrahlen können. Die Schmerzen werden oft als dumpf, drückend oder beklemmend beschrieben und sind typischerweise nicht durch Bewegung oder Druck provozierbar. Oft kommt es bei den Patienten zu einer akuten Dyspnoe mit Einsatz der Atemhilfsmuskulatur (Orthopnoe). Eine begleitende vegetative Symptomatik kann beispielsweise Schweißausbrüche, Übelkeit, Erbrechen, Unruhe oder Todesangst beinhalten ^{17,19}. Bis zu 20% der Myokardinfarkte verlaufen ohne die charakteristischen thorakalen Beschwerden und werden daher auch als stumme Infarkte bezeichnet. Dies betrifft insbesondere ältere Patienten mit Vorerkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus, oder einer chronischen Nierenerkrankung ^{16,20}.

Für die Diagnostik des Myokardinfarktes spielen insbesondere die ausführliche Anamnese, eine gründliche körperliche Untersuchung inklusive Erhebung der Vitalparameter, das 12-

Kanal-Elektrokardiogramm (EKG) und die Blutentnahme mit Bestimmung relevanter Laborparameter eine zentrale Rolle¹⁶. Innerhalb von 10 Minuten nach dem ersten Kontakt mit medizinischem Personal (first medical contact, FMC) sollte ein 12-Kanal-EKG abgeleitet und befundet werden²¹. Parallel sollten mittels Anamneseerhebung und körperlicher Untersuchung Symptome und Risikofaktoren identifiziert, die Schwere der Symptomatik eingeschätzt und eine kardiopulmonale Instabilität frühzeitig erkannt und therapiert werden. Gemäß der Empfehlungen der ESC-Leitlinien soll weiterhin das hochsensitive kardiale Troponin (hs-cTn) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden, um eine initiale Erhöhung und/oder einen dynamischen Verlauf feststellen zu können¹⁶. In der Regel wird hierfür der 0/1h- Algorithmus empfohlen, bei welchem die Blutabnahmen zum Zeitpunkt Null und nach einer Stunde erfolgen^{22,23}. Je nach Höhe und Ausprägung der Dynamik können auch weitere Bestimmungen der hs-cTn erforderlich sein²⁴. Bei unklaren oder uneindeutigen Fällen können zusätzlich bildgebende Verfahren wie die Echokardiographie, das Kardio-CT oder eine Koronarangiographie durchgeführt werden. Liegt ein hochgradiger Verdacht auf einen Myokardinfarkt vor, darf die weitere Diagnostik den Beginn der Therapie jedoch nicht verzögern^{16,25}.

2.2.3. Therapie und Prognose

Nach initialer Diagnose gemäß den oben genannten Kriterien erfolgt die befundabhängige Therapie. Als pharmakologische Akuttherapie auch im präklinischen Bereich kommen eine bedarfsgerechte Sauerstoffgabe (bei vorliegender Hypoxämie mit einer peripheren Sauerstoffsättigung <90 %), eine antianginöse Therapie mit Nitraten sowie eine analgetische und anxiolytische Therapie mit Morphin oder ähnlichen Substanzen in Betracht¹⁶. Zur Prävention maligner Arrhythmien kann außerdem die Gabe eines Beta-Rezeptoren-Blockers erwogen werden. Bei einem bestätigten oder vermuteten Myokardinfarkt mit ST-Strecken-Hebung im 12-Kanal-Elektrokardiogramm (ST-segment elevated myocardial infarction, STEMI) ist die schnellstmögliche Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes mittels primärer PCI essenziell, um den weiteren Untergang von ischämischem Gewebe zu verhindern^{16,17}. Falls eine PCI nicht innerhalb von 120 Minuten nach dem FMC möglich sein sollte, ist alternativ eine medikamentöse Fibrinolyse zu erwägen. Liegt ein Myokardinfarkt ohne ST-Strecken-Hebung vor, so erfolgt eine Koronarangiographie, gegebenenfalls mit PCI, in der Regel innerhalb von 24 Stunden¹⁶. In nicht eindeutigen Fällen ohne Erfüllung der klinischen Diagnosekriterien können Indikation und Zeitpunkt eines koronarangiographischen Vorgehens anhand des individuellen Risikoprofils ausgewählt werden¹⁶. In die entsprechende Risikostratifizierung fließen beispielsweise klinische Scores wie der GRACE-Risk-Score ein²⁶. Je nach Befund in der Koronarangiographie, oder nach frustriertem PCI-Versuch kann auch

eine koronararterielle Bypass-Operation notwendig sein. Dies betrifft insbesondere Fälle mit komplexer Anatomie und gleichzeitig ausgeprägtem ischämischem Areal ¹⁶.

Eine weitere wichtige Säule stellt die antithrombotische Therapie dar, welche sowohl als Akutmaßnahme als auch für die Rezidivprophylaxe von hoher Bedeutung ist. Hierfür werden Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure, Adenosindiphosphat-Rezeptor-Antagonisten (ADP-Rezeptor-Antagonisten) oder Glykoprotein IIb/IIIa- Rezeptor-Antagonisten in Kombination mit Antikoagulanzen wie beispielsweise unfractioniertem oder niedermolekularem Heparin (UFH bzw. NMH) verwendet. Auch diese Therapie sollte, sofern möglich, bereits präklinisch begonnen werden ¹⁶. Für eine detaillierte Übersicht bezüglich der Auswahl der entsprechenden Medikamente und die Medikationsdauer je nach individuellem Blutungs- und Ischämierisiko sei hier auf die S3-Leitlinie zum Management des akuten Koronarsyndroms verwiesen ¹⁶.

Sofern nach einem Myokardinfarkt eine Reduktion der linksventrikulären Pumpfunktion unter 40% persistiert, ist die Therapie dieser Herzinsuffizienz essenziell. Hierfür nutzt man insbesondere die Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS), da so das kardiale Remodeling (siehe Kapitel 1.2.4) reduziert und eine Verbesserung der Pumpfunktion und eine Reduktion der Mortalität erreicht werden kann. Die RAAS-Blockade über Hemmstoffe des Angiotensin-Konvertierungs-Enzyms (Angiotensin-Converting-Enzyme, ACE) ist aufgrund dieses Mechanismus sogar bei einer nicht reduzierten Pumpfunktion nach einem Myokardinfarkt empfohlen, da sie vermutlich bereits der Entstehung einer Herzinsuffizienz entgegenwirken kann ^{16,27}. Andere medikamentöse Optionen umfassen beispielsweise Beta-Blocker oder Natrium-Glukose-Co-Transporter 2-Hemmstoffe (SGLT2-Inhibitoren), welche ebenfalls bereits in der Behandlung der Herzinsuffizienz etabliert sind ¹⁶.

Fortschritte in der Entwicklung der oben genannten Therapiemethoden haben zwar bereits zu einer deutlichen Verringerung der Letalität geführt, dennoch ist der Myokardinfarkt aufgrund seiner hohen Morbidität und Mortalität weiterhin Gegenstand intensiver Forschung ²⁸. Die hohe epidemiologische und gesundheitsökonomische Bedeutung des akuten Myokardinfarktes und seiner Folgen verdeutlicht die Relevanz möglicher neuer Therapieoptionen. Insbesondere die Entwicklung neuartiger Therapiemethoden, welche die akuten und chronischen Folgeschäden effektiv verhindern oder abmildern, ist sowohl aus medizinischer als auch aus gesundheitsökonomischer Sicht erforderlich. Um Therapiemethoden für eine Erkrankung entwickeln zu können, ist jedoch zunächst ein Verständnis der genauen pathophysiologischen Mechanismen essenziell. Diese sollen im folgenden Teil erläutert werden.

2.2.4. Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes

Durch den teilweisen oder vollständigen Verschluss einer Koronararterie kommt es zu einer Unterbrechung, beziehungsweise Reduktion des Sauerstoffangebotes im betroffenen Myokard. Je nach Lokalisation und Ausmaß des Gefäßverschlusses kommt es in unterschiedlichem Ausprägungsgrad zu Funktionseinschränkungen des kontraktilem Apparates, intrazellulärer Azidose, Membraninstabilität und mitochondrialer Dysfunktion. Bei fortgesetzter Hypoxie führt dies schließlich zum Untergang von Kardiomyozyten²⁹. Da das Herz über keine relevante Fähigkeit zur Regeneration verfügt, verläuft die Reparatur nach Myokardinfarkt über die Entstehung einer Entzündungsreaktion mit konsekutiver Bildung einer Infarktnarbe^{29,30}. Durch die Nekrose von Kardiomyozyten werden vermehrt sogenannte „Damage associated molecular patterns“ (DAMPs) freigesetzt, also zelleigene Molekülstrukturen, welche mit einem Zellschaden assoziiert sind und über die Bindung an sogenannte Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) proinflammatorische Signalkaskaden initiieren, beispielsweise durch die Aktivierung des Nuclear-Factor (NF)- κ B^{31,32}. Die Endstrecke dieser Kaskaden hat eine vermehrte Produktion und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie beispielsweise Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α), Interleukin 1 β , Interleukin 6 oder das Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1 (MCP-1), zur Folge, welche wiederum Leukozyten aktivieren und eine vermehrte Migration dieser Zellen in das geschädigte Myokard begünstigen^{29,33}. Die infiltrierenden Leukozyten sorgen im Myokard zunächst für den notwendigen Abbau von Gewebetrümmern und toten Zellen; hierbei spielen vor allem phagozytierende Zellen wie neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle³⁴. Im weiteren Verlauf kommt es allerdings auch zu einer Umwandlung von ehemals gesunden Kardiomyozyten zu Fibroblasten und somit einem Umbau von funktionellem Myokard zu fibrotischem und nicht kontraktilem Bindegewebe^{33,34}. Diese überschießende Immunreaktion kann, je nach Ausmaß, die kardiale Pumpfunktion nach Myokardinfarkt deutlich verschlechtern^{29,35}.

Die Relevanz dieser proinflammatorischen Signalkaskaden wurde 2017 durch die CANTOS-Studie unterstrichen, welche zu dem Ergebnis kam, dass durch unspezifische Immunmodulation mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen Interleukin 1 β (Canakinumab) die Inzidenz von Re-Infarkten nach vorangegangenem Myokardinfarkt signifikant gesenkt wurde³⁶. Im Gegensatz dazu konnte jedoch im selben Jahr durch Horckmans et al. gezeigt werden, dass die vollständige Elimination von neutrophilen Granulozyten die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt verschlechterte und zu einer vermehrten Fibrosierung sowie progressiveren Herzinsuffizienz führte³⁷. Weitere Studien mit unterschiedlichen Ansatzpunkten der Immuninhibition nach Myokardinfarkt zeigten ebenfalls

keine Reduktion der Gesamtmortalität beziehungsweise der Infarktgröße^{38,39}. Obwohl die Modulation des Immunsystems also ein vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt ist, scheint ein vorsichtiges und gezieltes Vorgehen notwendig zu sein, da zwar ein überschießendes Remodeling und ein vermehrter myokardialer Zelltod verhindert werden soll, die durch eine ungezielte Immunsuppression verursachte Blockade wichtiger Reparationsvorgänge jedoch unbedingt verhindert werden muss^{40,41}. Zudem geht eine unspezifische Immunsuppression auch mit diversen weiteren Komplikationen einher; so war beispielsweise in der oben genannten CANTOS-Studie die Rate an tödlichen Infektionen erhöht³⁶.

2.2.5. Die Rolle der Monozyten

Von besonderer Bedeutung für die inflammatorischen und proliferativen Vorgänge nach einem Myokardinfarkt sind die Monozyten, deren Rolle im Folgenden dargestellt werden soll. Monozyten gehören zu den Zellen der myeloischen Reihe und bilden gemeinsam mit den Makrophagen und den dendritischen Zellen das sogenannte mononukleär-phagozytäre System (MPS). Monozyten tragen sowohl über direkte Effekte wie beispielsweise die Sekretion von Zytokinen, als auch indirekt, durch ihre Differenzierung zu dendritischen Zellen und Makrophagen, zu immunologischen Prozessen bei. Die Entwicklung von Monozyten aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ist abhängig vom Wachstumsfaktor Csf-1 (auch M-CSF, Monozytenkolonien-stimulierender Faktor) und verläuft über verschiedene Vorläuferzellen wie beispielsweise die Granulozyten/Monozyten-Progenitorzellen (granulocyte/monocyte-progenitor cells, GMP) oder die Monozyten/Dendritische Zellen-Progenitorzellen (monocyte/dendritic cells- progenitor cells, MDP)⁴². Murine Monozyten werden klassischerweise in zwei verschiedene Subsets unterteilt: Der überwiegende Teil exprimiert große Mengen des Lymphozyten-Antigens 6C sowie des CC-Chemokin-Rezeptors 2 (Ly6C^{high}/CCR2⁺). Ein deutlich kleinerer Teil an Monozyten exprimiert nur geringe Mengen an Ly6C und CCR2, dafür jedoch unter anderem den Chemokin-Rezeptor CX3CR1 (Ly6C^{low}/CX3CR1⁺). Ly6C^{high}-Monozyten werden zu Orten der Inflammation rekrutiert und produzieren große Menge an proinflammatorischen Zytokinen⁴³. Ly6C^{low}-Monozyten hingegen zeigen vor allem ein in den Blutgefäßen patrouillierendes Verhalten und ihre Funktionen sind deutlich schlechter verstanden^{44,45}. Beim Menschen werden die Monozyten ebenfalls anhand ihrer Expression von Rezeptoren unterschieden. Hierfür werden der Lipopolysaccharid-Rezeptor (CD14) und der niedrigaffine Immunglobulin G-Rezeptor (CD16) verwendet und die Monozyten in drei Untergruppen eingeteilt: CD14⁺⁺CD16⁻-Monozyten werden als klassische Monozyten bezeichnet und entsprechen in ihren Funktionen den Ly6C^{high}-Monozyten der Maus. CD14⁺CD16⁺⁺-Monozyten ähneln als nicht-klassische

Monozyten den murinen Ly6C^{low}-Monozyten. Erst in den letzten Jahren wurde auch eine dritte Untergruppe der CD14⁺⁺CD16⁺-Monozyten (intermediäre Monozyten) beschrieben. Sie exprimieren CCR2, MHC II (major histocompatibility complex class II) sowie den Angiopoietin-2-Rezeptor (TIE-2) und spielen vermutlich eine Rolle für die Antigenpräsentation und die Angiogenese ⁴³.

Es gibt umfassende Evidenz für die Bedeutung von Monozyten für die Inflammationsreaktion und die Reparationsvorgänge nach einer myokardialen Ischämie. Im Mausmodell konnte mittels intravitaler Mikroskopie gezeigt werden, dass bereits wenige Minuten nach einem Myokardinfarkt im Blutkreislauf zirkulierende Monozyten in das ischämische Myokard einwandern ⁴⁶. In der auf einen Myokardinfarkt folgenden Entzündungsreaktion kann nun eine Ly6C^{high}-dominante von einer Ly6C^{low}-dominanten Phase unterschieden werden. Zunächst werden in den ersten Tagen Ly6C^{high}-Monozyten in das Myokard rekrutiert und erreichen dort ungefähr am dritten Tag nach dem Myokardinfarkt ihren Peak ^{47,48}. Diese Monozytenpopulation entstammt zum weitaus überwiegenden Teil der Milz, welche bereits 2009 von Swirski et al. als Speicherort zur schnellen Mobilisation von Monozyten beschrieben wurde. Ihre Experimente mit splenektomierten Mäusen lassen schlussfolgern, dass über die Hälfte aller im Rahmen eines Myokardinfarktes rekrutierten Monozyten dem Milzpool entstammt und dieser insbesondere in den ersten 24 Stunden nach einem Myokardinfarkt freigesetzt wird ⁴⁹. Die Mobilisation dieser inflammatorischen, splenischen Monozyten nach einem Myokardinfarkt scheint zu einem wesentlichen Teil über neutrophile Granulozyten vermittelt zu sein. So konnte durch die Depletion von neutrophilen Granulozyten eine signifikant verminderte Anzahl an Ly6C^{high}-Monozyten im Myokard bei gleichzeitig signifikant geringerer Mobilisation von Ly6C^{high}-Monozyten aus der Milz gezeigt werden ³⁷. Weiterhin gibt es Evidenz dafür, dass auch ein aktiviertes RAAS und die Sekretion des Chemokin-Rezeptor-Liganden 7 (CCL7) durch B-Lymphozyten für die Mobilisation der Monozyten aus der Milz eine Rolle spielen ^{50,51}. Aufgrund dieser zahlreichen Mechanismen erscheinen die genauen Vorgänge bei der Mobilisation der Ly6C^{high}-Monozyten komplex und sind noch nicht vollständig verstanden ²⁹. Die nachfolgende Rekrutierung der zirkulierenden Ly6C^{high}-Monozyten in das Myokard ist maßgeblich über MCP-1, also den Liganden des CCR2-Rezeptors vermittelt. So ist die Rekrutierung dieser Monozyten sowohl bei CCR2^{-/-}-Mäusen, als auch nach medikamentöser Antagonisierung des CCR2-Rezeptors stark vermindert ^{52,53}. Im Myokard entfalten die Ly6C^{high}-Monozyten anschließend vielfältige Wirkungen. In der ersten Phase differenzieren sie hauptsächlich zu inflammatorischen Ly6C^{high}-Makrophagen, welche nekrotische Kardiomyozyten phagozytieren sowie proteolytische Enzyme und Zytokine wie IL1, IL6 und TNF α sezernieren ⁴⁴. Nach rund 3 Tagen nimmt die Zahl der Ly6C^{high}-Monozyten/Makrophagen ab und nach einer Woche erreicht die Zahl der Monozyten/Makrophagen mit niedriger Expression von Ly6C ihrerseits ihren Peak. Entgegen

früherer Vermutungen einer sequenziellen Rekrutierung von Ly6C^{high}- und Ly6C^{low}-Monozyten, scheint dieser Peak jedoch hauptsächlich durch die Differenzierung von Ly6C^{high}-Monozyten zu Ly6C^{low}-Makrophagen bedingt zu sein ⁴⁸. Dieser Differenzierungs-Switch in den Monozyten und der Wechsel von einer inflammatorischen in eine reparative Phase scheint unter anderem durch den nukleären Rezeptor 4A1 (NR4A1) orchestriert zu werden ⁵². Die in geringem Maße ebenfalls ablaufende Rekrutierung von Ly6C^{low}-Monozyten in das Myokard ist vermutlich über den Chemokin-Rezeptor CX3CR1 vermittelt ⁵⁴. Die Ly6C^{low}-Makrophagen zeigen kaum inflammatorische Aktivität, sondern entfalten ihre Wirkungen durch Stimulation von Myofibroblasten, Kollageneinlagerung und eine Förderung der Angiogenese ^{44,48}. Anschließend kehrt die Zahl der Monozyten und Makrophagen im ischämischen Myokard zwar in den Wochen nach einem Myokardinfarkt wieder auf normale Werte zurück, im nicht-ischämischen Myokard bleibt sie jedoch selbst nach mehreren Monaten noch signifikant erhöht ^{48,55}. Um dem erhöhten Bedarf zu begegnen, wird, neben einer lokalen Proliferation von Makrophagen, auch die vermehrte Freisetzung von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark durch das sympathische Nervensystem vermittelt. Durch die Absiedelung dieser Stammzellen in der Milz wird anschließend die extramedulläre Monozytopoese stimuliert ^{56,57}. Eine Übersicht über die Aktivität von Monozyten und anderen Immunzellen vor und nach einem Myokardinfarkt ist in Abbildung 2 dargestellt.

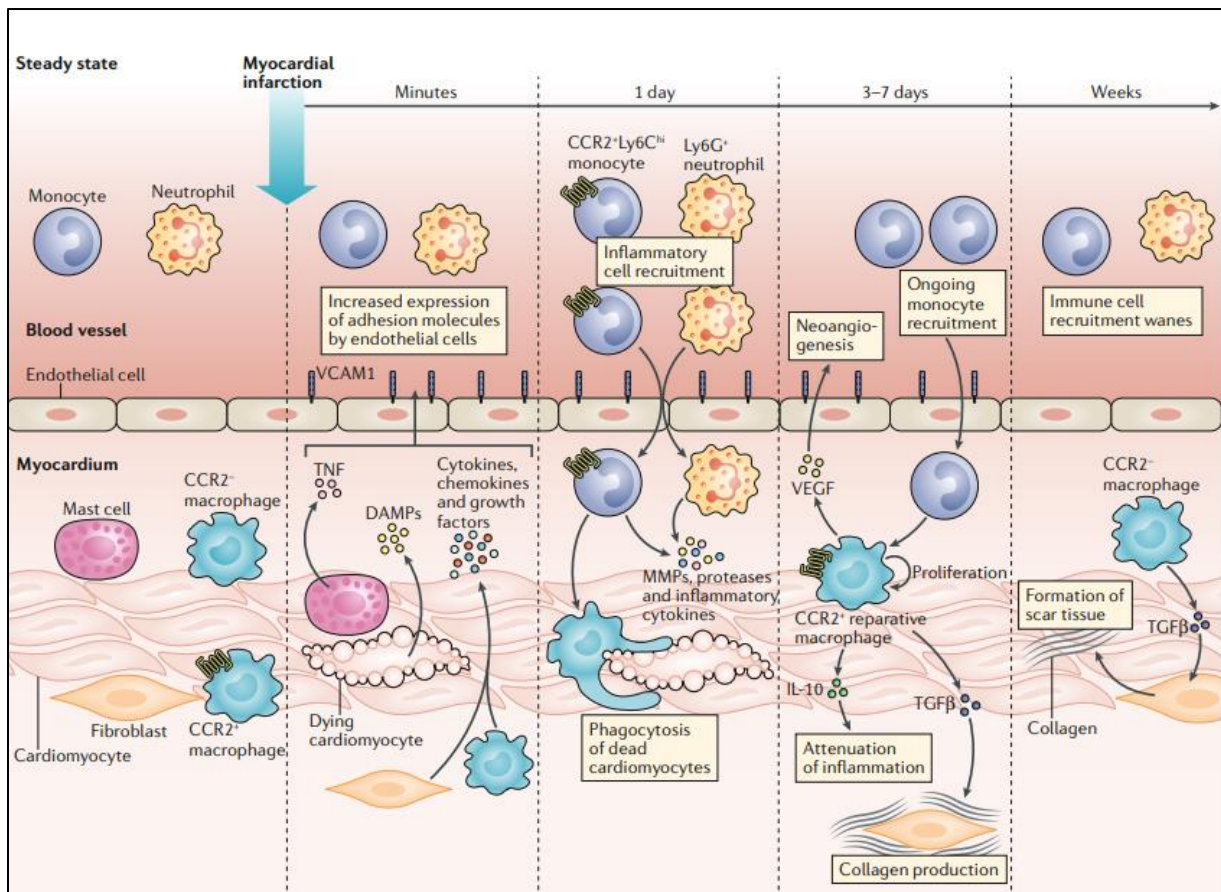


Abbildung 2: Aktivität verschiedener Immunzellen im Herzen im zeitlichen Verlauf vor und nach einem Myokardinfarkt ³⁴.

Diese Vorgänge der Monozyten-Rekrutierung und -Differenzierung scheinen in der Maus und im Menschen sehr ähnlich zu verlaufen. So konnte bei Patienten nach einem Myokardinfarkt ein sequenzieller Verlauf der Monozyten im Blut gezeigt werden, bei welchem auf einen initialen CD14⁺CD16⁻-Monozyten-Peak nach 3 Tagen ein CD14⁺CD16⁺-Monozyten-Peak nach 5 Tagen folgte ⁵⁸. Dies wurde durch postmortale Analysen von Herzgewebe bestätigt, welche eine inflammatorische CD16⁻-Phase von einer proliferativen Phase mit CD16⁺- und CD16⁻-Zellen unterscheiden konnte. Zudem konnte die Bedeutung der Milz als Reservoir für Monozyten bestätigt werden ⁵⁹. Bezogen auf die Prognose konnte bereits 2009 von Tsujioka et al. gezeigt werden, dass die maximale Anzahl klassischer, inflammatorischer Monozyten im Blut von Patienten eine negative Korrelation mit der Erholung der linksventrikulären Ejektionsfraktion nach einem Myokardinfarkt besitzt. Für die nicht-klassischen Monozyten der zweiten Phase war eine solche Korrelation nicht nachweisbar ⁵⁸. Diese Ergebnisse konnten 2021 von Askari et al. bestätigt werden, welche eine Korrelation in der Ausprägung des Myokardschadens mit der Anzahl an klassischen und intermediären, jedoch nicht mit der Anzahl an nicht-klassischen Monozyten fanden ⁶⁰.

2.3. Die Myeloperoxidase

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein lysosomales Häm-Protein, welches als Peroxidase-Enzym wirkt. Sie wird am häufigsten in neutrophilen Granulozyten exprimiert, welche eine Unterart der Leukozyten darstellen. Abgesehen von den neutrophilen Granulozyten findet man MPO auch in deutlich geringeren Mengen in Monozyten, hepatischen Kupffer-Zellen, sowie in den Zellen der Mikroglia des zentralen Nervensystems (ZNS) ⁶¹.

2.3.1. Aufbau und Funktion

Das kodierende MPO-Gen befindet sich auf dem Segment q12-24 auf dem langen Arm von Chromosom 17 ⁶². Während der Proteinreifung bindet das enzymatisch inaktive Vorläuferprotein apopro-MPO zunächst an die Chaperonproteine Calreticulin und Calnexin, und bindet anschließend eine Hämgruppe ⁶³. Durch die entstehenden Konformationsänderungen des Proteins entsteht pro-MPO, eine weitere inaktive Vorstufe. Pro-MPO durchläuft weitere komplexe Umwandlungen und wird schließlich zu reifem, enzymatisch aktivem MPO. Anschließend wird es hauptsächlich in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert, wo es rund 25 % der Proteinmasse und rund 5 % der gesamten Trockenmasse der neutrophilen Granulozyten ausmacht ⁶⁴. Das MPO-Protein hat eine dimere Struktur, die aus einem Paar von Protomeren einer schweren (circa 59 Kilodalton (kDa)) und einer leichten Kette (circa 13,5 kDa) besteht. Jede schwere Kette verfügt über eine kovalente Bindung mit einer Häm-Gruppe ⁶⁵. Die Struktur, sowie die grundsätzliche Bildung von MPO sind in Abbildung 3 dargestellt. Das Gesamtgewicht des reifen Enzyms beträgt rund 140 kDa und das humane und murine MPO-Protein zeigen eine starke Übereinstimmung von ca. 90 % ⁶⁶.

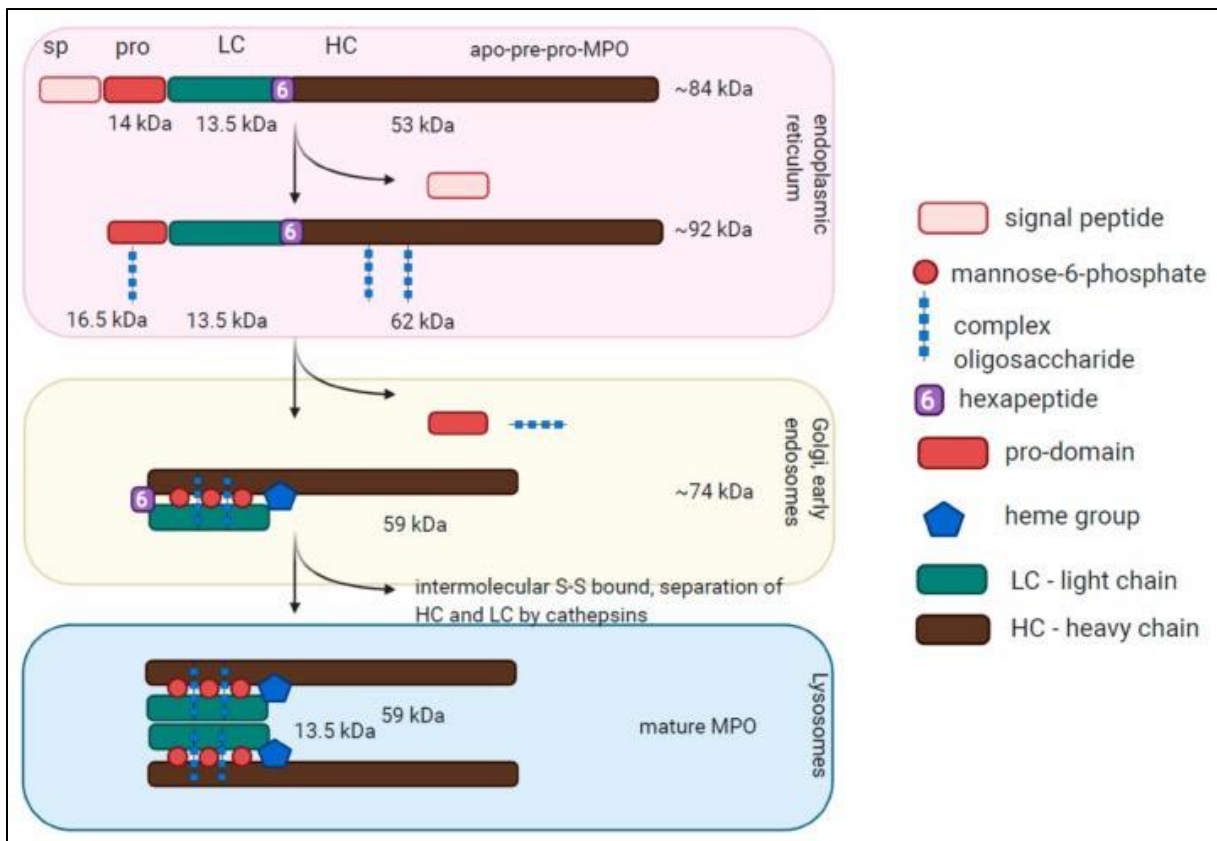


Abbildung 3: Struktur und Bildung der Myeloperoxidase ⁶⁶.

Das Enzym MPO kann, unter Verwendung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie Halogeniden und Pseudohalogeniden wie Chlorid (Cl^-), Bromid (Br^-) oder Thiocyanat (SCN^-), deren Reaktion zu hochreaktiven hypohalogenigen Säuren katalysieren ^{67,68}. Während dieses Halogenierungszyklus bildet MPO durch die Aufnahme von zwei Elektronen des H_2O_2 das hoch reaktive Compound I. Compound I wiederum oxidiert unter Abgabe von zwei Elektronen die oben genannten (Pseudo-)Halogenide zu deren korrespondierenden, hypohalogenigen Säuren ⁶⁹. Da Cl^- im menschlichen Körper das mit Abstand häufigste Halogenid darstellt, ist die Reaktion von Cl^- und H_2O_2 zu hypochloriger Säure (HOCl) die am häufigsten durch MPO katalysierte Reaktion. Neben diesem Halogenierungszyklus kann MPO auch den Peroxidasezyklus durchlaufen. Nach der Aufnahme der zwei Elektronen, kann das entstandene Compound I durch Oxidierung von organischen und anorganischen Substanzen ein Elektron abgeben und wird so zu Compound II reduziert. Durch die Abgabe des zweiten Elektrons kann Compound II wieder in die Grundform zurück reduziert werden, sodass ein erneuter Zyklus beginnen kann ⁷⁰. Durch diese Reaktionen kommt es zu zahlreichen MPO-abhängigen oxidativen Protein-Modifikationen, welche beispielsweise die Funktion von Enzymen, unter anderem der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) oder der Matrixmetalloproteinasen (MMP),

beeinflussen^{61,71,72}. HOCl und andere Reaktionsprodukte der MPO verfügen über mikrobizide und zytotoxische Eigenschaften und spielen daher eine Rolle bei der angeborenen Immunabwehr. Die Sekretion von MPO in die Phagosomen von neutrophilen Granulozyten, im Rahmen einer Infektion, führt über die hohe lokale Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies zur Abtötung der phagozytierten Erreger^{73,74}. Neben seiner Rolle bei der Phagozytose spielt das Enzym, durch eine Sekretion in den Extrazellularraum, auch eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation während diverser, akuter und chronischer Entzündungsvorgänge. So wird MPO von Endothelzellen aufgenommen und bedingt dort eine vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen, sowie eine Änderung des Transkriptoms mit folgender Zunahme der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen wie IL 6, IL 8 und MCP-1^{66,75}. Und auch in dem Zusammenspiel von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen wird durch die Interaktion von MPO mit Makrophagen-Mannose-Rezeptoren (MMR) oder β 2-Integrinen eine verstärkte Produktion von Chemokinen, Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies ausgelöst⁷⁶. Allerdings kommt es durch das hohe zytotoxische Potenzial der Reaktionsprodukte von MPO im Rahmen der Pathogenabwehr und bei sterilen Entzündungsprozessen auch zu unerwünschten Kollateralschäden im entzündeten Areal⁷³.

Ergänzend erfüllt MPO auch diverse nicht-enzymatisch vermittelte Funktionen. Es ist sehr reich an den Aminosäuren Arginin und Lysin und verfügt somit über zahlreiche positive Ladungen, weshalb es an verschiedene Proteine (wie beispielsweise Histone oder Transkriptionsfaktoren), DNA und Lipide bindet⁶⁶. Zirkulierende MPO bindet an Gefäßwände und schwächt die elektrostatische Abstoßung von negativ geladenen Endothelzellen und Leukozyten. So verstärkt es über physikalische Anziehungskräfte die Motilität von neutrophilen Granulozyten und begünstigt deren Transzytose⁷⁷. Weiterhin kann MPO über die Bindung an CD11b/CD18-Integrine auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten deren Apoptose verzögern und so zu einer verlängerten Inflammation beitragen⁷⁸. Zudem scheint die extrazelluläre MPO auch für die Ausbildung von neutrophilen extrazellulären Fallen (neutrophil extracellular traps, NET) von Bedeutung zu sein⁶⁶.

Die klinische Bedeutung von MPO für die Pathogenabwehr und das Immunsystem ist jedoch weiterhin unklar. So konnte eine Assoziation zwischen MPO-Defizienz und dem vermehrten Auftreten von Infektionen und chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis gezeigt werden und auch im Mausmodell einer MPO-Defizienz trat eine Anfälligkeit für bakterielle und Candida-bedingte Infektionen auf^{79,80}. Andererseits bleiben jedoch die meisten Personen mit MPO-Defizienz ohne jegliche klinische Symptomatik^{66,81}. Aufgrund der Abundanz des Enzyms sind weitere Funktionen der MPO daher sehr wahrscheinlich.

2.3.2. Die Myeloperoxidase bei kardiovaskulären Erkrankungen

Nachdem MPO zunächst nur als ein an der Immunabwehr beteiligtes Enzym mit hauptsächlich mikrobizider und zytotoxischer Wirkung angesehen wurde, gibt es mittlerweile umfassende Evidenz für die Beteiligung an einer Reihe kardiovaskulärer Erkrankungen wie beispielsweise der koronaren Herzkrankheit, der Herzinsuffizienz, der arteriellen Hypertonie aber auch des akuten Myokardinfarktes⁸²⁻⁸⁷. So zeigen Bevölkerungsstudien, dass erhöhte Plasma-beziehungsweise Serum-MPO-Level gesunder Individuen sowohl Indikatoren für die zukünftige Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit und das Auftreten kardialer Ereignisse sind, als auch mit einer erhöhten Gesamtmortalität einhergehen⁸⁸⁻⁹⁰. Ergänzend dazu liegen ebenfalls positive Korrelationen zwischen der Höhe des MPO-Spiegels und dem Risiko einer Plaqueruptur bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit sowie dem Mortalitätsrisiko bei Patienten nach einem Myokardinfarkt vor^{84,91-93}.

Der pro-inflammatorische und pro-fibrotische Einfluss der MPO begünstigt das ventrikuläre Remodeling und erhöht das Risiko einer Ventrikelruptur nach einem Myokardinfarkt⁹⁴. MPO-enhaltende neutrophile Granulozyten infiltrieren das Infarktgewebe innerhalb der ersten Stunden nach einem Myokardinfarkt und setzen große Mengen an MPO frei⁹⁵. Im Mausmodell einer myokardialen Ischämie konnte gezeigt werden, dass eine MPO-Defizienz diese Infiltration des Myokards durch neutrophile Granulozyten sowie die Freisetzung von MPO verringert und daraus folgend die linksventrikuläre Funktion verbessert^{95,96}. Auch eine pharmakologische Inhibition von MPO im Mausmodell von Ischämie und Reperfusion, führte in einer 2016 von Ali et al. durchgeführten Untersuchung zu einer verbesserten Ejektionsfraktion und einer geringeren linksventrikulären Hypertrophie⁹⁷. Diese Ergebnisse konnten 2023 von Guthoff et al. bestätigt werden³⁵. Da zwischen MPO-kompetenten und MPO-defizienten Mäusen jedoch kein Unterschied in Bezug auf die Infarktgröße bestand, scheint der Effekt von MPO vor allem für das Remodeling und weniger für die initiale Nekrose von Kardiomyozyten von klinischer Relevanz zu sein. Pathophysiologisch wurden durch das MPO-H₂O₂-Cl-System produzierte Aldehydverbindungen als wichtiger Faktor des linksventrikulären Remodelings identifiziert. In MPO-defizienten Mäusen mit myokardialer Ischämie kommt es zu einer geringeren Ausbildung dieser toxischen Aldehydverbindungen und daher zu einer signifikant geringeren linksventrikulären Dilatation sowie einer signifikant geringeren Reduktion der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LV-EF)⁹⁶. Auf molekularer Ebene konnte die MPO-vermittelte oxidative Inaktivierung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors 1 (PAI-1) als ein Mediator des Remodeling identifiziert werden⁹⁴. Weiterhin wurde gezeigt, dass die durch MPO induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 eine Transdifferenzierung ventrikulärer Fibroblasten hin zu Myofibroblasten bewirkt und somit die Ablagerung von Kollagen sowie die interstitielle Fibrose nach einem Myokardinfarkt verstärkt

und mit einem erhöhten Risiko für ventrikuläre Tachykardien einhergeht^{94,95}. Zahlreiche weitere Eigenschaften von MPO spielen eine Rolle für die Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen. Hierzu gehören beispielsweise die Oxidation von Lipoproteinen wie HDL (high density lipoprotein), die Begünstigung von endothelialer Dysfunktion oder die Thrombozytenaktivierung^{66,98}.

Da die immunologischen Vorgänge, trotz ihrer Relevanz für die Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen, bislang noch nicht in evidenzbasierte, klinische Therapieoptionen umgewandelt werden konnten, bietet MPO hier die Möglichkeit für ein neuartiges Therapieziel⁹⁹. In den letzten Jahren hat das Interesse an einer pharmakologischen Inhibition der MPO deutlich zugenommen. So wird gegenwärtig der Einsatz des MPO-Inhibitors AZD4831 in präklinischen und klinischen Studien untersucht^{100,101}.

2.4. Extrazelluläre Vesikel

Extrazelluläre Vesikel (EV) ist der Oberbegriff für alle von Zellen freigesetzten Partikel, welche von einer Lipiddoppelschicht begrenzt werden und sich nicht selbst replizieren können. Sie werden von allen Zelltypen freigesetzt, kommen sowohl in Geweben als auch in sämtlichen Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Blut, Urin, Speichel oder Liquor vor und können unter anderem nach Größe, Biogenese, oder ihrer jeweiligen Ursprungszelle eingeteilt werden. Gemäß den minimalen Informationen zur Untersuchung extrazellulärer Vesikel (Minimal information for studies of extracellular vesicles, MISEV Guidelines), welche 2023 von der internationalen Gesellschaft für extrazelluläre Vesikel (International Society for Extracellular Vesicles, ISEV) veröffentlicht wurden, sollen sie insbesondere von nicht-vesikulären extrazellulären Partikeln abgegrenzt werden, welche nicht über eine Lipiddoppelschicht verfügen¹⁰². Für ihre Biogenese werden zwei verschiedene Mechanismen unterschieden: Sogenannte Exosome werden durch Fusionierung von multivesikulären Körpern mit der Zellmembran freigesetzt, ihre Größe liegt meist zwischen 50 und 150 nm. Ektosome hingegen werden durch Abschnürung von Membranabschnitten gebildet und variieren in ihrer Größe meist zwischen 100 und 500 nm¹⁰³. Besser geeignet ist allerdings die Einteilung nach ihrer Größe, da der Ursprung der Vesikel meist schwer nachzuweisen ist und in der Regel beide Gruppen überlappend vorliegen. Anhand eines Grenzwertes von meist 200 nm unterscheidet man kleine EV (small EV, sEV) und große EV (large EV, lEV)¹⁰². Nachdem die Funktion von extrazellulären Vesikeln ursprünglich darin gesehen wurde, überschüssige Bestandteile der Zelle oder der Zellmembran abzutransportieren, ist in den vergangenen Jahrzehnten die Bedeutung der EV für die interzelluläre Kommunikation deutlich geworden¹⁰³. Extrazelluläre

Vesikel stellen einen Weg der Informationsvermittlung zwischen Zellen dar, indem sie unter anderem Proteine, Metabolite und genetische Informationen transportieren können. Ihre Lipiddoppelschicht schützt den Inhalt vor unspezifischem Abbau und durch Fusion mit Membranen oder Aufnahme mittels Endozytose können sie ihren Inhalt an andere Zellen weitergeben und so den Phänotyp und die Funktion der aufnehmenden Zellen beeinflussen. Auch eine direkte Bindung von Oberflächenproteinen der EV an Rezeptoren auf Zellmembranen ist möglich¹⁰⁴. Sie spielen dadurch eine Rolle in einer Reihe von physiologischen und pathologischen Prozessen, wie beispielsweise der Blutgerinnung, der Immunmodulation und bei malignen Erkrankungen¹⁰⁵.

In der jüngeren Vergangenheit ist schließlich auch eine Beteiligung von EV an den inflammatorischen und proliferativen Vorgängen nach einem Myokardinfarkt nachgewiesen worden. So setzen beispielsweise proinflammatorische Makrophagen EV frei, welche eine Angiogenese verhindern und die kardiale Dysfunktion nach einem Myokardinfarkt verstärken können¹⁰⁶. Im Gegensatz dazu vermitteln EV von CCR2-Makrophagen in proinflammatorischen CCR2⁺-Makrophagen den Switch zu einem proliferativen und Angiogenese-fördernden Makrophagen-Typ und verbessern die kardiale Funktion nach einem Myokardinfarkt¹⁰⁷. Auch als prognostische Marker sind EV im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen von wachsender Bedeutung. So existiert eine positive Korrelation der Expression bestimmter Mikro-RNA (miRNA)-Abschnitte in den zirkulierenden EV von Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung mit dem Risiko für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse und nach einem Myokardinfarkt konnten spezifisch in zirkulierenden EV im Blutplasma vorhandene Proteine nachgewiesen werden, welche neue potenzielle Biomarker darstellen könnten^{108,109}. Weiterhin wurden EV auch bereits als therapeutische Option im Rahmen kardialer Erkrankungen untersucht. So schützte im Versuch an Ratten eine repetitive, intravenöse Gabe von EV aus kardialen Progenitorzellen vor der Kardiotoxizität einer Kombinationschemotherapie aus Doxorubicin und Trastuzumab. Als Mechanismus konnte in dieser Studie die miRNA-vermittelte Downregulation von inflammatorischen Mediatoren wie beispielsweise MPO in Kardiomyozyten identifiziert werden¹¹⁰. Und auch im Modell einer myokardialen Ischämie wurde bereits eine kardioprotektive Wirkung durch EV aus den kardialen Progenitorzellen demonstriert¹¹¹.

Insbesondere in Bezug auf eine myokardiale Ischämie ist auch die Rolle von EV für die Migration und Chemotaxis von Immunzellen interessant. Bereits 2017 konnten Akbar et al. zeigen, dass nach einem Myokardinfarkt durch Endothelzellen sezernierte EV über den Blutstrom in die Milz wandern und dort die Mobilisation splenischer Monozyten signifikant steigern¹¹². Ergänzend hierzu wurde auch eine Mobilisation von splenischen neutrophilen Granulozyten nach einem Myokardinfarkt durch EV von Endothelzellen nachgewiesen¹¹³. Eine in vitro-Stimulation von Endothelzellen durch Inkubation mit TNF α konnte eine

Freisetzung von EV provozieren, welche, wiederum in vitro, die Migration von Monozyten verstärkte ¹¹⁴. Dennoch sind die genauen Mechanismen, welche in vivo diese vermehrte Produktion von EV durch Endothelzellen im Rahmen eines Myokardinfarktes vermitteln, nicht ausreichend geklärt.

Angesichts dieser vielfältigen Bedeutung von EV als Teil von Homöostase und Pathologien, sowie als Biomarker und Therapeutika ist das Interesse an der Forschung zu extrazellulären Vesikeln in den vergangenen Jahren stark gestiegen ¹¹⁵. Insbesondere das Blut, beziehungsweise das Blutplasma, ist als EV-haltiges Medium von besonderer Bedeutung, da sie dort als Biomarker minimalinvasiv bestimmt werden können ¹¹⁶. Aufgrund ihrer geringen Größe und der komplexen Zusammensetzung des Blutplasmas, welches neben den EV auch gelöste Proteine und Lipoproteine enthält, die die Anzahl der EV pro mL Blut ($\sim 10^{10}$ EV versus rund 10^{16} Lipoproteinpartikel pro mL) bei weitem übersteigen, ist die Isolation und Charakterisierung von EV aus dem Plasma jedoch mit einigen Schwierigkeiten verbunden ¹¹⁷. Es wurden bereits zahlreiche Methoden erarbeitet, mit welchen EV isoliert, das heißt in ihrer Konzentration erhöht, sowie aufgereinigt, also von ebenfalls in dem Ausgangsmedium vorkommenden Molekülen getrennt werden können. Hierzu zählen unter anderem die differenzielle Zentrifugation mit Ultrazentrifugation, die Ultrafiltration, die Größenausschluss-Chromatographie (size exclusion chromatography, SEC) oder die Immunpräzipitation. Je nach verwendeter Methode unterscheiden sich Spezifität und Sensitivität jedoch erheblich ¹⁰². Einen Überblick über die verbreiteten Methoden zur Isolation von EV bietet Abbildung 4.

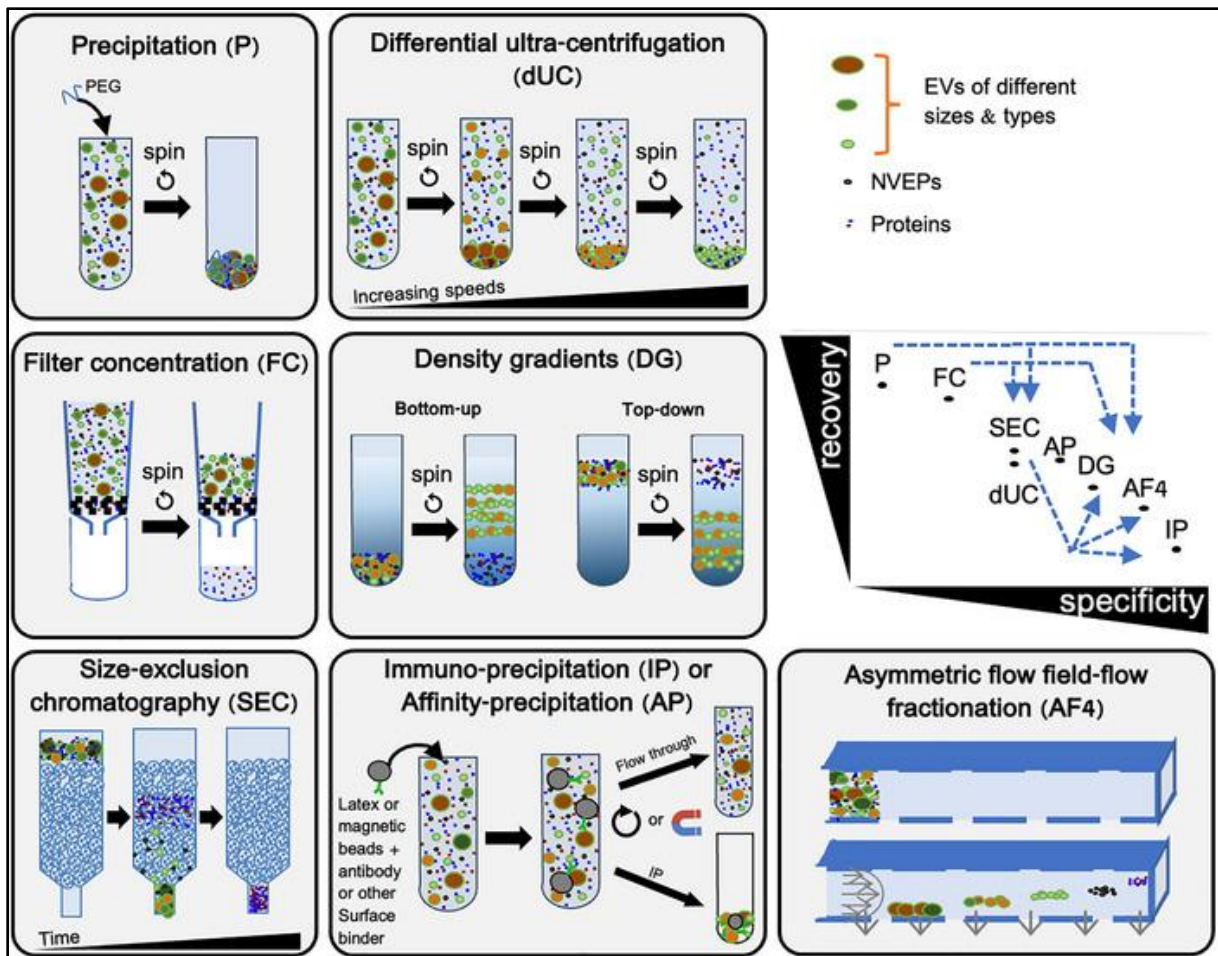


Abbildung 4: Übersicht über die gängigen Isolationsmethoden für EV¹⁰²

Die einzelnen Methoden gehen zudem mit spezifischen Nachteilen wie beispielsweise hohen Kosten (Ultrazentrifugation, Immunpräzipitation), langer Isolationsdauer (Dichtegradienten-Zentrifugation) oder potenzieller Schädigung der EV einher. Je nach Zielsetzung, muss die Wahl der Methode zur Isolation also unterschiedlich gewählt werden. Sollen beispielsweise die Membran-Bestandteile oder der Inhalt der Vesikel untersucht werden und ist lediglich eine kleine Menge an Ausgangsmaterial verfügbar, so ist eine Methode mit größtmöglicher Ausbeute sinnvoll, wohingegen bei nachfolgenden Untersuchungen der Vesikel-Morphologie oder ihrer biologischen Aktivität eine möglichst hohe Spezifität bei gleichzeitig minimaler Schädigung im Vordergrund steht.

2.5. Vordaten aus unserem Labor

Die in diesem Kapitel beschriebenen Daten wurden nicht von mir selbst, sondern von anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe generiert. Die Darstellung dieser Daten ist jedoch für das Verständnis der Zielsetzung meiner Dissertation von Bedeutung, weshalb sie hier besprochen werden. Alle nachfolgenden Ergebnisse wurden ebenfalls in der gemeinsam verfassten Publikation veröffentlicht ¹¹⁸.

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte bereits den Zusammenhang zwischen den MPO-Plasmaspiegeln und der Aktivität von Monozyten. Hierfür wurden Patienten mit ischämischer und nicht-ischämischer Herzinsuffizienz, sowie eine Gruppe gesunder Kontroll-Personen rekrutiert. Hierbei wiesen die Patienten einen signifikant höheren Plasmaspiegel an MPO im Vergleich zu den Kontrollen auf. Parallel dazu wiesen die aus dem Blut isolierten Monozyten der Patienten eine signifikant höhere Expression des inflammatorischen Zytokins TNF α auf. Es ergab sich zudem eine hochsignifikante, positive Korrelation zwischen der Höhe des Plasmaspiegels an MPO und der Freisetzung von TNF α durch die Monozyten (Abbildung 5). Dies kann als möglicher Hinweis auf eine Monozytenaktivierung durch MPO im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen interpretiert werden.

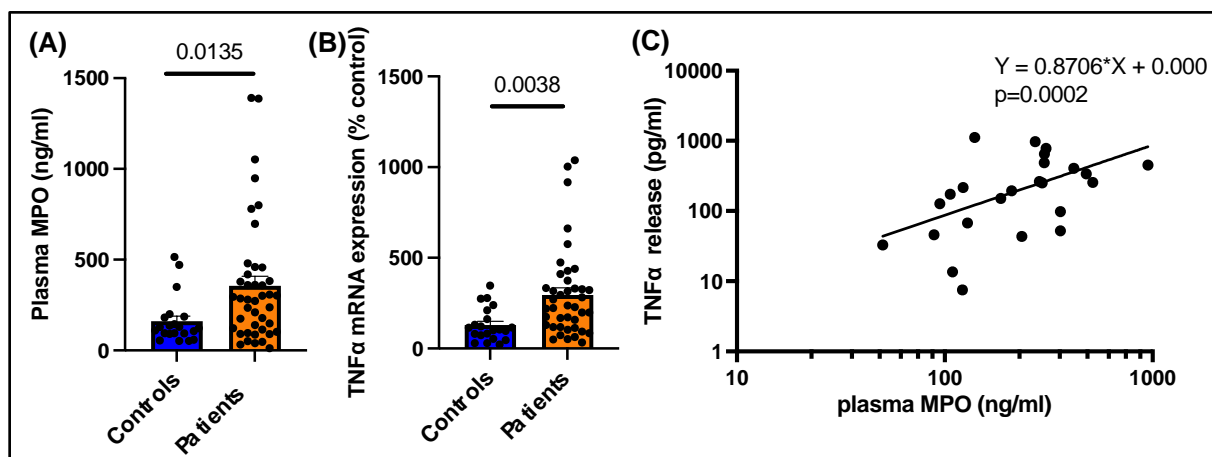


Abbildung 5: MPO korreliert mit der Aktivität von Monozyten in Patienten mit Herzinsuffizienz. MPO-Plasma-Spiegel von Patienten mit Herzinsuffizienz und gesunden Kontrollen. (n=21/42) (A). mRNA-Expression von TNF- α in Monozyten von Patienten und Kontrollen 2 Stunden nach Isolation (n=21/42) (B). Korrelation der Proteinexpression von TNF- α in Monozyten und den MPO-Plasma-Spiegeln (C). MPO= Myeloperoxidase. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben ¹¹⁸

Ergänzend wurde auch eine mögliche Bedeutung der MPO für die Rekrutierung von Immunzellen untersucht. Dafür wurde Wildtyp (WT)-Mäusen eine intraperitoneale Injektion von MPO, NaCl (Negativkontrolle) oder Thioglykolsäure (Positivkontrolle) verabreicht. Die intraperitoneale Injektion von MPO bewirkte, im Vergleich mit einer NaCl-Injektion, eine signifikant verstärkte Akkumulation von Leukozyten 3 Tage nach der Injektion (Abbildung 6).

Durchflusszytometrische Untersuchungen ergaben, dass diese Immunzellen vor allem Monozyten und Makrophagen waren (nicht dargestellt). Dies wurde als möglicher Hinweis für einen Einfluss der MPO auf die Migration und Chemotaxis von Immunzellen und insbesondere Monozyten gewertet.

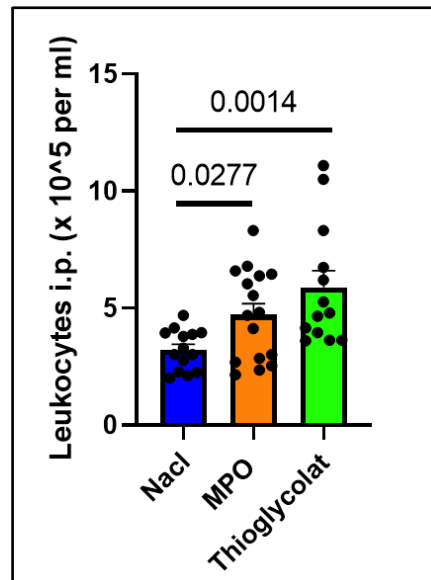


Abbildung 6: MPO-Injektion induziert intraperitoneale Leukozytenrekrutierung. Intraperitoneale Leukozytenanzahl bei WT-Mäusen 3 Tage nach intraperitonealer Injektion von NaCl 0,9 %, 10 µg/mL MPO in NaCl 0,9 %- bzw 3 % Thioglykolsäure in NaCl 0,9 %. WT: Wildtyp, MPO: Myeloperoxidase. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben ¹¹⁸

Um die Rolle der MPO für die Rekrutierung von Monozyten in einem klinisch relevanten Krankheitsbild zu untersuchen, wurde für WT- und MPO^{-/-}-Mäuse ein murines Modell der myokardialen Ischämie verwendet. Einen Tag nach Ligatur der LAD-Koronararterie wurden die Milz und das Herz der Mäuse entnommen, histologische Schnitte angefertigt und mithilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen die Marker CD11b (Cluster of Differentiation 11b, unter anderem exprimiert in Monozyten und Makrophagen) sowie Ly6G (Lymphozyten-Antigen 6G, hauptsächlich exprimiert in neutrophilen Granulozyten) dargestellt (Abbildung 7). Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl von Ly6G-positiven und CD11b-positiven Zellen in der Milz von MPO^{-/-}-Mäusen. Zudem war bei diesen Mäusen die Akkumulation von Ly6G-positiven Zellen im ischämischen Myokard reduziert. Der Einfluss von MPO auf die Rekrutierung und Migration von Immunzellen scheint also nicht nur durch die artifizielle, intraperitoneale Injektion von MPO auslösbar zu sein, sondern könnte auch in der Pathophysiologie des Myokardinfarktes eine Rolle spielen.

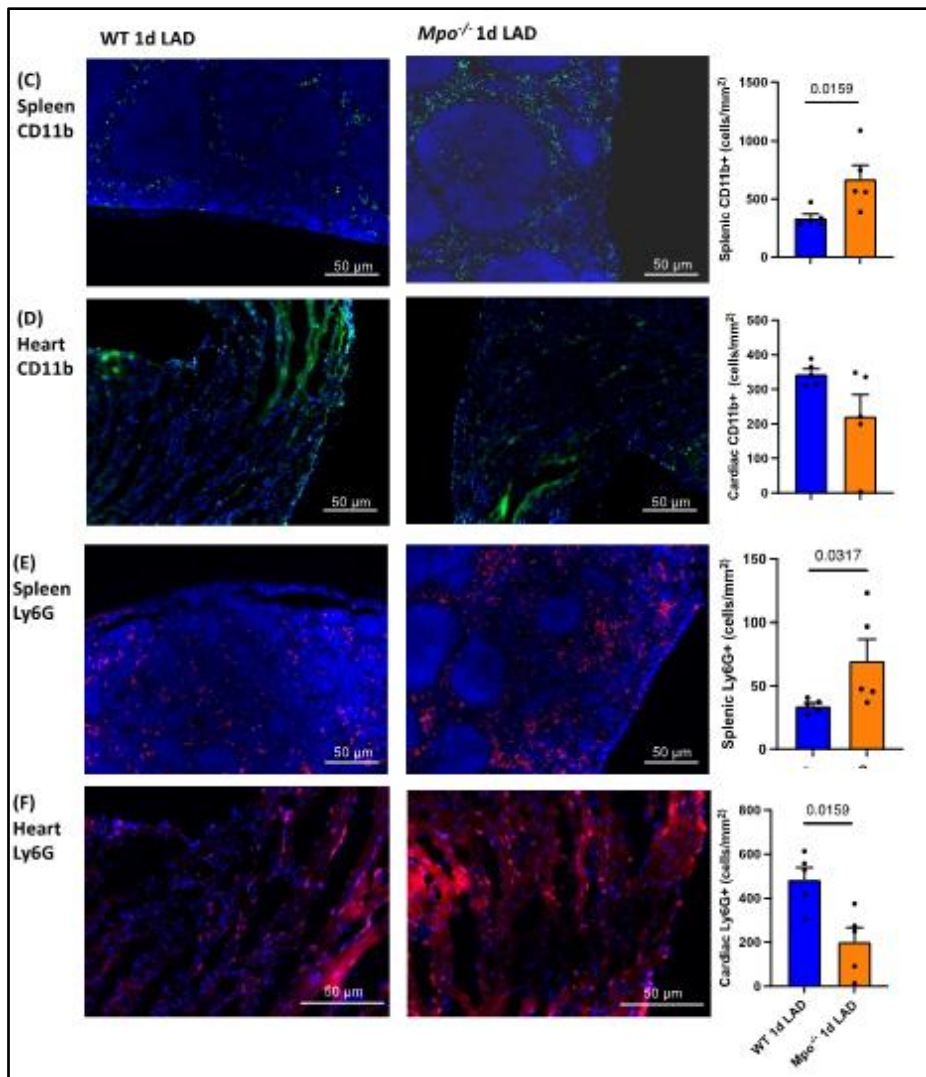


Abbildung 7: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder und Analysen von CD11b⁺- und Ly6G⁺-Zellen in der Milz sowie im linken Ventrikel von WT und MPO^{-/-} Mäusen, 1 Tag nach LAD Ligatur. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben ¹¹⁸

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Arbeitsgruppe bereits einen Einfluss von MPO auf die Aktivierung von Monozyten in Patienten mit Herzinsuffizienz zeigen konnte. Weitere Untersuchungen unseres Labors konnten außerdem Hinweise auf eine Beteiligung der MPO an Migrationsvorgängen verschiedener Immunzellen zeigen. Die Übertragung dieser Erkenntnisse auf das Auftreten einer myokardialen Ischämie bei Patienten lassen mutmaßen, dass eine Rolle der MPO auf die Rekrutierung von Immunzellen im Rahmen eines Myokardinfarktes möglich ist. Dies soll in der vorliegenden Dissertation genauer untersucht werden.

2.6. Zielsetzung dieser Dissertation

Monozyten tragen in besonderem Maße zur Inflammation und zum Remodeling nach einem Myokardinfarkt bei. Die Rekrutierung dieser Zellen aus dem Milzpool geschieht innerhalb von 24 h nach dem ischämischen Ereignis und ist maßgeblich über neutrophile Granulozyten vermittelt. Die genauen Mechanismen dieses Vorgangs sind allerdings noch nicht ausreichend aufgeklärt. Das Enzym Myeloperoxidase wird im Rahmen eines Myokardinfarktes durch neutrophile Granulozyten sezerniert und ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Während die lokalen inflammatorischen Effekte von MPO im Myokard bereits gut bekannt und vermehrt Ziel von klinischen Studien geworden sind, gibt es mittlerweile Hinweise darauf, dass die MPO auch für die Migration von Leukozyten und insbesondere von Monozyten von klinischer Relevanz sein könnte. Parallel dazu konnte auch für Myokardinfarkt-assoziierte extrazelluläre Vesikel ein Einfluss auf die Mobilisation splenischer Monozyten nachgewiesen werden. Hierfür könnten möglicherweise MPO-vermittelte Veränderungen der Vesikel von Relevanz sein. Um diesen Einfluss jedoch genauer untersuchen zu können, ist zunächst die Etablierung von Protokollen notwendig, um die Vesikel hinsichtlich ihrer Zusammensetzung analysieren zu können.

In dieser Dissertation soll daher der Frage nachgegangen werden, in welchem Ausmaß die MPO für die Rekrutierung splenischer Monozyten nach einer myokardialen Ischämie eine Rolle spielt. Hierfür sollen die vorhandenen histologischen Hinweise durch eine durchflusszytometrische Analyse ergänzt werden, um eine Differenzierung der Monozyten-Subpopulationen zu ermöglichen. Ergänzend soll ein reproduzierbares Konzept entwickelt werden, wie die nach einem Myokardinfarkt vermehrt freigesetzten extrazellulären Vesikel untersucht werden können.

Hierfür sollen die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

1. Führt eine Myeloperoxidase-Defizienz im Mausmodell einer myokardialen Ischämie zu einer verminderten Rekrutierung splenischer Monozyten?
2. Kann die Migration von Monozyten durch MPO in vitro verstärkt werden?
3. Was ist der zugrundeliegende Mechanismus, welcher in den Monozyten durch MPO induziert wird und der an der Migration dieser Monozyten beteiligt sein könnte?
4. Wie sieht ein praktikables und reproduzierbares Isolationsprotokoll aus, mit welchem die Zusammensetzung Myokardinfarkt-assoziiertes extrazellulärer Vesikel bei WT- und MPO^{-/-}-Mäusen verglichen werden können?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Verwendete Kits und Assays

Assay	Hersteller
BCA Protein-Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GoTaq® Master Mix	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Micro BCA Protein-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MPO ELISA mouse	Hycult Biotech, Uden, Niederlande
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland

3.1.2. Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Auflichtmikroskop Zellkultur Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Beatmungsgerät MiniVent	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus, March, Deutschland
BioRad Zell-Zählmaschine	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
BY-X800E Compact Fluoreszenz Mikroskop	Keyence Inc., Osaka, Japan
Cytek Aurora Flow Cytometer	Cytek, Fremont, Kalifornien, USA
Digitalwaage EMB 1000-2	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Eppendorf Comfort Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Feinwaage	VWR, International, Pennsylvania, USA
Fusion Fx Entwicklerkammer	Vilber Smart Imaging, Collégien, Frankreich
Heraeus HERAcell® CO2-Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isofluran-Anlage	Penlon Sigma, Abingdon, USA
Laminar Flow Werkbank SterilGARD Class II Type A/B3	The Baker Company, Sanford, USA
Leica MZ6 Operationsmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Breisgau, Deutschland
Mikroskop Olympus CK 2	Olympus, Shinjuku, Japan
Mikrotiterplatten-Zentrifuge	VWR International, Pennsylvania, USA
Multipipette 20–200 µl	Peqlab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
NanoDrop 2000/2000c Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Perfect spin 24Plus Zentrifuge	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
QuantStudio™ 3 Real Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Sorvall Discovery M120 Ultrazentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
S100AT4 fixed angle rotor (k-Faktor: 15,9)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Transmissions-Elektronenmikroskop JEOL JEM2100Plus	JOEL Ltd., Akishima, Tokio, Japan
Vakuumpumpe Mini-Vac Power	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Vortex Schüttler VF2 Janke & Kunkel	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Breisgau, Deutschland
Thermocycler Comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Eppendorf 5420	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Wasserbad SUB Aqua 26 Plus	Grant Instruments, Cambridge, England

ZetaView S/N 17-333	Particle Metrix, Meerbusch, Deutschland
---------------------	---

3.1.3. Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

6-Well Platten; 12-well- Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
µ-Slide I Luer	Ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland
0,22 µM Filter	Millex GS Merck, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
4-15 % Mini-PROTEAN Precast Protein Gels	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
96-well Platten	Greiner Bio One, Kremsmünster, Österreich
Amicon® Ultra Zentrifugenfilter, 10 kDa MWCO	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNase I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
dNTP-Mix,	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DTT	PanReacApplieChem
ECL-Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA-free Protease Inhibitor Tabletten	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ethanol 70 %	Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Falcon (15 ml und 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Fötales Kälberserum/FCS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
H ₂ O ₂	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

HBSS	Gibco Life Technologies Limited, England
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kollagenase Typ I	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kollagenase Typ XI	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MCP-1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Milchpulver (blotting grade, pulver, fettarm)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
MPO	Planta Natural Products, Vienna, Austria
Nitrocellulose-Membran	Amersham, Cytiva, Marlborough, MA, USA
Nunc® CryoTubes® Kryoröhrchen, Füllvolumen 1,8 ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Page Ruler für WesternBlot, Prestained Protein Ladder	Protein Biology, ThermoScientific
Paraformaldehyd	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBS	PAN-Biotech GmbH, Aidendach, Deutschland sowie Gibco Life Technologies Limited, England
PBS, steril	Gibco Life Technologies Limited, England
PCR-Mikrotiterplatten (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate, PCR Compatible DNA/RNase/PCR Inhibitors Free)	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PhosSTOP	Roche, Basel, Schweiz
Pipetten (P2, P10, P20, P100, P200, P1000)	Pipette, VWR International, Pennsylvania, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland sowie Biozym Scientific GmbH 2023, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Polystyrol Beads 3,00 µm	Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA

Ponceau S Solution	SERVA, Heidelberg, Deutschland
qEVOoriginal© 35 nm SEC-Säule	IZON Science LTD, Christchurch, Neuseeland
Red Blood Cell Lysis Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
RNase freies Wasser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
TC-Flasche T75, steril	Sarstedt, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRIzol™ Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.2. In vivo Experimente

Für sämtliche Experimente wurden 8 bis 14 Wochen alte MPO^{-/-}- und WT-Mäuse mit C57BL/6J Hintergrund (The Jackson Laboratory, Bar Harbour, USA) verwendet. Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) unter den Lizenznummern 2014.A234 sowie 2020.A487 genehmigt

Sämtliche Operationen und Organentnahmen wurden von einem eigens geschulten labortechnischen Assistenten der Arbeitsgruppe durchgeführt. Erst die weitere Prozessierung der Organe und des Blutes wurden von mir selbst durchgeführt.

3.2.1. Myokardinfarkt-Modell mittels permanenter LAD Ligatur

Das Mausmodell einer myokardialen Ischämie wurde bereits von Lindsey et al. ausführlich beschrieben ¹¹⁹. Die Mäuse wurden mit dem Inhalationsanästhetikum Isofluran (4 % vol/vol zur Narkoseeinleitung und 2 % vol/vol zur Narkoseerhaltung) anästhesiert und erhielten zusätzlich eine Schmerzausschaltung durch die subkutane Applikation von 0,05 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin 30 Minuten vor dem Eingriff. Nach Narkoseeinleitung erfolgte eine

endotracheale Intubation durch einen darin geschulten labortechnischen Assistenten und eine maschinelle Ventilation mit 150 Atemzügen pro Minute bei einem Atemzugvolumen von 7 $\mu\text{L/g}$ Körpergewicht (Harvard Apparatus, Holliston). Zum Wärmehalt wurden die Mäuse auf einer beheizten Platte gelagert. Anschließend wurde unter Verwendung eines Operationsmikroskopes (Leica MZ6, Leica Microsystems) eine laterale Thorakotomie im vierten Interkostalraum links durchgeführt und der linke Ventrikel dargestellt. Mithilfe eines 8/0 Polypropylen-Fadens wurde der vordere absteigende Ast der linken Koronararterie (left anterior descending artery, LAD) ligiert. Die resultierende Ischämie des linken Ventrikels wurde anschließend durch den erfahrenen Laborassistenten mittels visueller Begutachtung des Ablassens der linken Ventrikelvorderwand kontrolliert. Anschließend wurde die Thoraxwand wieder verschlossen und die Mäuse erhielten zur postoperativen Schmerztherapie zweimal täglich 0,05 mg/kg Buprenorphin subkutan.

24 Stunden nach dem Eingriff wurde den Versuchstieren unter tiefer, terminaler Anästhesie mit Isofluran der Thorax erneut eröffnet. Anschließen wurde mit einer 22G-Kanüle der rechte Ventrikel punktiert und die maximal mögliche Menge (circa 800-1000 μL) Vollblut entnommen. Dieses wurde unmittelbar in einem EDTA-Röhrchen gesammelt und anschließend mehrfach invertiert, um eine Hämostase zu verhindern.

Mäuse, die sich von dem Eingriff nicht erholten oder während, beziehungsweise nach der Prozedur verstarben, wurden von der Organentnahme und den weiteren Analysen ausgeschlossen.

3.2.2. Immunzellen-Durchflusszytometrie

Organentnahme und Probenaufbereitung

Nach der Entnahme des Blutes wurde das Herz der Versuchstiere mit 10 mL kaltem PBS gespült. Anschließend wurde der linke Ventrikel, einschließlich des Ventrikelseptums, entfernt, gewogen und mit einer Schere in kleine Stücke zerteilt. Das Gewebe wurde in einer enzymatischen Lösung aus Kollagenase I (450 U/mL), Kollagenase XI (125 U/mL), Hyaluronase (60 U/mL) und DNase I (60 U/mL) in HBSS für eine Stunde bei 37 °C verdaut. Im Anschluss wurde die Zellsuspension durch einen 50 μm Filter gegeben, in warmem RPMI + 10 % FBS resuspendiert und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (400 xg, 5 min) wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 200 μL FACS-Pufferlösung (Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) + 2 % FBS) resuspendiert.

Weiterhin wurde die Milz vollständig entnommen und gewogen. Anschließend wurde das Gewebe durch einen Zellfilter mit 70 μm Poren gegeben und in FACS-Pufferlösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde wiederum durch einen Zellfilter (50 μm Poren)

gegeben und die Suspension anschließend für 5 min bei 350 xg bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Zellpellet in 5 mL Erythrozyten-Lysepuffer (RBC-Lysepuffer) aufgenommen und für 3 min bei RT inkubiert. Nach Auffüllen mit 12 mL PBS und erneutem Zentrifugieren bei 400 xg für 5 min wurde der Überstand entfernt und die Zellen in FACS-Pufferlösung resuspendiert.

Durchflusszytometrische Untersuchung

Die isolierten Zellen von Milz und Herz wurden auf 96 well Platten gegeben. Nach einer Zentrifugation bei 400 xg für 3 min wurde der Überstand entfernt und der FcR-Blockierungs-Antikörper anti-CD16/32 (Verdünnung 1:100, BD) und der Live Dead UV Antikörper (Verdünnung 1:1000, BioLegend), jeweils gelöst in FACS-Pufferlösung, hinzugefügt und die Zellen für 20 min lichtgeschützt und auf Eis inkubiert. Die Blockade des FcR-Rezeptors verhindert ein unspezifisches Binden von Antikörper an diesen Rezeptor, das Live Dead Staining ermöglicht die Unterscheidung von vitalen und toten Zellen.

Nach der Inkubation erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 400 g für 3 min und ein Verwerfen des Überstandes. Als Nächstes wurden die Antikörper in einer zuvor bestimmten, optimalen Verdünnung hinzugefügt. Alle Antikörper wurden in FACS-Pufferlösung gelöst und es wurden 50 µL der Lösung durch inverses Pipettieren hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen für 20 min lichtgeschützt bei 4 °C inkubiert, wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nun entweder in 200 µL FACS-Pufferlösung aufgenommen und unmittelbar durchflusszytometrisch analysiert, oder in FACS-Pufferlösung mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bei 4 °C bis zum nächsten Tag gelagert.

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte mit dem Cytex Aurora Spektral Durchfluss-Zytometer und die Analyse der Daten wurde mit der FlowJo Software durchgeführt. Monozyten wurden als lebende CD45⁺CD3e⁻Ly6G⁻CD19⁻CD11b⁺CD115⁺ Zellen definiert und in ihrer Expression von Ly6C und CCR2 unterschieden. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism.

Fluor	Target	Clone	Dilution	Source
BUV496	CD45	30-F11	1:200	BD
BUV563	Ly6G	1-A8	1:200	BD
BUV661	CD11b	M1/70	1:400	BD
BUV737	CD3e	145-2C11	1:150	BD
BV650	Ly6C	HK1.4	1:100	BioLegend
BV785	CCR2	SA203G11	1:100	BioLegend
Spark NIR 685	CD19	6D5	1:400	BioLegend
AF488	CD115	AFS98	1:100	BioLegend

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Immunzellen-Durchflusszytometrie

3.2.3. MPO-Plasma-ELISA

Das EDTA-Vollblut wurde zweimal bei 5000 xg für 10 min zentrifugiert und das resultierende Plasma jeweils in ein frisches Reagiergefäß überführt. Zur Messung der MPO-Konzentration wurde anschließend ein Enzym-gekoppelter Immunassay (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) durchgeführt. Bei diesem biochemischen Verfahren binden die, in der Probe nachzuweisenden, Antigene an spezifische Antikörper, mit welchen die Mikrotiterplatte des ELISAs beschichtet ist. In diesem Fall wurde ein ELISA-Kit der Firma Hycult Biotech verwendet, bei welchem ein spezifischer Antikörper gegen MPO vorhanden war. Nachdem mittels wiederholter Waschschriffe ungebundene Substanzen entfernt wurden, wird anschließend ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper, welcher ebenfalls an das Zielantigen bindet, hinzugegeben. In diesem Fall wurde ein Biotin-konjugierter Sekundärantikörper verwendet. Bei der anschließenden Zugabe von Streptavidin-Peroxidase bindet diese an das Biotin des Sekundärantikörpers. Als finaler Schritt wird dann das Substrat Tetramethylbenzidin hinzugefügt, welches mit der Peroxidase zu einem farbigen Reaktionsprodukt umgesetzt wird. Dieser Farbumschlag kann im Anschluss dann spektrophotometrisch gemessen werden. Nach 30minütiger Inkubation bei 20-25 °C wird die Reaktion durch die Zugabe von Oxalsäure gestoppt und die Produktmenge durch eine spektrophotometrische Messung bei 450 nm und einen anschließenden Vergleich mit einer Standardkurve ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism

3.3. In vitro Experimente

3.3.1. Kultivierung humaner THP-1 Monozyten

Die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 ist bereits seit vielen Jahren als Modell für die Forschung an Monozyten sowie deren Differenzierung zu Makrophagen etabliert ¹²⁰. In vitro Experimente zur Erforschung der mechanistischen Grundlagen von Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten können durch die Nutzung dieses Modells einfach und unter objektivierbaren Bedingungen durchgeführt werden.

Humane THP-1-Monozyten wurden in Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI), welches mit 10 % fetalem Rinderserum und einer einprozentigen Kombination aus den Antibiotika Penicillin und Streptomycin supplementiert wurde, bei 37 °Celsius und 5 %CO₂ inkubiert. Das Wachstum und die Konfluenz wurden täglich unter einem invertierten Lichtmikroskop kontrolliert und die Zellen wurden alle drei Tage gesplittet. Dazu wurden die THP-1-Monozyten in 50 mL Falcons überführt, für 5 Minuten bei 300 xg zentrifugiert und anschließend in 5 mL frischem Medium resuspendiert. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden 10-20% der Zellsuspension anschließend in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät und mit frischem Medium inklusive FCS und Penicillin/Streptomycin supplementiert.

3.3.2. Stimulation der THP-1 Monozyten

Für die Stimulation wurden die THP-1 Monozyten 5 min bei 300 xg zentrifugiert, das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und es wurden jeweils 200.000 Zellen auf ein well einer 12-well Platte gegeben. Anschließend wurden als Medium entweder reines RPMI, RPMI mit 10 ng/mL MPO oder 10 ng/mL MPO plus 0,04 µM H₂O₂ hinzugefügt. H₂O₂ wurde verwendet, da es das wichtigste Substrat für MPO darstellt. Die Zellen wurden wiederum bei 37 °Celsius und 5 % CO₂ für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 300 xg zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen anschließend mit TRIzol lysiert oder für Migrations-Assays weiterverwendet.

3.3.3. Migrations-Assay

Die wie unter 3.3.2 beschrieben inkubierten THP-1 Monozyten wurden auf µ-Slide I Luer gegeben. Als Chemoattraktant wurde auf einer Seite des Slides MCP-1 (CCL2, der wichtigste Ligand des CCR2-Rezeptors) in einer Konzentration von 100 ng/mL hinzugefügt. Die Slides wurden anschließend in die Inkubationskammer eines Keyence BY-X800E Compact

Fluoreszenz Mikroskop eingesetzt und für 5 h bei 37 °Celsius und 5 %CO₂ inkubiert. In dieser Zeit wurde alle 30 Sekunden ein Bild aufgenommen, um die Zellmigration zu untersuchen. Zur Auswertung wurde die TrackMate Software verwendet. Für jeden Slide wurde die zurückgelegte Gesamtstrecke von 10 zufällig zu Beginn ausgewählten Zellen verfolgt. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism.

3.3.4. Genexpressionsanalysen

RNA-Isolation

Unmittelbar nach dem Ernten und Lysieren der Zellen erfolgte die Isolation der RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) anhand der Bedienungsanleitung. Bei diesem Verfahren bindet die RNA aus den lysierten Zellen an eine spezielle Silika-Membran und kann durch anschließende Waschschriffe von anderen Bestandteilen gereinigt werden. Zur Verringerung der Kontamination mit DNA wurde zusätzlich ein optionaler DNA-Verdau mittels DNasen durchgeführt. Als letzter Schritt wird schließlich die RNA durch Zugabe von RNase-freiem Wasser aus der Membran eluiert.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit einem NanoDropTM 2000/2000c - Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Das Prinzip dieser Untersuchung basiert auf den Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren und Proteinen. Während Nukleinsäuren bei der Absorption von Licht einen Peak bei 260 nm aufweisen, liegt das Maximum für Proteine bei 280 nm. Durch Messung der Absorptionswerte kann nun mit dem Lambert-Beerschen Gesetz einerseits die Konzentration der Nukleinsäuren berechnet werden und andererseits lässt das ebenfalls berechnete A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis den Grad der Kontamination der Probe erkennen, wobei verunreinigte Proben von weiteren Analysen ausgeschlossen wurden. Die isolierte RNA wurde anschließend unmittelbar verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

Reverse Transkription

Um die isolierte RNA mittels Polymerase-Kettenreaktion untersuchen zu können, wurde sie zunächst in komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) überschrieben. Dafür wurde das cDNA Reverse Transcription Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Zunächst wurde von der zuvor isolierten RNA eine Gesamtmenge von 500-1000 pg mit dem 7x gDNA Wipeout Buffer gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe bei 42 °C für 2 Minuten inkubiert und danach auf Eis gelagert. Dieser Schritt diente der Entfernung genomischer DNA, welche bei der vorherigen Isolation

gegebenenfalls noch nicht degradiert werden konnte. Nun wurde jeweils 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 1 µl Reverse Transcription Primer Mix und 4 µl 5x Quantiscript Reverse Transcription Buffer hinzugegeben und die eigentliche Reverse Transkription gestartet. Während der ersten Inkubation für 15 Minuten bei 42 °C konnte somit die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Der Primer Mix bindet dafür unspezifisch an den in jeder RNA vorkommenden Poly-A-Schwanz und durch Bindung der Reversen Transkriptase an den Primer wird dann die Bildung des komplementären Stranges initiiert. Der RT-Buffer sorgt für optimale Bedingungen und enthält die dafür notwendigen Nukleinsäuren. Bei einer anschließenden Inkubation bei 95 °C für 3 Minuten wird die Reverse Transkriptase inaktiviert. Die gewonnene cDNA wurde anschließend mit DNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 pg/ µl gebracht und anschließend unmittelbar verwendet oder bei -20 °C gelagert.

Real-Time Quantitative PCR

Mittels Real-Time quantitativer Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) konnten anschließend einzelne Genabschnitte amplifiziert und anschließend detektiert und quantifiziert werden. Durch Beobachtung der Amplifikationszyklen in Echtzeit können der Zyklus, ab dem die Reaktion exponentiell verläuft, exakt bestimmt und somit Rückschlüsse auf die Anfangskonzentration gezogen werden. Zunächst wird der cDNA-Doppelstrang durch eine Temperaturänderung in zwei Einzelstränge aufgeteilt. Im nächsten Schritt binden nach Senkung der Temperatur spezifisch entworfene Primer an die DNA-Einzelstränge. An den Primern setzt nun die DNA-Polymerase an und kann während der sogenannten Elongation wieder einen zum jeweiligen Einzelstrang komplementären DNA-Strang synthetisieren. Am Ende eines vollständigen Zyklus hat sich die Zahl an DNA-Doppelsträngen des gesuchten Gens dann verdoppelt. Liegt das gesuchte Gen in der cDNA vor, so zeigt sich folglich eine exponentielle Vervielfältigung. Der Zeitpunkt, an dem diese exponentielle Phase beginnt, wird als Threshold Cycle (C_t -Wert) bezeichnet. Je mehr von dem Gen bereits zu Beginn der RT-qPCR vorhanden war, desto früher wird dieser C_t -Wert erreicht. Um die Anzahl der erforderlichen Zyklen zu detektieren, wird zeitgleich die proportionale Amplifikation eines fluoreszierenden Farbstoffes durchgeführt. In dieser Arbeit wurde hierfür SYBR-Green verwendet. Dieser Farbstoff bindet doppelsträngige DNA und der resultierende Komplex emittiert grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm. Über die Messung dieses emittierten Lichtes kann nun auf die Zahl der Replikationszyklen geschlossen werden. Die für jede Probe individuell bestimmten C_t -Werte wurden anschließend mit der Delta-Delta-CT-Methode ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) ausgewertet. Hierfür wird der C_t -Wert der Probe mit den C_t -Werten eines nicht-regulierendem Gens und einer unstimulierten Kontrolle normalisiert. In dieser Doktorarbeit wurde hierfür das für diesen Zweck gut etablierte Gen der Ribosomen-Untereinheit 18S verwendet.

Diese Versuche wurden mit dem RT-qPCR-Kit der Firma Bio-Rad durchgeführt. Hierfür wurden auf einer qPCR-Mikrotiterplatte 2 ng der cDNA jeder Probe in Doppelbestimmung vorgelegt. Dazu wurden 8 µL eines zuvor angesetzten MasterMix bestehend aus 5 µL 2 x GoTaq qPCR Master Mix, 1 µL 100pmol forward primer, 1 µL 100pmol reverse primer, 0,1 µL 30 µM CXR Reference Dye und 0,9 µL dH₂O hinzu pipettiert. Die Platte wurde anschließend luftdicht verschlossen, zentrifugiert und in ein QuantStudio™ 3 Real-Time PCR Detection System überführt, in welchem die RT-qPCR nach einem standardisierten Protokoll (siehe Tabelle 3) mit den oben genannten Schritten durchgeführt wurde.

Alle verwendeten Primer wurden mit Nucleotide-Blast selbst entworfen. Die hierfür notwendigen mRNA-Sequenzen wurden der Pubmed Nukleotid Datenbank entnommen. Die entsprechenden Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 2 abgebildet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism.

Primer	Sequenz 5'-3'
CCR2	GTG TGT GGA GGT CCA GGA GT
CX3CR1	GAC GGT TGC ATT TAG CCA TT
18S	GGG GCA AGA TCC TCA CTT TC

Tabelle 2: Verwendete Primer-Sequenzen für die PCR.

Temperatur	Dauer
95 °C	2 Minuten
95 °C	3 Sekunden
60 °C	30 Sekunden

Tabelle 3: Verwendetes Cycling-Programm für die qRT-PCR

3.4. Isolation und Charakterisierung Myokardinfarkt-assoziiertes EV

3.4.1. Ultrazentrifugation

Die Operation der MPO^{-/-} und WT-Mäuse, sowie die anschließende terminale Blutentnahme erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben. Unmittelbar anschließend erfolgte die Isolation der extrazellulären Vesikel mittels Ultrazentrifugation. Bei dieser Technik werden sehr hohe Kräfte von 100.000 xg und höher verwendet, um kleine Moleküle wie EV zu sedimentieren. EV besitzen im Vergleich zu Plasmaproteinen und großen Lipoproteinen wie Chylomikronen und

VLDL eine höhere Dichte und ein höheres Gewicht, sodass durch eine passende Auswahl von Zentrifugationszeit und relativer Zentrifugalkraft (relative centrifugal force, rcf) die EV nahezu vollständig sedimentiert werden können, ein Großteil der Plasmaproteine und Lipoproteine jedoch im Überstand verbleibt. Um eine Kontamination mit Zellen, Zellfragmenten oder Plasmamembranbestandteilen zu verhindern, sind vorherige Zentrifugationsschritte mit niedrigeren Zentrifugalkräften erforderlich, bei welchen die EV im Überstand verbleiben. Dieses Vorgehen wird auch als differenzielle Zentrifugation bezeichnet. Zusätzlich erfolgte ein Filtrationsschritt, welcher Moleküle und Fragmente oberhalb eines bestimmten Größenwertes aussortiert.

Zunächst wurde die Vollblut-EDTA-Suspension unmittelbar nach der Blutentnahme zweimal mit 5000 xg für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und jeweils der Überstand in ein frisches Reagiergefäß überführt. Hierbei wurde darauf geachtet das Zellpellet nicht zu berühren, indem ein Sicherheitsabstand von mindesten 5 mm eingehalten wurde. Das Zellpellet wurde verworfen und das gewonnene Blutplättchen-arme Plasma (platelet-poor-plasma, PPP) wurde in einem 1,5 ml Reagiergefäß mit einer Phosphatgepufferten Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS) auf 1,2 ml aufgefüllt. Die entstandene Lösung wurde gründlich gevortext und anschließend mit einer 1 ml Spritze aufgenommen und langsam durch einen Filter mit einer Porengröße von 220 nm in ein frisches, Ultrazentrifugen-stabiles Reagiergefäß überführt. Der Filter wurde mit PBS nachgespült, bis das Reagiergefäß bis zu einer Markierung von 1,2 ml gefüllt war. Nun erfolgte die erste Ultrazentrifugation in einer Ultrazentrifuge (Sorvall Discovery M120) und einem Rotor mit fixiertem Neigungswinkel (S100AT4 fixed angle rotor, k-Faktor von 15,9) für 120 Minuten. Die Rotationsgeschwindigkeit von 47.000 Umdrehungen pro Minute entsprach dabei rund 120.000 xg und die Temperatur wurde auf +4 °C eingestellt. Nach Ablauf der Zentrifugationszeit wurde der Überstand unmittelbar abpipettiert, die Reagiergefäße erneut mit gefiltertem PBS auf 1,2 ml aufgefüllt und das entstandene Pellet durch gründliches vortexen gelöst. Anschließend erfolgte ein weiterer Ultrazentrifugationsschritt bei 120.000 xg und +4 °C für 90 Minuten. Diese Zeitdifferenz erklärt sich durch die unterschiedliche Dichte der Plasma-PBS- und EV-PBS-Suspensionen. In der EV-PBS-Suspension können die EV durch die geringere Dichte deutlich schneller pelletiert werden, wodurch bei einer längeren Zentrifugationszeit mit keiner weiteren Zunahme der Pelletierungs-Effizienz zu rechnen wäre, es jedoch durch die hohen einwirkenden Kräfte zu einer vermehrten Schädigung von Vesikeln und einer erhöhten Kontamination durch Plasmaproteine gekommen wäre¹²¹. Im Anschluss an diesen Schritt wurde erneut der Überstand abpipettiert und verworfen, das EV-Pellet wiederum in 100 µL gefiltertem PBS aufgenommen, nach gründlichem Vortexen aliquotiert und je nach Bedarf unmittelbar verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

3.4.2. Transmissionselektronenmikroskopie

Die EV-Pellets wurden nach Ultrazentrifugation in 100 µL gefiltertem PBS aufgenommen und anschließend der CECAD Imaging Facility der Universität zu Köln übergeben. Dort wurden mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (Transmission Electron Microscope JEOL JEM2100Plus) Schnittbilder der kryokonservierten EV-Suspensionen angefertigt. Diese wurden uns im Anschluss als TIF-Dateien zur Verfügung gestellt.

3.4.3. Nanopartikel Tracking Analyse

1 µL der EV-Suspensionen wurde in 1000 µL PBS gelöst und anschließend mittels Nanopartikel Tracking Analyse untersucht. Diese Untersuchung führte Herr Dr. Daniel Bachurski mit einer ZetaView S/N 17-333 (Particle Metrix) durch. Die Messungen erfolgten in 11 Positionen in 3 Zyklen und die Einstellungen wurden wie folgt gewählt: Sensitivität 75, Shutter 100, minimale Helligkeit 25, minimale Größe 5, maximale Größe 1000. Die Analyse erfolgte ebenfalls durch Herrn Bachurski mit der Software ZetaView Analyze 8.05.11 SP1 (Particle Metrix). Anschließend wurden uns die Messbedingungen und Ergebnisse als PDF-Dateien zur Verfügung gestellt.

3.4.4. Western Blot Analysen

Um ein Vorhandensein von EV nach der Ultrazentrifugation zu belegen, erfolgte der Nachweis definierter EV-Marker mittels Western Blot Analysen. Hierfür wurden die etablierten Marker ALIX, TSG101 und CD63 verwendet. Zudem wurde anhand von Oberflächenmarkern ein möglicher endothelialer (CD31), beziehungsweise neutrophiler (Ly6G) Ursprung der Vesikel untersucht.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Suspensionen der EV wurden nach der Ultrazentrifugation im Verhältnis 1:3-1:5 in Radioimmunprecipitation assay buffer (RIPA-Puffer) aufgenommen. Diesem Puffer wurden 1x PhosSTOP und 1x complete ultra Mini EDTA-free Protease Inhibitor hinzugefügt. Durch PhosSTOP werden gezielt Phosphatasen inhibiert und so die Proteine vor Dephosphorylierung geschützt. Dies hat den Vorteil, dass im weiteren Verlauf auch phosphorylierte Proteine noch nachgewiesen und quantifiziert werden können. Der Protease-

Inhibitor schützt die Proteine vor einem generellen Abbau durch Proteasen und verhindert somit verfälschte, oder falsch negative Resultate.

Anschließend wurde die Proteinkonzentration in den einzelnen Proben mit einem Pierce™ BCA-Protein-Assay-Kit von Thermo Scientific bestimmt. Hierzu wird zunächst ein Proteinstandard angesetzt, welcher exakt definierte Mengen an bovinem Serumalbumin (BSA) enthält und in demselben Puffer (RIPA) wie die Proben gelöst wird. Anschließend wurden die identischen Volumina der verschiedenen Standardkonzentrationen und der zu messenden Proben in eine 96-well-Platte pipettiert. Dabei wurde jeweils eine Doppelbestimmung vorgenommen, um die Genauigkeit erhöhen zu können und eventuelle Pipettierfehler auszuschließen. Dann wurden 200 µL des unmittelbar zuvor vorbereiteten Bicinchoninsäurehaltigen Reagenzes, mit einem pH-Wert von 11,25, in jedes well gegeben. Die Platte wurde in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät geschüttelt, um eine gleichmäßige Durchmischung von Probe und Reagenz sicherzustellen und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das BCA-Reagenz enthält zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}), welche an Peptidbindungen binden und unter den vorliegenden alkalischen Bedingungen zu einwertigen Kupferionen (Cu^+) reduziert werden. Durch die erhöhte Temperatur während der Inkubationszeit findet diese Reduktionsreaktion nicht nur, wie bei Raumtemperatur, an den Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin, sondern an Peptidbindungen generell statt. Dies hat zur Folge, dass das Ergebnis weniger von der Aminosäuren-Zusammensetzung der Proteine, sondern von der Proteinkonzentration abhängt. Die reduzierten, einwertigen Kupferionen bilden zusammen mit der Bicinchoninsäure einen blau-violetten Farbstoffkomplex, welcher nach erneuter gleichmäßiger Durchmischung bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen wurde. Anschließend wurde anhand der Mittelwerte der Absorptionswerte des Proteinstandards eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Konzentration der Proben durch Einsetzen in die Funktion der Standardkurve bestimmt werden konnte.

SDS-Gelelektrophorese

Um die Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden zwischen 10 und 15 µg Protein der zuvor quantifizierten Proben im Verhältnis 1:4 mit einem reduzierenden Probenpuffer (4x Tris-Glycin-Puffer („Lämmli-Puffer“) inklusive Dithiothreitol (DTT)) gemischt und anschließend für 5 Minuten bei 95 °C auf einem Thermocycler inkubiert. Bei dieser Temperatur werden die Proteine vollständig denaturiert und zusätzlich durch das DTT die Disulfidbrücken gespalten. Je nach Molekulargewicht und Anzahl der Zielproteine wurden entweder selbst gegossene 12 % Polyacrylamidgele oder 4-15 % Gradientengele der Firma BioRAD für die anschließende Gelelektrophorese verwendet. Dazu wurden die Taschen des Gels mit den Proben beladen

und die Elektrophorese zunächst mit 60 V für 10 Minuten und anschließend 100 V für weitere 100-120 Minuten durchgeführt. Um den Verlauf der Proteinauftrennung beobachten zu können und die Banden später zuordnen zu können, wurde ein Molekulargewichtsmarker auf jedem Gel separat aufgetrennt.

Western Blot-Analysen

Anschließend erfolgte ein Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran mittels Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad), welches für einen halbtrockenen Transfer geeignet ist. Unter Verwendung eines Transferpuffers (BioRad) wurden die Proteine dann für 120 min bei 200 mA vom Gel auf die Membran transferiert. Nachfolgend wurde die Membran für fünf Minuten auf einem Orbitalschüttler in Ponceau Rot Lösung gelegt. Die Ponceau Rot Lösung färbt unspezifisch alle transferierten Proteine, sodass der Transfererfolg beurteilt werden kann und zudem durch Schneiden der Membran eine Inkubation mit verschiedenen Antikörpern erfolgen kann. Nachdem mittels TBS/T die Ponceau Rot Lösung wieder abgewaschen wurde, wurden die Membranabschnitte jeweils für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Antikörperverdünnungslösung blockiert. Hierfür wurden je nach später verwendetem Antikörper entweder fünfprozentiges Milchpulver oder ein- bis fünfprozentiges bovines Serumalbumin (BSA) in TBS/T genutzt.

Die Membranen wurden danach mit den entsprechenden Antikörpern (siehe Tabelle 4) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membranen dreimal für 10 Minuten mit TBS/T gewaschen. Nach einer erneuten Inkubation mit dem zum Primärantikörper passenden Sekundärantikörper und einem erneuten dreimaligen Waschen mit TBS/T, erfolgte die Detektion der Zielproteine. Dafür wurden das SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (ThermoFisher Scientific) und ECL™ Start Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) in Verdünnungen von 1:1 bis 1:5 verwendet. Anschließend erfolgte eine Belichtung der Membranen unter Chemilumineszenz in einer Entwicklerkammer (Fusion Fx, Peqlab). Die Belichtungszeit wurde hierbei an die Bandenstärke nach einer Testbelichtung für zwei Sekunden angepasst.

Verwendeter Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
ALIX	Santa Cruz Biotechnology, SC-53540	1:200
TSG101	Sigma-Aldrich, T5701	1:250
CD63)	Sigma-Aldrich, SAB4301607	1:250
CD31	Abcam, AB25401	1:400
Ly6G	LsBio, LS-C112469	1:1000
Verwendeter Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Mouse IgG Peroxidase antibody	Vector Laboratories, PI-2000	1:10.000
Anti-Rabbit IgG Peroxidase antibody	Sigma Aldrich, A0545	1:10.000
Anti-Rat-IgG Peroxidase antibody	Vector Laboratories, PI-9400	1:10.000

Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Western Blot-Analysen.

3.4.5. Größenausschluss-Chromatographie

Da durch die Ultrazentrifugation die Vesikel zwar aus dem Plasma isoliert werden können, sich aber weiterhin eine große Menge an Plasmaproteinen und kleineren Lipoproteinen in der Suspension befindet, wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt unternommen, um die Kontamination zu minimieren. Hierfür wurde eine sogenannte Größenausschluss-Chromatographie (Size-exclusion chromatography, SEC) durchgeführt. Diese basiert auf dem Prinzip unterschiedlicher Elutionsprofile gelöster Stoffe. Die porösen Polymere der stationären Phase sind nur für Moleküle unterhalb einer bestimmten Größe durchdringbar (und diese unterscheidet sich je nach Porengröße). Dadurch verändert sich das Diffusionsvolumen dieser kleinen Moleküle deutlich, sodass sie deutlich länger in der Chromatographiesäule zurückgehalten werden als größere Stoffe, welche nur in den Zwischenräumen zwischen den Polymeren Platz finden. Dies bedingt einen schnelleren Fluss der größeren Substanzen und sorgt für die unterschiedlichen Elutionsprofile. Wenn man die eluierten Substanzen nun schrittweise auffängt, kann anhand der unterschiedlichen Elutionsprofile eine Differenzierung erfolgen. Da die EV (~ 50-200 nm) deutlich größer als die Lipoproteine HDL (7-12 nm) und LDL (20-30 nm) sowie gelöste Plasmaproteine sind, können sie in unterschiedlichen Fraktionen erwartet werden ¹¹⁷.

Für die Größenausschluss-Chromatographie wurden aus Polyacrylamid-Polymeren bestehende Säulen verwendet (qEVOoriginal© 35 nm, IZON Science LTD). Die Säulen, sowie alle verwendeten Puffer wurden vor Beginn auf Raumtemperatur gebracht, um eine Gasbildung zu verhindern. Anschließend wurden die Säulen mittels einer Klammer und eines Stativs senkrecht ausgerichtet, sodass ein optimaler Fluss gewährleistet war. Die Säule wurde mit 10 mL PBS (entsprechend einem Säulenvolumen) gespült. Dafür wurde die Pufferlösung in das Reservoir der Säule gefüllt, der untere Verschluss entfernt und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurde die durch Ultrazentrifugation gewonnene Vesikel-Suspension in insgesamt 500 µl PBS gelöst und nach gründlichem Vortexen auf die Säule geladen. Anschließend wurden 1,85 mL PBS auf die Säule geladen und der Durchfluss verworfen. Danach wurde damit begonnen den Durchfluss in 1,5 mL-Reagiergefäßen aufzufangen. Während zwölfmal jeweils in 500 µl Schritten PBS auf die Säule gegeben wurde, wurde das resultierende Durchflussvolumen in zwölf separaten 1,5 mL Gefäßen aufgefangen und chronologisch beschriftet. Nachdem die Säule mit 15 mL PBS gespült wurde, konnte die nächste Probe aufgeladen werden und wie oben beschrieben fortgefahren werden. Die einzelnen Fraktionen wurden entweder unmittelbar weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert. Nach der letzten Probe wurde die Säule mit 15 mL PBS mit 0,05% Natriumazid als Bakteriostatikum gespült, der entsprechende Durchfluss wiederrum verworfen und die Säule bis zur weiteren Verwendung entsprechend der Herstellerangaben bei +4 °C gelagert.

3.4.6. Micro BCA-Assay

Um die Kontamination der einzelnen Fraktionen mit Plasmaproteinen zu quantifizieren, wurde anschließend mittels Micro-BCA Assay die Proteinmenge in den einzelnen SEC-Fraktionen ermittelt. Dafür wurde aus den SEC-Fraktionen 100 µl Probenvolumen entnommen, dieses mit 100 µl Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA-Puffer) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dem RIPA-Puffer wurden vor der Verwendung wiederum ein Phosphatase-Inhibitor sowie ein Protease-Inhibitor hinzugefügt, um eine Dephosphorylierung von Proteinen, sowie deren Degradierung durch Proteasen zu verhindern. Für den Bicinchoninsäure-Assay wurde anschließend das micro-BCA-Kit der Firma Thermo Fisher Scientific entsprechend der Herstellerangaben verwendet, da es den Nachweis auch geringer Proteinmengen ermöglicht. Das weitere Vorgehen ist identisch mit dem unter 3.4.4 beschriebenen.

3.4.7. Mikropartikel-basierte Durchflusszytometrie der SEC-Fraktionen

Um die Vesikel-enthaltenden Fraktionen der SEC zu determinieren, wurde ein Mikropartikel-basiertes Durchflusszytometrie-Verfahren etabliert. Hierfür werden Polystyrol-Kügelchen (englisch: beads) verwendet, welche mit Biomolekülen gekoppelt werden, um eine durchflusszytometrische Analyse zu ermöglichen. Zunächst wurden die verbliebenen 400 µl der SEC-Fraktionen mit 1 µl carboxylierten Polystyrol-Beads (Polybead Microspheres, Polysciences) mit einem Durchmesser von 3 µm vermischt und anschließend in einem Überkopf-Schüttler über Nacht bei +4 °C inkubiert. Durch nicht-kovalente Bindungen (z.B. über van der Waals-Kräfte von Proteinen an die Polystyrol-Oberfläche wurden die EV in den einzelnen Fraktionen an die Beads gebunden. Am nächsten Tag wurden der Lösung 400 µl PBS mit 2 % bovinem Serumalbumin (BSA) hinzugefügt und es erfolgte eine erneute Inkubation bei 25 °C auf einem Thermoshaker bei 800 Umdrehungen pro Minute. Durch diesen Schritt konnten eventuell verbliebene Bindungsstellen der Beads vollständig mit BSA blockiert werden, sodass eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Beads verhindert wurde. Danach wurde das Volumen vollständig in ein Durchflusszytometrie-Gefäß überführt und für 2 Minuten bei 1000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde umgehend abpipettiert und die Beads in 1 mL FACS-Pufferlösung resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Beads wiederum in 500 µL FACS-Pufferlösung resuspendiert. Es wurden jeweils 100 µL der Lösung in frisch FACS-Tubes überführt und jeweils 100 µL der Antikörper (siehe Tabelle 5), gelöst in FACS-Pufferlösung, hinzugegeben. Zusätzlich wurden Isotypen-Kontrollen der entsprechenden Antikörper verwendet. Nach einer Inkubation auf Eis für 20 min wurden die Beads wiederum zweimal mit 500 µL FACS-Pufferlösung gewaschen und unmittelbar anschließend mit einem finalen Volumen von 100 µL auf dem Cytex Aurora Durchflusszytometer gemessen. Die Daten wurden anschließend mit FlowJo analysiert.

Fluor	Target	Clone	Dilution	Source
PE	CD9	MZ3	1:100	BioLegend
PE	CD81	Eat-2	1:100	BioLegend
PE	Isotype-Rat	RTK2758	1:100	BioLegend
PE	Isotype Hamster	HTK888	1:100	BioLegend

Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Mikropartikel-basierte Durchflusszytometrie der SEC-Fraktionen.

3.5. Massenspektrometrische Untersuchung der EV

Um eine spätere genauere Untersuchung der Vesikel zu ermöglichen, wurde ein Pilotversuch gestartet, in welchem die isolierten Vesikel von einer einzelnen und die gepoolten isolierten Vesikel von drei verschiedenen Mäusen massenspektrometrisch untersucht und miteinander verglichen wurden. Für die gepoolte Probe wurden die Vesikel der Mäuse nach dem letzten Ultrazentrifugationsschritt in ein gemeinsames Reagiergefäß überführt und anschließend wie oben beschrieben mit der SEC fortgefahren. Die EV-enthaltenden Fraktionen der SEC wurden anschließend gemeinsam in einem Amicon Filter Device aufgefangen, in welchem ein Filter mit einem gewichtsabhängigen Grenzwert von 10 kDa enthalten ist. Durch eine Zentrifugation bei 4000 xg für 10 min konnten die Vesikel-enthaltenden Fraktionen auf circa 50 µL konzentriert werden, während verbliebene Plasmaproteine mit geringem Molekulargewicht entfernt werden konnten. Die resultierenden EV-Suspensionen wurden mittels SDS-Verdau (5%-SDS in PBS) für die massenspektrometrische Untersuchung vorbereitet, welche im Anschluss durch die Proteomics Core Facility der Universität zu Köln durchgeführt wurde. Die nachgewiesenen Proteine wurden uns anschließend als Excel-Datei zur Verfügung gestellt.

4. Ergebnisse

4.1. MPO-Plasma-Level sind bei Wildtyp-Mäusen nach Myokardinfarkt erhöht

Um die MPO-Plasmaspiegel nach einem Myokardinfarkt zu bestimmen, wurden diese in WT-Mäusen mittels MPO-ELISA untersucht. Mit dieser Methode können Proteine qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Es konnte eine statistisch hochsignifikant erhöhte Konzentration an MPO im Plasma von WT-Mäusen einen Tag nach Ligatur der LAD-Arterie im Vergleich zu Kontrolltieren ohne LAD-Ligatur nachgewiesen werden. Dies ist ein Indikator für die Relevanz dieses Enzyms im Rahmen einer myokardialen Ischämie.

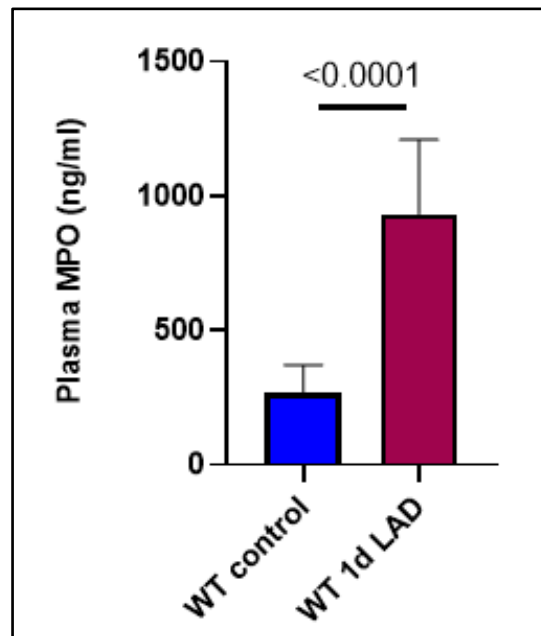


Abbildung 8: Ein Tag nach LAD-Ligatur zeigen sich erhöhte Plasma-Level von MPO in Wildtyp-Mäusen. $n=14/11$. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. WT= Wildtyp, 1d LAD= ein Tag nach Ligatur der LAD-Koronararterie, MPO= Myeloperoxidase

4.2. Die Mobilisation splenischer Monozyten nach myokardialer Ischämie ist bei MPO^{-/-}-Mäusen reduziert.

Um den Einfluss von MPO auf die Rekrutierung von splenischen Monozyten nach myokardialer Ischämie zu untersuchen, wurden WT- und MPO^{-/-}-Mäusen die LAD-Koronararterie ligiert und einen Tag später die Immunzellen aus Milz und Myokard durchflusszytometrisch untersucht. Es wurden anhand der verwendeten Antikörper Monozyten

als lebende Zellen, welche $CD45^+CD3e^-Ly6G^-CD19^-CD11b^+CD115^+$ waren, definiert. CD45 wurde als Marker für leukozytäre Zellen verwendet. Immunzellen, welche nicht Ziel dieser Analyse waren wurden durch die Antikörper gegen CD3 (T-Lymphozyten), Ly6G (neutrophile Granulozyten) und CD19 (B-Lymphozyten) exkludiert. Sowohl CD11b als auch CD115 werden durch Monozyten exprimiert und dienen daher als Marker für diese Zellart. Zur besseren Lesbarkeit sind die Monozyten in den untenstehenden Abbildungen als CD115⁻-Zellen bezeichnet. Die als Monozyten definierten Zellen wurden weiter in die beiden hauptsächlichen Subpopulationen von Ly6C^{high}- und Ly6C^{low}-Monozyten unterteilt. Die Gating-Strategie ist in Abbildung 9 dargestellt.

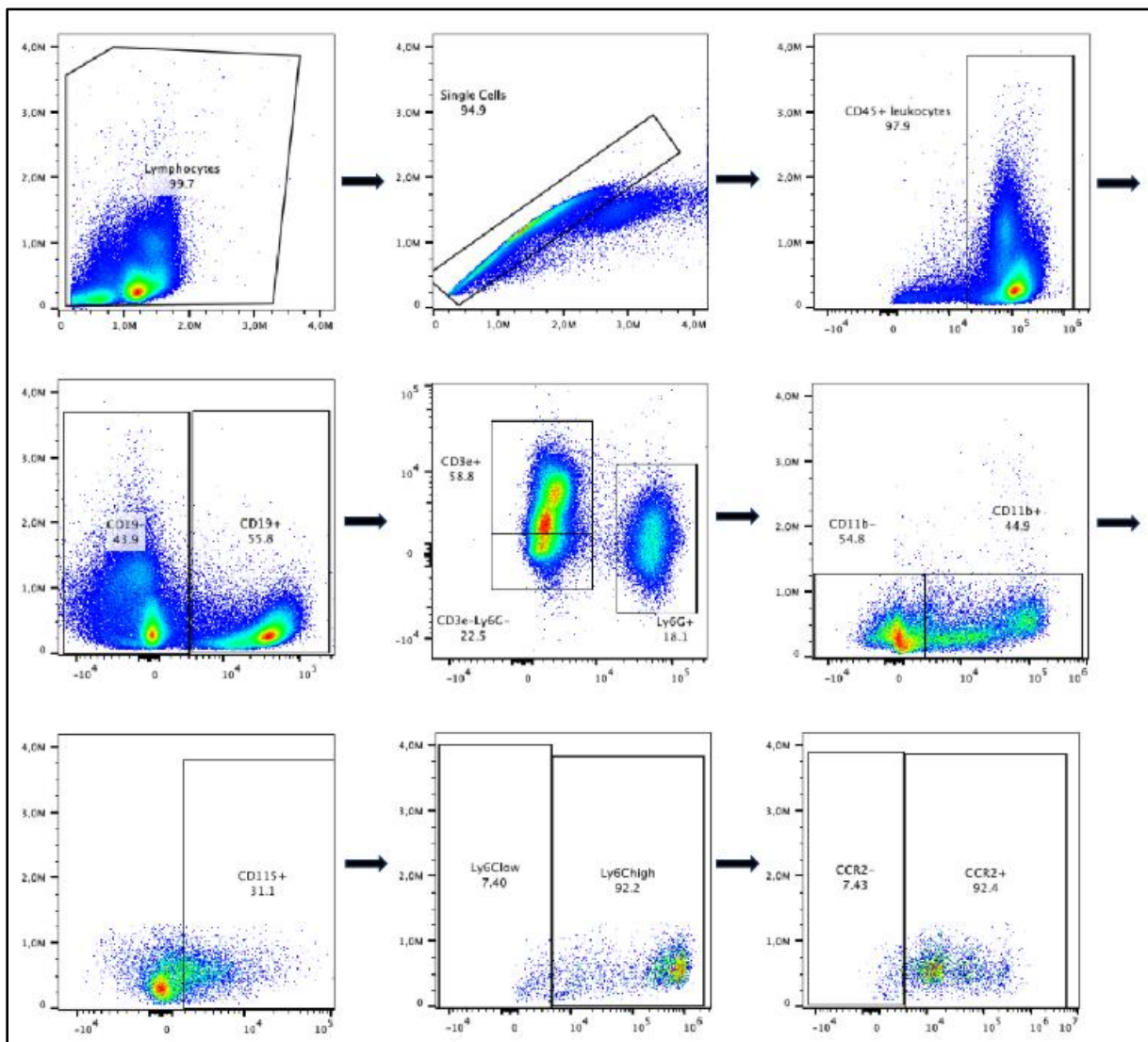


Abbildung 9: Gating-Strategie für die Definition von Ly6C^{high}-Monozyten.

Anschließend wurden die Ly6C^{high}-Monozyten weiter untersucht und nach der Ausprägung der Expression des Chemokinrezeptors CCR2 in Ly6C^{high}CCR2⁺ und Ly6C^{high}CCR2⁻ eingeteilt. Bei der statistischen Auswertung der absoluten Zellzahlen zeigte sich eine signifikant höhere

Anzahl an $CD45^+CD3e^-Ly6G^-CD19^-CD11b^+CD115^+Ly6C^{high}$ -Zellen, das heißt $Ly6C^{high}$ -Monozyten, pro g Organgewicht in der Milz (Abbildung 10a) und eine signifikant geringere Anzahl dieser Zellen im Myokard (Abbildung 10d) von $MPO^{-/-}$ -Tieren. Weitere Analysen zeigten, dass dieser Effekt lediglich bei den $Ly6C^{high}$ -Monozyten auftrat, welche ebenfalls den CCR2-Rezeptor exprimierten (Abbildung 10b und e). Bei CCR2-negativen $Ly6C^{high}$ -Monozyten war keine vermehrte Zellzahl in der Milz beziehungsweise keine verminderte Anzahl im Myokard nachweisbar (Abbildung 10c und f). MPO könnte demzufolge eine Funktion für die Mobilisation von splenischen $Ly6C^{high}/CCR2^+$ -Monozyten nach myokardialer Ischämie haben. Diese über MPO vermittelte Mobilisation von Monozyten könnte dann zur anschließenden Akkumulation von $Ly6C^{high}/CCR2^+$ -Monozyten im Myokard beitragen.

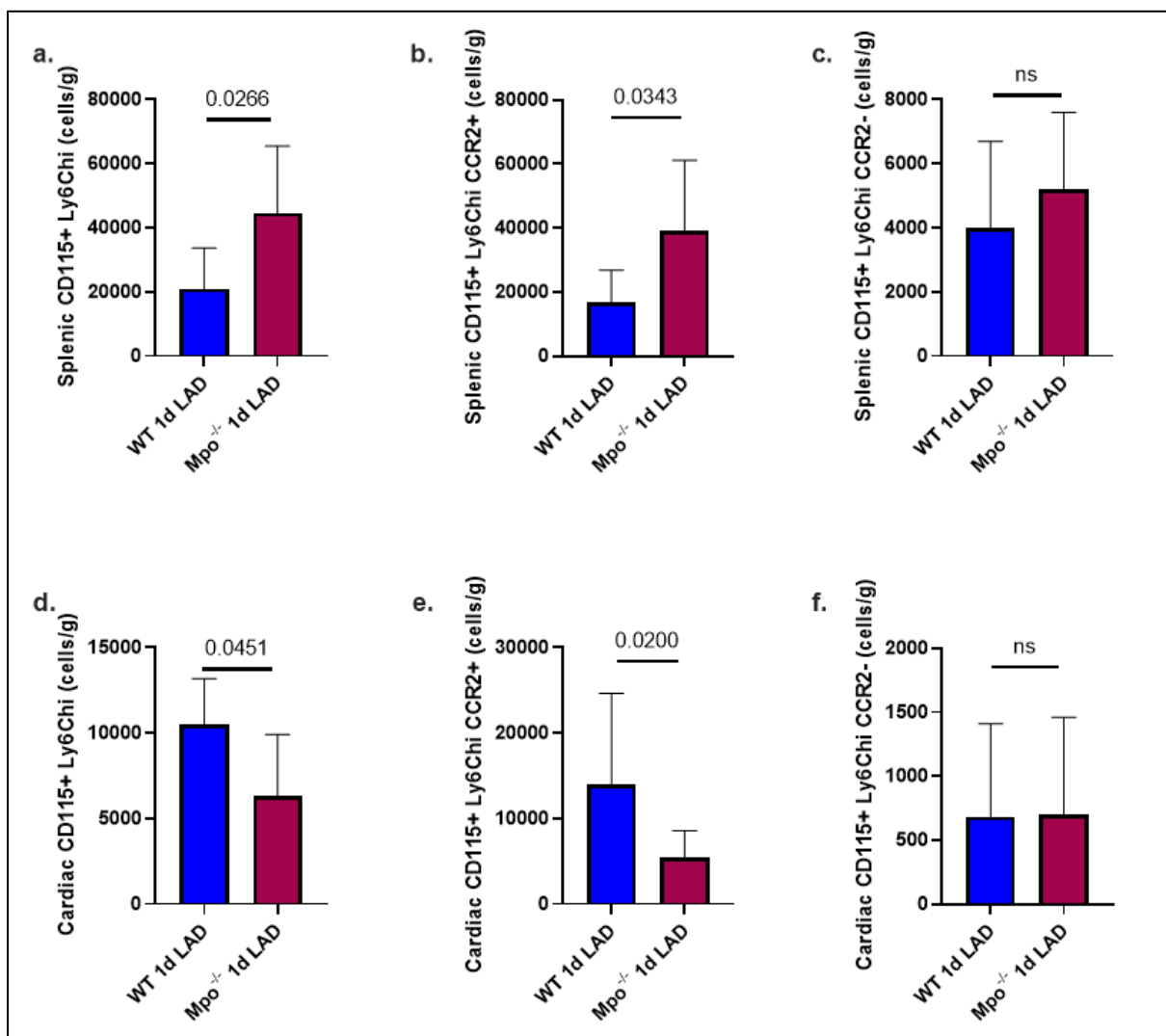


Abbildung 10: Anzahl an $Ly6C^{high}$ -Monozyten in Milz (a-c) und Myokard (d-f) von WT- und $MPO^{-/-}$ -Mäusen. Die Mobilisation der $Ly6C^{high}$ -Monozyten aus der Milz und die Rekrutierung in das Myokard sind in MPO -defizienten Mäusen einen Tag nach LAD-Ligatur reduziert. Weitere Analysen verdeutlichen, dass dieser Effekt sich auf $Ly6C^{high}/CCR2^+$ -Monozyten beschränkt. $n=8/10$ (Milz) bzw. $6/8$ (Herz). Die Daten sind als Mittelwerte + SEM angegeben. $CD115^+Ly6C^{hi}$ = $Ly6C^{high}$ -Monozyten, WT= Wildtyp, 1d LAD= ein Tag nach Ligatur der LAD-Koronararterie, MPO= Myeloperoxidase

4.3. Inkubation mit MPO und H₂O₂ erhöht die Expression des Chemokinrezeptors CCR2 in THP-1 Monozyten

Um eine direkte Wirkung von MPO auf die Expression von Chemokinrezeptoren, welche für die Rekrutierung dieser Zellen in das Myokard wichtig sind, in Monozyten zu überprüfen, wurden THP-1 Monozyten in der Zellkultur über Nacht mit 10 ng/mL MPO allein, oder MPO und dem Substrat H₂O₂ in einer Konzentration von 4 µM inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Ernte der Zellen und nach Isolation der RNA ein quantitativer Nachweis der mRNA der Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 mittels RT-qPCR. In Abbildung 11 ist die Expression der mRNA von CCR2 und CX3CR1 im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle dargestellt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der mRNA des Chemokinrezeptors CCR2 nach Inkubation mit MPO und H₂O₂ jedoch nicht nach Inkubation mit MPO allein. Die Expression der mRNA von CX3CR1 war nach Inkubation mit MPO und H₂O₂ ebenfalls numerisch erhöht, dies war jedoch statistisch nicht signifikant.

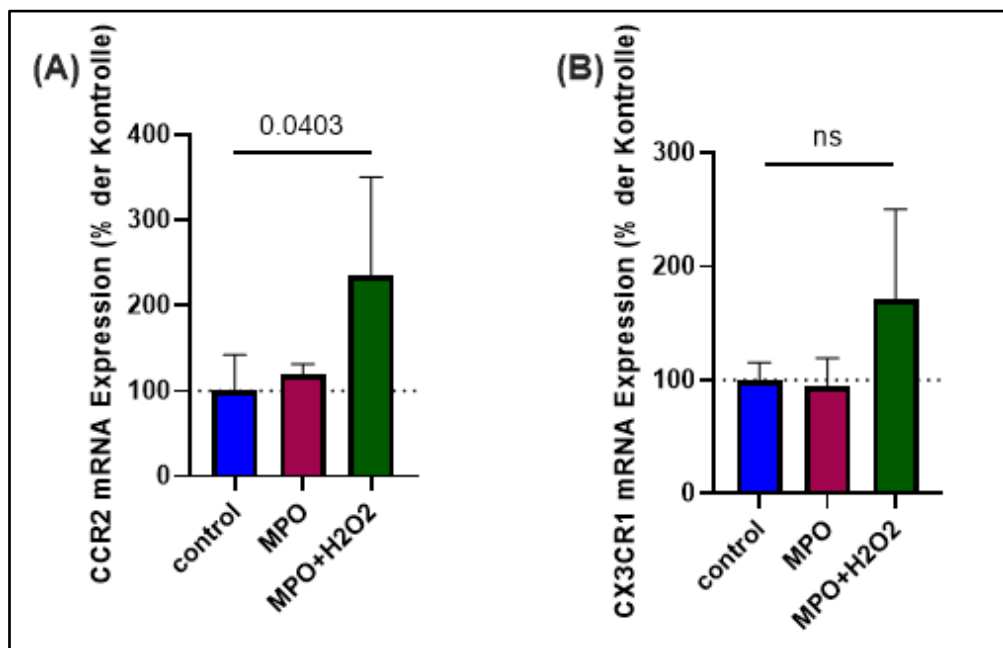
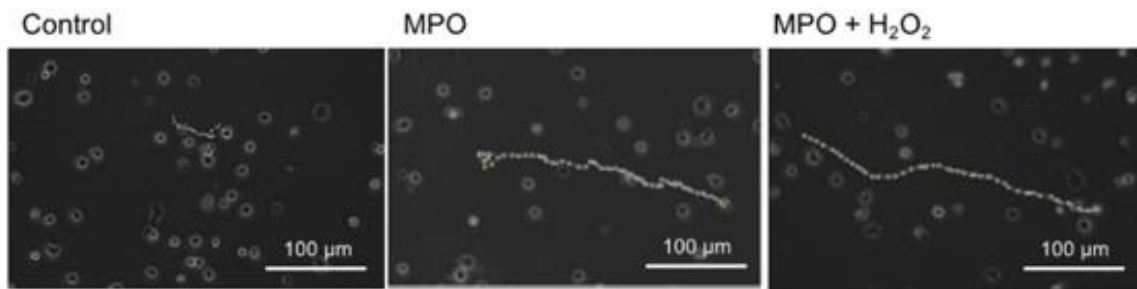


Abbildung 11: Die Stimulation von THP-1 Monozyten mit MPO und seinem Substrat H₂O₂ erhöht die mRNA-Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 (A) und (nicht signifikant) CX3CR1 (B). *n*=5/5/5. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. MPO= Myeloperoxidase, ns= nicht signifikant

4.4. MPO verstärkt die Migration von THP-1 Monozyten in vitro

Nach dem Nachweis einer vermehrten Expression von CCR2 in den Monozyten wurde überprüft, ob diese vermehrte Expression auch zu einer verstärkten Migration führt. Dafür wurden erneut THP-1 Monozyten über Nacht mit MPO, bzw. MPO und H₂O₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit diesen Zellen ein Migrations-Assay entlang eines Chemokin-Gradienten durchgeführt. Als Chemokin wurde MCP-1 gewählt, da es den hauptsächlichsten Liganden von CCR2 darstellt. Die Migration der Zellen wurde mittels live-imaging auf einem Mikroskop mit Inkubationskammer visualisiert. Es wurden je nach Kondition drei bis fünf Versuche durchgeführt und pro Versuch jeweils 10 Zellen zufällig ausgewählt, deren zurückgelegte Strecke entlang des MCP-1 Gradienten mit der Software TrackMate erfasst wurde. In Abbildung 12 sind repräsentative Bilder der Zellmigration (A) sowie der statistischen Auswertung der migrierten Strecke im Vergleich zu einer unstimulierten Kontrolle (B) abgebildet. Dabei zeigte sich nach Inkubation mit MPO eine hochsignifikant erhöhte Migration um rund 50%. Eine Stimulation mit MPO und H₂O₂ hatte sogar eine Verdopplung der zurückgelegten Strecke zur Folge. Diese Ergebnisse lassen eine Wirkung von MPO auf die MCP-1 vermittelte Migration vermuten.

(A)



(B)

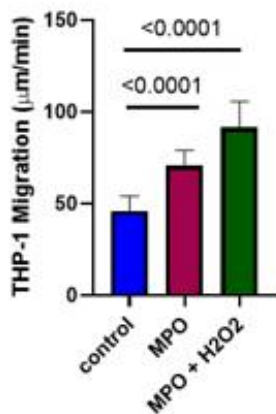


Abbildung 12: Die Inkubation von THP-1 Monozyten mit MPO bzw. MPO und H₂O₂ erhöht die Migration dieser Zellen entlang eines MCP-1 Gradienten. n= 5/5/3. (A) zeigt repräsentative Bilder der Migrationsstrecke eines Monozyten. Die Daten unter (B) sind als Mittelwert + SEM angegeben. MPO= Myeloperoxidase

4.5. Effektivität des EV-Isolationsprotokolls

Um die Effektivität der EV-Isolation zu beurteilen, wurden nach der Ultrazentrifugation die EV-Suspensionen auf Proteinkontamination und das Vorhandensein von Markerproteinen für extrazelluläre Vesikel untersucht. Eine weitere Aufreinigung der EV-Suspensionen durch die Größenausschluss-Chromatographie konnte mittels Bicinchoninsäure-Assay und im Mikropartikel-basierten Durchflusszytometrie-Verfahren anhand der Markerproteine CD9 und CD81 bestätigt werden.

4.5.1. Visualisierung der EV-Größenverteilung nach Ultrazentrifugation mittels TEM und NTA

Als erster Schritt zur Isolation der EV aus dem Blutplasma wurde eine differenzielle Ultrazentrifugation durchgeführt. Anschließend erfolgte die Visualisierung der EV mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) und die Bestimmung der Größenverteilung via Nanopartikel Tracking Analyse (NTA). Die Nanopartikel Tracking Analyse ist eine Methode zur Charakterisierung extrazellulärer Vesikel. Die Vesikel-enthaltenden Proben werden durch einen Laser beleuchtet und die entstehende Lichtstreuung wird durch eine hochauflösende Kamera aufgezeichnet. Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung verändert sich diese Lichtstreuung und durch die Registrierung dieser Änderungen und die Verwendung spezieller Algorithmen können anschließend die Partikelgröße und die Konzentration berechnet werden. Die TEM zeigte die Isolation intakter EV, welche einen Durchmesser von rund 100 nm besaßen und eine typische runde bis ovale Form aufwiesen. Die NTA belegte eine mittlere Größe der EV von circa 120 nm und eine normale Größenverteilung. Repräsentative Bilder der TEM und eine repräsentative NTA sind in Abbildung 13 zu finden.

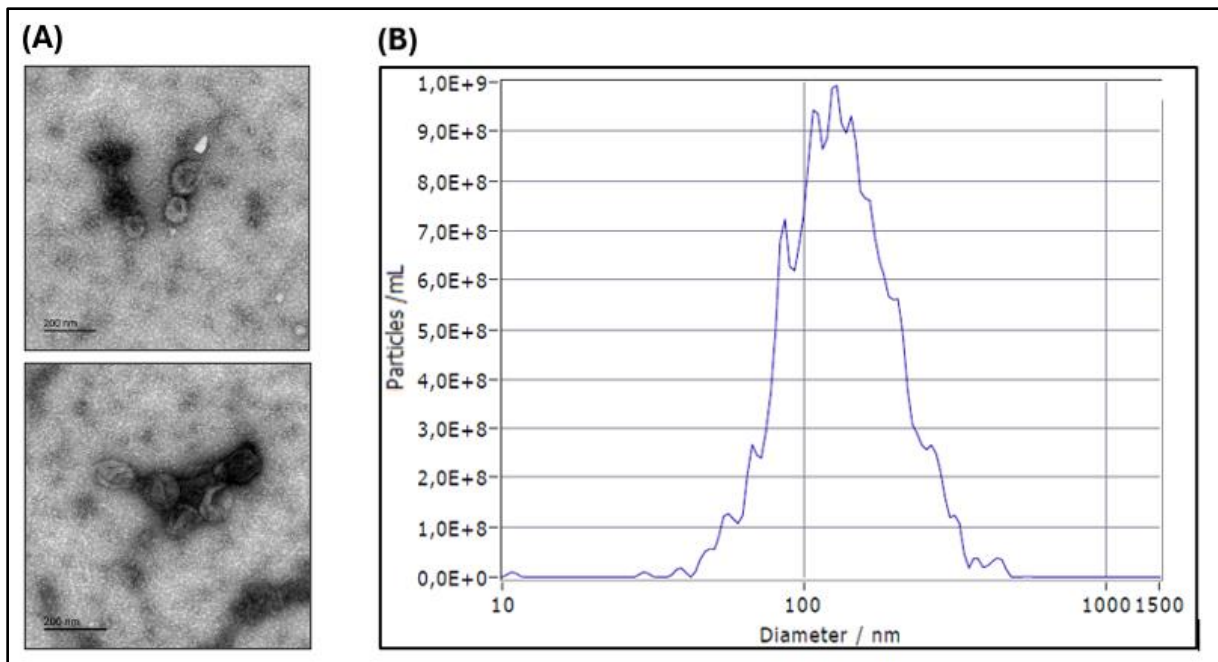


Abbildung 13: Visualisierung der EV-Größenverteilung. Repräsentative Bilder der elektronenmikroskopischen Analyse bestätigen das Vorliegen von EV mit einem Durchmesser von rund 100 nm (A) Repräsentative Nanopartikel Tracking Analyse bestätigt diese durchschnittliche Größe und belegt eine normale Größenverteilung (B)

4.5.2. Nachweis von EV-Markerproteinen mittels Western-Blot Analysen

Um die Effektivität des etablierten Isolationsprotokolls zu überprüfen, wurden die EV-Suspensionen auf das Vorliegen von EV-assoziierten Proteinen (Markerproteine für das Vorhandensein extrazellulärer Vesikel) mittels Western-Blot Analysen überprüft. Hierfür wurden als etablierte Marker das Tetraspanin-Protein CD63, das Tumoranfälligkeits-Gen 101 (tumor susceptibility gene 101, TSG101) sowie das ALG-2-interagierende Protein X (ALIX) verwendet. In allen acht untersuchten Proben konnten die EV-assoziierten Proteine nachgewiesen werden. Der erfolgreiche Nachweis der drei Markerproteine in allen untersuchten EV-Suspensionen ist in Abbildung 14 dargestellt.

Bei der Untersuchung handelt es sich um einen von der internationalen Gesellschaft für extrazelluläre Vesikel geforderten qualitativen Nachweis. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind keine konstitutiv exprimierten Proteine für extrazelluläre Vesikel bekannt (sogenannte Housekeeping-Proteine), anhand derer die Proteinmenge der Zielproteine normalisiert werden könnte. Eine quantitative Aussage über die Anzahl der Vesikel in Abhängigkeit von der Menge der exprimierten Markerproteine ist daher nicht möglich.

	WT BL	KO BL	WT LAD	KO LAD	Plasma	kDa
CD63						25
TSG101						44
ALIX						96

Abbildung 14: Qualitativer Nachweis der EV-Markerproteine in den EV-Suspensionen mittels Western Blot. *n* = 2/2/2/2. WT= Wildtyp, KO= MPO^{-/-}, BL= baseline, LAD= nach Ligatur der LAD-Arterie

4.5.3. Nachweis endothelialer und neutrophiler Oberflächenmarker in den EV-Suspensionen

Um die Herkunft der isolierten EV weiter zu untersuchen, wurde das Vorhandensein entsprechender Oberflächenmarker von Endothelzellen (CD31) und neutrophilen Granulozyten (Ly6G) ebenfalls mittels Western Blot Analysen untersucht (Abbildung 15). Dabei konnte wiederum in allen untersuchten EV-Suspensionen der Nachweis beider Oberflächenmarker erfolgen. Ein Vorhandensein von EV aus endothelialeem und neutrophileem Ursprung in den entsprechenden Suspensionen kann daher vermutet werden. Ein Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen ist jedoch auch hier aufgrund des Fehlens eines Housekeeping-Proteins nicht möglich.

	Myokard	WT BL	KO BL	WT LAD	KO LAD	kDa
CD31						130
Ly6G						25

Abbildung 15: Qualitativer Nachweis der Oberflächenmarker CD31 und Ly6G in den EV-Suspensionen mittels Western Blot. *n* = 3/3/3/3. WT= Wildtyp, KO= MPO^{-/-}, BL= baseline, LAD= nach Ligatur der LAD-Arterie

4.5.4. Reduktion der Proteinkontamination nach SEC

In einer ergänzenden Western Blot Untersuchung sollte das Vorhandensein des abundanten Plasmaproteins Albumin überprüft werden. Albumin wird verwendet, um die Kontamination der EV-Suspensionen mit den Plasmaproteinen der anfänglich verwendeten Blutprobe einzuschätzen. Im besten Falle sollte kein Albumin und somit wenig bis keine Plasmaproteine in der EV-Suspension vorhanden sein. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, konnte jedoch in

sämtlichen untersuchten Proben ein Nachweis von Albumin erfolgen. Insofern war von einer relevanten Kontamination der Probe mit Plasmaproteinen auszugehen.

	WT BL	KO BL	WT LAD	KO LAD	Plasma	kDa
ALB						67

Abbildung 16: Nachweis des Plasmaproteins Albumin in der EV-Suspension nach Ultrazentrifugation. n= 2/2/2/2. WT= Wildtyp, KO= MPO^{-/-}, BL= baseline, LAD= nach Ligatur der LAD-Arterie

Das Vorliegen von zahlreichen Plasmaproteinen in den EV-Suspensionen würde jedoch die nachfolgend angestrebte, massenspektrometrische Analyse der EV-Proteinzusammensetzung erschweren. Unterschiede in der Proteinzusammensetzung könnten in diesem Falle nicht auf die WT- und MPO^{-/-}-EV zurückführbar sein, sondern wären auch mit einer unterschiedlichen Zusammensetzung des Plasmas erklärbar. Vor weiterführenden Untersuchungen war demzufolge eine Reduzierung der Kontamination erforderlich. Daher wurde im Anschluss an die Ultrazentrifugation eine Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt. Hierfür wurden aus Polyacrylamid-Polymeren bestehende Säulen mit einer Ausschlussgröße von 35 nm verwendet. Da die EV zu groß für die Poren der Polymere der SEC-Säulen sind, haben sie ein geringeres Verteilungsvolumen und werden deutlich schneller aus den Säulen eluiert als kleinere Moleküle derselben Probe, wie beispielsweise Plasmaproteine oder Lipoproteine. Die EV-Suspensionen wurden in zeitlicher Reihenfolge ihrer Elution in zwölf Fraktionen aufgeteilt, von denen im Anschluss Fraktionen mit geringer Menge an Protein bei gleichzeitig hoher Anzahl an EV für weitere Analysen identifiziert werden sollten.

Hierfür wurde zunächst in sämtlichen Fraktionen der SEC mittels Bicinchoninsäure-Assay die Gesamtmenge an Protein quantifiziert. Die Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen ist in Abbildung 17 dargestellt. Auffallend ist hier eine starke Zunahme der Proteinkonzentration ab Fraktion 7, wohingegen in den Fraktionen 1-6 nur sehr geringe Mengen an Protein zu finden sind.

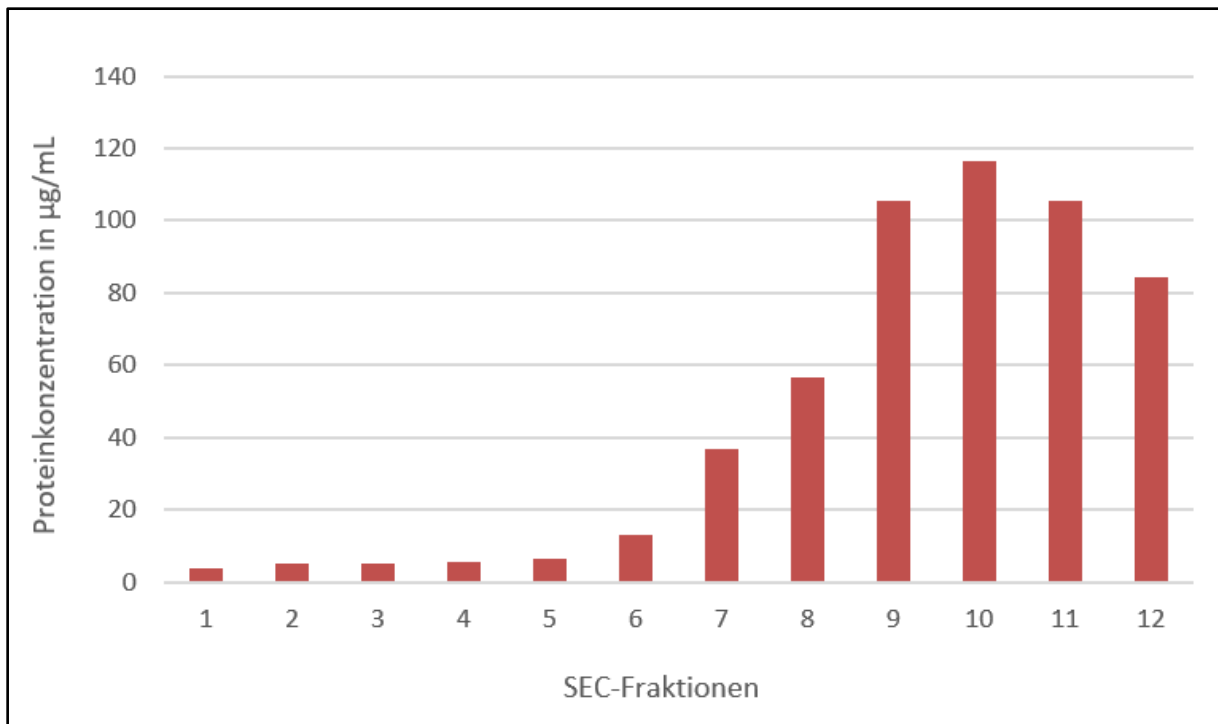


Abbildung 17: BCA-Assay der SEC-Fraktionen zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Erst ab Fraktion 7 nimmt diese merklich zu, sodass bis zur Fraktion 6 von einer geringen Kontamination mit Plasmaproteinen auszugehen ist. $n=1$. SEC= Size Exclusion Chromatographie

Weiterhin wurde eine Mikropartikel-basierte Durchflusszytometrie derselben Proben durchgeführt, um anhand der EV-Markerproteine CD9 und CD81 die EV-enthaltenden Fraktionen nachweisen zu können. Die EV binden an die verwendeten Mikropartikel (Beads) und da sie die Tetraspanine CD9 und CD81 auf ihrer Oberfläche exprimieren, können die spezifischen Antikörper anschließend daran binden. Abbildung 18 zeigt die Anzahl an Antikörper-positiven Ereignissen in den Fraktionen 1-12 der SEC. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, konnte durch die SEC eine sehr gute Auftrennung erfolgen, da die Menge an EV-Marker-positiven Ereignissen in den Fraktionen 3-6 (für CD9) beziehungsweise 3 und 4 (für CD81) am höchsten ist. Eine ausschließliche Verwendung der Fraktionen 3-6 für weitere Untersuchungen ermöglichte daher eine ausgeprägte Aufreinigung der EV-Suspensionen von Plasmaproteinen.

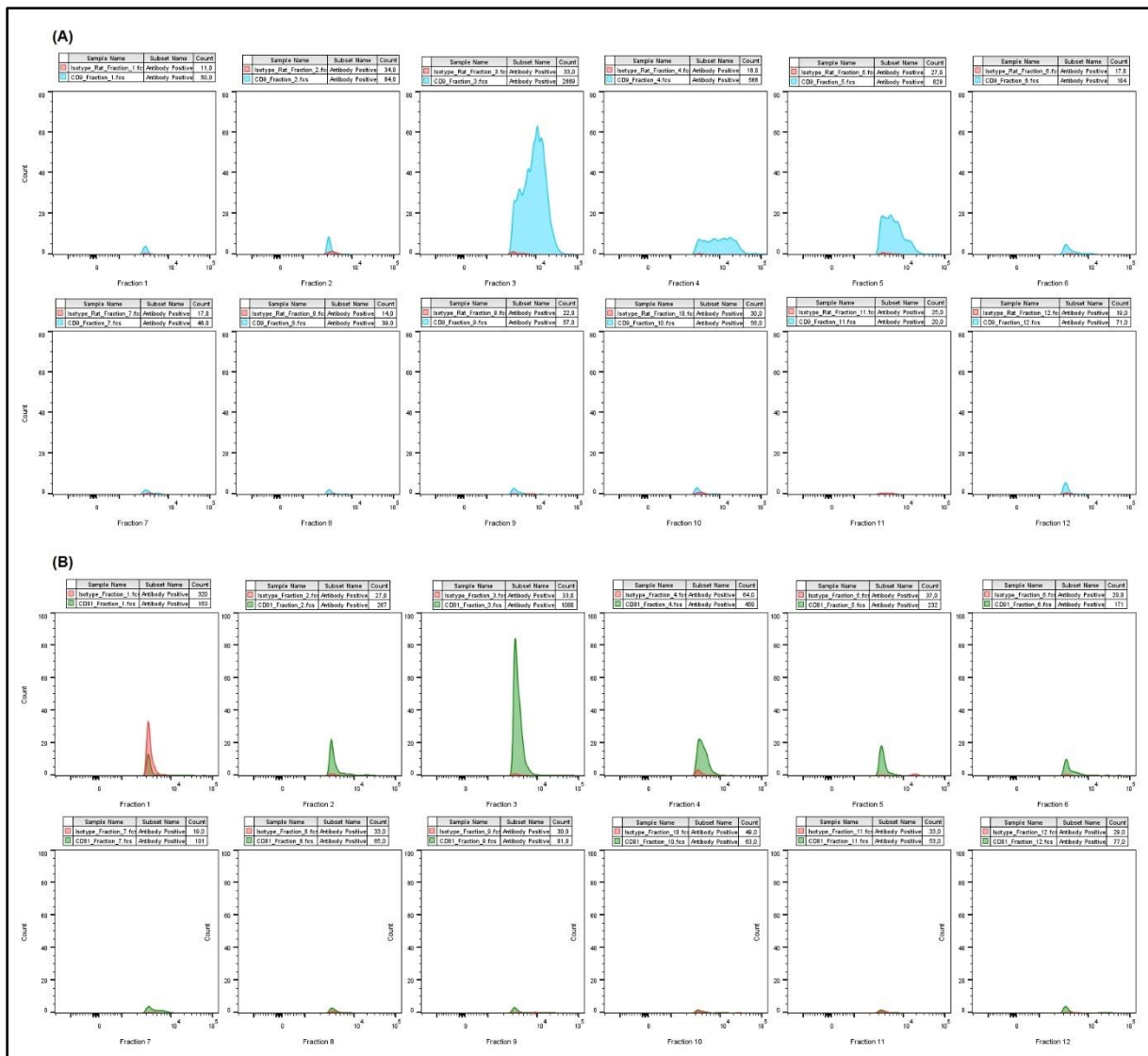


Abbildung 18: Anzahl der Antikörper-positiven Ereignisse in der Bead-basierten Durchflusszytometrie der SEC-Fractionen 1-12. Auf der X-Achse sind die Intensitäten der PE-gelabelten Antikörper abgebildet, auf der Y-Achse die Anzahl der Ereignisse. (A) Für den Antikörper gegen CD9 (blau) und die Isotypen-Kontrolle (rot). (B) Für den Antikörper CD81 (grün) und die Isotypen-Kontrolle (rot). Die meisten positiven Ereignisse konnten in den Fractionen 3-6 (CD9) beziehungsweise 3-4 (CD81) nachgewiesen werden.

4.5.5. Nachweis zahlreicher EV-assoziiierter Proteine in den EV-enhaltenden SEC-Fractionen

Um die Qualität der EV-Isolation zu evaluieren und um die Erfolgsaussichten einer Proteinanalyse einschätzen zu können, wurde eine erste, qualitative Proteomanalyse durchgeführt. Hierfür wurden die EV-enhaltenden Fractionen der SEC gepoolt, mittels Filtration aufkonzentriert und im Anschluss massenspektrometrisch untersucht. Für die Isolation der EV wurde einmal das Plasma einer einzigen Maus verwendet und einmal das Plasma von drei Mäusen gepoolt. Die Untersuchung selbst erfolgte nach SDS-Verdau der

Proben in unserem Labor durch die Proteomics Core Facility der Universität zu Köln. Insgesamt wurden 560 verschiedene Proteine nachgewiesen und im Anschluss als Excel-Datei zur Verfügung gestellt. Die gefundenen Proteine wurden mit den etablierten Datenbanken Exocarta und Vesiclepedia verglichen, welche jeweils eine Liste mit den 100 am häufigsten in EV nachgewiesenen Proteinen zur Verfügung stellen. Dabei zeigte sich bereits in der Einzelprobe eine hohe Rate an Übereinstimmungen, welche in der gepoolten Probe sogar noch gesteigert wurde. Die genaue Anzahl an Top 100 Proteinen, die in der Einzelprobe, beziehungsweise in der gepoolten Probe gefunden wurden, kann Tabelle 5 entnommen werden. Zu diesen Proteinen zählen beispielsweise EV-Oberflächenmarker wie das Tetraspanin-Protein CD9, Proteine des Energiestoffwechsels wie die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und die Pyruvatkinase M2 (PKM2), oder auch Proteine mit einer Rolle für Zytoskelett-Organisation und Zellmigration wie zum Beispiel Annexine (ANXA1, ANXA2, ANXA4) und Alpha-Aktinin (ACTN4). Interessanterweise konnte MPO weder in der Einzelprobe noch in der gepoolten Probe nachgewiesen werden. Da für diesen Versuch lediglich Plasma von WT-Mäusen mit LAD-Ligatur verwendet wurde, gab es keine Kontrollgruppe und die Daten wurden nicht statistisch ausgewertet. Die hohe Übereinstimmung an Proteinen in den untersuchten Proben mit den am häufigsten in EV nachgewiesenen Proteinen zeigt jedoch, dass das verwendete Protokoll dazu geeignet ist, EV für die Massenspektrometrie zu isolieren, um einen Vergleich der Proteinzusammensetzung der EV zu ermöglichen.

Eine genau Auflistung aller identifizierten Proteine ist im Anhang dieser Dissertation zu finden.

	Exocarta	Vesiclepedia
n=1	36/100	41/100
n=3 (gepoolt)	51/100	51/100

Tabelle 6: Anzahl von Übereinstimmungen bei Proteinen in den isolierten EV mit den 100 häufigsten EV-assoziierten Proteinen in den Datenbanken von Exocarta und Vesiclepedia (zuletzt überprüft am 24.06.2024)

5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des leukozytären Enzyms Myeloperoxidase auf die Mobilisation und Migration splenischer Monozyten untersucht. Weiterhin wurde ein Protokoll zur Isolation von extrazellulären Vesikeln aus dem Blutplasma und deren anschließender massenspektrometrischer Analyse entwickelt. Zusammenfassend können basierend auf den unter 2.6 vorgestellten Fragestellungen folgende Ergebnisse berichtet werden:

1. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ist die Mobilisation splenischer Ly6C^{high}-Monozyten nach einer myokardialen Ischämie bei Mäusen mit einer MPO-Defizienz reduziert. Die Zahl der Ly6C^{high}-Monozyten in der Milz der MPO^{-/-}-Mäuse ist einen Tag nach Ligatur der LAD-Koronararterie signifikant erhöht, die Zahl der Ly6C^{high}-Monozyten im Myokard hingegen signifikant reduziert. Eine weitere Analyse ergab, dass sich dieser Effekt auf die Gruppe der Ly6C^{high}/CCR2⁺-Monozyten beschränkt. Bei alleiniger Betrachtung der Ly6C^{high}/CCR2⁻-Monozyten sind diese Effekte nicht mehr nachweisbar.
2. Die Stimulation der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 mit MPO und ihrem primären Substrat H₂O₂ hat eine vermehrte Transkription des CC-Chemokin-Rezeptors CCR2 zur Folge. In anschließend durchgeführten Migrations-Assays führt dies zu einer vermehrten Migration der Monozyten entlang eines MCP-1-Gradienten.
3. Nach einer Kombination aus differenzieller Ultrazentrifugation und Größenausschluss-Chromatographie von murinem Blutplasma kann der Nachweis spezifischer Marker von extrazellulären Vesikeln bei deutlich reduzierter Kontamination durch Plasmaproteine erfolgen.
4. In einer Proteomanalyse dieser EV mittels Massenspektrometrie gelingt der Nachweis von insgesamt 560 Proteinen, welche eine große Übereinstimmung mit bekannten Proteinen aus EV-Datenbanken aufweisen.

5.2. Die Mobilisation splenischer Ly6C^{high}-Monozyten ist teilweise über MPO vermittelt

Es ist bekannt, dass die in der Milz residenten Monozyten maßgeblich zur Akkumulation von Monozyten im ischämischen Myokard in den Stunden und Tagen nach einem Myokardinfarkt beitragen ⁴⁹. Obwohl die Monozyten im ischämischen Myokard viele wichtige Aufgaben wie beispielsweise den Abbau von nekrotischen Kardiomyozyten übernehmen, ist ein vermehrtes Auftreten von Monozyten im Blut und eine überschießende Aktivität im Infarktareal mit einer schlechten Prognose assoziiert ⁴⁴. Die genauen Mechanismen ihrer Mobilisation sind bisher nicht hinreichend erforscht. Eine von unserer Arbeitsgruppe vermutete Beteiligung des Enzyms Myeloperoxidase an der Mobilisation von Monozyten wurde daher in dieser Dissertation mit einem Mausmodell der myokardialen Ischämie überprüft. Im Plasma von WT-Mäusen konnte bereits einen Tag nach LAD-Ligatur ein hochsignifikanter Anstieg der MPO nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit vorherigen Forschungsergebnissen, welche ebenfalls einen Anstieg der Plasma-Level von MPO nach einem Myokardinfarkt und sogar eine positive Korrelation mit der Letalität von Patienten nachweisen konnten ⁹¹. Dieses Resultat stellt daher zusätzliche Evidenz für die Bedeutung von MPO im Rahmen eines Myokardinfarktes dar.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie eine verminderte Mobilisation von Ly6C^{high}/CCR2⁺-Monozyten aus der Milz, sowie die verminderte Rekrutierung von Ly6C^{high}/CCR2⁺-Monozyten in das Myokard von MPO-defizienten Mäusen nach einer LAD-Ligatur nachgewiesen werden. Dies ist insbesondere interessant, da die verminderte Rekrutierung inflammatorischer Monozyten in das Myokard mit einem verbesserten Outcome assoziiert ist ⁴³. Ein weiterer Faktor für die Mobilisation der Ly6C^{high}-Monozyten aus dem Milzpool, der bereits 2010 von Leuschner et al. identifiziert wurde, ist die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, insbesondere über den Angiotensin-II-Rezeptors Typ 1. Es wird vermutet, dass die Hemmung des Remodelings und daher die Verhinderung der Entstehung einer Herzinsuffizienz durch ACE-Hemmer zumindest teilweise auf die Hemmung dieser Monozyten-Mobilität zurückzuführen ist ⁵⁰. Die Identifikation weiterer Mechanismen zur Inhibition der Monozyten-Mobilisation könnte daher direkte klinische Relevanz haben, da ergänzende oder alternative pharmakologische Optionen entwickelt werden könnten. Auch eine MPO-Defizienz, beziehungsweise eine medikamentöse Blockade von MPO, ist bereits mit einer verbesserten linksventrikulären Pumpfunktion in Verbindung gebracht worden ³⁵. Im Vergleich mit der RAAS-Blockade fällt auf, dass in beiden Fällen trotz initial gleichbleibender Infarktgröße eine verminderte Infiltration des Herzens durch proinflammatorische Monozyten erfolgt und nachfolgend das Remodeling reduziert wird. Bisher wurde die positive Wirkung der MPO-Inhibition vor allem mit den lokalen proinflammatorischen und profibrotischen

Mechanismen von MPO im Myokard selbst erklärt^{35,94}. Aufgrund der genannten Parallelen zwischen MPO- und RAAS-Inhibition ist jedoch auch die in dieser Arbeit identifizierte Wirkung auf die Mobilisation splenischer Monozyten als beitragender Faktor für das verbesserte Outcome denkbar. Es bleibt jedoch bislang unklar, ob die Inhibition der Monozyten-Mobilisierung bei RAAS- und MPO-Blockade dieselbe Population von Monozyten betrifft und ob gegebenenfalls weitere spezifische Veränderungen in Phänotyp und Funktion der entsprechenden Monozyten auftreten. Auch der zeitliche Verlauf der Monozyten im Myokard wurde nicht weiterverfolgt. Daher kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass der Effekt des MPO-Knockouts auf die Rekrutierung der Monozyten lediglich in einer Verzögerung der Mobilisation liegt. Da die Ly6C^{high}-Monozyten im zeitlichen Verlauf nach einem Myokardinfarkt unterschiedliche und vielfältige Wirkungen im Myokard wahrnehmen und eine Differenzierung in verschiedene Subgruppen von Makrophagen durchlaufen, besteht hier ein zusätzlicher Forschungsbedarf⁵². Hier ist beispielsweise interessant, ob es durch die verminderte Zahl von Ly6C^{high}-Monozyten auch zu einer geringeren Zahl an Ly6C^{high}-Makrophagen und nachfolgend auch Ly6C^{low}-Makrophagen im Myokard kommt. Eine Ergänzung unseres Experimentes um zusätzliche, spätere Zeitpunkte wäre sinnvoll, um den zeitlichen Verlauf auf die unterschiedlichen Populationen von Immunzellen im Myokard zu untersuchen. So können die Einflüsse einer MPO-Defizienz auf die Zusammensetzung und Entwicklung der Immunzellen im Myokard in diesem Rahmen weiter untersucht werden.

Bei der pharmakologischen Inhibition von MPO nach einem Myokardinfarkt konnten Ali et al. zeigen, dass ein Therapiebeginn unmittelbar nach Myokardinfarkt einem verzögerten Therapiebeginn nach 24 Stunden überlegen war⁹⁷. Da die splenischen Monozyten vor allem innerhalb der ersten 24 Stunden mobilisiert werden könnte dies wiederum ein Indiz für eine größere Bedeutung dieser MPO-vermittelten Mobilisation im Vergleich zu den lokalen inflammatorischen Effekten sein, da diese auch zu späteren Zeitpunkten noch stattfinden. Wie unter 2.2.5 beschrieben wird der Peak an inflammatorischen Monozyten im Myokard erst nach 3 Tagen erreicht, weswegen die Vermutung angestellt werden kann, dass eine lokale Inhibition inflammatorischer Vorgänge zu diesem Zeitpunkt am meisten Benefit verspräche. Aufgrund dieser je nach Zeitpunkt variablen Auswirkungen einer MPO-Inhibition wäre daher ebenfalls zu erwägen einen Vergleich zwischen Wildtyp-Mäusen, MPO-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen, welchen zu verschiedenen Zeitpunkten ein MPO-Inhibitor verabreicht wird, durchzuführen. Auf diese Art könnten eine mögliche dosisabhängige Wirkung auf die Mobilisation splenischer Monozyten festgestellt und eventuelle Unterschiede im zeitlichen Verlauf erkannt werden. Neben der Untersuchung der Mobilisation von Immunzellen sollten hierbei auch klinische Endpunkte wie LVEF und Mortalität erfasst werden.

5.3. MPO verstärkt die Migration humaner THP-1 Monozyten in vitro durch Induktion des Chemokin-Rezeptors CCR2

In dieser Arbeit konnte durch den quantitativen Nachweis der RNA des Chemokin-Rezeptors CCR2 mittels RT-qPCR eine signifikant erhöhte Transkription dieses Rezeptors durch die Stimulation humaner THP-1 Monozyten mit MPO und dem wichtigsten Substrat H_2O_2 nachgewiesen werden. In den durchgeführten Migrations-Assays zeigte sich eine durch Stimulation mit MPO signifikant erhöhte Migration der Monozyten entlang eines MCP-1-Gradienten. Dieser Effekt wurde durch die Hinzugabe von H_2O_2 weiter verstärkt. Da MCP-1 den wichtigsten Liganden für den CCR2-Rezeptor darstellt, ist hier ein Zusammenhang zwischen der vermehrten Migration und der durch MPO stimulierten Rezeptor-Expression sehr wahrscheinlich. Die verstärkte Migration durch MPO allein könnte darauf hindeuten, dass auch nicht-enzymatische Funktionen für die Migration relevant sind, eine intrinsische Produktion von H_2O_2 durch die THP-1-Monozyten ist jedoch ebenfalls möglich.

Die Stimulation der Migration von Zellen durch MPO ist bereits beschrieben worden. So konnte in einer von Mihalic et al. durchgeführten Untersuchung an humanen Zellen eines Chorionkarzinoms (JEG-3-Zellen) ebenfalls eine MPO-induzierte Zunahme der Migration dieser Zellen gezeigt werden, welche durch die Gabe eines MPO-Inhibitors verhindert wurde ¹²². Bemerkenswert ist, dass der verabreichte Inhibitor 4-Aminobenzoessäure (4-ABAH) lediglich eine irreversible Blockade der enzymatischen Funktion von MPO, jedoch keine Senkung der absoluten Proteinmenge und ebenfalls keine verminderte Aufnahme von MPO zur Folge hatte ¹²². Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass insbesondere die enzymatische Funktion der MPO für die Induktion von Migration und Chemotaxis unterschiedlicher Zellen relevant ist. Die Rolle des Chemokin-Rezeptors CCR2 wurde in der genannten Studie nicht untersucht, die Expression von CCR2 in JEG-3 Zellen ist allerdings bereits beschrieben worden ¹²³. Die Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR2 für die Rekrutierung von Monozyten ist hingegen bereits bekannt ¹²⁴. Eine wichtige Rolle spielen CCR2 und sein Ligand MCP-1 auch bei kardiovaskulären Erkrankungen. Sowohl die Akkumulation von Monozyten in atherosklerotischen Plaques, als auch die Migration proinflammatorischer Monozyten nach einem Myokardinfarkt, sind maßgeblich über diesen Mechanismus vermittelt ¹²⁵. Bemerkenswert ist allerdings, dass die Mobilisation splenischer Monozyten nach einem Myokardinfarkt nicht zwangsläufig von CCR2 abhängig zu sein scheint. So konnten Swirski et al. zeigen, dass in CCR2-defizienten Mäusen die Mobilisation splenischer Monozyten nach myokardialer Ischämie nicht reduziert war, die anschließende Rekrutierung dieser Monozyten aus dem Blut und folglich die Anzahl der Monozyten im Myokard jedoch schon ⁴⁹. Auch eine pharmakologische Inhibition von CCR2 ist im Mausmodell untersucht worden. Leuschner et al. behandelten Mäuse mit siRNA (small interfering RNA) gegen CCR2 und konnten

anschließend eine Reduktion der Infarktgröße nachweisen ¹²⁶. Bemerkenswert ist, dass in diesem Fall eine additive Splenektomie mit Entfernung aller splenischen Monozyten keinen zusätzlichen Benefit im Sinne einer zusätzlichen Verringerung von Ly6C^{high}-Monozyten im Myokard brachte. Der Therapieerfolg war demzufolge vermutlich maßgeblich über die Verringerung einer CCR2-vermittelten Migration von splenischen Monozyten in das Myokard vermittelt. Übereinstimmend mit der reduzierten Infarktgröße durch CCR2-Inhibition, konnten Lihn et al. nach der Gabe eines CCR2-Rezeptor-Antagonisten eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion nach einem Myokardinfarkt nachweisen ¹²⁷.

Die in dieser Arbeit gezeigte Hochregulation des CCR2-Rezeptors in den Monozyten durch MPO und H₂O₂ ist könnte daher einen vielversprechenden Ansatzpunkt für eine pharmakologische Therapie darstellen. Die gleichzeitige Anwendung von MPO-Inhibitoren und CCR2-Inhibitoren bei Patienten nach einem Myokardinfarkt könnte möglicherweise additive positive Effekte auf die Verminderung der Monozyten-Rekrutierung bei gleichzeitiger Reduzierung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen zeigen. Allerdings ist die CCR2-Regulation durch MPO vermutlich nicht der einzige relevante Mechanismus für die Mobilisation splenischer Monozyten. Daher ist weitere Forschung nach den verantwortlichen Mechanismen, welche die MPO-abhängige Mobilisation der splenischen Monozyten bewirken, erforderlich. Klinke et al. haben beispielsweise bereits eine nicht-enzymatisch vermittelte Stimulation der Migration von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen, welche über die positive Ladung von MPO vermittelt wird ⁷⁷. Eine solche nicht-enzymatisch vermittelte Migration der Ly6C^{high}-Monozyten könnte möglicherweise die Mobilisation dieser Zellen aus der Milz in das Blut begünstigen. In dem durchgeführten Migrations-Assay konnte eine solche direkte Wirkung von MPO nicht erfasst werden, da anstelle eines MPO-Gradienten ein MCP-1-Gradient verwendet wurde. In weiterführenden Experimenten sollte daher auch dies genauer untersucht werden. Hierfür wäre das oben beschriebene Mausmodell einer myokardialen Ischämie mit paralleler Gabe von 4-ABA zur Blockade der enzymatischen Aktivität der MPO in Wildtyp-Mäusen und nachfolgender Untersuchung der Mobilisation von Monozyten aus der Milz eine mögliche Option.

Eine von Tapp et al. durchgeführte Untersuchung des Monozyten-Subsets der intermediären Monozyten (siehe Kapitel 2.2.5) beim Menschen zeigte eine signifikante Hochregulation des CCR2-Chemokin-Rezeptors in dieser Zellpopulation nach einem Myokardinfarkt, ohne dass die Ursache hierfür aufgeklärt werden konnte ¹²⁸. Die aktuelle Arbeit bietet eine mögliche Erklärung für diese Regulation. So könnte dieser Mechanismus durch MPO (mit-)bedingt sein und somit insbesondere die Rekrutierung der intermediären Monozyten nach einem Myokardinfarkt begünstigen. Zawada et al. haben für die intermediären Monozyten eine

vermehrte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies nachgewiesen. Daher kann die Vermutung angestellt werden, dass eine verminderte Rekrutierung zu einer Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies im Myokard und somit zu einer geringeren Zellschädigung führen könnte. Auch hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um einen möglichen Effekt von MPO auf diese humane Monozyten-Untergruppe zu verifizieren.

Um den zugrundeliegenden, molekularen Mechanismus der Induktion von CCR2 durch MPO aufzudecken, führte eine Doktorandin unserer Arbeitsgruppe die oben genannten Experimente fort. Diese Versuche habe ich nicht selbst durchgeführt, sie sind jedoch für das weitere Verständnis relevant und wurden ebenfalls in der gemeinsamen Publikation veröffentlicht. Zunächst wurde eine Proteomanalyse von THP-1 Monozyten durchgeführt, welche ebenfalls, wie oben beschrieben, mit MPO oder mit MPO und H₂O₂ stimuliert worden waren. In diesem Versuch konnte eine vermehrte Aktivierung proinflammatorischer Signalwege nachgewiesen werden. Unter anderem wurden Inhibitoren von NF- κ B- und MAPK-Signalwegen durch MPO vermindert, Aktivatoren wie MAP2K3 und MAP3K2 im Gegensatz dazu vermehrt exprimiert¹¹⁸. Sowohl NF- κ B als auch MAPK sind als inflammatorische Signalkaskaden für die Immunreaktion nach einem Herzinfarkt relevant, indem sie beispielsweise die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten begünstigen. Interessanterweise sind beide Signalwege auch für die Expression von Chemokinrezeptoren relevant. So konnten Jesang et al. zeigen, dass eine vermehrte Expression von CCR2 in THP-1 Monozyten durch die Gabe eines MAPK-Inhibitors reduziert werden konnte und Wang et al. konnten durch die Gabe eines NF- κ B-Inhibitors die Produktion von CCR2 in Zellen der Mikroglia abschwächen^{129,130}. Wie unter 2.3.1 erläutert, ist eine Aktivierung von MAPK durch MPO in Fibroblasten nachgewiesen worden und auch eine konzentrationsabhängige Aktivierung von NF- κ B durch Reaktionsprodukte der MPO in Makrophagen wurde bereits beschrieben¹³¹. Daher kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die in dieser Arbeit nachgewiesene Stimulation von CCR2 durch MPO zumindest zum Teil über diese Mechanismen vermittelt wird. Auch hier sind jedoch weitere Mechanismen denkbar. So ist beispielsweise auch ein Einfluss von extrazellulären Vesikeln möglich. Nach einem Myokardinfarkt konnte für EV von Endothelzellen und Kardiomyozyten bereits eine Aktivierung kardialer Monozyten gezeigt werden, welche unter anderem mit einer vermehrten Expression von CCR2 einherging¹³². Zudem ist eine Wirkung von MPO auf die Aktivität von Endothelzellen bekannt. Schon 2001 konnten Yang et al. zeigen, dass MPO durch Endothelzellen aufgenommen wird und es dort zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kommt⁷⁵. Außerdem ist für von neutrophilen Granulozyten freigesetzte EV eine Schädigung von Endothelzellen beschrieben worden, welche über in diesen EV enthaltene MPO vermittelt wird¹³³. Aktivierte Endothelzellen setzen wiederum im Rahmen

eines Myokardinfarktes EV frei, welche nachweislich die Mobilisation von Monozyten aus der Milz vermitteln ¹¹². Die Induktion von CCR2 durch EV und die Aktivierung von Endothelzellen durch MPO lässt daher mutmaßen, dass unter dem Einfluss von MPO gebildete, zirkulierende Myokardinfarkt-assoziierte EV möglicherweise Effekte auf splenische Monozyten haben. Um einen solchen Zusammenhang detaillierter untersuchen zu können, ist jedoch zunächst die Etablierung eines Isolationsprotokolls für Myokardinfarkt-assoziierte zirkulierende EV notwendig.

Zusätzlich konnte nach Stimulation der THP-1 Monozyten mit MPO und H₂O₂ eine Steigerung der Expression des Chemokinrezeptors CX3CR1 gezeigt werden, dies war jedoch statistisch nicht signifikant. Da die Rekrutierung der Ly6C^{low}-Monozyten in den späteren Phasen nach einem Myokardinfarkt über diesen Chemokinrezeptor vermittelt wird, können möglicherweise auch hier durch ergänzende Untersuchungen weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Wie oben erwähnt, ist auch hier die Untersuchung der Zusammensetzung der Monozyten-Populationen im zeitlichen Verlauf und der Einfluss einer MPO-Defizienz auf diesen Verlauf interessant.

5.4. Eine Kombination aus differenzieller Ultrazentrifugation und Größenausschluss-Chromatographie ermöglicht die Proteom-Analyse Myokardinfarkt-assoziiierter extrazellulärer Vesikel

Im Rahmen der Fragestellung dieser Arbeit ist ein Einfluss von MPO auf Myokardinfarkt-assoziierte extrazelluläre Vesikel denkbar. Die Bedeutung von extrazellulären Vesikeln für die inflammatorischen und proliferativen Vorgänge nach einem Myokardinfarkt ist bereits beschrieben worden ¹⁰⁶. Ebenso konnten nach einem Myokardinfarkt spezifisch in EV vorhandene Proteine nachgewiesen werden, welche potenzielle Biomarker darstellen können ¹⁰⁹. Neben lokalen Effekten auf Kardiomyozyten und Immunzellen nach einem Myokardinfarkt, sind EV auch mitverantwortlich für die Mobilisation von neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten aus dem Milzpool ^{112,113}. Da die Isolation von EV aus Plasma jedoch verschiedene, unter 2.4 beschriebene Hürden mit sich bringt, wurde in dieser Arbeit zunächst ein Protokoll etabliert, mit welchem die Isolation von EV aus dem Plasma reproduzierbar und in einer Qualität erfolgt, welche eine nachfolgende Untersuchung mittels Massenspektrometrie ermöglicht. Weitere Untersuchungen in vitro und in vivo können anschließend ebenfalls erfolgen. Die am weitesten verbreitete Isolationsmethode für EV stellt vermutlich die differenzielle Ultrazentrifugation dar, da sie vergleichsweise einfach

durchzuführen ist und eine geringe Fehleranfälligkeit hat ¹³⁴. Anhand von Western Blot Analysen der EV-Markerproteine ALIX, TSG101 und CD63 konnte verifiziert werden, dass eine Isolation von EV gelungen war. Die Anfertigung elektronenmikroskopischer Bilder zeigte intakte EV in erwarteter kleiner Größe von circa 120 nm und mittels Nanopartikel Tracking Analyse wurde eine normale Größenverteilung bestätigt. Insbesondere für EV dieser Größe wurden bereits Auswirkungen auf die Migration splenischer Monozyten nach einem Myokardinfarkt nachgewiesen werden ¹¹². Weiterhin konnte durch die NTA die Bildung großer Proteinaggregate ausgeschlossen werden, welche im Anschluss eine Aufreinigung mittels Größenausschluss-Chromatographie erschwert hätten. Anschließend erfolgte der Nachweis der Oberflächenmarker CD31 (vor allem auf Endothelzellen exprimiert) und Ly6G (vor allem auf neutrophilen Granulozyten exprimiert). Demzufolge scheint ein Anteil an EV sowohl unter Normalbedingungen als auch im Modell einer myokardialen Ischämie von Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten zu stammen. Ergänzende, quantitative Untersuchungen könnten hier weitere wichtige Aufschlüsse über die genaue Zusammensetzung der EV nach einem Myokardinfarkt geben.

Um den Inhalt und insbesondere die Proteinladung der EV untersuchen zu können, wurden die EV-Suspensionen nach der Ultrazentrifugation mittels Größenausschluss-Chromatographie aufgereinigt. Die Kombination aus diesen beiden Verfahren ist bereits durch Tzaridis et al. als Möglichkeit zur Aufreinigung von Plasma-EV beschrieben worden ¹³⁵. Bei der SEC erfolgt insbesondere eine ausgeprägte Reduktion der Lipoproteine HDL und LDL sowie von Plasmaproteinen ¹³⁶. Daher stellt diese eine exzellente Ergänzung zur Ultrazentrifugation dar, bei welcher vor allem Chylomikronen und Plasmaproteine entfernt werden ¹³⁷. Die Vermeidung einer ausgeprägten Proteinkontamination konnte durch ein nach der SEC durchgeführtes Protein-Assay quantifiziert werden. Der Großteil aller, nach Ultrazentrifugation in der EV-Suspension verbliebenen Proteine wurde erst ab Fraktion 7 der SEC nachgewiesen. Im Gegensatz hierzu wurden in der Mikropartikel-basierten Durchflusszytometrie fast alle EV-Marker positiven Ereignisse in den Fraktionen 3-6 registriert. Durch Verwendung der Fraktionen 3-6 für weitere Analysen gelang daher eine Aufreinigung der EV-Suspension. Ziel des aktuellen Protokolls war es vor allem, mit den Materialien unseres Labors ein praktikables Konzept zu entwickeln, um weitergehende Untersuchungen der Proteinzusammensetzung der EV zu ermöglichen. Da im Rahmen der Organentnahme bei den Mäusen nur geringe Mengen Blut (rund 1 mL entsprechend circa 500 µL Plasma) zu entnehmen waren, musste eine Möglichkeit gefunden werden, die größtmögliche Menge EV daraus zu isolieren und gleichzeitig die Kontamination auf einem vertretbaren Niveau zu halten. Aufgrund des Nachweises vieler für Plasma-EV bekannter Proteine in der abschließend durchgeführten massenspektrometrischen Analyse des Proteoms, scheint das erstellte Protokoll für die Untersuchung des Proteoms von Plasma-EV geeignet zu sein. Wie

oben beschrieben, kann eine nun folgende quantitative Untersuchung des Proteoms Hinweise auf gegebenenfalls relevante Einflüsse von MPO auf die Zusammensetzung des Inhaltes der EV nach myokardialer Ischämie geben. Weitere Untersuchungen des Inhaltes der EV, zum Beispiel in Hinblick auf die Zusammensetzung und Anzahl transportierter miRNA könnte ebenfalls weiteres Wissen schaffen. Somit bietet diese Arbeit eine Möglichkeit die Forschung an Myokardinfarkt-assoziierten EV fortzuführen. Für die Fragestellungen unserer Arbeitsgruppe ist hier der Vergleich der EV von WT- und MPO^{-/-}-Mäusen jeweils vor und nach LAD-Ligatur interessant. Ein möglicher Einfluss von MPO auf die Zusammensetzung der EV könnte so identifiziert werden. Weitere Arbeitsgruppen und Labore mit ähnlicher Ausstattung, welche bei der Isolation von Plasma-EV vor denselben Hürden stehen, können ebenfalls an den Ergebnissen dieser Arbeit Orientierung finden.

5.5. Limitationen und Ausblick

Bei all den gewonnenen neuen Erkenntnissen ist es wichtig, auch die vorhandenen Limitationen dieser Arbeit zu betrachten. Gleichzeitig sollen mögliche neue Forschungsansätze beschrieben werden, welche auf Grundlage dieser Arbeit in Zukunft verfolgt werden können.

Für die Untersuchung der Monozyten-Mobilisation ist ein Mausmodell der myokardialen Ischämie gewählt worden und obwohl die Vorgänge in Maus und Menschen sehr ähnlich sein mögen, so ist eine Übertragung der Ergebnisse auf die Vorgänge beim Menschen nur bedingt möglich. Zunächst gibt es bereits grundlegende Unterschiede im kardiovaskulären System wie eine simplere Herzanatomie bei der Maus und eine geringere Ausbildung von Kollateralen der Herzkranzgefäße. Weiterhin wird bereits durch den chirurgischen Eingriff mit Eröffnung des Thorax und Manipulation des Herzens eine Immunreaktion ausgelöst. Dennoch stellt dieses Modell den aktuell besten Ansatz dar, um die Zellpopulationen im Myokard zu erforschen, da eine Myokardbiopsie beim Menschen ein sehr risikobehafteter Eingriff und im Rahmen einer myokardialen Ischämie mit bereits erhöhtem kardialem Risiko nicht zu vertreten wäre. Weiterhin ist auch die Untersuchung von humanen THP-1 Monozyten in der Zellkultur nicht gleichzusetzen mit dem Verhalten von Monozyten in vivo. Hier könnte die Isolation von Monozyten aus Blut und Gewebe von Mäusen mit anschließender Kultivierung in der Zellkultur ein erster Ansatz sein, die Ergebnisse unter Annäherung an die Realbedingungen zu überprüfen. Eine Sortierung von Zellen wäre zum Beispiel mittels Durchflusszytometrie möglich, sodass anschließend analog zu den THP-1 Zellen eine Stimulation mit MPO beziehungsweise MPO und H₂O₂ erfolgen könnte. So könnte auch der Effekt von MPO auf

unterschiedliche Monozyten-Subsets (Ly6C^{high} versus Ly6C^{low}) untersucht werden. Wie unter 2.2.5 beschrieben trägt die Milz zwar in bedeutendem Ausmaß zu der Akkumulation von Monozyten im Myokard bei, die Rolle des Knochenmarks wurde in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht. Unter anderem die verstärkte Monozytopoese und die Freisetzung von Monozyten aus dem Knochenmark sind ebenfalls über CCR2 vermittelt ¹²⁴. In folgenden Untersuchungen sollte daher insbesondere eine mögliche Rolle der MPO für diese Vorgänge überprüft werden. Auch die nicht signifikante Erhöhung in der Transkription des Chemokinrezeptors CX3CR1 sollte mit einer höheren Versuchszahl und gegebenenfalls auch mittels Migrations-Assay und Durchflusszytometrie weiter abgeklärt werden.

Im Hinblick auf die Ergebnisse der Proteomanalyse der extrazellulären Vesikel muss einschränkend erwähnt werden, dass weiterhin eine nicht unerhebliche Anzahl an Lipoproteinen wie das Apolipoprotein E und Plasmaproteinen wie Immunglobulin G oder Albumin nachgewiesen werden konnte. Eine vollständige Trennung der EV von diesen Plasma-Bestandteilen ist folglich nicht durchgeführt worden, wäre jedoch gemäß dem aktuellen Forschungsstand auch ein kaum umsetzbares Vorhaben. Die hohe Übereinstimmung mit bereits in EV identifizierten Proteinen, welche in den Datenbanken von Exocarta und Vesiclepedia überprüft wurden, zeigt jedoch, dass EV-assoziierte Proteine mit dem entwickelten Isolationsprotokoll nachgewiesen werden können. Nach Abschluss aller oben genannten Experimente wurden 2023 durch eine Task Force der ISEV weitere Empfehlungen für die Isolation von EV aus dem Blut vorgestellt ¹³⁸. Hier wurde insbesondere darauf verwiesen, dass weniger ein einziges Protokoll als Goldstandard betrachtet werden soll, sondern vor allem die detaillierte Auflistung aller Methoden und Ergebnisse zu mehr Transparenz und zu wichtigen Erkenntnissen über die Vor- und Nachteile einzelner Protokolle führen wird. Das dort vorgestellte Dokumentationsprogramm sollte in einer quantitativen Untersuchung des Proteoms von Infarkt-assoziierten EV verwendet werden.

5.6. Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurden Grundlagen der Rekrutierung von Immunzellen nach einem Myokardinfarkt untersucht. Eine Inhibition dieser Rekrutierung wurde bereits vielfach als mögliche therapeutische Option beschrieben, um ein überschießendes Remodeling zu verhindern. Die Myeloperoxidase konnte in dieser Dissertation als möglicher Mediator der Mobilisation splenischer Ly6C^{high}/CCR2⁺-Monozyten nach myokardialer Ischämie identifiziert werden. Dies könnte einen weiteren Ansatz für eine immunmodulatorische Therapie des Myokardinfarktes mittels MPO-Inhibitoren ermöglichen. Da insbesondere die enzymatische Aktivität der MPO für die Migration von Monozyten verantwortlich zu sein scheint, könnte eine Inhibition dieser enzymatischen Funktion einen selektiveren Mechanismus der Immunmodulation nach einem Myokardinfarkt darstellen. Aufgrund der in dieser Dissertation beschriebenen Hochregulation des CC-Chemokinrezeptors 2 durch die enzymatische Wirkung von MPO, könnte zudem auch eine kombinierte Inhibition von MPO und CCR2 in Frage kommen. Hierfür sind jedoch weitere Studien mit klinischen Endpunkten erforderlich. Die Etablierung eines Protokolls zur Isolation von Myokardinfarkt-assoziierten extrazellulären Vesikeln aus dem Blutplasma bietet zudem die Möglichkeit, diese heterogene Gruppe von EV genauer zu charakterisieren und zu untersuchen. Mögliche Unterschiede bei den MPO^{-/-}-Mäusen oder nach MPO-Inhibition könnten so identifiziert werden. Dieses Isolationsprotokoll lässt sich außerdem nicht nur im Rahmen eines Myokardinfarktes anwenden, sondern bietet die Möglichkeit Plasma-EV auch bei zahlreichen anderen physiologischen und pathologischen Prozessen genauer zu erforschen.

6. Literaturverzeichnis

- 1 WHO. World health statistics 2023 – Monitoring health for the SDGs.
- 2 Deutsche Herzstiftung e.V. Deutscher Herzbericht 2022. Sektorenübergreifende Versorgungsanalyse zur Kardiologie, Herzchirurgie und Kinderherzmedizin in Deutschland 2023.
- 3 Ebeling M, Mühlichen M, Talbäck M, Rau R, Goedel A, Klüsener S. Disease incidence and not case fatality drives the rural disadvantage in myocardial-infarction-related mortality in Germany. *Prev Med* 2023; 107833. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2023.107833>.
- 4 Desta L, Jernberg T, Löfman I, et al. Incidence, temporal trends, and prognostic impact of heart failure complicating acute myocardial infarction. The SWEDEHEART Registry (Swedish Web-System for Enhancement and Development of Evidence-Based Care in Heart Disease Evaluated According to Recommended Therapies): a study of 199,851 patients admitted with index acute myocardial infarctions, 1996 to 2008. *JACC Heart Fail* 2015; **3**: 234–42. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2014.10.007>.
- 5 Piccini JP, Schulte PJ, Pieper KS, et al. Antiarrhythmic drug therapy for sustained ventricular arrhythmias complicating acute myocardial infarction. *Crit Care Med* 2011; **39**: 78–83. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181fd6ad7>.
- 6 Gong FF, Vaitenas I, Malaisrie SC, Maganti K. Mechanical Complications of Acute Myocardial Infarction: A Review. *JAMA Cardiol* 2021; **6**: 341–49. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2020.3690>.
- 7 Kilic A, Sultan I, Chu D, Wang Y, Gleason TG. Mitral Valve Surgery for Papillary Muscle Rupture: Outcomes in 1342 Patients From The Society of Thoracic Surgeons Database. *Ann Thorac Surg* 2020; **110**: 1975–81. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2020.03.097>.
- 8 Jenča D, Melenovský V, Stehlik J, et al. Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Fail* 2021; **8**: 222–37. <https://doi.org/10.1002/ehf2.13144>.
- 9 Sulo G, Iglund J, Vollset SE, et al. Heart Failure Complicating Acute Myocardial Infarction; Burden and Timing of Occurrence: A Nation-wide Analysis Including 86 771 Patients From the Cardiovascular Disease in Norway (CVDNOR) Project. *J Am Heart Assoc* 2016; **5**. <https://doi.org/10.1161/JAHA.115.002667>.
- 10 © Statistisches Bundesamt (Destatis), 2023. Krankenhauspatienten: Deutschland, Jahre, Hauptdiagnose ICD-10 (1-3-Steller Hierarchie). Datenquelle: Statistisches Bundesamt (Destatis), Genesis-Online, zuletzt abgerufen am 03.09.2023, 13:14 Uhr; Datenlizenz by-2-0.
- 11 Emmons-Bell S, Johnson C, Roth G. Prevalence, incidence and survival of heart failure: a systematic review. *Heart* 2022; **108**: 1351–60. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2021-320131>.
- 12 © Statistisches Bundesamt (Destatis), 2023. Krankheitskosten, Krankheitskosten je Einwohner: Deutschland, Jahre, Krankheitsdiagnosen (ICD-10). Datenquelle: Statistisches

Bundesamt (Destatis), Genesis-Online, zuletzt abgerufen am 03.09.2023, 13:33 Uhr; Datenlizenz by-2-0.

- 13 Ziaeeian B, Fonarow GC. Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2016; **13**: 368–78. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.25>.
- 14 Domienik-Karłowicz J, Kupczyńska K, Michalski B, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction. Selected messages from the European Society of Cardiology document and lessons learned from the new guidelines on ST-segment elevation myocardial infarction and non-ST-segment elevation-acute coronary syndrome. *Cardiol J* 2021; **28**: 195–201. <https://doi.org/10.5603/CJ.a2021.0036>.
- 15 Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation* 2018; **138**: e618-e651. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000617>.
- 16 Byrne RA, Rossello X, Coughlan JJ, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *Eur Heart J* 2023. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehad191>.
- 17 Ibanez B, James S, Agewall S, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2018; **39**: 119–77. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393>.
- 18 Cohen M, Visveswaran G. Defining and managing patients with non-ST-elevation myocardial infarction: Sorting through type 1 vs other types. *Clin Cardiol* 2020; **43**: 242–50. <https://doi.org/10.1002/clc.23308>.
- 19 Lu L, Liu M, Sun R, Zheng Y, Zhang P. Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments. *Cell Biochem Biophys* 2015; **72**: 865–67. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0553-4>.
- 20 Ängerud KH, Ericsson M, Brännström M, Sederholm Lawesson S, Strömberg A, Thylén I. Symptoms of Acute Myocardial Infarction as Described in Calls to Tele-Nurses and in Questionnaires: A Mixed-Methods Study. *J Cardiovasc Nurs* 2023; **38**: 150–57. <https://doi.org/10.1097/JCN.0000000000000873>.
- 21 Diercks DB, Peacock WF, Hiestand BC, et al. Frequency and consequences of recording an electrocardiogram 10 minutes after arrival in an emergency room in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes (from the CRUSADE Initiative). *Am J Cardiol* 2006; **97**: 437–42. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.09.073>.
- 22 Shah ASV, Anand A, Strachan FE, et al. High-sensitivity troponin in the evaluation of patients with suspected acute coronary syndrome: a stepped-wedge, cluster-randomised controlled trial. *Lancet* 2018; **392**: 919–28. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31923-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31923-8).
- 23 Chapman AR, Anand A, Boeddinghaus J, et al. Comparison of the Efficacy and Safety of Early Rule-Out Pathways for Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2017; **135**: 1586–96. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025021>.

- 24 Lopez-Ayala P, Nestelberger T, Boeddinghaus J, et al. Novel Criteria for the Observe-Zone of the ESC 0/1h-hs-cTnT Algorithm. *Circulation* 2021; **144**: 773–87. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052982>.
- 25 Kofoed KF, Engstrøm T, Sigvardsen PE, et al. Prognostic Value of Coronary CT Angiography in Patients With Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes. *Journal of the American College of Cardiology* 2021; **77**: 1044–52. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.12.037>.
- 26 Wenzl FA, Kraler S, Ambler G, et al. Sex-specific evaluation and redevelopment of the GRACE score in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes in populations from the UK and Switzerland: a multinational analysis with external cohort validation. *The Lancet* 2022; **400**: 744–56. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)01483-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01483-0).
- 27 Flather MD, Yusuf S, Køber L, et al. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *The Lancet* 2000; **355**: 1575–81. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)02212-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02212-1).
- 28 Johansson S, Rosengren A, Young K, Jennings E. Mortality and morbidity trends after the first year in survivors of acute myocardial infarction: a systematic review. *BMC Cardiovasc Disord* 2017; **17**: 53. <https://doi.org/10.1186/s12872-017-0482-9>.
- 29 Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol* 2015; **5**: 1841–75. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150006>.
- 30 Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009; **324**: 98–102. <https://doi.org/10.1126/science.1164680>.
- 31 Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF-κB in the heart: to be or not to NF-κB. *Circ Res* 2011; **108**: 1122–32. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226928>.
- 32 Silvis MJM, Kaffka Genaamd Dengler SE, Odille CA, et al. Damage-Associated Molecular Patterns in Myocardial Infarction and Heart Transplantation: The Road to Translational Success. *Front Immunol* 2020; **11**: 599511. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599511>.
- 33 Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res* 2016; **119**: 91–112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>.
- 34 Swirski FK, Nahrendorf M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2018; **18**: 733–44. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0065-8>.
- 35 Guthoff H, Hof A, Klinka A, et al. Protective Effects of Therapeutic Neutrophil Depletion and Myeloperoxidase Inhibition on Left Ventricular Function and Remodeling in Myocardial Infarction. *Antioxidants (Basel)* 2022; **12**. <https://doi.org/10.3390/antiox12010033>.

- 36 Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017; **377**: 1119–31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>.
- 37 Horckmans M, Ring L, Duchene J, et al. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur Heart J* 2017; **38**: 187–97. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw002>.
- 38 Armstrong PW, Granger CB, Adams PX, et al. Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; **297**: 43–51. <https://doi.org/10.1001/jama.297.1.43>.
- 39 Faxon DP, Gibbons RJ, Chronos NAF, Gurbel PA, Sheehan F. The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; **40**: 1199–204. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(02\)02136-8](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(02)02136-8).
- 40 Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res* 2012; **110**: 159–73. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243162>.
- 41 Frangogiannis NG. The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014; **63**: 185–95. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000003>.
- 42 Wolf AA, Yáñez A, Barman PK, Goodridge HS. The Ontogeny of Monocyte Subsets. *Front Immunol* 2019; **10**: 1642. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01642>.
- 43 Arfvidsson J, Ahlin F, Vargas KG, Thaler B, Wojta J, Huber K. Monocyte subsets in myocardial infarction: A review. *Int J Cardiol* 2017; **231**: 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.12.182>.
- 44 Dutta P, Nahrendorf M. Monocytes in myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015; **35**: 1066–70. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304652>.
- 45 Auffray C, Fogg D, Garfa M, et al. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 2007; **317**: 666–70. <https://doi.org/10.1126/science.1142883>.
- 46 Jung K, Kim P, Leuschner F, et al. Endoscopic time-lapse imaging of immune cells in infarcted mouse hearts. *Circ Res* 2013; **112**: 891–99. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300484>.
- 47 Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 762–74. <https://doi.org/10.1038/nri3070>.
- 48 Peet C, Ivetic A, Bromage DI, Shah AM. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2020; **116**: 1101–12. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz336>.

- 49 Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 2009; **325**: 612–16. <https://doi.org/10.1126/science.1175202>.
- 50 Leuschner F, Panizzi P, Chico-Calero I, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction. *Circ Res* 2010; **107**: 1364–73. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227454>.
- 51 Zouggar Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med* 2013; **19**: 1273–80. <https://doi.org/10.1038/nm.3284>.
- 52 Hilgendorf I, Gerhardt LMS, Tan TC, et al. Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ Res* 2014; **114**: 1611–22. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303204>.
- 53 Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, et al. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 2005; **96**: 881–89. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000163017.13772.3a>.
- 54 Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007; **204**: 3037–47. <https://doi.org/10.1084/jem.20070885>.
- 55 Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, et al. Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circ Res* 2016; **119**: 853–64. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309001>.
- 56 Dutta P, Courties G, Wei Y, et al. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* 2012; **487**: 325–29. <https://doi.org/10.1038/nature11260>.
- 57 Leuschner F, Rauch PJ, Ueno T, et al. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J Exp Med* 2012; **209**: 123–37. <https://doi.org/10.1084/jem.20111009>.
- 58 Tsujioka H, Imanishi T, Ikejima H, et al. Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; **54**: 130–38. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.021>.
- 59 van der Laan AM, Horst EN ter, Delewi R, et al. Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur Heart J* 2014; **35**: 376–85. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh331>.
- 60 Askari N, Lipps C, Voss S, et al. Circulating Monocyte Subsets Are Associated With Extent of Myocardial Injury but Not With Type of Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med* 2021; **8**: 741890. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.741890>.

- 61 Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther* 2006; **111**: 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.06.023>.
- 62 Zaki SR, Austin GE, Chan WC, et al. Chromosomal localization of the human myeloperoxidase gene by in situ hybridization using oligonucleotide probes. *Genes Chromosomes Cancer* 1990; **2**: 266–70. <https://doi.org/10.1002/gcc.2870020403>.
- 63 Nauseef WM, McCormick SJ, Goedken M. Coordinated participation of calreticulin and calnexin in the biosynthesis of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1998; **273**: 7107–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.12.7107>.
- 64 Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 197–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653>.
- 65 Olsen RL, Little C. Studies on the subunits of human myeloperoxidase. *Biochem J* 1984; **222**: 701–09. <https://doi.org/10.1042/bj2220701>.
- 66 Kargapolova Y, Geißen S, Zheng R, Baldus S, Winkels H, Adam M. The Enzymatic and Non-Enzymatic Function of Myeloperoxidase (MPO) in Inflammatory Communication. *Antioxidants (Basel)* 2021; **10**. <https://doi.org/10.3390/antiox10040562>.
- 67 Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol* 2013; **93**: 185–98. <https://doi.org/10.1189/jlb.0712349>.
- 68 Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* 2018; **640**: 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>.
- 69 Bakkenist AR, Boer JE de, Plat H, Wever R. The halide complexes of myeloperoxidase and the mechanism of the halogenation reactions. *Biochim Biophys Acta* 1980; **613**: 337–48. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(80\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0005-2744(80)90088-1).
- 70 Marquez LA, Dunford HB, van Wart H. Kinetic studies on the reaction of compound II of myeloperoxidase with ascorbic acid. Role of ascorbic acid in myeloperoxidase function. *J Biol Chem* 1990; **265**: 5666–70.
- 71 Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 431–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405193102>.
- 72 Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001; **276**: 41279–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106958200>.
- 73 Rizo-Téllez SA, Sekheri M, Filep JG. Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy. *Antioxidants (Basel)* 2022; **11**. <https://doi.org/10.3390/antiox11112302>.

- 74 Klebanoff SJ. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians* 1999; **111**: 383–89. <https://doi.org/10.1111/paa.1999.111.5.383>.
- 75 Yang JJ, Preston GA, Pendergraft WF, et al. Internalization of proteinase 3 is concomitant with endothelial cell apoptosis and internalization of myeloperoxidase with generation of intracellular oxidants. *Am J Pathol* 2001; **158**: 581–92. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64000-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64000-X).
- 76 Nussbaum C, Klinke A, Adam M, Baldus S, Sperandio M. Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. *Antioxid Redox Signal* 2013; **18**: 692–713. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4783>.
- 77 Klinke A, Nussbaum C, Kubala L, et al. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood* 2011; **117**: 1350–58. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284513>.
- 78 El Kebir D, József L, Pan W, Filep JG. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through CD11b/CD18 integrins and prolongs inflammation. *Circ Res* 2008; **103**: 352–59. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000326772.76822.7a>.
- 79 Aratani Y, Koyama H, Nyui S, Suzuki K, Kura F, Maeda N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun* 1999; **67**: 1828–36. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.4.1828-1836.1999>.
- 80 Aratani Y, Kura F, Watanabe H, et al. Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J Infect Dis* 2000; **182**: 1276–79. <https://doi.org/10.1086/315843>.
- 81 Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, Gothot A. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit ? *Acta Haematol* 2000; **104**: 10–15. <https://doi.org/10.1159/000041062>.
- 82 Khan AA, Alsahli MA, Rahmani AH. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Med Sci (Basel)* 2018; **6**. <https://doi.org/10.3390/medsci6020033>.
- 83 Zhang R, Brennan ML, Fu X, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 2001; **286**: 2136–42. <https://doi.org/10.1001/jama.286.17.2136>.
- 84 Khan SQ, Kelly D, Quinn P, Davies JE, Ng LL. Myeloperoxidase aids prognostication together with N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in high-risk patients with acute ST elevation myocardial infarction. *Heart* 2007; **93**: 826–31. <https://doi.org/10.1136/hrt.2006.091041>.
- 85 Deuschl FG, Klinke A, Friedrichs K, et al. Myeloperoxidase is Critically Linked to the Development of Diastolic Heart Failure Following Pressure Overload. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2014; **33**: S164. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2014.01.440>.

- 86 Nettersheim FS, Schlüter JD, Kreuzberg W, et al. Myeloperoxidase is a critical mediator of anthracycline-induced cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 2023; **118**: 36. <https://doi.org/10.1007/s00395-023-01006-0>.
- 87 Ndrepepa G. Myeloperoxidase - A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clin Chim Acta* 2019; **493**: 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.02.022>.
- 88 Giovannini S, Onder G, Leeuwenburgh C, et al. Myeloperoxidase levels and mortality in frail community-living elderly individuals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; **65**: 369–76. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp183>.
- 89 Meuwese MC, Stroes ESG, Hazen SL, et al. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk Prospective Population Study. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; **50**: 159–65. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.03.033>.
- 90 Cavusoglu E, Ruwende C, Eng C, et al. Usefulness of baseline plasma myeloperoxidase levels as an independent predictor of myocardial infarction at two years in patients presenting with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2007; **99**: 1364–68. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.12.060>.
- 91 Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, et al. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 2007; **49**: 1993–2000. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.02.040>.
- 92 Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2003; **108**: 1440–45. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000090690.67322.51>.
- 93 Teng N, Maghzal GJ, Talib J, Rashid I, Lau AK, Stocker R. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep* 2017; **22**: 51–73. <https://doi.org/10.1080/13510002.2016.1256119>.
- 94 Askari AT, Brennan M-L, Zhou X, et al. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Exp Med* 2003; **197**: 615–24. <https://doi.org/10.1084/jem.20021426>.
- 95 Mollenhauer M, Friedrichs K, Lange M, et al. Myeloperoxidase Mediates Postischemic Arrhythmogenic Ventricular Remodeling. *Circ Res* 2017; **121**: 56–70. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310870>.
- 96 Vasilyev N, Williams T, Brennan M-L, et al. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation* 2005; **112**: 2812–20. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.542340>.
- 97 Ali M, Pulli B, Courties G, et al. Myeloperoxidase Inhibition Improves Ventricular Function and Remodeling After Experimental Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci* 2016; **1**: 633–43. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2016.09.004>.

- 98 Hawkins C, Nauseef WM, eds. Mammalian heme peroxidases. Diverse roles in health and disease. Boca Raton, FL, Abingdon, Oxon: CRC Press, Taylor et Francis Group, 2022.
- 99 Huang S, Frangogiannis NG. Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes and challenges. *Br J Pharmacol* 2018; **175**: 1377–400. <https://doi.org/10.1111/bph.14155>.
- 100 Lam CSP, Lund LH, Shah SJ, et al. Myeloperoxidase Inhibition in Heart Failure With Preserved or Mildly Reduced Ejection Fraction: SATELLITE Trial Results. *J Card Fail* 2023. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2023.04.003>.
- 101 Gan L-M, Lagerström-Fermér M, Ericsson H, et al. Safety, tolerability, pharmacokinetics and effect on serum uric acid of the myeloperoxidase inhibitor AZD4831 in a randomized, placebo-controlled, phase I study in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 2019; **85**: 762–70. <https://doi.org/10.1111/bcp.13855>.
- 102 Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* 2024; **13**: e12404. <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>.
- 103 Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr Biol* 2018; **28**: R435-R444. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059>.
- 104 Yáñez-Mó M, Siljander PR-M, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 2015; **4**: 27066. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>.
- 105 Buzas EI. The roles of extracellular vesicles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2023; **23**: 236–50. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00763-8>.
- 106 Liu S, Chen J, Shi J, et al. M1-like macrophage-derived exosomes suppress angiogenesis and exacerbate cardiac dysfunction in a myocardial infarction microenvironment. *Basic Res Cardiol* 2020; **115**: 22. <https://doi.org/10.1007/s00395-020-0781-7>.
- 107 Li L, Cao J, Li S, et al. M2 Macrophage-Derived sEV Regulate Pro-Inflammatory CCR2+ Macrophage Subpopulations to Favor Post-AMI Cardiac Repair. *Adv Sci (Weinh)* 2023; **10**: e2202964. <https://doi.org/10.1002/advs.202202964>.
- 108 Jansen F, Yang X, Proebsting S, et al. MicroRNA expression in circulating microvesicles predicts cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *J Am Heart Assoc* 2014; **3**: e001249. <https://doi.org/10.1161/JAHA.114.001249>.
- 109 Gidlöf O, Evander M, Rezeli M, Marko-Varga G, Laurell T, Erlinge D. Proteomic profiling of extracellular vesicles reveals additional diagnostic biomarkers for myocardial infarction compared to plasma alone. *Sci Rep* 2019; **9**: 8991. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45473-9>.

- 110 Milano G, Biemmi V, Lazzarini E, et al. Intravenous administration of cardiac progenitor cell-derived exosomes protects against doxorubicin/trastuzumab-induced cardiac toxicity. *Cardiovasc Res* 2020; **116**: 383–92. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz108>.
- 111 Barile L, Cervio E, Lionetti V, et al. Cardioprotection by cardiac progenitor cell-secreted exosomes: role of pregnancy-associated plasma protein-A. *Cardiovasc Res* 2018; **114**: 992–1005. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy055>.
- 112 Akbar N, Digby JE, Cahill TJ, et al. Endothelium-derived extracellular vesicles promote splenic monocyte mobilization in myocardial infarction. *JCI Insight* 2017; **2**. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.93344>.
- 113 Akbar N, Braithwaite AT, Corr EM, et al. Rapid neutrophil mobilization by VCAM-1+ endothelial cell-derived extracellular vesicles. *Cardiovasc Res* 2023; **119**: 236–51. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac012>.
- 114 Hosseinkhani B, van den Akker NMS, Molin DGM, Michiels L. (Sub)populations of extracellular vesicles released by TNF- α -triggered human endothelial cells promote vascular inflammation and monocyte migration. *J Extracell Vesicles* 2020; **9**: 1801153. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1801153>.
- 115 Camussi G, Lötvall J. The importance of controlled clinical trials with extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2023; **12**: e12347. <https://doi.org/10.1002/jev2.12347>.
- 116 Armstrong D, Wildman DE. Extracellular Vesicles and the Promise of Continuous Liquid Biopsies. *J Pathol Transl Med* 2018; **52**: 1–8. <https://doi.org/10.4132/jptm.2017.05.21>.
- 117 Nieuwland R, Siljander PR-M. A beginner's guide to study extracellular vesicles in human blood plasma and serum. *J Extracell Vesicles* 2024; **13**: e12400. <https://doi.org/10.1002/jev2.12400>.
- 118 Peters VBM, Matheis F, Erdmann I, et al. Myeloperoxidase induces monocyte migration and activation after acute myocardial infarction. *Front Immunol* 2024; **15**: 1360700. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1360700>.
- 119 Lindsey ML, Brunt KR, Kirk JA, et al. Guidelines for in vivo mouse models of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2021; **321**: H1056-H1073. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00459.2021>.
- 120 Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 1991; **47**: 22–31. <https://doi.org/10.1007/BF02041244>.
- 121 Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2014; **3**. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23111>.
- 122 Mihalic ZN, Kloimböck T, Cosic-Mujanovic N, et al. Myeloperoxidase enhances the migration and invasion of human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Redox Biol* 2023; **67**: 102885. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102885>.

- 123 Hannan NJ, Jones RL, White CA, Salamonsen LA. The chemokines, CX3CL1, CCL14, and CCL4, promote human trophoblast migration at the fetomaternal interface. *Biol Reprod* 2006; **74**: 896–904. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.045518>.
- 124 Tsou C-L, Peters W, Si Y, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 2007; **117**: 902–09. <https://doi.org/10.1172/JCI29919>.
- 125 França CN, Izar MCO, Hortêncio MNS, et al. Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond)* 2017; **131**: 1215–24. <https://doi.org/10.1042/CS20170009>.
- 126 Leuschner F, Dutta P, Gorbатов R, et al. Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes in mice. *Nat Biotechnol* 2011; **29**: 1005–10. <https://doi.org/10.1038/nbt.1989>.
- 127 Liehn EA, Piccinini A-M, Koenen RR, et al. A new monocyte chemotactic protein-1/chemokine CC motif ligand-2 competitor limiting neointima formation and myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Journal of the American College of Cardiology* 2010; **56**: 1847–57. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.04.066>.
- 128 Tapp LD, Shantsila E, Wrigley BJ, Pamukcu B, Lip GYH. The CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2012; **10**: 1231–41. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04603.x>.
- 129 Ko J, Yun C-Y, Lee J-S, Kim J-H, Kim IS. p38 MAPK and ERK activation by 9-cis-retinoic acid induces chemokine receptors CCR1 and CCR2 expression in human monocytic THP-1 cells. *Exp Mol Med* 2007; **39**: 129–38. <https://doi.org/10.1038/emm.2007.15>.
- 130 Wang Y, Ni H, Li H, et al. Nuclear factor kappa B regulated monocyte chemoattractant protein-1/chemokine CC motif receptor-2 expressing in spinal cord contributes to the maintenance of cancer-induced bone pain in rats. *Mol Pain* 2018; **14**: 1744806918788681. <https://doi.org/10.1177/1744806918788681>.
- 131 Pan GJ, Rayner BS, Zhang Y, van Reyk DM, Hawkins CL. A pivotal role for NF- κ B in the macrophage inflammatory response to the myeloperoxidase oxidant hypothiocyanous acid. *Arch Biochem Biophys* 2018; **642**: 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.016>.
- 132 Loyer X, Zlatanova I, Devue C, et al. Intra-Cardiac Release of Extracellular Vesicles Shapes Inflammation Following Myocardial Infarction. *Circ Res* 2018; **123**: 100–06. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311326>.
- 133 Pitanga TN, Aragão França L de, Rocha VCJ, et al. Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells. *BMC Cell Biol* 2014; **15**: 21. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-15-21>.
- 134 Jia Y, Yu L, Ma T, et al. Small extracellular vesicles isolation and separation: Current techniques, pending questions and clinical applications. *Theranostics* 2022; **12**: 6548–75. <https://doi.org/10.7150/thno.74305>.

- 135 Tzaridis T, Bachurski D, Liu S, et al. Extracellular Vesicle Separation Techniques Impact Results from Human Blood Samples: Considerations for Diagnostic Applications. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. <https://doi.org/10.3390/ijms22179211>.
- 136 Böing AN, van der Pol E, Grootemaat AE, Coumans FAW, Sturk A, Nieuwland R. Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *J Extracell Vesicles* 2014; **3**. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>.
- 137 Johnsen KB, Gudbergsson JM, Andresen TL, Simonsen JB. What is the blood concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 2019; **1871**: 109–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2018.11.006>.
- 138 Lucien F, Gustafson D, Lenassi M, et al. MIBlood-EV: Minimal information to enhance the quality and reproducibility of blood extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2023; **12**: e12385. <https://doi.org/10.1002/jev2.12385>.

7. Anhang

7.1. Proteine der EV-Proben

N=1	N=3	Gen	Proteinname
15,6844	21,0541	A2m	Alpha-2-macroglobulin-P
15,5918	NaN	Aars	Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic
NaN	22,6972	Abcb9	ATP-binding cassette sub-family B member 9
16,3085	17,0757	Abce1	ATP-binding cassette sub-family E member 1
NaN	16,3463	Acadl	Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial
19,4103	17,0317	Acly	ATP-citrate synthase
NaN	15,4356	Aco1	Cytoplasmic aconitate hydratase
NaN	15,1879	Aco2	Aconitate hydratase, mitochondrial
NaN	14,5661	Acox2	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 2
15,3493	NaN	Acp1	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase
NaN	14,1718	Acs1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 1
NaN	16,8672	Acss2	Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic
NaN	23,2408	Acta1	Actin, alpha skeletal muscle
20,0632	23,5987	Actb;Actg1	Actin, cytoplasmic 1
NaN	16,082	Actb2	Beta-actin-like protein 2
19,2494	17,2411	Actn4	Alpha-actinin-4
15,279	NaN	Actr3	Actin-related protein 3
NaN	16,1613	Adh1	Alcohol dehydrogenase 1
NaN	15,7532	Adh5;Adh7	Alcohol dehydrogenase class-3
NaN	20,6362	Adipoq	Adiponectin
14,9819	16,701	Adsl	Adenylosuccinate lyase
14,4591	NaN	Adss	Adenylosuccinate synthetase isozyme 2
NaN	13,499	Agt	Angiotensinogen
NaN	19,2877	Ahcy	Adenosylhomocysteinase
NaN	18,1321	Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein
NaN	18,333	Ak1	Adenylate kinase isoenzyme 1
NaN	18,9181	Akr1b1	Aldo-keto reductase family 1 member B1
20,6091	22,5382	Alb	Serum albumin
12,8818	NaN	Aldh18a1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase
NaN	20,0636	Aldh1a1	Retinal dehydrogenase 1
NaN	16,9616	Aldh8a1	2-aminomuconic semialdehyde dehydrogenase
NaN	19,7399	Aldh9a1	4-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase
21,4115	18,9316	Aldoa	Fructose-bisphosphate aldolase A
17,0287	NaN	Anp32e	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member E
17,5187	NaN	Anxa1	Annexin A1
16,8603	17,6628	Anxa2	Annexin A2
NaN	15,2477	Anxa4	Annexin A4
13,9257	NaN	Ap2a1	AP-2 complex subunit alpha-1
NaN	18,494	Apcs	Serum amyloid P-component

16,7317	NaN	Apex1	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase
NaN	19,61	Apoa1	Apolipoprotein A-I
NaN	16,4601	Apoa4	Apolipoprotein A-IV
NaN	22,005	Apob	Apolipoprotein B-100
NaN	21,0675	Apoc1	Apolipoprotein C-I
NaN	22,0162	Apoc4	Apolipoprotein C-IV
NaN	23,7601	Apoe	Apolipoprotein E
NaN	16,3779	Apoh	Beta-2-glycoprotein 1
NaN	16,2453	Aprt	Adenine phosphoribosyltransferase
NaN	19,3797	Aqp1	Aquaporin-1
19,1374	16,6369	Arf3	ADP-ribosylation factor 3
15,9586	17,5922	Arg1	Arginase-1
17,13	NaN	Arpc4	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4
17,7837	18,4005	Arvcf	Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome homolog
26,91	NaN	Asap2	Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2
NaN	19,2932	Ass1	Argininosuccinate synthase
NaN	15,9553	Atg7	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme ATG7
NaN	17,7368	Atic	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH
NaN	17,0859	Atp1a1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
17,7178	NaN	Atp5f1a	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
15,2112	NaN	Atp5f1b	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
NaN	17,6972	Bbs5	Bardet-Biedl syndrome 5 protein homolog
NaN	17,6446	Bsg	Basigin
16,3684	NaN	Btf3	Transcription factor BTF3
NaN	18,3908	C1qb	Complement C1q subcomponent subunit B
18,0272	NaN	C1rb	Complement C1r-B subcomponent
16,6869	21,0237	C3	Complement C3
NaN	18,9602	C4b	Complement C4-B
NaN	21,147	C4bpa	C4b-binding protein
NaN	17,8975	C5	Complement C5
NaN	17,6827	Ca2	Carbonic anhydrase 2
14,9041	NaN	Calm1	Calmodulin-1
18,4962	NaN	Calu	Calumenin
NaN	15,0384	Capn1	Calpain-1 catalytic subunit
15,0865	NaN	Cbr1	Carbonyl reductase [NADPH] 1
17,5817	17,6302	Ccdc88b	Coiled-coil domain-containing protein 88B
19,1554	16,2115	Cct2	T-complex protein 1 subunit beta
18,7453	NaN	Cct3	T-complex protein 1 subunit gamma
18,2104	16,0312	Cct5	T-complex protein 1 subunit epsilon
17,5638	NaN	Cct7	T-complex protein 1 subunit eta
12,6124	NaN	Cct8	T-complex protein 1 subunit theta
NaN	16,0907	Cd36	Platelet glycoprotein 4
NaN	17,6925	Cd44	CD44 antigen
NaN	16,9185	Cd47	Leukocyte surface antigen CD47
18,0872	23,3327	Cd5l	CD5 antigen-like
NaN	15,7128	Cd82	CD82 antigen

NaN	14,8408	Cd9	CD9 antigen
NaN	20,6259	Cdc5l	Cell division cycle 5-like protein
NaN	17,3683	Cdsn	Corneodesmosin
NaN	16,1066	Ces2c	Acylcarnitine hydrolase
NaN	20,9269	Ces3a	Carboxylesterase 3A
NaN	17,1584	Ces3b	Carboxylesterase 3B
NaN	17,0147	Cfh	Complement factor H
19,4027	17,2819	Cfl1	Cofilin-1
15,5345	NaN	Cfl2	Cofilin-2
NaN	15,3129	Chil3	Chitinase-like protein 3
NaN	21,3281	Cir1	Corepressor interacting with RBPJ 1
15,9353	NaN	Ckb	Creatine kinase B-type
NaN	19,5408	Ckm	Creatine kinase M-type
NaN	14,6165	Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial
17,9602	14,7696	Cltc	Clathrin heavy chain 1
NaN	23,8104	Clu	Clusterin
16,0533	NaN	Cndp1	Beta-Ala-His dipeptidase
NaN	16,8968	Col6a1	Collagen alpha-1(VI) chain
16,453	NaN	Copb1	Coatomer subunit beta
15,8063	NaN	Cops4	COP9 signalosome complex subunit 4
15,8991	NaN	Cops6	COP9 signalosome complex subunit 6
NaN	17,4012	Coro1a	Coronin-1A
NaN	12,4417	Coro7	Coronin-7
NaN	15,5186	Cp	Ceruloplasmin
NaN	19,7761	Cpb2	Carboxypeptidase B2
NaN	18,5266	Cpn1	Carboxypeptidase N catalytic chain
NaN	18,6673	Cpn2	Carboxypeptidase N subunit 2
15,2576	NaN	Cps1	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial
19,0334	21,1677	Crebrf	CREB3 regulatory factor
NaN	18,6952	Crebzf	CREB/ATF bZIP transcription factor
NaN	18,1638	Cs	Citrate synthase, mitochondrial
18,029	15,3397	Csde1	Cold shock domain-containing protein E1
16,119	NaN	Csrp1	Cysteine and glycine-rich protein 1
15,9627	16,7852	Dars	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic
14,5	NaN	Dctpp1	dCTP pyrophosphatase 1
15,2183	NaN	Ddx1	ATP-dependent RNA helicase DDX1
15,7004	NaN	Ddx17	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17
15,2552	NaN	Ddx46	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46
NaN	14,8622	Dhx15	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15
18,8302	16,7887	Dhx9	ATP-dependent RNA helicase A
NaN	17,8466	Dnpep	Aspartyl aminopeptidase
NaN	16,5194	Dsg1a	Desmoglein-1-alpha
18,193	18,7926	Dsp	Desmoplakin
15,2506	NaN	Dync1h1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1
20,6334	20,3615	Eef1a1	Elongation factor 1-alpha 1
NaN	17,6583	Eef1a2	Elongation factor 1-alpha 2

16,4889	NaN	Eef1b	Elongation factor 1-beta
13,1073	16,0868	Eef1g	Elongation factor 1-gamma
19,1567	17,0436	Eef2	Elongation factor 2
17,8484	NaN	Eftud2	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component
NaN	15,4551	Ehd4	EH domain-containing protein 4
15,2942	NaN	Eif3a	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A
20,2093	19,5062	Eif4a1	Eukaryotic initiation factor 4A-I
18,5556	16,638	Eif5a	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1
NaN	14,3511	Eml2	Echinoderm microtubule-associated protein-like 2
NaN	15,2694	Engase	Cytosolic endo-beta-N-acetylglucosaminidase
19,691	15,8347	Eno1	Alpha-enolase
NaN	15,4365	Entpd1	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1
NaN	14,1356	Epb42	Erythrocyte membrane protein band 4.2
NaN	16,0768	Ephx2	Bifunctional epoxide hydrolase 2
NaN	15,9103	Erap1	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
NaN	17,421	Esd	S-formylglutathione hydrolase
16,5576	15,4226	Etf1	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1
NaN	16,342	F11	Coagulation factor XI
NaN	19,5417	F13a1	Coagulation factor XIII A chain
NaN	17,0895	F13b	Coagulation factor XIII B chain
NaN	20,306	F8	Coagulation factor VIII
17,4195	15,3935	Fbl	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin
NaN	17,1755	Fcer1g	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma
NaN	19,961	Fcn1	Ficolin-1
NaN	16,9803	Fcn2	Ficolin-2
NaN	18,3913	Fermt3	Fermitin family homolog 3
NaN	22,2903	Fga	Fibrinogen alpha chain
NaN	21,5612	Fgb	Fibrinogen beta chain
NaN	22,1275	Fgg	Fibrinogen gamma chain
NaN	20,5042	Fgl1	Fibrinogen-like protein 1
NaN	15,1408	Flg2	Filaggrin-2
19,0125	17,8695	Flna	Filamin-A
12,4726	NaN	Flnb	Filamin-B
18,4514	23,0904	Fn1	Fibronectin
19,7906	NaN	Fscn1	Fascin
NaN	14,0623	Fth1	Ferritin heavy chain
NaN	16,9659	Fuca1	Tissue alpha-L-fucosidase
17,1068	NaN	Fxr1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1
17,8636	17,949	G6pdx	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase X
NaN	14,9841	Galc	Galactocerebrosidase
14,5426	NaN	Galnt2	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2
14,7379	20,0708	Ganab	Neutral alpha-glucosidase AB
15,0697	22,3079	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
NaN	16,7744	Gbe1	1,4-alpha-glucan-branching enzyme
NaN	17,3919	Gc	Vitamin D-binding protein
15,1904	NaN	Gcn1	eIF-2-alpha kinase activator GCN1

NaN	22,7009	Gfap	Glial fibrillary acidic protein
13,9468	NaN	Gipc2	PDZ domain-containing protein GIPC2
12,5938	NaN	Glrx3	Glutaredoxin-3
NaN	21,2583	Glt8d1	Glycosyltransferase 8 domain-containing protein 1
16,2776	14,8115	Glud1	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial
17,4668	21,2188	Gm10881	Ig kappa chain V-V region L7 (Fragment)
NaN	18,0195	Gnai1	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-1
NaN	19,256	Gnb1	Guanine nucleotide-binding protein G(l)/G(s)/G(t) subunit beta-1
NaN	16,2798	Gnmt	Glycine N-methyltransferase
NaN	16,9343	Gpd1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic
NaN	17,4124	Gpld1	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D
NaN	18,2256	Gpx1	Glutathione peroxidase 1
NaN	21,0745	Gpx3	Glutathione peroxidase 3
NaN	13,5591	Gpx4	Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
18,9831	19,2323	Gramd2b	GRAM domain-containing protein 2B
NaN	17,5577	Grb7	Growth factor receptor-bound protein 7
NaN	16,8499	Gsn	Gelsolin
13,8729	NaN	Gsr	Glutathione reductase, mitochondrial
NaN	18,5049	Gys1	Glycogen [starch] synthase, muscle
15,9963	NaN	H2afj	Histone H2A type 1-B
NaN	19,131	H2-D1;H2-L	H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha chain
NaN	16,8276	H2-K1	H-2 class I histocompatibility antigen, K-K alpha chain
NaN	21,1476	H2-Q10	H-2 class I histocompatibility antigen, Q10 alpha chain
NaN	18,7714	H6pd	GDH/6PGL endoplasmic bifunctional protein
NaN	13,4177	Hal	Histidine ammonia-lyase
NaN	22,2969	Hba	Hemoglobin subunit alpha
16,2733	21,1154	Hbb-b1	Hemoglobin subunit beta-1
NaN	14,8423	Hexa	Beta-hexosaminidase subunit alpha
16,1833	16,1952	Hist1h4a	Histone H4
19,0712	17,5877	Hnrnpa0	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0
18,8419	17,2123	Hnrnpa1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
19,2701	NaN	Hnrnpa2b1	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
17,6832	NaN	Hnrnpc	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2
15,7644	NaN	Hnrnpd	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0
14,3171	NaN	Hnrnpf	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
19,7121	18,8862	HnrnpH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
19,5816	17,9222	Hnrnpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
17,1005	NaN	Hnrnpm	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
15,1813	19,098	Hp	Haptoglobin
21,4422	20,7366	Hpx	Hemopexin
NaN	14,2871	Hras;Kras;Nras	GTPase NRas
NaN	20,5915	Hrg	Histidine-rich glycoprotein
18,8174	NaN	Hsp90aa1	Heat shock protein HSP 90-alpha
20,0376	18,3065	Hsp90ab1	Heat shock protein HSP 90-beta
17,5836	NaN	Hspa1a;Hspa1b	Heat shock 70 kDa protein 1B
NaN	15,2013	Hspa2	Heat shock-related 70 kDa protein 2

18,5495	18,927	Hspa5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP
21,4044	20,1215	Hspa8	Heat shock cognate 71 kDa protein
NaN	16,7649	Hspb1	Heat shock protein beta-1
23,3205	21,5846	Hspd1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
15,3785	NaN	Hypk	Huntingtin-interacting protein K
NaN	21,0814	Ier5	Immediate early response gene 5 protein
NaN	15,1771	Ift172	Intraflagellar transport protein 172 homolog
NaN	17,2887	Igfals	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit
23,1275	27,8979	Ighm	Immunoglobulin heavy constant mu
NaN	22,1624	Ighv1-62-3	Ig heavy chain V region 1-62-3
NaN	17,2629	Igh-VJ558	Ig heavy chain V region 108A
NaN	18,7962	Igkc	Immunoglobulin kappa constant
12,964	20,0959	Igk-V19-17	Ig kappa chain V19-17
NaN	20,5705	Igkv7-33	Ig kappa chain V-I region S107A
NaN	16,0552	Il2rb	Interleukin-2 receptor subunit beta
18,1492	16,521	Ilf2	Interleukin enhancer-binding factor 2
NaN	15,9928	Ilk	Integrin-linked protein kinase
16,3418	NaN	Impdh2	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2
NaN	15,1746	Inhbe	Inhibin beta E chain
NaN	15,1418	Inmt	Indolethylamine N-methyltransferase
NaN	17,147	Ipo4	Importin-4
14,3209	NaN	Ipo5	Importin-5
NaN	13,617	Itga2	Integrin alpha-2
NaN	19,8591	Itga2b	Integrin alpha-IIb
NaN	16,0122	Itga4	Integrin alpha-4
NaN	17,679	Itga6	Integrin alpha-6
NaN	15,5961	Itgal	Integrin alpha-L
NaN	16,9358	Itgb1	Integrin beta-1
NaN	14,3669	Itgb2	Integrin beta-2
NaN	19,0886	Itgb3	Integrin beta-3
NaN	17,9259	Itgb4	Integrin beta-4
16,0643	15,0076	Itih1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1
NaN	18,7747	Itih2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2
NaN	14,3318	Itih3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3
NaN	18,4361	Itih4	Inter alpha-trypsin inhibitor, heavy chain 4
19,1651	23,4579	Jchain	Immunoglobulin J chain
17,2972	18,3859	Jup	Junction plakoglobin
NaN	14,0063	Kcmf1	E3 ubiquitin-protein ligase KCMF1
13,9855	NaN	Kif5c	Kinesin heavy chain isoform 5C
NaN	15,0363	Klk1b1	Kallikrein 1-related peptidase b1
NaN	14,0922	Klkb1	Plasma kallikrein
NaN	16,8256	Kng1	Kininogen-1
14,9773	NaN	Kpnb1	Importin subunit beta-1
23,7854	24,6293	Krt1	Keratin, type II cytoskeletal 1
24,3028	24,4559	Krt10	Keratin, type I cytoskeletal 10
20,0462	19,7159	Krt12	Keratin, type I cytoskeletal 12

19,9075	19,1739	Krt13	Keratin, type I cytoskeletal 13
21,9273	21,3345	Krt16	Keratin, type I cytoskeletal 16
21,3565	20,4169	Krt17	Keratin, type I cytoskeletal 17
18,2625	NaN	Krt19	Keratin, type I cytoskeletal 19
23,7457	23,9304	Krt2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
16,2958	17,53	Krt26	Keratin, type I cytoskeletal 26
17,4886	NaN	Krt35	Keratin, type I cuticular Ha5
18,1367	17,8976	Krt4	Keratin, type II cytoskeletal 4
25,6288	25,4989	Krt42	Keratin, type I cytoskeletal 42
23,9344	23,3035	Krt5	Keratin, type II cytoskeletal 5
23,7349	23,1801	Krt6a	Keratin, type II cytoskeletal 6A
17,7916	NaN	Krt72	Keratin, type II cytoskeletal 72
16,3281	NaN	Krt75	Keratin, type II cytoskeletal 75
25,1724	24,5233	Krt76	Keratin, type II cytoskeletal 2 oral
16,5889	17,3445	Krt77	Keratin, type II cytoskeletal 1b
NaN	19,5784	Krt79	Keratin, type II cytoskeletal 79
15,596	15,5183	Krt80	Keratin, type II cytoskeletal 80
NaN	15,4639	Lamb1	Laminin subunit beta-1
NaN	14,963	Lamc1	Laminin subunit gamma-1
15,5687	15,6147	Ldha	L-lactate dehydrogenase A chain
20,3485	19,6116	Ldhb	L-lactate dehydrogenase B chain
NaN	20,0115	Lgals3bp	Galectin-3-binding protein
17,6012	NaN	Lmna	Prelamin-A/C
NaN	17,6734	Lpl	Lipoprotein lipase
NaN	17,1982	Lrp1	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1
NaN	16,8404	Lrp2	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2
NaN	18,1383	Man1a1	Mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IA
17,7849	NaN	Mapre1	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1
NaN	16,5557	Mark1	Serine/threonine-protein kinase MARK1
NaN	18,3051	Masp1	Mannan-binding lectin serine protease 1
NaN	17,3764	Masp2	Mannan-binding lectin serine protease 2
14,9839	NaN	Mb	Myoglobin
NaN	21,2841	Mbl1	Mannose-binding protein A
NaN	18,4528	Mbl2	Mannose-binding protein C
15,1058	NaN	Mcm3	DNA replication licensing factor MCM3
15,3421	NaN	Mcm7	DNA replication licensing factor MCM7
15,3033	NaN	Mdh2	Malate dehydrogenase, mitochondrial
NaN	18,567	Meaf6	Chromatin modification-related protein MEAF6
NaN	17,3902	Melk	Maternal embryonic leucine zipper kinase
NaN	14,6601	Melft	Melanotransferrin
NaN	17,0598	Mfge8	Lactadherin
NaN	17,229	Mocs3	Adenylyltransferase and sulfurtransferase MOCS3
NaN	18,1091	Msn	Moesin
NaN	19,0033	Mthfd1	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic
15,1996	NaN	Mtpn	Myotrophin
NaN	23,5501	Mug1	Murinoglobulin-1

NaN	16,7149	Mug2	Murinoglobulin-2
NaN	19,7341	Mup18	Major urinary protein 18
NaN	17,5499	Mup3	Major urinary protein 3
NaN	14,5557	Myh3	Myosin-3
18,0176	16,0634	Myh9	Myosin-9
17,6541	20,2663	Myo9b	Unconventional myosin-IXb
17,3901	NaN	Naca	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form
NaN	18,3632	Naip6;Naip7	Baculoviral IAP repeat-containing protein 1g
NaN	17,0353	Naprt	Nicotinate phosphoribosyltransferase
15,3779	NaN	Ncbp1	Nuclear cap-binding protein subunit 1
15,2689	NaN	Ncl	Nucleolin
16,0048	NaN	Niban2	Protein Niban 2
17,9728	NaN	Nme1	Nucleoside diphosphate kinase A
14,1083	NaN	Npepps	Puromycin-sensitive aminopeptidase
20,1851	17,8815	Npm1	Nucleophosmin
15,578	NaN	Npm3	Nucleoplasmin-3
16,8096	NaN	Nsf	Vesicle-fusing ATPase
NaN	15,6421	Nup160	Nuclear pore complex protein Nup160
NaN	13,352	Obscn	Obscurin
NaN	16,0041	Ogt	UDP-N-acetylglucosamine--peptide N-acetylglucosaminyltransferase 110 kDa subunit
NaN	16,9988	Oit3	Oncoprotein-induced transcript 3 protein
13,6169	NaN	Ola1	Obg-like ATPase 1
NaN	19,338	Olfm4	Olfactomedin-4
15,2578	NaN	Oxct1	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial
15,0354	NaN	Pabpc1	Polyadenylate-binding protein 1
14,2574	NaN	Pafah1b2	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB subunit beta
15,481	NaN	Paics	Multifunctional protein ADE2
14,308	NaN	Pcbp1	Poly(rC)-binding protein 1
NaN	18,844	Pfkl	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type
NaN	21,0979	Pfkm	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type
NaN	17,3897	Pfn1	Profilin-1
18,546	13,3524	Pgd	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating
15,5717	17,3787	Pgk1;Pgk2	Phosphoglycerate kinase 2
17,6214	15,3995	Phb	Prohibitin
16,542	NaN	Phb2	Prohibitin-2
13,6774	12,521	Phgdh	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
NaN	19,1797	Pigk	GPI-anchor transamidase
NaN	19,6391	Pigr	Polymeric immunoglobulin receptor
NaN	16,6653	Piwil1	Piwi-like protein 1
NaN	16,2587	Pkhd111	Fibrocystin-L
22,8571	20,3226	Pkm	Pyruvate kinase PKM
NaN	15,545	Pkp1	Plakophilin-1
19,2613	NaN	Plec	Plectin
NaN	17,72	Plg	Plasminogen
NaN	18,565	Plod1	Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
NaN	17,5257	Plod3	Multifunctional procollagen lysine hydroxylase and glycosyltransferase LH3

NaN	16,5072	Plxna1	Plexin-A1
NaN	14,3843	Pof1b	Protein POF1B
NaN	18,6845	Pon1	Serum paraoxonase/arylesterase 1
15,9123	15,0995	Ppia	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
NaN	16,6456	Ppp1ca	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit
16,8225	17,1688	Prdx1	Peroxiredoxin-1
17,6059	19,4458	Prdx2	Peroxiredoxin-2
16,8083	15,2057	Prdx6	Peroxiredoxin-6
15,1716	NaN	Prkaca	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha
16,4386	NaN	Prmt1	Protein arginine N-methyltransferase 1
NaN	14,332	Prmt5	Protein arginine N-methyltransferase 5
14,2406	NaN	Prpf40a	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A
17,2813	15,4502	Prps2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2
NaN	15,1576	Prrc2c	Protein PRRC2C
NaN	20,1851	Psg22	Pregnancy-specific glycoprotein 22
NaN	21,2547	Psma1	Proteasome subunit alpha type-1
NaN	20,7693	Psma2	Proteasome subunit alpha type-2
14,9954	22,2798	Psma3	Proteasome subunit alpha type-3
NaN	21,1266	Psma4	Proteasome subunit alpha type-4
NaN	20,8871	Psma5	Proteasome subunit alpha type-5
13,2026	20,106	Psma6	Proteasome subunit alpha type-6
16,0771	22,459	Psma7	Proteasome subunit alpha type-7
NaN	18,8911	Psmb1	Proteasome subunit beta type-1
NaN	17,6236	Psmb10	Proteasome subunit beta type-10
NaN	19,4985	Psmb2	Proteasome subunit beta type-2
15,4288	19,4676	Psmb3	Proteasome subunit beta type-3
NaN	20,9633	Psmb4	Proteasome subunit beta type-4
NaN	19,6932	Psmb5	Proteasome subunit beta type-5
NaN	20,9719	Psmb6	Proteasome subunit beta type-6
12,5078	20,1295	Psmb7	Proteasome subunit beta type-7
NaN	19,5171	Psmb8	Proteasome subunit beta type-8
NaN	18,211	Psmb9	Proteasome subunit beta type-9
14,227	NaN	Ptbp1	Polypyrimidine tract-binding protein 1
NaN	15,5964	Ptms	Parathyrosin
NaN	17,4808	Ptprc	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C
NaN	19,1845	Ptprk	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa
NaN	19,7972	Ptx3	Pentraxin-related protein PTX3
NaN	17,7988	Pygb	Glycogen phosphorylase, brain form
NaN	15,6414	Pygl	Glycogen phosphorylase, liver form
15,4341	25,4215	Pygm	Glycogen phosphorylase, muscle form
24,8554	32,0638	Pzp	Pregnancy zone protein
NaN	16,0306	Qsox1	Sulfhydryl oxidase 1
NaN	16,2991	Rab11b	Ras-related protein Rab-11B
16,2186	17,9747	Rab1A	Ras-related protein Rab-1A
NaN	16,0337	Rab7a	Ras-related protein Rab-7a
NaN	17,4076	Rack1	Receptor of activated protein C kinase 1

18,9729	17,0038	Ran	GTP-binding nuclear protein Ran
NaN	18,7	Rap1a	Ras-related protein Rap-1A
NaN	18,4864	Rassf8	Ras association domain-containing protein 8
17,7407	NaN	Rcc2	Protein RCC2
NaN	16,1489	Reln	Reelin
NaN	14,779	Rhog	Rho-related GTP-binding protein RhoG
13,0063	NaN	Rpl10a	60S ribosomal protein L10a
20,0292	16,0909	Rpl12	60S ribosomal protein L12
17,4772	15,1355	Rpl13a	60S ribosomal protein L13a
16,6289	NaN	Rpl14	60S ribosomal protein L14
14,6787	NaN	Rpl15	60S ribosomal protein L15
17,6937	NaN	Rpl17	60S ribosomal protein L17
14,6251	NaN	Rpl23	60S ribosomal protein L23
19,1619	NaN	Rpl3	60S ribosomal protein L3
14,3279	NaN	Rpl38	60S ribosomal protein L38
15,8823	NaN	Rpl4	60S ribosomal protein L4
18,8973	NaN	Rpl5	60S ribosomal protein L5
20,2521	16,5487	Rpl8	60S ribosomal protein L8
19,1692	13,6333	Rpl9	60S ribosomal protein L9
17,3247	NaN	Rplp0	60S acidic ribosomal protein P0
17,2423	NaN	Rps15a	40S ribosomal protein S15a
19,8496	18,9051	Rps2	40S ribosomal protein S2
17,724	19,1044	Ubb	Polyubiquitin-B
17,8875	15,9254	Rps3	40S ribosomal protein S3
14,7607	NaN	Rps6	40S ribosomal protein S6
19,216	NaN	Rpsa	40S ribosomal protein SA
17,5147	NaN	Rrm1	Ribonucleoside-diphosphate reductase large subunit
13,2092	NaN	RTRAF	RNA transcription, translation and transport factor protein
NaN	15,6427	Rwdd1	RWD domain-containing protein 1
NaN	17,834	Saa1	Serum amyloid A-1 protein
NaN	17,4546	Saa2	Serum amyloid A-2 protein
NaN	14,702	Scfd2	Sec1 family domain-containing protein 2
NaN	16,0553	Sdcbp	Syntenin-1
15,5918	16,667	Sdha	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial
NaN	17,4081	Selenbp1;Selenbp2	Methanethiol oxidase
NaN	14,4442	Selenop	Selenoprotein P
NaN	15,984	Selplg	P-selectin glycoprotein ligand 1
NaN	19,786	Serpina1b	Alpha-1-antitrypsin 1-2
NaN	21,768	Serpina1c	Alpha-1-antitrypsin 1-3
NaN	23,3803	Serpina1d	Alpha-1-antitrypsin 1-4
NaN	18,7071	Serpina1e	Alpha-1-antitrypsin 1-5
NaN	21,5242	Serpina3k	Serine protease inhibitor A3K
NaN	19,1063	Serpina3m	Serine protease inhibitor A3M
NaN	20,5186	Serpina3n	Serine protease inhibitor A3N
NaN	17,6042	Serpinc1	Antithrombin-III
NaN	16,3501	Serpind1	Heparin cofactor 2

NaN	18,339	Serpinf2	Alpha-2-antiplasmin
NaN	17,4811	Serping1	Plasma protease C1 inhibitor
15,9434	NaN	Set	Protein SET
17,4763	18,4846	Sfn	14-3-3 protein sigma
16,1105	NaN	Shmt2	Serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial
NaN	15,2456	Slc14a1	Urea transporter 1
NaN	16,7291	Slc16a1	Monocarboxylate transporter 1
NaN	23,0433	Slc17a9	Solute carrier family 17 member 9
16,0891	NaN	Slc25a13	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2
15,1682	NaN	Slc25a4;Slc25a5	ADP/ATP translocase 1
NaN	14,049	Slc29a1	Equilibrative nucleoside transporter 1
NaN	17,5903	Slc3a2	4F2 cell-surface antigen heavy chain
NaN	18,6819	Slc4a1	Band 3 anion transport protein
NaN	15,6463	Slc7a5	Large neutral amino acids transporter small subunit 1
NaN	14,8724	Smyd1	Histone-lysine N-methyltransferase Smyd1
15,2023	NaN	Snca	Alpha-synuclein
16,8223	NaN	Snd1	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1
NaN	17,2205	Spatc1l	Speriolin-like protein
NaN	16,8082	Spn	Leukosialin
NaN	15,5103	Spr	Sepiapterin reductase
NaN	17,1805	Steap3	Metalloreductase STEAP3
13,6297	NaN	Stip1	Stress-induced-phosphoprotein 1
NaN	17,3405	Stom	Erythrocyte band 7 integral membrane protein
16,8574	14,1136	Supt16h	FACT complex subunit SPT16
NaN	14,156	Syk	Tyrosine-protein kinase SYK
18,9418	NaN	Syncrip	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
NaN	16,3522	Synj2bp	Synaptojanin-2-binding protein
17,0092	14,6079	Taldo1	Transaldolase
NaN	16,4914	Tcn2	Transcobalamin-2
16,938	NaN	Tcp1	T-complex protein 1 subunit alpha
NaN	20,7932	Tf	Serotransferrin
NaN	21,3996	Tfrc	Transferrin receptor protein 1
NaN	15,1711	Tgm1	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K
NaN	17,2968	Thbs1	Thrombospondin-1
NaN	13,7361	Thy1	Thy-1 membrane glycoprotein
NaN	16,3376	Tinag1l	Tubulointerstitial nephritis antigen-like
NaN	15,6507	Tkfc	Triokinase/FMN cyclase
14,5134	NaN	Tkt	Transketolase
13,2885	NaN	Tln1	Talin-1
NaN	18,3943	Tnc	Tenascin
17,9997	16,3857	Tpm2	Tropomyosin beta chain
14,9215	NaN	Tpm3	Tropomyosin alpha-3 chain
15,8618	NaN	Tpt1	Translationally-controlled tumor protein
NaN	15,7978	Trim24	Transcription intermediary factor 1-alpha
14,4101	NaN	Trip13	Pachytene checkpoint protein 2 homolog
NaN	18,2427	Ttr	Transthyretin

22,8551	21,6669	Tuba1c	Tubulin alpha-1C chain
23,509	21,8598	Tuba4a	Tubulin alpha-4A chain
NaN	18,0847	Tubb1	Tubulin beta-1 chain
NaN	17,0174	Tubb4b	Tubulin beta-4B chain
19,0433	19,3386	Tubb5	Tubulin beta-5 chain
16,7284	NaN	Tufm	Elongation factor Tu, mitochondrial
17,6812	17,0843	Txn	Thioredoxin
NaN	15,7741	Uba1	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1
15,8213	NaN	Ube2d3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3
16,0096	NaN	Ube2l3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3
16,5891	NaN	Ublcp1	Ubiquitin-like domain-containing CTD phosphatase 1
14,4741	NaN	Ugp2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
NaN	16,8248	Uroc1	Urocanate hydratase
NaN	18,5111	Usp48	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 48
NaN	14,5095	Vamp8	Vesicle-associated membrane protein 8
15,9549	NaN	Vcl	Vinculin
16,2595	18,6883	Vcp	Transitional endoplasmic reticulum ATPase
18,6719	16,8021	Vim	Vimentin
17,766	NaN	Vps16	Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog
NaN	18,0945	Vtn	Vitronectin
NaN	24,8902	Vwf	von Willebrand factor
NaN	16,6264	Wdr1	WD repeat-containing protein 1
16,9074	NaN	Xrcc6	X-ray repair cross-complementing protein 6
NaN	13,931	Ywhae	14-3-3 protein epsilon
14,8138	15,9202	Ywhaq	14-3-3 protein theta
NaN	17,7686	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta
NaN	18,7916	Znf335	Zinc finger protein 335
17,0956	NaN		Ig heavy chain V region 914
20,1994	24,3681		Ig lambda-1 chain V region
17,3856	23,0223		Ig kappa chain V-II region 26-10
16,6166	22,7702		Ig heavy chain V-III region A4
NaN	22,6772		Ig heavy chain V region AC38 205.12
NaN	22,5657		Ig kappa chain V-V region HP R16.7
17,2309	21,9406		Ig kappa chain V-IV region S107B
NaN	21,8039		Ig heavy chain V-III region A4
NaN	21,5351		Ig heavy chain V-III region J606
NaN	21,132		Ig alpha chain C region
NaN	21,0628		Ig heavy chain V region MOPC 47A
NaN	20,5742		Ig kappa chain V-II region 7S34.1
NaN	20,4922		Ig heavy chain V regions TEPC 15/S107/HPCM1/HPCM2/HPCM3
NaN	20,3883		Ig lambda-1 chain C region
NaN	19,9945		Ig kappa chain V-V region MOPC 21
NaN	19,8791		Ig heavy chain V region MOPC 141
NaN	19,792		Ig heavy chain V-III region A4
NaN	19,7634		Ig heavy chain V region 441
NaN	19,5946		Ig kappa chain V-III region PC 3741/TEPC 111

NaN	19,4628		Ig kappa chain V-VI region NQ2-17.4.1
NaN	19,4306		Ig kappa chain V-II region 17S29.1
NaN	19,2298		Ig heavy chain V region MOPC 141
15,0491	18,9994		Ig heavy chain V region
NaN	18,8204		Ig kappa chain V-III region PC 2880/PC 1229
14,7343	18,7921		Ig kappa chain V-V region K2 (Fragment)
NaN	18,4631		Ig kappa chain V-V region MOPC 149
NaN	18,1615		Ig kappa chain V-III region PC 2154
NaN	16,9213		Ig kappa chain V-II region 2S1.3
NaN	16,8797		Ig kappa chain V-III region 50S10.1
NaN	16,3242		Ig kappa chain V-III region ABPC 22/PC 9245
NaN	16,2405		Ig kappa chain V-VI region NQ2-6.1
NaN	16,0155		Ig kappa chain V-VI region XRPC 44
NaN	15,72		Ig lambda-1 chain V region S178

7.2. Abbildungsverzeichnis

*Abbildung 1: Klinische Einteilung des Myokardinfarktes in fünf Typen*¹⁸. CAD= coronary artery disease, CABG= coronary artery bypass graft, ECG= electrocardiogram, MI= myocardial infarction, PCI= percutaneous coronary intervention 18

*Abbildung 2: Aktivität verschiedener Immunzellen im Herzen im zeitlichen Verlauf vor und nach einem Myokardinfarkt*³⁴. 25

*Abbildung 3: Struktur und Bildung der Myeloperoxidase*⁶⁶..... 27

*Abbildung 4: Übersicht über die gängigen Isolationsmethoden für EV*¹⁰² 33

*Abbildung 5: MPO korreliert mit der Aktivität von Monozyten in Patienten mit Herzinsuffizienz. MPO-Plasma-Spiegel von Patienten mit Herzinsuffizienz und gesunden Kontrollen. (n=21/42) (A). mRNA-Expression von TNF- α in Monozyten von Patienten und Kontrollen 2 Stunden nach Isolation (n=21/42) (B). Korrelation der Proteinexpression von TNF- α in Monozyten und den MPO-Plasma-Spiegeln (C). MPO= Myeloperoxidase. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben*¹¹⁸ 34

*Abbildung 6: MPO-Injektion induziert intraperitoneale Leukozytenrekrutierung. Intraperitoneale Leukozytenanzahl bei WT-Mäusen 3 Tage nach intraperitonealer Injektion von NaCl 0,9 %, 10 μ g/mL MPO in NaCl 0,9 %- bzw 3 % Thioglykolsäure in NaCl 0,9 %. WT: Wildtyp, MPO: Myeloperoxidase. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben*¹¹⁸ 35

*Abbildung 7: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder und Analysen von CD11b⁺- und Ly6G⁺-Zellen in der Milz sowie im linken Ventrikel von WT und MPO^{-/-} Mäusen, 1 Tag nach LAD Ligatur. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben*¹¹⁸..... 36

Abbildung 8: Einen Tag nach LAD-Ligatur zeigen sich erhöhte Plasma-Level von MPO in Wildtyp-Mäusen. n=14/11. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. WT= Wildtyp, 1d LAD= ein Tag nach Ligatur der LAD-Koronararterie, MPO= Myeloperoxidase..... 58

Abbildung 9: Gating-Strategie für die Definition von Ly6C ^{high} -Monozyten.	59
Abbildung 10: Anzahl an Ly6C ^{high} -Monozyten in Milz (a-c) und Myokard (d-f) von WT- und MPO ^{-/-} -Mäusen. Die Mobilisation der Ly6C ^{high} -Monozyten aus der Milz und die Rekrutierung in das Myokard sind in MPO-defizienten Mäusen einen Tag nach LAD-Ligatur reduziert. Weitere Analysen verdeutlichen, dass dieser Effekt sich auf Ly6C ^{high} /CCR2 ⁺ -Monozyten beschränkt. n=8/10 (Milz) bzw. 6/8 (Herz). Die Daten sind als Mittelwerte + SEM angegeben. CD115 ⁺ Ly6C ^{hi} = Ly6C ^{high} -Monozyten, WT= Wildtyp, 1d LAD= ein Tag nach Ligatur der LAD-Koronararterie, MPO= Myeloperoxidase	60
Abbildung 11: Die Stimulation von THP-1 Monozyten mit MPO und seinem Substrat H ₂ O ₂ erhöht die mRNA-Expression der Chemokinrezeptoren CCR2 (A) und (nicht signifikant) CX3CR1 (B). n=5/5/5. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. MPO= Myeloperoxidase, ns= nicht signifikant.....	61
Abbildung 12: Die Inkubation von THP-1 Monozyten mit MPO bzw. MPO und H ₂ O ₂ erhöht die Migration dieser Zellen entlang eines MCP-1 Gradienten. n= 5/5/3. (A) zeigt repräsentative Bilder der Migrationsstrecke eines Monozyten. Die Daten unter (B) sind als Mittelwert + SEM angegeben. MPO= Myeloperoxidase	63
Abbildung 13: Visualisierung der EV-Größenverteilung. Repräsentative Bilder der elektronenmikroskopischen Analyse bestätigen das Vorliegen von EV mit einem Durchmesser von rund 100 nm (A) Repräsentative Nanopartikel Tracking Analyse bestätigt diese durchschnittliche Größe und belegt eine normale Größenverteilung (B)	65
Abbildung 14: Qualitativer Nachweis der EV-Markerproteine in den EV-Suspensionen mittels Western Blot. n = 2/2/2/2. WT= Wildtyp, KO= MPO ^{-/-} , BL= baseline, LAD= nach Ligatur der LAD-Arterie	66
Abbildung 15: Qualitativer Nachweis der Oberflächenmarker CD31 und Ly6G in den EV-Suspensionen mittels Western Blot. n= 3/3/3/3. WT= Wildtyp, KO= MPO ^{-/-} , BL= baseline, LAD= nach Ligatur der LAD-Arterie	66
Abbildung 16: Nachweis des Plasmaproteins Albumin in der EV-Suspension nach Ultrazentrifugation. n= 2/2/2/2. WT= Wildtyp, KO= MPO ^{-/-} , BL= baseline, LAD= nach Ligatur der LAD-Arterie.....	67
Abbildung 17: BCA-Assay der SEC-Fractionen zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Erst ab Fraktion 7 nimmt diese merklich zu, sodass bis zur Fraktion 6 von einer geringen Kontamination mit Plasmaproteinen auszugehen ist. n=1. SEC= Size Exclusion Chromatographie	68
Abbildung 18: Anzahl der Antikörper-positiven Ereignisse in der Bead-basierten Durchflusszytometrie der SEC-Fractionen 1-12. Auf der X-Achse sind die Intensitäten der PE-gelabelten Antikörper abgebildet, auf der Y-Achse die Anzahl der Ereignisse. (A) Für den Antikörper gegen CD9 (blau) und die Isotypen-Kontrolle (rot). (B) Für den Antikörper CD81 (grün) und die Isotypen-Kontrolle (rot). Die meisten positiven Ereignisse konnten in den Fraktionen 3-6 (CD9) beziehungsweise 3-4 (CD81) nachgewiesen werden.	69

7.3. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Immunzellen-Durchflusszytometrie</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 2: Verwendete Primer-Sequenzen für die PCR.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 3: Verwendetes Cycling-Programm für die qRT-PCR.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 4: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für die Western Blot-Analysen.</i>	<i>54</i>
<i>Tabelle 5: Verwendete Antikörper für die Mikropartikel-basierte Durchflusszytometrie der SEC-Fraktionen.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabelle 6: Anzahl von Übereinstimmungen bei Proteinen in den isolierten EV mit den 100 häufigsten EV-assoziierten Proteinen in den Datenbanken von Exocarta und Vesiclepedia (zuletzt überprüft am 24.06.2024).....</i>	<i>70</i>

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Daten zur MPO-induzierten Monozyten-Migration wurden bereits am 26.04.2024 im Journal *Frontiers in Immunology* veröffentlicht ¹¹⁸.

(<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2024.1360700/full>)