

*Detektion und Modulation der chlorierenden Aktivität
der Myeloperoxidase in neutrophilen Granulozyten*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

cand. med. Johannes Remmler

Geburtsdatum, Geburtsort:

15.03.1989, Gera

angefertigt am:

Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Betreuer:

apl. Prof. Dr. Jürgen Arnhold

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

23.06.2015

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	II
Bibliografische Beschreibung.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einführung.....	1
1.1 Neutrophile Granulozyten und ihre Rolle bei Entzündungsprozessen.....	1
1.2 Myeloperoxidase (MPO).....	3
1.2.1 Aufbau und Eigenschaften der MPO.....	3
1.2.2 Enzymatische Aktivität der MPO.....	4
1.2.2.1 Halogenierungszyklus: chlorierende Aktivität und weitere Substrate.....	5
1.2.2.2 Peroxidasezyklus und Komplex II-Akkumulation	6
1.2.3 Rolle der MPO bei Entzündungsprozessen	7
1.3 Messung und Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität.....	9
1.3.1 Messung der chlorierenden MPO-Aktivität.....	9
1.3.2 Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität durch (-)-Epicatechin.....	10
1.3.2.1 Eigenschaften von (-)-Epicatechin	10
1.3.2.2 Effekt von (-)-Epicatechin auf die chlorierende MPO-Aktivität <i>in vitro</i>	11
2 Aufgabenstellung	13
3 Materialien und Methoden.....	14
3.1 Materialien.....	14
3.2 Methoden.....	16
3.2.1 Isolation von neutrophilen Granulozyten.....	16
3.2.2 Behandlung der neutrophilen Granulozyten	17
3.2.2.1 Behandlung mit Stimulatoren, Hemmstoffen sowie (-)-Epicatechin	17
3.2.2.2 Forcierung einer Komplex II-Akkumulation der MPO	18
3.2.2.3 Vorbereitung der durchflusszytometrischen Messung	18
3.2.3 Durchflusszytometrische Untersuchung und Fluoreszenzmessung.....	19
3.2.3.1 Untersuchung von Reinheit und Vitalität der Neutrophilen-Suspension	20
3.2.3.2 Messung der chlorierenden MPO-Aktivität in Neutrophilen.....	20

3.2.4	Statistische Auswertung.....	21
4	Ergebnisse.....	23
4.1	Reinheit und Vitalität der Neutrophilen-Suspension	23
4.2	Messung der chlorierenden MPO-Aktivität in Neutrophilen	25
4.2.1	Charakterisierung des APF/HPF-Systems an Neutrophilen.....	25
4.2.2	Stimulation mit PMA und Kontrollen mit verschiedenen Hemmstoffen.....	26
4.3	Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität in Neutrophilen	31
4.3.1	Effekt von (-)-Epicatechin auf unstimulierte Neutrophile.....	31
4.3.2	Effekt von (-)-Epicatechin auf mit PMA stimulierte Neutrophile	33
4.3.3	Effekt von (-)-Epicatechin auf mit H ₂ O ₂ stimulierte Neutrophile.....	35
4.3.3.1	Stimulation und Komplex II-Akkumulation durch H ₂ O ₂	35
4.3.3.2	Effekt von (-)-Epicatechin bei Komplex II-Akkumulation durch H ₂ O ₂	41
4.3.4	Grundlagen der Untersuchung Neutrophiler unter nitrosativem Stress	44
4.4	Grundlagen für die Untersuchung der MPO am Vollblut.....	48
5	Diskussion.....	53
5.1	Reinheit und Vitalität der Neutrophilen-Suspension	53
5.2	Messung der chlorierenden MPO-Aktivität in Neutrophilen	55
5.2.1	Grenzen und Alternativen des APF/HPF-Systems.....	58
5.3	Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität in Neutrophilen	61
5.3.1	Experimentelle Forcierung einer Komplex II-Akkumulation.....	63
5.3.2	Effekt von (-)-Epicatechin bei forcierter Komplex II-Akkumulation.....	65
5.4	Grundlagen für die Untersuchung der MPO am Vollblut.....	68
5.5	Ausblick.....	70
	Zusammenfassung	VII
	Literaturverzeichnis.....	XI
	Selbständigkeitserklärung.....	XX
	Wissenschaftlicher Werdegang.....	XXI
	Publikationen und Vorträge	XXII
	Danksagung.....	XXIII

BIBLIOGRAFISCHE BESCHREIBUNG

Johannes Remmler

*Detektion und Modulation der chlorierenden Aktivität der Myeloperoxidase
in neutrophilen Granulozyten*

Universität Leipzig, Dissertation

93 S.¹, 124 Lit.², 31 Abb., 9 Tab.

Referat:

In dieser Arbeit wurde die Myeloperoxidase in neutrophilen Granulozyten untersucht. Bei Entzündungsprozessen wandern Neutrophile ins Gewebe ein haben großen Einfluss auf den Entzündungsverlauf. Dabei spielt das Enzym Myeloperoxidase (MPO) eine wichtige Rolle. Die MPO produziert starke Oxidationsmittel, insbesondere auch Hypochlorsäure (HOCl), was als chlorierende Aktivität bezeichnet wird. HOCl trägt zur Pathogenabwehr bei und ist zudem an der Regulation und auch der Terminierung des Entzündungsprozesses beteiligt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neutrophile Granulozyten aus dem Vollblut gesunder Spender isoliert. Die chlorierende MPO-Aktivität konnte mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Aminophenylfluorescein (APF) durchflusszytometrisch gemessen werden. Diese Methode wurde systematisch optimiert. Außerdem wurde erstmals die chlorierende Aktivität der MPO am Zellmodell (*ex vivo*) moduliert. Unter verschiedenen Bedingungen wurde dabei der Einfluss des Flavonoids (–)-Epicatechin auf die chlorierende MPO-Aktivität untersucht.

Man nimmt an, dass unter Entzündungsbedingungen Komplex II akkumuliert, ein Intermediat der MPO, das keine chlorierende Aktivität aufweist. Einige Substanzen, wie (–)-Epicatechin, sind in der Lage, *in vitro* die chlorierende MPO-Aktivität zu steigern, indem sie Komplex II wieder in aktive Formen überführen. Dieser Sachverhalt wurde in dieser Arbeit erstmals am Zellmodell (*ex vivo*) untersucht. Unter Bedingungen, die zur Akkumulation von Komplex II führen, zeigte sich eine Steigerung der chlorierenden MPO-Aktivität durch (–)-Epicatechin.

Darüber hinaus konnten Grundlagen für eine Untersuchung der MPO am Vollblut gelegt werden: mithilfe von APF gelang eine durchflusszytometrische Differenzierung der Zellfraktionen anhand ihrer chlorierenden MPO-Aktivität und Granularität.

¹ Seitenzahl insgesamt

² Zahl der im Literaturverzeichnis ausgewiesenen Literaturangaben

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4-ABAH	<i>4-aminobenzoic acid hydrazide</i>
ANCA	Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC-AM	Acetoxymethylester-Form von Aminophenoxycalcein
APF	Aminophenylfluorescein
CCR3	Chemokinrezeptor 3 der CC-Familie
CD16	<i>Cluster of differentiation 16</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Diphenyliodoniumchlorid
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
E. coli	Escherichia coli
EPO	Eosinophile Peroxidase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HPF	Hydroxyphenylfluorescein
HySOx	N,N,N',N'-Tetramethyl-spiro(benzo(c)thiophene-1(3H),9'-(9H)xanthene)-3',6'-diamin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyaniniodid
L-NMMA	L-N ^G -Monomethylarginin
LPO	Lactoperoxidase
LPS	Lipopolysaccharid
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MPO	Myeloperoxidase
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SIN-1	3-Morpholinosydnoniminhydrochlorid

Suppl	<i>Supplement</i>
spp.	<i>Species pluralis</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
TPO	Thyreoperoxidase
Triazol	3-Amino-1,2,4-triazol

1 EINFÜHRUNG

1.1 Neutrophile Granulozyten und ihre Rolle bei Entzündungsprozessen

Neutrophile Granulozyten sind die am häufigsten vorkommenden Leukozyten im humanen Blut [1]. Sie werden im Knochenmark gebildet [2]. Charakteristisch ist ihr vielgestaltiger Zellkern [3]. Das Zytoplasma der Neutrophilen enthält 3 Arten von Granula: die primären (oder azurophilen), die sekundären (oder spezifischen, die weder eosino- noch basophil sind, und so den Namen der Neutrophilen bedingen) und die tertiären. Die primären (oder azurophilen) Granula enthalten unter anderem das Enzym MPO [4], den Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit. Die Neutrophilen sind Teil der angeborenen Immunabwehr und die erste zelluläre Abwehrinstanz gegen Bakterien und Pilze [1, 5]. Neben ihrer bekannten Funktion des Phagozytierens und Abtötens von mikrobiellen Erregern haben sie entscheidenden Anteil an der Entwicklung von Entzündungsprozessen und der Aktivierung der adaptiven Immunantwort [1, 5]. Die Neutrophilen können dabei auch zur Gewebsschädigung beitragen, bspw. bei überschießenden oder autoimmunen Entzündungsreaktionen [5, 6].

Eine Entzündung ist eine unspezifische, biochemische und zelluläre Antwort des Organismus auf eine Zellschädigung. Diese Schädigung kann durch Erreger, aber auch chemisch, physikalisch, durch immunologische Defekte etc. bedingt sein [7]. Bei der Entzündungsreaktion kommt den Neutrophilen eine entscheidende Rolle zu. Aus dem Blut rekrutiert durch diverse Botenstoffe [8, 9], sind sie die ersten Leukozyten am Entzündungsort [7, 10]. Aufgrund der Bedingungen (vergrößerte Endotheldurchlässigkeit sowie verringerte Geschwindigkeit des Blutflusses [7]) und mithilfe komplexer Mechanismen (Selektin-vermitteltes "Roller", schließlich Diapedese) gelangen die Neutrophilen ins Gewebe [2, 11, 12]. Hier akkumulieren sie und attackieren Pathogene [7]. Erreger werden phagozytiert [13] und im Phagosom mit verschiedenen Mechanismen zerstört. Hervorzuheben ist dabei die massive, NADPH-Oxidase-abhängige Produktion von ROS (*respiratory burst*) [8]. Auch die MPO, die in hoher Konzentration ins Phagosom gelangt, produziert mit HOCl ein starkes Oxidans [14]. Neben der MPO werden zudem andere schädigende Inhalte der Granula ins Phagosom entleert, bspw. Proteasen [15]. Darüber hinaus wird diskutiert, dass die Neutrophilen auch extrazellulär Erreger attackieren können, indem sie *neutrophil extracellular traps* (NETs) bilden [1, 4].

Neben der Bekämpfung von Pathogenen kommen den Neutrophilen im Entzündungsgebiet auch regulatorische Funktionen zu. Sie haben großen Einfluss auf den Fortgang der Entzündungsreaktion [1, 5]. Der Abtransport ("*clearance*") der Neutrophilen aus dem Entzündungsgebiet erfolgt vorrangig durch Makrophagen, die sich aus den, kurze Zeit nach den Neutrophilen ins Entzündungsgebiet eingewanderten, Monozyten differenzieren [16, 17]. Apoptotische Neutrophile, die rasch phagozytiert werden, veranlassen dabei die Makrophagen zur Freisetzung von Stoffen, die antiinflammatorisch und gewebstregenerierend wirken (bspw. IL-10, TGF- β) [16, 18]. Bei Nekrose der Neutrophilen (die auch sekundär nach Apoptose eintreten kann, wenn die Phagozytose nicht rechtzeitig erfolgt) werden dagegen Substanzen mit proinflammatorischer Wirkung freigesetzt. Dadurch wird in den Makrophagen bspw. NF- κ B aktiviert, was zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 führt [16]. In Abbildung 1-1 ist dieses Wechselspiel zwischen Neutrophilen und Makrophagen schematisch dargestellt.

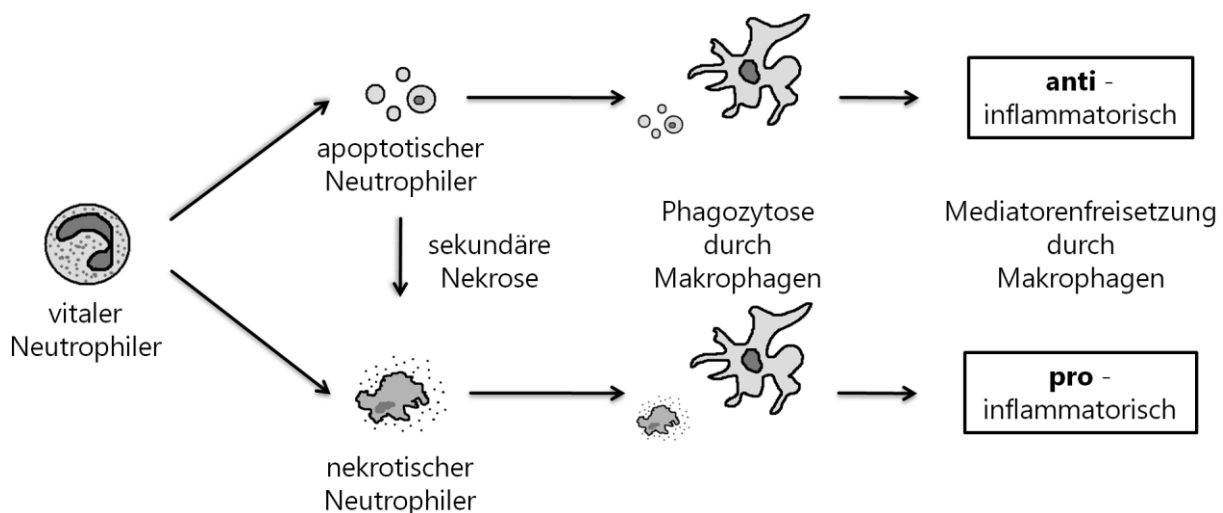


Abbildung 1-1: Interaktion von Neutrophilen und Makrophagen im Entzündungsgebiet. Die Beseitigung der Neutrophilen aus dem Entzündungsgebiet erfolgt vorrangig durch Makrophagen. Bei Apoptose der Neutrophilen und nachfolgend rascher Phagozytose durch Makrophagen schütten letztere antiinflammatorische Substanzen aus (z.B. IL-10, TGF- β). Nekrotische Neutrophile veranlassen den Makrophagen dagegen zur Freisetzung proinflammatorischer Substanzen (z.B. IL-1).

Dementsprechend ist für eine effiziente Entzündungsterminierung die Apoptose der Neutrophilen und nachfolgend die rasche Phagozytose durch Makrophagen entscheidend. Das Ausbleiben dieser Prozesse führt dagegen zur Verstärkung und Chronifizierung der Entzündungsreaktion [17]. Welche genauen Mechanismen und Signale der Neutrophilen Einfluss auf die Apoptose, auf die Makrophagen und damit auf den Entzündungsverlauf nehmen, ist Gegenstand aktueller Forschung und nur teilweise verstanden [16, 19]. Für diese Arbeit besonders interessant ist, dass dabei auch Produkte der MPO eine Rolle spielen, worauf in Abschnitt 1.2.3 näher eingegangen wird.

1.2 Myeloperoxidase (MPO)

Die MPO gehört zur Gruppe der humanen Häm-Peroxidasen. Zu dieser Gruppe zählen daneben noch die EPO und die LPO, die genetisch eng mit der MPO verwandt sind, sowie die TPO, die sich genetisch stärker unterscheidet [20, 21]. Alle 4 Enzyme haben gemeinsam, dass sie als prosthetische Gruppe eine Häm-Gruppe (Eisen-Protoporphyrin IX) enthalten, die kovalent an das Apoenzym gebunden ist. Unter Reduktion von H_2O_2 zu Wasser bilden sie durch Veränderung des Oxidationszustands des zentralen Eisenatoms hochreaktive Intermediate, die in der Lage sind, eine Vielzahl von Substanzen zu oxidieren. Klassischerweise werden MPO, EPO und LPO der angeborenen Immunabwehr zugeordnet, da sie auf diesem Weg antimikrobiell wirksame Oxidantien bilden [20]. Die in der Schilddrüse vorkommende TPO ist in die Produktion der Thyroidhormone involviert [22]. Die EPO kommt in eosinophilen Granulozyten vor [23], die LPO in Sekreten aus Speichel-, Milch- und anderen Schleimhautdrüsen [24]. Die MPO findet sich hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten, wo sie in großen Mengen in den primären (azurophilen) Granula gespeichert ist [25]. In den Neutrophilen ist sie das am häufigsten vorkommende Protein [26]. Daneben kommt die MPO auch, in geringerer Menge, in Monozyten vor, wobei sie nach der Differenzierung zu Makrophagen in der Regel nicht mehr zu finden ist. Dennoch gibt es auch einige Makrophagenpopulationen, die MPO enthalten [26, 27].

1.2.1 Aufbau und Eigenschaften der MPO

Die MPO ist ein homodimeres Protein. Jede der beiden identischen Untereinheiten ist aus 2 Polypeptidketten aufgebaut (bestehend aus 108 bzw. 466 Aminosäuren) und besitzt ein aktives Zentrum mit kovalent gebundener Häm-Gruppe (Eisen-Protoporphyrin IX) [24, 28]. Die beiden Untereinheiten sind durch eine einzelne Disulfidbrücke verbunden [21, 28]. Die Angaben zur Molekülmasse variieren (aufgrund der Glycosylierung) zwischen 140 kDa und 146 kDa [21, 28]. Die MPO unterscheidet sich von den 3 anderen humanen Häm-Peroxidasen nicht nur dadurch, dass sie als einzige ein Dimer ist (EPO, LPO und TPO sind Monomere) [24], sondern vor allem in der Bindung zwischen Häm-Gruppe und Apoenzym. Bei allen 4 Enzymen ist die Häm-Gruppe durch 2 Esterbindungen mit dem Apoenzym verbunden, bei der MPO besteht aber zusätzlich eine Sulfoniumionen-Verbindung [24, 28]. Die 3-fache Bindung (Esterbindung mit Asp94 und Glu242, Sulfoniumionen-Verbindung mit Met243) führt dazu, dass die Häm-Gruppe bei der MPO, im Unterschied zu EPO, LPO und TPO, gebogen konfiguriert ist [24, 28]. Diese Biegung der Häm-Gruppe ist in der Detailvergrößerung des

aktiven Zentrums in Abbildung 1-2 zu sehen. Abbildung 1-2 zeigt den dreidimensionalen Aufbau der MPO, der in [28] erstmals aufgeklärt und in [29] weiter erforscht wurde.

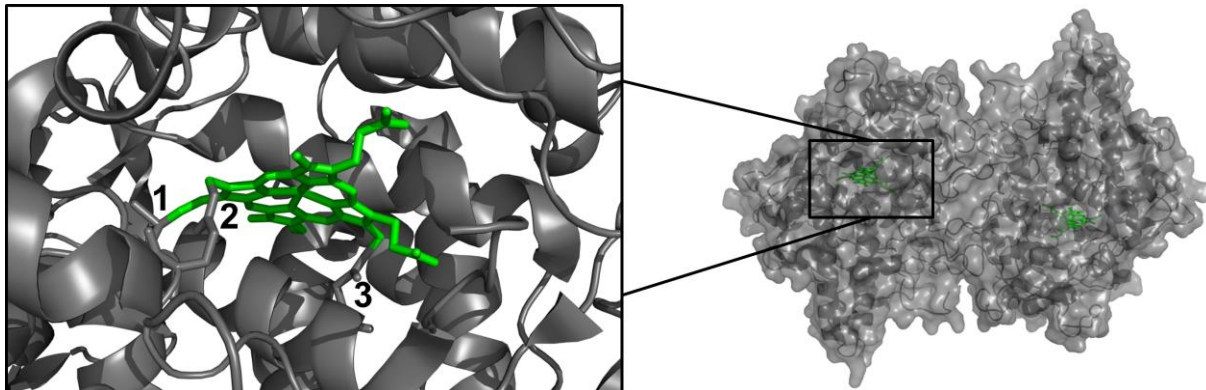


Abbildung 1-2: Struktur der MPO mit Detailvergrößerung eines aktiven Zentrums. Jede der beiden identischen Untereinheiten, die über eine einzelne Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, besitzt ein aktives Zentrum mit 3-fach kovalent gebundener Häm-Gruppe. Die dreifache Bindung und die daraus resultierende Biegung der Häm-Gruppe sind unter den humanen Häm-Peroxidasen einzigartig für die MPO. Die Häm-Gruppen sind grün dargestellt, in der Detailvergrößerung sind die kovalenten Bindungen zwischen Apo-Enzym und Häm-Gruppe bezeichnet (1 - Esterbindung mit Glu242; 2 - Sulfoniumionen-Verbindung mit Met243; 3 - Esterbindung mit Asp94). Die Abbildung basiert auf dem online verfügbaren, dreidimensionalen Modell der MPO, das in [29] vorgestellt wurde (Proteindatenbank-Kennung: 3f9p (<http://www.rcsb.org/pdb>)), und wurde mit der Software PyMOL 0.99 erstellt.

Die Biegung der Häm-Gruppe wird als Grund für die außergewöhnlich hohen Reduktionspotentiale der MPO diskutiert [26], die es der MPO ermöglichen, als einziger Vertreter der Häm-Peroxidasen Chlorid in relevanten Mengen zu oxidieren [20]. Diese Fähigkeit geht verloren, wenn das Met243 gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht und damit die Sulfoniumionen-Verbindung verhindert wird [30]. Die Oxidation von Chlorid zu HOCl, die auch als chlorierende Aktivität der MPO bezeichnet wird, ist der zentrale Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit.

1.2.2 Enzymatische Aktivität der MPO

Die native MPO (mit dreiwertigem Häm-Eisen: PorFe^{3+}) wird, unter Reduktion von H_2O_2 zu Wasser, in einer zweielektronischen Reaktion zu Komplex I ($^+\cdot\text{PorFe}^{4+}=\text{O}$) oxidiert. Komplex I ist ein starkes Oxidationsmittel und kann mit diversen Substraten reagieren. Dabei gibt es 2 grundsätzliche Möglichkeiten. Nimmt Komplex I in der Reaktion mit einem Substrat 2 Elektronen auf, so entsteht direkt wieder native MPO. Dies wird als Halogenierungszyklus bezeichnet. Nimmt Komplex I dagegen nur 1 Elektron auf, entsteht Komplex II ($\text{PorFe}^{4+}\text{-OH}$). Es bedarf einer weiteren Reaktion zur Reduktion von Komplex II zurück zum nativen Enzym. Dies wird als Peroxidasezyklus bezeichnet [26]. Zur Veranschaulichung zeigt Abbildung 1-3 schematisch die wichtigsten Redoxintermediate und Reaktionen der MPO.

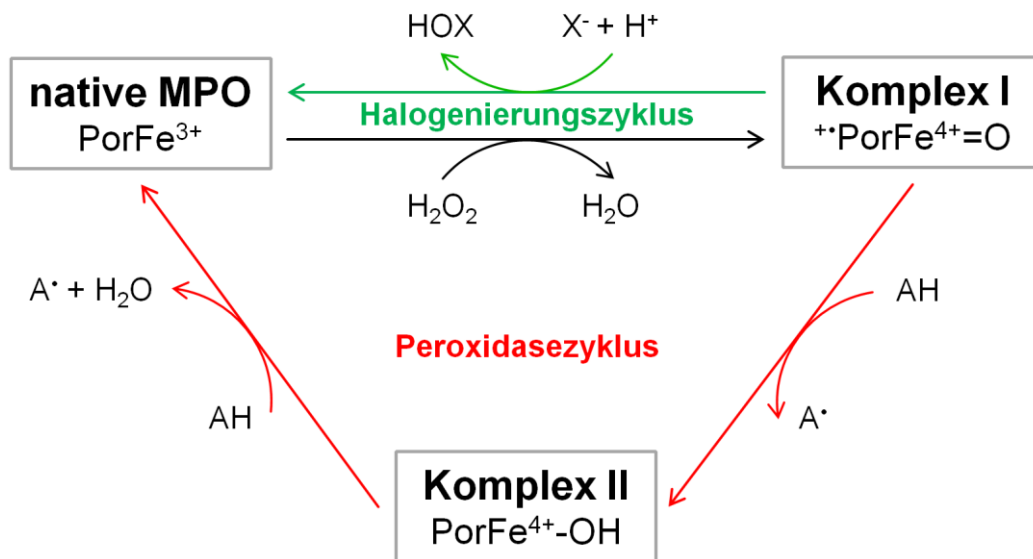


Abbildung 1-3: Die wichtigsten Reaktionszyklen und Redoxintermediate der MPO. Durch Reaktion mit H_2O_2 wird die native MPO zweielektronisch zu Komplex I oxidiert. Nun können Substrate entweder zweielektronisch (Halogenierungszyklus), oder, über die Bildung des Intermediates Komplex II, einelektronisch oxidiert werden (Peroxidasezyklus). PorFe steht für die Häm-Gruppe (Protoporphyrin IX und Eisen), wobei Ladungen und gebundenen Atome (O und H für Sauerstoff und Wasserstoff) angegeben sind. X steht für Substrate im Halogenierungszyklus, A für Substrate im Peroxidasezyklus.

1.2.2.1 Halogenierungszyklus: chlorierende Aktivität und weitere Substrate

Im Halogenierungszyklus reagiert Komplex I zweielektronisch mit einem Substrat, oxidiert es und wird dabei selbst zur nativen MPO reduziert [26]. Das klassische Substrat für diesen Zyklus ist Chlorid, das zu HOCl oxidiert wird. Dieser Vorgang wird auch als die chlorierende Aktivität der MPO bezeichnet [26, 31]. Die MPO ist die einzige Häm-Peroxidase, die Chlorid in relevanten Mengen oxidieren kann [20], bedingt durch das außergewöhnlich hohe Potential des Redoxpaars Komplex I/native MPO (Standardpotential 1,16 V bei pH 7,0 und 25 °C) [32]. Neben Chlorid können im Halogenierungszyklus noch weitere Substrate oxidiert werden. Das sind die Halogenide Bromid und Iodid sowie das Pseudohalogenid Thiocyanat (SCN^-) [33]. *In vivo* spielen hauptsächlich Chlorid und Thiocyanat (SCN^-) eine Rolle [34]. Thiocyanat (SCN^-) reagiert sehr schnell mit Komplex I ($k = (9,6 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 7,0 und 15 °C), Chlorid etwa 400 mal langsamer ($k = (2,5 \pm 0,3) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 7,0 und 15 °C) [33]. Chlorid kommt dafür *in vivo* in wesentlich höheren Konzentrationen vor (Plasmakonzentration 100 bis 140 mM [34]) als Thiocyanat (SCN^-) (Plasmakonzentration im Mittel 40 μM bei Nichtrauchern und 131 μM bei Rauchern [35]). Thiocyanat (SCN^-) kann *in vivo* eine mit Chlorid vergleichbar große Rolle als Substrat für den Halogenierungszyklus spielen [34]. Bei der Oxidation von Thiocyanat (SCN^-) entsteht dabei unter physiologischen Bedingungen vorrangig Hypothiocyanit ($^-\text{OSCN}$) [26, 33].

1.2.2.2 Peroxidasezyklus und Komplex II-Akkumulation

Im Peroxidasezyklus werden Substrate einelektronisch oxidiert, entweder in Reaktion mit Komplex I oder in Reaktion mit Komplex II. Dabei wird Komplex I zu Komplex II und Komplex II zum nativen Enzym reduziert [26]. Die Standardpotentiale der Redoxpaare betragen 1,35 V für Komplex I/Komplex II und 0,97 V für Komplex II/natives Enzym (jeweils bei pH 7,0 und 25 °C) [36]. Jedes infrage kommende Substrat reagiert aufgrund des höheren Reduktionspotentials schneller mit Komplex I als mit Komplex II. Dadurch kommt es bei Ablauf des Peroxidasezyklus stets zu einer gewissen Akkumulation von Komplex II. Da Komplex II nicht in der Lage ist, Chlorid zu oxidieren [33], verringert ein aktiver Peroxidasezyklus die chlorierende MPO-Aktivität. Eine große Zahl von Substraten kann im Peroxidasezyklus oxidiert werden. Tabelle 1-1 zeigt einige davon, mit Angabe der Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktionen mit Komplex I und Komplex II.

Tabelle 1-1: Ausgewählte Substrate des Peroxidasezyklus. Für jedes der Substrate ist die Geschwindigkeitskonstante für die Reaktion mit Komplex I (k_I) und Komplex II (k_{II}) angegeben. Zudem wurde der Quotient aus beiden Werten (k_I/k_{II}) errechnet. Dieser ist ein Maß dafür, wie stark das jeweilige Substrat eine Komplex II-Akkumulation bewirkt. Wenn nicht anders angegeben, handelt es sich um Geschwindigkeitskonstanten, die bei pH 7,0 und 25 °C ermittelt wurden.

Substrat	k_I (Geschwindigkeitskonstante der Reaktion mit Komplex I)	k_{II} (Geschwindigkeitskonstante der Reaktion mit Komplex II)	k_I/k_{II} (gerundet)
Tryptophan	$(4,5 \pm 0,1) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [37]	$6,9 \pm 1,3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [37]	65 000
H ₂ O ₂ ^a	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [38] ^b	$78 \pm 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [39] ^c	560
Serotonin	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [40]	$(1,4 \pm 0,1) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [40]	12
(-)-Epicatechin	$1,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [41]	$4,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [41]	4,2

a) Zum Vergleich: die Reaktion von H₂O₂ mit der nativen MPO (siehe Abbildung 1-3) läuft wesentlich schneller ab ($k = (1,7 \pm 0,1) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 7,0 und 15 °C [38]). Als Substrat des Peroxidasezyklus wird H₂O₂ im Überschuss relevant [42].

b) Diese Geschwindigkeitskonstante wurde bei 15°C bestimmt [38].

c) Bei dieser Reaktion wird Komplex II nicht zur nativen MPO reduziert (sondern zu Komplex III) [39].

Einige Substrate im Peroxidasezyklus reagieren um Größenordnungen schneller mit Komplex I als mit Komplex II. Komplex II wird dadurch viel schneller gebildet, als er abgebaut wird, und akkumuliert. Tryptophan ($k_I/k_{II} \approx 65\,000$, siehe Tabelle 1-1) in hoher Konzentration würde bspw. bewirken, dass die MPO beinahe vollständig als Komplex II vorläge und kaum noch chlorierende Aktivität besäße. Eine solche Komplex II-Akkumulation kann reduziert werden, wenn Substrate mit vergleichsweise hoher Affinität zu Komplex II hinzukommen. (-)-Epicatechin bspw. ($k_I/k_{II} \approx 4,2$, siehe Tabelle 1-1) reagiert schnell mit

Komplex II und würde wieder native MPO für den Halogenierungszyklus bereitstellen. Die chlorierende MPO-Aktivität würde sprunghaft steigen.

In vivo führen theoretisch 3 Mechanismen zu einer Komplex II-Akkumulation:

- 1.) Ein Übergewicht von Substanzen mit hohem k_I/k_{II} -Quotienten. Neben den in Tabelle 1-1 aufgeführten Tryptophan und H_2O_2 ist hier bspw. auch Homovanillinsäure zu nennen [43].
- 2.) Substanzen, die auf anderem Weg eine Komplex II-Bildung bewirken (d. h. nicht in Reaktion mit Komplex I). Dazu zählen Thiocyanat [44] und Peroxynitrit ($ONOO^-$). Letzteres kann native MPO direkt zu Komplex II oxidieren [45, 46], und zwar sehr effektiv ($k = (6,8 \pm 0,1) \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ bei pH 7,0 und 25 °C [46]). Bei Rauchern (hohe Thiocyanat-Spiegel [35]) und unter Entzündungsbedingungen (viel nitrosativer Stress [7]) ist daher eine Komplex II-Akkumulation besonders wahrscheinlich.
- 3.) Ein Mangel an Substanzen mit niedrigem k_I/k_{II} -Quotienten. Neben (-)-Epicatechin (siehe Tabelle 1-1) gibt es noch weitere, *in vivo* relevante Substanzen, die eine Komplex II-Akkumulation überwinden können. Dazu gehören Vitamin C [47], Serotonin [48] und Tyrosin [49]. Ein Mangel an diesen Substanzen trägt entsprechend zu einer Komplex II-Akkumulation bei.

Es kann vermutet werden, dass die MPO *in vivo* häufig zu einem erheblichen Teil als Komplex II vorliegt. Davon kann, aufgrund der Wirkung von Peroxynitrit ($ONOO^-$) (s. o.), besonders unter Entzündungsbedingungen ausgegangen werden. Ob eine solche Komplex II-Akkumulation tatsächlich mithilfe von (-)-Epicatechin überwunden und damit die chlorierende Aktivität gesteigert werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals am Zellmodell untersucht.

1.2.3 Rolle der MPO bei Entzündungsprozessen

An dieser Stelle soll vor allem auf die Wirkungen von HOCl im Entzündungsgebiet eingegangen werden, da HOCl, als Produkt der chlorierenden MPO-Aktivität, im Zentrum des Interesses dieser Arbeit steht. Daneben sei kurz erwähnt, dass auch andere Produkte der MPO unter Entzündungsbedingungen eine Rolle spielen (besonders Hypothiocyansäure (HOSCN) bzw. Hypothiocyanit (^-OSCN) [50]). Kurz genannt sei auch die Rolle der MPO als Antigen bei verschiedenen Vaskulitiden, die unter Medizinern allgemein bekannt sein dürfte: bei

Betroffenen lassen sich oft Antikörper gegen Antigene in Neutrophilen (ANCA) nachweisen, die unter anderem gegen die MPO gerichtet sein können [51].

Die klassische Bedeutung von HOCl bei Entzündungsprozessen ist das Abtöten von Pathogenen. Vorrangig geschieht dies im Phagosom, innerhalb der Neutrophilen. Die MPO wird durch Degranulation aus den primären (bzw. azurophilen) Granula ins Phagosom ausgeschüttet, wo sie dann in hoher Konzentration vorliegt. Aufgrund des *respiratory burst* liegt im Phagosom zugleich auch viel H₂O₂ vor und die MPO produziert die hochreaktive HOCl [14, 25, 52]. Essentiell scheint HOCl für die Pathogenabwehr jedoch nicht zu sein, denn Veröffentlichungen über Personen mit totaler MPO-Defizienz berichten über keine [53] bzw. zumindest nicht massive [54] höhere Anfälligkeit für Infektionen. Schwere, lebensbedrohliche Infektionen treten bei den MPO-Defizienten aber häufiger auf [54]. Auch für die Abwehr viraler Erreger ist HOCl von Bedeutung [55]. MPO-defiziente Mäuse zeigen eine höhere Anfälligkeit für *Candida albicans* [56].

Neben der Bedeutung für die direkte Bekämpfung von Pathogenen nimmt HOCl großen Einfluss auf den weiteren Verlauf einer Entzündungsreaktion. Hier ist HOCl als "zweischneidiges Schwert" zu sehen, das sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte vermittelt. Auf der einen Seite verursacht HOCl Gewebeschäden. Ein Teil der MPO und auch der HOCl gelangt nach extrazellulär und wirkt dort toxisch [25]. HOCl gilt zudem als pathogener Faktor bei der Entstehung von Krankheiten, insbesondere bei der Entstehung von Atherosklerose [57]. Als wichtiger Mechanismus dabei gilt die Oxidation von Lipoproteinen [58, 59]. Kardiovaskuläre Erkrankungen treten bei MPO-defizienten Personen seltener auf [54], bei Inhibition der MPO werden an einem Atherosklerose-Mausmodell weniger Plaques und eine bessere Endothelfunktion beobachtet [60]. Auch bei der rheumatoiden Arthritis spielt HOCl eine Rolle, in der Synovialflüssigkeit Betroffener fanden sich durch HOCl oxidierte Bestandteile [61]. Es wird derzeit auch der Ansatz verfolgt, MPO-Inhibitoren zum therapeutischen Einsatz zu entwickeln [14, 60, 62].

Auf der anderen Seite trägt HOCl zur Entzündungsterminierung bei. In der Reaktion mit endogenen Aminen entstehen Chloramine wie Monochloramin oder Taurinchloramin, die als Signalmoleküle wirken [26, 63, 64]. Nach dem in Abbildung 1-1 dargestellten Zusammenhang ist eine frühe Apoptose der Neutrophilen wichtig für die Entzündungsterminierung. Proapoptotische Wirkungen werden sowohl für Taurinchloramin [65, 66] als auch für Monochloramin [67] beschrieben. Die Neutrophilen MPO-defizienter Mäuse gehen verzögert in Apoptose, was durch die Zugabe von HOCl aufgehoben werden

kann [68]. Die Chloramine haben darüber hinaus noch weitere antiinflammatorische Effekte [69]. Taurinchloramin verringert bspw. die LPS-induzierte NO-Produktion [70]. Monochloramin verringert durch Hemmung der Proteinkinase C die Stärke des *respiratory burst* in Neutrophilen [71] und trägt zur Inhibition des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B bei [72, 73]. Abgesehen von der Chloraminbildung kann HOCl zudem die T-Zell-Aktivierung in Entzündungsherden vermindern, indem dendritische Zellen inhibiert werden [74].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die chlorierende Aktivität der MPO mit ihrem Produkt HOCl neben der unmittelbaren Pathogenabwehr auch für die Entzündungsregulation wichtig ist. HOCl kann zwar gewebsschädigend und pathogen wirken, spielt aber gleichzeitig bei der Terminierung von Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle.

1.3 Messung und Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität

1.3.1 Messung der chlorierenden MPO-Aktivität

Etablierte Substanzen zur Detektion der HOCl-Produktion sind Monochlordimedon und TNB. Monochlordimedon reagiert mit HOCl zu Dichlordimedon, wodurch sich die Absorptionseigenschaften stark ändern. So kann die HOCl-Produktion durch Absorptionsmessung nachgewiesen werden. Allerdings bewirkt Monochlordimedon selbst eine starke Komplex II-Akkumulation mit einhergehender Verminderung der chlorierenden MPO-Aktivität, was den Wert der Ergebnisse mindert [75, 76]. Mit TNB wird die HOCl-vermittelten Taurinchloraminbildung detektiert, Taurinchloramin oxidiert TNB zu farblosem DTNB. Diese Methode ist spezifischer und genauer als Monochlordimedon [75, 77], basiert jedoch auch auf Absorptionsmessungen und ist daher ebenso wenig zur durchflusszytometrischen Messung der HOCl-Produktion in Zellen geeignet wie Monochlordimedon. Die Fluoreszenzfarbstoffe APF und HPF, vorgestellt in [78], schaffen hier Abhilfe: durch Oxidation werden die zunächst nicht fluoreszierenden Substanzen fluoreszent und können so leicht detektiert werden. In gemeinsamer Betrachtung von APF- und HPF-Fluoreszenz ist eine spezifische Detektion von HOCl möglich [78]. Die Fluoreszenz kann sowohl *in vitro*, als auch *ex vivo* (in Zellen) gemessen werden. In Abschnitt 3.2.3.2 ist die Funktionsweise dieser Methode im Detail geschildert. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde diese neuere, noch wenig etablierte Methode näher evaluiert und auch, in Verbindung mit der Durchflusszytometrie, am Zellmodell eingesetzt. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden

in [79] publiziert. Dabei fanden auch einige Ergebnisse dieser Arbeit Eingang, in der der Einsatz von APF und HPF am Zellmodell weiter evaluiert wird.

1.3.2 Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität durch (-)-Epicatechin

Als nächster Schritt wurde nun mithilfe von APF die Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität durch (-)-Epicatechin sowohl *in vitro*, als auch am Zellmodell (*ex vivo*) untersucht. Die Experimente am Zellmodell sind Gegenstand dieser Arbeit. Die gemeinsamen Ergebnisse wurden in [42] publiziert.

1.3.2.1 Eigenschaften von (-)-Epicatechin

(-)-Epicatechin ist der potenteste Kandidat für die Überwindung einer Komplex II-Akkumulation der MPO. Es hat die höchste bekannte Reaktionsrate mit Komplex II ($k = 4,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 7,0 und 15 °C) [26, 41] und gleichzeitig einen außergewöhnlich niedrigen Quotienten der Reaktionsgeschwindigkeiten mit Komplex I und Komplex II ($k_{\text{I}}/k_{\text{II}} \approx 4,2$, siehe Tabelle 1-1). Wenn ein Großteil der MPO als Komplex II vorliegt, müsste (-)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität steigern.

(-)-Epicatechin gehört zu den Flavonoiden und wird mit der Nahrung aufgenommen [80]. Besonders in Wein- und Kakaoerzeugnissen sowie in verschiedenen Teearten, insbesondere in grünem Tee, finden sich (-)-Epicatechin und andere Flavonoide [81, 82]. Ein regelmäßiger Konsum von Flavonoiden verringert den Blutdruck und die kardiovaskuläre Mortalität [83]. (-)-Epicatechin ist in besonders hohem Maß verantwortlich für die positiven kardiovaskulären Effekte flavonoidreicher Nahrung [82]. Abbildung 1-4 zeigt die Strukturformel von (-)-Epicatechin.

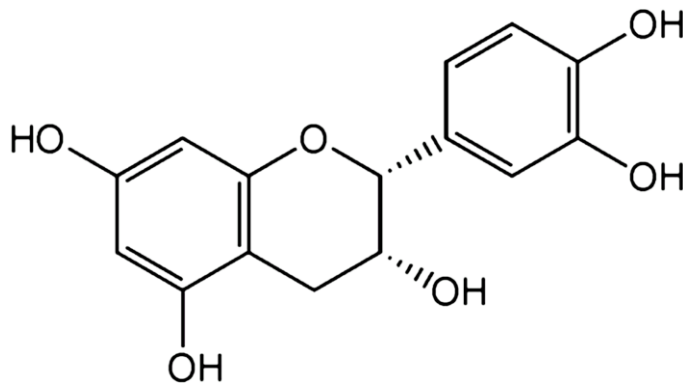


Abbildung 1-4: Strukturformel von (-)-Epicatechin. (-)-Epicatechin gehört zur Gruppe der Flavonoide, wird mit der Nahrung aufgenommen (insbesondere aus Wein- Kakao- und Teerzeugnissen) und fördert die Gefäßgesundheit. Es ist die Substanz mit der höchsten bekannten Reaktivität mit Komplex II der MPO.

1.3.2.2 Effekt von (-)-Epicatechin auf die chlorierende MPO-Aktivität *in vitro*

Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten beruhen auf Experimenten, die nicht vom Autor dieser Arbeit durchgeführt wurden. Die Experimente fanden zeitlich parallel zu jenen für diese Arbeit statt und die Ergebnisse wurden gemeinsam in [42] publiziert. Die Daten werden hier gezeigt, da sie für die Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit relevant sind.

Zunächst wurde die chlorierende MPO-Aktivität bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen gemessen. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 1-5, die experimentellen Bedingungen sind in der Bildunterschrift geschildert.

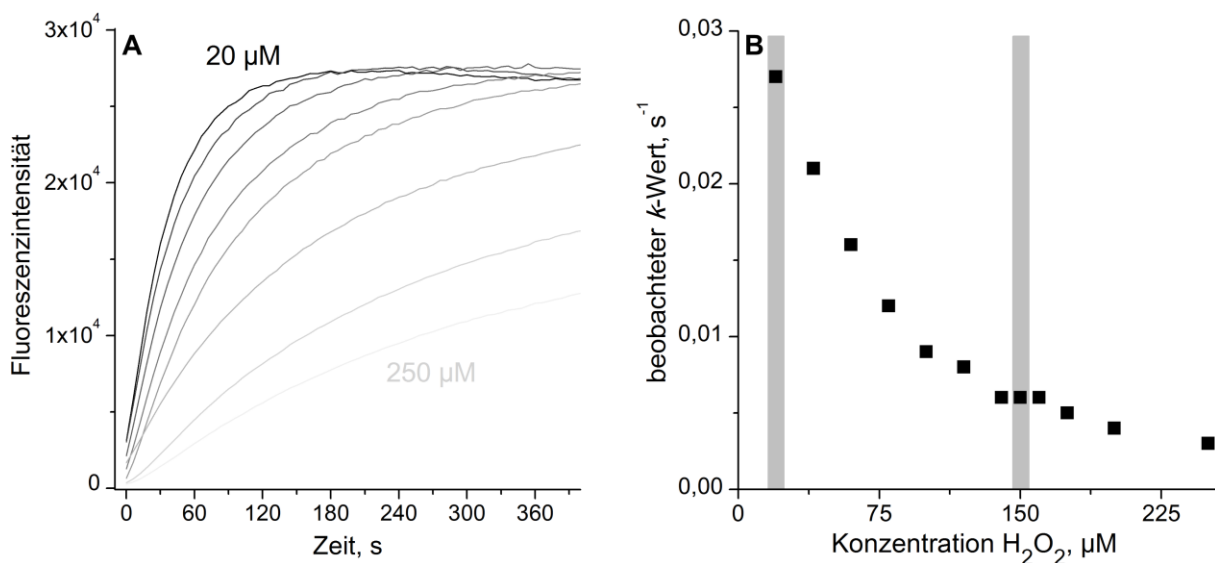


Abbildung 1-5: Chlorierende MPO-Aktivität bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen. APF-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit (A) und daraus errechnete "beobachtete k -Werte" (B). In PBS (10 mM, pH 7,4) wurde MPO (10 nM) mit Chlorid (140 mM) und APF (10 μM) bei 37 °C vorinkubiert. Zum Zeitpunkt $t = 0$ s wurde H_2O_2 in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und die Fluoreszenz bei $\lambda = 522$ nm (Anregung bei $\lambda = 488$ nm) detektiert. **A)** Gezeigt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit bei 20 μM (oberste, dunkelste Kurve), 40 μM , 60 μM , 80 μM , 100 μM , 150 μM , 200 μM und 250 μM (unterste, hellste Kurve) H_2O_2 . Es handelt sich um Mittelwertkurven von jeweils 3 Messungen **B)** Durch Ausgleichsrechnung (*fitting*) mithilfe der Software OriginPro 8 wurden aus den in A) gezeigten Kurven (Bereich 30 s bis 390 s) die Parameter der Exponentialfunktion $y = (A_1) - (A_2)e^{-kx}$ ermittelt. Der Wert k ("beobachteter k -Wert") dient als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit von HOCl mit APF und ist in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration dargestellt.

Mit Zugabe von H_2O_2 beginnt die MPO, HOCl zu bilden, welches stetig APF oxidiert (Abbildung 1-5 A). Da das APF irgendwann aufgebraucht ist, vermindert sich der Anstieg der Kurven mit der Zeit und die Kurven erreichen ein Maximum. Die HOCl-Produktion ist bei 20 μM H_2O_2 am schnellsten (Abbildung 1-5 A und B) und wird mit steigender H_2O_2 -Konzentration immer langsamer. Bei H_2O_2 -Konzentration von 200 μM und 250 μM wird nicht einmal das gesamte APF oxidiert (zu erkennen daran, dass das gemeinsame Maximum der anderen Konzentrationen nicht erreicht wird, Abbildung 1-5 A). Diese Daten bestätigen

die Annahme, dass H_2O_2 im Überschuss zu einem relevanten Substrat des Peroxidasezyklus wird, stark mit Komplex I reagiert und so eine Akkumulation des nicht chlorierend aktiven Komplex II bewirkt (siehe auch Tabelle 1-1).

Unter zwei ausgewählten Bedingungen ($20 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ und $150 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, grau markiert in Abbildung 1-5 B), wurde nun der Effekt von (-)-Epicatechin untersucht. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 1-6.

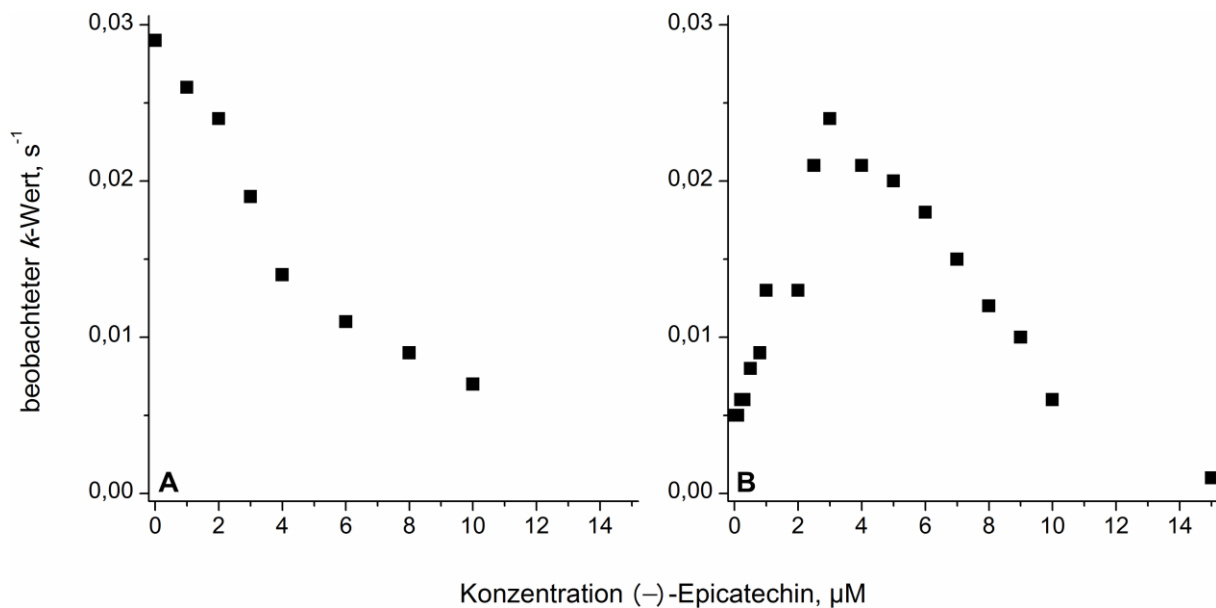


Abbildung 1-6: Effekt von (-)-Epicatechin bei $20 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ (A) und $150 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ (B). Die experimentellen Bedingungen und die Ermittlung der k -Werte sind unter Abbildung 1-5 beschrieben. (-)-Epicatechin wurde vor der Zugabe von H_2O_2 in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Dargestellt ist jeweils der "beobachtete k -Wert", als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit von HOCl mit APF, in Abhängigkeit von der (-)-Epicatechin-Konzentration.

In der Konzentration $20 \mu\text{M}$ bewirkt H_2O_2 keine Komplex II-Akkumulation. Die chlorierende MPO-Aktivität ist hoch (Abbildung 1-6 A, Wert bei $0 \mu\text{M}$ (-)-Epicatechin). Unter diesen Bedingungen verringert (-)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität desto stärker, je höher seine Konzentration ist. Bei $150 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ist die initiale chlorierende MPO-Aktivität dagegen gering (Abbildung 1-6 B, Wert bei $0 \mu\text{M}$ (-)-Epicatechin), da ein großer Teil der MPO als Komplex II vorliegt. In diesem Fall wird die chlorierende MPO-Aktivität durch (-)-Epicatechin in niedrigen Konzentrationen massiv gesteigert (maximal bei $3 \mu\text{M}$ (-)-Epicatechin). Bei höheren (-)-Epicatechin-Konzentrationen wird dieser Effekt geringer, bei $15 \mu\text{M}$ wird die chlorierende MPO-Aktivität gar weiter vermindert.

Zusammengefasst ermöglicht H_2O_2 im Überschuss die experimentelle Komplex II-Akkumulation. In niedrigen Konzentrationen steigert (-)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität, sofern eine Komplex II-Akkumulation vorliegt. In hohen Konzentrationen vermindert (-)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität.

2 AUFGABENSTELLUNG

Neutrophile Granulozyten spielen eine entscheidende Rolle in der angeborenen Immunantwort und tragen zudem zur Regulation von Entzündungsreaktionen bei. Das in den Neutrophilen in großer Menge vorliegende Enzym MPO ist für beide Aspekte wichtig. Das Produkt der chlorierenden MPO-Aktivität, HOCl, trägt zur Pathogenabwehr bei und hat zudem regulatorische Funktionen und entzündungsterminierende Wirkungen. *In vivo*, besonders unter Entzündungsbedingungen, ist davon auszugehen, dass ein großer Teil der MPO als Komplex II vorliegt, ein Intermediat ohne chlorierende Aktivität. Die chlorierende MPO-Aktivität ist dann stark vermindert.

Das Flavonoid (–)-Epicatechin reagiert außergewöhnlich schnell mit Komplex II und ist dadurch in der Lage, eine Komplex II-Akkumulation zu überwinden und die chlorierende MPO-Aktivität wieder zu steigern. Dieser Sachverhalt ist bislang aber nur durch *in vitro*-Untersuchungen bestätigt.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Detektion und Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität in neutrophilen Granulozyten (*ex vivo*).

Aufbauend auf einigen Voruntersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe soll eine bisher wenig etablierte Methode (APF/HPF) zur Detektion der chlorierenden MPO-Aktivität weiter am Zellmodell evaluiert werden. Untersuchungsobjekt sind aus dem Vollblut gesunder Spender isolierte neutrophile Granulozyten. Ziel ist es zunächst, die Detektionsmethode so weit zu optimieren, dass die chlorierende MPO-Aktivität in den Neutrophilen sicher durchflusszytometrisch quantifiziert werden kann.

Anschließend soll der Einfluss von (–)-Epicatechin auf die chlorierende MPO-Aktivität in Neutrophilen gemessen werden. Der Effekt von (–)-Epicatechin soll dabei unter verschiedenen Bedingungen evaluiert werden, unter anderem auch in der experimentell erzeugten Situation einer Komplex II-Akkumulation. Die These, dass Substanzen mit hoher Reaktivität gegenüber Komplex II der MPO die chlorierende MPO-Aktivität steigern können, wird hier, am Beispiel von (–)-Epicatechin, zum ersten Mal am Zellmodell überprüft. Die Forschung auf diesem Gebiet rückt damit näher an die *in vivo*-Situation heran.

Zudem soll überprüft werden, inwieweit sich das APF/HPF-System in Verbindung mit der Durchflusszytometrie dafür eignet, die chlorierende MPO-Aktivität direkt am Vollblut zu untersuchen.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

Für alle Experimente wurde am Tag des Experiments frisch abgenommenes, heparinisiertes Vollblut von Blutspendern verwendet, das vom Institut für Transfusionsmedizin (Institutsteil Mitte) des Universitätsklinikums Leipzig bereitgestellt wurde.

In Tabelle 3-1 sind die eingesetzten Chemikalien aufgeführt, in Tabelle 3-2 Geräte, die zusätzlich zur Laborgrundausrüstung (bspw. Pipetten, Waagen, Vortexer, Zentrifugen, Kühlschränke) verwendet wurden. Tabelle 3-3 zeigt die Software, die zur Steuerung der Geräte, zur Auswertung der Daten und zum Erstellen dieser Arbeit genutzt wurde.

Tabelle 3-1: Eingesetzte Chemikalien. Die rechte Spalte zeigt jeweils die Bezugsquelle.

(-)-Epicatechin \geq 90 % rein	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
3-Amino-1,2,4-triazol (Triazol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
3-Morpholinostyridoniminhydrochlorid (SIN-1)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
4-Aminobenzoessäurehydrazid (4-ABAH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aminophenylfluorescein (APF)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Anti-Human-CCR3 Antikörper, APC-konjugiert	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Anti-Human-CD16 Antikörper, FITC-konjugiert	eBioscience, Frankfurt, Deutschland
Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dextran aus <i>Leuconostoc spp.</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Diphenyliodoniumchlorid (DPI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Hank's balanced salt solution</i> (HBSS), modifiziert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
HBSS, modifiziert, ohne Calcium und Magnesium	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Heparin aus porciner intestinaler Mucosa	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hydroxyphenylfluorescein (HPF)	Biomol, Hamburg, Deutschland
<i>J-aggregate forming cationic dye</i> (JC-1)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
JC-1 Färbepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

L-N ^G -Monomethylarginin (L-NMMA) Acetat	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Lipopolysaccharid (LPS) aus <i>E. coli</i> 055:B5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchloridlösung (NaCl) 0,9 %	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Valinomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Zileuton	Tocris Bioscience, Ellisville, USA

Tabelle 3-2: Verwendete Geräte. In der rechten Spalte sind Typ und Hersteller aufgeführt.

Brutschrank	Cytoperm 2 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Durchflusszytometer	FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, USA)
Mikroskop	Kolleg SHB 45 (Eschenbach, Nürnberg, Deutschland)
pH-Meter	pH 213 (HANNA instruments, Kehl am Rhein, Deutschland)
Sterilwerkbank	HERAsafe (Heraeus, Hanau, Deutschland)
UV/Vis-Spektrometer	Cary 50 UV (Varian, Mulgrave, Australien)
Zählkammer	Neubauer improved (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland)

Tabelle 3-3: Genutzte Software. Die rechte Spalte zeigt jeweils den Hersteller.

CellQuest Pro 6.0	Becton Dickinson, San Jose, USA
Citavi 4.2	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
Flowing Software 2.5.0	Perttu Terho, Turku Centre for Biotechnology, Finnland
Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
OriginPro 8	OriginLab, Northampton, USA
PyMOL 0.99	Schrödinger, Portland, USA
UV Scan Application 3.00	Varian, Mulgrave, Australien
WinMDI 2.9	Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Isolation von neutrophilen Granulozyten

In 1 μ l Vollblut befinden sich im Normalfall etwa 5×10^6 Erythrozyten, 200 000 bis 400 000 Thrombozyten und zwischen 5000 und 10 000 Leukozyten. Unter letzteren stellen die neutrophilen Granulozyten mit 55 bis 65 % die größte Fraktion dar, eosinophile (2 bis 4 %) und basophile (0,5 bis 1 %) Granulozyten kommen seltener vor [84].

Pro Spender wurden ca. 18 ml heparinisieretes (10 U/ml), peripher-venöses Vollblut verwendet (2 Blutentnahmeröhrchen), das in der Regel 1 bis 2 Stunden vor Isolationsbeginn abgenommen wurde. Die komplette Isolationsprozedur mit Ausnahme der Zentrifugationen erfolgte stets an einer Sterilwerkbank und unter Einhaltung von dem Umgang mit humanem Blut angemessenen Vorsichtsmaßnahmen. Die verwendeten Puffer wurden mit destilliertem, gefiltertem Wasser hergestellt und der pH-Wert mit NaOH und HCl unter Verwendung eines elektronischen pH-Meters eingestellt. Das Protokoll für die Isolation war in der Arbeitsgruppe bereits etabliert und wurde in weiten Teilen übernommen.

Das Blut wurde zunächst mit Dextran (final 2 %) versetzt. Nach einer 60-minütigen Sedimentationsphase wurde der nunmehr erythrozytenarme Überstand abgenommen, mit Biocoll Trennlösung (1,077 g/ml) im Verhältnis 1 : 1 unterschichtet und einer Dichtegradientenzentrifugation unterworfen (20 min, 20 °C, 400 g). Nach Verwerfen der flüssigen Phase, einschließlich des Interphaserings aus Mono- und Lymphozyten, verblieb ein Zellpellet, bestehend aus Granulozyten und den restlichen Erythrozyten. Die Elimination Letzterer erfolgte nun mittels hypotoner Lyse. Dafür wurde das Pellet für 30 s in 1 ml destilliertem, gefiltertem Wasser resuspendiert und anschließend 5 ml calciumfreier HBSS-Puffer (pH 7,4) zugesetzt, um wieder annähernd isotone Bedingungen herzustellen. Darauf folgte eine Zentrifugation (10 min, 4 °C, 400 g) und der Überstand wurde verworfen. Die hypotone Lyse erfolgte in der Regel dreimal. Das nun weitgehend erythrozytenfreie Pellet wurde dann erneut in calciumfreiem HBSS-Puffer resuspendiert und mithilfe einer Zählkammer am Mikroskop die Zellzahl bestimmt. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 4 °C, 400 g) wurden die Granulozyten in einer Konzentration von 10^6 /ml in HBSS-Puffer mit Calcium (pH 7,4) aufgenommen. Die resultierende Zelllösung enthält Neutrophile sowie Eosinophile und Basophile in der natürlichen Häufigkeitsverteilung (s. o.). Somit kann von einem Neutrophilenanteil über 90 % ausgegangen werden.

3.2.2 Behandlung der neutrophilen Granulozyten

Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls an einer Sterilwerkbank. Wenn nicht anders erwähnt fanden Inkubationen im Brutschrank (dunkel, 37 °C, 95 % Luftfeuchte, 5 % CO₂-Gehalt der Luft) statt, um physiologischen Bedingungen möglichst nah zu sein.

3.2.2.1 Behandlung mit Stimulatoren, Hemmstoffen sowie (-)-Epicatechin

Zur Stimulation wurden Neutrophile mit H₂O₂, PMA oder LPS inkubiert. H₂O₂ ist essentielles Substrat der MPO. PMA induziert unter anderem die Bildung von Superoxidanionen (O₂^{•-}) durch die NADPH-Oxidase [85], welche wiederum, spontan oder durch die Superoxiddismutase, zu H₂O₂ umgesetzt werden [86]. LPS fungiert als Aktivator der Neutrophilen und induziert nitrosativen Stress (u. a. die Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻)) [87]. H₂O₂-Arbeitslösungen (10 mM) wurden ausgehend von einer 8,8 M Stammlösung durch Verdünnung mit destilliertem, gefiltertem Wasser hergestellt. Der H₂O₂-Gehalt wurde spektroskopisch kontrolliert [88], ausgehend vom Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [89]. PMA wurde in der Konzentration 5 mM in DMSO gelöst, LPS in destilliertem, gefiltertem Wasser (Stammlösung 5 mg/ml).

Zur Kontrolle wurden verschiedene Hemmstoffe eingesetzt, aufgelistet in Tabelle 3-4. So wurde die MPO gehemmt, um Effekte auf sie zurückführen zu können. Des Weiteren wurden Katalase (baut H₂O₂ ab), NADPH-Oxidase (liefert H₂O₂), 5-Lipoxygenase (Produkte können mit HOCl reagieren [90]) und iNOS (NO trägt zur Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻) bei [91], das den Farbstoff APF oxidieren kann [78]), zu Kontrollzwecken gehemmt.

Tabelle 3-4: Eingesetzte Hemmstoffe. In der Spalte c final ist angegeben, in welcher Endkonzentration der jeweilige Hemmstoff im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde.

Hemmstoff	gehemmtes Enzym	Literatur	c final
3-Amino-1,2,4-triazol (Triazol)	Katalase	[92]	10 mM
4-Aminobenzoessäurehydrazid (4-ABAH)	Myeloperoxidase (MPO)	[93]	500 µM
Diphenyliodoniumchlorid (DPI)	NADPH-Oxidase	[94]	50 µM
L-N ^G -Monomethylarginin (L-NMMA)	induzierbare NO-Synthase (iNOS)	[95]	200 µM
Zileuton	5-Lipoxygenase	[96]	20 µM

Triazol und L-NMMA wurden direkt in HBSS-Puffer, dem Medium der Zelllösung, gelöst, 4-ABAH, DPI und Zileuton in DMSO. Die Konzentrationen der Stammlösungen betragen 1,5 M (4-ABAH), 150 mM (DPI) beziehungsweise 100 mM (Zileuton).

Auch (-)-Epicatechin wurde in DMSO gelöst, in der Konzentration von 1 M. Alle Stammlösungen in DMSO wurden möglichst hochkonzentriert hergestellt. Ziel war dabei eine möglichst geringe finale DMSO-Konzentration, da DMSO zytotoxisch wirken kann [97]. Der Anteil von DMSO am Gesamtvolumen der Zelllösung lag stets unter 0,05 %.

3.2.2.2 Forcierung einer Komplex II-Akkumulation der MPO

Wie in Abschnitt 1.2.2.2 geschildert ist davon auszugehen, dass die MPO *in vivo* häufig zu großen Teilen als Komplex II vorliegt. Um im Experiment eine solche Akkumulation von Komplex II zu bewirken, wurde H_2O_2 in hohen Konzentrationen verwendet. Neben der bekannten (zweielektronischen) Reaktion mit nativer MPO unter Bildung von Komplex I reagiert H_2O_2 auch mit Komplex I, wenn auch deutlich langsamer. Bei dieser einelektronischen Reaktion entsteht Komplex II, der wiederum nur extrem langsam abgebaut wird [38, 39]. Bei einem Überschuss von H_2O_2 tritt diese Reaktionen in den Vordergrund und führt zu einer Akkumulation von Komplex II, der *in vitro* zu einer stark verringerten chlorierenden MPO-Aktivität führt [42].

Zudem wurde in dieser Arbeit mit der Akkumulation von Komplex II durch Peroxynitrit (ONOO^-) experimentiert. Peroxynitrit ist in der Lage, in direkter Reaktion mit nativer MPO eine schnelle Komplex II-Bildung zu bewirken [46]. Es entsteht zum einen bei der Stimulation der Neutrophilen mit LPS [87], zum anderen wurde die Substanz SIN-1 verwendet, die Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und NO freisetzt, woraus Peroxynitrit (ONOO^-) entsteht [91].

3.2.2.3 Vorbereitung der durchflusszytometrischen Messung

Nach Abschluss der letzten Inkubationsschritte wurden die zu untersuchenden Ansätze zentrifugiert (5 min, 4 °C, 400 g) und in 4 °C kaltem HBSS-Puffer mit Calcium (pH 7,4) resuspendiert (wiederum in der Konzentration $10^6/\text{ml}$). Dadurch wurde die Zelllösung von im Laufe des Experiments zupipettierten Chemikalien weitgehend befreit. Bis zum Abschluss der Messungen am Durchflusszytometer verblieben die Proben auf Eis.

3.2.3 Durchflusszytometrische Untersuchung und Fluoreszenzmessung

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von Zellen passieren diese einzeln einen Laserstrahl. Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht können detektiert und zur Charakterisierung von Zellgröße und Granularität genutzt werden. Darüber hinaus ist es möglich, nach Anregung (mit verschiedenen Lasern in verschiedenen Wellenlängen möglich) Fluoreszenz in mehreren, definierten Wellenlängenbereichen zu messen [98, 99]. Insbesondere die Fluoreszenzmessung spielt für diese Arbeit eine entscheidende Rolle. Die Fluoreszenz (im untersuchten Wellenlängenbereich) jeder Zelle wird einzeln detektiert und im Gerät in eine Spannung umgesetzt. Bei der Wandlung in digitale Daten wird jede Spannung einem sogenannten Kanal zugeordnet, wobei jeder Kanal einen bestimmten Spannungsbereich abdeckt [98]. Das verwendete Durchflusszytometer, ein Becton Dickinson FACS Calibur, besitzt einen Analog-Digital-Wandler mit 1024 Kanälen. Jeder Abschnitt auf der Fluoreszenzskala entspricht einem der Kanäle und die Messung liefert die Anzahl der Zellen pro Kanal [98]. Für die Fluoreszenzmessungen im Rahmen dieser Arbeit wurde eine logarithmische Skalierung gewählt, die der großen Bandbreite möglicher Messwerte am ehesten gerecht wird und als günstig für Fluoreszenzmessungen gilt [98]. Somit ergeben die Messungen eine Häufigkeitsverteilung der untersuchten Zellen entlang einer relativen, logarithmischen Fluoreszenzskala, wie in Abbildung 3-1 exemplarisch dargestellt. Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Messparameter (Verstärkung etc.) anhand einiger Vortests festgelegt und waren dann für alle gleichartigen Experimente identisch. Wenn nicht anders angegeben, wurden pro Messung 10 000 Zellen untersucht.

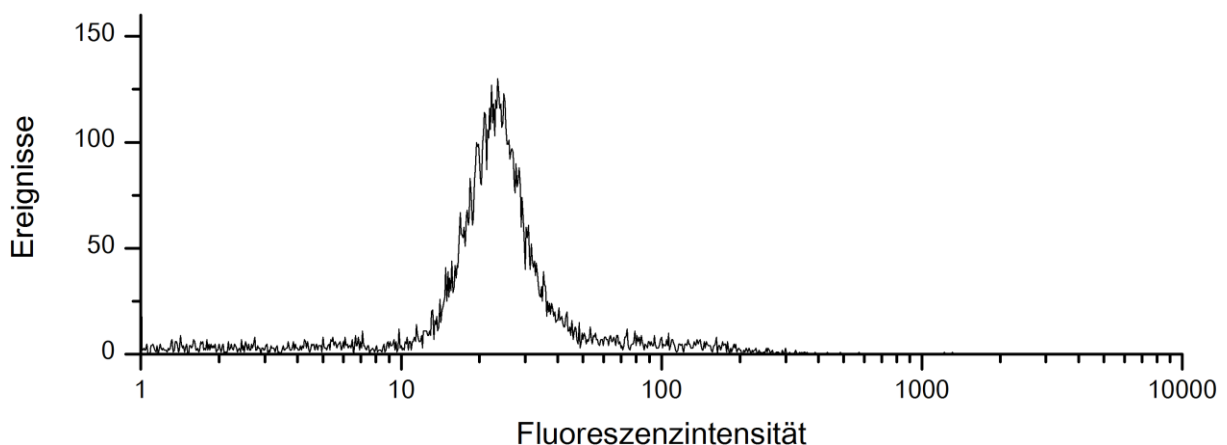


Abbildung 3-1: Exemplarisches Ergebnis einer durchflusszytometrischen Fluoreszenzmessung. Von 10 000 Zellen einer Probe unstimulierter Neutrophiler (APF-gefärbt) wurde die Fluoreszenzintensität im Bereich $\lambda = 530 \pm 15$ nm gemessen (Anregung $\lambda = 488$ nm). Dargestellt ist die Anzahl der Zellen pro Kanal (die Fluoreszenzskala ist logarithmisch auf 1024 Kanäle aufgeteilt).

3.2.3.1 Untersuchung von Reinheit und Vitalität der Neutrophilen-Suspension

Die Reinheit und Vitalität der Zelllösung wurde bei mehreren exemplarischen Isolationen durchflusszytometrisch geprüft.

Zur Prüfung der Reinheit wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Antikörper verwendet. Die Neutrophilen wurden mit FITC-konjugierten Anti-Human-CD16-Antikörpern angefärbt (Neutrophile exprimieren CD16 [100]). Zusätzlich wurden die übrigen Granulozyten mit APC-konjugierten Anti-Human-CCR3-Antikörpern gefärbt (CCR3 ist ein Chemokinrezeptor, der auf Eosinophilen und Basophilen vorkommt [101, 102]). 1 ml der Zelllösung wurden dazu mit je 2 μ l der beiden Färbelösungen für 30 min inkubiert (im Schüttler und bei 4 °C). Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung erfolgte die Anregung bei $\lambda = 488$ nm (FITC) bzw. $\lambda = 635$ nm (APC), die Emissionen wurden im Bereich $\lambda = 530 \pm 15$ nm (FITC) bzw. $\lambda = 661 \pm 8$ nm (APC) gemessen.

Zur Prüfung der Vitalität wurde der Farbstoff JC-1 verwendet. Dieser lagert sich, je nach Zustand der Mitochondrienmembran, entweder Aggregate bildend in den Mitochondrien oder frei verteilt im Zytoplasma ab. Die Emissionswellenlänge der Aggregate unterscheidet sich deutlich von der des frei verteilten Farbstoffs. So können Änderungen des Mitochondrienmembranpotentials, die bereits sehr früh im Apoptoseprozess auftreten, detektiert werden. Der frei verteilte Zustand spricht dabei für Apoptose, Aggregate für eine intakte Mitochondrienmembran [103, 104]. Für diese Experimente wurden 10^6 der isolierten Zellen in 500 μ l HBSS-Puffer mit Calcium sowie 500 μ l JC-1 Färbepuffer aufgenommen und 10 min mit final 0,77 μ M JC-1 im Brutschrank (37 °C) inkubiert. Zusätzlich mit Valinomycin (final 0,9 μ M) inkubierte Proben dienten als Positivkontrolle [104]. Die Fluoreszenz wurde im Durchflusszytometer bei $\lambda = 488$ nm angeregt und im Bereich $\lambda = 530 \pm 15$ nm (Aggregate) bzw. $\lambda = 585 \pm 21$ nm (frei verteilte Form) gemessen.

3.2.3.2 Messung der chlorierenden MPO-Aktivität in Neutrophilen

Die chlorierende Aktivität der MPO ist durch die Produktion von HOCl charakterisiert. Mit den von Setsukinai et al. entwickelten Fluoresceinderivaten APF und HPF ist es möglich, HOCl spezifisch und dosisabhängig zu detektieren [78]. Es handelt sich bei beiden Substanzen um Fluorescein mit einer aromatischen Schutzgruppe, die die normalerweise starke Fluoreszenz des Fluoresceins nahezu vollständig unterbindet. Bei Kontakt mit ausreichend starken Oxidationsmitteln wird die Schutzgruppe abgespalten und Fluorescein wird frei [78]. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 3-2 dargestellt.

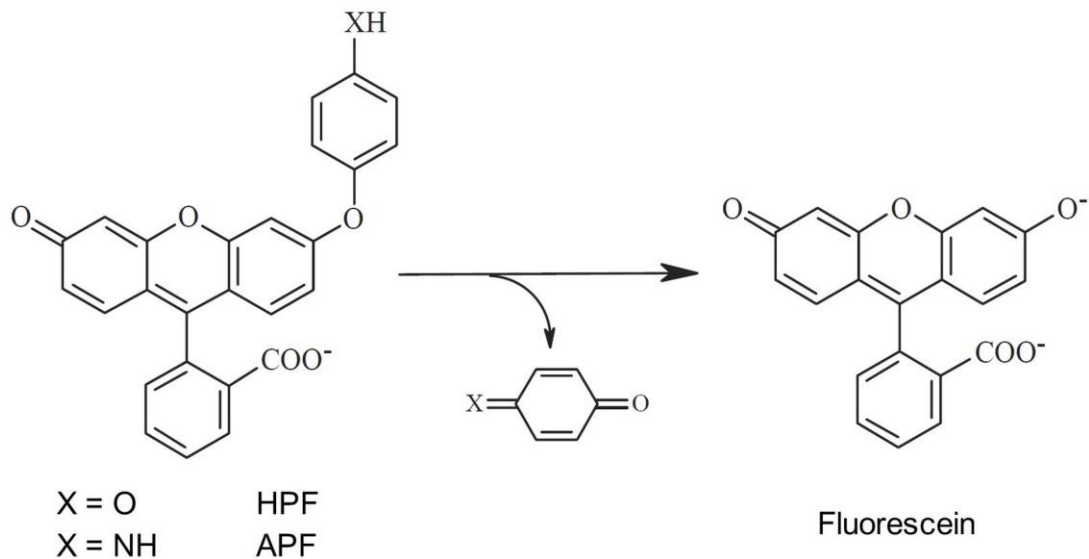


Abbildung 3-2: Funktionsweise von APF und HPF. Bei Reaktion von APF bzw. HPF mit ausreichend starken Oxidationsmitteln (APF: Hydroxylradikale, Peroxynitrit, HOCl; HPF: Hydroxylradikale, Peroxynitrit) wird die Schutzgruppe oxidativ abgespalten und Fluorescein wird frei. Abbildung aus [105], modifiziert.

Die hochreaktiven Sauerstoffspezies Peroxynitrit ($ONOO^-$) und Hydroxylradikale ($HO\cdot$) können auf diese Weise sowohl APF als auch HPF oxidieren. APF wird darüber hinaus auch von HOCl oxidiert. Es resultiert jeweils eine dosisabhängige Fluoreszenzsteigerung. Dagegen wird HPF so gut wie nicht von HOCl oxidiert [78]. In gemeinsamer Nutzung der beiden Substanzen kann somit HOCl spezifisch und dosisabhängig detektiert werden. Andere reaktive Sauerstoffspezies wie H_2O_2 , NO, Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), Singulett-Sauerstoff (1O_2), oder Peroxylradikale ($ROO\cdot$) sind nicht in der Lage, die Farbstoffe zu oxidieren. Auch lichtinduzierte Autooxidation tritt so gut wie nicht auf [78].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Farbstoffe in Neutrophilen eingesetzt. Dabei konnte an einige Vorerfahrungen innerhalb der Arbeitsgruppe angeknüpft werden [79]. Beide Farbstoffe wurden, wenn nicht anders angegeben, in einer finalen Konzentration von $5 \mu M$ eingesetzt (Stammlösungen des Herstellers $2,362 \text{ mM}$ (APF) bzw. $2,356 \text{ mM}$ (HPF), jeweils in Methylacetat). Die Fluoreszenz wurde durchflusszytometrisch gemessen. Die Anregung erfolgte dabei mit einem Argon-Laser bei $\lambda = 488 \text{ nm}$, die Emission wurde im Bereich $\lambda = 530 \pm 15 \text{ nm}$ gemessen.

3.2.4 Statistische Auswertung

Um die Fluoreszenzintensitäten mehrerer Proben untereinander quantitativ vergleichen zu können, wurde mithilfe des Computerprogramms Flowing Software 2.5.0 die mittlere Fluoreszenzintensität jeder Probe ermittelt. Dabei wurde das geometrische Mittel errechnet,

der für logarithmisch erfasste durchflusszytometrische Daten in der Regel genutzte Mittelwert [98], der auch in vergleichbaren Arbeiten Anwendung findet [106, 107]. Die mittlere Fluoreszenzintensität der Probe in Abbildung 3-1 beträgt bspw. 21,53 relative Einheiten.

Zur Prüfung auf statistische Signifikanz wurde der zweiseitige Einstichproben-t-Test verwendet. Obwohl eine Normalverteilung der Daten, die der t-Test voraussetzt [108, 109], nicht sicher ist, wurde dieser Test gewählt, da er alle Informationen der Daten nutzt [108]. Zudem reagiert er robust auf die Verletzung der Normalverteilungsvoraussetzung [108, 109], sodass, insbesondere bei Stichproben $n \geq 10$, eine annähernd symmetrische Verteilung der Daten ausreicht [108]. Das Vorliegen einer solchen Verteilung konnte leicht mittels Verteilungshistogramm überprüft werden. Bei p-Werten $< 0,05$ wurde ein statistisch signifikanter Unterschied konstatiert (Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$). Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software OriginPro 8 durchgeführt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Reinheit und Vitalität der Neutrophilen-Suspension

Die nach der Isolationsprozedur resultierende Neutrophilen-Suspension wurde mehrfach auf Reinheit und Vitalität untersucht. Zur Prüfung der Reinheit wurden an Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, um die Neutrophilen auf der einen und die Eosinophilen und Basophilen auf der anderen Seite anzufärben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-1 und Tabelle 4-1 wiedergegeben.

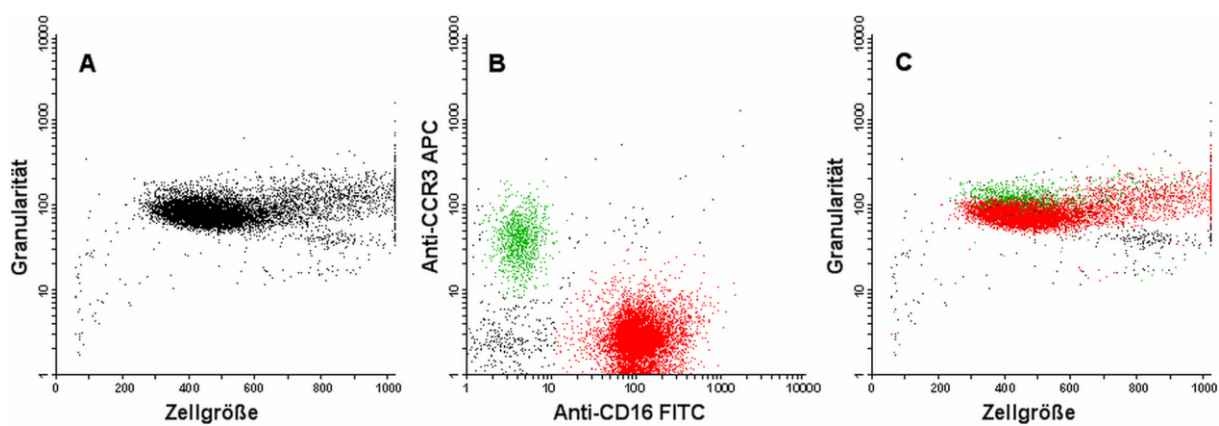


Abbildung 4-1: Durchflusszytometrische Reinheitsprüfung einer typischen Isolation. Nach der Isolation wurden die Neutrophilen mit Anti-CD16 FITC bzw. Anti-CCR3 APC gefärbt (jeweils 2 μ l Färbelösung/ml, 30 min) und anschließend durchflusszytometrisch untersucht (10 000 Messereignisse je Probe) **A)** Standardmäßige Ansicht in der Vorwärtsstreuung-Seitwärtsstreuung-Darstellung (Maße für Zellgröße und Granularität). **B)** Die Fluoreszenz in den Wellenlängenbereichen der beiden Farbstoffe ist gegeneinander aufgetragen. Die Fraktionen der Neutrophilen (mit Anti-CD16 FITC gefärbt, rot markiert) und Eosinophilen/Basophilen (mit Anti-CCR3 APC gefärbt, grün markiert) sind nun klar auszumachen. **C)** Übertragung der Markierung auf die Vorwärtsstreuung-Seitwärtsstreuung-Darstellung.

Tabelle 4-1: Anteil der Granulozyten in der Zelllösung bei 3 typischen Isolationen. Die Zellfraktionen wurden, wie in Abbildung 4-1 B dargestellt, markiert und ihr Anteil an allen gemessenen Ereignissen errechnet. Die untere Hälfte der Tabelle zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 unabhängigen Isolationen.

in Abbildung 4-1 dargestellter Spender	Neutrophile	85,94 %
	Eosinophile + Basophile	10,31 %
alle untersuchten Isolationen (n = 3)	Neutrophile	90,77 \pm 4,22 %
	Eosinophile + Basophile	5,68 \pm 4,02 %

Durchschnittlich liegt der Neutrophilenanteil bei etwa 91 % der Messereignisse, bei den übrigen handelt es sich überwiegend um eosinophile und basophile Granulozyten. Andere

Zellen und nicht zelluläre Verunreinigungen machen somit im Mittel weniger als 4 % der Messereignisse aus.

Zur Prüfung der Vitalität wurde der Farbstoff JC-1 verwendet. Liegt dieser Farbstoff in einer angefärbten Zelle vorrangig als Aggregat vor, spricht dies für eine intakte Mitochondrienmembran und damit für die Vitalität der Zelle. Abbildung 4-2 und Tabelle 4-2 zeigen die Ergebnisse dieser Experimente.

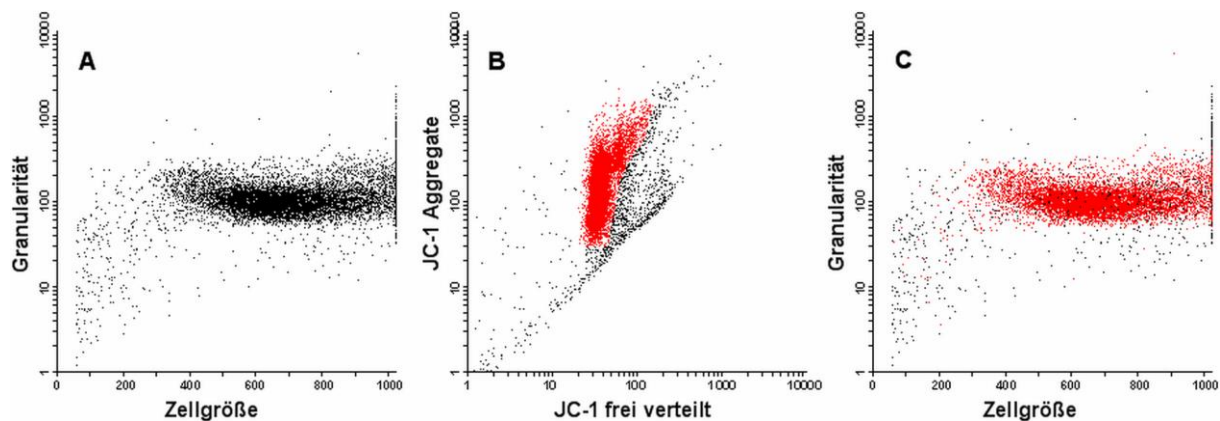


Abbildung 4-2: Durchflusszytometrische Vitalitätsprüfung einer typischen Isolation. Nach der Isolation wurden die Neutrophilen mit JC-1 gefärbt (0,77 μ M, 10 min) und anschließend durchflusszytometrisch untersucht (10 000 Messereignisse je Probe) **A)** Standardmäßige Ansicht in der Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung (Maße für Zellgröße und Granularität). **B)** Die Fluoreszenzen in den Wellenlängenbereichen der beiden Zustände des JC-1 sind gegeneinander aufgetragen. Die Fraktion vitaler Zellen (vorrangig Aggregate) wurde rot markiert. **C)** Übertragung der Markierung auf die Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung.

Tabelle 4-2: Anteil vitaler Zellen bei 4 typischen Isolationen. Die Fraktion der vitalen Zellen wurde, wie in Abbildung 4-2 B dargestellt, markiert und ihr Anteil an allen gemessenen Ereignissen errechnet. Die untere Hälfte der Tabelle zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 unabhängigen Isolationen.

in Abbildung 4-2 dargestellter Spender	vital	90,13 %
alle untersuchten Isolationen (n = 4)	vital	90,29 \pm 2,26 %

Die auf diese Weise ermittelte Fraktion der vitalen Zellen macht bei 4 unabhängigen Isolationen im Mittel ca. 90 % der gemessenen Ereignisse aus.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass sowohl die Reinheit als auch die Vitalität einer Neutrophilen-Suspension nach der für diese Arbeit genutzten Isolationsprozedur im Mittel etwas über 90 % liegt.

4.2 Messung der chlorierenden MPO-Aktivität in Neutrophilen

4.2.1 Charakterisierung des APF/HPF-Systems an Neutrophilen

Zur Charakterisierung von APF und HPF an Neutrophilen wurden die Zellen mit den Stimulantien H_2O_2 oder PMA inkubiert. Beide Stoffe steigern theoretisch die chlorierende MPO-Aktivität. Um gemessene Effekte der MPO zuordnen zu können, wurden Kontrollansätze mit dem MPO-Inhibitor 4-ABAH behandelt. Die Ergebnisse je eines exemplarischen Spenders für H_2O_2 und PMA sind in Abbildung 4-3 wiedergegeben.

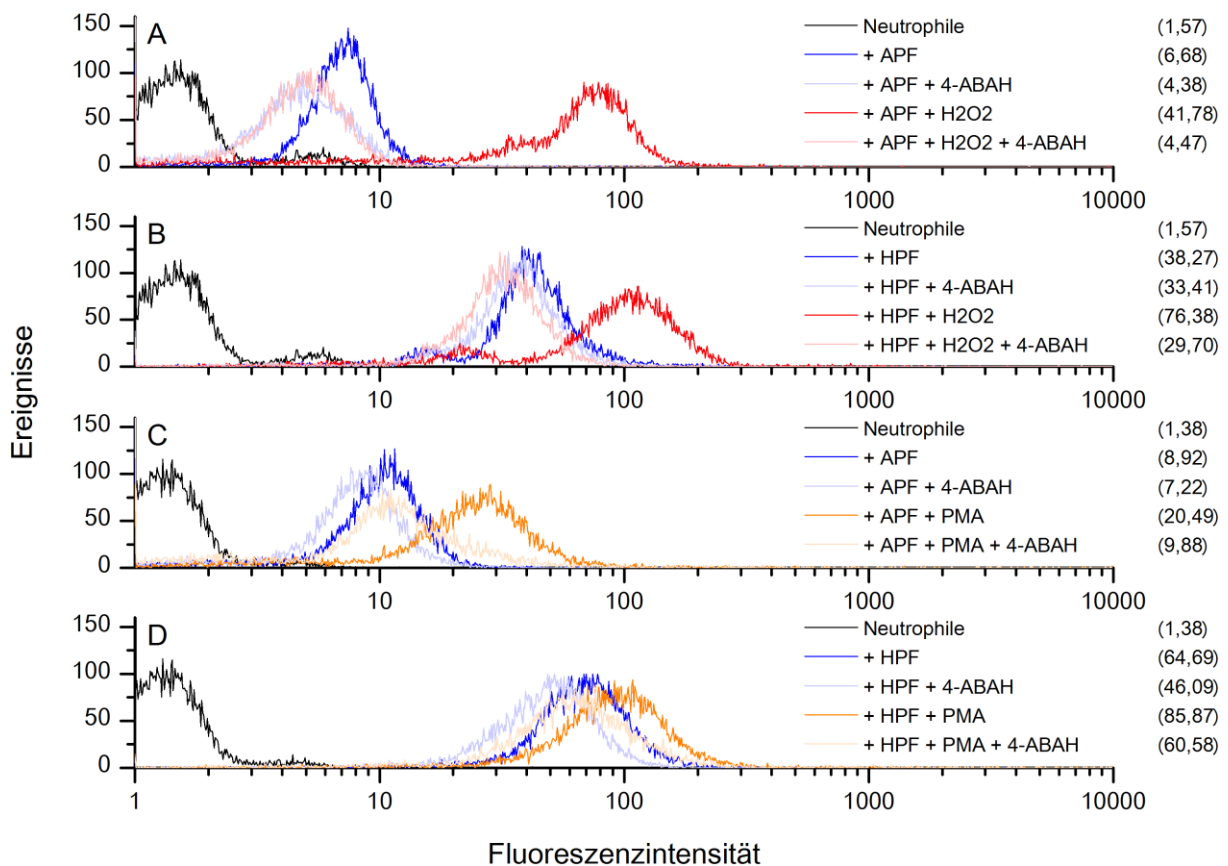


Abbildung 4-3: Durchflusszytometrische Fluoreszenzmessung, Effekt der Stimulation von APF- bzw. HPF-gefärbten Neutrophilen mit H_2O_2 oder PMA. A+B) Neutrophile eines Spenders wurden 30 min mit APF (A) bzw. HPF (B) (jeweils 5 μ M) inkubiert und dann zum Teil mit H_2O_2 (50 μ M, 120 min) stimuliert. Zu jeder Probe wurde eine Kontrolle mit MPO-Hemmstoff mitgeführt (4-ABAH (500 μ M), Zugabe 15 min vor Farbstoff). **C+D)** Neutrophile eines zweiten Spenders wurden 30 min mit APF (C) bzw. HPF (D) (jeweils 5 μ M) inkubiert und dann zum Teil mit PMA (2 nM, 120 min) stimuliert. Zu jeder Probe wurde eine Kontrolle mit MPO-Hemmstoff mitgeführt (4-ABAH (500 μ M), Zugabe 15 min vor Farbstoff). **A-D)** Hinter jeder Probe ist in Klammern die mittlere Fluoreszenzintensität angegeben. Je Probe wurden 10 000 Zellen untersucht.

Durch Zugabe von H_2O_2 oder PMA steigert sich die Fluoreszenz bei den APF-gefärbten Zellen deutlich (Abbildung 4-3 A und C). Bei Zugabe von MPO-Hemmstoff verschwindet dieser Effekt weitgehend. Bei den HPF-gefärbten Zellen (Abbildung 4-3 B und D) zeigt sich ebenfalls eine Fluoreszenzsteigerung durch H_2O_2 und PMA. Die relative Steigerung

gegenüber den Unstimulierten ist allerdings deutlich kleiner. Auch hier wird der Effekt durch Hemmung der MPO stark verringert. Zur Verdeutlichung sind die relativen Veränderungen der mittleren Fluoreszenzintensität noch einmal in Abbildung 4-4 dargestellt (es handelt sich um eine alternative Darstellung der selben Daten exemplarischer Spender, die auch Abbildung 4-3 zugrunde liegen).

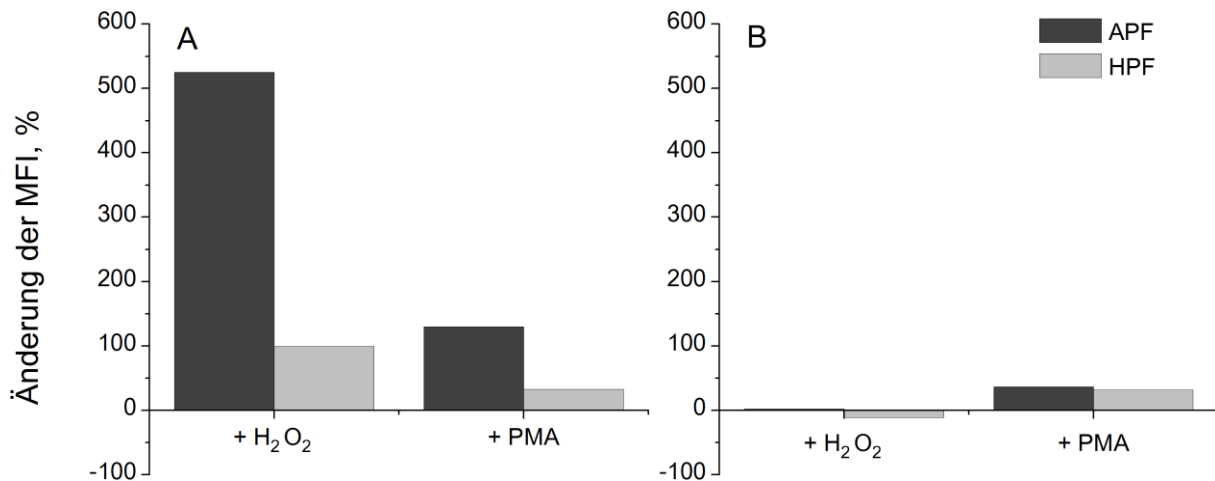


Abbildung 4-4: Relative Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bei Stimulation von APF- bzw. HPF-gefärbten Neutrophilen mit H₂O₂ oder PMA. A) Neutrophile wurden 30 min mit APF bzw. HPF (jeweils 5 µM) inkubiert und dann bei einem Spender mit H₂O₂ (50 µM, 120 min) und bei einem zweiten mit PMA (2 nM, 120 min) stimuliert. Die Fluoreszenz von 10 000 Zellen je Probe wurde durchflusszytometrisch gemessen. **B)** wie in A), aber zusätzlich MPO-Hemmstoff (4-ABAH (500 µM), Zugabe 15 min vor Farbstoff).

Bei Betrachtung der relativen Fluoreszenzveränderungen wird noch einmal ersichtlich, dass die APF-Fluoreszenz sich bei Stimulation der MPO stark steigert, während die HPF-Fluoreszenz darauf deutlich weniger reagiert. Bei gehemmter MPO zeigen sich kaum Fluoreszenzveränderungen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die APF-Fluoreszenz auf Stimulation und Hemmung der chlorierenden MPO-Aktivität reagiert und somit zu deren Detektion geeignet ist. HPF kann als Kontrolle eingesetzt werden, da es deutlich weniger stark auf HOCl reagiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in den weiteren Experimenten hauptsächlich APF verwendet, HPF-Kontrollen wurden nur in ausgewählten Fällen mitgeführt.

4.2.2 Stimulation mit PMA und Kontrollen mit verschiedenen Hemmstoffen

Das Verhalten der APF-Fluoreszenz bei PMA-Stimulation wurde näher untersucht, da PMA in dieser Arbeit ein wichtiges Werkzeug zur Stimulation der chlorierenden MPO-Aktivität darstellt. Dazu wurden Konzentrationsabhängigkeit und Kinetik bei jeweils 2 Spendern detektiert. Je ein exemplarisches Ergebnis ist in Abbildung 4-5 dargestellt.

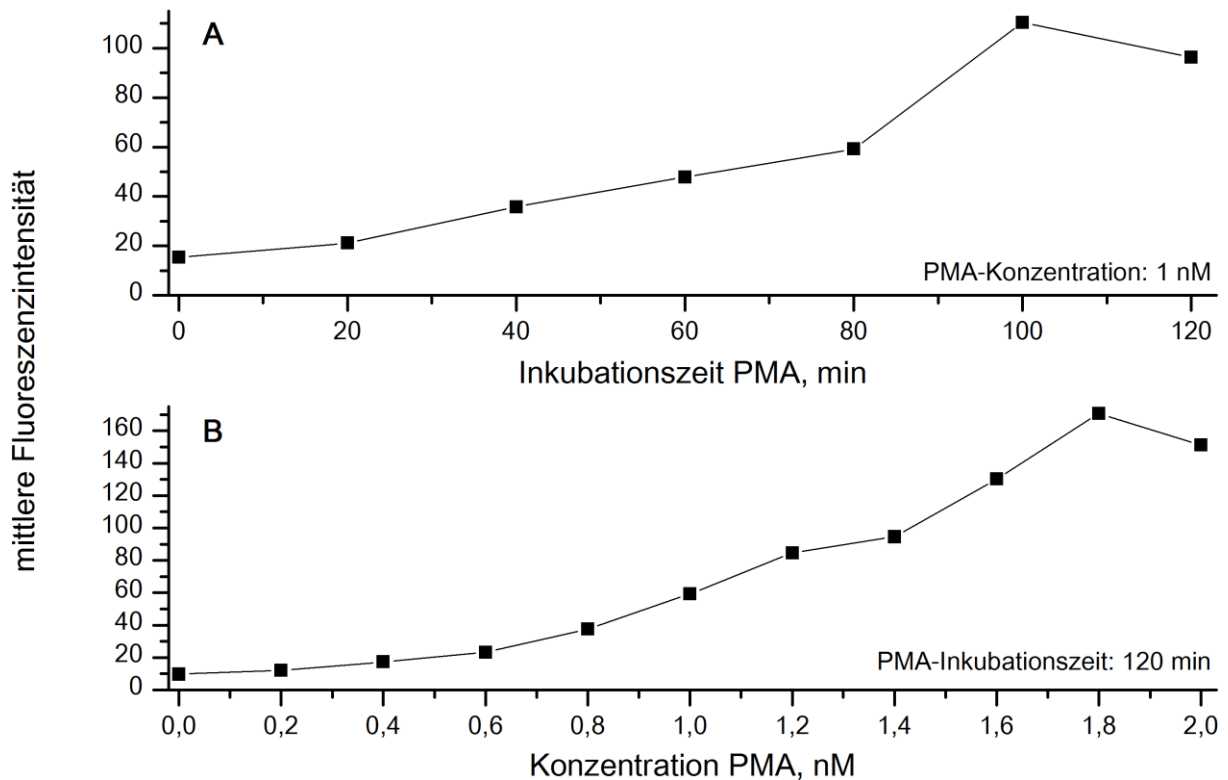


Abbildung 4-5: Mittlere Fluoreszenzintensität APF-gefärbter Neutrophiler in Abhängigkeit von PMA-Inkubationszeit und -Konzentration. A) Neutrophile eines Spenders wurden 30 min mit APF (5 μ M) inkubiert und dann mit PMA (1 nM) über unterschiedliche Inkubationszeiten stimuliert. **B)** Neutrophile eines zweiten Spenders wurden ebenfalls 30 min mit APF inkubiert und dann mit PMA in unterschiedlichen Konzentrationen für 120 min stimuliert. **A+B)** Die Fluoreszenz von 10 000 Zellen je Probe wurde durchflusszytometrisch gemessen.

Die APF-Fluoreszenz steigt stetig mit steigender PMA-Konzentration an. Auch mit zunehmender PMA-Inkubationszeit steigt die APF-Fluoreszenz stetig an. Bei höheren Konzentrationen (nahe 2 nM) und längeren Inkubationszeiten (nahe 120 min) gibt es allerdings Abweichungen von diesem Verhalten. In allen späteren Experimenten wurde PMA in der Konzentration 1 nM bei einer Inkubationszeit von 60 min eingesetzt.

Im Rahmen aller Experimente für diese Arbeit wurden Neutrophile von insgesamt 39 Spendern auf diese Weise (1 nM, 60 min) mit PMA stimuliert. Die mittlere Fluoreszenzintensität der unstimulierten sowie der PMA-stimulierten Zellen bei diesen 39 Spendern ist in Form von Boxplots in Abbildung 4-6 A dargestellt. Bei all diesen Spendern wurde zudem errechnet, um welchen Faktor sich die mittlere Fluoreszenzintensität durch Stimulation mit PMA steigert (Abbildung 4-6 B).

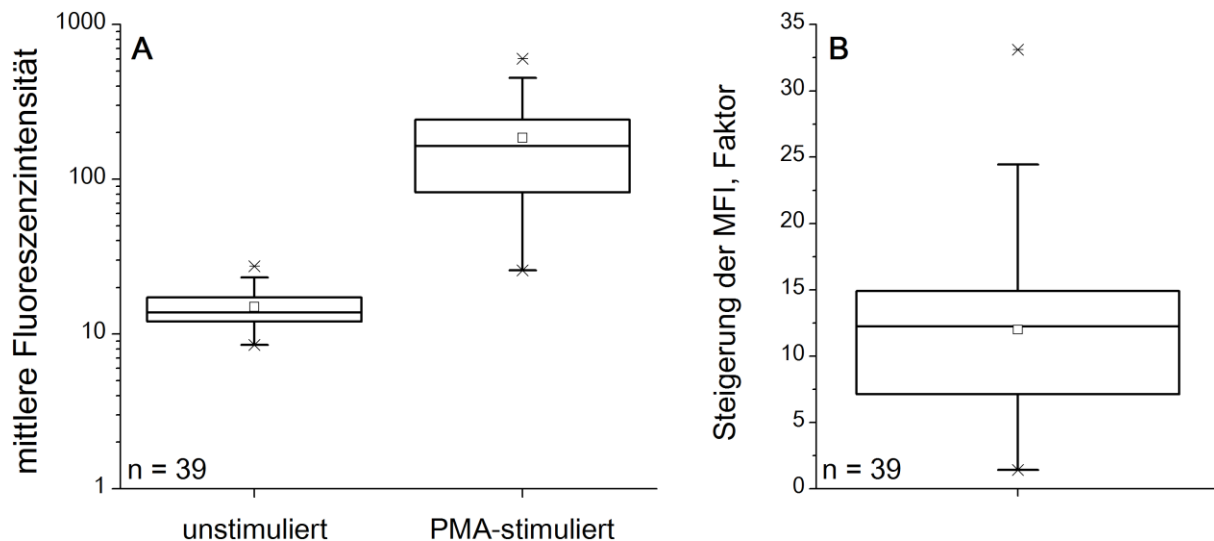


Abbildung 4-6: APF-Fluoreszenz von unstimulierten und PMA-stimulierten Neutrophilen sowie errechnete Steigerung der Fluoreszenz bei 39 Spendern. A) Bei 39 Spendern wurde jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität bei unstimulierten und PMA-stimulierten (1 nM, 60 min) Neutrophilen ermittelt. Aus diesen Werten wurden Boxplots erstellt. Die Zellen waren mit APF (5 μ M, 30 min) gefärbt und die Fluoreszenz von 10 000 Zellen je Probe wurde durchflusszytometrisch gemessen. **B)** Dargestellt ist, um welchen Faktor sich die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) durch Stimulation mit PMA steigert. Dieser Faktor wurde für jeden der 39 Spender errechnet und die Werte als Boxplot dargestellt.

Es wird ersichtlich, dass bei Stimulation mit PMA stets eine Steigerung der APF-Fluoreszenz resultiert, die allerdings spenderabhängig erheblich variiert. Der Steigerungsfaktor liegt im Mittel bei 12,00, minimal bei 1,43 und maximal bei 33,10.

Um den Einfluss von anderen Oxidantien als HOCl auf die APF-Fluoreszenz zu untersuchen, wurden Neutrophile von 6 Spendern mit verschiedenen Hemmstoffen inkubiert, bevor sie APF-gefärbt und teilweise mit PMA stimuliert wurden. Neben der MPO (mit 4-ABAH) wurde die NADPH-Oxidase (mit DPI) gehemmt, die bei Stimulation mit PMA indirekt (über die Bildung von die Bildung von Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$)) das Substrat H_2O_2 für die MPO liefert [85, 86]. Außerdem wurde L-NMMA zur Hemmung der iNOS und Zileuton zur Hemmung der 5-Lipoxygenase eingesetzt. Von der iNOS gebildetes NO trägt zur Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^-$) bei [90], das den Farbstoff APF oxidieren kann [77]. Produkte der 5-Lipoxygenase können mit HOCl reagieren [89]. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigt Abbildung 4-7.

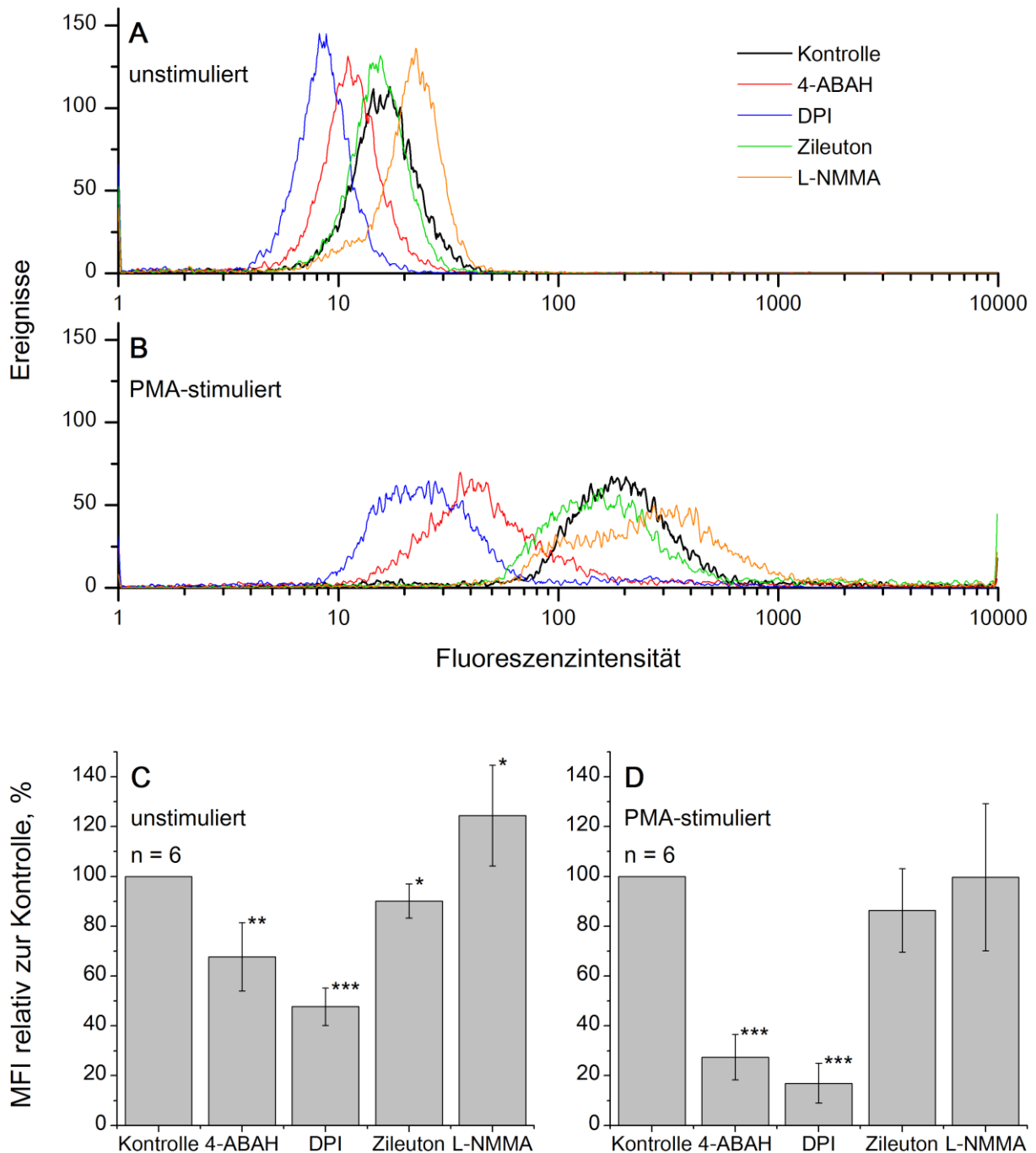


Abbildung 4-7: Effekt von verschiedenen Hemmstoffen auf die APF-Fluoreszenz von unstimulierten und PMA-stimulierten Neutrophilen. Exemplarischer Spender (A+B) und statistische Auswertung von 6 Spendern (C+D). A+B) Neutrophile wurden 15 min mit 4-ABAH (500 μ M), DPI (50 μ M), Zileuton (20 μ M) oder L-NMMA (200 μ M) inkubiert, zudem gab es eine Kontrolle ohne Hemmstoff. Danach wurde APF (5 μ M) zugegeben und weitere 30 min inkubiert. Ein Teil der Proben (A) blieb unstimuliert, während andere (B) anschließend 60 min mit PMA (1 nM) stimuliert wurden. Anschließend wurde die Fluoreszenz von 10 000 Zellen je Probe durchflusszytometrisch gemessen. (Zur klareren Darstellung wurden die Graphen mithilfe des Savitzky-Golay-Filters geglättet) C+D) Bei jedem Spender wurden die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) jeder Probe ermittelt und ins Verhältnis zur Fluoreszenz der Kontrolle (ohne Hemmstoff) gesetzt. Diese relativen Werte der 6 Spender wurden statistisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen bei unstimulierten (C) und PMA-stimulierten (D) Neutrophilen. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; zweiseitiger Einstichproben-t-Test gegen 100).

Bei Betrachtung des exemplarischen Spenders (Abbildung 4-7 A und B) fallen zunächst Unterschiede zwischen der Kontrolle und den mit Hemmstoffen behandelten Neutrophilen auf. Diese Unterschiede werden in der statistischen Analyse aller 6 Spender näher untersucht (Abbildung 4-7 C und D). Vergleicht man die Diagramme A und B in Abbildung 4-7, wird außerdem ersichtlich, dass durch Stimulation mit PMA die Fluoreszenz ansteigt, diese Steigerung allerdings bei Hemmung der NADPH-Oxidase (mit DPI) und der MPO (mit 4-ABAH) verringert ist. Schon bei den unstimulierten Zellen ist die Fluoreszenz der mit 4-ABAH oder DPI behandelten Zellen signifikant geringer als die der Kontrolle (sie liegt im Mittel bei 67 % (4-ABAH, $p = 0,002$) bzw. 48 % (DPI, $p < 0,001$) der Kontrolle). Bei den PMA-stimulierten Zellen ist dieser Unterschied noch deutlicher (27 % (4-ABAH) bzw. 17 % (DPI) der Kontrollfluoreszenz (jeweils $p < 0,001$)). 4-ABAH und DPI verringern somit sowohl die APF-Fluoreszenz bei unstimulierten und PMA-stimulierten Zellen als auch die durch PMA erzielte Fluoreszenzsteigerung. Dies bestätigt, dass die APF-Fluoreszenz die chlorierende MPO-Aktivität widerspiegelt und dass der Effekt von PMA MPO-abhängig ist. Auch die Hemmstoffe Zileuton und L-NMMA zeigen Effekte auf die APF-Fluoreszenz, die allerdings vergleichsweise geringer sind. Zileuton verringert die Fluoreszenz der Unstimulierten im Mittel auf 90 % ($p = 0,017$) der Kontrollfluoreszenz, L-NMMA erhöht sie auf 124 % ($p = 0,031$). Bei den PMA-stimulierten sind die Effekte beider Hemmstoffe statistisch nicht signifikant. Zumindest bei unstimulierten Neutrophilen muss also von einem gewissen Einfluss von Produkten der 5-Lipoxygenase bzw. von Peroxynitrit (ONOO^-) auf die APF-Fluoreszenz ausgegangen werden, bei PMA-stimulierten Zellen ist er aufgrund der untersuchten Stichprobe nicht anzunehmen. Auch HPF-gefärbte Neutrophile wurden mit den genannten Hemmstoffen inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht (Ergebnisse nicht gezeigt). Hier verringern 4-ABAH und DPI die Fluoreszenz der unstimulierten Zellen auf 83 % (4-ABAH) bzw. 95 % (DPI) und die der PMA-stimulierten Zellen auf 92 % (4-ABAH) bzw. 62 % (DPI) im Vergleich zur Kontrolle. Zileuton und L-NMMA bewirken weder bei unstimulierten noch bei PMA-stimulierten Neutrophilen eine erwähnenswerte Fluoreszenzveränderung gegenüber der Kontrolle. Somit reagiert auch die HPF-Fluoreszenz auf Hemmung der MPO und insbesondere auf Hemmung der NADPH-Oxidase. Die Effekte sind aber, verglichen mit jenen bei APF-Färbung, deutlich kleiner.

Es lässt sich zusammenfassen, dass PMA zuverlässig, aber von Spender zu Spender unterschiedlich stark, die chlorierende MPO-Aktivität stimuliert. Kontrollen mit verschiedenen Hemmstoffen bestätigen, dass die APF-Fluoreszenz maßgeblich die HOCl-Produktion der MPO abbildet und andere Oxidantien allenfalls eine geringe Rolle spielen.

4.3 Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität in Neutrophilen

In dieser Arbeit wurde erstmals die Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität durch das Flavonoid (–)-Epicatechin am Zellmodell (*ex vivo*) untersucht. Es existieren aber eine Reihe von *in vitro*-Ergebnissen: (–)-Epicatechin reagiert sehr schnell sowohl mit Komplex I als auch mit Komplex II der MPO, wobei der Quotient aus den Reaktionsraten (Reaktionsgeschwindigkeit mit Komplex I / Reaktionsgeschwindigkeit mit Komplex II $\approx 4,2$) ungewöhnlich niedrig ist [41]. (–)-Epicatechin ist dadurch theoretisch in der Lage, eine Komplex II-Akkumulation zu überwinden: liegt die MPO zu großen Teilen als Komplex II vor, überwiegt die Reaktion von (–)-Epicatechin mit Komplex II. Letzterer wird dabei zur nativen MPO reduziert und so die chlorierende MPO-Aktivität gesteigert. Ist dagegen wenig Komplex II vorhanden, überwiegt die Reaktion von (–)-Epicatechin mit Komplex I. Dabei wird Komplex II gebildet und so die chlorierende MPO-Aktivität verringert. *In vitro*-Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe haben diese Annahmen für (–)-Epicatechin-Konzentrationen bis 10 μM bestätigt. In höheren Konzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) tritt die Reaktion mit Komplex I weiter in den Vordergrund und die chlorierende MPO-Aktivität wird auch dann verringert, wenn viel Komplex II vorliegt (vgl. [42] und Abschnitt 1.3.2.2).

Nun wurde der Effekt von (–)-Epicatechin auf die APF-Fluoreszenz von Neutrophilen untersucht. Zunächst wurden unstimulierte, dann PMA-stimulierte Neutrophile betrachtet. Schließlich wurde der (–)-Epicatechin-Effekt unter Bedingungen einer forcierten Komplex II-Akkumulation getestet, bewirkt durch einem Überschuss von H_2O_2 . Zudem wurde damit experimentiert, eine Komplex II-Akkumulation durch Peroxynitrit (ONOO^-) herbeizuführen.

4.3.1 Effekt von (–)-Epicatechin auf unstimulierte Neutrophile

Zur Untersuchung des Effekts von (–)-Epicatechin auf unstimulierte Neutrophile wurden Zellen von 4 Spendern insgesamt 120 min mit verschiedenen Konzentrationen des Flavonoids inkubiert (0 μM (Kontrolle), 1 μM , 2 μM , 4 μM , 8 μM , 16 μM , 32 μM , 64 μM , 128 μM), wobei nach 30 min noch APF (5 μM) zugegeben wurde. Bei der Auswertung wurde zunächst für jeden Spender die mittlere Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der (–)-Epicatechin-Konzentration ermittelt. Um die Ergebnisse mehrerer Spendern untereinander vergleichen zu können, wurde dann die mittlere Fluoreszenz jeder Probe ins Verhältnis zur entsprechenden Kontrolle ohne (–)-Epicatechin gesetzt. Auf Basis dieser Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt. Abbildung 4-8 zeigt die Auswertung und deren Ergebnisse.

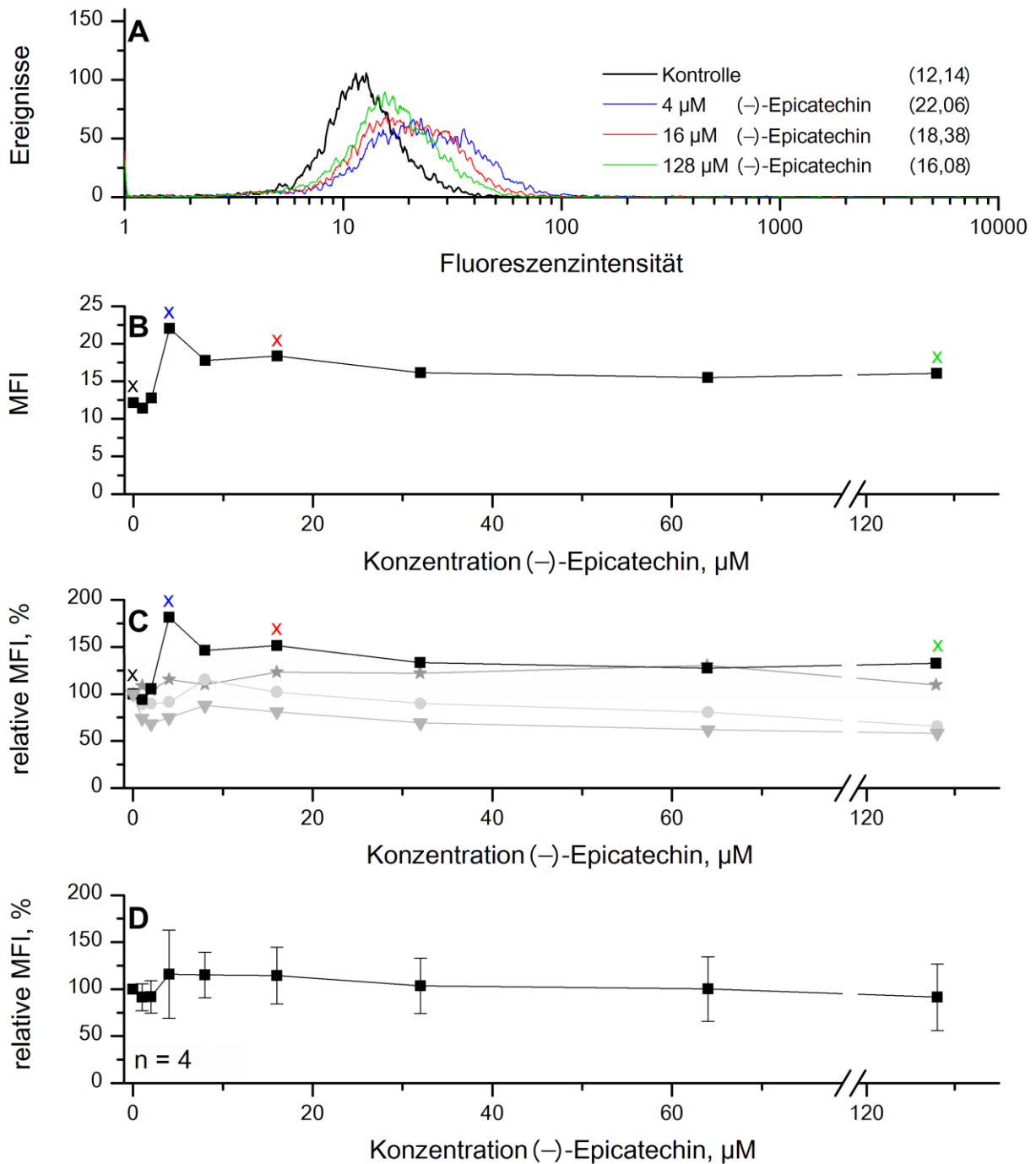


Abbildung 4-8: Einfluss von (-)-Epicatechin auf die APF-Fluoreszenz unstimulierter Neutrophiler. Exemplarischer Spender (A+B) und statistische Auswertung von 4 Spendern (C+D). Neutrophile wurden 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von (-)-Epicatechin inkubiert, dann mit APF gefärbt (5 µM) und weitere 90 min inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz von 10 000 Zellen je Probe durchflusszytometrisch gemessen. **A**) Die durchflusszytometrischen Daten eines Spenders bei 3 ausgewählten (-)-Epicatechin-Konzentrationen sowie der Kontrolle sind gezeigt (zur klareren Darstellung wurden die Graphen mithilfe des Savitzky-Golay-Filters geglättet). Bei jeder Probe wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt (in Klammern in der Legende). **B**) Die MFI aller Proben ist in Abhängigkeit von der (-)-Epicatechin-Konzentration dargestellt. Die farbigen X zeigen, welche Datenpunkte den entsprechenden Histogrammen in A) zuzuordnen sind. **C**) Die MFI der Proben ist nun relativ zur Kontrolle (ohne (-)-Epicatechin, \pm 100 %) dargestellt. Der in A) und B) gezeigte exemplarische Spender ist schwarz dargestellt, die farbigen X zeigen wiederum, welche Datenpunkte den entsprechenden Histogrammen in A) zuzuordnen sind. Die übrigen 3 Spender sind in Graustufen dargestellt. **D**) Aus den in C) dargestellten relativen Werten der 4 Spender wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet.

Es wird ersichtlich, dass (-)-Epicatechin bei allen 4 Spendern zu Veränderungen der APF-Fluoreszenz führt (Abbildung 4-8 C). Diese Änderungen sind sehr unterschiedlich. Bei einem Spender (Quadrate in Abbildung 4-8 C) wird die Fluoreszenz, insbesondere bei 4 μM (-)-Epicatechin, stark gesteigert, bei einem anderen verringert sich die APF-Fluoreszenz durch (-)-Epicatechin (Dreiecke). Auch die Beträge der Fluoreszenzveränderungen sind unterschiedlich, bei einem der Spender (Sterne) sind sie bspw. vergleichsweise klein. Bei Betrachtung von Mittelwert und Standardabweichung (Abbildung 4-8 D) wird ersichtlich, dass es keinen signifikanten Gesamttrend gibt. Im Mittel fällt die Fluoreszenz bei 1 μM und 2 μM (-)-Epicatechin-Konzentration etwas ab (jeweils 92 % der Kontrolle) und steigt bei 4 μM maximal an (116 % der Kontrolle). Mit weiter steigenden (-)-Epicatechin-Konzentrationen nimmt die relative Fluoreszenz dann stetig wieder ab (bis auf 92 % der Kontrolle bei 128 μM). Der Effekt von (-)-Epicatechin ist jedoch bei jeder Konzentration kleiner als die Standardabweichung und nie statistisch signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass (-)-Epicatechin in der Lage ist die chlorierende MPO-Aktivität von unstimulierten Neutrophilen zu modulieren. Die Effekte sind von Spender zu Spender unterschiedlich und so zeigen sich im Mittel keine signifikanten Veränderungen.

4.3.2 Effekt von (-)-Epicatechin auf mit PMA stimulierte Neutrophile

Der Effekt von (-)-Epicatechin auf die APF-Fluoreszenz von PMA-stimulierten Neutrophilen wurde an Zellen von 14 Spendern untersucht. Die Neutrophilen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von (-)-Epicatechin inkubiert (1 μM , 2 μM , 4 μM , 8 μM , 16 μM , 32 μM), zudem gab es eine Kontrolle ohne (-)-Epicatechin. Nach 30 min wurde APF (5 μM) und nach weiteren 30 min PMA (1 nM) zugegeben. Die Zellen wurden noch weitere 60 min inkubiert und anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Fluoreszenzmessung. Die Auswertung erfolgte analog zur Vorgehensweise bei den Unstimulierten. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-9 gezeigt, wobei die APF-Fluoreszenz einiger repräsentativer Spender in Abhängigkeit von der (-)-Epicatechin-Konzentration dargestellt ist (Abbildung 4-9 A). Die Fluoreszenz ist dabei in Relation zur Kontrolle ohne (-)-Epicatechin des jeweiligen Spenders gesetzt. Dies ermöglicht den Vergleich der Spender untereinander, der ansonsten durch die sehr variable Wirkung von PMA (siehe 4.2.2) erschwert wird. Außerdem wurden die Ergebnisse aller 14 Spender statistisch ausgewertet (Abbildung 4-9 B).

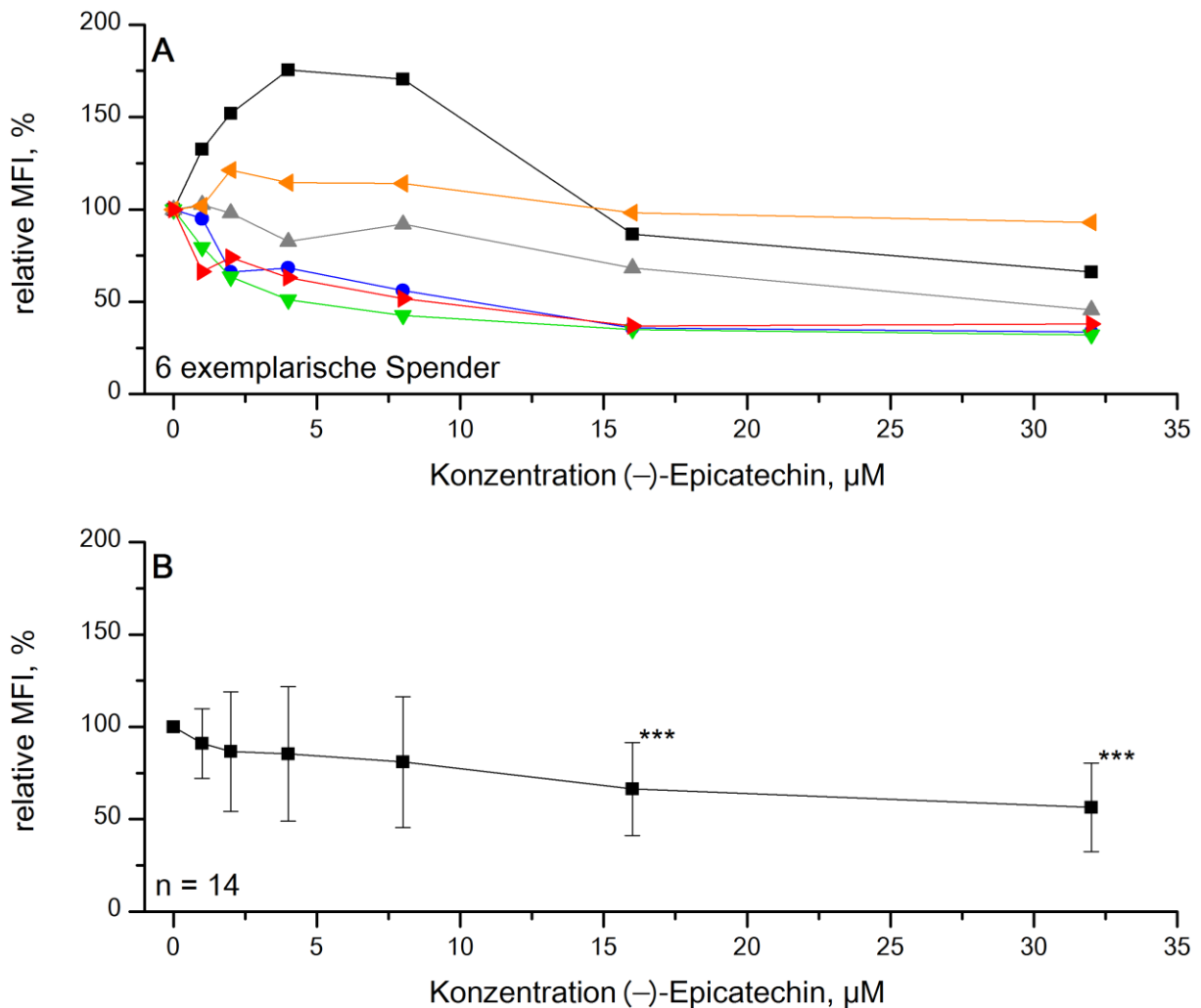


Abbildung 4-9: Einfluss von (-)-Epicatechin auf die APF-Fluoreszenz PMA-stimulierter Neutrophiler. 6 exemplarische Spender (A) und statistische Auswertung von allen 14 Spendern (B). Neutrophile wurden 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von (-)-Epicatechin inkubiert, dann mit APF gefärbt (5 μM , 30 min) und schließlich mit PMA stimuliert (1 nM, 60 min). Anschließend wurde die Fluoreszenz von 10 000 Zellen je Probe durchflusszytometrisch gemessen. **A)** Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von 6 der 14 untersuchten Spendern ist in Abhängigkeit von der (-)-Epicatechin-Konzentration dargestellt. Dabei ist die Fluoreszenz jeweils in Relation zur Kontrolle ohne (-)-Epicatechin (\triangleq 100 %) gesetzt. **B)** Die in A) dargestellten relativen Werte wurden bei allen 14 untersuchten Spendern erhoben und Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind gekennzeichnet (***) p < 0,001; zweiseitiger Einstichproben-t-Test gegen 100).

Bei Betrachtung einzelner exemplarischer Spender (Abbildung 4-9 A) wird ersichtlich, dass (-)-Epicatechin deutliche Effekte auf die APF-Fluoreszenz hat. Diese Effekte sind zum einen von Spender zu Spender unterschiedlich, zum anderen auch von der (-)-Epicatechin-Konzentration abhängig. Besonders bei den Konzentrationen 2 μM , 4 μM und 8 μM gibt es sehr große Unterschiede zwischen den Spendern, zu erkennen auch an den großen Standardabweichungen in der statistischen Auswertung (Abbildung 4-9 B). (-)-Epicatechin bewirkt in diesem Konzentrationsbereich bei einigen Spendern eine Fluoreszenzsteigerung (bspw. auf 176 % (schwarz in Abbildung 4-9 A) oder 115 % (orange) der Kontrolle bei 4 μM

(-)-Epicatechin). Bei 6 von 14 Spendern fanden sich im Konzentrationsbereich 2 - 8 μM Fluoreszenzwerte, die höher lagen als die der Kontrolle. Bei der Mehrzahl der Spender bewirkt (-)-Epicatechin in diesem Konzentrationsbereich dagegen eine Verringerung der APF-Fluoreszenz (bspw. blau, grün und rot in Abbildung 4-9 A). Auch die Mittelwerte liegen unterhalb der Kontrolle (87 % (2 μM), 85 % (4 μM) bzw. 81 % (8 μM) der Kontrollfluoreszenz), wenngleich die Unterschiede nicht statistisch signifikant sind. Bei höheren (-)-Epicatechin-Konzentrationen (16 μM und 32 μM) ergibt sich ein einheitlicheres Bild. Die Unterschiede zwischen den Spendern sind hier nicht so groß, zu erkennen auch an den kleineren Standardabweichungen. Bei fast allen Spendern ist die APF-Fluoreszenz in diesem Konzentrationsbereich im Vergleich zur Kontrolle verringert, lediglich bei 2 von 14 Spendern fanden sich Werte oberhalb der Kontrollfluoreszenz. Im Mittel ist die Fluoreszenz signifikant verringert, sie liegt bei 66 % (16 μM , $p < 0,001$) bzw. 56 % (32 μM , $p < 0,001$) der Kontrolle.

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass (-)-Epicatechin bei PMA-stimulierten Neutrophilen in Konzentrationen bis 8 μM spenderabhängig sehr unterschiedliche Effekte auf die chlorierende MPO-Aktivität hat. Bei einigen Spendern wird sie erhöht, bei anderen erniedrigt, wobei Letzteres etwas häufiger vorkommt. Einen statistisch signifikanten Effekt über alle Spender gibt es nicht. Bei höheren (-)-Epicatechin-Konzentrationen (16 μM und 32 μM) sind die Unterschiede zwischen den Spendern geringer und (-)-Epicatechin verringert die chlorierende MPO-Aktivität statistisch signifikant.

4.3.3 Effekt von (-)-Epicatechin auf mit H_2O_2 stimulierte Neutrophile

4.3.3.1 Stimulation und Komplex II-Akkumulation durch H_2O_2

Aus den Ergebnissen an unstimulierten und PMA-stimulierten Neutrophilen wird eine große spenderabhängige Variabilität des (-)-Epicatechin-Effektes deutlich. Dieser beruht vermutlich darauf, dass die MPO bei verschiedenen Spendern zu unterschiedlichen Anteilen als Komplex II vorliegt. *In vitro* steigert (-)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität, wenn experimentell durch einen Überschuss von H_2O_2 eine Komplex II-Akkumulation forciert wird [42]. Hier wird dieses Prinzip nun auf das Zellmodell übertragen.

Zunächst wurde der Effekt verschiedener H_2O_2 -Konzentrationen auf die APF-Fluoreszenz von Neutrophilen untersucht. Dazu wurden bei 9 Spendern Konzentrationsabhängigkeiten detektiert. Als Inkubationszeit wurden 60 min festgelegt, die untersuchten

H₂O₂-Konzentrationen lagen im Bereich 0 µM (Kontrolle) bis 1280 µM. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-10 dargestellt.

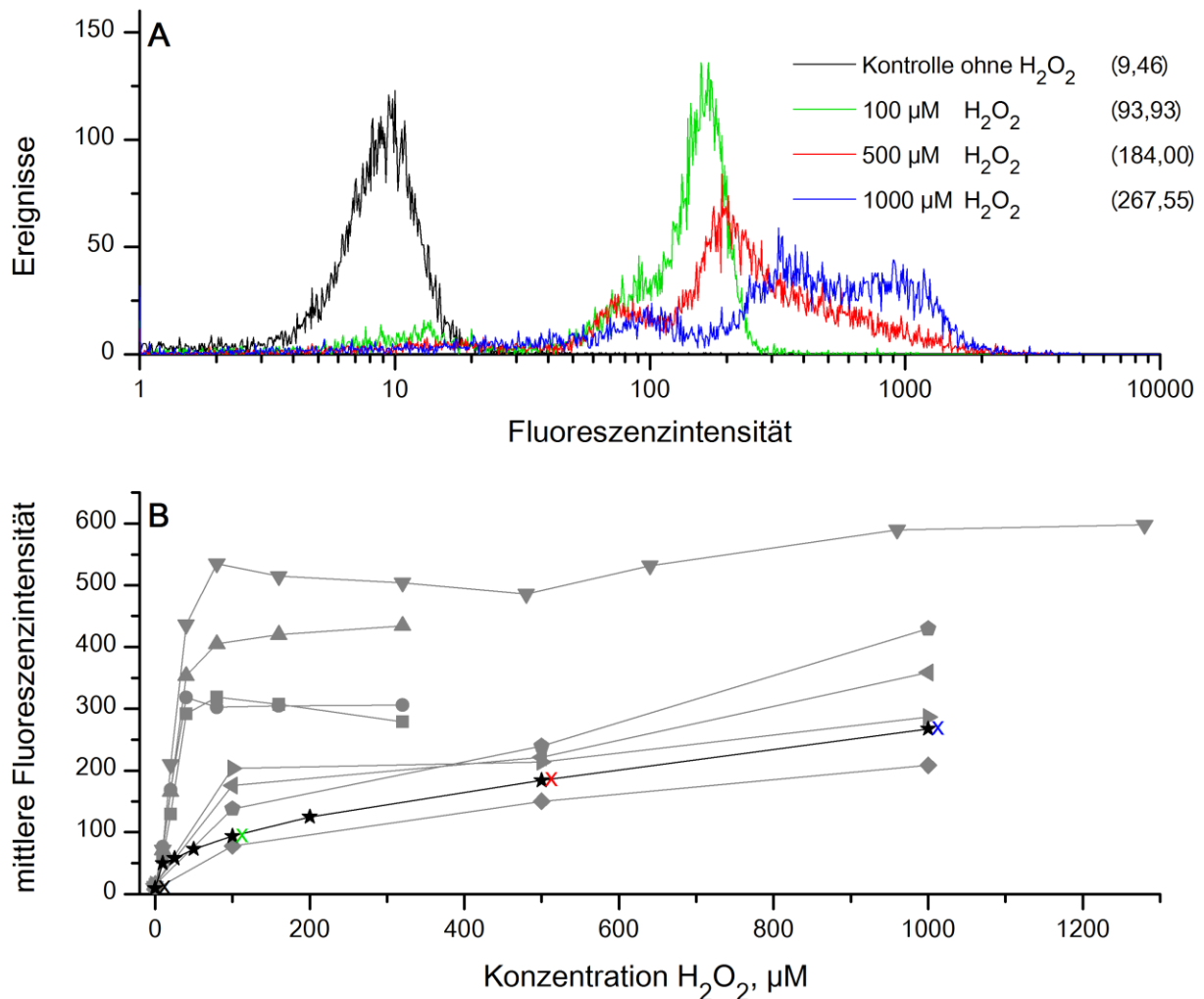


Abbildung 4-10: Fluoreszenz APF-gefärbter Neutrophiler in Abhängigkeit von der H₂O₂-Konzentration. Neutrophile wurden mit APF gefärbt (5 µM, 30 min) und anschließend 60 min mit verschiedenen Konzentrationen von H₂O₂ inkubiert. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Fluoreszenzmessung von 10 000 Zellen je Probe. **A**) Die Fluoreszenzhistogramme eines exemplarischen Spenders bei 3 ausgewählten H₂O₂-Konzentrationen sowie der Kontrolle sind gezeigt. Bei jeder Probe wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ermittelt (in Klammern in der Legende). **B**) Die MFI aller 9 untersuchten Spender ist in Abhängigkeit von der H₂O₂-Konzentration dargestellt. Der in A) gezeigte exemplarische Spender ist schwarz dargestellt, die farbigen X zeigen, welche Datenpunkte den entsprechenden Histogrammen in A) zuzuordnen sind. Die übrigen Spender sind grau dargestellt.

Zunächst ist ersichtlich, dass H₂O₂ bei allen Spendern zu einer deutlichen Erhöhung der APF-Fluoreszenz führt. Dabei kommt es schon bei niedrigen Konzentrationen zu starken Steigerungen, sodass die Fluoreszenzkurven (Abbildung 4-10 B) anfangs steil ansteigen. Bei 5 von 9 Spendern werden im Konzentrationsbereich bis 100 µM bereits mindestens 70 % der maximalen MFI erreicht. Die Fluoreszenzkurven flachen tendenziell mit steigender H₂O₂-Konzentration ab, bei Erhöhung der Konzentration über 100 µM hinaus treten vergleichsweise geringere Fluoreszenzsteigerungen auf. Bei 2 Spendern (Quadrate, Kreise in

Abbildung 4-10 B) geht die Fluoreszenz sogar wieder zurück. Alles in allem ist der Verlauf der Fluoreszenzkurven in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration bei Vergleich der 9 Spender recht ähnlich, es zeigen sich starke Anstiege bei geringen und weniger starke bzw. vereinzelt sogar negative bei höheren Konzentrationen. Große Unterschiede gibt es aber bezüglich der Höhe der Fluoreszenzwerte. Die maximale MFI variiert zwischen 208,44 und 697,76 Fluoreszenzeinheiten. Diese große spenderabhängige Variabilität ist vergleichbar mit jener bei Stimulation mit PMA (siehe 4.2.2).

Bei einem Spender wurden Kontrollen mit Inhibitoren der MPO (4-ABAH) und der Katalase (Triazol) sowie HPF-gefärbte Kontrollen mitgeführt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 4-11.

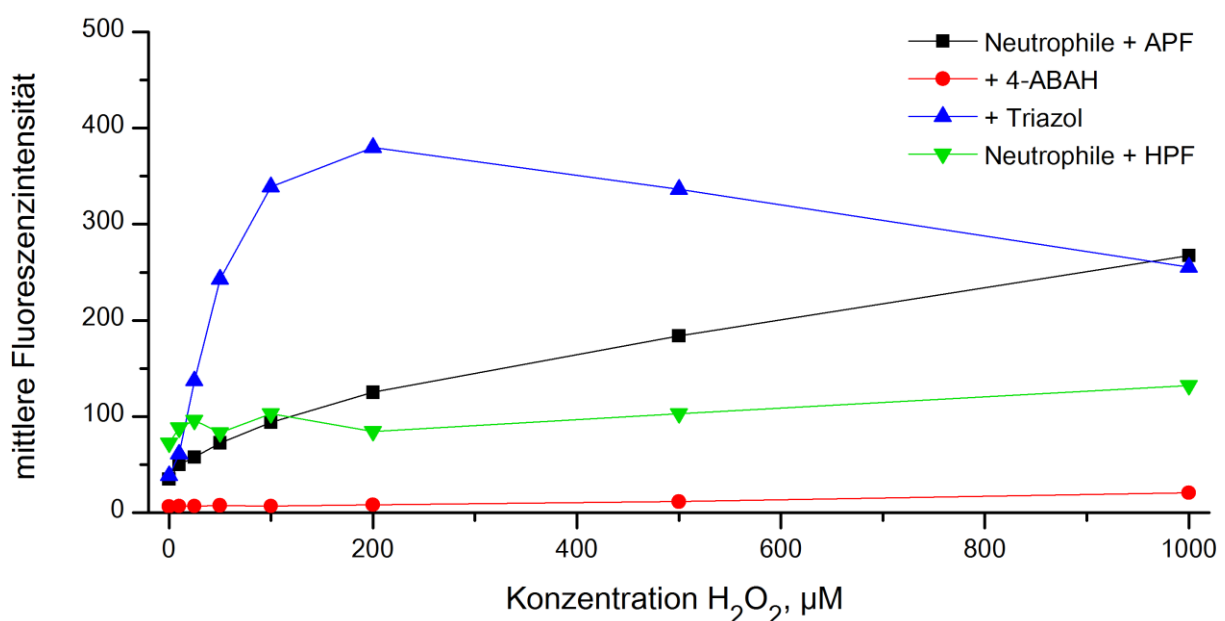


Abbildung 4-11: Fluoreszenz APF-gefärbter Neutrophiler in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration mit Kontrollen. Neutrophile eines Spenders wurden zum Teil mit APF (schwarze, rote und blaue Kurve) und zum Teil mit HPF (grüne Kurve) gefärbt (jeweils 5 μM , 30 min). Anschließend wurde H_2O_2 in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und weitere 60 min inkubiert. Bei einigen der APF-gefärbten Proben wurden zusätzlich die Inhibitoren 4-ABAH (500 μM , rote Kurve) bzw. Triazol (10 mM, blaue Kurve) zugesetzt (15 min vor Beginn der Färbung). Die Fluoreszenz von 10 000 Zellen je Probe wurde durchflusszytometrisch gemessen.

Die APF-gefärbten Neutrophilen mit 4-ABAH (rot in Abbildung 4-11) sowie die HPF-gefärbten Neutrophilen (grün) zeigen kaum Fluoreszenzveränderungen durch H_2O_2 , was bestätigt, dass der Effekt bei APF-gefärbten Zellen ohne Inhibitor (schwarz) auf die chlorierende MPO-Aktivität zurückzuführen ist. Bei Hemmung der Katalase (blau) steigt die APF-Fluoreszenz dagegen deutlich stärker an als das ohne Katalasehemmung der Fall ist. Dabei wird bei 200 μM H_2O_2 ein Maximum erreicht, bei höheren Konzentrationen fällt die Fluoreszenzkurve wieder ab. Es ist anzumerken, dass bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen (500 μM und 1 mM) und gleichzeitiger Katalasehemmung wahrscheinlich die Zellvitalität

abnimmt (Hinweise darauf ergeben sich in der Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung, nicht gezeigt).

Insgesamt ergeben sich einige Hinweise auf eine vermehrte Komplex II-Bildung bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen. Dafür spricht sowohl die Abflachung der Fluoreszenzkurven nahezu aller Spender mit steigender H_2O_2 -Konzentration (Abbildung 4-10 B) als auch der Abfall der Fluoreszenzkurve bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen unter Katalasehemmung (Abbildung 4-11). Um die Bildung von Komplex II durch H_2O_2 weiter zu untersuchen, wurde der Effekt von (-)-Epicatechin auf die APF-Fluoreszenz bei unterschiedlichen H_2O_2 -Konzentrationen geprüft. Neutrophile von 4 Spendern wurden dazu mit 0 μM (Kontrolle), 4 μM , 8 μM oder 16 μM (-)-Epicatechin inkubiert, mit APF gefärbt und anschließend mit H_2O_2 in 3 verschiedenen Konzentrationen (100 μM , 500 μM , 1 mM) stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-12 dargestellt.

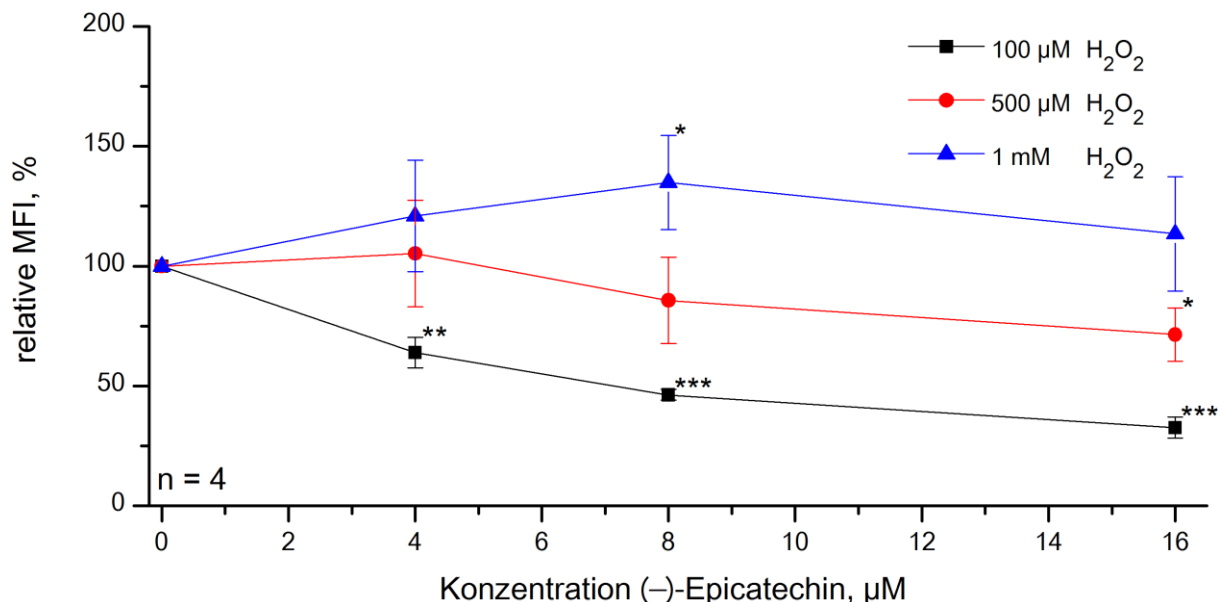


Abbildung 4-12: Einfluss von (-)-Epicatechin auf die APF-Fluoreszenz von Neutrophilen bei Stimulation mit H_2O_2 in 3 verschiedenen Konzentrationen. Neutrophile von 4 Spendern wurden 30 min mit verschiedenen Konzentrationen von (-)-Epicatechin inkubiert, dann mit APF gefärbt (5 μM , 30 min) und schließlich mit H_2O_2 in 3 verschiedenen Konzentrationen (100 μM , 500 μM , 1 mM) für 60 min stimuliert. Anschließend wurde die Fluoreszenz von 10 000 Zellen je Probe durchflusszytometrisch gemessen. Bei jedem Spender wurde so für jede der 3 H_2O_2 -Konzentrationen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der (-)-Epicatechin-Konzentration ermittelt. Dann wurden die Fluoreszenzwerte jeweils in Relation zur Kontrolle ohne (-)-Epicatechin ($\pm 100\%$) gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Daten von den 4 untersuchten Spendern. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; zweiseitiger Einstichproben-t-Test gegen 100).

Die Effekte von (-)-Epicatechin unterscheiden sich, abhängig von der eingesetzten H_2O_2 -Konzentration, deutlich. Bei Stimulation mit 100 μM H_2O_2 wird die APF-Fluoreszenz durch (-)-Epicatechin statistisch signifikant verringert auf im Mittel 64 % (bei 4 μM , $p = 0,002$),

46 % (bei 8 μM , $p < 0,001$) bzw. 32 % (bei 16 μM , $p < 0,001$) der Kontrollfluoreszenz. Bei Stimulation mit 500 μM H_2O_2 kommt es durch 4 μM (-)-Epicatechin im Mittel zu einer leichten Fluoreszenzsteigerung (105 % der Kontrolle), bei höheren (-)-Epicatechin-Konzentrationen dagegen ebenfalls zu einer teilweise signifikanten Verringerung auf 86 % (bei 8 μM) bzw. 71 % (bei 16 μM , $p = 0,014$) der Kontrollfluoreszenz. Bei Stimulation mit 1 mM H_2O_2 bewirkt (-)-Epicatechin eine Steigerung der APF-Fluoreszenz, die bei 8 μM (-)-Epicatechin statistisch signifikant ist ($p = 0,038$). Die MFI beträgt hier im Mittel 121 % bei 4 μM , 135 % bei 8 μM und 113 % bei 16 μM (-)-Epicatechin im Verhältnis zur Kontrolle. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch 1 mM H_2O_2 eine Komplex II-Bildung bewirkt wird, sodass (-)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität steigert. Bei Behandlung mit 100 μM H_2O_2 wird die chlorierende MPO-Aktivität dagegen durch (-)-Epicatechin verringert, was zeigt, dass weniger Komplex II vorhanden ist.

Diese *ex vivo*-Ergebnisse sind vergleichbar mit jenen *in vitro*, allerdings ist die bei Neutrophilen zur Komplex II-Bildung erforderliche H_2O_2 -Konzentration (1 mM) deutlich höher als jene *in vitro* (150 μM [42]). Die Ergebnisse mit Triazol (siehe Abbildung 4-11) legen nahe, dass die Katalase für diesen Unterschied verantwortlich ist. Um diese These zu prüfen, wurde das beschriebene Experiment (Abbildung 4-12) wiederholt, nun wurde allerdings für jeden Ansatz noch eine Kontrolle mit Triazol mitgeführt. Außerdem wurde die Pipettierreihenfolge geändert. Nach APF-Färbung (30 min) wurden die Neutrophilen 60 min mit H_2O_2 in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. (-)-Epicatechin wurde jetzt aber erst 15 min nach Zugabe von H_2O_2 hinzugefügt, die Inkubationszeit für (-)-Epicatechin betrug demnach nur noch 45 min (im Gegensatz zu 120 min im ursprünglichen Versuchsaufbau). Ziel war es, (-)-Epicatechin erst nach der Stimulation und mutmaßlichen Komplex II-Bildung durch H_2O_2 zuzugeben. Zu den geprüften (-)-Epicatechin-Konzentrationen 0 μM (Kontrolle), 4 μM , 8 μM und 16 μM kam noch 32 μM hinzu. H_2O_2 wurde jetzt in den Konzentrationen 20 μM (bewirkt *in vitro* eine Stimulation mit geringer Komplex II-Bildung [42]), 150 μM (bewirkt *in vitro* eine Komplex II-Bildung [42]) und 1 mM (bewirkt bei Neutrophilen eine Komplex II-Bildung, s. o.) eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 4-13 dargestellt.

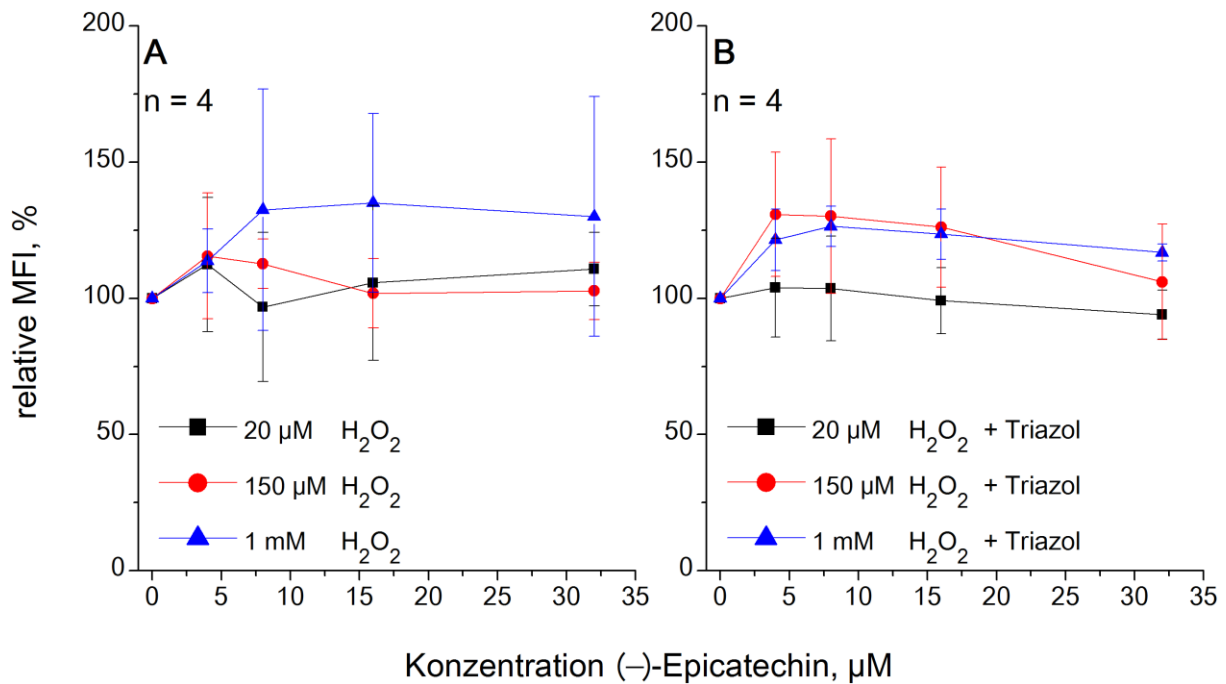


Abbildung 4-13: Einfluss von (-)-Epicatechin auf die APF-Fluoreszenz von Neutrophilen bei Stimulation mit H₂O₂ in 3 verschiedenen Konzentrationen ohne (A) und mit (B) gehemmter Katalase. Neutrophile von 4 Spendern wurden mit APF gefärbt (5 µM, 30 min) und dann mit H₂O₂ in 3 verschiedenen Konzentrationen (20 µM, 150 µM, 1 mM) für 60 min stimuliert. 15 min nach Zugabe von H₂O₂ wurden verschiedene Konzentrationen von (-)-Epicatechin hinzugefügt. Zu jeder Probe gab es eine Kontrolle mit dem Katalasehemmstoff Triazol (10 mM, Zugabe 15 min vor APF). Nach Abschluss der Inkubationen erfolgte die durchflusszytometrische Fluoreszenzmessung von 10 000 Zellen je Probe. Bei jedem Spender wurde so für jede der 3 H₂O₂-Konzentrationen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der (-)-Epicatechin-Konzentration ermittelt. Dann wurden die Fluoreszenzwerte jeweils in Relation zur Kontrolle ohne (-)-Epicatechin (\cong 100 %) gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Daten von den 4 untersuchten Spendern für die Proben ohne (A) und mit (B) Triazol.

Ohne Katalasehemmung (Abbildung 4-13 A) bewirkt (-)-Epicatechin eine deutliche Fluoreszenzsteigerung bei Stimulation mit 1 mM H₂O₂ (im Mittel maximal 135 % der Kontrolle, bei 16 µM (-)-Epicatechin). Dies bestätigt eine Komplex II-Bildung unter diesen Bedingungen. Bei Stimulation mit 20 µM oder 150 µM H₂O₂ zeigt (-)-Epicatechin dagegen kaum Effekte. Wenn die Katalase durch Triazol inhibiert wird (Abbildung 4-13 B), bewirkt (-)-Epicatechin ebenfalls eine Fluoreszenzsteigerung bei Stimulation mit 1 mM H₂O₂ (im Mittel maximal 126 % der Kontrolle, bei 8 µM (-)-Epicatechin). Eine Fluoreszenzsteigerung tritt hier aber auch bei Stimulation mit 150 µM H₂O₂ auf (maximal 131 % der Kontrollfluoreszenz, bei 4 µM (-)-Epicatechin). Bei Einsatz von 20 µM H₂O₂ zeigen sich auch bei Katalasehemmung kaum Effekte auf die APF-Fluoreszenz. Die Zugabe von Triazol bewirkt demnach, dass schon bei geringeren H₂O₂-Konzentrationen (hier 150 µM) Komplex II entsteht (ähnlich wie dies auch *in vitro* der Fall ist [42]). Bei Einsatz von Triazol zeigen sich aber Anzeichen einer verminderten Zellvitalität in der Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung, gezeigt am Beispiel eines Spenders in Abbildung 4-14.

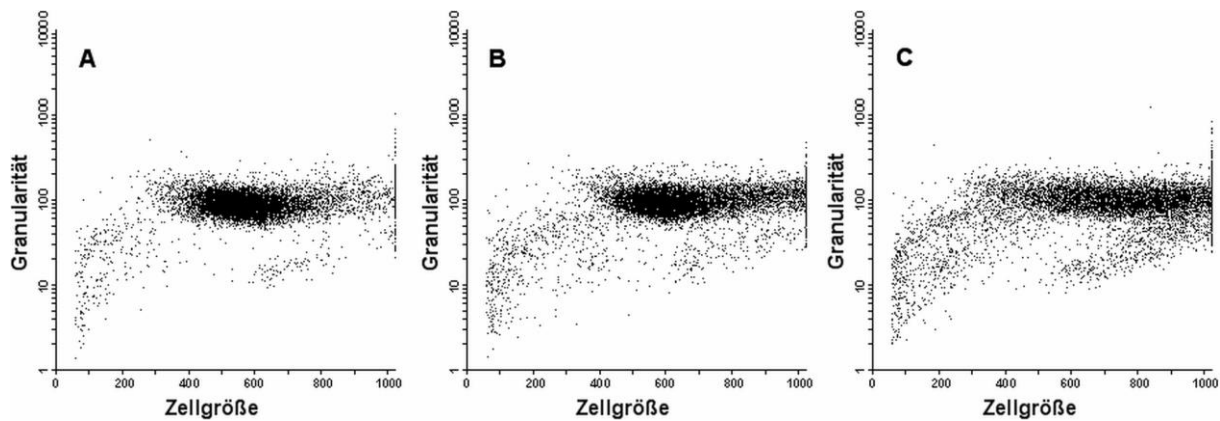


Abbildung 4-14: Auswirkung von H₂O₂-Stimulation und Hemmung der Katalase auf die Neutrophilen eines Spenders. Ansicht von je 10 000 Zellen in der Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung (Maße für Zellgröße und Granularität) ohne Stimulation (A), nach 60-minütiger Stimulation mit 1 mM H₂O₂ (B) und nach 60-minütiger Stimulation mit 150 µM H₂O₂ bei gleichzeitiger Hemmung der Katalase durch Triazol (10 mM) (C).

Bei Hemmung der Katalase und gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit H₂O₂ (150 µM) (Abbildung 4-14 C) befinden sich tendenziell mehr Zellen außerhalb der Zone, in der sich vitale Zellen normalerweise befinden (Abbildung 4-14 A), als bei H₂O₂-Stimulation (1 mM) ohne Katalasehemmung (Abbildung 4-14 B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Zugabe von H₂O₂ zu einer Steigerung der chlorierenden MPO-Aktivität führt. Mit steigenden H₂O₂-Konzentrationen über 100 µM nimmt dieser Effekt kaum weiter zu, was durch eine Bildung von Komplex II zu erklären ist. Bei Stimulation mit 1 mM H₂O₂ liegt ein erheblicher Teil der MPO als Komplex II vor, was sich in einem fluoreszenzsteigernden Effekt von (–)-Epicatechin zeigt. Bei Inhibition der Katalase mit Triazol ist weniger H₂O₂ (150 µM) nötig, um eine vergleichbare Komplex II-Akkumulation herbeizuführen, allerdings kommt es dabei eher zur Schädigung der Zellen. Ein H₂O₂-Überschuss ist demnach auch in Neutrophilen ein funktionierendes Modellsystem für eine Komplex II-Akkumulation. Für die weiteren Experimente wurde dafür H₂O₂ in der Konzentration 1 mM eingesetzt.

4.3.3.2 Effekt von (–)-Epicatechin bei Komplex II-Akkumulation durch H₂O₂

Der Effekt von (–)-Epicatechin auf Neutrophile, die 60 min mit 1 mM H₂O₂ stimuliert wurden, wurde noch einmal bei einer größeren Anzahl Spender untersucht (n = 12). H₂O₂ wurde dabei nach 30-minütiger APF-Färbung (5 µM) hinzugefügt. (–)-Epicatechin wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (von 0 µM (Kontrolle) bis 128 µM) und 15 min nach Zugabe von H₂O₂ hinzugefügt. Die Auswertung erfolgte analog zur Vorgehensweise bei den Unstimulierten. In Abbildung 4-15 sind zunächst die Ergebnisse von 6 der 12 untersuchten

Spender exemplarisch dargestellt. Die Darstellung der Fluoreszenz in Relation zur Kontrolle ohne (-)-Epicatechin des jeweiligen Spenders ermöglicht den Vergleich der Spender untereinander, der ansonsten durch die variable Wirkung von H_2O_2 (siehe 4.3.3.1) erschwert wird.

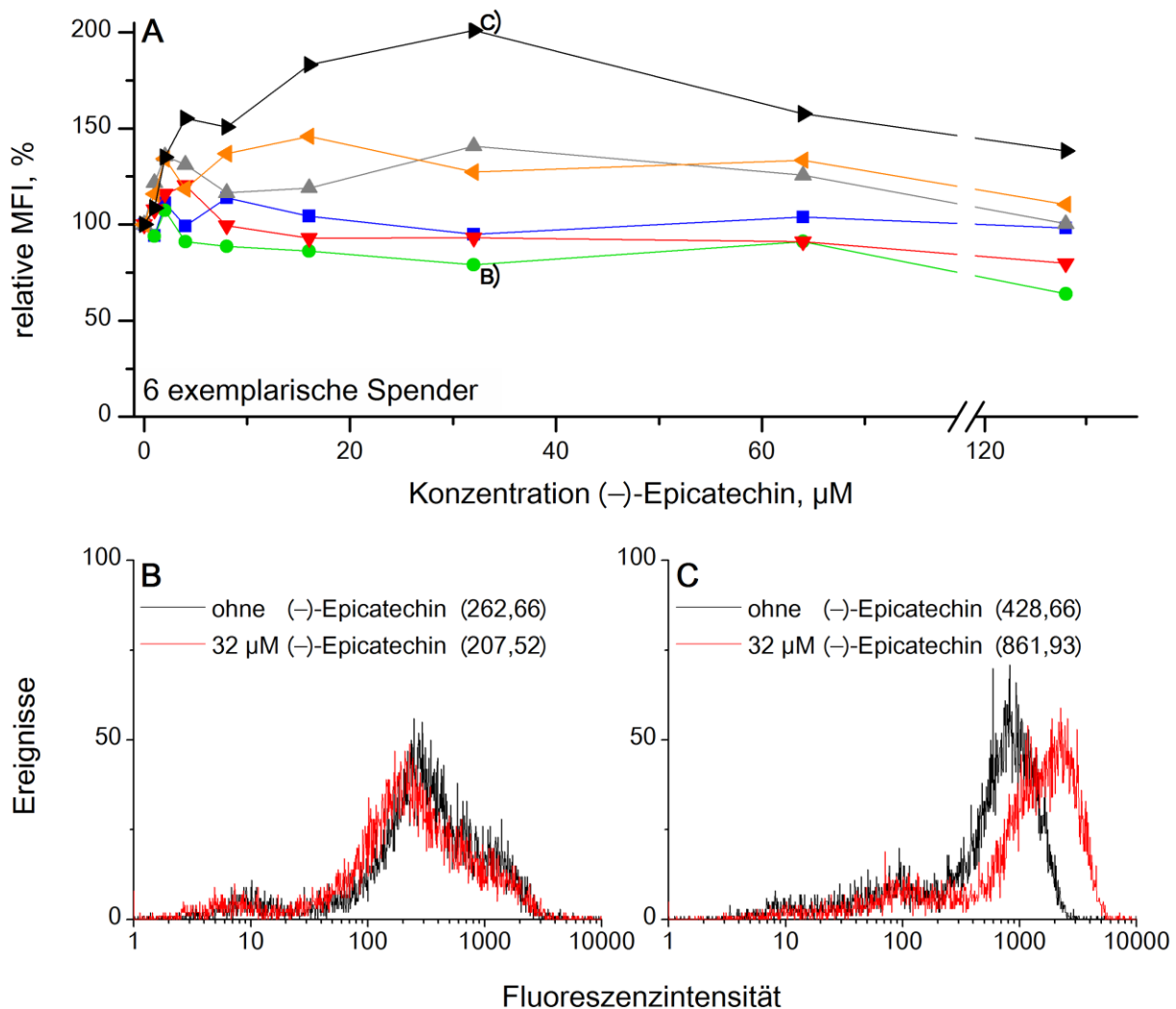


Abbildung 4-15: Einfluss von (-)-Epicatechin auf die APF-Fluoreszenz Neutrophiler bei Stimulation mit 1 mM H_2O_2 . 6 exemplarische Spender (A) sowie Fluoreszenzhistogramme ausgewählter Proben (B und C). Neutrophile wurden mit APF gefärbt (5 µM, 30 min) und dann mit H_2O_2 (1 mM) für 60 min stimuliert. 15 min nach Zugabe von H_2O_2 wurden verschiedene Konzentrationen von (-)-Epicatechin hinzugefügt. Nach Abschluss der Inkubationen wurde durchflusszytometrisch die Fluoreszenz von 10 000 Zellen je Probe gemessen. **A)** Bei jedem Spender wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) in Abhängigkeit von der (-)-Epicatechin-Konzentration ermittelt und dann in Relation zur Kontrolle ohne (-)-Epicatechin ($\pm 100\%$) gesetzt. Die Ergebnisse von 6 der 12 untersuchten Spender sind gezeigt. **B+C)** Dargestellt sind die Fluoreszenzhistogramme von 2 ausgewählten Spendern bei 32 µM (-)-Epicatechin (rot) und ohne (-)-Epicatechin (schwarz). In der Legende ist jeweils in Klammern die MFI angegeben. Die ausgewählten Spender stellen Extrembeispiele dar und sind in A) mit Großbuchstaben markiert.

Es zeigt sich, dass die von (-)-Epicatechin verursachten Veränderungen der APF-Fluoreszenz von Spender zu Spender unterschiedlich sind. So steigert (-)-Epicatechin in der Konzentration 32 µM die MFI eines Spenders auf 201 % der MFI der Kontrolle (Abbildung 4-15 A

(schwarze Kurve) und C). Bei einem anderen Spender wird die APF-Fluoreszenz unter gleichen Bedingungen auf 93 % der Kontrollfluoreszenz gesenkt (Abbildung 4-15 A (grüne Kurve) und B). Insgesamt zeigt sich ein Trend zur Fluoreszenzsteigerung durch (-)-Epicatechin, während Fluoreszenzverringierungen selten vorkommen. Bei 4 von 12 Spendern fanden sich mindestens bei einer (-)-Epicatechin-Konzentration eine MFI, die geringer war als die der Kontrolle ohne (-)-Epicatechin. In Abbildung 4-16 ist die statistische Auswertung aller 12 untersuchten Spender dargestellt.

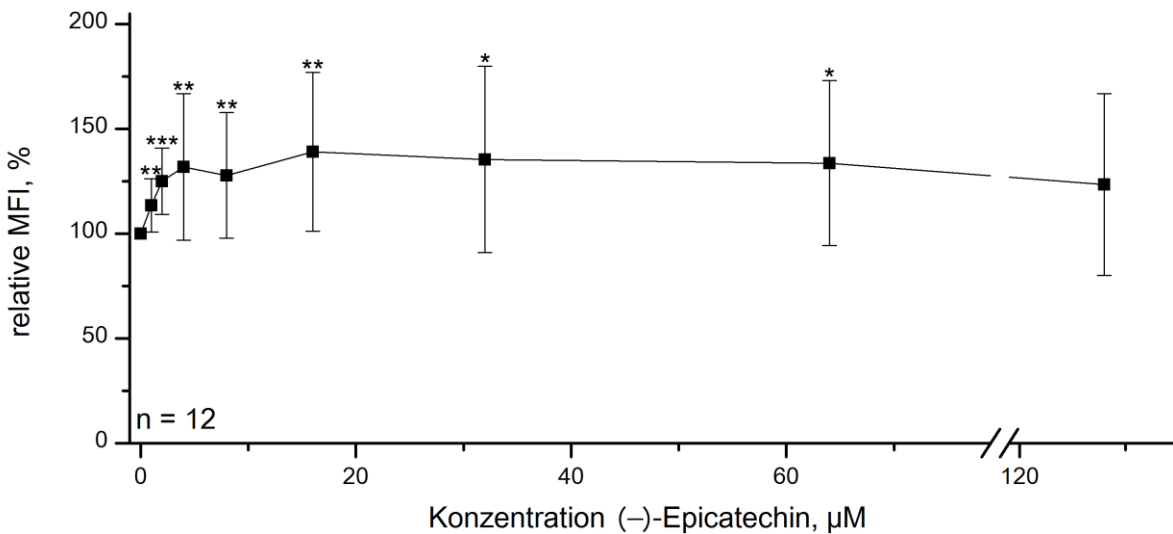


Abbildung 4-16: Einfluss von (-)-Epicatechin auf die APF-Fluoreszenz Neutrophiler bei Stimulation mit 1 mM H_2O_2 . Statistische Auswertung von 12 Spendern. Die Behandlung der Zellen und die Messung und Verarbeitung der Daten erfolgte wie für Abbildung 4-15 A beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen MFI in Abhängigkeit von der (-)-Epicatechin-Konzentration aller 12 untersuchten Spender. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; zweiseitiger Einstichproben-t-Test gegen 100).

Es wird ersichtlich, dass (-)-Epicatechin im Mittel in allen eingesetzten Konzentrationen die APF-Fluoreszenz steigert. Diese Steigerung ist, außer im Falle von 128 μM (-)-Epicatechin, stets statistisch signifikant. Die maximale Steigerung erfolgt bei 16 μM (-)-Epicatechin (auf im Mittel 134 % der Kontrolle, $p = 0,004$). Bei höheren (-)-Epicatechin-Konzentrationen (64 μM , 128 μM) nimmt die Steigerung der APF-Fluoreszenz leicht ab, bleibt aber vorhanden (im Mittel auf 123 % der Kontrollfluoreszenz bei 128 μM (-)-Epicatechin, $p = 0,089$). Die großen Unterschiede zwischen den Spendern spiegeln sich in großen Standardabweichungen wieder (maximal bei 32 μM (-)-Epicatechin: 130 ± 40 % der Kontrollfluoreszenz, $p = 0,019$).

Um zu kontrollieren, ob die gemessenen Effekte der MPO zuzuordnen sind, wurden bei einem Spender Kontrollen mit 4-ABAH und HPF mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-17 dargestellt.

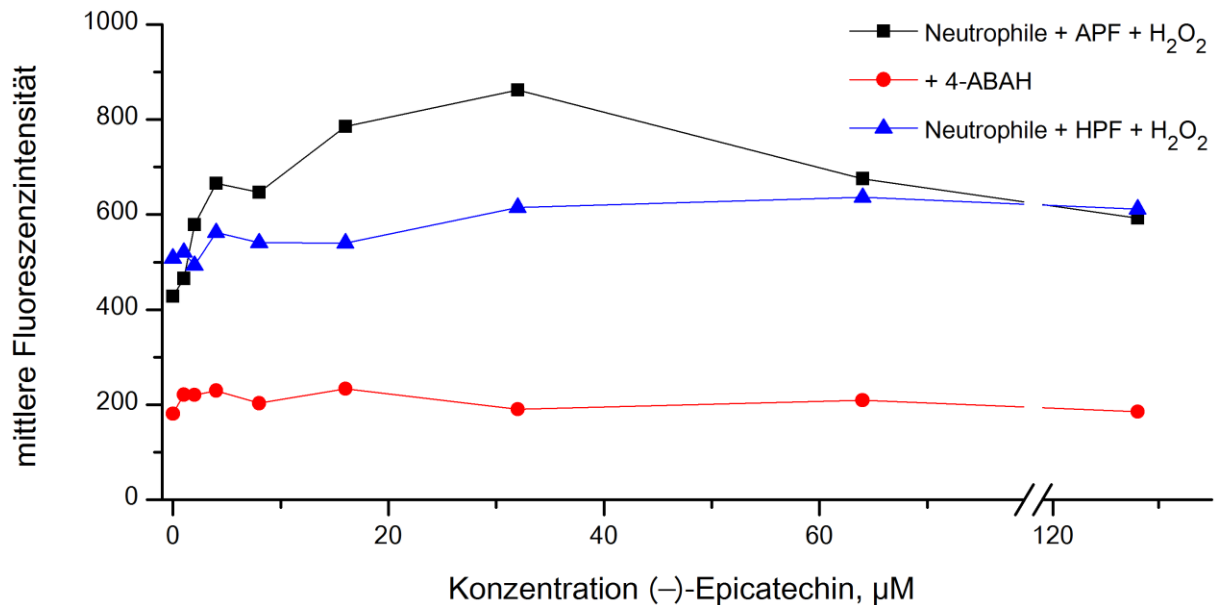


Abbildung 4-17: Fluoreszenz APF-gefärbter und mit H₂O₂ stimulierter Neutrophiler in Abhängigkeit von der (-)-Epicatechin-Konzentration mit Kontrollen. Neutrophile eines Spenders wurden zum Teil mit APF (schwarze und rote Kurve) und zum Teil mit HPF (blaue Kurve) gefärbt (jeweils 5 µM, 30 min). Anschließend wurde H₂O₂ zugesetzt (1 mM, 60 min). Bei einigen der APF-gefärbten Proben wurde zusätzlich der MPO-Inhibitor 4-ABAH (500 µM, rote Kurve) zugesetzt (15 min vor Beginn der Färbung). 15 min nach Zugabe von H₂O₂ wurde (-)-Epicatechin in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt. Nach Abschluss der Inkubationen wurde die Fluoreszenz von 10 000 Zellen je Probe durchflusszytometrisch gemessen.

Die APF-gefärbten Neutrophilen mit 4-ABAH (rot in Abbildung 4-17) sowie die HPF-gefärbten Neutrophilen (blau) zeigen kaum Fluoreszenzveränderungen durch (-)-Epicatechin, was bestätigt, dass der Effekt bei APF-gefärbten Zellen ohne Inhibitor (schwarz) auf die chlorierende MPO-Aktivität zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass (-)-Epicatechin nach einer gezielten Komplex II-Akkumulation durch Stimulation mit 1 mM H₂O₂ eine statistisch signifikante Steigerung der chlorierenden MPO-Aktivität bewirkt. Diese Steigerung ist im Mittel maximal bei 16 µM und nimmt bei höheren (-)-Epicatechin-Konzentrationen leicht ab. Der Effekt von (-)-Epicatechin ist dabei spenderabhängig sehr variabel. Kontrollen mit 4-ABAH und HPF bestätigen, dass die gemessenen Effekte auf die chlorierende Aktivität der MPO zurückzuführen sind.

4.3.4 Grundlagen der Untersuchung Neutrophiler unter nitrosativem Stress

Ein H₂O₂-Überschuss ist zwar ein funktionierendes Modellsystem für eine Komplex II-Akkumulation, *in vivo* spielen solch hohe H₂O₂-Konzentrationen allerdings keine Rolle. Die *in vivo* unter Entzündungsbedingungen auftretende Komplex II-Akkumulation wird vorrangig durch nitrosativen Stress, insbesondere Peroxynitrit (ONOO⁻), verursacht (siehe auch 1.2.2.2).

Um diese Bedingungen experimentell nachzustellen, wurden Neutrophile zum einen mit LPS stimuliert. LPS wirkt als Aktivator der Neutrophilen und bewirkt unter anderem die Bildung von Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) und NO, woraus spontan Peroxynitrit ($ONOO^-$) entsteht [87]. Zum anderen wurde der Peroxynitritdonor SIN-1 verwendet, der direkt und simultan Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) und NO generiert, woraus sich wiederum Peroxynitrit ($ONOO^-$) bildet [91].

Zunächst wurden APF-gefärbte Neutrophile in mehreren Konzentrationen und über unterschiedliche Inkubationszeiten mit LPS stimuliert. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 4-18.

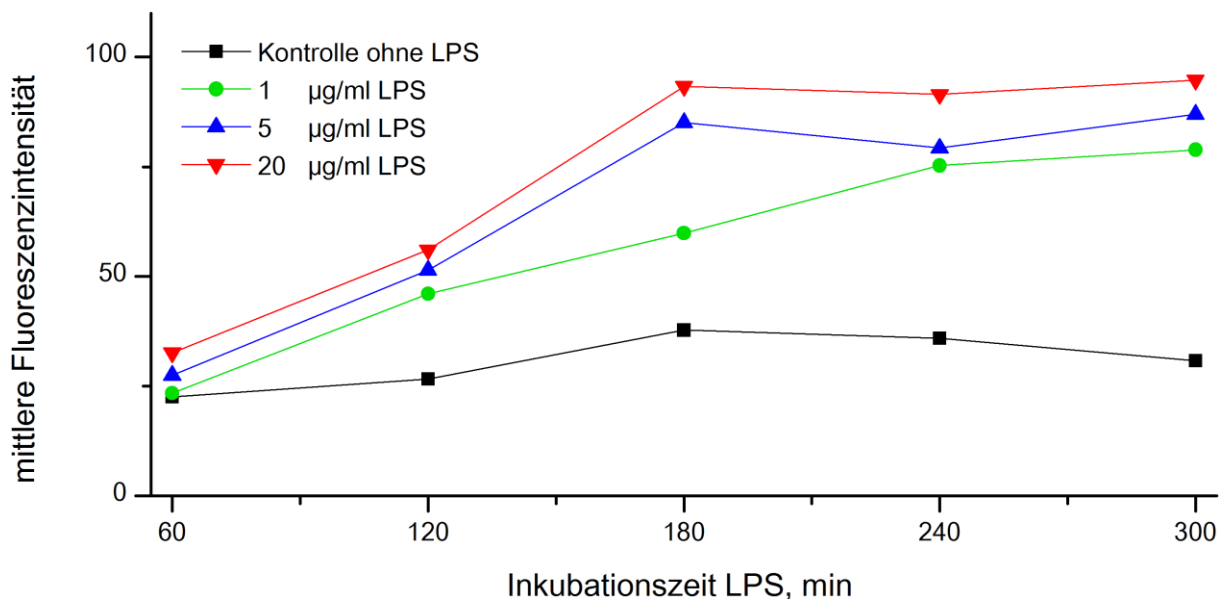


Abbildung 4-18: Fluoreszenz APF-gefärbter Neutrophiler in Abhängigkeit von der LPS-Inkubationszeit bei unterschiedlichen LPS-Konzentrationen. Neutrophile eines Spenders wurden mit APF gefärbt (5 µM, 30 min). Anschließend wurde LPS in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Dabei existierte jeder Ansatz 5-fach, sodass für jede LPS-Konzentration 5 Messungen im Abstand von 60 min durchgeführt werden konnten. Je Probe wurde die Fluoreszenz von 10 000 Zellen durchflusszytometrisch erfasst.

Es zeigt sich, dass LPS eine Erhöhung der APF-Fluoreszenz bewirkt. Die Fluoreszenz steigt dabei sowohl mit steigender LPS-Konzentration, als auch mit steigender LPS-Inkubationszeit an. Bei längeren Inkubationszeiten als 180 min treten allerdings Abweichungen von diesem Verhalten auf. In allen folgenden Experimenten betrug die LPS-Inkubationszeit 180 min.

Bekanntlich kann der Farbstoff APF durch Peroxynitrit ($ONOO^-$) oxidiert werden [78]. Es ist anhand der Daten in Abbildung 4-18 daher nicht möglich darüber zu urteilen, ob die gemessene Erhöhung der APF-Fluoreszenz vom MPO-Produkt HOCl oder von Peroxynitrit ($ONOO^-$) verursacht wird. Um diese beiden Effekte diskriminieren zu können, wurde HPF eingesetzt (HPF wird, wie APF, von Peroxynitrit ($ONOO^-$) oxidiert [78], reagiert aber in deutlich geringerem Maß als APF mit HOCl, siehe 4.2.1). Bei 2 Spendern wurde erneut die

Abhängigkeit der APF-Fluoreszenz von der LPS-Konzentration (LPS-Inkubationszeit 180 min) gemessen, diesmal wurde jedoch für jede Probe eine HPF-Kontrolle mitgeführt. In Abbildung 4-19 ist dargestellt, wie stark sich die Fluoreszenz durch Zugabe von LPS in der jeweiligen Konzentration steigert.

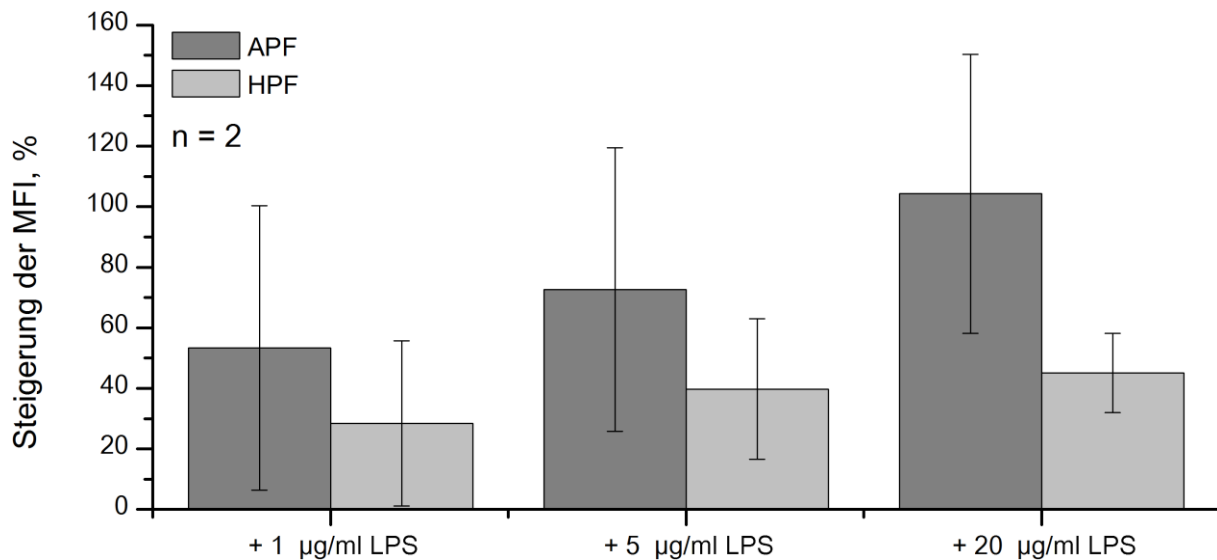


Abbildung 4-19: Steigerung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) APF- bzw. HPF-gefärbter Neutrophiler bei Zugabe von LPS in unterschiedlichen Konzentrationen. Neutrophile zweier Spender wurden 30 min mit APF bzw. HPF (jeweils 5 µM) inkubiert und dann weitere 180 min mit LPS in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Die Fluoreszenz von 10 000 Zellen je Probe wurde durchflusszytometrisch gemessen. Bei jedem Spender wurde so ermittelt, wie sich die MFI durch Zugabe von LPS ändert (relativ zur Kontrolle ohne LPS). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Daten von den beiden untersuchten Spendern.

Die Steigerung der Fluoreszenz durch LPS ist bei APF-Färbung deutlich stärker als bei Färbung mit HPF. Dieser Unterschied deutet darauf hin, dass zumindest ein erheblicher Teil des LPS-bedingten Fluoreszenzanstiegs bei den APF-gefärbten Neutrophilen durch HOCl verursacht wird. LPS steigert demnach die chlorierende MPO-Aktivität. Dagegen ist keine valide Aussage darüber möglich, ob und wieviel Peroxynitrit (ONOO^-) gebildet wird und welchen Anteil es an der Steigerung der APF-Fluoreszenz hat, denn der Anstieg der HPF-Fluoreszenz kann sowohl durch Peroxynitrit (ONOO^-) als auch durch HOCl bedingt sein.

Die Wirkung des Peroxynitritdonors SIN-1 wurde sowohl bei APF- als auch bei HPF-gefärbten Neutrophilen untersucht. Dazu wurden die Neutrophilen 90 min mit unterschiedlichen Konzentrationen von SIN-1 inkubiert. Die Zellen wurden zudem zusätzlich mit PMA stimuliert (1 nM, 60 min), um die chlorierende MPO-Aktivität zu erhöhen. Die Ergebnisse eines exemplarischen Spenders sind in Abbildung 4-20 dargestellt.

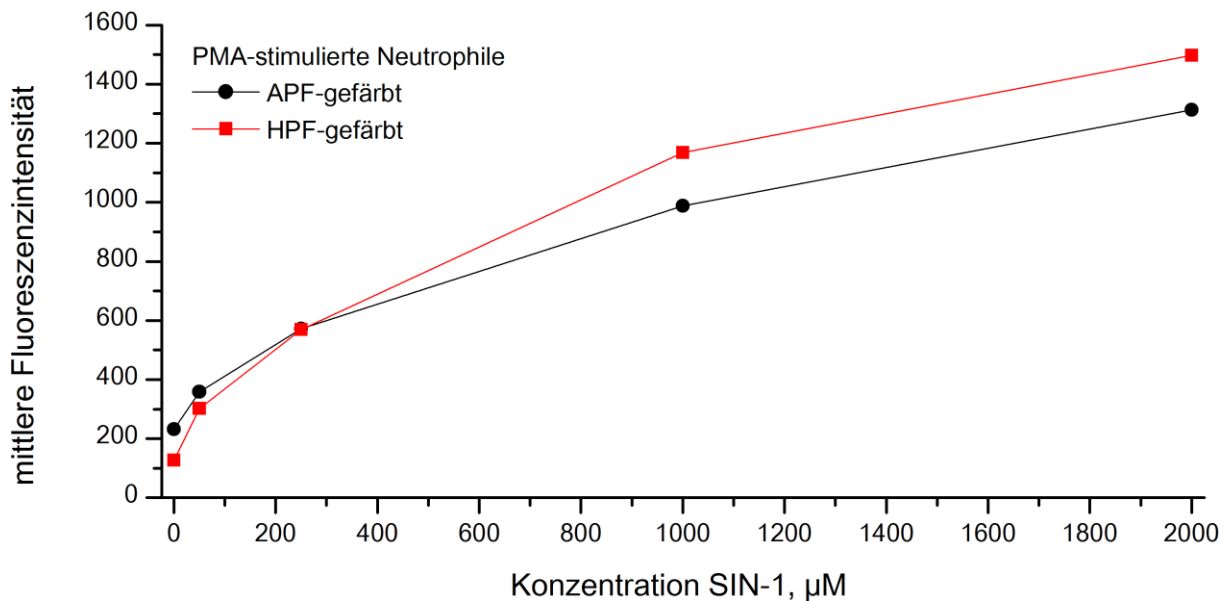


Abbildung 4-20: Fluoreszenz APF- bzw. HPF-gefärbter, PMA-stimulierter Neutrophiler in Abhängigkeit von der SIN-1-Konzentration. Neutrophile eines Spenders wurden mit APF bzw. HPF gefärbt (jeweils 5 µM, 30 min). Anschließend wurde SIN-1 in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. 30 min später wurde zusätzlich PMA (1nM) hinzugefügt und die Neutrophilen weitere 60 min inkubiert. Je Probe wurde dann die Fluoreszenz von 10 000 Zellen durchflusszytometrisch gemessen.

Durch die Zugabe von SIN-1 wird sowohl die APF- als auch die HPF-Fluoreszenz der Neutrophilen in vorher nicht gekanntem Ausmaß gesteigert. Weder durch Stimulation mit PMA (siehe 4.2.2) noch mit H₂O₂ (siehe 4.3.3.1) resultieren bei APF-gefärbten Neutrophilen mittlere Fluoreszenzintensitäten über 1000 relativen Einheiten. Bei dem in Abbildung 4-20 dargestellten Spender beträgt die MFI bei PMA-Stimulation 231,54 relative Einheiten, bei zusätzlicher Zugabe von 2 mM SIN-1 erhöht sie sich auf 1313,01 relative Einheiten. Zudem steigert SIN-1 auch die HPF-Fluoreszenz, diese verhält sich annähernd analog zur APF-Fluoreszenz und wird sogar etwas stärker durch SIN-1 gesteigert. Sowohl die sehr hohen APF-Fluoreszenzwerte als auch der starke Einfluss von SIN-1 auf die HPF-Fluoreszenz deuten darauf hin, dass ein Großteil der gemessenen Effekte auf Peroxynitrit (ONOO⁻) zurückgeht. Der Anteil von HOCl an der APF-Fluoreszenz und damit die chlorierende MPO-Aktivität kann auf Basis der erfassten Daten nicht quantifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die chlorierende MPO-Aktivität mit LPS stimuliert werden kann. Ob und wieviel Peroxynitrit (ONOO⁻) bei Stimulation mit LPS entsteht, kann nicht sicher beurteilt werden. Mit SIN-1 ist dagegen sicher eine Peroxynitritproduktion möglich. Sowohl die APF- als auch die HPF-Fluoreszenz reagieren sehr stark auf Peroxynitrit (ONOO⁻), sodass die chlorierende MPO-Aktivität unter diesen Bedingungen nicht mit dem APF/HPF-System quantifiziert werden kann.

4.4 Grundlagen für die Untersuchung der MPO am Vollblut

Aus den Ergebnissen in Abschnitt 4.3 geht hervor, dass (-)-Epicatechin nur dann eine Fluoreszenzsteigerung bei APF-gefärbten Neutrophilen bewirkt, wenn die MPO zu großen Teilen als Komplex II vorliegt. Auf Basis dieser Erkenntnis könnte Blut (z. B. von Patienten) auf eine Komplex II-Akkumulation der MPO hin untersucht werden. Hilfreich wäre dafür ein möglichst einfaches und schnelles Untersuchungsverfahren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Grundlagen für eine Untersuchung der MPO am Vollblut erarbeitet. Sie basieren auf der Möglichkeit, in der Analyse durchflusszytometrisch untersuchter Zellen nur bestimmte Fraktionen zu betrachten, sodass die Isolation der Neutrophilen überflüssig wird. Zunächst wurde überprüft, wie sich das Weglassen einzelner Schritte der Isolationsprozedur auf die resultierende Zelllösung auswirkt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-21 am Beispiel eines exemplarischen Spenders dargestellt.

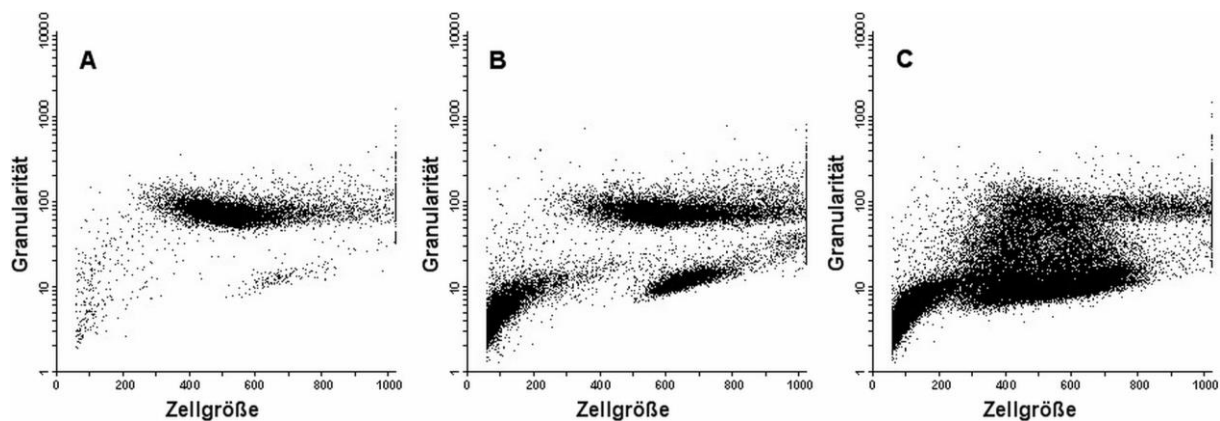


Abbildung 4-21: Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung (Maße für Zellgröße und Granularität) der Zellen eines Spenders bei Weglassen verschiedener Isolationschritte. Neutrophile eines Spenders wurden unterschiedlichen Prozeduren des Isolationsprotokolls unterzogen und die jeweils resultierende Zelllösung durchflusszytometrisch untersucht. **A)** Ansicht bei normaler Isolationsprozedur (10 000 Messereignisse wurden erfasst). **B)** Ansicht ohne Dichtegradientenzentrifugation (20 000 Messereignisse wurden erfasst). **C)** Ansicht ohne Dichtegradientenzentrifugation sowie ohne hypotone Lyse (50 000 Messereignisse wurden erfasst)

Die Fraktion der Granulozyten (klar abzugrenzen in der Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung nach der etablierten Isolationsprozedur, Abbildung 4-21 A) ist auch bei Weglassen der Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung 4-21 B) noch deutlich abgrenzbar. Bei den zusätzlich sichtbaren Fraktionen dürfte es sich um die übrigen Leukozyten sowie Thrombozyten handeln. Wird zusätzlich die hypotone Lyse gestrichen, d. h. findet nur noch die Dextranedimentation statt (Abbildung 4-21 C), gelangt auch eine große Zahl Erythrozyten in die Zelllösung und die Fraktionen können nicht mehr klar anhand von Granularität und Zellgröße abgegrenzt werden.

Um die Zellfraktionen dennoch differenzieren zu können, wurde neben Zellgröße und Granularität nun zusätzlich, mithilfe von APF, die chlorierende MPO-Aktivität betrachtet. Die Dextran sedimentation (60 min) wurde beibehalten, um die starke Überzahl der Erythrozyten im Vollblut (etwa 500- bis 1000-fach gegenüber den Leukozyten [84]) zu vermindern. Je Blutentnahmeröhrchen wurde 1 ml des Überstands abgenommen, zentrifugiert (5 min, 400 g) und in 10 ml Puffer (HBSS mit Calcium, pH 7,4) resuspendiert. Diese Zelllösung wurde dann direkt mit APF gefärbt (5 μ M, 30 min) und durchflusszytometrisch untersucht (50 000 Ereignisse pro Messung). Zur Kontrolle wurde parallel die Abgrenzung der Neutrophilen mit einem etablierten Verfahren (Anti-CD16 FITC) durchgeführt. Abbildung 4-22 zeigt die Ergebnisse anhand eines exemplarischen Spenders.

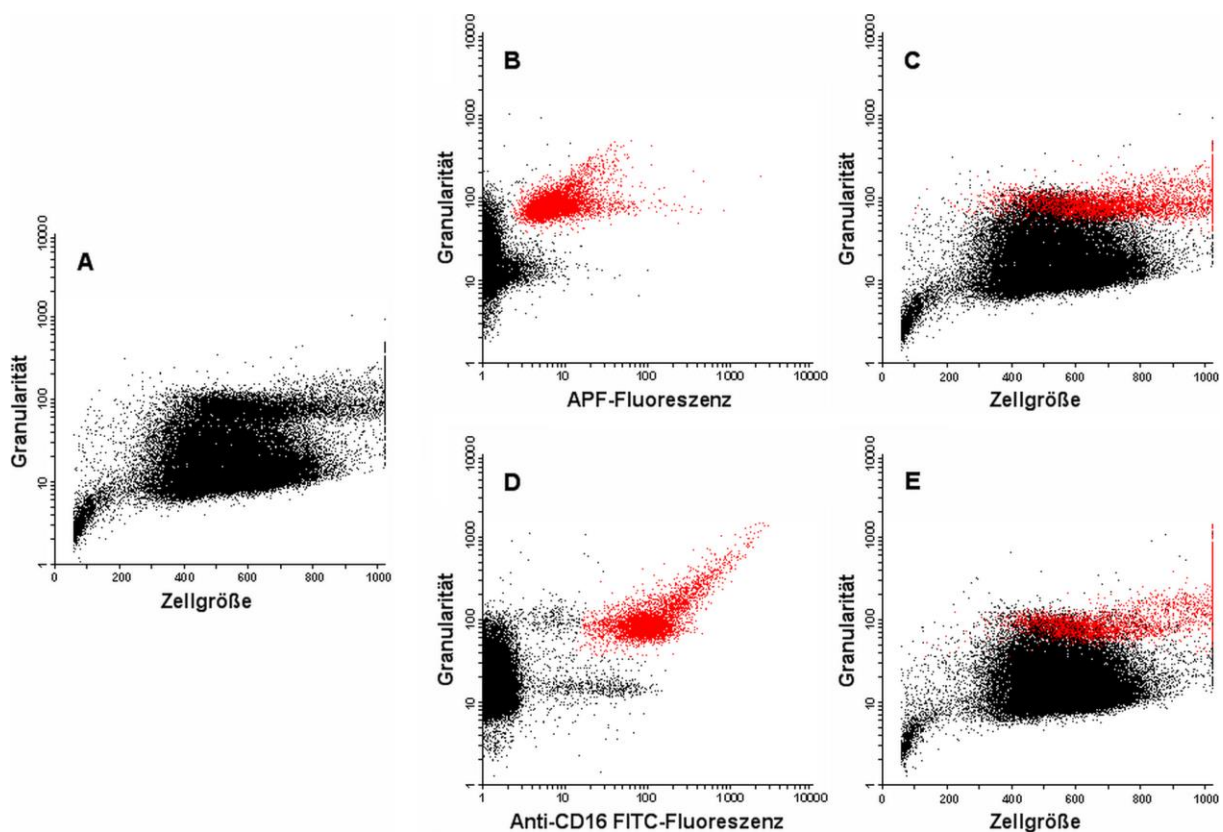


Abbildung 4-22: Durchflusszytometrische Abgrenzung der Granulozytenfraktion mittels APF-Färbung (B+C) und Kontrolle mittels Anti-CD16-FITC-Färbung (D+E). Vollblut eines exemplarischen Spenders wurde einer Dextran sedimentation (60 min) unterworfen. Je Blutentnahmeröhrchen wurde 1 ml des Überstands abgenommen, zentrifugiert (5 min, 400 g) und in 10 ml HBSS-Puffer (mit Calcium, pH 7,4) resuspendiert. Die resultierende Zelllösung wurde gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch untersucht (50 000 Ereignisse pro Probe). **A)** Standardmäßige Ansicht in der Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung (Maße für Zellgröße und Granularität). **B+C)** Die Zelllösung wurde mit APF gefärbt (5 μ M, 30 min). Bei Auftragung der APF-Fluoreszenz gegen das Seitwärtsstreulicht kann die Granulozytenfraktion abgegrenzt und markiert werden (B). Diese Markierung wurde auf die Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung übertragen (C). **D+E)** Die Zelllösung wurde mit Anti-CD16 FITC gefärbt (2 μ l Färbelösung/ml, 30 min). Bei Auftragung der FITC-Fluoreszenz gegen das Seitwärtsstreulicht kann die Fraktion der Neutrophilen abgegrenzt und markiert werden (D). Diese Markierung wurde auf die Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung übertragen (E).

Das in Abbildung 4-22 dargestellte Experiment wurde mit Vollblut von insgesamt 5 Spendern durchgeführt. Es wurde dabei jeweils auch errechnet, welchen Anteil die mittels APF ermittelte Granulozytenfraktion an allen Messereignissen hatte. Dieser Wert wurde mit der per Anti-CD16-FITC-Methode ermittelten Neutrophilenfraktion verglichen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4-3.

Tabelle 4-3: Anteil der ermittelten Fraktionen an allen (50 000) erfassten Messereignissen. Die mittels APF ermittelte Granulozytenfraktion sowie die mittels Anti-CD16 FITC ermittelte Neutrophilenfraktion wurden, wie in Abbildung 4-23 dargestellt, markiert und ihr Anteil an allen gemessenen Ereignissen errechnet. Der Unterschied zwischen beiden Fraktionen wurde errechnet und prozentual auf die mit APF ermittelte Fraktion bezogen. Die untere Hälfte der Tabelle zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von 5 untersuchten Spendern.

in Abbildung 4-22 dargestellter Spender	Granulozytenfraktion (APF-Methode)	12,64 %
	Neutrophile (Anti-CD16-FITC-Methode)	9,36 %
	Unterschied (bezogen auf APF-Methode)	25,95 %
alle untersuchten Spender (n = 5)	Granulozytenfraktion (APF-Methode)	12,39 ± 3,75 %
	Neutrophile (Anti-CD16-FITC-Methode)	8,68 ± 2,09 %
	Unterschied (bezogen auf APF-Methode)	29,03 ± 5,48 %

Es wird ersichtlich, dass mithilfe der gleichzeitigen Betrachtung von APF-Fluoreszenz und Granularität der Zellen die Granulozytenfraktion recht sicher abgrenzbar ist. Abbildung 4-22 zeigt, dass die mit dieser Methode selektierten Zellen in der selben Region (in der Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung) liegen wie die mit der etablierten Anti-CD16-FITC-Methode selektierten Neutrophilen. Die Neutrophilen werden demnach mit der APF-Methode erfasst. Die mithilfe der APF-Methode selektierte Fraktion enthält im Mittel 12 %, die Anti-CD16-FITC-Kontrolle 9 % aller Messereignisse. Der Unterschied ist zum Teil dadurch zu erklären, dass die Eosinophilen durch APF mit erfasst werden (HOBr, das Produkt der EPO, kann APF oxidieren [79]).

Bei der angewandten Untersuchungsmethode des Vollbluts nach Dextranedimentation kann also mithilfe von APF die relevante Zellfraktion recht sicher selektiert werden. Zugleich kann deren chlorierende MPO-Aktivität beurteilt werden. In Abbildung 4-23 ist dies am Beispiel eines Spenders dargestellt. Zudem ist gezeigt, wie sich die Stimulation der chlorierenden MPO-Aktivität mit H₂O₂ (1 mM, 60 min) unter diesen Bedingungen auswirkt.

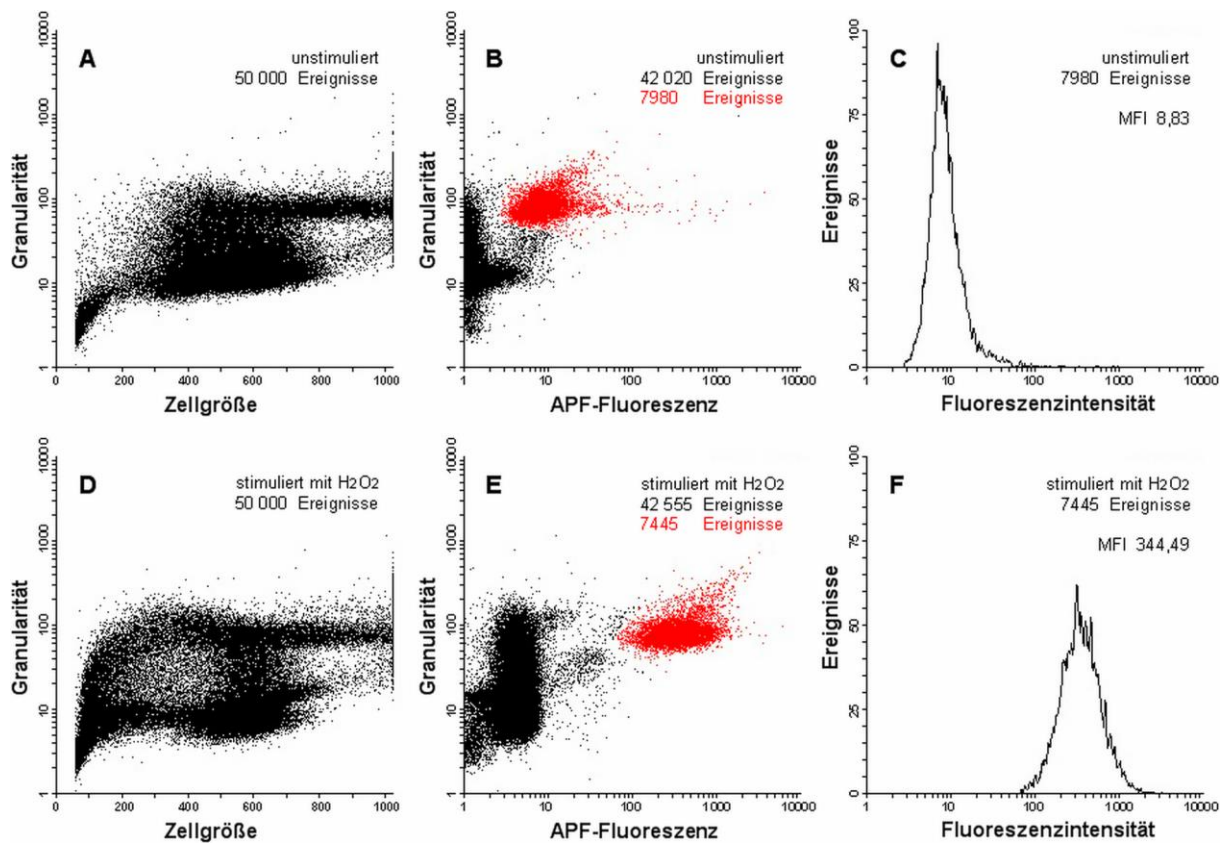


Abbildung 4-23: Durchflusszytometrische Abgrenzung der Granulozytenfraktion mittels APF-Färbung ohne (B) und mit H₂O₂-Stimulation (E). Fluoreszenzhistogramme der selektierten Fraktionen (C+F). Vollblut eines exemplarischen Spenders wurde einer Dextran-sedimentation (60 min) unterworfen. Je Blutentnahmeröhrchen wurde 1 ml des Überstands abgenommen, zentrifugiert (5 min, 400 g) und in 10 ml HBSS-Puffer (mit Calcium, pH 7,4) resuspendiert. Die resultierende Zelllösung wurde mit APF gefärbt (5 µM, 30 min), zum Teil mit H₂O₂ stimuliert (1 mM, 60 min) und anschließend durchflusszytometrisch untersucht (50 000 Ereignisse pro Probe). A, B und C zeigen die unstimulierten, D, E und F die mit H₂O₂ stimulierten Proben. **A+D**) Standardmäßige Ansicht in der Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung (Maße für Zellgröße und Granularität). **B+E**) Auftragung der APF-Fluoreszenz gegen das Seitwärtsstreulicht und Markierung der Granulozytenfraktion. **C+F**) Darstellung nur der markierten Fraktion im Fluoreszenzhistogramm mit Angabe der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI).

Nach Stimulation der chlorierenden MPO-Aktivität mit H₂O₂ können die Granulozyten anhand von APF-Fluoreszenz und Granularität differenziert werden (Abbildung 4-23 E). Sie sind dabei etwas besser abgrenzbar als im Falle der unstimulierten Zellen (Abbildung 4-23 B). Die APF-Fluoreszenzen der selektierten Fraktionen können spezifisch ausgewertet werden (Abbildung 4-23 C und F). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der unstimulierten (8,83 relative Einheiten) und mit H₂O₂ stimulierten Zellen (344,49 relative Einheiten) liegen in vergleichbaren Größenordnungen wie bei der Betrachtung isolierter Neutrophiler unter gleichen Bedingungen (siehe 4.3.3.1). Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich bei den selektierten Zellfraktionen zu großen Teilen um Neutrophile handelt. Die in Abbildung 4-23 dargestellten Ergebnisse konnten in ähnlicher Weise bei 4 weiteren Spendern reproduziert werden (nicht gezeigt).

Es lässt sich zusammenfassen, dass durch Verzicht auf die Isolation der Neutrophilen und Untersuchung von Vollblut nach lediglich einer Dextransedimentation die Möglichkeit verloren geht, die Granulozytenfraktion anhand von Zellgröße und Granularität durchflusszytometrisch klar abzugrenzen. Mithilfe der zusätzlichen Betrachtung der APF-Fluoreszenz kann aber eine Zellfraktion selektiert werden, die zu großen Teilen aus Neutrophilen besteht. Dies ist sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Zellen möglich. Die chlorierende MPO-Aktivität der so selektierten Granulozytenfraktion kann dann anhand der APF-Fluoreszenz quantifiziert werden.

5 DISKUSSION

5.1 Reinheit und Vitalität der Neutrophilen-Suspension

Die MPO kommt im menschlichen Körper hauptsächlich in den neutrophilen Granulozyten vor [25]. Um die MPO am Zellmodell zu untersuchen, wurden daher für diese Arbeit humane Neutrophile aus frisch (maximal 1 bis 2 Stunden vor Isolationsbeginn) abgenommenem Vollblut von Blutspendern isoliert. Die resultierende Neutrophilen-Suspension wurde mehrfach auf Reinheit und Vitalität untersucht. Zur Überprüfung der Reinheit wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoffen FITC bzw. APC gekoppelte Antikörper gegen CD16 bzw. CCR3 verwendet. CD16 ist auf Neutrophilen sowie Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen zu finden [100]. Da von den genannten Zellen durch die Dichtegradientenzentrifugation nur die Neutrophilen in die Zelllösung gelangen, konnten mit den FITC-konjugierten Anti-Human-CD16-Antikörpern die Neutrophilen selektiv gefärbt werden. CCR3 ist ein Chemokinrezeptor, der auf eosinophilen [101], und basophilen [102] Granulozyten vorkommt. Auch die gemeinsame Fraktion der Eosinophilen und Basophilen konnte so selektiv angefärbt werden. Die Vitalität wurde mit dem Farbstoff JC-1 untersucht. Liegt dieser Farbstoff in einer angefärbten Zelle vorrangig als Aggregat vor, spricht das für eine intakte Mitochondrienmembran und damit für die Vitalität der Zelle (Der Verlust der Integrität der Mitochondrienmembran ist ein frühes Apoptosezeichen) [103, 104].

Die Analyse von 3 unabhängigen Isolationen ergab, dass die Neutrophilen im Mittel 90,77 % aller Messereignisse ausmachen, die Eosinophilen und Basophilen gemeinsam 5,68 % und alle übrigen Ereignisse 3,55 %. Die Größe der gemeinsamen Eosinophilen- und Basophilen-Fraktion schwankt dabei recht stark (Standardabweichung 4,02 %). Angemerkt werden muss, dass die Markierung der Zellfraktionen (dargestellt in Abbildung 4-1) manuell erfolgte und die genannten Anteile eher als Orientierungswerte zu verstehen sind. Dennoch kann von einem durchschnittlichen Neutrophilenanteil um 90 % ausgegangen werden. Dazu kommt, dass bei jeder durchflusszytometrischen Messung zwangsläufig auch einige nichtzelluläre Bestandteile mit erfasst werden, sodass der Neutrophilenanteil, nur bezogen auf die Zellen, noch etwas höher liegen dürfte. Bei Betrachtung der genannten Werte und Orientierung an der normalen Häufigkeitsverteilung zwischen Eosinophilen und Basophilen im humanen Blut [84], dürfte die Suspension durchschnittlich etwa 5 % Eosinophile (bei relativ großer Schwankungsbreite) und ca. 1 % Basophile enthalten. Außerdem ist, aufgrund ihrer etwa 500- bis 1000-fachen Überzahl gegenüber den Leukozyten [83], zu vermuten, dass trotz der

Dextran sedimentation und dreifachen hypotonen Lyse einige Erythrozyten in die Suspension gelangen. Die Vitalitätsuntersuchung der Zellen in der Suspension nach 4 unabhängigen Isolationen ergab einen vitalen Anteil von im Mittel 90,29 %. Auch hier muss angemerkt werden, dass die Markierung der vitalen Fraktion (dargestellt in Abbildung 4-2) manuell erfolgte und die Ergebnisse eher zur Orientierung dienen, als dass sie exakte Werte darstellen. Da sowohl in nichtzellulären Bestandteilen als auch in Erythrozyten keine JC-1-Aggregatbildung (die eine intakte Mitochondrienmembran voraussetzt) möglich ist, dürfte der vitale Anteil bei den Granulozyten aber größer als der insgesamt gemessene sein. Es kann also davon ausgegangen werden, dass über 90 % der Granulozyten nach der Isolation vital sind.

Die Isolationsprozedur liefert also eine Zellsuspension, die zu über 90 % vitale Zellen enthält, und die zu untersuchenden Neutrophilen machen im Mittel über 90 % der Zellen in der Suspension aus. Die Vitalität liegt im Rahmen dessen, was nach einer solchen Prozedur zu erwarten ist. Höchstwahrscheinlich geht ein Teil der Zellen bei den Zentrifugations- und Lyse-Schritten während der Isolation zugrunde. Zudem gehen Neutrophile in *ex vivo*-Kulturen rasch in Apoptose, die Halbwertszeit beträgt 18 Stunden [110]. Da insgesamt immer mehrere Stunden zwischen Blutentnahme und Untersuchung der Zellen am Durchflusszytometer vergehen, kann man mit einer Vitalität von 90 % zufrieden sein. Die Reinheit der Suspension wird dadurch limitiert, dass die Granulozytenfraktion im verwendeten Isolationsprotokoll nicht weiter aufgetrennt wird. Andere Verunreinigungen (Erythrozyten und nichtzelluläre Bestandteile) sind mit durchschnittlich 3,5 % der Messereignisse dagegen nur geringfügig vorhanden und schwerlich zu vermeiden. Sie dürften zudem bei Fluoreszenzmessungen mit APF bzw. HPF kaum Einfluss nehmen. Zu beachten ist aber, dass die Suspension im Mittel etwa 5 % Eosinophile enthält. Da HOBr, ein Produkt der EPO, APF oxidieren kann [79], muss davon ausgegangen werden, dass bei Untersuchungen mit APF ein kleiner Teil der gemessenen Fluoreszenz von der bromierenden Aktivität der EPO in Eosinophilen verursacht wird. Zu verhindern wäre das nur durch eine zusätzliche Separierung der Eosinophilen, die aber aufwändig und zudem der Zellvitalität abträglich ist [111].

Zusammenfassend erhält man nach der verwendeten Isolationsprozedur eine Neutrophilen-Suspension mit einer zufriedenstellenden Vitalität von über 90 % und einer Reinheit um 90 %. Letztere wäre nur mit beträchtlichem (und zellschädlichem) Aufwand weiter zu erhöhen, und so muss ein leichter Einfluss der Eosinophilen (Anteil um 5 %) akzeptiert werden.

5.2 Messung der chlorierenden MPO-Aktivität in Neutrophilen

In dieser Arbeit wurde die chlorierende MPO-Aktivität in Neutrophilen mit den Fluoreszenzfarbstoffen APF und (in geringerem Maße von Bedeutung) HPF gemessen, die eine spezifische Detektion von HOCl erlauben [78] (zur Funktionsweise siehe Abschnitt 3.2.3.2). Die Fluoreszenz in den Zellen wurde dabei durchflusszytometrisch quantifiziert. Erste Erfahrungen mit dem Einsatz von APF/HPF am Zellmodell bestanden innerhalb der Arbeitsgruppe bereits [79], im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode weiter evaluiert. Dazu wurden APF- und HPF-gefärbte Neutrophile mit PMA und H₂O₂ behandelt, wobei stets Kontrollen mit dem MPO-Inhibitor 4-ABAH mitgeführt wurden. Darüber hinaus wurde der Effekt von PMA auf die APF-Fluoreszenz von Neutrophilen weiter untersucht und mithilfe verschiedener Hemmstoffe überprüft, ob andere Oxidantien als HOCl Einfluss auf die APF-Fluoreszenz nehmen.

Sowohl H₂O₂ als auch PMA bewirken eine deutliche Steigerung der APF-Fluoreszenz. Auch die HPF-Fluoreszenz wird durch die beiden Substanzen gesteigert, jedoch in deutlich geringerem Maße. Die Zugabe des MPO-Inhibitors 4-ABAH bewirkt eine nahezu vollständige Aufhebung all dieser Effekte.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die APF-Fluoreszenz die chlorierende MPO-Aktivität abbildet: H₂O₂ ist Substrat der MPO und für die Bildung von Komplex I notwendig, Komplex I wiederum oxidiert Chlorid zu HOCl (siehe auch Abbildung 1-3). PMA induziert über die Aktivierung der Proteinkinase C die Bildung von Superoxidanionen (O₂^{•-}) durch die NADPH-Oxidase [84], welche wiederum, spontan oder durch die Superoxiddismutase, zu H₂O₂ umgesetzt werden [85]. Eine Erhöhung der chlorierenden Aktivität durch H₂O₂ und PMA ist also zu erwarten. Die Aufhebung des Effektes der beiden Substanzen durch 4-ABAH spricht ebenfalls dafür, dass die gemessenen Effekte auf die APF-Fluoreszenz MPO-vermittelt sind.

Dass H₂O₂ und PMA auch eine (wenngleich deutlich geringere) Steigerung der HPF-Fluoreszenz bewirken, war dagegen anhand der Originalveröffentlichung der Entwickler Setsukinai et al. [78] nicht zu erwarten, laut der HPF nicht durch HOCl oxidiert wird. Andererseits zeigt die Aufhebung dieses Effektes durch 4-ABAH, dass die MPO und damit höchstwahrscheinlich HOCl dafür verantwortlich ist. Auch *in vitro*-Untersuchungen zeigen, dass HPF durch HOCl oxidiert wird, wenn auch in geringerem Maß als APF [79]. Es kann daher festgehalten werden, dass HPF von HOCl oxidiert werden kann. HPF-Kontrollen haben daher geringere Aussagekraft als angenommen, denn eine Veränderung der HPF-Fluoreszenz

kann auch durch HOCl bewirkt werden und muss nicht zwingend durch ein anderes Oxidans (Peroxynitrit (ONOO^-) oder Hydroxylradikale ($\text{HO}\cdot$)) verursacht sein.

Auffällig ist, dass die mittlere Fluoreszenzintensität bei unstimulierten HPF-gefärbten Neutrophilen deutlich höher liegt als die der APF-gefärbten Neutrophilen (vgl. dazu die kräftig blauen Kurven in Abbildung 4-3 A und C (APF-gefärbt) mit jenen in Abbildung 4-3 B und D (HPF-gefärbt)). Die "basale Fluoreszenzintensität" liegt, zumindest beim Einsatz in Neutrophilen wie in dieser Arbeit, bei HPF demnach höher als bei APF. Dieser Unterschied zwischen den beiden Farbstoffen war durchgehend bei allen untersuchten Spendern zu beobachten, ist jedoch *in vitro* nicht vorhanden [79], und wird auch in der Originalveröffentlichung nicht erwähnt [78], obwohl dort fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Neutrophilen durchgeführt wurden. Er führt dazu, dass beim Einsatz von HPF als Kontrolle nur der Vergleich relativer Fluoreszenzänderungen sinnvoll ist (wie es bspw. in Abbildung 4-4 gezeigt ist). Die absoluten Werte (mittlere Fluoreszenzintensität) sind dagegen zwischen den beiden Farbstoffen nicht vergleichbar, zumindest nicht bei Einsatz am Zellmodell. Der Grund für die höhere "basale Fluoreszenzintensität" bei HPF kann nur vermutet werden. In einem Fachartikel berichtet einer der Entwickler von APF und HPF, dass beide Farbstoffe zwar gut in Zellen hineingelangen, aber auch recht schnell aus diesen herausdiffundieren [112]. Möglicherweise besteht dabei ein Unterschied zwischen APF und HPF, Letzteres verbleibt länger in den Zellen und ist so intrazellulär in höheren Konzentrationen vorhanden. Eventuell wird HPF auch besser in die Zellen aufgenommen.

Die nähere Untersuchung des Effektes von PMA auf APF-gefärbte Neutrophile ergab tendenziell eine stetige Steigerung der Fluoreszenz mit steigender Konzentration (0 bis 2 nM) und Inkubationszeit (0 bis 120 min). Abweichungen von diesem Verhalten ergaben sich dabei bei langen Inkubationszeiten sowie hohen Konzentrationen. Wie stark die APF-Fluoreszenz durch PMA gesteigert wird, ist von Spender zu Spender sehr unterschiedlich.

Über den bereits geschilderten Mechanismus der Aktivierung der NADPH-Oxidase über die Proteinkinase C, mit daraus folgender Bildung von H_2O_2 aus Superoxidanionen ($\text{O}_2\cdot^-$) [85, 86], erklärt sich die beobachtete Steigerung der APF-Fluoreszenz durch PMA, denn H_2O_2 ermöglicht erst die chlorierende MPO-Aktivität. Auch die Konzentrations- und Inkubationszeitabhängigkeit dieses Effektes ist plausibel: je mehr und je länger die Neutrophilen PMA ausgesetzt sind, desto mehr H_2O_2 steht für die MPO zur Verfügung. Über den Grund für die große Spendervariabilität des PMA-Effektes kann dagegen nur spekuliert werden.

Die Untersuchung des Effektes verschiedener Hemmstoffe auf die APF-Fluoreszenz unstimulierter und PMA-stimulierter Neutrophiler ergab, dass die Hemmung der NADPH-Oxidase und der MPO jeweils eine deutliche Fluoreszenzverminderung bewirken, insbesondere bei den PMA-stimulierten Neutrophilen (mittlere Fluoreszenzintensität durchschnittlich 27 % (4-ABAH) bzw. 17 % (DPI) der Kontrolle). Die Hemmung der iNOS und der 5-Lipoxygenase bewirken leichte Veränderungen der APF-Fluoreszenz von unstimulierten Neutrophilen, bei PMA-stimulierten haben sie keine signifikanten Effekte. Bei HPF-gefärbten Neutrophilen sind vergleichsweise geringere Effekte zu beobachten, wobei insbesondere der NADPH-Oxidase-Hemmstoff DPI Einfluss auf die Fluoreszenzintensität nimmt (62 % der Kontrolle bei den PMA-stimulierten Zellen).

Der starke und signifikante (p in allen Fällen $< 0,01$) Effekt der Hemmung von NADPH-Oxidase und MPO auf die APF-Fluoreszenz der Neutrophilen bestätigt noch einmal bei einer größeren Spenderanzahl ($n = 6$) die zuvor gemachten Beobachtungen: die APF-Fluoreszenz wird in hohem Maß von der chlorierenden MPO-Aktivität verursacht, insbesondere bei stimulierten Neutrophilen. Die Fluoreszenz ist im Mittel bei Hemmung der NADPH-Oxidase etwas geringer als bei Hemmung der MPO. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Tatsache, dass das bei Aktivität der NADPH-Oxidase entstehende H_2O_2 in der Fenton-Reaktion Hydroxylradikale ($HO\cdot$) liefert [85, 113], die in der Lage sind, APF zu oxidieren [78]. Dieser Mechanismus liefert auch eine Erklärung für den Effekt der NADPH-Inhibition auf die HPF-Fluoreszenz: auch HPF wird durch Hydroxylradikale ($HO\cdot$) oxidiert [78]. Tatsächlich ist aufgrund dieser Ergebnisse davon auszugehen, dass das außerordentlich starke Hydroxylradikal ($HO\cdot$) (Standardpotential des Redoxpaars $HO\cdot/H_2O \approx 2,3$ V bei pH 7,0 [114]) bei allen Experimenten einen kleinen Teil der APF-Fluoreszenz verursacht.

Die Inhibition der iNOS und der 5-Lipoxygenase nehmen leichten Einfluss auf die APF-Fluoreszenz der unstimulierten Neutrophilen, bei den PMA-stimulierten verursachen sie dagegen keinen signifikanten Effekt. Zu erklären ist das dadurch, dass bei Stimulation mit PMA die chlorierende MPO-Aktivität stark ansteigt und andere Einflüsse auf die APF-Fluoreszenz dadurch weniger ins Gewicht fallen. Die bei den unstimulierten Neutrophilen verursachten Effekte (leichter Rückgang der Fluoreszenz durch 5-Lipoxygenase-Hemmung (im Mittel 90 % der Kontrolle), Anstieg durch iNOS-Hemmung (im Mittel 124 % der Kontrolle)) verhalten sich beide konträr zur Erwartung: eine Hemmung der iNOS und damit Verminderung der möglichen Peroxynitritbildung müsste zu einer Fluoreszenzverminderung führen, wenn Peroxynitrit ($ONOO^-$) Anteil an der APF-Fluoreszenz hat (Peroxynitrit kann APF oxidieren [78]). Die Hemmung der 5-Lipoxygenase sollte dagegen theoretisch

verhindern, dass Produkte des Enzyms mit HOCl interagieren [90] und damit die Menge an mit APF reagierendem HOCl und somit auch die APF-Fluoreszenz erhöhen. Möglicherweise liegen diesen Ergebnissen metabolische Kompensationsmechanismen als Reaktion auf die Enzyminhibition zugrunde. Jedenfalls kann konstatiert werden, dass weder Peroxynitrit (ONOO^-) noch Produkte der 5-Lipoxygenase entscheidenden Einfluss auf die APF-Fluoreszenz in Neutrophilen nehmen, insbesondere nicht bei stimulierten Zellen. Da Peroxynitrit (ONOO^-) neben dem Hydroxylradikal ($\text{HO}\cdot$) das einzige Oxidans ist, das APF und HPF oxidieren [78] und damit Messungen potentiell stören kann, ist dies eine wertvolle Erkenntnis.

Alles in allem zeigen die Ergebnisse, dass die chlorierende MPO-Aktivität in Neutrophilen mit APF durchflusszytometrisch quantifiziert werden kann. Die APF-Fluoreszenz wird zu großen Teilen durch die chlorierende MPO-Aktivität (also HOCl) verursacht, insbesondere bei stimulierten Neutrophilen. Abgesehen von HOCl verursachen wahrscheinlich Hydroxylradikale ($\text{HO}\cdot$) einen gewissen Teil der APF-Fluoreszenz, Peroxynitrit (ONOO^-) und Produkte der 5-Lipoxygenase haben dagegen keinen entscheidenden Einfluss. Der Einsatz von HPF als Kontrollreagenz ist zwar möglich, da HPF deutlich weniger stark auf HOCl reagiert als APF. Er ist aber von eingeschränkterer Aussagekraft als erwartet, da die Originalveröffentlichung [78] angibt, HPF reagiere gar nicht mit HOCl. Zudem hat HPF unerwarteterweise eine deutlich höhere "basale Fluoreszenzintensität" (Fluoreszenz in unstimulierten Neutrophilen) als APF.

5.2.1 Grenzen und Alternativen des APF/HPF-Systems

An dieser Stelle sollen einige Aspekte der Ergebnisse in Abschnitt 4.3.4 (Grundlagen der Untersuchung Neutrophiler unter nitrosativem Stress) diskutiert werden, da sie eher für die Detektion als für die Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität relevant sind. Peroxynitrit (ONOO^-) bewirkt *in vitro* eine starke Komplex II-Akkumulation der MPO [44, 45] und wird gleichzeitig *in vivo* unter Entzündungsbedingungen verstärkt gebildet (verstärkte Bildung von NO [7], welches mit Superoxidanionen ($\text{O}_2\cdot^-$) zu Peroxynitrit (ONOO^-) reagiert [91]). Dadurch wäre es der ideale Kandidat, um *ex vivo* eine Komplex II-Akkumulation unter Entzündungsbedingungen zu simulieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mithilfe der Substanz SIN-1 eine hohe Peroxynitritkonzentration in Neutrophilen erreicht werden kann: SIN-1 steigert sowohl die APF- als auch die HPF-Fluoreszenz, und zwar bei beiden Farbstoffen in ähnlichem Maße und auf Werte, die durch Stimulation der chlorierenden MPO-

Aktivität mit H_2O_2 oder PMA nicht zu erreichen sind. Daher muss ein Großteil der Fluoreszenzsteigerung durch Peroxynitrit (ONOO^-) bedingt sein. Gleichzeitig wird aber klar, dass unter diesen Bedingungen nicht mehr differenziert werden kann, welcher Teil der APF-Fluoreszenz durch die chlorierende MPO-Aktivität und welcher durch Peroxynitrit verursacht wird. Insbesondere deshalb nicht, weil die Aussagekraft der HPF-Fluoreszenz eingeschränkt ist (HPF kann auch durch HOCl oxidiert werden und die absoluten Fluoreszenzwerte von APF und HPF sind aufgrund der höheren "basalen Fluoreszenzintensität" von HPF nicht direkt vergleichbar). Die chlorierende MPO-Aktivität kann also am Zellmodell nicht mit dem APF/HPF-System quantifiziert werden, wenn Peroxynitrit (ONOO^-) in größeren Mengen anwesend ist.

Angesichts dieser offenkundigen Limitation soll das APF/HPF-System hier mit einigen Alternativen verglichen werden. Bereits in der Einführung (Abschnitt 1.3.1) beschrieben wurden Monochlordimedon und TNB. Insbesondere TNB ermöglicht eine exakte Messung der HOCl -Produktion *in vitro*. Beide Methoden basieren jedoch auf Absorptionsmessung und sind daher für die Messung der HOCl -Produktion in Zellen nicht geeignet (lediglich nach extrazellulär gelangtes HOCl könnte detektiert werden) [75–77]. Neben APF/HPF gibt es aber einige neuere Entwicklungen, deren Funktion auf Fluoreszenz basiert und mit denen die chlorierende MPO-Aktivität somit auch intrazellulär (z. B. durchflusszytometrisch) detektiert werden könnte. Tabelle 5-1 zeigt eine Übersicht der infrage kommenden Fluoreszenzfarbstoffe.

Tabelle 5-1: Fluoreszenzfarbstoffe zur Detektion von HOCl . Die Farbstoffe erscheinen in der Tabelle in der zeitlichen Reihenfolge ihrer ersten Vorstellung in einem Fachartikel. In der Tabelle als Abkürzung benutzte chemische Formeln: $\text{HO}\cdot$ - Hydroxylradikal, ONOO^- - Peroxynitrit, HOCl - Hypochlorsäure. Die vollen Namen der Farbstoffe können dem Abkürzungsverzeichnis dieser Arbeit entnommen werden, für R19-S wird in der Originalveröffentlichung kein voller Name angegeben [117].

Bezeichnung	geeignet zur Detektion von	vorgestellt
APF/HPF	APF: $\text{HO}\cdot$, ONOO^- , HOCl HPF: $\text{HO}\cdot$, ONOO^- gemeinsam: HOCl (spezifisch, Limitationen siehe diesen Abschnitt)	2003 in [78]
HySOx	HOCl (spezifisch)	2007 in [115]
APC-AM	$\text{HO}\cdot$, ONOO^- , HOCl	2009 in [116]
R19-S	HOCl (spezifisch)	2011 in [117]

Alle in Tabelle 5-1 aufgeführten Farbstoffe funktionieren nach dem Prinzip, dass die zu detektierende Substanz mit dem zunächst nicht fluoreszenten Farbstoff reagiert und dabei ein stark fluoreszierendes Produkt entsteht. APC-AM bietet gegenüber APF den Vorteil, dass es bei zellulären Experimenten zuverlässiger in den Zellen verbleibt, was vor allem bei Langzeitmessungen wichtig ist. Der APF-ähnliche Farbstoff wird von den Entwicklern als Weiterentwicklung von APF verstanden und reagiert, wie APF, neben HOCl auch mit Hydroxylradikalen ($\text{HO}\cdot$) und Peroxynitrit (ONOO^-) [112, 116]. Er ist somit für die Untersuchung der chlorierenden MPO-Aktivität unter Peroxynitriteinfluss ebenso wenig geeignet wie APF, zumal es keine HPF-äquivalente Kontrollsubstanz für APC-AM gibt. Die beiden rhodaminbasierten Farbstoffe HySOx und R19-S erlauben dagegen eine spezifische Detektion von HOCl. Beide Farbstoffe reagieren nicht oder kaum mit anderen ROS, auch nicht mit Hydroxylradikalen ($\text{HO}\cdot$) und Peroxynitrit (ONOO^-) [115, 117]. Somit sind sie theoretisch geeignet, die chlorierende MPO-Aktivität auch unter Einfluss von Peroxynitrit (ONOO^-) zu messen. Beide Farbstoffe wurden auch bereits für zelluläre Experimente eingesetzt, wobei jeweils die HOCl-Produktion in isolierten Neutrophilen fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden konnte [115, 117]. R19-S hat gegenüber HySOx den Vorteil, dass es kommerziell erhältlich und demnach zur Forschung verfügbar ist. Zudem wurde es bereits in Verbindung mit der Durchflusszytometrie eingesetzt: in [118] wurde die HOCl-Produktion in isolierten Phagosomen von Neutrophilen durchflusszytometrisch mit R19-S detektiert und zudem mit Kontrollen (MPO- und NADPH-Oxidase-Inhibition) eine MPO-Abhängigkeit der gemessenen Fluoreszenz gezeigt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die chlorierende MPO-Aktivität in Neutrophilen mithilfe der Durchflusszytometrie zuverlässig mit APF detektiert werden kann. HPF kann, obwohl mit eingeschränkter Aussagekraft, zur Kontrolle eingesetzt werden. Soll die chlorierende MPO-Aktivität aber unter Einfluss von Peroxynitrit (ONOO^-) untersucht werden, stößt das APF/HPF-System an seine Grenzen: es ist nicht mehr zu diskriminieren, welcher Teil der APF-Fluoreszenz durch HOCl und welcher durch Peroxynitrit (ONOO^-) verursacht wird. Als Alternative kommt für zukünftige Untersuchungen der chlorierenden MPO-Aktivität unter Peroxynitriteinfluss insbesondere R19-S infrage. Dieser kommerziell verfügbare Fluoreszenzfarbstoff ist laut Literatur hochspezifisch für HOCl, reagiert nicht mit Peroxynitrit (ONOO^-) und wurde bereits an Neutrophilen, auch unter Verwendung der Durchflusszytometrie, eingesetzt.

5.3 Modulation der chlorierenden MPO-Aktivität in Neutrophilen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die chlorierende MPO-Aktivität erstmals am Zellmodell (*ex vivo*) moduliert. Dazu wurde der Effekt des Flavonoids (–)-Epicatechin auf die chlorierende MPO-Aktivität in verschiedenen Situationen untersucht: bei unstimulierten und PMA-stimulierten Neutrophilen sowie unter Bedingungen einer gezielten Komplex II-Akkumulation.

Der Effekt von (–)-Epicatechin auf unstimulierte Neutrophile (untersucht bei 4 Spendern) ist uneinheitlich: insbesondere im Konzentrationsbereich bis 8 μM (–)-Epicatechin treten deutliche Veränderungen der APF-Fluoreszenz auf, die von Spender zu Spender aber unterschiedlich ausfallen. Ein Gesamttrend ist nicht auszumachen, dennoch zeigt sich, dass (–)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität modulieren kann. Der Einfluss von (–)-Epicatechin auf die chlorierende MPO-Aktivität bei PMA-Stimulation wurde an Neutrophilen von 14 Spendern untersucht. Hier zeigt sich, dass (–)-Epicatechin in geringen Konzentrationen (bis 8 μM) spenderabhängig sehr unterschiedliche Effekte hat. Bei einigen Spendern wird die chlorierende MPO-Aktivität erhöht, bei anderen verringert, wobei Letzteres etwas häufiger vorkommt. Einen statistisch signifikanten Effekt über alle Spender gibt es nicht. Bei höheren (–)-Epicatechin-Konzentrationen (16 μM und 32 μM) sind die Unterschiede zwischen den Spendern geringer und (–)-Epicatechin verringert die chlorierende MPO-Aktivität statistisch signifikant.

Obwohl (–)-Epicatechin die Substanz mit der höchsten bekannten Reaktionsrate mit Komplex II der MPO ist [26] ($k_{\text{II}} = 4,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 7,0 und 25 °C [41]), reagiert es, wie alle Substrate des Peroxidasezyklus der MPO, noch schneller mit Komplex I ($k_{\text{I}} = 1,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 7,0 und 25 °C [41]). Dies liegt im höheren Reduktionspotential des Paares Komplex I/Komplex II gegenüber Komplex II/natives Enzym begründet [36]. Aus dem Quotienten aus beiden Reaktionsraten lässt sich, obwohl er außergewöhnlich niedrig ist ($k_{\text{I}}/k_{\text{II}} \approx 4,2$), schließen, dass (–)-Epicatechin nur dann die chlorierende Aktivität steigern kann, wenn ein großer Teil der MPO als Komplex II vorliegt (schätzungsweise müsste mehr als 4,2-fach mehr Komplex II als Komplex I vorhanden sein). Andernfalls überwiegt die Reaktion von (–)-Epicatechin mit Komplex I, wodurch Komplex II vermehrt und damit die chlorierende MPO-Aktivität verringert wird. Aus den *in vitro*-Untersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe (vgl. [42] und Abschnitt 1.3.2.2) geht zudem hervor, dass (–)-Epicatechin, wenn es in höheren Konzentrationen ($> 10 \mu\text{M}$) eingesetzt wird, stets die chlorierende MPO-Aktivität verringert, auch unter forcierter Komplex II-Akkumulation. In diesem

Konzentrationsbereich scheint prinzipiell die Reaktion von (–)-Epicatechin mit Komplex I zu überwiegen. Unter diesen Gesichtspunkten scheint folgende Erklärung für die Effekte von (–)-Epicatechin auf die chlorierende MPO-Aktivität von PMA-stimulierten Neutrophilen plausibel: Wie auch *in vitro* überwiegt bei den Konzentrationen 16 μM und 32 μM (–)-Epicatechin prinzipiell die Reaktion des Flavonoids mit Komplex I der MPO, was zur Vermehrung von Komplex II und damit zu einer Verminderung der chlorierenden MPO-Aktivität führt, die statistisch signifikant ist (p jeweils $< 0,001$). In den Konzentrationen 1 μM , 2 μM , 4 μM und 8 μM ist (–)-Epicatechin dagegen in der Lage, die chlorierende MPO-Aktivität zu steigern, sofern anteilig genug MPO als Komplex II vorliegt. Die großen spenderabhängigen Unterschiede des (–)-Epicatechin-Effektes in diesem Konzentrationsbereich lassen sich also dadurch erklären, dass der relative Anteil an Komplex II von Spender zu Spender stark schwankt. Besonders bei einem der untersuchten Spender (Abbildung 4-9 A, schwarze Kurve) scheint die MPO zu großen Teilen als Komplex II vorzuliegen, (–)-Epicatechin steigert die chlorierende Aktivität stark. Bei der Mehrzahl der Spender liegt dagegen weniger MPO als Komplex II vor, sodass die Reaktion von (–)-Epicatechin mit Komplex I in den Vordergrund tritt (z. B. Abbildung 4-9 A, grüne Kurve).

Es gibt mehrere denkbare Gründe dafür, dass der als Komplex II vorliegende Anteil der MPO von Spender zu Spender variiert. Eine Reihe von Stoffen, die mit der Nahrung aufgenommen werden, können Einfluss auf die MPO nehmen. Substanzen mit hoher Reaktivität gegenüber Komplex I, wie Tryptophan [37], bewirken eine Komplex II-Akkumulation. Substanzen mit hoher Reaktivität gegenüber Komplex II, wie Vitamin C [47] oder Flavonoide wie (–)-Epicatechin [41], können dagegen eine Komplex II-Akkumulation teilweise aufheben. Thiocyanat, eine Substanz, die bei Rauchern wesentlich höher konzentriert im Blut vorliegt als bei Nichtrauchern [35], bedingt ebenfalls eine Komplex II-Akkumulation [44]. So könnten Ernährungsweise und Rauchverhalten den Zustand der MPO beeinflussen. Auch Peroxynitrit (ONOO^-) bewirkt eine Komplex II-Akkumulation [45, 46]. Es entsteht verstärkt unter Entzündungsbedingungen, aus NO und Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [7, 91]. Bei Personen, die an entzündlichen Erkrankungen leiden, könnte die MPO demnach verstärkt als Komplex II vorliegen. Bei der Mehrzahl der 14 untersuchten Spender besteht keine Komplex II-Akkumulation ((–)-Epicatechin bewirkt eine Fluoreszenzverminderung). Man könnte hier einen Zusammenhang vermuten mit der Tatsache, dass Blutspender in aller Regel gesund sind.

5.3.1 Experimentelle Forcierung einer Komplex II-Akkumulation

Die beobachteten Einflüsse von (-)-Epicatechin auf die APF-Fluoreszenz PMA-stimulierter Neutrophiler legten den Schluss nahe, dass (-)-Epicatechin (in Konzentrationen bis 8 μM) die chlorierende MPO-Aktivität steigert, sofern ein ausreichend großer Anteil des Enzyms als Komplex II vorliegt. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden Versuche zur experimentellen Erzeugung einer Komplex II-Akkumulation in Neutrophilen unternommen, um den Einfluss von (-)-Epicatechin unter diesen Bedingungen untersuchen zu können. Die Komplex II-Akkumulation sollte mithilfe von H_2O_2 im Überschuss, sowie versuchsweise mit Peroxynitrit (ONOO^-) erzeugt werden.

Die chlorierende MPO-Aktivität in Neutrophilen steigert sich bei Zugabe von H_2O_2 , wobei der Anstieg mit steigender H_2O_2 -Konzentration (Bereich 0 bis 1280 μM) immer geringer und bei einigen Spendern bei hohen Konzentrationen sogar negativ wird. Bei zusätzlicher Hemmung der Katalase wird bei 200 μM H_2O_2 ein Fluoreszenzmaximum erreicht, bei höheren Konzentrationen nimmt die Fluoreszenz wieder ab. Diese Ergebnisse deuten bereits darauf hin, dass es bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen zu einer Komplex II-Bildung in den Neutrophilen kommt. Bei Prüfung des Effektes von (-)-Epicatechin bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen zeigt sich ein fluoreszenzsteigernder Effekt des Flavonoids bei Stimulation mit 1 mM H_2O_2 , und ein fluoreszenzverringender Effekt bei Stimulation mit 100 μM H_2O_2 . Das bestätigt eine Komplex II-Bildung bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen (1 mM).

H_2O_2 ist Substrat der nativen MPO und essentiell für die Bildung von Komplex I und damit auch für die chlorierende Aktivität [26]. H_2O_2 kommt aber auch als Substrat des Peroxidasezyklus infrage. Hier reagiert es um Größenordnungen schneller mit Komplex I ($k_{\text{I}} = (4,4 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 7,0 und 15 °C [38]) als mit Komplex II ($k_{\text{II}} = 78 \pm 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 7,0 und 25 °C [39]), der Quotient $k_{\text{I}}/k_{\text{II}}$ liegt bei rund 560. *In vitro* bewirkt H_2O_2 in niedriger Konzentration (20 μM) eine starke chlorierende MPO-Aktivität, die bei weiterer Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration immer geringer wird (vgl. [42] und Abschnitt 1.3.2.2). Je höher die Konzentration von H_2O_2 also ist, umso stärker tritt seine Rolle als Substrat des Peroxidasezyklus in den Vordergrund, und als solches bewirkt H_2O_2 eine starke Komplex II-Akkumulation. Die geschilderten Ergebnisse an Neutrophilen lassen den Schluss zu, dass am Zellmodell die gleichen Prinzipien gelten.

Allerdings fallen Unterschiede zwischen den *in vitro*-Ergebnissen und jenen am Zellmodell auf. Zum ersten geht am Zellmodell die HOCl-Produktion bei den meisten Spendern bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen nicht zurück, sie steigt lediglich nicht mehr entscheidend an.

Zum zweiten sind am Zellmodell höhere H_2O_2 -Konzentrationen nötig um eine Komplex II-Akkumulation zu bewirken (1 mM) als *in vitro* (150 μM [42]). Ersteres lässt sich wahrscheinlich mit einem methodischen Unterschied zwischen beiden Systemen erklären: während *in vitro* die Geschwindigkeit des APF-Umsatzes gemessen wird, wird bei der durchflusszytometrischen Messung am Zellmodell die Endfluoreszenz, d. h. die insgesamt zu Fluorescein umgesetzte Menge APF erfasst. Eventuell wird im Laufe der Inkubationszeiten die durch H_2O_2 bewirkte Komplex II-Akkumulation durch andere, mit der MPO interagierende Stoffe abgeschwächt (wie bspw. Vitamin C [47]) und so mehr APF umgesetzt. Generell muss bedacht werden, dass am Zellmodell eine ganze Reihe unkalkulierbarer Faktoren auf die Ergebnisse einwirken, die beim isolierten Enzym nicht vorhanden sind. Ein wichtiges Beispiel ist die Katalase, die unter anderem auch in Neutrophilen vorkommt und H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff spaltet [119]. Dieses Enzym verringert die mit der MPO interagierende Menge an H_2O_2 . Das erklärt auch, warum am Zellmodell höhere H_2O_2 -Konzentrationen als *in vitro* nötig sind, um eine Komplex II-Akkumulation zu bewirken.

Eine Überprüfung des Katalaseeinflusses mittels Inhibition des Enzyms zeigt tatsächlich, dass bei gehemmter Katalase bereits bei einer Stimulation mit 150 μM H_2O_2 eine Steigerung der chlorierenden MPO-Aktivität durch (-)-Epicatechin auftritt (siehe Abbildung 4-13). Bei gehemmter Katalase reicht also auch am Zellmodell, genau wie *in vitro*, eine H_2O_2 -Konzentration von 150 μM aus, um eine Komplex II-Akkumulation zu bewirken.

Bei der Forcierung einer Komplex II-Akkumulation in Neutrophilen durch hochkonzentriertes H_2O_2 muss bedacht werden, dass derart hohe Konzentrationen (bspw. 1 mM H_2O_2) *in vivo* nicht vorkommen und es sich daher um ein unphysiologisches Modellsystem handelt. H_2O_2 bewirkt zudem eine Aktivierung der Neutrophilen im Sinne einer proinflammatorischen Stimulation [120] und steigert die Apoptoserate der Neutrophilen [121].

Damit erklären sich auch folgende Ergebnisse dieser Arbeit: Bei Stimulation mit 1 mM H_2O_2 befinden mehr Zellen außerhalb des Bereichs in der Vorwärtsstreulicht-Seitwärtsstreulicht-Darstellung, in dem sich vitale Zellen normalerweise befinden (Referenz dafür: unstimulierte Neutrophile des selben Spenders). Die Zellen werden also durch H_2O_2 geschädigt, der Effekt ist allerdings meist eher gering. Wesentlich stärker tritt das selbe Phänomen bei zusätzlicher Katalase-Hemmung auf, auch schon bei deutlich niedrigeren H_2O_2 -Konzentrationen (150 μM) (siehe Abbildung 4-14). Für die folgenden Experimente wurde H_2O_2 daher in der Konzentration 1 mM und ohne zusätzliche Katalasehemmung eingesetzt.

Neben der offensichtlich funktionierenden, aber unphysiologischen Forcierung der Komplex II-Akkumulation mit H_2O_2 sollte zum selben Zweck auch Peroxynitrit (ONOO^-) eingesetzt werden (die entsprechenden Ergebnisse finden sich in Abschnitt 4.3.4). Diese Substanz bewirkt *in vitro* eine effektive Komplex II-Akkumulation durch direkte Oxidation der nativen MPO zu Komplex II [45, 46]. Ein solches Modellsystem wäre wesentlich näher an physiologischen Bedingungen: unter Entzündungsbedingungen wird *in vivo* verstärkt Peroxynitrit (ONOO^-) gebildet [87], da sowohl NO [7], als auch Superoxidanionen ($\text{O}_2\cdot^-$) (durch die NADPH-Oxidase [85]) ausgeschüttet werden, aus denen Peroxynitrit (ONOO^-) spontan entsteht [91]. In dieser Arbeit wurden Neutrophile sowohl mit LPS stimuliert (bewirkt eine Peroxynitritbildung [87]) als auch mit der Substanz SIN-1 behandelt, die simultan Superoxidanionen ($\text{O}_2\cdot^-$) und NO freisetzt, was zur spontanen Peroxynitritbildung führt [91].

An diesem Punkt musste allerdings festgestellt werden, dass das APF/HPF-System an seine Grenzen stößt, sobald eine größere Menge Peroxynitrit im System vorhanden ist. Ausführlich wird diese Problematik in Abschnitt 5.2.1 diskutiert. Wichtig war jedoch die Erkenntnis, dass mithilfe der Substanz SIN-1 eine hohe Peroxynitritkonzentration in Neutrophilen erreicht werden kann: SIN-1 steigert sowohl die APF- als auch die HPF-Fluoreszenz, und zwar bei beiden Farbstoffen in ähnlichem Maße und auf Werte, die durch Stimulation der chlorierenden MPO-Aktivität mit H_2O_2 oder PMA nicht zu erreichen sind. Daher muss ein Großteil der Fluoreszenzsteigerung durch Peroxynitrit (ONOO^-) bedingt sein. An dieser Stelle können zukünftige Untersuchungen mit einem alternativen Fluoreszenzfarbstoff, bspw. R19-S, ansetzen (siehe Abschnitt 5.2.1).

Zusammengefasst hat sich H_2O_2 im Überschuss (1 mM) als zuverlässiges Modellsystem zur Forcierung einer Komplex II-Akkumulation in Neutrophilen erwiesen. Die Erzeugung von Peroxynitrit in Neutrophilen, die selbiges in einer physiologischeren Art und Weise ermöglichen sollte, ist mithilfe von SIN-1 möglich, woran zukünftige Untersuchungen anknüpfen können.

5.3.2 Effekt von (-)-Epicatechin bei forcierter Komplex II-Akkumulation

Die Untersuchung des Effektes von (-)-Epicatechin auf die chlorierende MPO-Aktivität bei forcierter Komplex II-Akkumulation durch 1 mM H_2O_2 wurde an Neutrophilen von 12 Spendern durchgeführt. Es zeigt sich im Mittel eine Steigerung der chlorierenden MPO-Aktivität über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich (1 μM bis 128 μM), die bei

16 μM (-)-Epicatechin maximal ist (im Mittel 134 % der Kontrolle, $p = 0,004$) und bei höheren (-)-Epicatechin-Konzentrationen wieder geringer wird. Abgesehen vom klaren (und statistisch signifikanten) Gesamttrend hin zu einer Steigerung der HOCl-Produktion durch (-)-Epicatechin zeigen sich recht große spenderabhängige Unterschiede in der Stärke dieses Effektes.

Damit wird erstmals am Zellmodell gezeigt, dass (-)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität steigert, sofern die MPO zu großen Teilen als Komplex II vorliegt. Diese Ergebnisse decken sich mit älteren [75] und aktuellen (vgl. [42] und Abschnitt 1.3.2.2) *in vitro*-Ergebnissen.

3 auffällige Aspekte sollen nun diskutiert werden: zum ersten die großen Unterschiede zwischen den Spendern, zum zweiten die Tatsache, dass der (-)-Epicatechin-Effekt deutlich geringer ausfällt als *in vitro* und zum dritten die Tatsache, dass im Gegensatz zu den *in vitro*- und auch zu den vorherigen zellulären Ergebnissen mit PMA kein Fluoreszenzrückgang bei hohen (-)-Epicatechin-Konzentrationen auftritt. Eine Erklärung für letzteren Punkt liefert die Änderung des Pipettierschemas im Vergleich zu den Experimenten mit PMA: statt 120 min betrug die Inkubationszeit (-)-Epicatechins nur noch 45 min (Grund für die Änderung war, dass (-)-Epicatechin erst nach der Zugabe H_2O_2 und damit nach stattgefundener Komplex II-Akkumulation zugegeben werden sollte). Innerhalb dieser kürzeren Zeit ist wohl bei hohen Konzentrationen nicht das gesamte (-)-Epicatechin in die Zellen hineingelangt. Möglicherweise geschieht die Aufnahme des Flavonoids durch einen phagozytoseartigen Prozess [42], der gesättigt werden kann. Tatsächlich benötigt die Aufnahme des strukturverwandten Epigallocatechingallat etwa 60 min [122]. Die großen Unterschiede zwischen den untersuchten Spendern lassen sich mit den am Zellmodell vorhandenen weiteren Faktoren erklären, die den Zustand der MPO beeinflussen: ernährungsabhängig vorhandene Substanzen wie Vitamin C [47] oder Tryptophan [37], vom Rauchverhalten abhängig vorhandenes Thiocyanat [35, 44] oder bei Entzündung verstärkt gebildetes Peroxynitrit (ONOO^-) [46, 87]. Der Einfluss all dieser Faktoren trägt wahrscheinlich auch dazu bei, dass der (-)-Epicatechin-Effekt geringer ausfällt als *in vitro*. Zudem bewirkt der Einfluss der Katalase in Neutrophilen den Abbau von H_2O_2 [119], was zu einer unvollständigen Komplex II-Akkumulation und damit einem geringeren Effekt von (-)-Epicatechin führen könnte.

Alles in allem kann konstatiert werden, dass (–)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität in isolierten Neutrophilen steigern kann, wenn eine Komplex II-Akkumulation vorliegt. Dieses Ergebnis könnte in verschiedener Hinsicht von Bedeutung sein:

Erstens liefert es einen neuen Erklärungsansatz für die bekannten gesundheitsfördernden Effekte der Flavonoide und insbesondere (–)-Epicatechins [82, 83].

Zweitens liefert es einen möglichen Ansatz der Therapie schwerer Entzündungen: unter Entzündungsbedingungen akkumuliert *in vivo* höchstwahrscheinlich Komplex II der MPO, da verstärkt Peroxynitrit gebildet wird, das native MPO direkt zu Komplex II oxidiert [46, 87]. Die HOCl-Produktion der MPO wird also verringert. Zugleich gibt es mehrere Mechanismen, über die eine entzündungsterminierende Wirkung von HOCl vermittelt wird. Dazu gehört die Bildung von Chloraminen, die als antiinflammatorische Signalmoleküle wirken [69–73] und eine, für eine schnelle Entzündungsterminierende wichtige (siehe Abbildung 1-1), rasche Apoptose von aktivierten Neutrophilen begünstigen [65–67]. Eine Überwindung der Komplex II-Akkumulation mit Steigerung der chlorierenden MPO-Aktivität könnte also als therapeutisch erstrebenswertes Ziel angesehen und (–)-Epicatechin in diesem Sinne eingesetzt werden. An dieser Stelle darf jedoch nicht verschwiegen werden, dass HOCl auch eine Reihe gesundheitsschädlicher und proinflammatorischer Wirkungen hat. Eine gewebsschädigende Wirkung von nach extrazellulär gelangtem HOCl [25] ebenso wie die Beteiligung von HOCl an der Pathogenese der Atherosklerose [57] sind bestätigt. Dennoch könnte, gerade bei chronischen Entzündungen, bei denen die nicht richtig stattfindende Entzündungstermination ein zentrales Problem ist, HOCl insgesamt positiv wirken.

Drittens ergibt sich ein analytischer bzw. diagnostischer Ansatzpunkt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen am Zellmodell die Vermutung, die sich bereits aus den bekannten kinetischen Daten der Reaktion (–)-Epicatechins mit der MPO ergab: Da (–)-Epicatechin schneller mit Komplex I als mit Komplex II der MPO reagiert [41], kann es nur dann eine Steigerung der chlorierenden MPO-Aktivität bewirken, wenn die MPO zu großen Teilen als Komplex II vorliegt. Im Umkehrschluss kann dieses Wissen genutzt werden, um Neutrophile (oder auch Vollblut, siehe Abschnitt 5.4) auf eine Komplex II-Akkumulation der MPO hin zu untersuchen. Derartige Erhebungen könnten bspw. mit Krankendaten von Patienten korreliert und mögliche Zusammenhänge zwischen "MPO-Status" und klinischem Status aufgedeckt werden.

5.4 Grundlagen für die Untersuchung der MPO am Vollblut

Mit der Perspektive einer möglichen zukünftigen Analyse von Patientenblut auf Aspekte der MPO wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit mithilfe von APF und der Durchflusszytometrie die chlorierende MPO-Aktivität am Vollblut untersucht werden kann.

Abgesehen von der Dextrasedimentation wurde die Isolationsprozedur gestrichen. Die resultierende Zelllösung lässt keine Diskriminierung der Zellfraktionen anhand von Zellgröße und Granularität mehr zu. Färbt man die Zellen aber mit APF und trägt die APF-Fluoreszenz gegen die Granularität der Zellen auf, so lässt sich die Granulozytenfraktion recht sicher abgrenzen. Die Kontrolle mit einer etablierten Methode (FITC-konjugierte Antikörper gegen CD16 zur Anfärbung der Neutrophilen) sowie die Tatsache, dass die markierte Granulozytenfraktion bei Stimulation durch H_2O_2 mit der erwarteten starken Fluoreszenzsteigerung reagiert, bestätigen das. Die APF-Fluoreszenz und damit die chlorierende MPO-Aktivität der selektierten Granulozytenfraktion kann selektiv beurteilt werden.

Auffällig ist, dass die anhand von APF-Fluoreszenz und Granularität selektierte Granulozytenfraktion stets etwas größer ist, als die anhand von Anti-CD16-FITC-Färbung und Granularität selektierte Neutrophilenfraktion (im Mittel rund 12 % gegenüber rund 9 % der Messereignisse). Teilweise lässt sich das dadurch erklären, dass die Eosinophilen eine ähnliche APF-Fluoreszenz haben wie die Neutrophilen (HOBr, das Produkt der EPO, kann APF oxidieren [79]). Da sie zudem auch eine ähnliche Granularität wie die Neutrophilen aufweisen, werden die Eosinophilen bei der APF-Methode mit erfasst, bei der Anti-CD16-Färbung jedoch nicht, da auf ihnen kein CD16 vorkommt [100]. Die Eosinophilen sind allerdings anteilig nicht zahlreich genug, um den Unterschied vollständig zu erklären. Möglich ist, dass die Farbstoffkonzentration bei der Anti-CD16-FITC-Färbung für diese Art Zelllösung zu niedrig war, um alle Neutrophilen ausreichend stark anzufärben und so einige nicht erfasst wurden. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Selektion der Granulozytenfraktion anhand von APF-Fluoreszenz und Granularität einige andere Zellen mit erfasst werden, auch weil die Markierung der Zellen manuell erfolgt und damit ein Stück weit willkürlich ist. Andererseits ist es unwahrscheinlich, dass Monozyten (in denen auch MPO vorkommt [26]) mit erfasst werden, da sich deren Granularität deutlich von jener der Neutrophilen unterscheidet. Alles in allem kann man davon ausgehen, dass die vorgestellte Selektionsmethode die überwiegende Mehrheit der Neutrophilen und Eosinophilen erfasst, sowie möglicherweise einige andere Zellen.

Obwohl die direkte Untersuchung der Zellen nach Dextran sedimentation einen deutlich geringeren Zeit- und Materialaufwand mit sich bringt als die vollständige Granulozytenisolation, ist es keine direkte Untersuchung am Vollblut im eigentlichen Sinne. Eine solche ist allerdings, angesichts der 500- bis 1000-fachen Überzahl der Erythrozyten gegenüber den Leukozyten im Vollblut [84], nur schwer vorstellbar, insbesondere bei Anwendung der Durchflusszytometrie: um eine für die Beurteilung der MPO ausreichende Menge Neutrophiler zu untersuchen, müsste die insgesamt untersuchte Zellzahl sehr groß sein, was wiederum einen erhöhten Zeitaufwand mit sich bringen würde. Zudem ist fraglich, ob die Messergebnisse noch in einem vertretbaren Verhältnis zu den Messfehlern des Gerätes stehen, wenn nur etwa ein Tausendstel der untersuchten Zellen von Interesse sind, die Messfehler aller untersuchten Zellen aber das Ergebnis beeinflussen könnten. An einem Verfahren zur Reduktion der Erythrozytenzahl wird man daher kaum vorbei kommen, wenn die MPO am Vollblut untersucht werden soll. Statt der Dextran sedimentation wäre auch die Anwendung der hypotonen Lyse denkbar, um dies zu erreichen. An dieser Stelle könnten weitere Forschungen anschließen, um zu beurteilen, welches Verfahren letztendlich unkomplizierter ist und bessere Ergebnisse liefert.

Ein möglichst schnelles und unkompliziertes Verfahren zur Beurteilung der MPO am Vollblut könnte von praktischem Nutzen sein. Zum einen könnte eine MPO-Defizienz diagnostiziert werden. Allerdings gibt es bereits etablierte Verfahren, mit denen das ebenfalls möglich ist [123, 124]. Zum anderen könnte aber, aufgrund der spezifischen Detektion der chlorierenden MPO-Aktivität mit der APF-Methode, auch bspw. eine Komplex II-Akkumulation der MPO erfasst werden. Dazu könnte (-)-Epicatechin eingesetzt werden, wobei eine deutliche Steigerung der APF-Fluoreszenz durch das Flavonoid, wie in Abschnitt 5.3 ausführlich geschildert, für eine Komplex II-Akkumulation sprechen würde. So könnte an Patientenblut oder auch am Tiermodell die These geprüft werden, dass eine Komplex II-Akkumulation der MPO mit entzündlichen Erkrankungen korreliert.

Zusammengefasst ermöglicht die durchflusszytometrische Untersuchung von Vollblut nach Dextran sedimentation mithilfe von APF eine relativ verlässliche Selektion der Granulozytenfraktion und die Beurteilung der chlorierenden MPO-Aktivität in den selektierten Zellen. Weitere Forschungen könnten diese Methode aufgreifen: zum einen, um die Untersuchung der MPO am Vollblut noch schneller und unkomplizierter zu machen und zum anderen, indem sie die Methode an Patientenblut oder am Tiermodell einsetzen.

5.5 Ausblick

Diese Arbeit bestätigt, dass mit APF die chlorierende MPO-Aktivität in Neutrophilen durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Sie zeigt, dass das Flavonoid (–)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität in Neutrophilen steigert, wenn die MPO in den Neutrophilen zu großen Teilen als Komplex II vorliegt. Und sie zeigt auf, dass die Neutrophilen anhand der chlorierenden MPO-Aktivität durchflusszytometrisch selektiert und so untersucht werden können, ohne dass sie isoliert werden müssen.

Weitere Forschung könnte insbesondere an folgenden Punkten ansetzen:

Erstens gibt es mittlerweile Fluoreszenzfarbstoffe, die APF und HPF unter bestimmten Umständen überlegen sein könnten. Insbesondere das Verhalten der chlorierenden MPO-Aktivität unter Peroxynitriteinfluss ist mit APF/HPF am Zellmodell nicht beurteilbar, wie diese Arbeit zeigt. Neuere, hochspezifische Farbstoffe auf Rhodaminbasis könnten dafür jedoch geeignet sein [115, 117].

Zweitens ist der bei der Untersuchung am Vollblut gewählte Weg zur Erythrozytenreduktion (die Dextranedimentation) nur eine Möglichkeit von mehreren. Hier könnte weitere Forschung möglicherweise einen besseren Weg finden, sowohl was den Aufwand als auch das Ergebnis betrifft.

Drittens bietet die Möglichkeit der Untersuchung der chlorierenden MPO-Aktivität am Vollblut interessante Perspektiven. An Patientenblut oder am Tiermodell könnte so bspw. die These geprüft werden, dass eine Komplex II-Akkumulation der MPO mit entzündlichen Erkrankungen korreliert.

Eine Verfolgung der genannten Forschungsansätze könnte dazu beitragen, die Rolle der MPO bei Entzündungsprozessen besser zu verstehen. Möglicherweise stellen Substanzen wie (–)-Epicatechin, die eine Komplex II-Akkumulation der MPO überwinden können, sogar einen Therapieansatz bei chronischen Entzündungen dar.

ZUSAMMENFASSUNG

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

*Detektion und Modulation der chlorierenden Aktivität der Myeloperoxidase
in neutrophilen Granulozyten*

eingereicht von:

Johannes Remmler

angefertigt am:

Institut für Medizinische Physik und Biophysik, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

betreut von:

apl. Prof. Dr. Jürgen Arnhold

eingereicht im Februar 2014

Neutrophile Granulozyten sind die häufigsten Leukozyten im menschlichen Blut und eine bedeutende Komponente der angeborenen Immunantwort. Bei Entzündungsprozessen sind sie die ersten Zellen, die aus dem Blut in das betroffene Gewebe einwandern. Dort haben sie zwei entscheidende Funktionen. Erstens phagozytieren und töten sie Pathogene. Zweitens haben sie großen Anteil an der Regulation der Entzündungsreaktion. Das in den Neutrophilen in großer Menge vorliegende Enzym Myeloperoxidase (MPO) ist für beide Funktionen wichtig. Die MPO produziert starke Oxidationsmittel, insbesondere Hypochlorsäure (HOCl), was als chlorierende Aktivität bezeichnet wird. HOCl trägt zur Pathogenabwehr bei und ist zudem an der Regulation und auch der Terminierung des Entzündungsprozesses beteiligt.

Die MPO ist eine Häm-Peroxidase. Unter Reduktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser wird die native Form der MPO (mit dreiwertigem Häm-Eisen: PorFe^{3+}) in einer zweielektronischen Reaktion zu Komplex I ($^+\cdot\text{PorFe}^{4+}=\text{O}$) oxidiert. Komplex I ist ein starkes Oxidationsmittel und reagiert mit diversen Substraten. Dabei gibt es zwei grundsätzliche Möglichkeiten: nimmt Komplex I in der Reaktion mit einem Substrat zwei Elektronen auf, so entsteht direkt wieder native MPO. Dies wird als Halogenierungszyklus bezeichnet. Nimmt Komplex I dagegen nur ein Elektron auf, entsteht Komplex II ($\text{PorFe}^{4+}\text{-OH}$) und es bedarf einer weiteren Reaktion zur Reduktion von Komplex II zurück zum nativen Enzym. Dies wird als Peroxidasezyklus bezeichnet.

Im Halogenierungszyklus wird (unter anderem) Chlorid zu HOCl oxidiert. Das Produkt dieser sogenannten chlorierenden Aktivität, HOCl, ist ein starkes Oxidans, dass zur Abtötung von Erregern beiträgt und sogar gewebsschädigend und pathogen wirken kann. Andererseits hat es auch regulatorische Effekte und wirkt, insbesondere über die Bildung von Chloraminen, entzündungsterminierend.

Als Substrat des Peroxidasezyklus kommen viele Substanzen in Frage. Sie reagieren sowohl mit Komplex I (wobei Komplex II entsteht) als auch mit Komplex II (wobei native MPO entsteht), jedoch aufgrund der Redoxeneigenschaften stets besser mit Komplex I. Daher kommt es bei Ablauf des Peroxidasezyklus immer zu einer gewissen Komplex II-Akkumulation. Da Komplex II nicht mit Chlorid reagiert, wird dabei die chlorierende MPO-Aktivität verringert.

Wie stark ein Substrat des Peroxidasezyklus eine Komplex II-Akkumulation bewirkt, hängt von seiner Reaktivität mit Komplex I und Komplex II sowie dem Quotienten aus beiden Größen ab. Die meisten Substrate reagieren sehr viel schneller mit Komplex I und bewirken eine entsprechend starke Komplex II-Akkumulation. Zudem oxidiert bspw. Peroxynitrit native MPO direkt zu Komplex II. Das ist relevant, da Peroxynitrit *in vivo* unter Entzündungsbedingungen gebildet wird. Gerade in Entzündungsherden könnte die MPO daher zu großen Teilen als Komplex II vorliegen und die chlorierende MPO-Aktivität entsprechend gering sein, was angesichts der entzündungsterminierenden Effekte von HOCl zur Chronifizierung der Entzündung beitragen könnte.

Das Flavonoid (-)-Epicatechin (bspw. in grünem Tee enthalten) hat die höchste bekannte Reaktivität mit Komplex II und der Quotient aus den Reaktionsraten mit Komplex I und Komplex II ($\approx 4,2$) ist außergewöhnlich niedrig. (-)-Epicatechin ist dadurch in der Lage, eine Komplex II-Akkumulation teilweise aufzuheben und die chlorierende MPO-Aktivität wieder zu steigern, was aber bisher nur in Untersuchungen an isolierter MPO (*in vitro*) gezeigt wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von (-)-Epicatechin auf die chlorierende MPO-Aktivität in neutrophilen Granulozyten (*ex vivo*) zu untersuchen. Um die Voraussetzungen dafür zu schaffen, sollte eine bislang wenig etablierte Methode zur Detektion der chlorierenden MPO-Aktivität am Zellmodell weiter charakterisiert und optimiert werden. Zudem sollte untersucht werden, ob die chlorierende MPO-Aktivität mit dieser Methode auch direkt am Vollblut gemessen werden kann.

Die neutrophilen Granulozyten wurden aus dem Vollblut gesunder Spender isoliert. Zugunsten der Zellvitalität wurde darauf verzichtet, die am Ende der Isolationsprozedur resultierende Granulozytenlösung, die auch Eosinophile und Basophile enthält, weiter aufzutrennen. Die Analyse dieser Granulozytensuspension ergab einen mittleren Neutrophilenanteil von etwa 90 % und eine mittlere Vitalität von über 90 %.

Die Messung der chlorierenden MPO-Aktivität in den Neutrophilen erfolgte durchflusszytometrisch mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Aminophenylfluorescein (APF). Bei APF handelt es sich um Fluorescein mit einer aromatischen Schutzgruppe, die zunächst die Fluoreszenz verhindert. Bei Reaktion mit HOCl wird die Schutzgruppe abgespalten und Fluorescein wird frei.

Diese Methode wurde evaluiert und optimiert. H₂O₂ und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), Aktivatoren der MPO, steigern die APF-Fluoreszenz stark. Durch MPO-Inhibition können diese Effekte aufgehoben werden. Das spricht dafür, dass die APF-Fluoreszenz die chlorierende MPO-Aktivität widerspiegelt. Kontrollversuche mit verschiedenen Hemmstoffen zeigen zudem, dass andere Oxidantien als HOCl allenfalls geringen Einfluss auf die APF-Fluoreszenz nehmen.

Der Effekt von (-)-Epicatechin auf die chlorierende MPO-Aktivität wurde nun zunächst an unstimulierten und PMA-stimulierten Neutrophilen untersucht. Hier zeigt sich, dass die Wirkung von (-)-Epicatechin spenderabhängig stark variiert. Bei PMA-stimulierten Neutrophilen von 14 Spendern differiert bspw. die APF-Fluoreszenz bei Zugabe von 4 µM (-)-Epicatechin zwischen 50 % und 176 % der Fluoreszenzintensität der entsprechenden Kontrolle. Im Konzentrationsbereich bis 8 µM ergibt sich so auch keine statistisch signifikante Fluoreszenzänderung durch (-)-Epicatechin. Aufgrund der bekannten kinetischen Daten ((-)-Epicatechin reagiert rund 4,2 mal schneller mit Komplex I als mit Komplex II) ist folgende Erklärung plausibel: der Effekt von (-)-Epicatechin ist davon abhängig, wieviel MPO als Komplex II vorliegt. Im Falle einer Komplex II-Akkumulation steigert es die chlorierende MPO-Aktivität, andernfalls verringert es sie.

Zur Prüfung dieser These wurden Neutrophile mit einem Überschuss H_2O_2 (1 mM) inkubiert. Dies führt zu einer Komplex II-Akkumulation der MPO, was durch verschiedene Kontrollexperimente abgesichert wurde. Unter diesen Bedingungen wurde der Effekt von (-)-Epicatechin auf die chlorierende MPO-Aktivität erneut untersucht, an Neutrophilen von 12 Spendern. Hier zeigt sich eine statistisch signifikante Steigerung der APF-Fluoreszenz durch (-)-Epicatechin, die bei 16 μM maximal ist (Steigerung der Fluoreszenzintensität auf im Mittel 134 % der Kontrolle, minimal 93 %, maximal 199 %, $p = 0,004$). Auch hier gibt es eine große spenderabhängige Variabilität des Effektes. Eine mögliche Erklärung dafür sind weitere im Spenderblut vorkommende Substanzen, die mit der MPO interagieren und die experimentell herbeigeführte Komplex II-Akkumulation vermindern können, bspw. Tyrosin oder Vitamin C.

Abschließend wurde untersucht, ob die chlorierende MPO-Aktivität auch ohne Isolation der Neutrophilen mithilfe von APF durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Bei der Untersuchung von Vollblut nach lediglich einer Dextran sedimentation (zur Dezimierung der Erythrozyten) geht die Möglichkeit verloren, die Granulozytenfraktion anhand von Zellgröße und Granularität durchflusszytometrisch klar abzugrenzen. Bei zusätzlicher Betrachtung der APF-Fluoreszenz kann aber eine Zellfraktion selektiert werden, die zu großen Teilen aus Neutrophilen besteht. Dies ist sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Zellen möglich. Die chlorierende MPO-Aktivität der so selektierten Granulozytenfraktion kann dann anhand der APF-Fluoreszenz quantifiziert werden.

Aus den Erkenntnissen, dass (-)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität steigert, wenn eine Komplex II-Akkumulation vorliegt, und dass die chlorierende MPO-Aktivität auch ohne zeitaufwändige Neutrophilenisolation untersucht werden kann, ergibt sich eine interessante Perspektive: Blut von Patienten oder auch Versuchstieren könnte auf eine Komplex II-Akkumulation der MPO hin untersucht und die entsprechenden Ergebnisse mit klinischen Parametern (bspw. entzündlichen Erkrankungen) korreliert werden.

Zusammengefasst bestätigt diese Arbeit, dass mit APF die chlorierende MPO-Aktivität in Neutrophilen durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Sie zeigt, dass das Flavonoid (-)-Epicatechin die chlorierende MPO-Aktivität in Neutrophilen steigert, wenn die MPO in den Neutrophilen zu großen Teilen als Komplex II vorliegt. Und sie zeigt auf, dass die Neutrophilen anhand der chlorierenden MPO-Aktivität durchflusszytometrisch selektiert und so untersucht werden können, ohne dass sie isoliert werden müssen. Sie liefert so auch Ansatzpunkte für weitere Forschung.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Mócsai, A. (2013): *Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond*. J Exp Med 210(7): 1283–99.
- [2] Borregaard, N. (2010): *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity 33(5): 657–70.
- [3] Akgul, C.; Moulding, D. A.; Edwards, S. W. (2001): *Molecular control of neutrophil apoptosis*. FEBS Lett 487(3): 318–22.
- [4] Brinkmann, V.; Reichard, U.; Goosmann, C.; Fauler, B.; Uhlemann, Y.; Weiss, D. S.; Weinrauch, Y.; Zychlinsky, A. (2004): *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science 303(5663): 1532–5.
- [5] Nathan, C. (2006): *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nat Rev Immunol 6(3): 173–82.
- [6] Németh, T.; Mócsai, A. (2012): *The role of neutrophils in autoimmune diseases*. Immunol Lett 143(1): 9–19.
- [7] Mariotti, A. (2004): *A primer on inflammation*. Compend Contin Educ Dent 25(7 Suppl 1): 7–15.
- [8] El-Benna, J.; Dang, P. M.-C.; Gougerot-Pocidallo, M.-A.; Marie, J.-C.; Braut-Boucher, F. (2009): *p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases*. Exp Mol Med 41(4): 217–25.
- [9] McDonald, B.; Pittman, K.; Menezes, G. B.; Hirota, S. A.; Slaba, I.; Waterhouse, C. C. M.; Beck, P. L.; Muruve, D. A.; Kubes, P. (2010): *Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation*. Science 330(6002): 362–6.
- [10] Melley, D. D.; Evans, T. W.; Quinlan, G. J. (2005): *Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome*. Clin Sci (Lond) 108(5): 413–24.
- [11] Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M. I.; Nourshargh, S. (2007): *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol 7(9): 678–89.
- [12] Nourshargh, S.; Hordijk, P. L.; Sixt, M. (2010): *Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium*. Nat Rev Mol Cell Biol 11(5): 366–78.
- [13] Nordenfelt, P.; Tapper, H. (2011): *Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils*. J Leukoc Biol 90(2): 271–84.
- [14] Malle, E.; Furtmüller, P. G.; Sattler, W.; Obinger, C. (2007): *Myeloperoxidase: a target for new drug development?* Br J Pharmacol 152(6): 838–54.
- [15] Soehnlein, O. (2009): *Direct and alternative antimicrobial mechanisms of neutrophil-derived granule proteins*. J Mol Med (Berl) 87(12): 1157–64.
- [16] Bratton, D. L.; Henson, P. M. (2011): *Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins*. Trends Immunol 32(8): 350–7.
- [17] Freire, M. O.; Van Dyke, T. E. (2013): *Natural resolution of inflammation*. Periodontol 2000 63(1): 149–64.

- [18] Fadok, V. A.; Bratton, D. L.; Konowal, A.; Freed, P. W.; Westcott, J. Y.; Henson, P. M. (1998): *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF*. J Clin Invest 101(4): 890–8.
- [19] Liu, G.; Wu, C.; Wu, Y.; Zhao, Y. (2006): *Phagocytosis of apoptotic cells and immune regulation*. Scand J Immunol 64(1): 1–9.
- [20] Battistuzzi, G.; Bellei, M.; Bortolotti, C. A.; Sola, M. (2010): *Redox properties of heme peroxidases*. Arch Biochem Biophys 500(1): 21–36.
- [21] Furtmüller, P. G.; Zederbauer, M.; Jantschko, W.; Helm, J.; Bogner, M.; Jakopitsch, C.; Obinger, C. (2006): *Active site structure and catalytic mechanisms of human peroxidases*. Arch Biochem Biophys 445(2): 199–213.
- [22] Ruf, J.; Carayon, P. (2006): *Structural and functional aspects of thyroid peroxidase*. Arch Biochem Biophys 445(2): 269–77.
- [23] Olsen, R. L.; Little, C. (1983): *Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood*. Biochem J 209(3): 781–7.
- [24] Singh, A. K.; Singh, N.; Sharma, S.; Singh, S. B.; Kaur, P.; Bhushan, A.; Srinivasan, A.; Singh, T. P. (2008): *Crystal structure of lactoperoxidase at 2.4 Å resolution*. J Mol Biol 376(4): 1060–75.
- [25] Klebanoff, S. J. (2005): *Myeloperoxidase: friend and foe*. J Leukoc Biol 77(5): 598–625.
- [26] Arnhold, J.; Flemmig, J. (2010): *Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity*. Arch Biochem Biophys 500(1): 92–106.
- [27] Sugiyama, S.; Okada, Y.; Sukhova, G. K.; Virmani, R.; Heinecke, J. W.; Libby, P. (2001): *Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes*. Am J Pathol 158(3): 879–91.
- [28] Fiedler, T. J.; Davey, C. A.; Fenna, R. E. (2000): *X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution*. J Biol Chem 275(16): 11964–71.
- [29] Carpena, X.; Vidossich, P.; Schroettner, K.; Calisto, B. M.; Banerjee, S.; Stamper, J.; Soudi, M.; Furtmüller, P. G.; Rovira, C.; Fita, I.; Obinger, C. (2009): *Essential role of proximal histidine-asparagine interaction in mammalian peroxidases*. J Biol Chem 284(38): 25929–37.
- [30] Kooter, I. M.; Moguilevsky, N.; Bollen, A.; van der Veen, L. A.; Otto, C.; Dekker, H. L.; Wever, R. (1999): *The sulfonium ion linkage in myeloperoxidase: direct spectroscopic detection by isotopic labeling and effect of mutation*. J Biol Chem 274(38): 26794–802.
- [31] Harrison, J. E.; Schultz, J. (1976): *Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase*. J Biol Chem 251(5): 1371–4.
- [32] Arnhold, J.; Furtmüller, P. G.; Regelsberger, G.; Obinger, C. (2001): *Redox properties of the couple compound I/native enzyme of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase*. Eur J Biochem 268(19): 5142–8.
- [33] Furtmüller, P. G.; Burner, U.; Obinger, C. (1998): *Reaction of myeloperoxidase compound I with chloride, bromide, iodide, and thiocyanate*. Biochemistry 37(51): 17923–30.

- [34] van Dalen, C. J.; Whitehouse, M. W.; Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J. (1997): *Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase*. *Biochem J* 327(Pt 2): 487–92.
- [35] Morgan, P. E.; Pattison, D. I.; Talib, J.; Summers, F. A.; Harmer, J. A.; Celermajer, D. S.; Hawkins, C. L.; Davies, M. J. (2011): *High plasma thiocyanate levels in smokers are a key determinant of thiol oxidation induced by myeloperoxidase*. *Free Radic Biol Med* 51(9): 1815–22.
- [36] Furtmüller, P. G.; Arnhold, J.; Jantschko, W.; Pichler, H.; Obinger, C. (2003): *Redox properties of the couples compound I/compound II and compound II/native enzyme of human myeloperoxidase*. *Biochem Biophys Res Commun* 301(2): 551–7.
- [37] Jantschko, W.; Furtmüller, P. G.; Allegra, M.; Livrea, M. A.; Jakopitsch, C.; Regelsberger, G.; Obinger, C. (2002): *Redox intermediates of plant and mammalian peroxidases: a comparative transient-kinetic study of their reactivity toward indole derivatives*. *Arch Biochem Biophys* 398(1): 12–22.
- [38] Furtmüller, P. G.; Burner, U.; Jantschko, W.; Regelsberger, G.; Obinger, C. (2000): *Two-electron reduction and one-electron oxidation of organic hydroperoxides by human myeloperoxidase*. *FEBS Lett* 484(2): 139–43.
- [39] Jantschko, W.; Furtmüller, P. G.; Zederbauer, M.; Lanz, M.; Jakopitsch, C.; Obinger, C. (2003): *Direct conversion of ferrous myeloperoxidase to compound II by hydrogen peroxide: an anaerobic stopped-flow study*. *Biochem Biophys Res Commun* 312(2): 292–8.
- [40] Dunford, H. B.; Hsuanyu, Y. (1999): *Kinetics of oxidation of serotonin by myeloperoxidase compounds I and II*. *Biochem Cell Biol* 77(5): 449–57.
- [41] Spalteholz, H.; Furtmüller, P. G.; Jakopitsch, C.; Obinger, C.; Schewe, T.; Sies, H.; Arnhold, J. (2008): *Kinetic evidence for rapid oxidation of (–)-epicatechin by human myeloperoxidase*. *Biochem Biophys Res Commun* 371(4): 810–3.
- [42] Flemmig, J.; Remmler, J.; Röhring, F.; Arnhold J. (2014): *(–)-Epicatechin regenerates the chlorinating activity of myeloperoxidase in vitro and in neutrophil granulocytes*. *J Inorg Biochem* 130: 84–91.
- [43] Burner, U.; Obinger, C.; Paumann, M.; Furtmüller, P. G.; Kettle, A. J. (1999): *Transient and steady-state kinetics of the oxidation of substituted benzoic acid hydrazides by myeloperoxidase*. *J Biol Chem* 274(14): 9494–502.
- [44] Tahboub, Y. R.; Galijasevic, S.; Diamond, M. P.; Abu-Soud, H. M. (2005): *Thiocyanate modulates the catalytic activity of mammalian peroxidases*. *J Biol Chem* 280(28): 26129–36.
- [45] Floris, R.; Piersma, S. R.; Yang, G.; Jones, P.; Wever, R. (1993): *Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite: a comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase*. *Eur J Biochem* 215(3): 767–75.
- [46] Furtmüller, P. G.; Jantschko, W.; Zederbauer, M.; Schwanninger, M.; Jakopitsch, C.; Herold, S.; Koppenol, W. H.; Obinger, C. (2005): *Peroxynitrite efficiently mediates the interconversion of redox intermediates of myeloperoxidase*. *Biochem Biophys Res Commun* 337(3): 944–54.
- [47] Bolscher, B. G.; Zoutberg, G. R.; Cuperus, R. A.; Wever, R. (1984): *Vitamin C stimulates the chlorinating activity of human myeloperoxidase*. *Biochim Biophys Acta* 784(2-3): 189–91.

- [48] Ximenes, V. F.; Maghzal, G. J.; Turner, R.; Kato, Y.; Winterbourn, C. C.; Kettle, A. J. (2010): *Serotonin as a physiological substrate for myeloperoxidase and its superoxide-dependent oxidation to cytotoxic tryptamine-4,5-dione*. *Biochem J* 425(1): 285–93.
- [49] Vlasova, I. I.; Sokolov, A. V.; Arnhold, J. (2012): *The free amino acid tyrosine enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase*. *J Inorg Biochem* 106(1): 76–83.
- [50] Lloyd, M. M.; Grima, M. A.; Rayner, B. S.; Hadfield, K. A.; Davies, M. J.; Hawkins, C. L. (2013): *Comparative reactivity of the myeloperoxidase-derived oxidants hypochlorous acid and hypothiocyanous acid with human coronary artery endothelial cells*. *Free Radic Biol Med* 65: 1352–62.
- [51] Rutgers, A.; Heeringa, P.; Tervaert, J. W. (2003): *The role of myeloperoxidase in the pathogenesis of systemic vasculitis*. *Clin Exp Rheumatol* 21(6 Suppl 32): 55–63.
- [52] Hampton, M. B.; Kettle, A. J.; Winterbourn, C. C. (1998): *Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing*. *Blood* 92(9): 3007–17.
- [53] Lanza, F. (1998): *Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency*. *J Mol Med (Berl)* 76(10): 676–81.
- [54] Kutter, D.; Devaquet, P.; Vanderstocken, G.; Paulus, J. M.; Marchal, V.; Gothot, A. (2000): *Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit?* *Acta Haematol* 104(1): 10–5.
- [55] Yamamoto, K.; Miyoshi-Koshio, T.; Utsuki, Y.; Mizuno, S.; Suzuki, K. (1991): *Virucidal activity and viral protein modification by myeloperoxidase: a candidate for defense factor of human polymorphonuclear leukocytes against influenza virus infection*. *J Infect Dis* 164(1): 8–14.
- [56] Aratani, Y.; Koyoma, H.; Nyi, S.-I.; Suzuki, K.; Kura, F.; Maeda, N. (1999): *Severe impairment in early host defense against candida albicans in mice deficient in myeloperoxidase*. *Infect Immun* 67(4): 1828–36.
- [57] Podrez, E. A.; Abu-Soud, H. M.; Hazen, S. L. (2000): *Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis*. *Free Radic Biol Med* 28(12): 1717–25.
- [58] Malle, E.; Marsche, G.; Panzenboeck, U.; Sattler, W. (2006): *Myeloperoxidase-mediated oxidation of high-density lipoproteins: fingerprints of newly recognized potential proatherogenic lipoproteins*. *Arch Biochem Biophys* 445(2): 245–55.
- [59] Zheng, L.; Nukuna, B.; Brennan, M.-L.; Sun, M.; Goormastic, M.; Settle, M.; Schmitt, D.; Fu, X.; Thomson, L.; Fox, P. L.; Ischiropoulos, H.; Smith, J. D.; Kinter, M.; Hazen, S. L. (2004): *Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease*. *J Clin Invest* 114(4): 529–41.
- [60] Liu, C.; Desikan, R.; Ying, Z.; Gushchina, L.; Kampfrath, T.; Deiliiis, J.; Wang, A.; Xu, X.; Zhong, J.; Rao, X.; Sun, Q.; Maiseyeu, A.; Parthasarathy, S.; Rajagopalan, S. (2012): *Effects of a novel pharmacologic inhibitor of myeloperoxidase in a mouse atherosclerosis model*. *PLOS ONE* 7(12): e50767.
- [61] Schiller, J.; Arnhold, J.; Sonntag, K.; Arnold, K. (1996): *NMR studies on human, pathologically changed synovial fluids: role of hypochlorous acid*. *Magn Reson Med* 35(6): 848–53.

- [62] Soubhye, J.; Aldib, I.; Elfving, B.; Gelbcke, M.; Furtmüller, P. G.; Podrecca, M.; Conotte, R.; Colet, J.-M.; Rousseau, A.; Reye, F.; Sarakbi, A.; Vanhaeverbeek, M.; Kauffmann, J.-M.; Obinger, C.; Nève, J.; Prévost, M.; Zouaoui Boudjeltia, K.; Dufrasne, F.; van Antwerpen, P. (2013): *Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of novel 3-alkylindole derivatives as selective and highly potent myeloperoxidase inhibitors*. *J Med Chem* 56(10): 3943–58.
- [63] Peskin, A. V.; Winterbourn, C. C. (2001): *Kinetics of the reactions of hypochlorous acid and amino acid chloramines with thiols, methionine, and ascorbate*. *Free Radic Biol Med* 30(5): 572–9.
- [64] Grisham, M. B.; Jefferson, M. M.; Melton, D. F.; Thomas, E. L. (1984): *Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils*. *J Biol Chem* 259(16): 10404–13.
- [65] Emerson, D. K.; McCormick, M. L.; Schmidt, J. A.; Knudson, C. M. (2004): *Taurine monochloramine activates a cell death pathway involving Bax and Caspase-9*. *J Biol Chem* 280(5): 3233–41.
- [66] Klamt, F.; Shacter, E. (2005): *Taurine chloramine, an oxidant derived from neutrophils, induces apoptosis in human B lymphoma cells through mitochondrial damage*. *J Biol Chem* 280(22): 21346–52.
- [67] Ogino, T.; Ozaki, M.; Hosako, M.; Omori, M.; Okada, S.; Matsukawa, A. (2009): *Activation of c-Jun N-terminal kinase is essential for oxidative stress-induced Jurkat cell apoptosis by monochloramine*. *Leuk Res* 33(1): 151–8.
- [68] Tsurubuchi, T.; Aratani, Y.; Maeda, N.; Koyama, H. (2001): *Retardation of early-onset PMA-induced apoptosis in mouse neutrophils deficient in myeloperoxidase*. *J Leukoc Biol* 70(1): 52–8.
- [69] Wojtecka-Lukasik, E.; Czuprynska, K.; Maslinska, D.; Gajewski, M.; Gujski, M.; Maslinski, S. (2006): *Taurine-chloramine is a potent antiinflammatory substance*. *Inflamm Res* 55(Suppl 1): 17–8.
- [70] Kim, J. W.; Kim, C. (2005): *Inhibition of LPS-induced NO production by taurine chloramine in macrophages is mediated through Ras-ERK-NF-kappaB*. *Biochem Pharmacol* 70(9): 1352–60.
- [71] Ogino, T.; Kobuchi, H.; Sen, C. K.; Roy, S.; Packer, L.; Maguire, J. J. (1997): *Monochloramine inhibits phorbol ester-inducible neutrophil respiratory burst activation and T cell interleukin-2 receptor expression by inhibiting inducible protein kinase C activity*. *J Biol Chem* 272(42): 26247–52.
- [72] Ogino, T.; Hosako, M.; Hiramatsu, K.; Omori, M.; Ozaki, M.; Okada, S. (2005): *Oxidative modification of I-kappaB by monochloramine inhibits tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation*. *Biochim Biophys Acta* 1746(2): 135–42.
- [73] Omori, M.; Ogino, T.; Than, T. A.; Okada, S. (2002): *Monochloramine inhibits the expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 induced by TNF-alpha through the suppression of NF-kappaB activation in human endothelial cells*. *Free Radic Res* 36(8): 845–52.
- [74] Odobasic, D.; Kitching, A. R.; Yang, Y.; O'Sullivan, K. M.; Muljadi, R. C. M.; Edgton, K. L.; Tan, D. S. Y.; Summers, S. A.; Morand, E. F.; Holdsworth, S. R. (2013): *Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function*. *Blood* 121(20): 4195–204.
- [75] Kirchner, T.; Flemmig, J.; Furtmüller, P. G.; Obinger, C.; Arnhold, J. (2010): *(-)-Epicatechin enhances the chlorinating activity of human myeloperoxidase*. *Arch Biochem Biophys* 495(1): 21–7.

- [76] Kettle, A. J.; Winterbourn, C. C. (1988): *The mechanism of myeloperoxidase-dependent chlorination of monochlorodimedon*. *Biochim Biophys Acta* 957(2): 185–91.
- [77] Kettle, A. J.; Winterbourn, C. C. (1994): *Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase*. *Methods Enzymol* 233: 502–12.
- [78] Setsukinai, K.; Urano, Y.; Kakinuma, K.; Majima, H. J.; Nagano, T. (2003): *Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species*. *J Biol Chem* 278(5): 3170–5.
- [79] Flemmig, J.; Zschaler, J.; Remmler, J.; Arnhold, J. (2012): *The fluorescein-derived dye aminophenyl fluorescein is a suitable tool to detect hypobromous acid (HOBr)-producing activity in eosinophils*. *J Biol Chem* 287(33): 27913–23.
- [80] Heilmann, J.; Merfort, I. (1998): *Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden: II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden*. *Pharm Unserer Zeit* 27(4): 173–83.
- [81] Müller, N. (2010): *Bolusgabe von weißem und grünem Tee bei Gesunden: Plasmakinetik von Flavan-3-olen und Einfluss auf oxidative Biomarker*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Hohe Landwirtschaftliche Fakultät).
- [82] Schroeter, H.; Heiss, C.; Balzer, J.; Kleinbongard, P.; Keen, C. L.; Hollenberg, N. K.; Sies, H.; Kwik-Urbe, C.; Schmitz, H.-H.; Kelm, M. (2006): *(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(4): 1024–9.
- [83] Buijsse, B.; Feskens, E. J.; Kok, F. J.; Kromhout, D. (2006): *Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen elderly study*. *Arch Intern Med* 166(4): 411–7.
- [84] Schiebler, T. H.; Korf, H.-W. (2007): *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 10. Auflage, Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- [85] Sheppard, F. R.; Kelher, M. R.; Moore, E. E.; McLaughlin, N. J.; Banerjee, A.; Silliman, C. C. (2005): *Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation*. *J Leukoc Biol* 78(5): 1025–42.
- [86] Allen, R. C.; Yevich, S. J.; Orth, R. W.; Steele, R. H. (1974): *The superoxide anion and singlet molecular oxygen: their role in the microbicidal activity of the polymorphonuclear leukocyte*. *Biochem Biophys Res Commun* 60(3): 909–17.
- [87] József, L.; Zouki, C.; Petasis, N. A.; Serhan, C. N.; Filep, J. G. (2002): *Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF- κ B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(20): 13266–71.
- [88] Beers, R. F. Jr.; Sizer, I. W. (1952): *A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase*. *J Biol Chem* 195(1): 133–40.
- [89] Zuurbier, K. W. M.; Bakkenist, A. R. J.; Wever, R.; Muijsers, A. O. (1990): *The chlorinating activity of human myeloperoxidase: high initial activity at neutral pH value and activation by electron donors*. *Biochim Biophys Acta* 1037(2): 140–6.
- [90] Lee, C. W.; Lewis, R. A.; Tauber, A. I.; Mehrotra, M.; Corey, E. J.; Austen, K. F. (1983): *The myeloperoxidase-dependent metabolism of leukotrienes C₄, D₄, and E₄ to 6-trans-leukotriene B₄ diastereoisomers and the subclass-specific S-diastereoisomeric sulfoxides*. *J Biol Chem* 258(24): 15004–10.

- [91] Hogg, N.; Darlay-Usmar, V. M.; Wilson, M. T.; Moncada, S. (1992): *Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide*. *Biochem J* 281(Pt 2): 419–24.
- [92] Mechlovich, D.; Amit, T.; Mandel, S. A.; Bar-Am, O.; Bloch, K.; Vardi, P.; Youdim, M. B. H. (2010): *The novel multifunctional, iron-chelating drugs M30 and HLA20 protect pancreatic β -cell lines from oxidative stress damage*. *J Pharmacol Exp Ther* 333(3): 874–82.
- [93] Kettle, A. J.; Gedye, C. A.; Winterbourn, C. C. (1997): *Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide*. *Biochem J* 321(Pt 2): 503–8.
- [94] Doussi re, J., Vignais, P. V. (1992): *Diphenylene iodonium as an inhibitor of the NADPH oxidase complex of bovine neutrophils: factors controlling the inhibitory potency of diphenylene iodonium in a cell-free system of oxidase activation*. *Eur J Biochem* 208(1): 61–71.
- [95] Cotter, G.; Kaluski, E.; Blatt, A.; Milovanov, O.; Moshkovitz, Y.; Zaidenstein, R.; Salah, A.; Alon, D.; Michovitz, Y.; Metzger, M.; Vered, Z.; Golik, A. (2000): *L-NMMA (a nitric oxide synthase inhibitor) is effective in the treatment of cardiogenic shock*. *Circulation* 101(12): 1358–61.
- [96] Rossi, A.; Pergola, C.; Koeberle, A.; Hoffmann, M.; Dehm, F.; Bramanti, P.; Cuzzocrea, S.; Werz, O.; Sautebin, L. (2010): *The 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, suppresses prostaglandin biosynthesis by inhibition of arachidonic acid release in macrophages*. *Br J Pharmacol* 161(3): 555–70.
- [97] Da Violante, G.; Zerrouk, N.; Richard, I.; Provot, G.; Chaumeil, J. C.; Arnaud, P. (2002): *Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures*. *Biol Pharm Bull* 12(25): 1600–3.
- [98] Shapiro, H. M. (2003): *Practical flow cytometry*. 4. Auflage, John Wiley & Sons, Hoboken.
- [99] Tung, J. W.; Heydari, K.; Tirouvanziam, R.; Sahaf, B.; Parks, D. R.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A. (2007): *Modern flow cytometry: a practical approach*. *Clin Lab Med* 27(3): 453–68.
- [100] Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. (2001): *Immunobiology*. 5. Auflage, Garland Science, New York.
- [101] Kitaura, M.; Nakajima, T.; Imai, T.; Harada, S.; Combadiere, C.; Tiffany, H. L.; Murphy, P. M.; Yoshie, O. (1996): *Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3*. *J Biol Chem* 271(13): 7725–30.
- [102] Ugucconi, M.; Mackay, C. R.; Ochensberger, B.; Loetscher, P.; Rhis, S.; LaRosa, G. J.; Rao, P.; Ponath, P. D.; Baggiolini, M.; Dahinden C. A. (1997): *High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines*. *J Clin Invest* 100(5): 1137–43.
- [103] Smiley, S. T.; Reers, M.; Mottola-Hartshorn, C.; Lin, M.; Chen, A.; Smith, T. W.; Steele, G. D.; Chen, L. B. (1991): *Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(9): 3671–5.
- [104] Cossarizza, A.; Baccarani-Contri, M.; Kalashnikova, G.; Franceschi, C. (1993): *A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1)*. *Biochem Biophys Res Commun* 197(1): 40–5.

- [105] Gomes, A.; Fernandes, E.; Lima, J. L. F. C. (2005): *Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species*. J Biochem Biophys Methods 65(2-3): 45–80.
- [106] Nahas, S. A.; Butch, A. W.; Du, L.; Gatti, R. A. (2009): *Rapid flow cytometry-based structural maintenance of chromosomes 1 (SMC1) phosphorylation assay for identification of ataxia-telangiectasia homozygotes and heterozygotes*. Clin Chem 55(3): 463–72.
- [107] Temmerman, K.; Nickel W. (2009): *A novel flow cytometric assay to quantify interactions between proteins and membrane lipids*. J Lipid Res 50(6): 1245–54.
- [108] Weiß, C. (2010): *Basiswissen medizinische Statistik*. 5. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- [109] Rasch, B.; Hofmann, W.; Friese, M.; Naumann, E. (2010): *Quantitative Methoden 1: Einführung in die Statistik für Psychologen und Sozialwissenschaftler*. 3. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg.
- [110] Zschaler, J. (2011): *Spontane Apoptose eosinophiler Granulozyten: Vergleichende Analyse zu neutrophilen Granulozyten*. Masterarbeit, Universität Leipzig (Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie).
- [111] Schefzyk, M.; Bruder, M.; Schmiedl, A.; Stephan, M.; Kapp, A.; Wedi, B.; Raap, U. (2009): *Eosinophil granulocytes: functional differences of a new isolation kit compared to the isolation with anti-CD16-conjugated MicroBeads*. Exp Dermatol 18(7): 653–5.
- [112] Nagano, T. (2009): *Bioimaging probes for reactive oxygen species and reactive nitrogen species*. J Clin Biochem Nutr 45(2): 111–24.
- [113] Tauber, A. I.; Babior, B. M. (1977): *Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils*. J Clin Invest 60(2): 374–9.
- [114] Koppenol, W. H. (1987): *Thermodynamics of reactions involving oxyradicals and hydrogen peroxide*. Bioelectroch Bioener 18(1-3): 3–11.
- [115] Kenmoku, S.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T. (2007): *Development of a highly specific rhodamine-based fluorescence probe for hypochlorous acid and its application to real-time imaging of phagocytosis*. J Am Chem Soc 129(23): 7313–8.
- [116] Izumi, S.; Urano, Y.; Hanaoka, K.; Terai, T.; Nagano, T. (2009): *A simple and effective strategy to increase the sensitivity of fluorescence probes in living cells*. J Am Chem Soc 131(29): 10189–200.
- [117] Chen, X.; Lee, K.-A.; Ha, E.-M.; Lee, K. M.; Seo, Y. Y.; Choi, H. K.; Kim, H. N.; Kim, M. J.; Cho, C.-S.; Lee, S. Y.; Lee, W.-J.; Yoon, J. (2011): *A specific and sensitive method for detection of hypochlorous acid for the imaging of microbe-induced HOCl production*. Chem Commun 47(15): 4373–5.
- [118] Aiken, M. L.; Painter, R. G.; Zhou, Y.; Wang, G. (2012): *Chloride transport in functionally active phagosomes isolated from human neutrophils*. Free Radic Biol Med 53(12): 2308–17.
- [119] Roos, D.; Weening, R. S.; Wyss, S. R.; Aebi, H. E. (1980): *Protection of human neutrophils by endogenous catalase: studies with cells from catalase-deficient individuals*. J Clin Invest 65(5): 1515–22.
- [120] Pricop, L.; Gokhale, J.; Redecha, P.; Ng, S. C.; Salmon, J. E. (1999): *Reactive oxygen intermediates enhance Fc gamma receptor signaling and amplify phagocytic capacity*. J Immunol 162(12): 7041–8.

-
- [121] Kasahara, Y.; Iwai, K.; Yachie, A.; Ohta, K.; Konno, A.; Seki, H.; Miyawaki, T.; Taniguchi, N. (1997): *Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils*. Blood 89(5): 1748–53.
- [122] Sakagami, H.; Asano, K.; Hara, Y.; Shimamura, T. (1992): *Stimulation of human monocyte and polymorphonuclear cell iodination and interleukin-1 production by epigallocatechin gallate*. J Leukoc Biol 51(5): 478–83.
- [123] Kutter, D. (1998): *Prevalence of myeloperoxidase deficiency: population studies using Bayer-Technicon automated hematology*. J Mol Med (Berl) 76(10): 669–75.
- [124] Kutter, D.; Al Haidari, K.; Thoma, J. (1994): *Myeloperoxidase deficiency: simple methods for its diagnosis and significance of different forms*. Klin Lab 40(4): 342–6.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

6.2.2014

Datum



Unterschrift

WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

Persönliche Daten

Name	Johannes Remmler
Geburtsdatum	15.03.1989
Geburtsort	Gera

Schulbildung

06/2007	Abitur am Goethe-Gymnasium Gera (Note 1,4)
---------	--

Studium

10/2007	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Leipzig
09/2009	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5)
10/2011 - 09/2012	Zwei Semester beurlaubt, Experimentalphase der Promotion am Institut für Medizinische Physik und Biophysik Leipzig (gefördert durch ein Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät Leipzig)
voraussichtlich 05/2014	Beginn des Praktischen Jahres des Medizinstudiums

PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE

08/2012 Mitautorschaft bei einem Fachartikel:

Flemmig, J.; Zschaler, J.; Remmler, J.; Arnhold, J. (2012): *The fluorescein-derived dye aminophenyl fluorescein is a suitable tool to detect hypobromous acid (HOBr)-producing activity in eosinophils.* J Biol Chem 287(33): 27913–23.

09/2013 15-minütiger Vortrag mit Diskussion auf einer themenspezifischen Tagung:

The flavonoid (-)-epicatechin regenerates the chlorinating activity of myeloperoxidase. 8th International Human Peroxidase Meeting, Sydney, Australien (09.-12.09.2013)

01/2014 Geteilte Erstautorschaft bei einem Fachartikel:

Flemmig, J.; Remmler, J.; Röhring, F.; Arnhold J. (2014): *(-)-Epicatechin regenerates the chlorinating activity of myeloperoxidase in vitro and in neutrophil granulocytes.* J Inorg Biochem 130: 84–91.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Arnhold für die Ermöglichung dieser Arbeit, die Bereitstellung des interessanten Themas und vor allem für die zu jeder Zeit hervorragende Betreuung.

Des Weiteren danke ich dem Institut für Medizinische Physik und Biophysik und seinen Mitarbeitern für die Bereitstellung von Büro- und Laborräumen, Geräten und Arbeitsmitteln und für die angenehme zwischenmenschliche Atmosphäre, die allgemein herrschte. Dies ermöglichte es mir, im Zeitraum von Oktober 2011 bis September 2012 die Experimente für diese Arbeit effektiv durchzuführen. Ebenso danke ich der Medizinischen Fakultät für die Unterstützung mit einem Promotionsstipendium im gleichen Zeitraum, die es mir möglich machte, mich voll auf diese Arbeit zu konzentrieren.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Jörg Flemmig für die exzellente theoretische und praktische Einarbeitung in die Thematik bedanken, ebenso bei Frau Josefin Zschaler und Frau Maria Schönberg für zahlreiche Ratschläge und Hilfestellung bei methodischen Problemen im Laboralltag. Der gesamten Arbeitsgruppe gilt mein Dank für eine großartige Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Transfusionsmedizin (Institutsteil Mitte) und ganz besonders den Blutspendern, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ganz herzlich möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre rückhaltlose Unterstützung bedanken.