

**Bedeutung von Myeloperoxidase
für Atherogenese und Neointimaformierung am
Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Bakary Camara

aus Conakry/Guinea

2020

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Georg Nickenig
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Alexander Pfeifer

Tag der Mündlichen Prüfung: 03.09.2020

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Innere Medizin; Kardiologie, Angiologie, Pneumologie und Internistische Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung	5
1.1 Einleitung.....	5
1.2 Material und Methoden	11
1.3 Ergebnisse.....	19
1.4 Diskussion	23
1.5 Zusammenfassung	28
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung.....	30
2 Veröffentlichung	36
Abstract.....	39
Introduction/Background	39
Materials and Methods.....	41
Results.....	42
Discussion.....	42
References.....	45
3 Danksagung	44

Abkürzungsverzeichnis

A.....	Arteria
Abb.....	Abbildung
ANOVA.....	Varianzanalyse (ANalysis Of VAriance)
ApoE ^{-/-}	Apolipoprotein E-Defizienz, Apolipoprotein E-defizienz
CDC.....	Center of Disease Control and Preventions
CVD.....	Cardiovascular disease
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
ELISA.....	Enzym-linked immunosorbent Assay
HDL.....	High-density lipoprotein
HET.....	Haus für experimentelle Therapie
i.p.....	intraperitoneal
i.v.....	intravenös
IL-10.....	Interleukin 10
IL-6.....	Interleukin 6
KHK.....	Koronare Herzkrankheit
LDL.....	Low-density lipoprotein
LV.....	linksventrikulär
MPO.....	Myeloperoxidase
MPO ^{-/-}	Myeloperoxidase-Defizienz
pH.....	pH-Wert
PMN.....	Polymorphkernige neutrophilen Granulozyten
SMC.....	smooth muscle cells, glatte Muskelzellen
Tab.....	Tabelle
UKB.....	Universitätsklinik Bonn
WT.....	Wildtyp

Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Die kardiovaskulären Erkrankungen (CVD) gehören seit Jahrzehnten zu den führenden Todesursachen weltweit. Nach Angaben des *Centers for Disease Control and Preventions, CDC*, versterben über 7 Millionen Menschen an der koronaren Herzkrankheit (KHK) jährlich. Gesundheitspolitisch betrachtet stellen diese Erkrankungen auch für den aktuellen Stand der Medizin eine große sozioökonomische Herausforderung in der Vor- und Nachsorge sowie in der Akutbehandlung der betroffenen Patienten dar.

Bei den CVD handelt es sich um Erkrankungen multifaktorieller Genese. Ihre Entwicklung wird sowohl durch genetische Prädispositionen als durch eine Vielzahl an Risikofaktoren wie zum Beispiel Rauchen, Hypercholesterinämie, Diabetes Mellitus und arterielle Hypertonie beeinflusst (Ross R, 1999).

In der Frühphase kommt es zu einer Endotheldysfunktion, die durch die Rekrutierung, und die Adhäsion von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) charakterisiert wird. Anschließend wird die Infiltration, die Migration sowie die Aktivierung der PMN initiiert. Diese Zellwanderung wird hauptsächlich durch zytotoxische Mediatoren gesteuert, die zu einer Potenzierung dieser Chemotaxis beitragen (Galkina und Ley, 2009). Konsekutiv sezernieren die aktivierten PMNs vermehrt proinflammatorische Enzyme wie die Myeloperoxidase (MPO), die in der subendothelialen Matrix akkumuliert und katalytisch aktiv verbleibt. Dieser hochpotente Oxidationskatalysator provoziert den oxidativen Stress und trägt zu vaskulären inflammatorischen Prozessen entscheidend bei (Lau und Baldus, 2006). Als Antwort auf die alterierende Entzündung und den oxidativen Stress proliferieren die glatten Gefäßmuskelzellen (*smooth muscle cells, SMC*). Die entstandene Läsion wird fibrotisch und bildet einen Kern aus nekrotischem Gewebe und Lipiden. Bei Ruptur einer solchen atherosklerotischen Plaque kommt es zu thrombembolischen Verschlüssen in kleineren nachgeschalteten Gefäßen, was wiederum zu einer Ischämie führt (Ross R, 1999).

Die Myeloperoxidase

Die MPO gehört zu den Hämoproteinen. Gemeinsam mit anderen Enzymen derselben Klasse (u.a. der Lactoperoxidase, der eosinophilen Peroxidasen und der thyroiden Peroxidasen) bildet die MPO die Familie der Säugetier-spezifischen Peroxidasen. Das stark glykolysierte Protein ist ein 150 kDa schweres homodimeres Enzym. Seine Monomere werden aus einer leichten und einer schweren Untereinheit zusammen gebildet. Über eine kovalente Verbindung wird ein Häm-Molekül, welches dem Protein die intensive grüne Farbe verleiht, jeweils von einer schweren Kette getragen (Abb. 1; Lau und Baldus, 2006). Ferner liegt bei der MPO im Gegensatz zu anderen Peroxidasen eine zusätzliche Sulfoniumionen-Bindung zwischen dem Schwefelatom des Methionin²⁴³ und dem terminalen Kohlenstoff der Vinylgruppe des Pyrrolringes A vor. Dies ist verantwortlich für die Fähigkeit des Enzyms Chlorid als Substrat einzusetzen und stellt damit eine spezifische Eigenschaft der MPO im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der Peroxidase-Familie dar (R. Fenna et al.; K.L. Taylor et al, 1995).

Hauptsächlich ist die MPO in den azurophylen Granula der neutrophilen Granulozyten lokalisiert. In diesen Zellen macht sie etwa 5% der gesamten Proteine aus. Des Weiteren ist das Enzym in geringer Menge sowohl in Monozyten sowie in gewebs- bzw. organspezifischen Makrophagen (hepatischen Kupferzellen und Mikroglia) nachweisbar. Physiologisch entfaltet die MPO ihre Wirkung in der angeborenen Immunabwehr (Lau und Baldus, 2006; Nicholls und Hazen, 2009). Die katalytische Pathogenabwehr setzt ein sogenanntes MPO-System voraus. Letzteres besteht aus der MPO selbst, Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Substrat und einem geeigneten oxidierbaren Kosubstrat. Durch eine Redox-Reaktion kann die MPO in zwei unterschiedliche radikalische komplexe Verbindungen (*Compound-I* und *-II*) überführt werden (Abb. 2). Die *Compound-I* kann durch eine direkte Oxidation von Halogeniden, Pseudohalogeniden oder Nitrit in die native MPO-Form zurückreduziert werden. Angesichts ihren höheren physiologischen Konzentrationen reagiert die *Compound-I* wesentlich mit Chlorid-Ionen (Cl^-). Diese werden zu hypochloriger Säure ($HOCl$) oxidiert, welche wiederum als starkes Oxidationsmittel ein toxisches Molekül für Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen und Helminthen, aber auch für körpereigene Strukturen darstellt. (H. Fliss, 1988; J. E. Harrison und J. Schultz, 1976).

Die *Compound-II* ist nicht in der Lage mit Halogeniden zu reagieren. Vielmehr fungieren hier aromatische Aminosäure und Nitrite als geeignete Reaktionspartner. Durch die entstandenen reaktiven freien Radikale kann der oxidative Stress protrahieren.

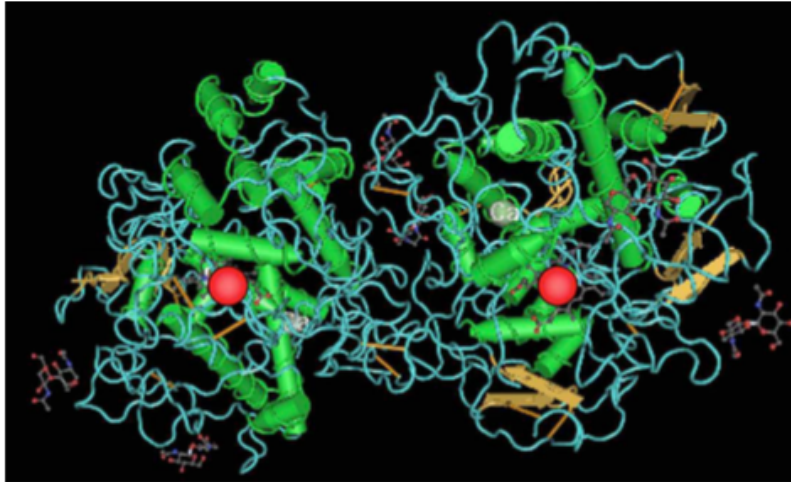
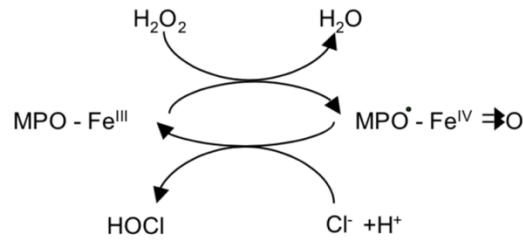


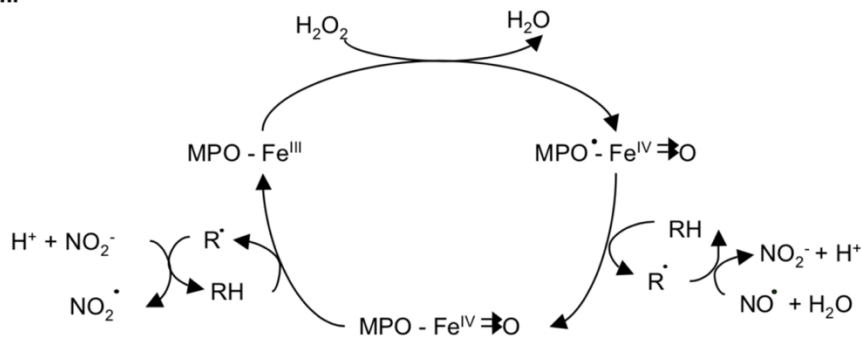
Abb. 1: Die Homodimeren des MPO-Moleküls dreidimensional dargestellt. Das Hämo-protein (rot), die Alpha-Helices (grün) und die Beta-Faltblatt-Strukturen (gelb) wurden hier hervorgehoben. Quelle: Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology and Therapeutics*. 2006.

Im subendothelialen Raum wird durch die MPO-Aktivität das vaskuläre Stickstoffmonoxid in pathophysiologisch relevantem Ausmaß oxidiert. Hierdurch kommt es zu einer direkten Konsumption von Stickstoffmonoxid (NO) mit konsekutiver Reduktion der Bioverfügbarkeit dieses entscheidenden vasoaktiven sowie anti-inflammatorischen Moleküls. Durch die HOCl-induzierte Chlorierung von L-Arginin - dem Substrat der NO-Synthase - wird deren Aktivität ebenfalls vermindert (Zhang et al., 2001). Ferner fungiert die MPO-generierte HOCl als Oxidans für Lipoproteine wie LDL und HDL (C. Leeuwenburgh et al., 1997; Hazen S.L., Heinecke, 1997). Chlorierte und nitrierte LDL werden besonders bevorzugt von Makrophagen aufgenommen. All diese Eigenschaften verleihen der MPO einen proatherogenen Charakter, der in mehreren *in-vitro* und *in-vivo* Studien identifiziert werden konnte (Nicholls und Hanzen, 2009; Yang et al, 2006; Wong et al, 2009). Hierauf beruhend konnte das Enzym und seine oxidativen Endprodukte in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden (Daughtery et al, 1994; Van Leeuwen et al, 2008).

I.



II.



III.

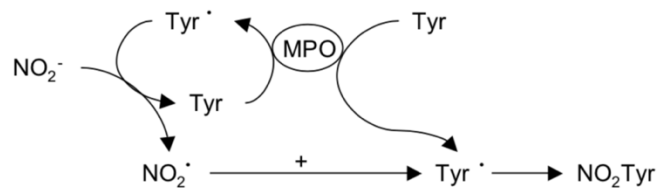


Abb. 2: Katalysierte Redox-Reaktionen der MPO. In der ersten Reaktion entstandene hypochlorige Säure ist essentiell für die Pathogenabwehr. Allerdings können physiologische Substrate (RH) durch Compound-II oxidiert werden und dadurch freie Radikale entstehen (R[•]), die wiederum den NO-Konsumption begünstigen. Alternativ könnte der NO-Verbrauch nach der Oxidation von Tyrosin durch Compound-III durch die Übertragung von NO₂ unterstützt. Quelle: Klinke A, et al. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. Blood. 2011.

Die MPO besitzt nicht nur einen mechanistischen Zusammenhang mit der Vulnerabilität für Rhythmusstörungen wie Vorhofflimmern, sondern ein erhöhter Serum-Spiegel an Myeloperoxidase korreliert auch mit einer linksventrikulären (LV-) Dilatation und einer eingeschränkten LV-Funktion (Rudolph et al. 2007). Ferner konnte die MPO als

unabhängiger prädiktiver Marker für kardiovaskuläre Erkrankungen demaskiert werden. Diese Tatsache wird dadurch unterstützt, dass totale oder subtotale MPO-defiziente Personen mit geringer Wahrscheinlichkeit als MPO-kompetente CVD entwickeln. Zusätzlich korreliert ein erhöhter MPO-Serumspiegel mit einer endothelialen Dysfunktion, bestimmt durch Fluss-abhängige Dilatation der A. brachialis (Vita et al. 2004). Interessanterweise waren intrakoronare ermittelte, hohe MPO-Konzentrationen im Plasma sowie die Leukozytenzahl direkt proportional zum Vorkommen von KHK (Zhang et al. 2001). Weitere klinische und epidemiologische Studien konnten Hinweise auf eine direkte Korrelation zwischen dem Enzym und kardiovaskulären Erkrankungen unabhängig von den traditionellen Risikofaktoren erbringen. So wird eine MPO-Elevation im Serum mit zunehmender kardiovaskulärer Mortalität assoziiert. In diesem Zusammenhang kann die MPO als prognostischer Marker sowohl bei gesunden als auch bei Patienten mit stabiler KHK, akutem Koronarsyndrom und Myokardinfarkt fungieren (Meuwese et al, 2007; Baldus et al, 2003; Mocatta et al, 2007). Im Gegensatz zu dieser Vielzahl an Befunden der Kontribution der MPO an atherogenen Vorgängen erbrachten einzelne in-vivo Studien kontroverse Ergebnisse. Unter anderem führte die Transplantation von MPO-defizienten Knochenmark in LDL-Rezeptor Knockout Mäuse zu einer geringfügig erhöhten Plaquelast in der Aortenwurzel (Brennan et al, 2001). Darüber hinaus konnte in weiteren experimentellen Studien gezeigt werden, dass die Überexpression humaner MPO in murinen Makrophagen eine Progression der Atherosklerose im Mausmodell fördern kann (McMillen et al, 2005; Castellani et al, 2006).

Die Hypothese und Zielsetzung

Angesichts der jetzigen wissenschaftlichen Erkenntnisse könnte die Beteiligung der MPO in vaskulären pathophysiologischen Mechanismen der Atherogenese von erheblicher Bedeutung sein. Zum einen provoziert das Enzym eine Rekrutierung von inflammatorischen Zellen in der extrazellulären Matrix, indem sie deren Adhäsion und Migration über die Gefäßwand begünstigt. Zum anderen fördert es über seine extramikrobiziden und katalytischen Eigenschaften die Entstehung und das Fortschreiten der Atherogenese. Durch seinen proinflammatorischen Charakter

propagiert und prolongiert es den vaskulären oxidativen Stress und damit die vaskuläre Inflammation. Damit scheint das Hämoprotein nicht nur an der Entstehung von CVD Teil zu haben, sondern deren Progression sogar zu ermöglichen. Obgleich das gesamte Spektrum der MPO-vermittelten Funktionen noch nicht ganz aufgedeckt ist, sprechen viele Befunde für die atherogenen Eigenschaften des Enzyms. Dadurch könnte es sich hierbei um eine Zielstruktur für diagnostische aber auch therapeutische Strategien handeln. Zweck der folgenden Arbeit ist es, die Bedeutung der MPO in einem atherosklerotischen Apolipoprotein-E-Knockout Mausmodell sowie in Knochmarktransplantationsexperimenten zu charakterisieren. In diesem Kontext soll die Auswirkung einer pharmakologischen Hemmung des Häm-Enzyms sowie seiner genetischen Inaktivierung auf die Freisetzung der vaskulären freien Sauerstoffradikale und der inflammatorischen Zytokine im Plasma, die Endothelfunktion sowie die Bildung atherosklerotischer Läsionen (Abb. 3) untersucht werden. Ferner sollen die Effekte der MPO in der Formierung von Neointima im Mausmodell analysiert werden (Abb. 3).

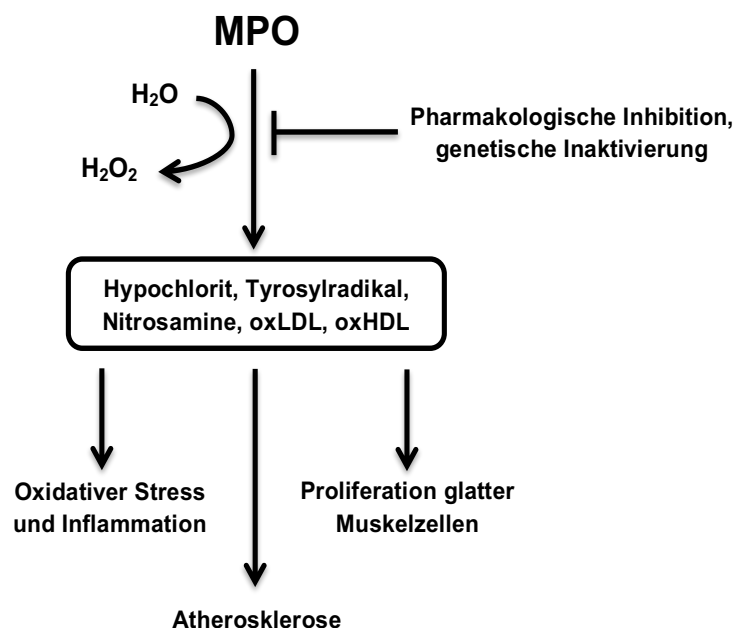


Abb. 3: Arbeitshypothese: MPO führt über die Oxidation zahlreicher physiologischer Substrate zu einem protrahierten vaskulären oxidativen Stress, vermehrten inflammatorischen Prozessen, zunehmender Proliferation der glatten Muskelzellen und konsekutiv zur Entstehung von atherosklerotischen Läsionen. Durch eine pharmakologische Inhibition oder Gen-Inaktivierung des Hämoproteins könnten diese atherogenen Eigenschaften signifikant gehemmt werden.

Apolipoprotein-E defiziente Mäuse:

Die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen ist bei Wildtyp-Mäusen nicht zu beobachten. Jahrzehnte hinweg war das einzige Mausmodell der Atherosklerose die C57BL/6-Maus. Die Läsionen konnten allerdings erst nach einem sehr intensiven, fettreichem Ernährungsregime entstehen (Reardon CA et al. 2001). Zusätzlich waren ihre Lokalisation und Histologie dem Menschen nicht identisch (Jawien J et al. 2004). Mithilfe von gezielter Genmodifikation entstand parallel in zwei Laboratorien im Jahr 1992 die Apolipoprotein-E-defiziente Maus (ApoE^{-/-}-Maus) (Piedrahita JA et al. 1992). Dieser Erfolg stellt einen Meilenstein dar, wodurch die Atherogenese Forschung revolutioniert wurde (Meir KS et al. 2004).

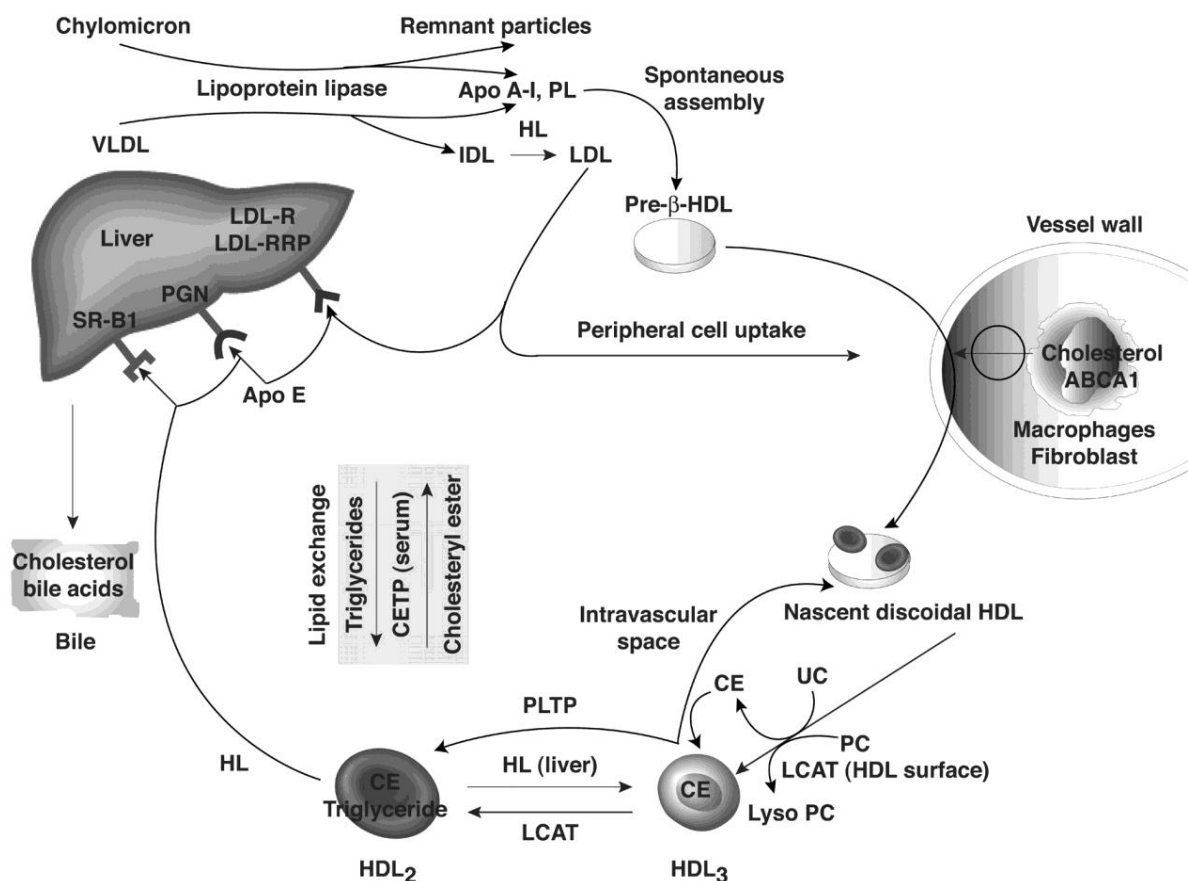


Abb. 4: Funktion vom ApoE im Rahmen des Fettstoffwechsels. Quelle: Assmann et al. Circulation. 2004.

Apolipoprotein E, dessen Synthese primär in der Leber und im Gehirn stattfindet, fungiert als Ligand für hepatische Rezeptoren, um die Aufnahme und Elimination von Chylomikronen und Very-Low-Density-Lipoprotein (VLDL)-Überreste zu ermöglichen (Abb. 4). Es reguliert die vaskuläre Cholesterin-Homöostase und steuert hierbei inflammatorische Reaktionen nach einer Sezernierung durch Monozyten und Makrophagen (Böcker W, Denk H, Heitz P, 2001).

Die Fütterung von ApoE^{-/-}-Mäusen mit einer sog. „Western Type Diet“ steigert und intensiviert bei einem Cholesterin-Spiegel über 200 mg/dl den Atherogenese-Prozess (Plump AS et al. 1992). Die gebildeten atherosklerotischen Läsionen in diesem Tiermodell lassen sich in ihrer ähnliche Lage und Histologie mit dem Menschen besser vergleichen (Rosenfeld ME et al. 2000). Mit diesem Mausmodell konnten zahlreiche Studien über genetische, pharmakologische sowie chirurgische Interventionen durchgeführt werden. Somit konnten Erkenntnisse über die Grundlage der Atherogenese gewonnen werden.

1.2 Material und Methoden

Tiere und Behandlungsprotokoll im ApoE-Maus-Modell

Für die Experimente wurden 6-8 Wochen alte ApoE^{-/-}-Mäuse sowie gleichaltrige myeloperoxidase-defiziente (MPO^{-/-}) Mäuse (genetischer Hintergrund: C57BL/6J, Charles River, Sulzfeld Germany) verwendet. Diese Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 22 °C und 12 Stunden Tag/Nacht-Zyklus gehalten. Sie wurden mit Wasser ad libitum versorgt. Die ApoE-knockout-Mäuse wurde mit einer fett- sowie cholesterinreichen Diät (bestehend aus 21% Fett, 19,5% Casein und 1,25% Cholesterin, Ssniff, Germany) gefüttert.

In einer ersten Versuchsreihe wurden 18 ApoE^{-/-} -Mäuse in drei Gruppen randomisiert (siehe Abb. 1A der Publikation). Die erste Gruppe erhielt als Kontrolle das Lösungsmittel (10 prozentige Dimethylsulfoxidlösung DMSO). Der zweiten Gruppe wurde eine niedrigere (10 µg/mg KG, entsprechend 250 µg i.p.) und der dritten Gruppe eine höhere (20 µg/mg KG, entsprechend 500 µg i.p.) Dosis von 4-para-Aminobenzoessäure (4-ABAH, Sigma-Aldrich) appliziert.

In der zweiten Versuchsreihe (Abb. 4A der Publikation) wurden ApoE^{-/-}-Mäuse einer Ganzkörperbestrahlung mit einer Dosis von 11 Gray ausgesetzt. Sie wurden in zwei Gruppen unterteilt, die mit 2,5 x10⁶ Zellen aus dem Knochenmark von WT- (Kontrollgruppe) oder von MPO^{-/-}-Mäusen durch eine intravenöse Verabreichung transplantiert. Bei zwei zufällig ausgewählten Tieren wurde keine Knochenmarkstransplantation durchgeführt. Über 14 Tage wurden die Tiere dieser Versuchsreihe mit normalem Futter sowie Leitungswasser versorgt (mit Enrofloxacin 10 mg/kg Körpergewicht versetzt). Durch den Tod der nicht transplantierten Tiere wurde die Effektivität der Repopulation im Knochenmark bei den allogenen transplantierten Tieren gewährleistet. Im Anschluss konnte das Regime für das Mausmodell der Atherosklerose durchgeführt werden.

Tiere und Behandlungsprotokoll im Neointima-Maus-Modell

Die mechanische Verletzung der Endothelschicht der Gefäße wurde bei 6-8 Wochen alten WT-Mäusen der Inzuchtlinie C57BL/6J und MPO^{-/-}-Mäusen mit dem gleichen genetischen Hintergrund induziert. Unter einer Sedierung mittels Xylazin-Hydrochloride (2,5 mg/100g KG i.p.) und Ketamin-Hydrochlorid (7,5 mg/100 g KG i.p.) wurde bei konstanter Körpertemperatur von ca. 37 °C die linke A. carotis communis, carotis interna und externa frei präpariert. Die drei Gefäßen konnten mittels Fäden unter Zug passager und schonend abgeklemmt (Abb. 5A). Die A. carotis externa wurde durch eine transversale Arterotomie eröffnet und ein 35 µm dicker Katheterdraht retrograd bis in die Carotis communis eingeführt. Mit korkenzieherartigen Bewegungen wurde der Draht dreimal auf und ab im Gefäß manövriert und damit eine Schädigung der Endothelschicht provoziert. Zum Schluss wurde die A. carotis externa ligiert und der Blutfluss in der A. carotis communis sowie A. carotis interna wiederhergestellt (Abb. 5B). Die Wunde konnte anschließend mit Einzelknopfnähten verschlossen. Der gesamte Eingriff dauerte ca. 30 Minuten. Die Aufwachphase erfolgt in mit Wärmekissen beheizten Käfigen, um einen Abfall der Körpertemperatur zu verhindern. Zur postoperativen Analgesie wurde Metamizol eingesetzt.

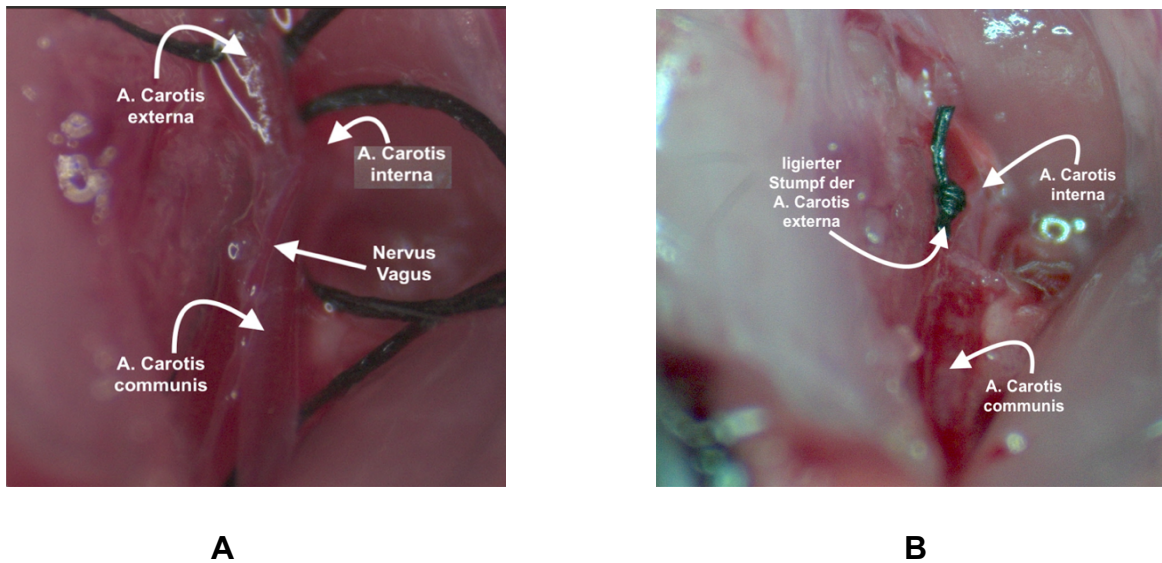


Abb. 5: Intraoperative Aufnahmen: Die Karotiden wurden bis zur Freilegung der Bifurkation unter Mikroskop vorsichtig präpariert. Der Blutzufuhr wird anhand von Fäden unterbrochen und die mechanische Läsion wie oben beschrieben vorgenommen (A). Zum Schluss wird die A. carotis externa ligiert und die Reperfusion wiederhergestellt (B).

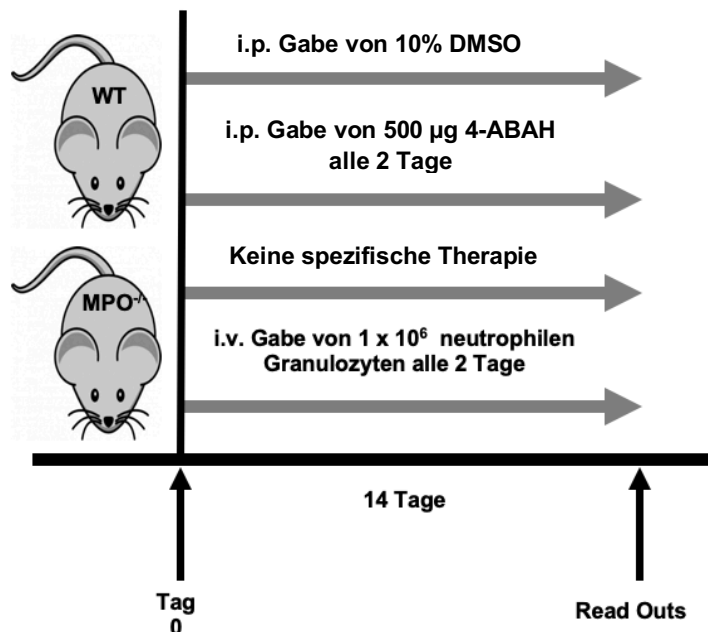


Abb. 6: Behandlungsschema nach Carotisläsion von WT- sowie MPO^{-/-}-Mäusen. Neben einer pharmakologischen MPO-Inhibition bei einer Gruppe von WT-Tieren wurde eine intravenöse Verabreichung von neutrophilen Granulozyten (aus der Milz von WT-Mäusen) bei einer Gruppe MPO-Knockout-Mäuse jeden zweiten Tag über 14 Tage durchgeführt. Die jeweiligen Behandlungen wurden durch respektive Kontrollgruppen (DMSO-Gabe bei den übrigen WT-Tieren oder ohne Transfer von neutrophilen Granulozyten bei den restlichen MPO^{-/-}-Tieren) ergänzt.

Im Anschluss zur oben beschriebenen Carotisläsion wurde den randomisierten WT-Mäusen 500 µg 4-Aminobenzoesäure (n = 8) oder das Lösungsmittel (10 prozentige DMSO-Lösung, n = 8) alle zwei Tage intraperitoneal appliziert. Die MPO^{-/-}-Mäuse wurden auch in zwei Gruppen unterteilt (à 6 pro Gruppe). In einer der zwei Gruppen erhielten die Versuchstiere alle zwei Tage 1x10⁶ isolierter neutrophiler Granulozyten durch intravenöse Injektion in die Schwanzvenen (Abb. 6). Nach 14 Tagen wurde die Tiere euthanasiert, die Karotiden nach sorgfältiger Präparation exzidiert, in ein Einbettungsmedium (Tissue tek OCT, Miles) überführt und bei – 80 °C schockgefroren.

Tierzucht und Tierversuche wurden in enger Kooperation mit dem Haus für experimentelle Therapie (HET) des UKB durchgeführt. Entsprechende Tierversuchsgenehmigungen wurden gemäß BGB vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz in Recklinghausen, NRW, erteilt (Genehmigungsnummer: 50.203.2-BN 22,22-4).

Bestimmung des Gesamtcholesterins

Das Cholesterinlevel im Plasma wurde im Labor des Instituts für klinische Chemie und Pharmakologie der Universitätsklinik Bonn gemessen. Für die Detektion wurde ein Gaschromatograph angewendet.

Messung von inflammatorischen Zytokinen im murinen Plasma mittels ELISA

Der Plasmaspiegel an Interleukin 6 und 10 (IL-6 und IL-10) wurde mit einem ELISA-Kit (Sabioscience, Germany) nach Angabe des Hersteller quantifiziert. Die Proben wurden mit einem BSA-Puffer (2%) in mit Antikörpern beschichteten Wells einer Mikrotiterplatte transferiert und für 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion-Antikörper (1:20 verdünnt) wurden hinzugefügt und für weitere 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte eine Immunodetektion mithilfe von Avidin-HRP (1:1000 verdünnt, 30 Minuten Inkubationszeit im Dunkel) und einer Entwicklungslösung durchgeführt werden. Durch ein Photometer (Tecan Austria, Austria) erfolgte die Vermessung der Absorption

in den Wells zwischen 570 nm und 450 nm Wellenlänge. Die Konzentration der Interleukine konnte zum Schluss durch den Bezug auf eine erstellte Standardkurve berechnet werden.

Quantifizierung vom vaskulären oxidativen Stress

Die vaskulären freien Sauerstoffradikale konnten in intakten Segmenten der Aorta mit Hilfe von L012 Chemolumineszenzen-Verfahren gemessen werden. Das L012, ein Luminol-Derivat, besitzt eine ausgeprägte Sensitivität für Superoxidradikale, nimmt jedoch selbst an den Redox-Reaktionen nicht teil. Nachdem die Aorta freipräpariert und aus dem Situs entfernt wurde, konnte sie in ein modifiziertes Krebs-HEPES Puffer eingebettet werden (pH 7,4; in mmol/l: NaCl 99,01; KCl 4,69; CaCl₂ 1,87; MgSO₄ 1,20; Na HEPES 20,0; K₂HPO₄ 1,03; NaHCO₃ 25,0; D (+) Glukose 11,1). Hier ließen sie sich vom überschüssigen Bindegewebe befreien und in ein Szintillationsröhrchen mit Krebs-HEPES-Puffer und 100 mol/l L012 für eine Inkubationszeit von 5 Minuten transferieren. Die Chemolumineszenz wurde über 15 Minuten unter Verwendung eines Szintillationsdetektors (Lumiat LB 9501, Berthold) jede Minute erfasst. Die erhobenen Ergebnisse setzten wir in Relation zum Trockengewicht der jeweiligen Aortensegmenten. Somit werden die freigesetzten vaskulären Sauerstoffradikale in relativer Chemolumineszenz pro Milligramm Gewebematerial angegeben.

Analyse der Endothelfunktion

Die Aorta descendens wurde nach Exzision in gekühltem Tyrode-Puffer (in mmol/l: NaCl 118,0; CaCl₂ 2,5; KCl 4,73; MgCl₂ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0; Na-EDTA 0,026; D (+) Glukose 5,5) mit einem pH-Wert von 7,4 eingebettet. Das Gefäß wurde vorsichtig vom Bindegewebe befreit und in drei Millimeter langen Ringen zerteilt. Letztere wurden zur Analyse der Endothelfunktion in physiologische Organbäder überführt, die mit oben genannter Pufferlösung bei 37 °C unter kontinuierlichem Zufuhr von 95% O₂ sowie 5% CO₂ gefüllt sind. Nach Zugabe von vasoaktiven Stocklösungen (KCl 20 mmol/l und 40 mmol/l, Phenylephrin 1 nmol/l bis 10 mol/l, Carbachol 10 nmol/l bis 100 mol/l und Nitro-

glycerin 1 nmol/l bis 10 mol/l) wurde die isometrische Spannung der glatten Muskelzellen der Aortenstücke über ein Messgerät (BeMon Software) erfasst. Nach Erreichen der maximalen Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation wurde die Konzentration der jeweiligen Stocklösung in den Organbädern erhöht. Die Vasokonstriktion wurde durch Gabe von Phenylephrin erzeugt. Anschließend wurden die Gefäßsegmente mit Carbachol stimuliert und die erzeugte endothelabhängige Vasodilatation ermittelt. Die endothelunabhängige Vasodilatation wurde mit Hilfe von Nitroglycerin ausgelöst. Durch den Bezug einer kumulativen Konzentration-Wirkung-Kurve wurde die Endothelfunktion quantifiziert.

Färbung der atherosklerotischen Läsionen und morphometrische Analyse

Zum Nachweis von atherosklerotischen Plaques wurden die Kryoschnitte der Aorta ascendens sowie der Klappenebene (9 µm dick und 15 konsekutive Schnitte pro Tier) in 3,7% Formaldehyde fixiert und mit einer speziellen Ölrot-Stocklösung bearbeitet. Anschließend konnte eine Hämatoxylin-Färbung nach Standardprotokoll zur Desmaskierung der Zellkerne für die morphometrische Analyse durchgeführt werden. Unter Verwendung von Zeiss Axiovert 200 Mikroskop (Carl Zeiss Jena, Germany) und von Axio-Cam MRc5 nahmen wir die gefärbten Präparate auf. Mit dem Zeiss AxioVision software Rel. 4.5.0 sowie dem Corel Graphic Suite X4 wurden der Gesamtfläche und der lipidpositiven Areale in einer Reihe histologischer Schnitte ermittelt, um die atherosklerotische Plaquebildung quantifizieren zu können. Die Messungen der lipidgefärbten Flächen wurden in Prozent des gesamten Gefäßareals erfasst.

Zellisolation und Transfusionsregime

Neutrophile Granulozyten isolierten wir aus dem Milz von Wildtyp-Mäusen durch ein spezifisches Kit und einen magnetischen Zelltrenner (MACS™, MiltenyiBiotec) nach Angabe des Herstellers. Nach Induktion einer mechanischen Endothelschädigung der Karotiden erhielten MPO-defiziente Mäuse alle zwei Tage 1×10^6 dieser isolierten Zellen durch intravenöse Injektion in die Schwanzvenen.

Histologische und immunhistochemische Färbung der Neointima

Die gewonnenen Karotis-Segmente wurden mit dem Leica Kryostat zu 7 µm-dicken Schnitten bearbeitet und auf mit Poly-L-Lysine beschichteten Objektträgern transferiert. Die morphometrische Analyse konnte nach Durchführung von Hämotoxylin-Färbung nach Standardprotokoll erfolgen. Ferner führten wir eine immunhistochemische Färbung der Kryoschnitte mit fluoreszierendem anti- α -smoothmuscle-actin (Sigma-Aldrich) durch. Hierbei wurde das 4,6-diamidino-2-phenylindol (Dapi, Sigma-Aldrich) zur Gegenfärbung der Zellkerne genutzt. Eine visuelle Analyse der MPO-Expression in der Gefäßwand konnte ebenfalls mit einer immunhistochemischen Färbung anhand von mausspezifischen MPO-Antikörpern (1:250 verdünnt, Calbiochem) sowie vom Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit-AK (1:100) als Sekundärantikörper durchgeführt werden. Auch hier diente das Dapi zur Gegenfärbung der Zellkerne. Die einzelnen Kryoschnitte wurden mit Zeiss Axiovert 200 Mikroskop aufgenommen und mit Zeiss AxioVision software Rel. 4.5.0 morphometrisch analysiert. Die relative neointimale Fläche bezieht sich auf die Gesamtgefäßwand (Angabe in Prozent) nach Quantifizierung von 25 histologischen Schnitten pro Tier.

Statistik

Alle Daten werden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Ihr statischer Vergleich wurde mit ungepaarten studentischen T-Test bzw. ANOVA-Analyse sowie einer Newman-Keuls post hoc -Analyse durchgeführt. Eine statische Signifikanz wird bei einem p-Wert $< 0,05$ erreicht.

1.3 Ergebnisse

Effekt einer MPO-Inhibition auf kardio-metabolische Basisparameter

Erwartungsgemäß imponierte bei den ApoE^{-/-}-Mäusen ein hoher Cholesterinspiegel (Tab. 1 der Publikation). Zwischen den einzelnen Gruppen gab es jedoch keine relevanten Unterschiede bezüglich der Cholesterinwerte oder des Körpergewichts. Darüber hinaus blieb der systolische Blutdruck während der Versuchsreihe unbeeinflusst von der applizierten Menge an 4-ABAH. Ferner zeigten die Herzfrequenzen in allen drei Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Vaskulärer oxidativer Stress und intravasale Inflammation

Vaskuläre entzündliche Prozesse stellen wichtige Grundlagen bei der Atherogenese dar. Der pathologische Verlauf sowie das Ausmaß der Erkrankung werden von inflammatorischen Prozessen geprägt. Durch die Erfassung von entzündlichen Surrogat-Markern soll die pathophysiologischen Relevanz einer MPO-Beteiligung in der Atherosklerose beurteilt werden. Zu diesem Zweck wurden der oxidative Stress, die Konzentration von IL-6 sowie IL-10 ausgewählt. Wie in Abb. 8 dargestellt führte 4-ABAH in hoher Dosis zu einer signifikanten Verminderung des vaskulären oxidativen Stresses (Kontrollgruppe: 100 ± 13,5 %; 500 µg 4-ABAH: 43,1 ± 9,1 %; p = 0,003 vs. Kontrolle; Abb. 1B der Publikation). In niedriger Dosis war keine signifikante Wirkung des MPO-Inhibitors auf den oxidativen Stress zu beobachten (250 µg 4-ABAH: 94,2 ± 23,4 %; Abb. 1B der Publikation).

Zudem führte die MPO-Inhibition mit 500 µg 4-ABAH zu einer signifikanten Reduktion des IL-6-Spiegels als pro-inflammatorischer Marker (IL-6 in pg/ml: Kontrolle: 279 ± 57; 250 µg 4-ABAH: 170 ± 14; 500 µg 4-ABAH: 71 ± 9; p = 0,01 vs. Kontrolle; Abb. 1C der Publikation). Der anti-inflammatorische Marker IL-10 zeigte sich durch die Behandlung mit der hohen Dosis von 4-ABAH hingegen bedeutsam erhöht (IL-10 in pg/ml: Kontrolle: 31 ± 12; 250 µg 4-ABAH: 64 ± 16; 500 µg 4-ABAH: 99 ± 19; p = 0,01 vs. Kontrolle; Abb. 1D der Publikation).

Analyse der Endothelfunktion

Die Endothelfunktion wurde anhand der isolierten Stücke aus der Aorta in Organbädern mit einer physiologischen Pufferlösung untersucht. Unter einem cholesterinreichen Ernährungsregime kann bei ApoE^{-/-}-Mäusen eine bedeutsame verminderte endothelabhängige Vasorelaxation und damit eine relevante Endotheldysfunktion erreicht werden (Abb. 10A). Bei gleichzeitiger systemischer MPO-Inhibition mit der hohen Dosis 4-ABAH verbesserte sich die endothelabhängige, durch Carbachol induzierte Vasodilatation signifikant (in %: Kontrolle: 51,8 ± 2,8; 250 µg 4-ABAH: 46,2 ± 5,6; 500 µg 4-ABAH: 26,3 ± 3,5; p = 0,004 vs. Kontrolle, p = 0,4 vs. 250 µg 4-ABAH; Abb. 2A der Publikation). Die endothel-unabhängige Vasodilatation war in allen Gruppen weitestgehend erhalten (Abb. 2B der Publikation). Somit konnte die Annahme verifiziert werden, dass die spezifische MPO-Inhibition mit 4-Amino-Benzoessäure einen selektiven Effekt auf die Endothelfunktion aufweist. Hier sei erwähnt, dass das Diagramm zu vasokonstriktorisches Effekten von Phenylephrin nicht angezeigt werden. Eine Vasorelaxation wurde erst nach Erreichen der maximalen Vasokonstriktion mit oben genannten Reagenzien initiiert.

Beurteilung der atherosklerotischen Plaquebildung

Die cholesterinreiche Diät hat eine massive Bildung und eine Progression der atherosklerotischen Plaques vor allem in der Aortenwurzel der ApoE^{-/-}-Mäusen zur Folge. Diese verkalkten Läsionen können aufgrund ihres hohen Lipidanteils mit einer spezifischen Färbung (Ölrot) histologisch hervorgehoben werden (Abb. 3A der Publikation). Die morphometrische Begutachtung dieser Läsionen erbrachte, dass die intraperitoneale Applikation von 4-ABAH in hoher Dosis die atherosklerotische Plaquemasse statistisch signifikant reduziert. Diese 4-ABAH getriggerte Plaquereduktion konnte bei der Gabe der niedrigen Dosierung des MPO-Inhibitors zwar auch beobachtet, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu zeigen (relative Plaque-Fläche: 17,9 ± 1,6 % bei der Kontrolle vs. 13,9 ± 3,2 % bei 250 µg 4-ABAH und 10,7 ± 2 % bei 500 µg 4-ABAH, p = 0,02; Abb. 3B der Publikation).

Modell der Knochenmarktransplantation

Die Beteiligung von Immunzellen in der Atherogenese bleibt unbestritten. Doch handelt es sich hierbei um komplexe zellulär sowie humoral gesteuerte Vorgänge. In dieser Pathophysiologie übernehmen pluripotente immunologische Zellen aus dem Knochenmark eine zentrale Rolle. Mit diesem Hintergrund soll eine potentielle Rolle der MPO im Knochenmarktransplantationsmodell mit ApoE^{-/-}-Mäusen näher analysiert werden. Nach einer letalen Bestrahlung mit anschließender allogener Transplantation von Spender-Knochenmark aus WT- oder MPO^{-/-}-Mäusen sollen die vaskuloprotektiven Effekte von zirkulierenden MPO-kompetenten inflammatorischen Zellen identifiziert werden. Die hierdurch entstandenen Gruppen zeigten keine wesentlichen Unterschieden bezüglich ihrer metabolischen und Vitalparameter (Tab.).

Tab. : Angabe zu metabolischen und Vitalparametern von ApoE-defizienten Mäusen unterteilt nach Transplantationsgruppen. Kein Hinweis auf statistisch signifikante Unterschiede in beiden Gruppen. n = 6, Mittelwerte ± SEM

	WT-Knochenmark	MPO ^{-/-} -Knochenmark
Gesamtcholesterin (mg/dl)	1276±83	1254±105
Körpergewicht (g)	23±1	23±1
Systolischer Blutdruck (mmHg)	132±6	135±4
Herzfrequenz (bpm)	627±21	639±16

Mit dieser relativen MPO-Defizienz konnte eine vaskuloprotektive Konstellation der inflammatorischen Zytokine im Plasma beobachtet werden. Dies wurde durch eine Erhöhung des anti-inflammatorischen Interleukins IL-6 bei gleichzeitiger Verminderung des pro-inflammatorischen IL-10 charakterisiert (IL-6 in pg/ml: 36 ± 7 vs. 24 ± 5; p = 0,04 und IL-10 in pg/ml: 47 ± 4 vs. 64 ± 16; p = 0,04; Abb. 4C-D der Publikation). Begleitend zu diesem Verlauf wurde ein reduzierter Anteil an vaskulären freien Sauerstoffradikalen in diesen Versuchstieren festgestellt (100 ± 13,5 % vs. 43,1 ± 9,1 %; p = 0,006; Abb. 4B der Publikation).

Die endothel-abhängige Vasorelaxation konnte signifikant verbessert werden (maximale Relaxation in %: 39 ± 4 vs. 24 ± 3 ; $p = 0,009$; Abb. 5A der Publikation). In beiden Gruppen zeigte sich eine vergleichbare endothel-unabhängige Vasodilation induziert durch Gabe von Nitroglycerin. Darüber hinaus ergab sich eine signifikant reduzierte atherosklerotische Plaquelast in den Mäusen mit MPO^{-/-}-Knochenmark (relative Plaque-Fläche: 26 ± 2 % vs. 14 ± 3 %; $p = 0,009$; Abb. 5B und 5C der Publikation).

Neointimaformierung

Die Proliferation der glatten Muskelzelle der Gefäßwand gehört zu den histomorphologischen Kriterien der Atherogenese. Sie ist das Resultat aus komplexen Interaktionen zwischen Blutbestandteilen (v.a. Leukozyten), Endothelzellen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Ein entscheidender Stimulus stellt die Läsion der Endothelzellschicht dar. Die Folge ist eine Migration der glatten Muskelzellen von der Media in die Intima sowie eine Anlagerung von zirkulierenden vaskulären Progenitorzellen an den verletzten Gefäßarealen. Es kommt zu einer protrahierten Zellproliferation mit Ausbildung einer sog. Neointima. Die Konsequenz dieser neointimalen Hyperplasie ist zum einen eine Instabilität einer atherosklerotischen Plaqueläsion und zum anderen eine Reduktion des Gefäßlumens, welche u.a. nach einer Angioplastie oder Stentimplantation oft beobachtet werden konnte. Diese Untersuchung im Neointima-Mausmodell soll eine potentielle MPO-Partizipation verifizieren.

Eine pharmakologische MPO-Inhibition führte zu einer reduzierten neointimalen Hyperplasie (neointimale Areale in % der gesamten Gefäßwand: 52 ± 1 vs. 38 ± 2 , $p = 0,04$; Abb. 6A und 6D der Publikation). Derselbe Effekt konnte ebenfalls in MPO-Knockout Mäusen gezeigt werden (relative neointimale Fläche in % der gesamten Gefäßwand: 63 ± 2 vs. 41 ± 1 ; $p=0,03$; Abb. 6B und 6E der Publikation). Umgekehrt konnte eine Repopulation dieses Tierkollektivs mit MPO-kompetenten neutrophilen Granulozyten aus Wildtyp-Mäusen zu einer Zunahme der neointimalen Läsion führen (relative neointimale Fläche in % der gesamten Gefäßwand: 55 ± 2 ; $p = 0,048$; Abb. 6E der Publikation). Ferner waren MPO-positive Zellen in diesen Arealen nachweisbar (Abb. 6C der Publikation).

1.4 Diskussion

Die vaskuläre Inflammation nimmt in der Entstehung und beim Fortschreiten von CVD eine signifikante Rolle ein. Diese Erkenntnis hat sich im Laufe der Jahrzehnte in einer Reihe von Studien (sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro*) herauskristallisiert. Die komplexen Interaktionen der mitbeteiligten zellulären und humoralen Faktoren werden zwar sukzessiv identifiziert, allerdings bleibt eine Vielzahl dieser pathophysiologischen Vorgänge noch nicht vollständig geklärt. In den Fokus des aktuellen wissenschaftlichen Interesses geraten immer mehr inflammatorische Moleküle, die nicht nur einen chemotaktischen, sondern auch einen oxidativen Charakter aufweisen. Diese Arbeit konnte in verschiedenen *in-vivo* Mausmodellen eine relevante Beteiligung des Hämoproteins Myeloperoxidase in der Atherogenese nachweisen. Zudem konnte erstmalig gezeigt werden, dass das inflammatorische Enzym in der Neointimaformierung involviert ist.

Bedeutung für die vaskuläre Inflammation und den oxidativen Stress

Mit unseren Daten konnte erstmalig gezeigt werden, dass die systemische Inaktivierung der Myeloperoxidase durch 4-Aminobenzoesäure antiatherogene Effekte im murinen Modell aufweist. Lokalisiert in den azurophylen Granula von neutrophilen Granulozyten und Monozyten bleibt das Hämoprotein unabdingbar für das physiologische Immunsystem im Rahmen der Abwehr von Pathogenen (Lau D., 2006; Nicholls S.J., 2009). In *in-vivo* Experimenten konnte bewiesen werden, dass die Myeloperoxidase CD11b-Integrin-vermittelt intrazelluläre Mechanismen auslöst, die apoptotische Signalkaskaden in aktivierten Granulozyten verhindern und somit deren Lebensdauer verlängern (El Kebir D., 2008). Dieser Vorgang stellte eine MPO-gesteuerte Prolongation der Inflammation dar. Durch die regelmäßige Applikation dieses Reagenz konnte eine Verminderung der Konzentration von Interleukin 6 bei gleichzeitiger Steigerung von Interleukin 10 erzielt werden. Diese Befundkonstellation spricht für einen vaskuloprotektiven Effekt einer systemischen Inhibition der Myeloperoxidase im hier gewählten Tiermodell. Eine protrahierte Inflammation mit einhergehender persistierender Aktivierung des Hämoproteins favorisiert einen katalytischen Verbrauch von Stickstoffmonoxid und fördert den vaskulären oxidativen Stress (Malle E., 2007; Nicholls S.J., 2005). Die hierunter produzierten Sau-

erstoffradikale fördern den strukturelle und funktionelle vaskuläre Umbau auf zellulärer Ebene (Klinke A. et al., 2017). Eine Inhibition mittels 4-Aminobenzoessäure drosselt wesentlich den intravasalen oxidativen Stress. Diese Beobachtung kann als Ausdruck der reduzierten vaskulären Aktivität des inflammatorischen Enzyms unter der pharmakologischen Hemmung gewertet werden. Diese vaskuloprotektiven Eigenschaften konnten wir ebenfalls im murinen Model der Knochenmarkstransplantation demonstrieren. Die relative Defizienz an Myeloperoxidase resultierte in eine relevante Abmilderung der vaskulären Inflammation sowie eine reduzierte intravasale Freisetzung von freien Sauerstoffradikale.

Bedeutung für die Endothelfunktion

Die oben beschriebenen pathologischen Kaskaden induzieren konsekutiv eine Apoptose der Endothelschicht und initiieren damit eine Endotheldysfunktion (Sugiyama S. et al., 2004; Vita JA. et al., 2004; Hazen SL., 2004). Die ausreichende pharmakologische Inhibition der Myeloperoxidase mittels 4-ABAH konnte wesentliche Verbesserung der Endothelfunktion ermöglichen, ohne metabolische oder hämodynamische Parameter zu beeinflussen. Ein vergleichbarer Effekt konnte mit einer Repopulation von bestrahlten ApoE^{-/-}-Mäusen mit MPO-defizienten Knochenmark beobachtet werden. Diese Beobachtungen liefern weitere Indizien dafür, dass eine selektive MPO-Hemmung eine positive Wirkung auf die vaskuläre Funktion und Morphologie im genutzten Mausmodel der Atherosklerose besitzt. Die Grundlage für dieses vaskuloprotektive Milieu ist auf eine zunehmende Bioverfügbarkeit vom Stickstoffmonoxid zurückzuführen. Verglichen zu Wildtyp-Mäusen konnte bei MPO-Knockout Mäusen eine Reduktion der Acetylcholin-abhängigen Vasodilation nach einer Vorbehandlung mit Lipopolysaccharid beobachtet werden (Eiserich JP. et al., 2002). Bei Exposition eines Infektstimulus zeigen MPO-Knockout-Mäusen neben einer erhöhten Bioverfügbarkeit an Stickstoffmonoxid eine deutliche Verbesserung der vaskulären Funktion. Es ist anzunehmen, dass die sub-endotheliale MPO die Bioverfügbarkeit des Stickstoffmonoxids in vivo signifikant beeinträchtigt und damit eine wichtige Rolle in der Endothelfunktion besitzt (Lau D., 2006). Zusätzlich konnte in einem Tiermodell der vaskulären Inflammation nachgewiesen wer-

den, dass die MPO zu einer Oxidation der löslichen Guanylatcyclase führt. Hierbei konnte eine eNOS- bzw. NO-abhängige endotheliale Dysfunktion beobachtet und durch pharmakologische sowie genetische MPO-Inhibition behoben werden (Cheng D. et al, 2019).

Bedeutung für die atherosklerotische Plauebildung

Initiative Vorgänge wie vaskuläre Inflammation, oxidativer Stress und Endotheldysfunktion, an denen die MPO direkt oder indirekt partizipiert, repräsentieren die idealen Prämissen zur Entstehung von atherosklerotischen Plaqueläsionen. Die katalytischen MPO-Endprodukte - weit voran die Hypochlorsäure - sind befähigt, Lipide, Lipoproteine oder gar DNA oxidativ zu modifizieren (Malle E., 2007; Nicholls SJ., 2005). Die MPO verursacht eine Peroxidation von Lipiden und begünstigt die Akkumulation von oxidiertem Cholesterin in Zellen. Somit verhindert das Enzym den Rücktransport des Cholesterins via HDL (Zhang R. et al, 2002; Undurti A. et al., 2009).

Die 4-Aminobenzoessäure gehört zu den potenten pharmakologischen MPO-Inhibitoren. Sie führt zu einer irreversiblen Inaktivierung des Häm-Moleküls. Unsere Untersuchungen ergaben, dass die Gabe des Pharmakons zu einer signifikanten Verminderung der atherosklerotischen Plaquemasse führt. Dieser Effekt ist als Ausdruck einer reduzierten HOCl-Produktion, die aus der medikamentösen MPO-Inhibition resultiert. Diese Beobachtung stellt einen zusätzlichen Beleg dar, dass das Enzym über seine Substrate in der Atherogenese als Trigger-Faktor der Plaqueläsion assoziiert ist. Im Kern einer solchen Läsion konnte man die MPO und ihre oxidierten Endprodukte neben sogenannten Schaumzellen (Makrophagen) immunhistologisch sowie biochemisch nachweisen (Daugherty A. et al., 1994; Hazell LJ. et al., 1996; Hazen SL., 1997; Malle E. et al., 2000). Weitere Studien konnten demonstrieren, dass eine Überexpression von humaner MPO in LDL-Knockout Mäusen zu vermehrten atherosklerotischen Läsionen in der Aorta führt. Interessanterweise zeigte sich eine positive Korrelation zwischen in Plaques lokalisiertem MPO und dem Ausmaß der Läsion (McMillen TS., 2005). Eine post-hoc Analyse von inflammatorischen Biomarkern konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen dem MPO-Level im Serum und inflammatorischer Aktivität in atherosklerotischen

Läsionen bei Patient mit KHK (dal-PLAQUE-Studie, Duivenvoorden R. et al, 2013). Vermehrte MPO-Aktivität geht mit gehäuften Blutungen innerhalb der fibrotischen Läsionen – ein Hinweis für labile Plaque - einher. Das inflammatorische Enzym kann die Identifizierung von kritischen Läsionen ermöglichen und zeitgleich als therapeutisches Ziel für eine Plaquestabilisierung fungieren (Rashid I. et al, 2018)

Auch im Knochentransplantationsmodell ging die erzeugte relative MPO-Defizienz mit einer wesentlichen Verringerung der Plaqueformation einher. Im Gegensatz hierzu zeigte die Arbeit von Brennan et al. eine Zunahme der Atherosklerose in LDL-Knockout-Mäusen, die nach letaler Bestrahlung mit Knochenmark MPO-defizienter Mäusen transplantiert wurden. Diese kontroversen Ergebnisse sind vermutlich auf das verwendete Tiermodell der Atherosklerose zurückzuführen.

Bedeutung für die neointimalen Hyperplasie

Von der Initiierung der Endotheldysfunktion bis zur Plaquebildung scheint die MPO eine Schlüsselrolle zu tragen. Die subendotheliale MPO kann nicht nur in der Gefäßwand akkumuliert werden, sondern sie besitzt die Fähigkeit Granulozyten chemotaktisch zu rekrutieren (Klinke A. et al, 2008). Diese migrativen Kaskaden werden durch zytotoxische Mediatoren provoziert und bestärkt. Unter diesen Konditionen wird der Wechsel zwischen Proliferation und Apoptose der SMC begünstigt. Eine Vulnerabilität der Plaqueläsion ist die Folge dieser potenzierten pro-inflammatorischen Eigenschaft der MPO. Eine inhibierte Apoptose der SMC in atherosklerotischen Läsionen kann Plaque-rupturen präventiv verhindern. Zudem wird die Bildung einer proliferierenden Neointima gehemmt und somit die resultierende de-novo oder Restenose des betroffenen Gefäßes vermieden (Thompson, 1995).

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben weitere Hinweise dafür geliefert, dass die MPO in der Pathogenese der neointimalen Hyperplasie nach Endothelschädigung involviert ist. Das Tiermodell, welches für dieses Experiment zur Anwendung kam, erfuhr keine lipidreiche Diät, so dass lediglich die Rolle der MPO in der Antwort auf eine mechanische Endothelverletzung untersucht werden konnte. Es wurde erstmalig bewiesen, dass die

induzierte neointimale Läsion durch eine pharmakologische MPO-Inhibition mit 4-Aminobenzoessäure abgemildert werden kann. Dieser Effekt konnte im MPO-Knockout-Mäusen reproduziert werden. Nach einer Besiedlung dieser Tiere mit MPO-kompetenten neutrophilen Granulozyten wurde vermehrte neointimale Proliferation induziert. In diesen MPO-Knockout Mäusen waren die infundierten MPO-positiven Zellen innerhalb der neointimalen Läsionen nachweisbar. Damit bestätigen wir eine migrative und infiltrative Eigenschaft der MPO mit konsekutiver Akkumulation der PMN. Klinke et al beschrieben dieses Phänomen als PMN-Einfangen (*-Trapping*) und postulierten einen relevanten Beitrag der Myeloperoxidase in diesen Prozessen (Klinke A. et al, 2011). Entscheidende Faktoren für die protrahierte Proliferation von glatten Muskelzellen sind die Enzymsubstrate Hypochlorsäure und Peroxynitrit (Yang J., 2006). Die produzierten Sauerstoff Radikale sind zudem in der Lage das RhoA-Protein zu oxidieren und damit Rho-Kinase indirekt zu aktivieren. Folglich wird die explodierende SMC-Vermehrung im Rahmen des vaskulären Umbaus unterstützt (Klinke A. et al., 2017).

1.5 Zusammenfassung

Die Daten aus dieser Arbeit belegen die bedeutende Rolle der Myeloperoxidase im Rahmen der Atherogenese. In der Pathophysiologie fungiert das Hämoprotein als Initiator der Atherosklerose. Zum anderem triggert es das Fortschreiten der Erkrankung.

Die Myeloperoxidase provoziert vaskuläre inflammatorische Vorgängen und prolongiert ihr Fortbestehen. Die hierfür notwendigen Zellen können über Chemotaxis rekrutiert und ihre Apoptose unterdrückt werden. Die systemische Hemmung der Aktivität des Hämoproteins favorisiert einen reduzierten intravasalen oxidativen Stress. Unter dieser Bedingung konnten wir eine vaskuloprotektive Konstellation der Zytokine beobachten. Interleukin 10 wird dadurch zunehmend im Plasma sezerniert. Zugleich wird eine Abnahme von Interleukin 6 begünstigt wird.

Ein niedriger Myeloperoxidasenspiegel im Serum korreliert mit einem geringeren Auftreten von koronarer Herzkrankheit. Damit kann das Enzym die Entstehung einer Endotheldysfunktion sowie die Präsenz einer koronarer Herzerkrankung prädictieren (Baldus S. et al. 2003; Vita JA. Et al., 2004; Brennan ML. Et al. 2003). In entsprechender Konzentration führt die 4-Aminobenzoessäure, ein selektiver Myeloperoxidase-Inhibitor, zu einer bedeutsamen Verbesserung der Endothelfunktion. Die reduzierte Aktivität des inflammatorischen Enzyms geht mit einer Drosselung der Stickstoffmonoxid-Konsumption einher. Die endothel-getriggerte Vasodilatation bleibt dadurch unbeeinträchtigt und eine relevante Endotheldysfunktion – das Surrogatparameter für die Progression der Atherosklerose – kann verhindert werden.

Eine Vielzahl von klinischen Studien schreiben dem Enzym eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und der Folgeerscheinung der Atherosklerose bei Menschen zu. Im atherosklerotischen Apolipoprotein-E-Mausmodell konnte durch die Behandlung mit der 4-Aminobenzoessäure eine wesentliche Reduktion der Plaquelast erreicht werden. Es ist anzunehmen, dass diese selektive Hemmung der Myeloperoxidase möglicherweise für eine Stabilität der atherosklerotischen Läsion sorgen kann. Brennan et al. sehen die Myeloperoxidase als ein exzellenter Marker für die Plaquevulnerabilität und schreiben ihr einen hohen Vorhersagewert beim Akutem Koronarsyndrom zu, da das Hämoprotein in instabilen Plaques durch Leukozyten stark überexprimiert wird und durch seine katalytische Aktivität eine Plaqueruptur beeinflusst.

Die Daten aus dem Neointima-Mausmodell zeigen, dass die Myeloperoxidase über das System der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten in der Neointimaformation involviert ist. Die antiinflammatorische Wirkung von 4-Aminobenzoessäure konnte die myeloperoxidase-assoziierte proliferative vaskuläre Veränderung unterdrücken. Dieser Effekt könnte für die Plaquesvulnerabilität aber auch im Rahmen von Angioplastie sowie für die Stent-Restenose von Bedeutung sein.

Die genannten proatherogenen Eigenschaften der Myeloperoxidase konnten in verschiedenen komplexen Tiermodellen verifiziert werden. In Summe sprechen diese Daten dafür, dass eine systemische Inhibition der Myeloperoxidase einen diagnostischen sowie einen therapeutischen Ansatzpunkt bei der Atherosklerose darstellen könnte. Ihre Anwendung könnte sowohl in der Entstehung der atherosklerotischen Läsionen als auch in der Plaquestabilisierung von Bedeutung sein. Letztere könnte man in ergänzenden Analysen wie in einem Regressionsmodell der Atherosklerose verifizieren.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Assmann G, Gotto AM, Jr. HDL Cholesterol and Protective Factors in Atherosclerosis. *Circulation*. 2004. 109(23_suppl_1):III-8-14.

Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, Simoons ML, Hamm CW. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003. 23: 1440–1445

Böcker W, Denk H, Heitz P. *Pathologie*. 2., völlig überarb. Aufl. ed. München [u.a.]: Urban & Fischer; 2001.

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

Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ, Nissen SE, Hazen SL. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J Med*. 2003. 349: 1595–604

Castellani LW, Chang JJ, Wang X, Lusis AJ, Reynolds WF. Transgenic mice express human MPO -463G/A alleles at atherosclerotic lesions, developing hyperlipidemia and obesity in -463G males. *J Lipid Res*. 2006. 47: 1366–1377

Cheng D, Talib J, Stanley CP, Rashid I, Michaëlsson E, Lindstedt EL, Croft KD, Kettle AJ, Maghzal GJ, Stocker R. Inhibition of MPO (Myeloperoxidase) Attenuates Endothelial Dysfunction in Mouse Models of Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019. 39 :1448-1457

Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1994. 94: 437–444

Duivenvoorden R., Mani V., Woodward M., Kallend D., Suchankova G., Fuster V., Rudd J.H.F., Tawakol A., Farkouh M.E., Fayad Z.A. Relationship of serum inflammatory biomarkers with plaque inflammation assessed by FDG PET/CT: The dal-PLAQUE study. *JACC Cardiovasc. Imaging*. 2013. 6:1087–1094.

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

El Kebir D, Jozsef L, Pan W, Filep JG. Myeloperoxidase delays neutrophil apoptosis through cd11b/cd18 integrins and prolongs inflammation. *Circ Res*, 2008. 103: 352–359

Fenna R, Zeng J, Davey C. Structure of the green heme in myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 1995. 316: 653–656

Fliss H. Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leukocyte oxidants. *Mol Cell Biochem*. 1988. 84:177–188

Galkina E, Ley K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2009. 27:165–197

Harrison JE, Schultz J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem*. 1976. 251: 1371–1374

Hazell LJ, Arnold L, Flowers D, Waeg G, Malle E, Stocker R. Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1996. 97: 1535–1544.

Hazen SL. Myeloperoxidase and plaque vulnerability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004. 24: 1143–1146

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

Hazen SL, Zhang R, Shen Z, Wu W, Podrez EA, MacPherson JC, Schmitt D, Mitra SN, Mukhopadhyay C, Chen Y, Cohen PA, Hoff HF, Abu-Soud HM. Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation *In vivo*. *Circ Res*. 1999. 85: 950–958

Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*. 2004. 55: 503-517.

Kettle AJ, Gedye CA, Winterbourn CC. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. *Biochem J*. 1997. 321: 503–508

Klinke A, Berghausen E, Friedrichs K, et al. Myeloperoxidase aggravates pulmonary arterial hypertension by activation of vascular Rho-kinase. *Circulation Research*. 2017. 121: 56–70

Klinke A, et al. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood*. 2011. 117: 1350–1358.

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

Lau D, Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacol Ther*. 2006. 111:16–26

Leeuwenburgh C, Hardy MM, Hazen SL, Wagner P, Oh-ishi S, Steinbrecher UP, Heinecke JW. Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J Biol Chem*. 1997. 272:1433–1436

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

Malle E, Waeg G, Schreiber R, Gröne EF, Sattler W, Gröne HJ. Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/halide system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *Eur J Biochem*. 2000. 267: 4495-503

McMillen TS, Heinecke JW, LeBoeuf RC. Expression of human myeloperoxidase by macrophages promotes atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2005. 111: 2798–2804

Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E-Deficient Mouse: A Decade of Progress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2004. 24: 1006-1014.

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

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

Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005. 25: 1102–11

Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *J Lipid Res*. 2009. 50: 346–351

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

Piedrahita JA, Zhang SH, Hagan JR, et al. Generation of Mice Carrying a Mutant Apolipoprotein E Gene Inactivated by Gene Targeting in Embryonic Stem Cells. *PNAS*. 1992. 89: 4471-4475.

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

Rashid I, Maghzal GJ, Chen YC, et al.. Myeloperoxidase is a potential molecular imaging and therapeutic target for the identification and stabilization of high-risk atherosclerotic plaque. *Eur Heart J*. 2018. 39:3301–3310

Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, et al. Advanced Atherosclerotic Lesions in the Innominate Artery of the ApoE Knockout Mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000. 20 :2587-2592.

Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999. 14: 115–126

Rudolph V, Rudolph TK, Hennings JC, Blankenberg S, Schnabel R, Steven D, Haddad M, Knittel K, Wende S, Wenzel J, Munzel T, Heitzer T, Meinertz T, Hubner C, Baldus S. Activation of polymorphonuclear neutrophils in patients with impaired left ventricular function. *Free Radic Biol Med.* 2007. 43: 1189–1196

Sugiyama S, Kugiyama K, Aikawa M, Nakamura S, Ogawa H, Libby P. Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004. 24: 1309–1314

Taylor KL, Strobel F, Yue KT, Ram P, Pohl J, Woods AS, Kinkade JM. Isolation and identification of a protoheme ix derivative released during autolytic cleavage of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys.* 1995. 316: 635–642

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* 1995. 267(5203):1456-62

Undurti A, Huang Y, Lupica JA, Smith JD, DiDonato JA, Hazen SL. Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle. *J Biol Chem.* 2009. 284: 30825–30835

Van Leeuwen M, Gijbels MJ, Duijvestijn A, Smook M, van de Gaar MJ, Heeringa P, de Winther MP, Tervaert JW. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008. 28: 84–89

Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, et al. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation.* 2004. 110: 1134–1139

Wong ND, Gransar H, Narula J, Shaw L, Moon JH, Miranda-Peats R, Rozanski A, Hayes SW, Thomson LE, Friedman JD, Berman DS. Myeloperoxidase, subclinical atherosclerosis, and cardiovascular disease events. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2009. 2: 1093–1099

Yang J, Cheng Y, Ji R, Zhang C. Novel model of inflammatory neointima formation reveals a potential role of myeloperoxidase in neointimal hyperplasia *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006. 29: 3087–3093

Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles, RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *Jama*. 2001. 286: 2136–2142

Zhang R, Brennan ML, Shen Z, Mac Pherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem*. 2002. 277: 46116–46122

Zhang C, Reiter C, Eiserich JP, Boersma B, Parks DA, Beckman JS, Barnes S, Kirk M, Baldus S, Darley-Usmar VM, White CR. L- arginine chlorination products inhibit endothelial nitric oxide production. *J Biol Chem*. 2001. 276: 27159–27165

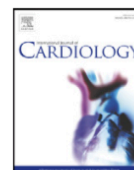
2. Veröffentlichung

International Journal of Cardiology 204 (2016) 29–36



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Cardiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijcard

Neutrophil-derived myeloperoxidase promotes atherogenesis and neointima formation in mice

Vedat Tiyerili ^{a,*}, Bakary Camara ^{a,1}, Marc U. Becher ^a, Jan W. Schrickel ^a, Dieter Lütjohann ^b, Martin Mollenhauer ^c, Stephan Baldus ^c, Georg Nickenig ^a, René P. Andrié ^a^a Department of Cardiology, University of Bonn, Bonn, Germany^b Institute for Clinical Chemistry, University of Bonn, Bonn, Germany^c Department of Cardiology, Heart Center, University of Cologne, Cologne, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 November 2015

Accepted 20 November 2015

Available online 22 November 2015

Keywords:

Myeloperoxidase

Atherosclerosis

4-ABAH

Cardiovascular disease

Neointimal hyperplasia

ABSTRACT

Background: Myeloperoxidase (MPO), expressed mainly in neutrophils, is an enzyme linked to inflammation and oxidative stress. MPO is an independent prognostic marker in healthy individuals as well as in patients with coronary artery disease. In this present study we analyze the role of MPO in experimental atherogenesis and neointima formation after vascular injury in mice.

Methods and results: 6–8 weeks old apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice were fed a high-cholesterol diet for 8 weeks with concomitant treatment with two different doses (10 µg/mg bw vs. 20 µg/mg bw) of 4-ABAH (MPO inhibitor). Application at lower dosage did not affect oxidative stress, endothelial function and atherosclerotic plaque development. 4-ABAH in higher dosage decreased inflammatory markers and vascular oxidative stress, consecutively improved endothelial function and reduced significantly atherosclerotic plaque development. To assess the role of circulating intracellular MPO, irradiated ApoE^{-/-} mice were repopulated with bone marrow-derived cells from MPO^{-/-} mice and were fed a high-cholesterol diet for 8 weeks. This MPO deficiency resulted in alleviated inflammation, reduced oxidative stress and improved endothelial function with a significant impact on plaque formation. To understand the possible role of MPO in vascular remodeling, we tested its effects on neointima formation following vascular injury in mice. MPO inhibition by 4-ABAH reduced significantly neointima formation. It was significantly reduced in MPO deficient mice, whereas transfer of spleen-derived neutrophils from WT mice enhanced it.

Conclusion: Our data suggests a central role of MPO in the pathogenesis of atherogenesis and prefers pharmacological MPO inhibition as a therapeutic strategy for prevention and therapy of atherosclerosis and restenosis.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Background

Atherosclerosis, the major cause of cardiovascular disease (CVD), is a chronic inflammatory disease in which neutrophils and monocytes play a key role [1]. The sequence of events leading to CVD includes endothelial dysfunction, atherosclerotic plaque formation, and plaque rupture [1]. Inflammation within the vascular wall has been implicated in all these stages of atherosclerotic plaque development, which is characterized by the deposition and accumulation of modified lipids in the subendothelial compartment of the arterial wall, as well as vascular remodeling [2]. The inflammatory response is often initiated by the adhesion of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) to vascular endothelial cells [3]. Activated PMNs produce and secrete myeloperoxidase (MPO) as a potent oxidizing agent and inflammatory mediator, which may

contribute to vascular injury [3]. Recent reports have suggested that MPO may play an important role in vascular injury and atherogenesis [4–6]. In this regard, MPO and its oxidant end products are present in both human and experimental atherosclerotic lesions [7–8]. Moreover, recent studies demonstrate MPO as an independent prognostic marker in healthy individuals as well as in patients with stable coronary artery disease, acute coronary syndromes and myocardial infarction [9–11]. In contrast to clinical data, investigation in animal models of atherosclerosis has produced controversial results. An early study found that transplantation of bone marrow from MPO-knockout mice into irradiated LDL receptor knockout mice demonstrated an unexpected modest increase in lesion size [12]. However, other observations indicate that expression of human MPO in murine macrophages promotes atherosclerosis in mice [13–14]. Furthermore, multiple lines of evidence suggest that pro-atherogenic biological effects may be triggered by oxidative modification of targets in the artery wall by MPO-generated reactive species [15–17]. Given the growing evidence for an important role of MPO in inflammatory triggered atherosclerosis, therapeutic strategies should be developed to directly assess the pathophysiologic

* Corresponding author at: Department of Cardiology, University of Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53105 Bonn, Germany.

E-mail address: Vedat.Tiyerili@ukb.uni-bonn.de (V. Tiyerili).

¹ Contributed equally.

implications of MPO. However, to date, specific MPO inhibitors are not available and they will be difficult to develop considering the general heme-centered structure of this protein. In order to understand the possible role of MPO in atherogenesis and vascular remodeling, we first analyzed the effects of pharmacological MPO inhibition and checked in a second step the impact of MPO deficient circulating inflammatory cells in an animal model of atherosclerosis. The second aim of the present study was to determine MPO effects on neointimal hyperplasia after vascular injury.

2. Material and methods

2.1. Animals and procedures

In the following study, 6–8 weeks old apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) mice (genetic background: C57BL/6J, Charles River, Sulzfeld, Germany) and age-matched myeloperoxidase knockout (MPO^{-/-}) mice (genetic background (C57BL/6J, Charles River, Sulzfeld, Germany) were used. Animals were kept in a 22 °C room under 12-h light/dark cycle. They received drinking water ad libitum. ApoE^{-/-} mice were given a high-fat, cholesterol-rich fodder for 8 weeks that based on 21% fat, 19.5% casein, and 1.25% cholesterol (ssniff, Germany). First (Fig. 1A), 18 ApoE^{-/-} mice were randomized in 3 groups to receive the specific MPO inhibitor 4-amino benzoic acid hydrazide (4-ABAH, Sigma-Aldrich, Germany) in a low dose (10 µg/mg bw 4-ABAH every second day i.p. n = 6), in a high dose (20 µg/mg bw 4-ABAH every second day i.p. n = 6) or vehicle (10% DMSO, n = 6). Second (Fig. 4A), ApoE^{-/-} mice were lethally irradiated and transplanted with MPO^{-/-} (n = 6) or WT (n = 6) bone marrow. ApoE^{-/-} mice were subjected to 11 Gy lethal total body irradiation. 6 h later, mice were repopulated intravenously with 2.5×10^6 cells obtained from the femurs of age and sex-matched MPO^{-/-} mice or WT mice. Mice were maintained on antibiotic water for 1 week prior to

irradiation and 1 week after irradiation. After 1 week of recovery, mice were given a high-cholesterol fodder for 8 weeks. Animals were weighed weekly. In the pre- and post-treatment phase arterial blood pressure was assessed using a computerized tail-cuff method (CODA 6, Kent Scientific). In a settling-in period of 3 consecutive days mice were trained in pre-warmed tail-cuff device. This procedure was followed by supplementary measurements of blood pressure and heart rate on 3 consecutive days. 20 measured values were averaged for each individual animal. Using the mean values of all 3 days mice were compared among themselves. After treatment of 8 weeks mice were euthanized to perform read-outs, tissue samples and blood were collected. The handling of all animals was carried out according to the animal protection law stated in the German civil code and the investigations were approved by the National Office for Nature, Environment and Consumer Protection in Recklinghausen, Nordrhein-Westfalen (Permit Number: 50.203.2-BN 22,22–4).

2.2. Analysis of cholesterol level

Cholesterol levels were measured by gas chromatography–flame ionization detection.

2.3. Measurements of cytokines

Plasma IL-6 and IL-10 were determined using an ELISA kit specific for mouse (SABiosciences, Germany). Samples and 2% bovine serum albumin buffer were transferred in wells pre-coated with antibodies and were incubated for 120 min at room temperature. Detection antibodies (1:20 dilutions) were added for 60 min at 37 °C. The immunodetection was performed using Avidin-HRP (1:1000 dilutions, incubation time 30 min in dark) and a development solution. The absorbance was read at 570 nm with 450 nm as reference wavelength using a photometer (Tecan Austria, Austria).

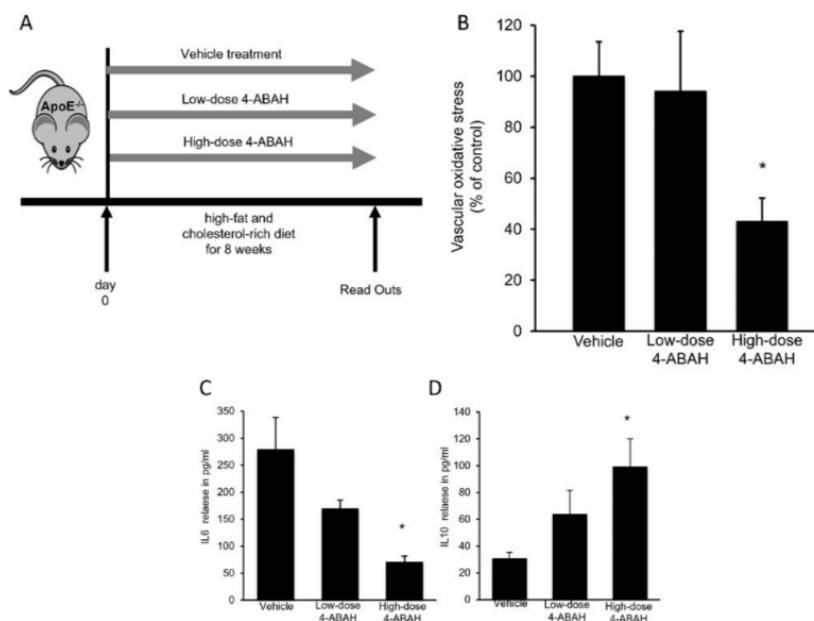


Fig. 1. Experimental setting, vascular oxidative stress and inflammation. (A) ApoE^{-/-} mice were fed with a high-fat and cholesterol-rich diet and were randomized in 3 groups to receive the specific MPO inhibitor 4-amino benzoic acid hydrazide (4-ABAH) in a low dose every second day i.p. (n = 6), in a high dose every second day i.p. (n = 6) or vehicle (n = 6). After a treatment period of 8 weeks mice were sacrificed and read-outs were performed. (B) Vascular ROS formation in isolated aortic segments assessed by L-012 chemiluminescence was significantly reduced by high dose 4-ABAH. (C and D) Plasma IL6 levels, determined using an ELISA kit, were significantly reduced, whereas plasma IL10 was enhanced. Mean ± SEM. *P < 0.05 vs. vehicle.

2.4. Assessment of endothelial function

Descending aorta was excised and was placed in cooled, a modified Tyrode buffer containing, in mmol/L, NaCl 118.0, CaCl₂ 2.5, KCl 4.73, MgCl₂ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0, Na EDTA 0.026, D(+)glucose 5.5, pH 7.4. The vessel was carefully freed of adventitial tissue and sectioned in three-millimeter rings. The aortic segments were fixed in organ baths filled with the above-described buffer (37 °C; continuously aerated with 95% O₂ and 5% CO₂). Isometric tension was recorded with the aid of fastened force transducer. Over 60 min the vessel segments were gradually extended to a resting tension of 10 mN, which was maintained throughout the experiment, and permitted to calibrate for additional 30 min. Drugs were added in growing concentrations to reach cumulative concentration–response curves: KCl 20 mmol/L and 40 mmol/L, phenylephrine 1 nmol/L to 10 mol/L, carbachol 10 nmol/L to 100 mol/L, and nitroglycerin 1 nmol/L to 10 mol/L. The drug concentration was increased when vasoconstriction or vasorelaxation was completed. Before adding the next substance drugs were washed out.

2.5. Assessment of atherosclerotic lesions and morphometric analysis

After embedding in Tissue Tek OCT embedding medium hearts with ascending aortas were sliced on a Leica cryostat (9 µm), beginning at the apex and progressing through the aortic valve area into the ascending aorta and the aortic arch. Sections were placed on poly-L-lysine (Sigma) coated slides. For analysis 15 consecutive sections per animal were used. The aortic cryosections were fixed with 3.7% formaldehyde and stained with oil red O working solution to detect atherosclerotic lesions. At least hematoxylin staining was accomplished using standard protocols for morphometric analysis. Stained samples were examined with a Zeiss Axiovert 200 microscope (Carl Zeiss Jena, Germany) and an AxioCam MRC5. Images were acquired with Zeiss AxioVision software Rel. 4.5.0 and processed with Corel Graphic Suite X4. Lipid-staining area and total area of serial histological sections were evaluated to quantify the atherosclerotic plaque formation in the aortic root. Atherosclerosis data are expressed as lipid-staining area in percent of total surface area. The investigator who accomplished the histological analyses was unaware of the hypothesis of this study and the treatment of the respective animal group.

2.6. Measurement of vascular reactive oxygen species

Superoxide release in intact vessel segments was measured by L-012 chemiluminescence. In brief, L-012, formed by derivation of luminol, has a high sensitivity for superoxide radicals and does not exert redox cycling itself. After excision of aortas, the vessel segments were immersed in cooled, modified a Krebs-HEPES buffer (pH 7.4; in mmol/L: NaCl 99.01, KCl 4.69, CaCl₂ 1.87, MgSO₄ 1.20, Na HEPES 20.0, K₂HPO₄ 1.03, NaHCO₃ 25.0, D(+)glucose 11.1). Aortas were sectioned in 2-mm segments after removing connective tissue. The aortic segments were transferred into scintillation vials containing a Krebs-HEPES buffer with 100 mol/L L-012 and were incubated for 5 min. Chemiluminescence was determined over 15 min in a scintillation counter (Lumat LB 9501, Berthold) at 1-min intervals. The vessel segments were then dried, and dry weight was measured. Oxygen radical release is expressed as relative chemiluminescence per milligram of aortic tissue.

2.7. Carotid artery injury and immunohistochemistry of neointimal lesions

6–8 weeks old wild-type (C57BL/6J, Charles River, Sulzfeld, Germany) and age-matched MPO-knockout mice (genetic background (C57BL/6J, Charles River, Sulzfeld, Germany) were used in this study. First, wild-type mice (n = 8) were randomized to receive the specific MPO inhibitor 4-amino benzoic acid hydrazide (4-ABAH, Sigma-Aldrich, Germany) in a high dose (20 µg/mg bw 4-ABAH every second day i.p) or vehicle (10% DMSO). Second, we analyzed the impact of

MPO and the relevance of spleen-derived neutrophils on neointima formation and randomized mice in 3 groups (1. Wild-type mice (n = 6), 2. MPO-knockout mice (n = 6), 3. MPO-knockout mice with spleen-derived neutrophils from WT mice injection (n = 6)). All mice were anesthetized with 150 mg/kg bw ketamine hydrochloride (Ketanest, Pharmacia) and 0.1 mg/kg bw xylazine hydrochloride (Rompun 2%, Bayer). The intervention was performed using a dissecting microscope (MZ6; Leica). After a midline incision of the ventral side of the neck, the bifurcation of the left carotid artery was exposed. Two filaments were placed in the proximal and distal segments of the external carotid artery. The distal ligature was then pinched. The internal and common carotid arteries were temporary occluded to perform a transverse arteriotomy between the ligatures of external carotid artery and to insert a flexible wire (0.13 mm in diameter), that is slightly curved (30°) at the tip and completely fills out the vessel. In a rotating manner the wire was conducted along the common carotid artery for three times. At least, the wire was removed and the proximal ligature of the external carotid artery was tied off. After reassuring normal blood flow the skin was closed with single sutures using 6/0 silk. After a recovery period of 14 days, carotid arteries were harvested and perfusion-fixed embedded in Tissue Tek OCT embedding medium (Miles), snap-frozen, and stored at –80 °C. Samples were sliced on a Leica cryostat (7 µm). Sections were placed on slides coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) for immunohistochemical analysis. Before performing immunohistochemistry, tissue cryosections were postfixed in 4% formaldehyde for 2 min. Slides were pre-incubated with 0.5% Igpal (Sigma) and 5% normal goat serum (Sigma) for 30 min each. For morphometric analyses, H&E staining was performed using standard protocols. Embedded sections were stained with fluorescein anti-α-smooth muscle actin (Sigma-Aldrich), and nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (Dapi, Sigma-Aldrich) in a mounting medium. Fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-α-smooth muscle actin-positive cells were counted in 10 separate sections from different vessels of each group. For the visual analysis of expression of MPO frozen aortic tissue sections of 5 µm were fixed with 3.7% formaldehyde for 15 min at room temperature, washed with PBS, and permeabilized with 0.1% Triton X-100/PBS for 20 min at room temperature. Aortic tissues were blocked with 10% goat serum/0.1% Triton X-100/PBS for 1 h at room temperature. Incubation was performed with a primary antibody specific for MPO (1:250, Calbiochem) in 10% goat serum at 4 °C. The tissue was then washed with PBS and incubated with Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit secondary antibody (1:100) for 1 h in 10% goat serum/0.1% Triton X-100 in PBS. It was again washed with PBS and counterstained for nuclei with Dapi 1 µg/mL in PBS in the dark for 15 min at room temperature. Slides were mounted with cover-slips with a Dako fluorescence mounting medium. All sections were examined with a Zeiss Axiovert 200. Morphometric analysis was performed using Zeiss AxioVision software Rel. 4.5.0 to determine external elastic lamina, internal elastic lamina, and lumen circumference as well as medial and neointimal areas of ≈25 sections per animal.

2.8. Cell isolation and transfusion regime

Neutrophils were isolated from C57BL/6 spleen by using the Neutrophil Isolation Kit and a MACS™ Separator according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). MPO deficient mice received 1 × 10⁶ spleen-derived neutrophils from WT mice intravenous tail vein injection directly after induction of arterial injury every second day.

2.9. Statistical analysis

Data are presented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using the ANOVA test followed by the Neuman–Keuls post hoc analysis. P < 0.05 indicates statistical significance.

3. Results

3.1. Basic characteristics

Table 1 shows the resulting basic characteristics including total cholesterol, non-invasive blood pressure, heart rate and body weight. Total cholesterol levels were elevated in ApoE^{-/-} mice. Fig. 1A schematizes the study design for the studies in ApoE^{-/-} mice treated or not with 4-ABAH. 4-ABAH treatments did not affect cholesterol levels. There were no significant differences in cholesterol levels between both dosages of 4-ABAH. Body weights were no significantly different within the three groups. Furthermore, 4-ABAH treated animals were not significantly different in systolic blood pressure. Heart rate measurements were similar in all groups (Table 1).

3.2. Vascular oxidative stress and inflammation

Vascular release of superoxide radicals was measured by L012-chemiluminescence assays in intact aortic segments. Fig. 1B illustrates that vascular superoxide release was significantly lower in animals treated with high dose of 4-ABAH than vehicle treated animals (vehicle: 100 ± 13.5% of control vs. high dose 4-ABAH: 43.1 ± 9.1% of control, $p = 0.003$, Fig. 1B). Low-dose 4-ABAH did not influence oxidative stress significantly (low-dose 4-ABAH: 94.2 ± 23.4% of control, Fig. 1B). Focusing on IL6 as pro-inflammatory humoral marker we detected significantly reduced IL6-levels (Fig. 1C) in high dose 4-ABAH treated animals (IL6 in pg/mL: vehicle: 279 ± 57; low-dose 4-ABAH: 170 ± 14, high dose 4-ABAH: 71 ± 9, $P = 0.01$ vs. vehicle), while the anti-inflammatory marker IL10 (Fig. 1D) was significantly increased after MPO inhibition by high dose 4-ABAH (IL10 in pg/mL: vehicle: 31 ± 12; low-dose 4-ABAH: 64 ± 16, high dose 4-ABAH: 99 ± 19, $P = 0.01$ vs. vehicle).

3.3. Endothelial function

To investigate endothelial function of intact isolated aortic ring preparations organ chamber experiments were carried out. As shown in Fig. 2A, ApoE^{-/-} mice developed endothelial dysfunction after 8 weeks of cholesterol-rich diet. Concomitant MPO inhibition significantly improved dose-dependently endothelium-dependent, carbachol-exerted vasodilation (maximal relaxation in %: vehicle: 51.8 ± 2.8, low-dose 4-ABAH: 46.2 ± 5.6, high dose 4-ABAH: 26.3 ± 3.5, $P = 0.004$ vs. vehicle, $P = 0.04$ vs. low-dose 4-ABAH, Fig. 2A). Endothelium-independent vasodilation, as measured by nitroglycerin-induced vasorelaxation, was not significantly affected by 4-ABAH therapies (Fig. 2B). Furthermore, 4-ABAH did not impact phenylephrine or KCl- induced vasoconstriction (data not shown).

3.4. Atherosclerotic plaque development

After 8 weeks of cholesterol-rich diet we quantified the atherosclerotic plaque formation (oil red O staining) in the aortic root and ascending aorta. Fig. 3A shows representative cross-sections of the aortic root of all groups with atherosclerotic plaques. In contrast to low-dose 4-ABAH, high dose 4-ABAH treatment reduced significantly

atherosclerotic plaque development (17.9 ± 1.6% plaque area for vehicle, 13.9 ± 3.2% plaque area for low-dose 4-ABAH and 10.7 ± 2.0% for high dose 4-ABAH, $P = 0.02$ vs. vehicle, Fig. 3B).

3.5. Bone marrow transplantation experiments

In order to understand to what extent circulating pro-inflammatory cells mediate the observed effects, bone marrow transplantation experiments were performed. The experimental setting is depicted in Fig. 4A. ApoE^{-/-} mice were lethally irradiated, repopulated with MPO^{-/-} or WT bone marrow and fed a high-cholesterol diet for 8 weeks. Irradiated ApoE^{-/-} mice reconstituted with MPO deficient bone marrow showed reduced vascular oxidative stress (100 ± 13.5% of control vs. 43.1 ± 9.1% of control, $P = 0.006$, Fig. 4B) and inflammation (IL6 in pg/mL: 36 ± 7 vs. 24 ± 5, $P = 0.04$ vs. vehicle, Fig. 4C and IL 10 in pg/mL: 47 ± 4 vs. 64 ± 16, $P = 0.04$ vs. vehicle, Fig. 4D). Endothelial-dependent vasorelaxation was improved in irradiated ApoE^{-/-} mice repopulated either with MPO^{-/-} bone marrow-derived cells (maximal relaxation in %: 39 ± 4 vs. 24 ± 3, $P = 0.009$, Fig. 5A). Both groups showed similar endothelium-independent vasorelaxation. Furthermore, we detected a significantly reduced plaque load in these mice (26 ± 2% vs. 14 ± 3%, $P = 0.043$, Fig. 5B and C). Blood pressure, heart rate body weight and cholesterol levels were not significantly different between the two groups (Table S1).

3.6. Neointima formation

In order to understand the possible role of MPO in vascular remodeling, we tested its effects on neointimal formation following vascular injury in mice. C57/Bl6 mice were randomized to receive 4-ABAH or vehicle after vascular injury. Specific MPO inhibition by 4-ABAH reduced significantly neointima formation (neointima area in %: 52 ± 1 vs. 38 ± 2, $P = 0.04$, Fig. 6A and D). As well, neointima formation was significantly reduced in MPO deficient mice (neointima area in %: 63 ± 2 vs. 41 ± 1, $P = 0.03$, Fig. 6B and E), whereas transfer of spleen-derived neutrophils from WT mice enhanced neointima formation (neointima area in %: 55 ± 2, $P = 0.048$, Fig. 6C and E). In these mice MPO-positive cells were found within the lesions (Fig. 6C).

4. Discussion

The presented data demonstrate the fundamental relevance of MPO in the pathogenesis of atherogenesis and neointima formation after vascular injury. Main findings are: (a) pharmacological inhibition of MPO by 4-ABAH have vasculoprotective effects in an animal model of atherosclerosis, (b) transplantation of MPO deficient cells in irradiated ApoE^{-/-} mice led to alleviated inflammation, decreased oxidative damage and increased endothelial function with a significant impact on plaque formation, and (c) specific MPO inhibition by 4-ABAH or general MPO deficiency reduced significantly neointima formation.

MPO, an iron-containing heme protein, is stored in primary azurophilic granules of neutrophils and has a key role in innate immune system as a microbiological agent [3]. However, under pathological conditions, persistent activation of MPO in activated neutrophils may adversely affect tissues [3,4]. HOCl, an endproduct of MPO reactions, is able to induce modification reactions targeting lipids, DNA and proteins, oxidative stress, and catalytic consumption of nitric oxide [18–19]. MPO stimulates endothelial apoptosis, initiates endothelial dysfunction, and increases plaque vulnerability [20–22]. Interestingly, MPO and endproducts of MPO-generated oxidants are localized in atherosclerotic lesions, besides foam cell macrophages [7,15,23–24]. Our results demonstrate favorable effects of systemic MPO inhibition or MPO deficiency in reducing plaque burden. In our study we used 4-ABAH as a potent irreversible inhibitor of MPO. 4-ABAH promotes inactivation through

Table 1
Basic characteristics.

	Vehicle	Low-dose 4-ABAH	High dose 4-ABAH
Total cholesterol (mg/dl)	1359 ± 11	1330 ± 82	1298 ± 51
Body weight (g)	23.9 ± 0.7	25.4 ± 0.7	25.1 ± 0.7
SBP (mm Hg)	138 ± 5	133 ± 10	136 ± 8
Heart rate (beats/min)	769 ± 16	705 ± 11	738 ± 10

Systolic blood pressure (SBP), heart rate, body weight and plasma concentrations of total cholesterol were determined in all animal groups after 8 weeks treatment with a high-fat diet containing 1.25% cholesterol and the respective 4-ABAH co-treatments. Mean ± SEM.

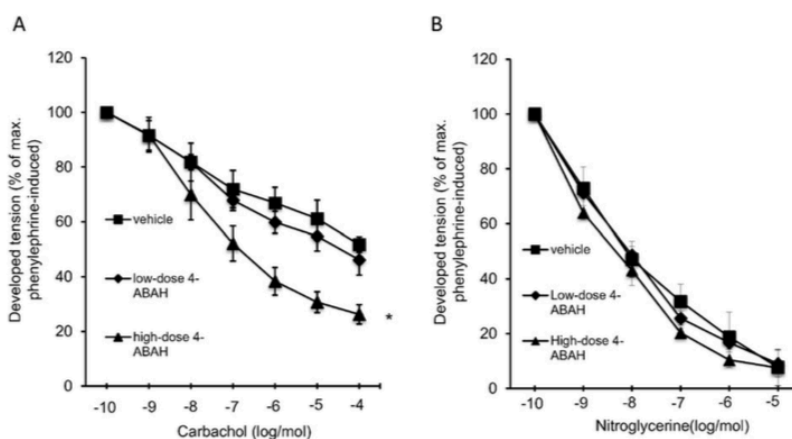


Fig. 2. Endothelial function. After 8 weeks aortic segments of ApoE^{-/-} mice were isolated and their functional performance was assessed in organ chamber experiments. Endothelium-dependent vasodilation induced by carbachol (A) and endothelium-independent vasodilation induced by nitroglycerin (B) is shown. 4-ABAH in the high dose improved significant diet-induced endothelial dysfunction. Mean \pm SEM. *P < 0.05 vs. vehicle.

reaction that involves the ferrous enzyme. It also irreversibly inactivates HOCL production by the purified enzyme and stimulates neutrophils [3, 25]. 4-ABAH should be useful for determining the contribution of MPO to oxidant-mediated reactions of neutrophils and atherogenesis. In our study we showed for the first time dose dependent anti-atherogenic effects of 4-ABAH, including improved endothelial function and oxidative stress in mice. In addition, 4-ABAH application resulted in decreased levels of circulating pro-inflammatory IL6 and increased anti-inflammatory IL10-levels, thus favoring anti-inflammatory effects within the vascular compartment and improvement of vascular function and morphology. For a detailed examination we assessed the role of circulating intracellular MPO and repopulated irradiated ApoE^{-/-} mice with bone marrow-derived cells from MPO^{-/-} mice. MPO deficiency in bone marrow-derived cells resulted in alleviated inflammation, reduced oxidative damage and increased endothelial function with a significant impact on plaque formation. MPO may thus be involved in the atherosclerotic process directly by promoting lesion development. Several other observations strongly suggest that MPO is involved in atherosclerosis. For example, MPO promotes lipid peroxidation and cholesterol accumulation in cells, and alters the reverse transportation of cholesterol induced by HDL [26,27]. Recent study has demonstrated that

overexpression of human MPO in LDL knockout mice led to increased atherosclerotic lesion size in aorta. In that study, human MPO was localized in lesions and was correlative to larger lesions [13]. Our findings are corresponding to these observations. Furthermore, compared with wild-type mice MPO-knockout mice showed resistance to acetylcholine-dependent vascular relaxation induced by lipopolysaccharide-treatment [28]. Exposure of MPO-knockout mice to an acute inflammatory stimulus displayed an improvement of vascular function besides an increase of vascular NO bioavailability compared with wild-type mice. This suggests that subendothelial MPO contributes significantly to the impairment of NO bioavailability in vivo [3]. On the other hand, Brennan et al. found increased atherosclerosis in LDL knockout mice on a high-fat diet in which the bone marrow had been repopulated with MPO^{-/-} cells after irradiation. Concomitantly they observed augmented atherosclerosis in LDL knockout mice on a high-fat diet in which the bone marrow had been repopulated with MPO^{-/-} cells after irradiation [12]. The reason for this latter unexpected result is not clear but may attribute to the used animal model of atherosclerosis.

Our results provide additional evidence that MPO is also involved in controlling neointima formation after arterial injury. The used

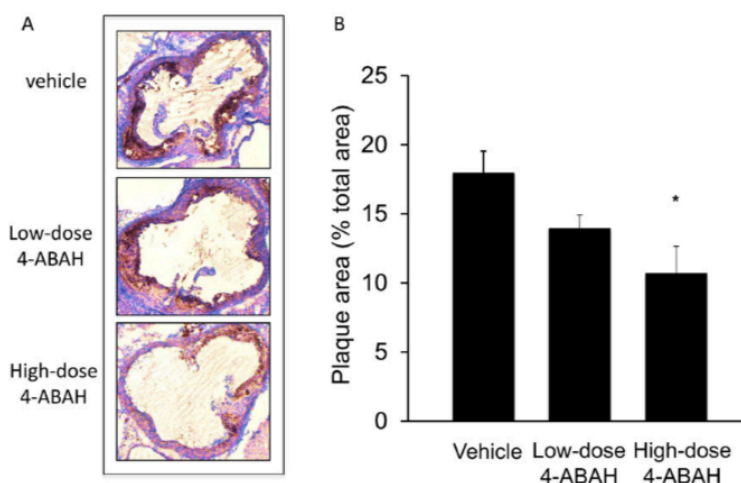


Fig. 3. Atherosclerotic plaque development. (A) Representative histological cross-sections of the aortic root were stained with oil red O to analyze atherosclerotic plaque development. (B) Quantitative analysis of atherosclerotic lesion formation indicated as plaque area in % of total area. Mean \pm SEM. *P < 0.05 vs. vehicle.

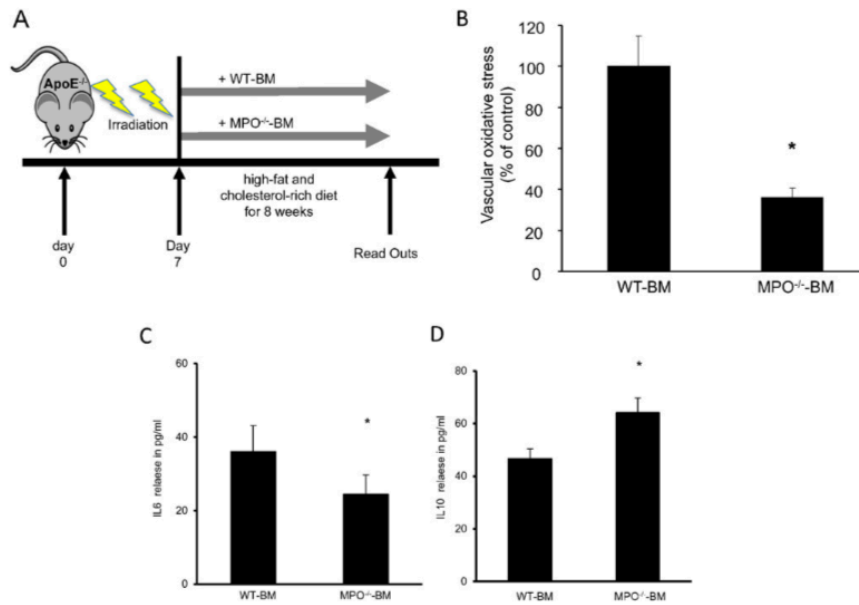


Fig. 4. Bone marrow transplantation: vascular oxidative stress and inflammation. (A) Experimental setting: ApoE^{-/-} mice were lethally irradiated and transplanted with MPO^{-/-} (n = 6) or WT (n = 6) bone marrow. ApoE^{-/-} mice were subjected to 11 Gy lethal total body irradiation. 6 h later, mice were repopulated intravenously with 2.5×10^6 cells obtained from the femurs of age and sex-matched MPO^{-/-} mice (MPO^{-/-} BM) or WT mice (WT-BM). After a treatment period of 8 weeks mice were sacrificed and read-outs were performed. (B) Vascular ROS formation in isolated aortic segments assessed by L-012 chemiluminescence was significantly reduced in ApoE mice transplanted with MPO bone marrow. (C and D) Plasma IL6 levels, determined using an ELISA kit, were significantly reduced, whereas plasma IL10-levels were enhanced in ApoE mice transplanted with MPO bone marrow. Mean \pm SEM. *P < 0.05 vs. vehicle.

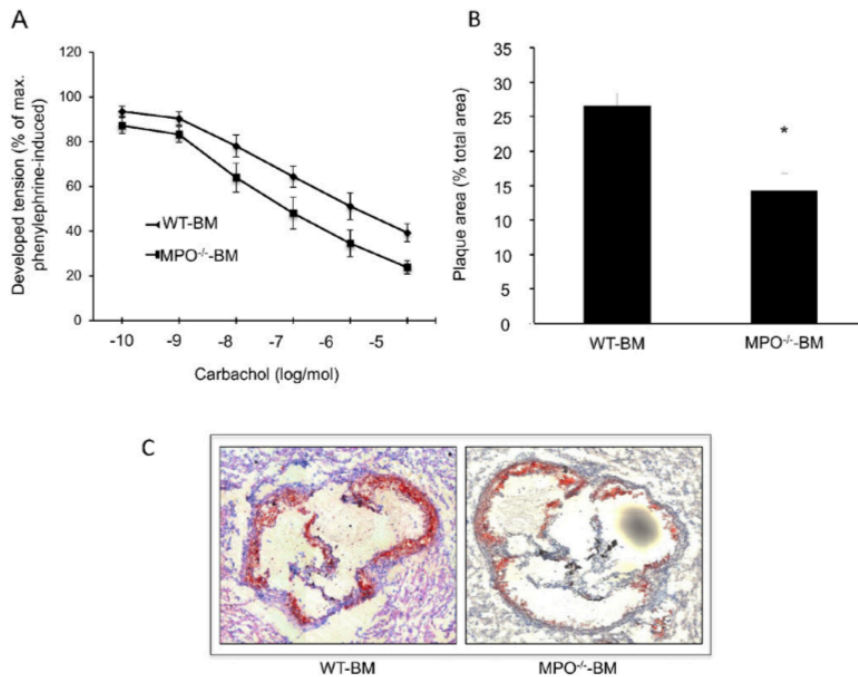


Fig. 5. Bone marrow transplantation: Endothelial function and atherosclerotic plaque development. After 8 weeks aortic segments of ApoE^{-/-} mice were isolated and their functional performance was assessed in organ chamber experiments. Endothelium-dependent vasodilation induced by carbachol (A) is shown. MPO deficiency in circulating cells after transplantation improved significant diet induces endothelial dysfunction in ApoE^{-/-} mice. (B) Analysis of atherosclerotic lesion formation demonstrated significantly reduced plaque load indicated as plaque area in % of total area. (C) Representative histological cross-sections of the aortic root were stained with oil red O to analyze atherosclerotic plaque development. Mean \pm SEM. *P < 0.05 vs. WT-BM.

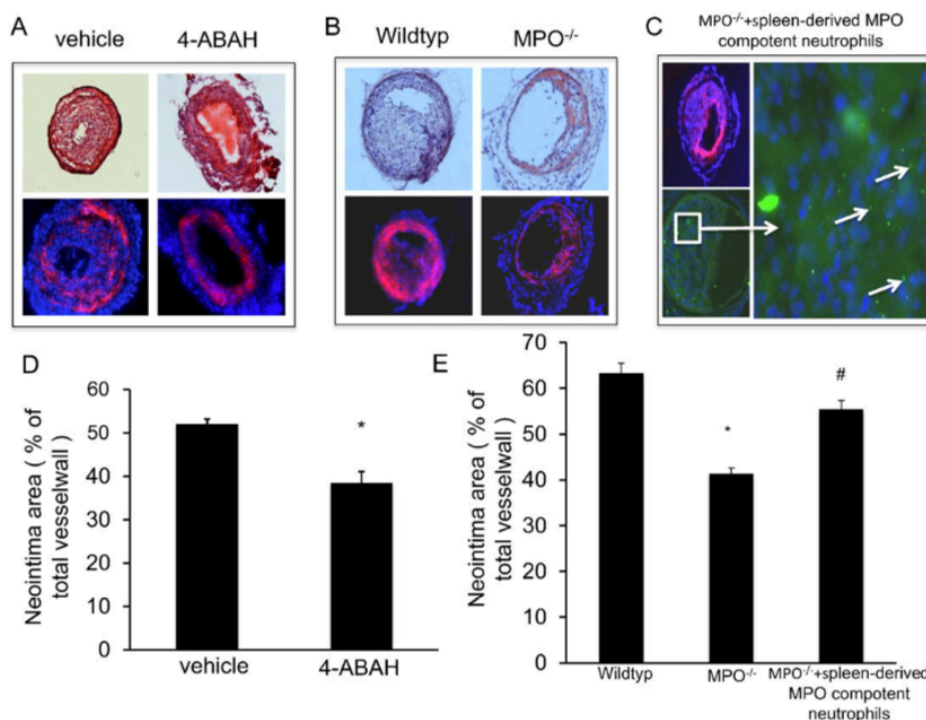


Fig. 6. Neointima formation after vascular injury. (A and D) 6–8 weeks old C57Bl/6J wild-type received 4-ABAH ($n = 8$) or vehicle ($n = 8$) after vascular injury. Fourteen days after carotid artery injury, vessels were subjected to histological analysis. Specific MPO inhibition by 4-ABAH reduced significantly neointima formation (representative H&E and ASMAC stainings). B and E: neointima formation was significantly reduced in MPO deficient mice ($n = 6$, representative H&E and ASMAC stainings). (C and E) MPO deficient mice received 1×10^6 spleen-derived neutrophils from WT mice ($n = 6$) intravenous tail vein injection directly after induction of arterial injury every second day. (C and D) In these mice transfer of spleen-derived neutrophils from WT mice enhanced neointima formation and MPO-positive cells (green) were found within the lesions of neointima formation. Mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

mouse model of neointimal formation is not affected by lipid administration, so we are able to analyze the role of MPO in the arterial wall response to injury of the endothelium. We demonstrated for the first time, that experimental induced neointimal lesion formation was prevented by 4-ABAH treatment and general MPO deficiency, whereas transfusion of MPO-positive neutrophils derived from spleen enhanced neointimal formation. In fact, we detected MPO in these mice within the neointimal lesions. Other data are in line with our experience, and suggested that MPO is able to induce neointimal lesion via its product HOCl [5].

Several clinical lines of evidence implicate MPO a role by the development of atherosclerosis-related diseases in humans. Immunohistochemical and biochemical analyses detect the enzyme and its oxidation products within human atherosclerotic lesions [24]. Decreased incidence of cardiovascular events was observed in individuals with total or subtotal MPO deficiency [29]. Further, individuals possessing a MPO-promoter polymorphism associated with a reported 2-fold reduction in enzyme expression appear cardio-protected, with a markedly decreased angiographic evidence of coronary artery disease, non-fatal myocardial infarction, and cardiac death [30]. Increased systemic levels of MPO have a predictive value for the presence of angiographic coronary artery disease [10,31]. Additionally, serum MPO levels serve as a strong and independent predictor of endothelial dysfunction in human subjects [21]. Finally, Brennen and colleagues suggested that MPO serves as a marker of the vulnerable plaque and introduced MPO as an excellent candidate for the prediction of acute coronary syndromes because it is released by activated leukocytes, is elevated and catalytically active in vulnerable plaques, and has been mechanically linked to factors affecting the development and stability of plaques [31].

In summary, our data underline the importance of neutrophil-derived MPO in atherosclerosis and in vascular proliferation under pathological conditions. Our presented data are consistent with a growing body of clinical and experimental evidence suggesting that MPO has a pro-atherosclerotic effect. Therefore, pharmacological MPO inhibition could possibly be beneficial in the treatment and prophylaxis of atherosclerosis and restenosis and provides a new therapeutic strategy for atherosclerosis-related CVD.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.11.128>.

Conflict of interest statement

The authors report no relationships that could be construed as a conflict of interest.

Acknowledgments

The excellent technical assistance of Anna Flender is greatly appreciated. Vedat Tiyerili (O-109.0033) was supported by BONFOR, University of Bonn, Germany.

References

- [1] R. Ross, Atherosclerosis—an inflammatory disease, *N. Engl. J. Med.* 340 (2) (1999) 115–126 (14).
- [2] E. Galkina, K. Ley, Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 165–197.
- [3] D. Lau, S. Baldus, Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease, *Pharmacol. Ther.* 111 (1) (2006) 16–26.
- [4] S.J. Nicholls, S.L. Hazen, Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis, *J. Lipid Res.* 50 (2009) S346–S351 (Suppl.).

- [5] J. Yang, Y. Cheng, R. Ji, C. Zhang, Novel model of inflammatory neointima formation reveals a potential role of myeloperoxidase in neointimal hyperplasia, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291 (6) (2006) H3087–H3093.
- [6] N.D. Wong, H. Gransar, J. Narula, L. Shaw, J.H. Moon, R. Miranda-Peats, et al., Myeloperoxidase, subclinical atherosclerosis, and cardiovascular disease events, *JACC Cardiovasc. Imaging* 2 (9) (2009) 1093–1099.
- [7] A. Daugherty, J.L. Dunn, D.L. Rateri, J.W. Heinecke, Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions, *J. Clin. Invest.* 94 (1) (1994) 437–444.
- [8] M. Van Leeuwen, M.J. Gijbels, A. Duijvestijn, M. Smook, M.J. van de Gaar, P. Heeringa, et al., Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28 (1) (2008) 84–89.
- [9] M.C. Meuwese, E.S. Stroes, S.L. Hazen, J.N. van Miert, J.A. Kuivenhoven, R.G. Schaub, et al., Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk prospective population study, *J. Am. Coll. Cardiol.* 50 (2) (2007) 159–165.
- [10] S. Baldus, C. Heeschen, T. Meinertz, A.M. Zeiher, J.P. Eiserich, T. Münzel, et al., Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes, *Circulation* 108 (12) (2003) 1440–1445 (23).
- [11] T.J. Mocatta, A.P. Pilbrow, V.A. Cameron, R. Senthilmohan, C.M. Frampton, A.M. Richards, et al., Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction, *J. Am. Coll. Cardiol.* 49 (20) (2007) 1993–2000.
- [12] M.L. Brennan, M.M. Anderson, D.M. Shih, X.D. Qu, X. Wang, A.C. Mehta, et al., Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice, *J. Clin. Invest.* 107 (4) (Feb 2001) 419–430.
- [13] T.S. McMillen, J.W. Heinecke, R.C. LeBoeuf, Expression of human myeloperoxidase by macrophages promotes atherosclerosis in mice, *Circulation* 111 (21) (2005) 2798–2804.
- [14] L.W. Castellani, J.J. Chang, X. Wang, A.J. Lusis, W.F. Reynolds, Transgenic mice express human MPO -463G/a alleles at atherosclerotic lesions, developing hyperlipidemia and obesity in -463G males, *J. Lipid Res.* 47 (7) (2006) 1366–1377.
- [15] L.J. Hazell, L. Arnold, D. Flowers, G. Waeg, E. Malle, R. Stocker, Presence of hypochlorite-modified proteins in human atherosclerotic lesions, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1535–1544.
- [16] E.A. Podrez, D. Schmitt, H.F. Hoff, S.L. Hazen, Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 1547–1560.
- [17] S.L. Hazen, R. Zhang, Z. Shen, W. Wu, E.A. Podrez, J.C. MacPherson, et al., Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation In vivo, *Circ. Res.* 85 (1999) 950–958.
- [18] E. Malle, P.G. Furtmüller, W. Sattler, C. Obinger, Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br. J. Pharmacol.* 152 (6) (2007) 838–854.
- [19] S.J. Nicholls, S.L. Hazen, Myeloperoxidase and cardiovascular disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (6) (2005) 1102–1111.
- [20] S. Sugiyama, K. Kugiyama, M. Aikawa, S. Nakamura, H. Ogawa, P. Libby, Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 1309–1314.
- [21] J.A. Vita, M.L. Brennan, N. Gokce, S.A. Mann, M. Goormastic, M.H. Shishehbor, et al., Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans, *Circulation* 110 (2004) 1134–1139.
- [22] S.L. Hazen, Myeloperoxidase and plaque vulnerability, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (2004) 1143–1146.
- [23] S.L. Hazen, J.W. Heinecke, 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima, *J. Clin. Invest.* 99 (9) (1997) 2075–2081.
- [24] E. Malle, G. Waeg, R. Schreiber, E.F. Gröne, W. Sattler, H.J. Gröne, Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/halide system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins, *Eur. J. Biochem.* 267 (14) (2000) 4495–4503.
- [25] A.J. Kettle, C.A. Gedy, C.C. Winterbourn, Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide, *Biochem. J.* 321 (Pt 2) (1997) 503–508.
- [26] R. Zhang, M.L. Brennan, Z. Shen, J.C. MacPherson, D. Schmitt, C.E. Molenda, et al., Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation, *J. Biol. Chem.* 277 (48) (2002) 46116–46122.
- [27] A. Undurti, Y. Huang, J.A. Lupica, J.D. Smith, J.A. DiDonato, S.L. Hazen, Modification of high density lipoprotein by myeloperoxidase generates a pro-inflammatory particle, *J. Biol. Chem.* 284 (45) (2009) 30825–30835.
- [28] J.P. Eiserich, S. Baldus, M.L. Brennan, W. Ma, C. Zhang, A. Tousson, et al., Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase, *Science* 296 (2002) 2391–2394.
- [29] D. Kutter, P. Devaquet, G. Vanderstocken, J.M. Paulus, V. Marchal, A. Gothot, Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit? *Acta Haematol.* 104 (2000) 10–15.
- [30] B. Nikpoor, G. Turecki, C. Fournier, P. Theroux, G.A. Rouleau, A functional myeloperoxidase polymorphic variant is associated with coronary artery disease in French-Canadians, *Am. Heart J.* 142 (2001) 336–339.
- [31] M.L. Brennan, M.S. Penn, F. Van Lente, V. Nambi, M.H. Shishehbor, R.J. Aviles, et al., Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain, *N. Engl. J. Med.* 349 (17) (2003) 1595–1604.

3. Danksagung

Zunächst einmal möchte ich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Georg Nickenig, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Bonn, für diese großartige Möglichkeit zur Einführung in das wissenschaftliche Spektrum der Grundlagenforschung bedanken. Unter seiner konzeptionellen Führung konnte ich nicht nur die Anwendungsgebiete der molekularen Kardiologie kennenlernen, sondern meine Kenntnisse in diesem Feld erweitern.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meinen Betreuern Herrn PD. Dr. med. Vedat Tiyerili und Herrn Prof. Dr. med. René Andrié für die Bereitstellung dieses Themas, die umfangreiche und konsequente Einarbeitung, die persönliche Betreuung sowie die ständige Ansprechbarkeit trotz ihrer ausgeprägten Anbindung in ihrem klinischen Alltag. Unter ihrer wissenschaftlichen Führung habe ich eine ausgezeichnete nationale sowie internationale Kooperation erfahren. Beide sind für mich sehr wichtige und nicht zuletzt sehr freundliche Persönlichkeiten, mit denen ich die Ehre hatten zu arbeiten. Die wertvolle Unterstützung des MTA-Teams der Molekularen Kardiologie sei hier erwähnt. Für die gute Einarbeitung an den Gerätschaften sowie in die OP-Methodik bedanke ich mich herzlichst. In diesem Kontext möchte ich meinen Mitstreiter, sehr geschätzten Kollegen Dr. med. Adem Aksoy ebenfalls danken für den wissenschaftlichen Austausch, die zahlreiche Unterstützung, die produktiven Diskussionen und die tolle gemeinsame Zeit.

Herzlicher Dank an meinem Bruder Fodé Diogo Camara und seiner großartigen Familie (Hilke, Ayana, Layla und Fyna Camara) für ihre mühevollen und geduldigen Begleitung während meines gesamten Werdegangs. Ich weiß eure Fürsorge unheimlich zu schätzen. Meiner Mutter M'Mah Yansané sowie meinem verstorbenen Vater Diogo Camara möchte ich ganz speziell danken. Diese beiden Personen haben die ersten wegweisenden Steine in meinem Leben gelegt. Sie mir ermöglicht mich zu entfalten und die Person zu werden, die ich heute bin.

Mein ganz persönlicher Dank gilt Franziska Möhl für ihre unersetzbare Unterstützung und ständige Ermutigung. Mit ihr an meiner Seite bleiben sowohl die schönen als die holprigen Augenblicke auf immer und ewig besonders. Danke für dein Vertrauen, dein Dasein als Ruhepole und dafür, dass du mir ständig den Rücken gestärkt und freigehalten hast.