

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Universitäres Herzzentrum Hamburg, Cardiovascular Research Center

Direktor: Prof. Dr. Stefan Blankenberg

Einfluss von Myeloperoxidase auf die pro fibrotische Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen in vitro

Dissertation

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

vorgelegt von:
Niels Ostmeier aus Düsseldorf

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 06.12.2019

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Thomas
Eschenhagen**

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Stephan Baldus

Inhaltsverzeichnis

1. Zielsetzung	5
2. Einführung	5
2.1. Aufbau des Blutgefäßes	6
2.2. Die vaskulären glatten Muskelzellen	7
2.3. Extrazelluläre Matrix	10
2.4. p-38 MAP-Kinase	12
2.5. Myeloperoxidase	14
1.5.1. Katalytische Aktivität und Pathogenabwehr	15
1.5.2. Extrakatalytische Eigenschaften von MPO	18
1.5.3. MPO und Atherosclerose	18
1.5.4. MPO und Vorhofflimmern	24
3. Materialien und Methoden	25
3.1. Materialien	25
3.1.1. Reagenzien und Arzneistoffe	25
3.1.2. Antikörper	26
3.1.3. Puffer und Lösungen	27
3.1.4. Zellkulturmaterialien	28
3.1.5. Reaktionskits	28
3.1.6. Geräte und Software	28
3.2. Kultivierung von rattenaortalen glatten Muskelzellen (RSMCs)	29
3.3. Bestimmung der p38 MAP-Kinase Aktivierung in glatten Muskelzellen	30
3.4. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in Zellhomogenaten	32
3.1. Darstellung von MPO in RSMCs	33
3.2. Bestimmung der <i>Transforming Growth Factor Beta 1</i> (TGF-β) Produktion in RSMCs	34
3.3. Darstellung von TGF-β 1 in RSMCs mittels Immunfluoreszenzhistologie	35
3.4. Bestimmung der CD40 Expression in RSMCs	35
3.5. Darstellung von CD-40 in RSMCs	35
3.6. Wiederholte Gabe von hypochloriger Säure (HOCl)	36
3.7. Analyse der Zellproliferation mittels MTT Assay	36
3.8. Bestimmung von Fibronectin mittels Immunoblotting	37
3.9. Darstellung von Fibronectin mittels Immunfluoreszenzhistologie	37
3.10. Colorimetrische Bestimmung von Collagen	38
3.11. Statistische Auswertung	39
4. Ergebnisse	40
4.1. MPO wird in glatte Gefäßmuskelzellen aufgenommen	40
4.2. Einfluss von MPO auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen	41
4.3. TGF-β Produktion in RSMCs	42
4.4. p38 MAP-Kinasen Aktivierung in RSMCs	47
4.5. Expression von CD40 auf RSMCs	49
4.6. Fibronectinsynthese in RSMCs	50
4.7. Collagensynthese in RSMCs	52
5. Diskussion	54
5.1. MPO reichert sich in vaskulären glatten Muskelzellen an	54

5.2.	MPO hemmt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in vitro.....	55
5.3.	MPO-abhängige Bildung von TGF-β	56
5.4.	MPO stimuliert die Bildung von ECM	58
5.5.	MPO aktiviert p38 MAP-Kinase.....	59
5.6.	MPO als Faktor in kardiovaskulären Umbauprozessen.....	60
5.7.	Ausblick.....	64
6.	Zusammenfassung	65
7.	Summary	66
8.	Abkürzungsverzeichnis	67
9.	Literaturverzeichnis.....	70
10.	Danksagung	87
11.	Lebenslauf.....	87
12.	Eidesstattliche Versicherung	88

1. Zielsetzung

Die leukozytäre Myeloperoxidase hat sich seit einigen Jahren als wichtiger Faktor in kardiovaskulären Remodelingprozessen etabliert. Bisher lag der Fokus hierbei vornehmlich auf Prozessen, die sich in der Lamina intima des Gefäßes und in Kardiomyozyten abspielen. Um das Verständnis des Einflusses von MPO auf das Herzkreislaufsystem weiter zu vertiefen, soll diese Arbeit einen grundlagenwissenschaftlichen Beitrag zum Verständnis von MPO induzierten, phänotypischen Veränderungen in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) leisten. Besonderes Augenmerk soll hierbei auf die Unterscheidung zwischen katalytischen und extrakatalytischen Eigenschaften der MPO gelegt werden. Deshalb sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Interagiert MPO mit kultivierten VSMCs?
2. Führt eine Exposition der Zellen gegenüber MPO zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und konsekutiv zu einer veränderten Expression von Wachstumsfaktoren und Oberflächenmarkern?
3. Sind diese Effekte auf die Bildung von HOCl zurückzuführen?
4. Zeigen sich nach MPO Exposition profibrotische Veränderungen der VSMCs?

2. Einführung

Kardiovaskuläre Erkrankungen und ihre Komplikationen bilden die Haupttodesursache in der westlichen Welt. Laut WHO belegten mit chronischer ischämischer Herzkrankheit, akutem Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz drei kardiovaskuläre Erkrankungen die vordersten Plätze in der Todesursachenstatistik für Deutschland von 2012. Zusammengenommen sind kardiovaskuläre Erkrankungen für knapp die Hälfte der Todesfälle in Deutschland verantwortlich. Als Gründe hierfür sind vor allem Lifestylefaktoren, wie zum Beispiel die Entwicklung eines metabolischen Syndroms, anzusehen.

Heute ist bekannt, dass vielen dieser Krankheitsbilder eine entzündliche Veränderung der Gefäßstrukturen zugrunde liegt. Die Mechanismen dieser inflammatorischen Prozesse sind seit langem Ziel intensiver Forschung, trotzdem ist die zugrundeliegende Pathophysiologie noch unzureichend verstanden. Wesentlichen Anteil an den physikalischen und biologischen Eigenschaften des Gefäßsystems haben die glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Werden sie entzündlich oder fibrotisch verändert, ist eine normale Gefäßfunktion nicht mehr gewährleistet.

2.1. Aufbau des Blutgefäßes

Die Kenntnis der anatomischen und physiologischen Eigenschaften der Gefäße ist Grundvoraussetzung für das Verständnis kardiovaskulärer Erkrankungen.

Grob lässt sich das Gefäßsystem in drei Bereiche aufteilen: Das Hoch- und Niederdrucksystem, sowie die Mikrozirkulation. Die meisten relevanten pathologischen Veränderungen spielen sich in den Arterien des Hochdrucksystems ab. Obwohl sich die Funktion und Anatomie der Gefäße dieser drei Systeme stark unterscheiden, liegt ihnen allen der selbe, dreischichtige Aufbau zugrunde. Die innerste Schicht des Gefäßes wird als Intima bezeichnet. Im Wesentlichen wird sie durch das Endothel gebildet. Diese Zellschicht kleidet das Gefäß von innen aus und ist daher von entscheidender Bedeutung für die Interaktion von humoralen und korpuskulären Bestandteilen des Blutes mit der Gefäßwand. Es steuert die Aufnahme von Stoffen aus dem Blut und kontrolliert die Extravasation, zum Beispiel von Entzündungszellen. Weiterhin hat es einen antithrombotischen Effekt. Zusätzlich ist es verantwortlich für die Regulation des Tonus der glatten Muskelzellen des Gefäßes. Das Endothel sitzt einer Basalmembran auf. Im subendothelialen Raum finden sich die Lamina propria und Lamina elastica interna. Diese Bindegewebsschichten bestehen aus extrazellulären Matrixproteinen (ECM) wie Collagenen und Fibronectin. Der Tunica intima schließt sich die Tunica Media an. Hier sind die vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) der dominierende Zelltyp. Sie regulieren, zum Teil gesteuert durch das Endothel, zum Teil auf neuronale Stimulation hin, durch Kontraktion den Gefäßtonus.

Auch diese Muskelzellschicht ist mit ECM durchsetzt. Den Abschluss der Tunica media bildet die Lamina elastica externa. Umhüllt wird das Gefäß von der Tunica adventitia. Diese Collagenreiche Bindegewebsschicht verankert das Gefäß im umliegenden Gewebe. In ihr verlaufen Nerven und in größeren Gefäßen die Vasa vasorum. Die Ausprägung der einzelnen Schichten ist typisch für jeden Teil des Kreislaufsystems. So besitzen Arterien eine Kräftige Media, wohingegen die Kapillaren der Mikrozirkulation über so gut wie keine glatten Muskelzellen verfügen.

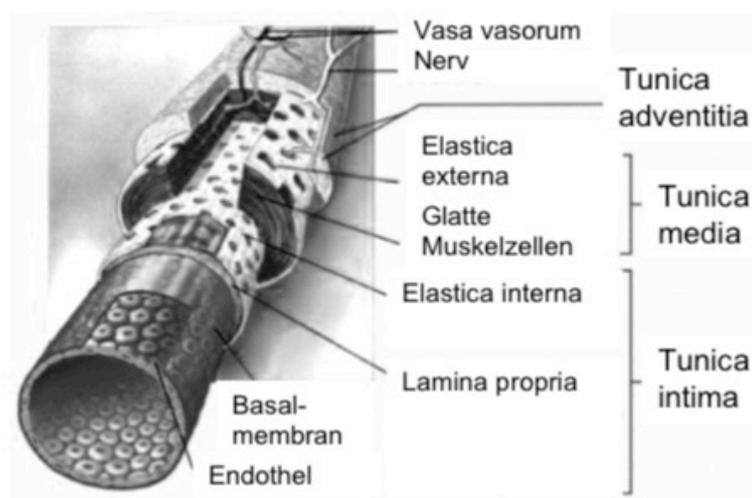


Abbildung 1: Aufbau der Wandschichten des Blutgefäßes. modifiziert nach McGraw-Hill Companies / Rutgers, The State University of New Jersey.

2.2. Die vaskulären glatten Muskelzellen

Vaskuläre glatte Muskelzellen sind mesenchymalen Ursprungs und erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben. Zusammen mit der ECM der Gefäßwand, für deren

Synthese sie neben einigen Fibroblasten hauptverantwortlich sind, bestimmen sie die physikalischen Eigenschaften des Gefäßes. Ist ihre Funktion gestört, ist eine normale Gefäßfunktion nicht mehr möglich. Schon seit einiger Zeit ist bekannt, dass man Grundsätzlich zwischen zwei wesentlichen Phänotypen von VSMCs unterscheiden muss: Den sogenannten kontraktilen und den synthetischen VSMCs (101). Erstere stellen den dominierenden Zelltyp in der Media des erwachsenen Menschen dar. Sie sind konzentrisch angeordnet und weisen einen gut ausgeprägten kontraktilen Apparat auf. Hieraus ergibt sich auch ihre Hauptfunktion, die in der Regulation des Blutdruckes und -flusses durch Kontraktion oder Relaxation besteht. Gesteuert werden sie hierbei zum einen durch vom Endothel gebildete, vasoaktive Substanzen. Endothelin und Angiotensin sind hier als wichtige tonuserhöhende, NO als relaxierender Mediator zu nennen (44). Weiterhin unterliegen die VSMCs einer neuronalen Kontrolle. Sie proliferieren extrem langsam und zeigen eine geringe synthetische Aktivität. In diesem Zustand exprimieren die glatten Muskelzellen eine Reihe von Oberflächenproteinen, die für sie einzigartig sind (93). Ganz anders imponieren die VSMCs vom sogenannten synthetischen Typ. Sie finden sich vereinzelt in der Intima des Gefäßes und in pathologisch veränderten Gefäßabschnitten. Wie der Name vermuten lässt, zeichnen sich diese Zellen durch eine massiv gesteigerte Syntheserate von ECM (117), Proteasen (36), Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (101) aus, und weisen einige inflammatorische Zellmarker auf (11, 42). Sie proliferieren und migrieren und sind reich an Golgiapparat und rauem endoplasmatischem Retikulum. In dieser Form sind VSMCs hauptverantwortlich für Remodelingprozesse im Rahmen der physiologischen Reparatur von Gefäßverletzungen aber auch in der Entwicklung und dem Progress von pathologischen Gefäßveränderungen. Beispiele hierfür sind die Atherosclerose (101) und die Ausbildung von Aortenaneurysmata (66).

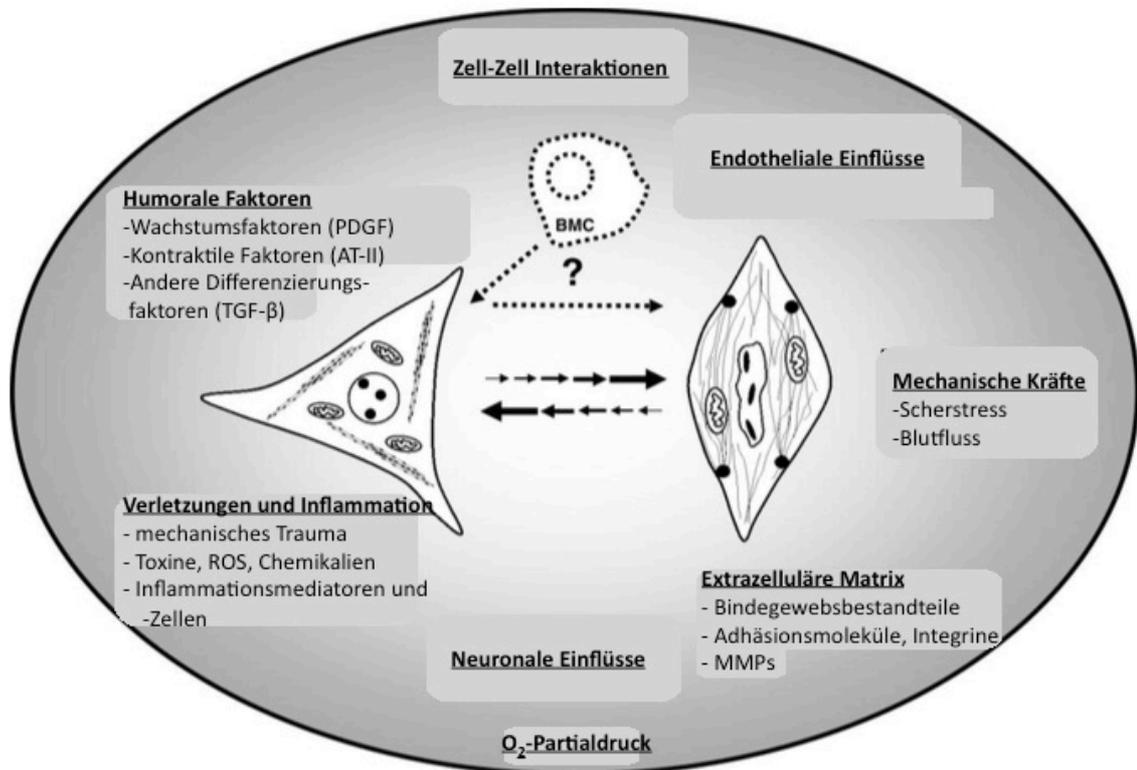


Abbildung 2: Faktoren die die Differenzierung glatter Gefäßmuskelzellen zum synthetischen (links) oder kontraktiven (rechts) Typ beeinflussen (BMC = Bone marrow Cell, PDGF = Platelet derived growthfactor, AT-II = Antithrombin II, TGF- β = Transforming growthfactor beta, ROS = Reaktive Sauerstoffspezies, MMPs = Matrixmetalloproteinase). modifiziert nach: Gary K Owens et al., *Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease, Physiological Reviews, 2004 vol. 84 (3) pp. 767-801*

VSMCs sind also in der Lage, ihre Funktion radikal zu verändern. Diese Fähigkeit wurde vor nun schon fast 40 Jahren als „phenotypic modulation“ beschrieben (14). Hierbei wird die Differenzierung der glatten Muskelzellen durch eine Reihe von Faktoren bestimmt. Obwohl es sich als schwierig herausgestellt hat, die genaue Bedeutung der einzelnen Faktoren in vivo zu verifizieren, so zeigen in vitro Studien den Einfluss von mechanischer Beanspruchung (102), kontraktiven Faktoren (37), ECM (13, 49, 98), neuronalen

Faktoren, ROS (113), Interaktionen mit dem Endothel und dem Wachstumsfaktor *Transforming Growth Factor beta 1* (TGF- β) (109) auf den Phänotyp der VSMCs. Einige bedeutende Mediatoren der Funktion der SMCs sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

2.3. Extrazelluläre Matrix

Die Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) besitzen eine Vielzahl von Funktionen. In erster Linie bestimmen sie die mechanischen Eigenschaften des Gefäßes. Elastische Fasern, die vermehrt in den herznahen Arterien zu finden sind, verleihen der Gefäßwand eine große Dehnbarkeit, während collagene Fasern im Vergleich unflexibel und starr sind. Kommt es zu einer überschießenden Produktion von ECM spricht man von Fibrose. Hier werden vornehmlich collagene Fasern vermehrt produziert. Fibrose findet physiologischerweise kompensatorisch zur Deckung von Substanzdefekten, etwa nach einem Myokardinfarkt, oder im Rahmen von pathologischen Prozessen, beispielsweise chronischen Entzündungen, statt. Eine hieraus resultierende Störung der Zusammensetzung der ECM schwächt die Gefäßwand und kann im schlimmsten Falle zur Bildung von Aneurysmata und daraus resultierender Ruptur des Gefäßes führen (54). Außerdem stören fibrotische Areale die Fortleitung von elektrischen Reizen (90). Fibrose entwickelt sich unter anderem als Reaktion auf erhöhten mechanischen oder oxidativen Stress, Apoptose, Nekrose oder Zytokine. Auch einigen vasoaktiven Substanzen wie Angiotensin II werden profibrotische Eigenschaften zugesprochen (31). Auf zellulärer Ebene wird Fibrose wesentlich durch einen vermehrten Umbau der ECM durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) vermittelt (15). In der Gefäßwand sind in erster Linie die glatten Gefäßmuskelzellen für die Produktion der ECM verantwortlich. Da ihre eigentliche Funktion jedoch in der Modulation des Gefäßtonus liegt, ist ihre synthetische Funktion nur sehr schwach ausgeprägt. Verschiedene Faktoren können diese aber durch Begünstigung oben beschriebener phänotypischer Veränderungen erheblich erhöhen (92). Somit ähneln in fibrotisch veränderten Gefäßabschnitten die glatten Gefäßmuskelzellen in Form und Funktion sehr denen Fibroblasten. Von besonderer Bedeutung für fibrotische Prozesse in der

Gefäßwand und die Menge und Zusammensetzung der ECM sind daher auch Wachstumsfaktoren wie der *Platelet Derived Growth Faktor* (PDGF) und TGF- β (24). TGF- β ist ein polypeptider Wachstumsfaktor, der neben der Produktion von ECM mannigfaltige weitere Funktionen hat, die zum Beispiel auch Effekte auf das Zellwachstum und Differenzierung, sowie immunmodulatorische Eigenschaften umfassen (20). Darum wird er auch von einer Vielzahl von Zellen gebildet und nahezu alle Zellen besitzen entsprechende Rezeptoren. Besonders für diesen Wachstumsfaktor ist, dass er zunächst in einer inaktiven Form gebildet wird, in der pro-TGF- β mit so genannten *Latency-associated Proteins* (LAP) verbunden ist. Auch nach Abspaltung der LAPs bleiben die beiden Teile nicht kovalent aneinander gebunden und werden an ECM gebunden, bis sie von dort freigesetzt werden (100). Dies kann zum Beispiel proteolytisch durch MMPs sowie durch Senkung des pH-Wertes geschehen. Einmal freigesetzt bindet TGF- β an einen Membranrezeptor welcher nach Bindung des Wachstumsfaktors dimerisiert und eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden in Gang setzt (100). Am besten erforscht ist die TGF- β -vermittelte Aktivierung der sogenannten Smad-Kaskaden (110). Nach Phosphorylierung werden diese in den Nucleus transportiert und entfalten dort ihre Wirkung auf die Transkription profibrotischer Gene. Dieses wird als kanonisches Signaling bezeichnet. Seit einiger Zeit sind allerdings auch andere Signalkaskaden mit TGF- β in Verbindung gebracht worden, so auch die MAP-Kinase-Kaskaden (108). Gerade für die Steuerung der ECM Synthese in der Gefäßwand scheinen diese nicht kanonische Signalkaskaden, die unabhängig von Smad-Molekülen ablaufen, eine große Bedeutung zu besitzen (53). Dieses Erkenntnis lässt neue Blickwinkel auf die lange Zeit paradox wirkende Rolle von TGF- β in kardiovaskulären Remodelingprozessen zu, die weiterer und genauerer Untersuchung bedürfen.

Eine Vielzahl von Studien belegt weiterhin einen sehr starken Zusammenhang zwischen inflammatorischen und fibrotischen Prozessen (25, 105). Somit darf auch der Effekt proinflammatorischer Mediatoren auf die Synthese der ECM nicht unterschätzt werden. So wie beispielsweise der CD40 Signalweg. Galt der CD40-Ligand traditionell als charakteristischer Rezeptor aktivierter T-Lymphozyten, ist heute bekannt, dass er und somit auch die Interaktion mit

CD40 in einer Vielzahl verschiedener Zelllinien und somit pathogenetischer Prozesse involviert ist (127). Fibrotische Veränderungen im Zusammenhang mit CD40 Signalprozessen sind unter anderem für pulmonale Fibroblasten beschrieben (62). Auch vaskuläre Gefäßmuskelzellen sind einem CD40 Signaling unterworfen (11).

Betrachtet man die Aufgaben der ECM, gehen diese weit über ihre strukturelle Bedeutung hinaus. Wie oben erwähnt, bestimmt die Zusammensetzung der ECM den Phänotyp glatter Muskelzellen (98). Außerdem bestimmen ECM-Moleküle durch Bindung von anderen Wachstumsfaktoren und Enzymen deren Aktivität oder agieren selber als Ligand für zelluläre Rezeptoren. Ein in dieser Hinsicht besonders interessanter Bestandteil der ECM ist Fibronectin (FN) (84). FN besitzt eine Reihe von Bindungsstellen für die verschiedensten Substanzen, unter anderen Fibrin, Heparin, Collagen und einige Integrine. Es wurde auch eine besondere Affinität der leukozytären Myeloperoxidase zu Fibronectin gezeigt (7). Fibronectin begünstigt das oben erwähnte *phenotypic switching* von VASMCs hin zum synthetischen Phänotyp (119). In mehreren Studien konnte eine gesteigerte FN-Produktion mit einer Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Hierzu zählt unter anderem die vermehrte Expression von FN in atherosclerotischen Läsionen (69). Die Strukturellen und regulatorischen Eigenschaften der ECM sind also an einer Vielzahl von pathologischen Prozessen im kardiovaskulären System beteiligt.

2.4. p-38 MAP-Kinase

Ein etablierter Vermittler zellulärer Differenzierungsprozesse und inflammatorischer Reaktionen ist die *p38 mitogen-activated protein (MAP)-Kinase*. Ähnlich wie die anderen Mitglieder der MAP-Kinase Familie, steuert sie Proliferation, Apoptose und einige entzündliche Veränderungen als Antwort auf extrazelluläre Stimuli. Sie wird durch Phosphorylierung eines für sie typischen Thr-Gly-Tyr Motivs aktiviert (41) und phosphoryliert in Folge eine Vielzahl von Zielproteinen. Am längsten als solches bekannt, ist die sogenannte *MAP-Kinase Activated Protein Kinase 2 (MAPKAPK2/MK2)* (103). Diese wiederum

aktiviert eine Reihe von Substraten, wie zum Beispiel das *small heatshock Protein 27* (HSP27) (103) oder das *cAMP-response binding Protein* (CREB), aber auch Transskriptionsfaktoren wie ATF1 (118). Die Aktivierte Form von p38 MAP-Kinase kann ihrerseits auch direkt Transskriptionsfaktoren aktivieren. Besonders etabliert ist hier der Zusammenhang mit dem proinflammatorischen Transskriptionsfaktor NF-kappa B (107). Die Gesamtmenge an p38 MAP-Kinase in der Zelle ist unter physiologischen Bedingungen konstant. Ihre Aktivität wird durch Dephosphorylierung durch einige spezifische MAP-Kinase Phosphatasen (MKP) (116) und andere Phosphatasen gehemmt. Hieraus resultiert eine besonders schnelle Anpassung dieses Signalweges an Stimuli. Eine Vielzahl von extrazellulären Signalen führt zur Aktivierung von p38 MAP-Kinase. Hierzu zählen unter anderen UV-Licht, Hitze, osmotischer und oxidativer Stress, sowie eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (126). Die Gruppe der up-stream Mediatoren, die letztendlich p38 MAP-Kinase aktivieren ist groß und heterogen, was für die besondere Komplexität dieses Pathways verantwortlich ist. Klassischerweise wird die MAP-Kinase durch eine MAP-Kinase Kinase (MKK) aktiviert (126). Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass p38 MAP-Kinase sich durch Autophosphorylierung aktiviert, zum Beispiel nach Interaktion mit *transforming growth faktor- β -activated Kinase 1 binding protein* (TAB1) (38). Von besonderer Bedeutung ist auch die Aktivierung von MAP-Kinasen durch subletale Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies. Dies wurde sowohl für Wasserstoff Peroxid (H_2O_2), als auch vor einiger Zeit für die chlorinierende Spezies hypochlorige Säure (HOCl) gezeigt (85).

p38 MAP-Kinase gilt als wesentlicher Mediator von entzündlichen Erkrankungen. Auch eine Verbindung zu Erkrankungen des kardiovaskulären Systems konnte etabliert werden (88). Etliche in vivo Studien zeigen außerdem eine Beteiligung von p38 MAP-Kinase an kardiovaskulären Remodelingprozessen zum Beispiel nach einem Myokardinfarkt oder nach Ballondilatation von Gefäßen. Ushio-Fukai et al. haben gezeigt, dass die Angiotensin II induzierte Proliferation und Hypertrophie von kultivierten VSMCs im Wesentlichen durch oxidative Aktivierung von MAP-Kinasen vermittelt wird

(120). Der Phänotyp von VSMCs wird also in kritischem Maße durch Aktivierung von MAP-Kinasen bestimmt.

2.5. Myeloperoxidase

Myeloperoxidase (MPO) gehört neben der Lactoperoxidase, der eosinophilen Peroxidase und der thyroiden Peroxidase zur Familie der Säugetierspezifischen Peroxidasen. Es handelt sich um ein 150 kDA schweres, homodimeres Hämprotein. Dabei setzen sich die Monomere jeweils aus einer leichten und einer schweren Untereinheit zusammen, von denen die schwere Kette das kovalent gebundene Häm-Molekül trägt, das dem Enzym seine spezifischen katalytischen Eigenschaften und seine intensiv grüne Farbe verleiht (73). Im Menschen ist MPO im Wesentlichen in den azurophilen Granula der polymorphkernigen Granulozyten (PMN) lokalisiert und macht 5% von deren Gesamtmasse aus (63). Außerdem findet sie sich noch in geringem Maße in einigen Makrophagen, Mikroglia und Kupferzellen (17). Einzigartig ist die Fähigkeit von MPO zur Synthese von chlorinierenden Reaktionsprodukten, der hypochlorigen Säure (HOCl) (46). Außerdem ist ihre stark kationische Ladung neben anderen Merkmalen für eine Reihe von extrakatalytischen Eigenschaften verantwortlich. Als wesentlicher Mediator leukozytärer Funktionen wird MPO seit langem eine Aufgabe in der Pathogenabwehr zugeschrieben. Es zeigte sich aber auch eine bedeutende Rolle dieses einzigartigen Enzyms in der Pathophysiologie kardivaskulärer Erkrankungen.

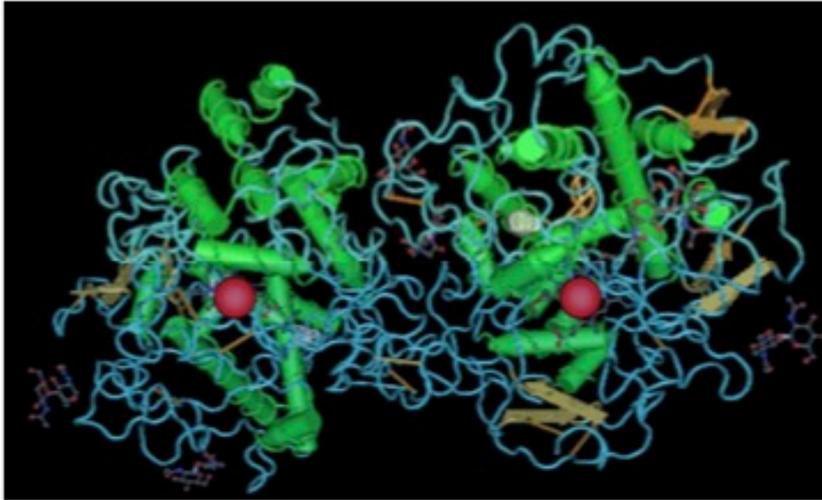


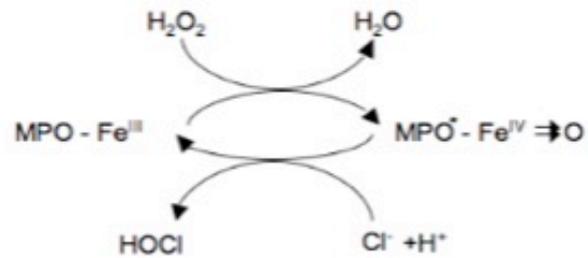
Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der homodimeren Myeloperoxidase. Farblich hervorgehobene Häm-Moleküle (rot) sowie Alpha-Helices (grün) und Beta-Faltblatt (gelb) Bereiche. Aus Lau et al., Pharm Ther 2006.

1.5.1. Katalytische Aktivität und Pathogenabwehr

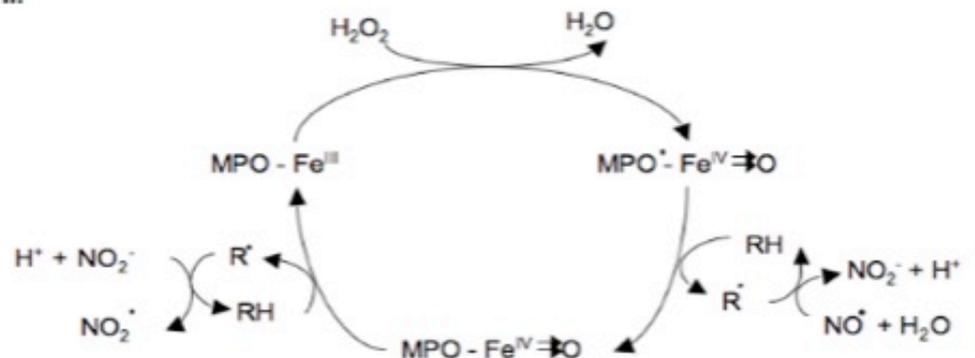
Werden Leukozyten aktiviert, wird MPO im Rahmen des sogenannten "Respiratory Burst" in das Phagosom und den Extrazellulären Raum sezerniert (22). Hier bildet es unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) eine Reihe von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS). Während der Granulozytenaktivierung wird H_2O_2 durch die NADPH-Oxidase bereitgestellt (43). Neben dem Substrat H_2O_2 benötigt das MPO-Reaktionssystem ein oxidierbares Kosubstrat. Hierfür kommen unter anderem Halogenide, Pseudohalogenide und Nitrit (NO_2^-) in Frage. Unter physiologischen Bedingungen stellt allerdings Chlorid (Cl^-) aufgrund seiner hohen Bioverfügbarkeit den wesentlichen Reaktionspartner dar (29, 46). Als Reaktionsprodukt entsteht HOCl, ein Molekül mit hoher oxidativer Potenz und somit toxischer Wirkung gegen einige Pathogene, aber auch körpereigene Strukturen. Zusätzlich bewirkt HOCl die Bildung von Radikalen und molekularen Chlors (48, 50). Letzteres kann zu Chlorinierung von Phenolresten führen.

Besonders 3-Chloro- und 3,5-Dichloro-Tyrosin eignen sich deshalb als gute Marker für die katalytische Aktivität von MPO (21). Vor allem für die pathophysiologischen Eigenschaften von MPO ist die Oxidation von NO und NO_2^- von besonderer Bedeutung. So wird NO zu NO_2^- und NO_2^- zu Stickstoffdioxid (NO_2) oxidiert. Dies ist seinerseits ein reaktives Radikal und kann Phenolreste nitrieren (23). Daher kann auch 3-Nitrotyrosin als Aktivitätsmarker für MPO herangezogen werden, allerdings mit geringerer Spezifität. Die Bedeutung der mikrobiziden Funktion im menschliche Organismus, die MPO durch die Bildung von ROS und RNS besitzt, ist bis heute nicht vollständig geklärt (64). In vitro Versuche zeigten die Notwendigkeit von MPO für die Abwehr einiger Bakterien- und Pilzspezies (78, 79) und auch in einigen Mausmodellen konnte eine Anfälligkeit MPO-defizienter Mäuse gegenüber einer Auswahl an Erregern gezeigt werden (2, 3, 52). Diese Daten lassen sich aber nur begrenzt auf den Menschen übertragen, da murine Leukozyten 10 bis 20 mal weniger MPO beinhalten als humane (10). Fakt ist, dass ,von einem seltenen Gendefekt betroffene, MPO-defiziente Menschen nur eine leicht erhöhte Infektanfälligkeit zeigen und dies nur, wenn gleichzeitig prädisponierende Faktoren wie zum Beispiel ein Diabetes mellitus vorliegen (72, 94). Aus diesem Grund fokussiert sich die aktuelle Forschung eher auf die extramikrobiziden Eigenschaften von MPO.

I.



II.



III.

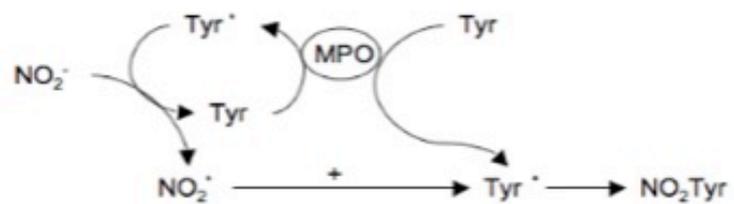


Abbildung 4: MPO-Katalysierte Reaktionen. I: In einem 2 Elektronen-Schritt wird H_2O_2 durch MPO reduziert, welches hiernach als Compound-I ($\text{MPO-Fe}^{\text{IV}}$) vorliegt. In einem weiteren Schritt werden die Elektronen dann auf Cl^- übertragen, welches zu hypochloriger Säure (HOCl) oxidiert wird. II: Neben Chlorid können auch andere organische Stoffe (RH) als Elektronenakzeptoren fungieren. Hierbei wird zunächst ein Elektron übertragen worauf hin MPO in Form des Compound-II ($\text{MPO-Fe}^{\text{IV}}$) vorliegt. Anschließend wird ein weiteres Elektron abgegeben. Durch Wasserstoffabspaltung entstehen jeweils organische Radikale (R^{\cdot}). Diese können zum Beispiel mit NO^{\cdot} und NO_2^- reagieren unter der Bildung von NO_2^{\cdot} und NO_2^- . III: Ein weiterer möglicher Elektronenakzeptor sind Tyrosinreste (Tyr). Das hierbei entstandene Tyrosinradikal (Tyr^{\cdot}) Reagiert mit NO_2^- zu Nitrotyrosin (NO_2Tyr). mod. nach

Klinke, A.: Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten (2009)

1.5.2. Extrakatalytische Eigenschaften von MPO

Ein erster indirekter Hinweis auf extrakatalytische Eigenschaften von MPO ergab sich aus der Tatsache, dass sich die Assoziation von MPO zur Membran von PMN durch Antikörper gegen den Oberflächenrezeptor CD11b/CD18 verhindern ließ (60). Bis dahin war die Anreicherung von MPO entlang der Zellmembran der PMN durch vermehrten Transport des Enzyms an die Membran im Zuge der Sekretion interpretiert worden. Lau et al. gelang es schließlich zu zeigen, dass MPO von extrazellulär an CD11b/CD18 bindet und so wesentlichen Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden in den Leukozyten hat (74). Diese spiegelten sich zum Beispiel in einer Aktivierung von Tyrosinkinase, MAP-Kinasen und dem Transkriptionsfaktor NFκ-B wieder. Dieses führte zu Degranulation, Expression von Integrinen und Aktivierung von NADPH Oxidase. Diese Effekte waren weitestgehend unabhängig von durch MPO gebildeten ROS und RNS. MPO fungiert also als auto- und parakriner Mediator von Entzündungsreaktionen. Klinke et al. demonstrierten vor Kurzem die Fähigkeit von MPO zur Rekrutierung von PMN (65). Verantwortlich hierfür ist die stark positive Ladung des Enzyms und die daraus resultierende, elektrostatische Interaktion mit der anionischen Oberfläche der Leukozyten. Im selben Zuge konnte auch eine vermehrte Leukozytenrekrutierung durch MPO in vivo gezeigt werden. Abgesehen von seiner Rolle als Produzent von reaktiven Produkten verfügt MPO also offenbar auch über eine Reihe von extrakatalytischen Eigenschaften. Besondere Bedeutung kommt dem Enzym in der Pathophysiologie von kardiovaskulären, entzündlichen Erkrankungen zu (73). Auf diese soll im Folgenden näher eingegangen werden.

1.5.3. MPO und Atherosclerose

Schon sehr lange wird die Bedeutung von MPO für die Entwicklung und den Progress von atherosclerotischen Veränderungen untersucht. Hierbei fanden

sich deutliche Hinweise auf vermehrte MPO Aktivität in Patienten, die an koronarer Herzkrankheit (KHK) leiden. Ein wichtiger Schritt hierbei war der Nachweis von Oxidationsprodukten von MPO in atherosclerotischen Plaques. Diese fanden sich sowohl in intakten (8, 76, 123), als auch in rupturierten Plaques (115). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Patienten mit erhöhten MPO-Plasmaspiegeln ein größeres Risiko aufweisen, an einer KHK zu erkranken (131). Diese Ergebnisse werden weiterhin dadurch gestützt, dass Patienten, die an einem angeborenen totalen oder subtotalen MPO-Mangel litten, im Vergleich zu einer zufällig ausgewählten Kohorte aus der Normalbevölkerung mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit an KHK erkrankten (68). Zusätzlich erwiesen sich die MPO-Serumkonzentrationen als unabhängiger Marker für das Risiko von kardialen Komplikationen bei Patienten, die sich mit pektangiosen Beschwerden (135) oder einem akutem Koronarsyndrom (6), also einer bereits manifesten atherosclerotischen Erkrankung vorstellten. All diese Ergebnisse identifizieren MPO also als bedeutenden Biomarker für die Abschätzung sowohl der Entwicklung, als auch des komplikationsreichen Verlaufes einer KHK. Unklar bleibt aber, ob MPO selber für die atherosclerotischen Veränderungen verantwortlich ist, oder die Serumkonzentrationen und oxidative Aktivität einfach als Folge erhöhter Leukozytenaktivierung erhöht sind. Für die funktionelle Bedeutung von MPO sprechen die Ergebnisse der Untersuchung eines Polymorphismus im MPO-Gen, der zu einer geringeren Expressionsrate des Enzyms führt. Hier zeigte sich, dass eine so bedingte Verminderung der MPO-Aktivität in den betroffenen Patienten zu einer Risikoreduktion für die Entwicklung einer KHK führte (16, 96). Es scheint also, dass MPO eine bedeutende Rolle in der Atherogenese spielt, die unabhängig von anderen leukozytären Mechanismen zu sein scheint.

Welches sind nun also die Mechanismen, durch die MPO die Entwicklung und Ruptur atherosclerotischer Plaques beeinflusst?

Einer der wichtigsten und am besten erforschten Faktoren der Atherogenese ist die Hypercholesterinämie und die daraus resultierende Ansammlung von Lipiden in der Arterienwand (25). Hierbei kommt es zu oxidativer Veränderung von *Low Density Lipoprotein* (LDL), was zu einer gesteigerten Pathogenität

dieses Moleküls führt. Erhöhte Antikörpertiter gegen diese oxidierten LDL korrelieren mit einem erhöhten Risiko für KHK (80). Die Pathogenität der oxidierten LDL erklärt sich zum einen durch einen zytotoxischen Effekt derselben (51). Außerdem werden modifizierte LDL nicht mehr vom LDL-Rezeptor erkannt. Diese *high-uptake* Form der LDL erlaubt die noch stärkere Ansammlung von LDL in der Gefäßwand und die Bildung von Schaumzellen, einer charakteristischen Form von lipid-beladenen Makrophagen, die ihrerseits eine bedeutende Rolle in der Pathologie der Atherosclerose spielen. (59, 99) In vitro Versuche konnten die oxidative Modifikation der LDL nach Inkubation mit HOCl zeigen (59). Es kommt zur Oxidation der Lysin-Reste in Apolipoprotein B-100. Dieses Protein ist im Wesentlichen für die Funktion der LDL verantwortlich. Diese proatherogene Eigenschaft von MPO ist also auf seine Fähigkeit zur Bildung von HOCl zurück zu führen.

Aber auch andere Lipoproteine werden durch von MPO gebildete HOCl oxidativ verändert. So wird die Funktion von *High Density Lipoprotein* (HDL) gleichermaßen durch MPO gestört. Physiologischerweise haben HDL die Aufgabe, Cholesterin aus der Peripherie zur Leber zu transportieren, wo es dann abgebaut wird. Auch die Störung dieses Prozesses kann eine Ansammlung von Lipiden in der Gefäßwand nach sich ziehen. Atheromatöse Läsionen weisen einen erhöhten Gehalt an durch MPO oxidierten HDL auf (9, 132, 133). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Plasmaspiegel von oxidativ veränderten HDL in Patienten mit manifester KHK erhöht waren (97, 132). Ein Mechanismus, der die Pathogenität der oxidierten, dysfunktionalen HDL erklären kann, ist die Störung des *ATP-binding Casette Transporters A1* (ABCA-1) (9, 133). Dieser aktive Transporter interagiert mit Apolipoprotein A-1 und fördert daraufhin die Abgabe von Lipiden aus den Zellen (91). Ist dieser Mechanismus durch Modifikation der HDL gestört, kommt es konsekutiv zu Anreicherung von Lipiden in den Zellen.

Abgesehen von der Lipidstoffwechselstörung ist die endotheliale Dysfunktion eine der frühesten Veränderung der Atherogenese (25). Dem Endothel kommt eine Reihe komplexer Aufgaben zu, nachdem es die einzige Schicht der Gefäßwand ist, die in direktem Kontakt zum Blut steht. Als solche stellt es eine

Barriere sowohl für lösliche, als auch korpuskuläre Bestandteile des Blutes dar, deren Transport es kontrolliert. Weitere Funktionen des Endothels sind Angiogenese und die Modulation der Blutgerinnung. Von besonderer Bedeutung ist allerdings auch die Regulation des Gefäßtonus durch die Endothelzellen. Dies setzt eine einwandfreie Kommunikation zwischen den Endothelzellen der Intima und den glatten Muskelzellen der Lamina media voraus, welche durch Kontraktion den Gefäßtonus beeinflussen. Als Botenstoff fungiert hier neben Endothelin, Angiotensin und Prostacyclin auch das bioaktive Radikal Stickstoffmonoxid (NO) (44). NO wird in den Endothelzellen durch die intrazelluläre NO-Synthase aus Arginin gebildet und diffundiert daraufhin zu den glatten Muskelzellen, wo es seine tonusmindernde Wirkung durch Aktivierung der Guanylatzyklase entfaltet (55). Dabei hat es eine Halbwertszeit von nur etwa 5-20 Sekunden. Neben seinen vasodilatativen Eigenschaften wird NO auch noch eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen. Kommt es nun zu einem verminderten Angebot von NO, ist die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion die Folge (30, 45). Es konnte gezeigt werden, dass NO auch ein mögliches Substrat von MPO ist (1). Von besonderer Bedeutung für die Fähigkeit von MPO, das NO-Signalling empfindlich zu stören, ist aber vor allem anderen die anatomische Lokalisation des Enzyms in der Gefäßwand. Baldus et al. konnten zeigen, dass sich MPO nach apikal zu basaler Transzytose durch die Endothelzellen im subendothelialen Bereich anreichert (5). Hier bindet es sich an Proteine der extrazellulären Matrix und bleibt auch in Abwesenheit neutrophiler Granulozyten aktiv. Von den Endothelzellen gebildetes NO wird also auf dem Weg zu den glatten Muskelzellen der Media abgefangen und kann seine Wirkung nicht mehr entfalten. Neben dem Konsum von NO stört MPO weiterhin auch die Bildung von NO in den Endothelien. Hierfür ist erneut das Reaktionsprodukt von MPO, HOCl, verantwortlich. In vitro Studien konnten eine Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) durch HOCl nachweisen (134). Weiterhin wird die NO-Synthese durch oxidative Modifikation der Substrate der eNOS gestört. Dies konnte sowohl für L-Arginin, welches als Stickstoffdonor fungiert, als auch für das Kosubstrat NADPH gezeigt werden (26, 128). Diese Erkenntnisse zusammengenommen ist es wenig verwunderlich, dass MPO in einer Vielzahl von Studien als Auslöser endothelialer Dysfunktion

identifiziert wurde. Zum einen konnte in ex vivo Tierexperimenten die Hemmung der Relaxation von Aortensegmenten nach Stimulation mit Acetyl-Cholin gezeigt werden (22, 129). Außerdem stellte sich in einer klinischen Studie, bei der der Blutfluss der Brachialarterie gemessen wurde, der MPO Serumspiegel als unabhängiger Prediktor für endotheliale Dysfunktion heraus (123). Erkenntnisse, die unabhängig bestätigt und zuletzt noch um den Nachweis eines nachteiligen Effektes auf den epikardialen, mikrovaskulären und extramyokardialen Blutfluss im Großtiermodell erweitert werden konnten (104). Neben einem gestörten NO-Signalling konnten neue Studien auch eine vermehrte Expression des Endothelinrezeptors nach Inkubation mit MPO oder HOCl in kultivierten Endothelzellen und glatten Muskelzellen zeigen (75). Anschließend ex vivo Organbadexperimente zeigten auch hier eine erhöhte Gefäßkontraktilität. Die Bedeutung von MPO als kritischer Störfaktor der endothelvermittelten, vaskulären Funktion konnte also sowohl in vitro, als auch in vivo bestätigt werden. Neben der gestörten Vasomotorik sei an dieser Stelle noch einmal auf die inflammatorischen Veränderungen des Endothels durch MPO bedingten NO-Mangel hingewiesen, die im weiteren Verlauf näher besprochen werden.

Die meisten Komplikationen der Atherosclerose, wie zum Beispiel ein akutes Koronarsyndrom, sind Folge der Ruptur eines, durch verschiedene Veränderungen instabil gewordenen, atherosclerotischen Plaques und die darauf folgende intravasale Thrombusbildung (27). Diese rupturgefährdeten Plaques zeichnen sich besonders durch eine große Anzahl von Makrophagen aus. Sie sind reich an Matrixmetalloproteinasen und prothrombotischem Material (18), und besitzen einen nekrotischen, lipidreichen Kern, der von einer dünnen Schicht Endothelzellen bedeckt ist. Wird diese Schicht durch weiteres Absterben von Zellen zu schwach, kommt es zur Ruptur (28). Außerdem zeigte die Untersuchung von atherosclerotischen Plaques von Patienten, die an einem akuten Myokardinfarkt gestorben waren, eine vermehrte Invasion von neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu Patienten, die eine nicht kardial bedingte Todesursache aufwiesen (89). Dies und die bereits oben erwähnten Studien, die MPO Plasmaspiegel als Prädiktor für Kardiovaskuläre Komplikationen identifizieren (6, 135), legen nahe, dass MPO auch in diesem

Prozess eine Rolle zukommt. Zum einen lässt sich diese durch die von MPO verursachte Störung des NO-Signallings erklären. Neben den Effekten auf die Vasomotorik, übt NO physiologischerweise auch antiinflammatorische und antithrombotische Effekte aus. Diese werden zum Beispiel durch die Inhibition der Leukozytenadhäsion und Steuerung der Plättchenadhäsion und –aggregation vermittelt. Zusätzlich unterdrückt NO die Expression von *Plasminogen-activator-inhibitor-1* (PAI-1), einem prothrombotischen Protein (70). Aber auch andere inflammatorische Veränderungen durch MPO könnten zur Ruptur des Plaques beitragen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Exposition von Endothelzellen gegenüber HOCl in vitro zu Apoptose und Expression von Tissue-Faktor führte (114).

Auch die extrazelluläre Matrix des Thrombus unterliegt Veränderungen durch MPO. Durch Aktivierung von MMPs trägt MPO zur Destabilisierung des Plaques bei. Diese Enzymgruppe hat erheblichen Einfluss auf die Zusammensetzung der ECM. So wird zum Beispiel MMP-7 durch oxidative Veränderung durch HOCl über den sogenannten "*Cystein-Switch*" aktiviert (33). Diese Erkenntnisse verdeutlichen, dass MPO sowohl die zelluläre Zusammensetzung des atherosclerotischen Plaques, als auch seinen Phänotyp hinsichtlich ECM Produktion und inflammatorischer Konfiguration maßgeblich beeinflusst.

Schlussendlich erstreckt sich die Bedeutung von MPO bis zum postischämischen, ventrikulären Remodelling. Eine in vivo Studie mit MPO-Knockout Mäusen zeigte eine geringere Leukozyteninfiltration und verringerte Dilatation des linken Ventrikels, sowie eine bessere ventrikuläre Pumpfunktion und verzögerte Myokardruptur in den MPO-defizienten Mäusen (4). Als Ursachen hierfür werden eine verminderte Einwanderung von Leukozyten in das Infarktgebiet sowie eine Modulation des PAI-1 Signallings durch MPO diskutiert. Diese Ergebnisse konnten unabhängig bestätigt werden (121). Neueste Studien stellten nun einen Zusammenhang zwischen MPO und der Transdifferenzierung von Myocardialen Fibroblasten her (87). In einem Mausmodell fanden sich 7 Tage nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden signifikant weniger Myofibroblasten im Infarkt- und Periinfarktareal der MPO-Knockout Mäuse als im Wildtyp. In-vitro Studien führten diesen Effekt auf ein

verändertes MAP-Kinase Signalling zurück. Auch eine vermehrte Produktion von Collagen wurde für die Kardiomyocyten gezeigt.

1.5.4. MPO und Vorhofflimmern

Neuere Studien haben gezeigt, dass MPO eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des Vorhofflimmerns spielt (32). Rudolph et al. haben diese sowohl in Tierexperimenten, als auch in klinischen Studien untersucht (105). Zum einen wurde das Auftreten von Vorhofflimmern in Patienten beobachtet, die einen neuen Zwei-Kammer-Schrittmacher erhalten hatten, der eine kontinuierliche Überwachung des Vorhofrhythmus ermöglichte. Patienten, die ein Vorhofflimmern entwickelten, zeigten erhöhte MPO Plasmaspiegel. Diese Beobachtung ist konkordant mit den Ergebnissen der histologischen Untersuchung von Vorhofgewebe von Patienten, die sich einer koronaren Bypassoperation unterzogen. Hier zeigte sich ein höherer Gehalt an MPO und seinen Oxidationsprodukten in Patienten, die gleichzeitig an Vorhofflimmern litten. Um zu zeigen, dass MPO hier von funktioneller Bedeutung ist, führten Rudolph et al. Versuche mit MPO-knockout Mäusen durch. Diese waren im Vergleich zum Wildtyp vor der Entwicklung eines Vorhofflimmerns nach Provokation mit Angiotensin deutlich geschützt. Dieser Effekt lies sich durch intravenöse Applikation von MPO umkehren, was deutlich macht, dass MPO ein wichtiger unabhängiger Mediator arhythmogener Veränderungen ist.

Ein Bedeutender Mechanismus in der Pathologie des Vorhofflimmerns ist die Vorhoffibrose (57). Fibrotische Areale im Vorhofmyokard stören die elektrische Reizweiterleitung und entfalten so ihr arhythmogenes Potential (12, 90). Die oben genannte Studie von Rudolph et al. zeigte, dass MPO zu einer vermehrten Vorhoffibrose in Mäusen führte (105). Wichtige Ursachen für die atriale Fibrose sind zum Beispiel eine vermehrte Ausschüttung von TGF- β (122) und eine gestörte MMP Aktivierung (15). Aus in vitro Experimenten ist bekannt, dass MMP durch oxidative Veränderung durch MPO aktiviert werden können (33). Gleichzeitig zeigte sich, dass das HOCl durch Oxidierung verschiedener Aminosäurenreste im katalytischen Zentrum die proteolytische Aktivität von MMPs auch mindern kann (34). Die Versuche mit MPO-Konockoutmäusen

zeigten auch erstmals die vermehrte Aktivierung von MMP-2 und MMP-9 durch MPO in vivo (105). Die Aktivität der MMPs wird durch die sogenannten Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMs) regulatorisch inhibiert. Es ist bekannt, dass diese durch MPO inaktiviert werden können (124). Vor kurzem wurde gezeigt, dass MPO-generierte Oxidantien Einfluss auf die Aktivierung intrazellulärer MAP-Kinase-Kaskaden haben (71, 75). Eine Stimulation dieses Pathways führt zu einer vermehrten Freisetzung von MMPs (111, 112). Eine gestörte Aktivität der MMPs scheint also eine wesentliche Rolle in der MPO-vermittelten Vorhoffibrose zu spielen. Auch andere Inhibitoren von proteolytisch aktiven Enzymen, wie zum Beispiel α 1-Antitrypsin, werden durch oxidative Manipulation in ihrer Aktivität geschwächt (19). Schließlich spielt auch die Fähigkeit von MPO, Leukozyten zu rekrutieren und diese zu aktivieren (65, 74, 77), eine bedeutende Rolle für die Initiation und Perpetuierung der entzündlich bedingten Fibrose des Myokards.

Neben dem Umbau der ECM des Vorhofmyokards werden auch andere Mechanismen von MPO diskutiert, die zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Vorhofflimmern führen können. So zeigten Gewebeproben von Patienten mit Vorhofflimmern einen erhöhten Gehalt an oxidativ veränderter myofibrillärer Creatinkinase (MM-CK) (86). MPO mag also auch einen störenden Einfluss auf die Kontraktilität der Kardiomyocyten haben.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Reagenzien und Arzneistoffe

Bezeichnung	Hersteller
Alexa Fluor 488 Phalloidin	Invitrogen (Karlsruhe, D)

Bovines Serumalbumin (BSA)	Gibco, (Karlsruhe, D)
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako, (Glostrup, DK)
DAPI	Sigma, (Deisenhofen, D)
Formaldehyd	Tousimis (Rockville, MD, USA)
Humanes Serumalbumin	Sigma
Hypochlorige Säure	Roth, (Karlsruhe, D)
Milch	Gibco
Myeloperoxidase (MPO), human	Planta Natural Products (Wien, A)
PBS	Gibco
PhosphoSTOP	Roche, (Mannheim, D)
Ponceaurot	Sigma
Protease-Inhibitor Complete	Roche
Rekombinante Myeloperoxidase Q91T (Mut MPO)	generiert von Prof. Dr. Paul-Georg Furtmüller, Universität für Bodenkultur Wien, A
Super Signal west Femto Stable Peroxide Buffer, Super Signal West Femto Luminol Enhancer Solution	Pierce, (Rockford, IL, USA)
Thiazolyl Blau Tetrazolium Bromid	Sigma
Triton X-100	Sigma
Trizma	Sigma
Trypsin-EDTA	Sigma
Tween	Sigma
Wasserstoffperoxyd	Roth
Ziegenserum	Sigma

3.1.2. Antikörper

Primärantikörper	Spezifität	Spezies des Spendertiers	Hersteller
CD40	polyclonal	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Inc

Fibronectin (FBN11	monoclonal	Maus	Thermo Scientific
Fibronectin (FN3E2)	monoclonal	Maus	Abcam
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	monoclonal	Kaninchen	Cell Signalling
MPO	polyclonal	Kaninchen	Calbiochem
Phospho-p38 MAP-Kinase	polyclonal	Kaninchen	Cell Signaling
TGF- β (TGFB1)	polyclonal	Kaninchen	Lifespan Biosciences

Sekundärantikörper	Konjugat	Spezies des Spendertiers	Hersteller
Alexa Fluor 488, anti rabbit	Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen
Alexa Fluor 594, anti mouse	Alexa Fluor 594	Ziege	Invitrogen
IgG, anti Mouse	Meerrettich-Peroxidase	Pferd	VectorLabs
IgG, anti Rabbit	Meerrettich-Peroxidase	Ziege	VectorLabs

3.1.3. Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blottingpuffer	14,4 g Glycin, 3,03 g Tris-HCl in 800 ml Wasser, 200 ml Methanol
Homogenisierungs-Puffer	121mg Tris-HCl, 4,28g Saccharose, 57 mg EGTA, 292 mg EDTA ad 50 ml Aqua bidest., pH 7,5
Homogenisierungs-Lösung	1 Tablette Protease-Inhibitor, 1 Tablette PhosStop, 100 μ l SDS ad 10 ml Homogenisierungs-Puffer
SDS-Probenpuffer	10% Glycerol, 2,3% SDS, 0,05% Bromphenolblau in 60 mM Tris-HCl

3.1.4. Zellkulturmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Ratten aortale glatte Muskelzellen (RASMCs)	Lonza (Basel, CH)
Dubelcos Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Karlsruhe, D)
Fetales bovines Serum (FBS)	Gibco
HBSS	Gibco
PBS	Gibco
Kulturmedium	DMEM + 20% FBS + Penicillin/Streptomycin
Versuchsmedium	DMEM + 5% FBS + Penicillin/Streptomycin

3.1.5. Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
Pierce BCA-Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Scientific (Rockford, IL, USA) Pierce
Sircol Soluble Collagen Assay	Biocolor (Carrickfergus, Nordirland)

3.1.6. Geräte und Software

Bezeichnung	Firma
Fluoreszenzmikroskop, DMLB	Leica (Solms, D)
Fluorometer, Twinkle LB 970	Berthold (Bad Wildbad, D)
ImageJ (Vers 10.2)	Wayne Rasband (Open Source)
Prism GraphPad (Vers 6.1)	GraphpadSoftware, Inc

3.2. Kultivierung von rattenaortalen glatten Muskelzellen (RASMCs)

Jegliche Behandlung der glatten Muskelzellen erfolgte unter den sterilen Bedingungen einer Laminar-Flow Bank nach Angaben des Herstellers. Als primäres Kulturbehältnis wurden T75-Zellkulturflaschen verwendet. Diese wurden mit 15 ml des Kulturmediums beschickt und dann zur Equilibration des CO₂-Gehalts und der Temperatur für 30 min im Brutschrank belassen. Die RASMCs wurden direkt vom Hersteller Lonza in kryokonservierter Form erworben und bis zur Aussaat in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Aussaat wurde die Ampulle mit 0,5 ml der Zellsuspension in einer Konzentration von $\geq 1.000.000$ Zellen pro ml bei 37°C vorsichtig aufgetaut und die Suspension anschließend in die Kulturflasche überführt. Durch sanftes schwenken wurde eine gleichmäßige Verteilung gewährleistet. Anschließend wurde die Kulturflasche für 24 h im Brutschrank belassen, um eine sichere Adhärenz der Zellen vor dem ersten Mediumwechsel zu ermöglichen. Im Verlauf wurden die Zellen bei täglicher, lichtmikroskopischer Kontrolle der Konfluenz unter 2-tägigen Mediumwechsel kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von >90% wurden die Zellen in ein entsprechendes neues Kulturbehältnis (T75-Flasche, 6-Well Platte, Chamberslide) passagiert oder kryokonserviert. Vor der Passagierung wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin EDTA-Lösung überschichtet. Das Ablösen der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes wurde lichtmikroskopisch überwacht. Anschließend wurde die Trypsinierung durch Zugabe von warmem Kulturmedium gestoppt und die Suspension in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Nach 3 minütigem Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 1000 rpm wurde anschließend der Überstand verworfen und das Zellpellet in 8 ml Kulturmedium resuspendiert. Dann wurde die Suspension in der benötigten Verdünnung zwischen 1:3 und 1:8 auf die entsprechenden Kulturbehältnisse verteilt. Ein erster Mediumwechsel erfolgte wiederum nach 24 h.

Zur Kryokonservierung wurde das Zellpellet nach der Zentrifugation in 1 ml Gefriermedium suspendiert und in ein Kryotube überführt, welches zunächst für 24 h bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff konserviert wurde.

3.3. Bestimmung der p38 MAP-Kinase Aktivierung in glatten Muskelzellen

Grundsätzlich bestanden die durchgeführten Experimente aus einer Exposition der RASMCs gegenüber dem MPO-System beziehungsweise verschiedenen Kontrollen und anschließender Inkubation unter Kulturbedingungen für verschieden lange Zeiträume. Da die Rattenzellen mit humaner MPO behandelt wurden, wurden zur Kontrolle RASMCs mit der entsprechenden Konzentration eines anderen humanen Proteins, nämlich humanem Serumalbumin (HSA), behandelt, um immunologische Effekte auszuschließen.

Um zu untersuchen in welchem Maße die phosphorylierte, aktive Form der p38-MAP-Kinase in den Zellen vorlag, wurden RASMCs der Passage 2 bis 9 in 6-Well Platten bis zu einer Konfluenz von $\geq 90\%$ kultiviert. Da das im Kulturmedium in hohem Maße (20%) enthaltene FBS die Eigenschaft hat, freie Radikale und andere reaktive Moleküle zu neutralisieren (scavengern) und diese bei den untersuchten Mechanismen eine bedeutende Rolle spielen, wurden die Inkubationen nicht in normalem Kulturmedium durchgeführt, sondern in einem jeweils frisch angesetzten Versuchsmedium, welches nur 5% FBS enthielt. Zuvor durchgeführte Experimente zeigten keinen relevanten Einfluss dieser Reduktion der Wachstumsfaktoren auf die Stresskinasenaktivierung der RASMCs. Vor Beginn des Experimentes wurde das Versuchsmedium unter sterilen Bedingungen frisch angesetzt und für 30 min in einer T25-Flasche zur Equilibration im Brutschrank belassen, anschließend mit dem Versuchsmedium versetzt und wiederum für 30 Minuten im Inkubator belassen. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen wie folgt:

MPO 1 µg/ml + H₂O₂ 20 µM

MPO 20 µg/ml + H₂O₂ 80 µM

MPO 20 µg/ml

HOCl 20 μ M

H₂O₂ 80 μ M

HSA 20 μ g/ml

Es wurde strikt darauf geachtet, dass die Zugabe von H₂O₂ erst nach Versetzung der Zellen mit MPO erfolgte. Jegliche mechanische Irritation der Zellen wurde wenn möglich bei zügigem Arbeiten vermieden. Nach 15 minütiger Inkubation wurde der Überstand verworfen und die 6-Well Platten auf flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die am Boden der Wells fixierten Zellen wurden anschließend auf Eis gekühlt unter Zuhilfenahme eines Zellschabers in Homogenisierungslösung mit 0,1% SDS als Detergenz aufgelöst und in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Nach 10 Minuten unter wiederholtem Vortexen wurden die Gefäße bei 4°C und 12.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Das Pellet aus Membranbestandteilen wurde verworfen und der Überstand zum Teil im Verhältnis 1:3 mit Laemmli-Puffer (10% Glycerol, 2,3% SDS, 0,05%Bromphenolblau in 60 mM Tris-HCl) versetzt und für den anschließenden Westernblot bei -20°C gelagert oder direkt dem anschließenden BCA-Assay zugeführt.

Die Auftrennung der Proteine des Zellhomogenates erfolgte durch Gelelektrophorese. Zunächst wurden die Proben in Laemmli-Puffer für 5 min bei 95°C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Dann wurden sie auf ein 10%iges Polyacrylamid Gel aufgetragen. Hierbei wurde jede Tasche des Gels so beschickt, dass sie die selbe Proteingesamtkonzentration enthielt. Nach Auftrennung der Proteine wurden diese durch Blotting (Blottingpuffer: 14,4 g Glycin, 3,03 g Tris-HCl in 800 ml Wasser, 200 ml Methanol, 200 mA Stromstärke) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach einmaligem Waschen der Membran in TBST-Puffer, wurden die unspezifischen Bindungsstellen für 2 mal 30 min mit einer Lösung aus 5% bovinem Serumalbumin (BSA) in TBST-Puffer geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper gegen Phospho-p38 MAP-Kinase (polyklonal, 1:1000, Cell Signaling) in 5%-BSA-TBST-Puffer bei 4°C über Nacht. Nach mehrmaligem Waschen in TBST-Puffer erfolgte dann die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-gebundenen

Sekundärantikörper (1:10.000, Vectorlabs), wiederum in 5%-BSA-TBST für 60 min. Durch Zugabe eines Substrates (Super Signal West Femto Stable Peroxide Buffer, Super Signal West Femto Luminol Enhancer Solution, Pierce) reagierte die Peroxidase unter Lumineszenzentwicklung. Diese wurde auf einem Film aufgezeichnet und diente später zur Quantifizierung der Ergebnisse. Nach anschließendem Strippen der Membran und Blocken der unspezifischen Bindungsstellen wie oben beschrieben, wurde die Membran dann zur abschließenden Ladekontrolle mit einem Primärantikörper gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (monoklonal, 1:5000, Cell Signaling) inkubiert und nach dem oben genannten Schema weiter behandelt.

Die densitometrische Auswertung der Lumineszenzbanden erfolgte mittels ImageJ Software. Zur Verbesserung der Validität wurden alle Versuche in doppeltem Ansatz durchgeführt und ein Mittelwert errechnet. Die Daten werden als Foldchange im Verhältnis zur Kontrolle HSA mit dem Wert 100 % präsentiert.

3.4. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in Zellhomogenaten

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den Homogenaten wurde ein BCA Assay (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden 10 µl des Zelllysates in die Kavitäten einer 96-Well Mikrotiterplatte eingebracht. Desweiteren wurden als Standard Lösungen mit BSA in Konzentrationen von 0-2.000 µg/ml pipettiert. Alle Ansätze wurden doppelt gemessen. Alle Wells wurden mit dem frisch zubereiteten Reaktionsgemisch aus alkalischer, Tartrat-haltiger Bicinchoninsäure- und Kupfersulfat-Lösung versetzt und anschließend abgedeckt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Durch die ablaufende Biuret-Reaktion bildete sich nun ein bläulicher Chelatkomplex aus Bicinchoninsäure und Cu^+ . Anschließend wurde die Absorption der Ansätze bei 570 nm bestimmt und mit Hilfe des pipettierten Standards eine Eichkurve erstellt. Anhand der Kurvengleichung wurden nun die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet.

3.1. Darstellung von MPO in RASMCs

Um die Aufnahme und Verteilung von MPO in glatten Muskelzellen darzustellen, wurde diese mithilfe von Immunfluoreszenzhistochemie dargestellt. Hierzu wurden RASMCs der Passage 2-9 bis zu einer Konfluenz von $\geq 90\%$ auf einem 8-Well Chamberslide kultiviert. Das Versuchsmedium wurde wie oben beschrieben vorbereitet. Nach 30 minütiger Inkubation im Versuchsmedium wurden die Zellen anschließend mit dem MPO-System bestehend aus MPO (20 $\mu\text{g/ml}$) und H_2O_2 (80 μM) für 14 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und die Zellen auf den Slides für 15 min in 3,7% Formaldehyd fixiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Zellen dann zur Permeabilisierung für 20 min bei Raumtemperatur mit 0,1% Triton X 100 in PBS inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 1 stündige Inkubation mit 10% Ziegen Serum in 0,1% Triton X 100 in PBS geblockt. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen MPO (polyklonal, 1:250, Calbiochem) in 10% Ziegen Serum in 0,1% Triton X 100 in PBS für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Als Negativkontrolle wurde die Behandlung mit dem Erstantikörper in einem der Wells unterlassen. Anschließend wurden die Slides erneut mehrmals mit PBS gewaschen. Nun erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem Sekundärantikörper gegen Kaninchen IgG Alexa 488 (1:100) in 10% Ziegen Serum in 0,1% Triton X 100/PBS in Dunkelheit für 1 h, ebenfalls bei Raumtemperatur. Im Folgenden wurde bei allen Arbeitsschritten darauf geachtet, die Slides vor Licht zu schützen. Nach zweimaligen Waschen in PBS, wurden die Nuclei durch die 15 minütige Inkubation mit DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$) angefärbt. Nach abschließendem erneuten waschen in PBS wurden die Zellen dann in Dako Fluoreszenz-Medium eingebettet und abgedeckt. Die Lagerung erfolgte unter Lichtverschluss bei 4°C. Die Auswertung erfolgte mit einem Leica-Fluoreszenzmikroskop und der Software I-Vision.

3.2. Bestimmung der *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF- β) Produktion in RASMCs

Um die Bildung des Wachstumsfaktors TGF- β in den glatten Muskelzellen zu bestimmen, wurden RASMCs der Passage 2-9 in 6-Well Platten bis zu einer Konfluenz von $\geq 90\%$ kultiviert. Das Versuchsmedium wurde wie oben beschrieben vorbereitet. Die Zellen wurden für 30 min mit dem Versuchsmedium inkubiert und dann wie folgt behandelt:

MPO 1 $\mu\text{g/ml}$ + H₂O₂ 20 μM

MPO 10 $\mu\text{g/ml}$ + H₂O₂ 60 μM

MPO 20 $\mu\text{g/ml}$ + H₂O₂ 80 μM

MPO 20 $\mu\text{g/ml}$

rekombinante katalytisch inaktive MPO 20 $\mu\text{g/ml}$ + H₂O₂ 80 μM

HOCl 20 μM

H₂O₂ 80 μM

HSA 20 $\mu\text{g/ml}$

Wie oben erwähnt erfolgte die Wasserstoffperoxidapplikation erst nachdem die Zellen mit MPO behandelt wurden. Nach 14 h Inkubationszeit, wurde der Überstand verworfen und die Zellen auf Eis gekühlt mithilfe eines Zellschabers in Homogenisierungslösung aufgelöst. Nach mehrmaligem Vortexen wurde das Lysat für 15 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert, das Pellet verworfen und der Überstand wie oben beschrieben für Westernblot und BCA-Assay aufbereitet. Die Gelelektrophorese und Westernblot erfolgten nach dem selben Protokoll, wie oben beschrieben. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer Lösung aus 5%-Milch in TBST geblockt. Als Primärantikörper diente ein Antikörper gegen TGF- β 1 (polyklonal, 1:1.000, LifeSpan BioSciences), der wiederum, wie auch der Meerrettichperoxidaskonjugierte Sekundärantikörper (1:10.000, Vectorlabs), in 5%-Milch in TBST gelöst appliziert wurde. Die Ladekontrolle erfolgte wie oben geschrieben durch Detektion von GAPDH, die Auswertung mittels

ImageJ. Zur Verbesserung der Validität wurden alle Versuche in doppeltem Ansatz durchgeführt und ein Mittelwert errechnet.

3.3. Darstellung von TGF- β 1 in RASMCs mittels Immunfluoreszenzhistologie

Die Darstellung von TGF- β erfolgte in Zellen der Passage 2-9, die zuvor auf einem 8-Well Chamberslide bis zu einer Konfluenz von $\geq 90\%$ kultiviert wurden. Es erfolgte die Exposition gegenüber HSA und dem MPO-Reaktionssystem wie oben beschrieben. Nach 14-stündiger Inkubation wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 3,7% Formaldehyd fixiert und für die Immunhistochemie wie oben genannt behandelt. Als Primärantikörper diente ein Antikörper gegen TGF β 1 (polyklonal, 1:50, LifeSpan BioSciences). Als Sekundärantikörper diente Alexa 488 anti Kaninchen IgG (1:100). Die Aufnahmen wurden wiederum mit dem Leica Fluoreszenzmikroskop angefertigt.

3.4. Bestimmung der CD40 Expression in RASMCs

Die Expression von CD40 wurde analog zu dem oben beschriebenen Protokoll durch Gelelektrophorese und Westernblotting untersucht. Die Membranen wurden mit 5%-Milch in TBST geblockt. Als Primärantikörper diente ein anti-CD-40 (polyklonal, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Inc) Antikörper, als Sekundärantikörper kam erneut der Meerrettichperoxidase-konjugierte anti-rabbit IgG (1:10.000, Vectorlabs) zum Einsatz.

3.5. Darstellung von CD-40 in RASMCs

Die Darstellung von CD-40 auf RASMCs mittels Immunfluoreszenz erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll. Als Primärantikörper diente anti-CD-40 (polyklonal, 1:50, SantaCruzBiotechnology, Inc), als Sekundärantikörper erneut Alexa 488 anti Kaninchen IgG (1:100, Invitrogen).

3.6. Wiederholte Gabe von hypochloriger Säure (HOCl)

Um den Effekt einer wiederholten Applikation von HOCl auf die Zellen zu untersuchen wurden RASMCs der Passage 2-9 bei 90% Konfluenz für 14 h in 6-Well Platten in Versuchsmedium inkubiert. Nun erfolgte Applikation von 20 μ M HOCl je nach Ansatz alle 6, 4 oder 3 Stunden. Anschließend erfolgte die Ernte, Aufbereitung und Bestimmung der TGF- β Expression wie oben genannt.

3.7. Analyse der Zellproliferation mittels MTT Assay

Für die Proliferationsanalyse wurden RASMCs der Passagen 4-6 in einer 6-Well Platte bis zu einer Konfluenz von ca 60% kultiviert. Die Zellen wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend für 24 h in wachstumsfaktorfreiem Medium inkubiert um die Zellzyklen zu synchronisieren. Das Versuchsmedium wurde wie oben beschrieben vorbereitet und die Zellen anschließend in dem Versuchsmedium wie folgt behandelt:

HSA 20 μ g/ml

MPO 1 μ g/ml + H₂O₂ 20 μ M

MPO 10 μ g/ml + H₂O₂ 60 μ M

MPO 20 μ g/ml + H₂O₂ 80 μ M

Nach der Exposition wurden die Zellen erneut für 24 h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen für weitere 4 h in einem Medium mit 12 mM MTT-Lösung (5 mg Thiazolyl Blau Tetrazolium Bromid (Sigma) in 1 ml PBS) inkubiert. In den vitalen Zellen wurde nun in einer NADH abhängigen Reaktion das Produkt MTT Formazan produziert, welches auf Grund seiner dunkelblauen Farbe später für photometrische Messung genutzt wurde. Nach Ablauf der Zeit wurde der Überstand erneut verworfen und die Zellen in 10% SDS in 10 mM HCl durch wiederholtes Pipettieren lysiert. Die Behandlung mit Salzsäure bewirkte einen Farbumschlag des Phenolrot des Mediums, was eine störungsfreie Photometrie ermöglichte. Die Lysate wurden in die Kavitäten einer

96-Well Mikrotiterplatte überführt und aus denen im Folgenden die Lichtabsorption bei 570 nm gemessen wurde.

3.8. Bestimmung von Fibronectin mittels Immunoblotting

Die Bestimmung der Fibronectinproduktion in den RASMCs wurde analog zum oben beschriebenen Protokoll für TGF- β durchgeführt. Zellen wurden für 14 h entweder mit HSA (20 μ g/ml) oder dem MPO-Reaktionssystem MPO (20 μ g/ml) + H₂O₂ (80 μ M) inkubiert. Nach Blocken der Nitrocellulosemembran mit 5% BSA in TBST, wurde als Primärantikörper ein Antikörper gegen Fibronectin (FN3E2) (monoklonal, 1:100, Abcam) verwendet. Als Sekundärantikörper diente anti-mouse IgG (1:10.000, Vectorlabs).

3.9. Darstellung von Fibronectin mittels Immunfluoreszenzhistologie

Für die Darstellung der Bestandteile der extrazellulären Matrix erfolgte die Kultivierung der RASMCs auf 8-Well Chamberslides. 24 h nach Passage wurde die Exposition wie gehabt in Versuchsmedium gegenüber folgenden Agenzien durchgeführt:

HSA 20 μ g/ml

MPO 20 μ g/ml + H₂O₂ 80 μ M

Nach Exposition erfolgte eine weitere Kultivierung für 62 h in Versuchsmedium. Nach 48 h wurde das Versuchsmedium gewechselt. Nach Inkubation wurden die Überstände für weitere Analysen auf -80°C konserviert und die Zellen wie oben beschrieben für Immunhistochemie aufbereitet. Zusätzlich wurde eine Färbung mithilfe von Alexa Fluor 488 Phalloidin in 10% Ziegenserum in 0,1% Triton X 100 in PBS durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein Antikörper gegen Fibronectin-1 (monoklonal, 1:50, Thermo Scientific), als Sekundärantikörper Alexa Fluor 594 anti-Kaninchen IgG bzw Alexa Fluor 594 anti-Maus IgG verwendet.

3.10. Colorimetrische Bestimmung von Collagen

Um eine mögliche Fibroseneigung der Zellen zu untersuchen, sollte die Collagenproduktion der Zellen nach MPO-Exposition bestimmt werden. Da VSMCs in Kultur kontinuierlich Collagen produzieren, war es wichtig, diesen Effekt von dem durch MPO verursachten zu trennen. Deshalb wurde zur Überprüfung der Collagenproduktion ein Assay gewählt, der die Menge an löslichem Collagen im Überstand bestimmen konnte. Da der Überstand vor der Inkubation mit MPO verworfen wurde, wurde so nur die ECM-Produktion nach MPO-Applikation erfasst.

Um die Produktion von Collagen durch die RASMCs zu untersuchen, wurde die Collagenkonzentration mithilfe des Sircol Collagen Assays (biocolor) nach Angaben des Herstellers colorimetrisch bestimmt. Hierbei wurden vor allem die Collagene des Typs I und V erfasst. Als Proben dienten Überstände von Zellkulturen, die für 14 h mit dem MPO-Reaktionssystem (MPO 20 µg/ml + H₂O₂ 80 µM oder MPO 10 µg/ml + H₂O₂ 60 µM) oder HSA (20 µg/ml) inkubiert worden waren. Vor Beginn des Assays wurde das Collagen in den Proben konzentriert und isoliert. Hierzu wurden 1 ml der Proben in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit Isolations- und Konzentrationspuffer (biocolor) versetzt und über Nacht auf Eis gekühlt inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet aus hydratisiertem Collagen dem Assay zugeführt. Die Proben wurden mit 1 ml der Sirius-Rot-haltigen Färbelösung versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur unter leichter Durchmischung inkubiert. Anschließend erfolgte erneut eine 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 rpm und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig mit 750 µl eisgekühlter Waschlösung überschichtet und wiederum für 10 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen der überständigen Waschlösung, wurde das Pellet durch wiederholtes Vortexen in einer natriumhydroxidhaltigen Lösung aufgelöst. Je 200 µl dieser Lösung wurden dann in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte überführt und es erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei 555 nm Wellenlänge. Mit Hilfe der vom Hersteller

bereitgestellten Standardlösungen mit bekannter Collagenkonzentration wurde anschließend einer Standardkurve errechnet, anhand derer die Collagenkonzentration in den Proben ermittelt wurde. Da die Inkubation der Zellen mit MPO einen proliferationshemmenden Effekt hatte und für diese Proben keine Gesamtproteinbestimmung durchgeführt werden konnten, wurde die für die MPO-behandelten Proben ermittelte Collagenkonzentration mit einem Faktor multipliziert. Dieser war aus allen durchgeführten Proteinbestimmungen errechnet worden und betrug 1,16613127 (SD=0,16606576).

3.11. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der Software Prism GraphPad (Vers 6.0, GraphpadSoftware, Inc). Die Daten werden präsentiert als Mittelwert \pm SD. Bei normal verteilten Daten erfolgte der Vergleich mittels Studentischem T-Test bzw. Anova-Analyse. Stellten sich Daten nach Durchführung des Kolmogorov-Smirnov-Tests als nicht normal verteilt heraus, wurde als nicht parametrischer Test der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Als Signifikanzgrenze wurde ein p-Wert von $<0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. MPO wird in glatte Gefäßmuskelzellen aufgenommen

Um zu zeigen, dass MPO nicht nur im Überstand aktiv ist, sondern auch in die Zellen der Kultur hinein gelangt, wurde MPO mittels Immunfluoreszenzhistochemie in den rattenaortalen, glatten Muskelzellen (RASMCs) dargestellt (Abb. 5). Die Zellen waren 14 h zuvor mit dem MPO-System inkubiert und anschließend wie oben beschrieben für die Histologie aufbereitet worden. Es zeigte sich ein deutliches Signal für MPO. Das angewandte Verfahren lässt zwar keine sichere Differenzierung zwischen intra- und extrazellulärem Signal zu, das Verteilungsmuster lässt sich allerdings gut mit den Verläufen der zytoplasmatischen und der nucleären Membran korrelieren. Es kann also davon ausgegangen werden, dass MPO sich vor allem diesen Strukturen anlagert.

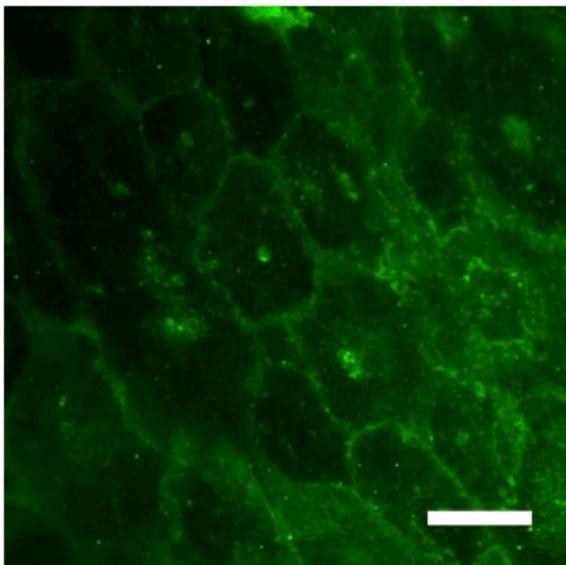


Abbildung 5: Immunzytochemische Darstellung von humaner MPO (grün) in rattenaortalen glatten Muskelzellen. Die Zellen wurden für 14 h mit dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem bestehend aus 20 µg/ml MPO + H₂O₂ 80 µM in Versuchsmedium inkubiert. Scale bar, 100 nm.

4.2. Einfluss von MPO auf die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen

Die Proliferation der RASMCs wurde mithilfe eines MTT-Assays photometrisch bestimmt. Die Absorption der Proben bei 570 nm ist hier proportional zu der Anzahl der vitalen Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit dem MPO-Reaktionssystem (Abb. 2). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige, proliferationshemmende Wirkung von MPO bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml MPO + 20 µM H₂O₂ (p < 0,002). Bei steigenden MPO Konzentrationen nahm der Effekt zu (Abb. 6).

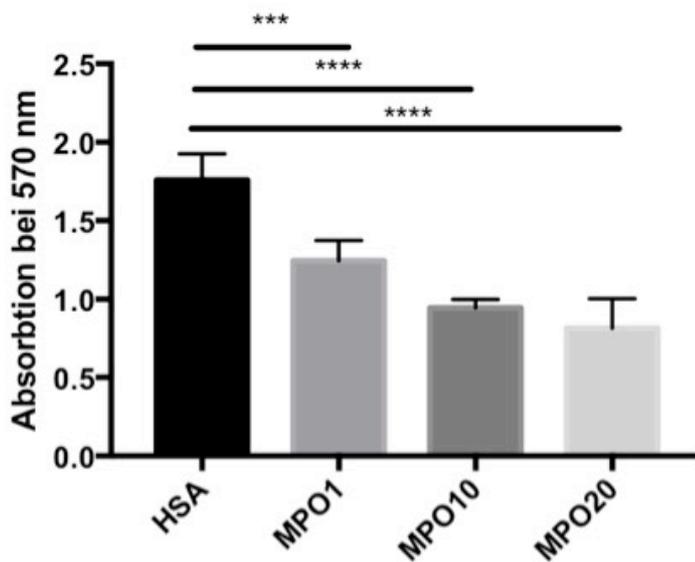


Abbildung 6: Bestimmung der Stoffwechselaktivität rattenortaler glatter Muskelzellen mittels MTT-Assay. Die Zellen wurden für 24 Stunden mit humanem Serumalbumin (HSA, n=6) und dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem in den Konzentrationen 1 µg/ml MPO + H₂O₂ 20 µM (MPO1, n=4), 10 µg/ml MPO + H₂O₂ 60 µM (MPO10, n=4) und 20 µg/ml MPO + H₂O₂ 80 µM (MPO20, n=6) in Versuchsmedium inkubiert. Darstellung der Mittelwerte ±SD. *** = p < 0,002, **** = p < 0,001

Außerdem wurde die Gesamtproteinkonzentration in Zelllysaten von RASMCs mittels BCA-Assays untersucht (Abb. 7). Auch hier zeigte sich eine Reduktion des Proteingehalts in den MPO-behandelten Zellen nach 14 stündiger Inkubation ($p < 0,001$).

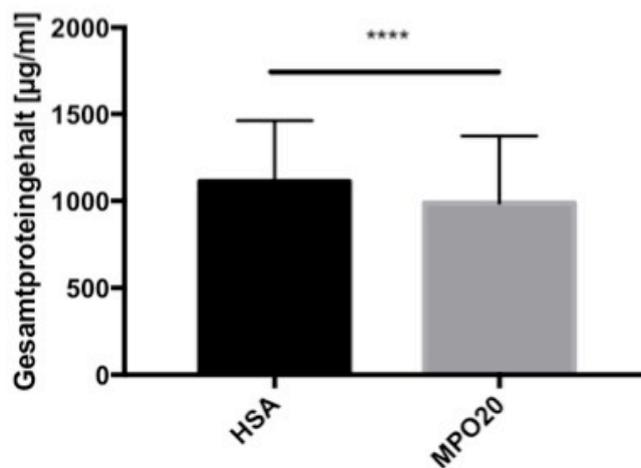


Abbildung 7: Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in Zelllysaten rattenaortaler glatter Muskelzellen mittels BCA-Assay. Die Zellen wurden für 14 h mit humanem Serumalbumin (HSA) oder dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem bestehend aus 20 µg/ml MPO + H₂O₂ 80 µM (MPO20) in Versuchsmedium inkubiert. Darstellung der Mittelwerte ±SD. n=40. **** = $p < 0,001$

4.3. TGF-β Produktion in RASMCs

Durch Immunoblotting wurde der TGF-β-Gehalt in den RASMCs nach 14 stündiger Inkubation mit HSA oder dem MPO-Reaktionssystem untersucht (Abb. 8). Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung des TGF-β 1 Proteingehalts in den MPO-behandelten Zellen bis auf etwa das Doppelte im

Vergleich zur Negativkontrolle mit HSA bei Exposition gegenüber MPO der Konzentration 20 µg/ml ($p < 0,05$).

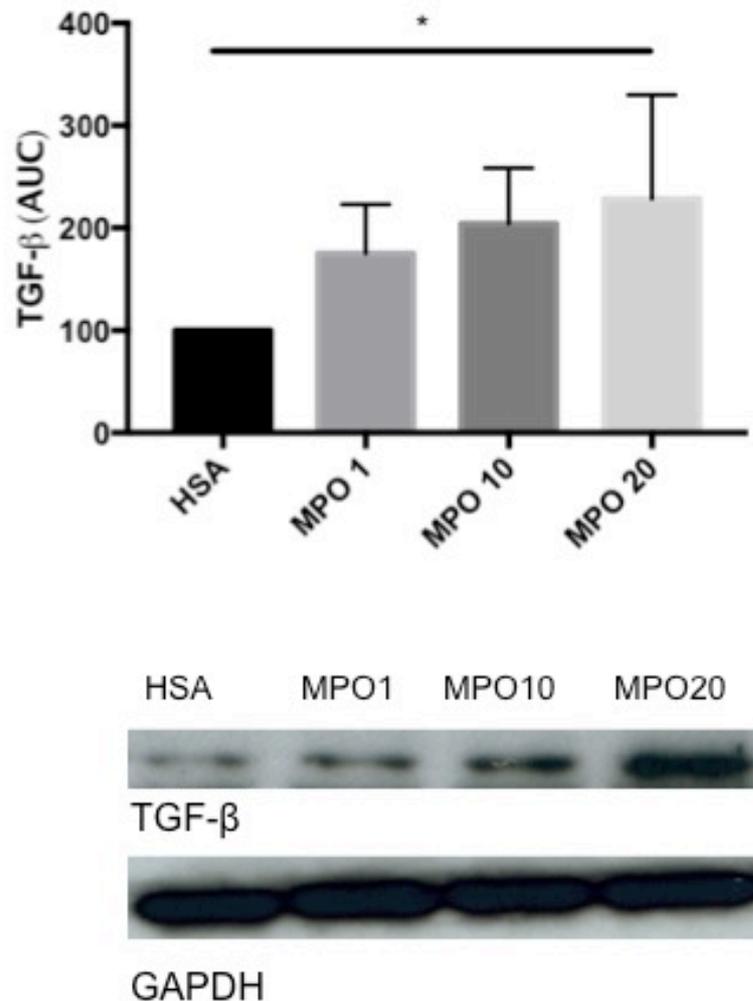


Abbildung 8: Bestimmung von TGF-β 1 in rattenaortalen glatten Muskelzellen mittels Westernblotting. Die Zellen wurden für 14 h mit humanem Serumalbumin (HSA) und dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem in den Konzentrationen 1 µg/ml MPO + H₂O₂ 20 µM (MPO1, n=6), 10 µg/ml MPO + H₂O₂ 60 µM (MPO10, n=7) 20 µg/ml MPO + H₂O₂ 80 µM (MPO20, n=11) in Versuchsmedium inkubiert. Darstellung der Fläche unter der Kurve (AUC) in Relation zur Kontrolle (HSA), Mittelwert ±SD. * = $p < 0,05$

Zusätzlich wurde TGF- β in den Zellen mit Hilfe von Immunofluoreszenzhistologien dargestellt (Abb. 9). Auch hier zeigt sich eine Verstärkung des Signals in MPO-behandelten Zellen.

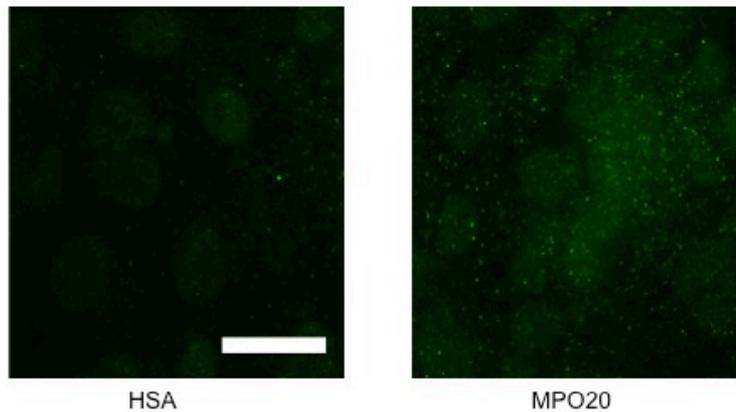


Abbildung 9: Repräsentative, immunzytochemische Darstellung von TGF- β 1 (grün) in kultivierten rattenaortalen glatten Muskelzellen. Die Zellen wurden für 14 h mit humanem Serumalbumin (HSA) und dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem in der Konzentration 20 $\mu\text{g/ml}$ MPO + H_2O_2 80 μM (MPO20) in Versuchsmedium inkubiert. Scale bar, 100 nm.

Um den Mechanismus der MPO-Wirkung besser zu untersuchen, wurden außerdem Ansätze analysiert, die mit MPO ohne Zugabe des Substrates H_2O_2 , sowie nur mit dem Substrat H_2O_2 oder nur mit dem Produkt des Enzyms HOCl inkubiert wurden (Abb. 10). Weder die einmalige Applikation der ROS H_2O_2 und HOCl, noch die Behandlung der Zellen mit MPO ohne Bereitstellung des passenden Substrates H_2O_2 zeigte eine signifikante Erhöhung der TGF- β -Spiegel in den Zellen. Die TGF- β -Level in den parallel durchgeführten Ansätzen mit dem kompletten MPO-Reaktionssystem waren gegenüber allen Kontrollen signifikant erhöht (jeweils $p < 0,01$). Dies lässt vermuten, dass die katalytische Aktivität des Enzyms für den Effekt verantwortlich ist.

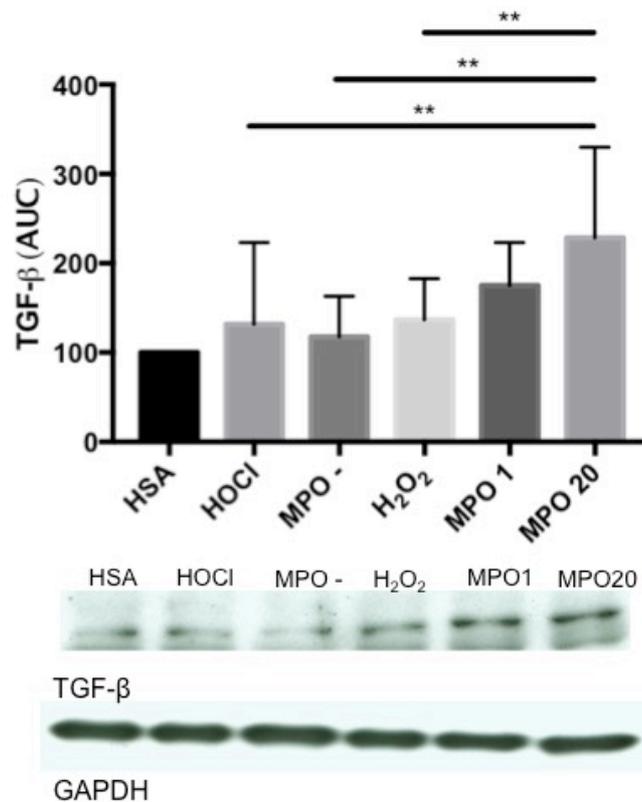


Abbildung 10: Bestimmung von TGF- β 1 in rattenaortalen glatten Muskelzellen mittels Westernblotting. Die Zellen wurden für 14 h mit humanem Serumalbumin (HSA) und dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem in den Konzentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$ MPO + H₂O₂ 20 μM (MPO1, n=6) und 20 $\mu\text{g/ml}$ MPO + H₂O₂ 80 μM (MPO20, n=11) in Versuchsmedium inkubiert. Zur Kontrolle erfolgte die Inkubation mit hypochloriger Säure (20 μM , HOCl, n=7), MPO ohne H₂O₂ (MPO -, n=6), sowie mit H₂O₂ (80 μM , n=9). Darstellung der Fläche unter der Kurve (AUC) in Relation zur Kontrolle (HSA), Mittelwert \pm SD. ** = p < 0,01

Um diese These weiter zu überprüfen, wurde MPO im Reaktionssystem durch eine mutante, durch Austausch der Häm-assoziierten Aminosäure Methionin durch Threonin katalytisch inaktive Form ersetzt (MPO Q91T). RASMCs die mit diesem Ansatz nach dem selben Protokoll inkubiert wurden, zeigten ebenfalls keine erhöhten TGF- β -Spiegel (Abb. 11).

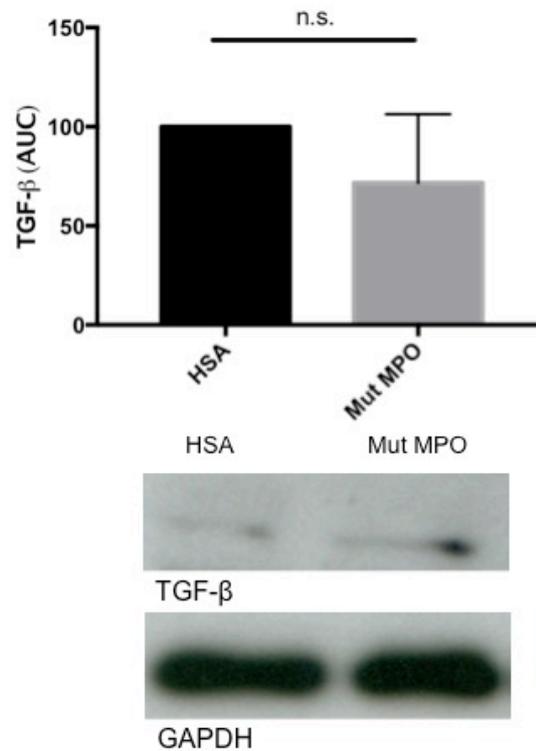


Abbildung 11: Bestimmung von TGF- β 1 in rattenaortalen glatten Muskelzellen mittels Westernblotting. Die Zellen wurden für 14 h mit humanem Serumalbumin (HSA) und einer katalytisch inaktiven, mutanten Form (Q91T) von MPO + 80 μ M H₂O₂ (Mut MPO, n=5) in Versuchsmedium inkubiert. Darstellung der Fläche unter der Kurve (AUC) in Relation zur Kontrolle (HSA), Mittelwert \pm SD. n.s. = nicht signifikant.

Um den Effekt der hypochlorigen Säure (HOCl) als Produkt der katalytischen Aktivität von MPO direkt nachzuweisen, wurden RASMCs über 14 h wiederholt mit HOCl behandelt und anschließend die TGF- β Expression in den Zellen mittels Westernblot bestimmt (Abb. 12). Hierbei zeigte sich eine Erhöhung der TGF- β Spiegel, die abhängig von der Anzahl der HOCl-Gaben war. Die Daten legen nahe, dass eine kontinuierliche Produktion von HOCl in den Zellen für die TGF- β -Produktion ursächlich ist.

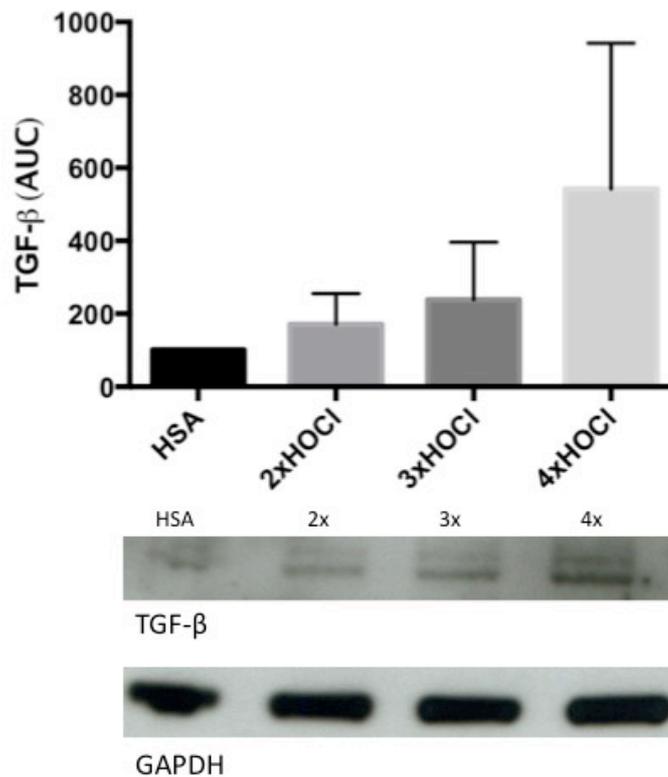


Abbildung 12: Bestimmung von TGF- β 1 in rattenaortalen glatten Muskelzellen mittels Westernblotting. Die Zellen wurden für 14 h mit humanem Serumalbumin (HSA) als Kontrolle in Versuchsmedium inkubiert. Bei den restlichen Zellen erfolgte die Applikation von hypochloriger Säure (20 μ M) zu Beginn der Inkubation und dann wiederholt nach je 6 (2xHOCl), 4 (3xHOCl) und 3 Stunden (4xHOCl). $n=4$. Darstellung der Fläche unter der Kurve in Relation zur Kontrolle (HSA), Mittelwert \pm SD.

4.4. p38 MAP-Kinasen Aktivierung in RASMCs

Die Aktivierung von sogenannten Stresskinasen durch MPO stellte einen möglichen Pfad für die Erhöhung der TGF- β Produktion in den RASMCs dar. Eine solche Kinase ist die p38 MAP-Kinase. RASMCs wurden für 15 min mit dem MPO-Reaktionssystem, sowie HOCl als Positivkontrolle inkubiert.

Anschließend wurde mittels Immunoblotting die Menge an in aktivierter, phosphorylierter Form vorliegender p38 MAP-Kinase ermittelt (Abb. 13). Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung des P-p38-MAP-Kinase Signals in den MPO behandelten Zellen ($p < 0,05$ für MPO 1 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,01$ für MPO 20 $\mu\text{g/ml}$). Auch die einmalige Exposition gegenüber HOCl resultierte in einer vermehrten Aktivierung der MAP-Kinasen ($p < 0,05$).

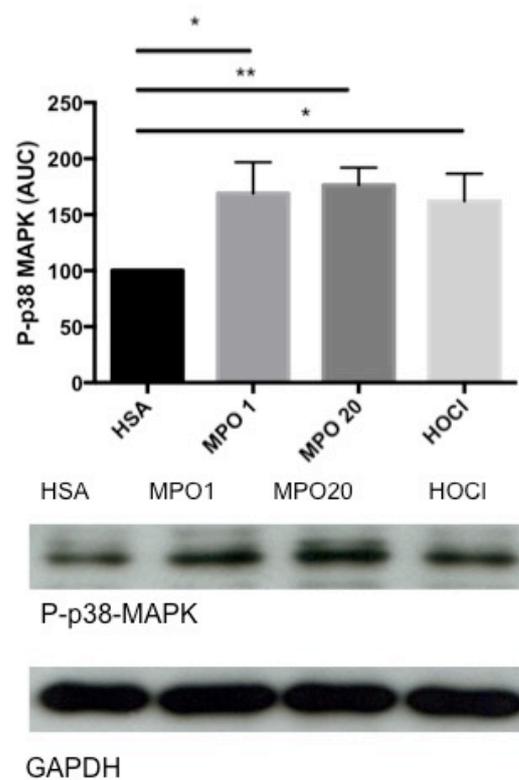


Abbildung 13: Bestimmung von phosphorylierter p38 MAP Kinase in rattenaortalen glatten Muskelzellen mittels Westernblotting. Die Zellen wurden für 15 min mit humanem Serumalbumin (HSA, $n=6$), dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem in den Konzentrationen 1 $\mu\text{g/ml}$ MPO + H_2O_2 20 μM (MPO1, $n=4$) und 20 $\mu\text{g/ml}$ MPO + H_2O_2 80 μM (MPO20, $n=6$) und hypochloriger Säure der Konzentration 20 μM (HOCl, $n=5$) in Versuchsmedium inkubiert. Darstellung der Fläche unter der Kurve (AUC) in Relation zur Kontrolle (HSA), Mittelwert \pm SD. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

4.5. Expression von CD40 auf RASMCs

Es wurde weiterhin die Expression des Oberflächenmarkers CD40 auf den RASMCs untersucht. Auch hier wurden Zellen für 14 h mit HSA (20 µg/ml) und dem MPO Reaktionssystem (MPO 20 µg/ml + H₂O₂ 80 µM) inkubiert. Aus den wie oben beschrieben angefertigten Zelllysaten wurden anschließend Westernblots angefertigt. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der CD40 Expression um 38% ($p < 0,05$) in den MPO behandelten Zellen (Abb. 14).

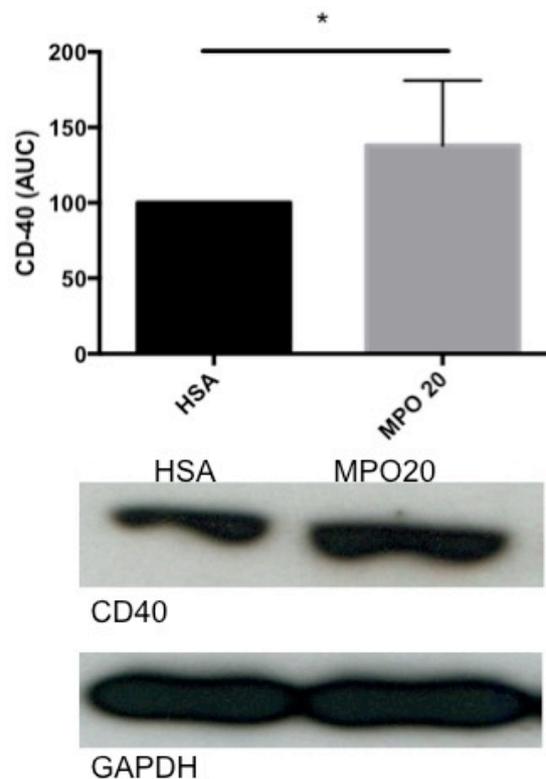


Abbildung 14: Bestimmung von CD40 in rattenaortalen glatten Muskelzellen mittels Westernblotting. Die Zellen wurden für 14 h mit humanem Serumalbumin (HSA) und dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem in der Konzentration 20 µg/ml MPO + H₂O₂ 80 µM (MPO20) in Versuchsmedium inkubiert. n=8. Darstellung der Fläche unter der Kurve (AUC) in Relation zur Kontrolle (HSA), Mittelwert ±SD. * = $p < 0,05$

Zusätzlich wurde die CD40 Expression auf der Zelloberfläche mithilfe von Immunfluoreszenz dargestellt. In Konkordanz zu den Ergebnissen aus dem Westernblot zeigte sich hier ein verstärktes Signal für CD40 bei den Zellen, die mit MPO behandelt wurden (Abb.15).

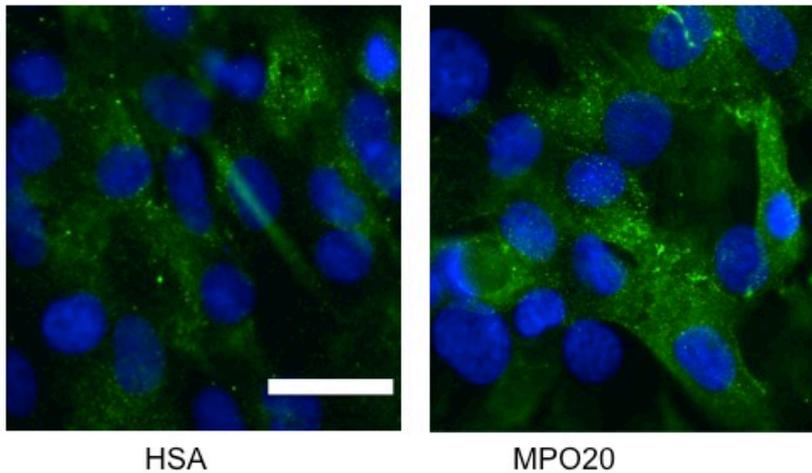


Abbildung 15: Representative, immunzytochemische Darstellung von CD40 (grün) auf kultivierten rattenaortalen glatten Muskelzellen. Die Zellen wurden für 14 h mit humanem Serumalbumin (HSA) und dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem in der Konzentration 20 µg/ml MPO + H₂O₂ 80 µM (MPO20) in Versuchsmedium inkubiert. Darstellung der Zellkerne durch DAPI (blau). Scale bar, 100 nm.

4.6. Fibronectinsynthese in RASMCs

Um neben dem Nachweis fibroseassoziiierter Wachstumsfaktoren auch eine vermehrte Produktion von ECM direkt nachzuweisen, wurde die Fibronectinproduktion in den Zellen durch Immunoblotting bestimmt (Abb. 16). RASMCs wurden für 14 h entweder mit HSA oder dem MPO-Reaktionssystem

inkubiert. Bei letzteren zeigte sich ein bis auf das Dreifache erhöhter Fibronectingehalt ($p < 0,01$).

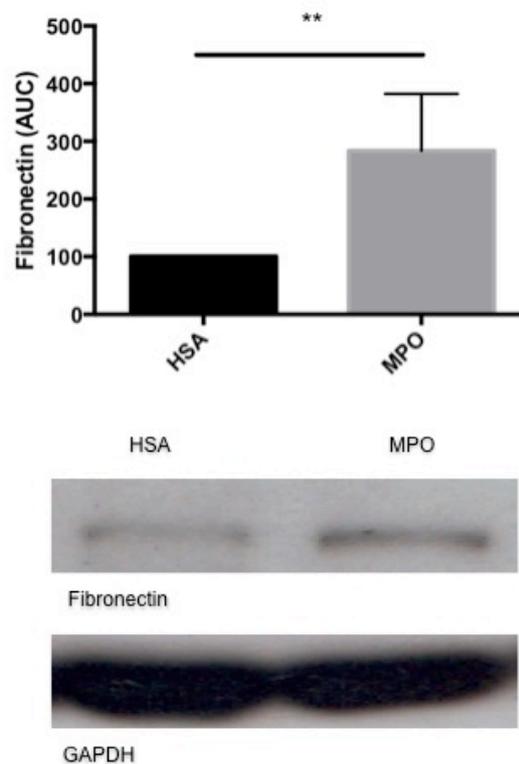


Abbildung 16: Bestimmung von Fibronectin in rattenaortalen glatten Muskelzellen mittels Westernblotting. Die Zellen wurden für 14 h mit humanem Serumalbumin (HSA) und dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem in der Konzentration 20 $\mu\text{g/ml}$ MPO + H_2O_2 80 μM (MPO) in Versuchsmedium inkubiert. $n=5$. Darstellung der Fläche unter der Kurve (AUC) in Relation zur Kontrolle (HSA), Mittelwert \pm SD. ** = $p < 0,01$

Desweiteren wurde Fibronectin mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Hierzu wurden Zellen verwendet, die 62 h zuvor entweder mit HSA oder dem MPO-System inkubiert worden waren (Abb 17). Auch hier konnte eine vermehrte Expression von Fibronectin in den MPO-behandelten Zellen gezeigt werden.

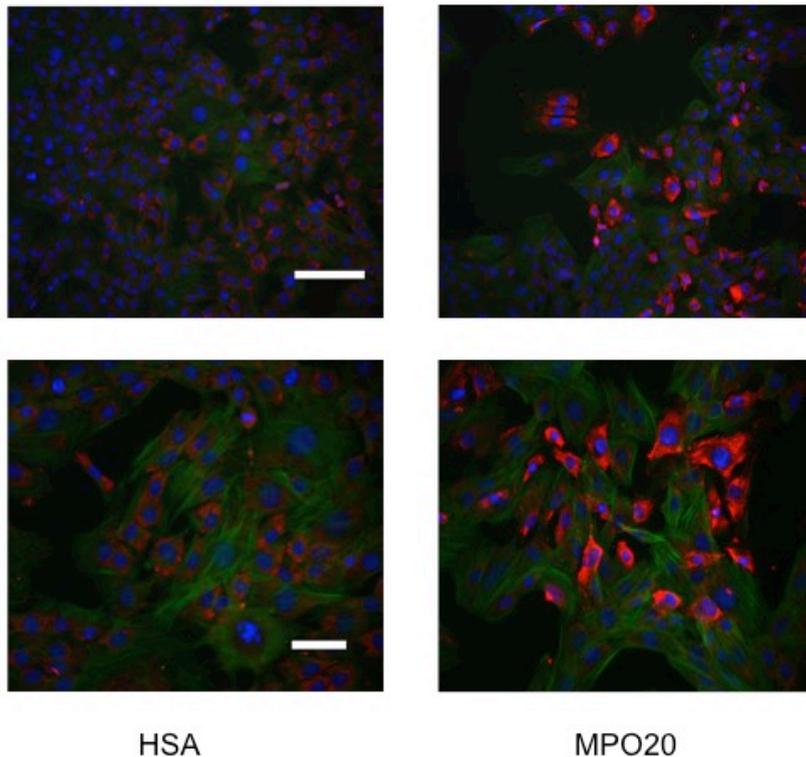
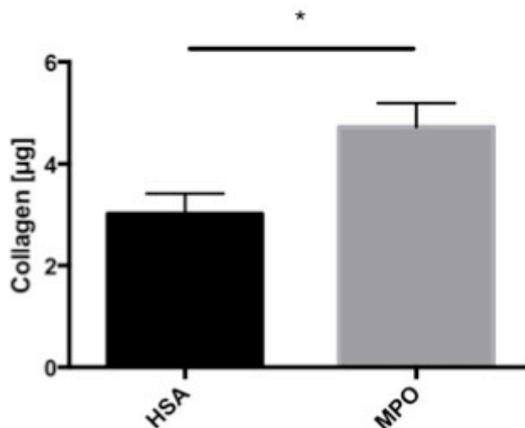


Abbildung 17: Representative, immunzytochemische Darstellung von Fibronectin (rot) auf kultivierten rattenaortalen glatten Muskelzellen. Die Zellen wurden 62 h nach Behandlung mit humanem Serumalbumin (HSA) und dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem in der Konzentration 20 $\mu\text{g/ml}$ MPO + H_2O_2 80 μM (MPO) fixiert. Darstellung der Zellkerne durch DAPI (blau) und des Zytoskeletts durch Alexa Fluor 488 Phalloidin (grün). Scale bar, oben: 200 nm, unten: 100 nm.

4.7. Collagensynthese in RASMCs

Um den Einfluss von MPO auf die Collagenproduktion der glatten Muskelzellen zu untersuchen wurden verschiedene Assays verwendet. Der Sircol Collagen-Assay (biocolor) ermöglicht es, durch Färbung mit Sirius-Rot, den Gehalt von Collagen im Überstand der Zellkulturen photometrisch zu bestimmen. Dieser ist

proportional zur Menge an neu gebildetem Collagen. Nach 14 stündiger Inkubation zeigte sich so eine Erhöhung der Collagenmenge in den Überständen der MPO-behandelten Zellen ($p < 0,05$) (Abb. 18). Hiermit konnte nun also auch ein Korrelat für eine fibrotische Veränderung der Zellen direkt nachgewiesen werden.



*Abbildung 18: Bestimmung des Collagens im Überstand kultivierter rattenaortaler glatter Muskelzellen mittels Sircol Collagen Assay. Die Zellen wurden für 14 h mit humanem Serumalbumin (HSA) und dem Myeloperoxidase-Reaktionssystem in der Konzentration 20 µg/ml MPO + H₂O₂ 80 µM (MPO) in Versuchsmedium inkubiert. n=4. Darstellung als Mittelwert ±SD. * = p < 0,05*

5. Diskussion

Die Erkenntnisse über die Bedeutung von MPO für kardiovaskulär inflammatorische Prozesse nehmen stetig zu. Diese Arbeit bestätigt sowohl einige der vor kurzen beschriebenen Mechanismen und zeigt neue mögliche Wege für MPO-bedingtes kardiovaskuläres Remodelling auf. Durch seine katalytische Aktivität führt MPO zu vermehrter Produktion des für die Differenzierung glatter Muskelzellen wichtigen Wachstumsfaktors TGF- β . Des Weiteren konnte die gesteigerte Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix gezeigt werden. Ein möglicher Vermittler dieser Effekte ist die p38-MAP-Kinase, die durch Exposition gegenüber dem MPO-Reaktionssystem aktiviert wird und als bedeutender Mediator zellulärer Differenzierungsprozesse bekannt ist.

5.1. MPO reichert sich in vaskulären glatten Muskelzellen an

MPO wird im Rahmen des sogenannten „*respiratory burst*“ aus polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten ins Interstitium freigesetzt (22). In verschiedenen vorangegangenen Studien konnte allerdings spezielle Interaktionen des Enzyms mit verschiedenen Zellen der Gefäßwand gezeigt werden. Diese beinhalten sowohl die Adhäsion an der äußeren Zellmembran, als auch die Aufnahme in die Zellen und den Transport durch die selben hindurch (5, 65, 74). Um solche Effekte auch im Bezug auf vaskuläre glatte Muskelzellen zu überprüfen, wurden die Zellen nach Inkubation mit MPO gewaschen und das Enzym mittels Immunfluoreszenz in den Zellen dargestellt. Die Ergebnisse beweisen nicht nur eine Aufnahme von MPO in die Zellen, sie lassen auch Rückschlüsse auf die subzelluläre Verteilung von MPO in den Zellen zu. Es zeigt sich eine Affinität sowohl zur zytoplasmatischen, als auch zur Kernmembran. Diese Erkenntnisse decken sich mit der für endotheliale Zellen beschriebenen Verteilung von MPO (125). Die Mechanismen, die für die Aufnahme von MPO in die Zellen und anschließende Verteilung verantwortlich sind, sind allerdings nach wie vor nicht vollständig bekannt. Fakt ist, das MPO durch seine einzigartige Struktur und stark positive Ladung zu Interaktion mit

einer Vielzahl von Biomolekülen fähig ist. Die Kräfte, die MPO an die Membranen binden, mögen also sowohl elektrostatischer Natur, oder durch Bindung an Rezeptoren vermittelt sein. Beides wurde für MPO schon gezeigt (65, 74). Die Tatsache, dass MPO sich in relevanten Maße perinukleär anreichert, ist für ihre Funktion als Produzent von ROS allerdings von großer Bedeutung, da hierdurch ein anderes Spektrum von Proteinen für oxidative Veränderungen zur Verfügung steht als an der zytoplasmatischen Membran. Auch in Hinsicht der Kinasenaktivierung spielt die subzelluläre Lokalisation eine Rolle (126). Außerdem könnten durch die Produktion an diesem kritischen Punkt in der Zelle schon geringere Mengen an ROS einen bedeutenden Effekt haben. Dies erklärt zum Teil den größeren Einfluss von MPO-vermitteltem oxidativen Stress gegenüber anderweitiger ROS-Applikation.

Die vorliegende Arbeit stärkt also die Rolle von MPO als wichtigen Vermittler oxidativen Stresses auch in Abwesenheit von Entzündungszellen durch den Nachweis einer relevanten Anreicherung der MPO in VSMCs.

5.2. MPO hemmt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in vitro

Sowohl die erhobenen Daten aus dem MTT-Assay, als auch aus den Bestimmungen des Gesamtproteingehaltes der Zelllysate zeigen eine verminderte Zellproliferation der mit dem MPO-Reaktionssystem inkubierten Zellen im Verhältnis zur Negativkontrolle. Bei lichtmikroskopisch imponierender Zunahme der Zelldichte unter allen Versuchsbedingungen im Zeitraum zwischen der Exposition und der Ernte (Daten nicht aufgeführt), lassen sich hier proliferationshemmende und zytotoxische Effekte nicht klar unterscheiden. Hierfür wäre die Untersuchung des Zellzyklus nötig, die hier nicht durchgeführt wurde. Das wichtigste Produkt der MPO, die hypochlorige Säure (HOCl), ist für seine zytotoxische Wirkung bekannt und spielt in diesem Zusammenhang sicher die bedeutendste Rolle (114). Dies wird auch dadurch gestützt, dass die wiederholte Applikation von HOCl ebenfalls zu einem geringeren Gesamtproteingehalt des Zelllysates führte (Daten nicht aufgeführt). An dieser Stelle muss allerdings auch eine proliferationshemmende Wirkung des durch MPO vermehrt produzierten TGF- β diskutiert werden (58). Da die

Beschaffenheit der extrazellulären Matrix ebenfalls Einfluss auf die Proliferation der glatten Muskelzellen (93) hat und, wie hier gezeigt, auch durch MPO alteriert wird, können die komplexen, dieser Beobachtung zugrunde liegenden Prozesse in dieser Arbeit nicht ausreichend geklärt werden.

5.3. MPO-abhängige Bildung von TGF- β

In der Vergangenheit konnte eine Assoziation zwischen MPO und fibrotischen Veränderungen des kardiovaskulären Systems etabliert werden. Als bedeutender Mechanismus hierfür konnte eine MPO-bedingte Alteration der MMP-Aktivierung identifiziert werden. Auch andere Mechanismen, die zum Beispiel die posttranslationale Veränderung von ECM durch MPO mit einbeziehen, werden diskutiert. Diese Arbeit zeigt nun erstmals, dass auch eine vermehrte Produktion des Wachstumsfaktors TGF- β durch VSMCs fibrotische Veränderungen induziert. TGF- β ist einer der bedeutendsten profibrotischen Wachstumsfaktoren und erhöhte Level hiervon sind mit einer Reihe von pathologischen Remodelingprozessen im kardiovaskulären System assoziiert. Inkubation von RASMCs mit dem MPO-System führte zu einer vermehrten Produktion von TGF- β . Dies zeigte sich sowohl im durchgeführten Western-Blot, als auch in den immunhistochemischen Färbungen. Besonderes Augenmerk sollte auf dem Mechanismus, durch den MPO diese Veränderungen vermittelt, liegen; insbesondere auf der Unterscheidung zwischen katalytischen und extrakatalytischen Eigenschaften. Hierzu wurden Experimente mit einer mutanten, katalytisch inaktiven Form von MPO durchgeführt, die nicht zur Bildung von HOCl und anderen ROS in der Lage ist. Ein Ausbleiben der TGF- β -Antwort nach Inkubation der Zellen mit diesem Agens zeigt eindeutig die Bedeutung der katalytischen Aktivität von MPO für die vermehrte TGF- β -Produktion. Um wiederum zu beweisen, dass HOCl der Mediator der MPO-vermittelten Veränderungen ist, wurden RASMCs direkt mit HOCl behandelt. Das Ausbleiben eines Effektes nach einmaliger Gabe von HOCl spricht unserer Meinung nach nicht gegen diese Hypothese, sondern ist vielmehr ein Beleg dafür, dass MPO seine einzigartige Wirkung durch eine kontinuierliche Bildung von ROS an strategisch bedeutenden Lokalisationen in der Zelle entfaltet. Es ist nicht klar nachvollziehbar, wie hoch die tatsächliche

Konzentration von HOCl intrazellulär nach Applikation in den Zellüberstand ist. Es ist aber anzunehmen, dass im Zellmedium enthaltene Scavenger und zelleigene, antioxidative Mechanismen die HOCl Spiegel stark abschwächen und vor allem auf eine sehr kurze Zeitspanne beschränken. MPO bildet HOCl nicht nur in einer kontinuierlichen Art und Weise, sondern vor allem auch direkt am Ort der Wirkung, nämlich intrazellulär und kernnah, wie die histologischen Färbung im Rahmen dieser Arbeit belegen. Um trotzdem eine kontinuierliche Stimulation der Zellen mit HOCl, wie sie durch MPO erfolgt, zu simulieren, wurden die Zellen über 14 h in regelmäßigen Zeitabständen mit HOCl behandelt. Hier zeigte sich deutlich ein Trend hin zu vermehrter TGF- β -Produktion, je häufiger HOCl appliziert wurde. Anders als in vorausgegangenen Studien (75) reichte die endogene H₂O₂ Produktion durch die RASMCs unter unseren Kulturbedingungen nicht aus, um wirksame Spiegel von HOCl zu erzeugen. Dies zeigt sich in einem Ausbleiben der TGF- β Produktion bei Behandlung der Zellen ohne initiale Zugabe von H₂O₂. Die Tatsache, dass eine einmalige Applikation von H₂O₂ keinerlei Auswirkungen auf die Produktion von TGF- β hatte, legt die Vermutung nahe, dass die Bedeutung von MPO vor allem in der Perpetuierung primär kurzzeitiger Reizungen der Zelle liegt. In vivo ist der bedeutendste intrazelluläre Generator von H₂O₂ die NADPH-Oxidase. Diese wird zum Beispiel durch Aktivierung des Angiotensin II-Rezeptors 1 (AT-1) aktiviert (44). Dieser Pathway könnte also ein Korrelat für die artifizielle Gabe von H₂O₂ in vivo darstellen. Da die Behandlung der Zellen mit AT-II bereits ohne Zugabe von MPO einen Anstieg der TGF- β Produktion bewirkte (Daten nicht aufgeführt), konnte im Rahmen dieser Arbeit dieses Szenario nicht zufriedenstellend simuliert werden. Die Aktivierung der NADPH-Oxidase durch AT-II wird unter Anderem über p38 MAP Kinasen vermittelt (47). Eine AT-II unabhängige Aktivierung dieses Signalweges durch MPO, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurde, stellt allerdings einen guten Erklärungsansatz für die langfristige katalytische Aktivität von MPO, auch ohne Wiederholung der H₂O₂ Zugabe dar. In diesem Modell zeichnet sich MPO also durch die Fähigkeit aus, initial kurze Reizungen der Zelle zu prolongieren und somit eine chronische Störung der Zellaktivität zu provozieren.

5.4. MPO stimuliert die Bildung von ECM

Die vorliegende Arbeit zeigt nicht nur eine vermehrte Produktion profibrotischer Wachstumsfaktoren durch MPO, sondern gleichzeitig auch eine gesteigerte Synthese von Proteinen der ECM als indirekter Nachweis des gesteigerten TGF- β Signallings (106). In der Gefäßwand sind VSMCs hauptverantwortlich für die Gestaltung der ECM und eine Überproduktion der entsprechenden Bestandteile ist assoziiert mit einem fibrotischen Umbau des Gefäßes. In solchen fibrotischen Regionen dominieren vor allem collagene Fasern das Bild. Die Bestimmung des Gehalts an löslichem Collagen im Überstand der Zellkulturen zeigt eine gesteigerte Synthese von Collagen nach Behandlung der Zellen mit MPO, was in vitro als Korrelat für fibrotische Veränderungen anzusehen ist. Nach unserem Wissen ist dies die erste Arbeit, die diesen Zusammenhang eindeutig herstellt. Dieses Ergebnis stärkt das Verständnis von MPO als Vermittler von fibrotischen Veränderungen des Herzkreislaufsystems. MPO beeinflusst die Zusammensetzung der ECM nicht nur durch Aktivierung und Deaktivierung von MMPs und posttranslationale Veränderungen der ECM-Bestandteile, sondern nimmt auch direkt Einfluss auf die Produktion von ECM durch die hierfür verantwortlichen Zellen.

Ein weiteres Molekül der ECM, das durch MPO-Applikation vermehrt gebildet wird, ist Fibronectin (FN). Anders als andere Bestandteile der ECM, ist Fibronectin nicht in der Lage sich aus seinem löslichen Zustand selbst zusammenzusetzen. Die Polymerisation der löslichen Form erfolgt an spezifischen Stellen der Zelloberfläche (84). Gerade in seiner unlöslichen Form hat Fibronectin eine Reihe regulatorischer Funktionen. Die Untersuchung mittels Immunfluoreszenz konnte eindeutig die vermehrte Ansammlung von Fibronectin an der Zelloberfläche zeigen, was nicht nur eine vermehrte Bildung sondern auch den gesteigerten Einbau von Fibronectin in die ECM nach MPO-Behandlung der Zellen beweist, ein Schritt, der für die Entfaltung der Wirkung von FN unerlässlich ist. In dieser Form ist FN dafür bekannt, als wichtiger Faktor das „*phenotypic switching*“ der VSMCs hin zum synthetischen Phänotyp zu induzieren (49). Ein Ereignis, das die ECM-Produktion in der Gefäßwand noch weiter aus dem Gleichgewicht bringt. MPO könnte hier eine wichtige Rolle

als Promotor eines pathologischen Umbaus der Gefäßwand zukommen. Im Rahmen dieser Studie kann nicht eindeutig belegt werden, ob die Veränderungen der ECM-Produktion durch vermehrtes TGF- β -Signalling oder durch andere MPO-vermittelte Effekte bedingt sind. Es gibt eine starke Evidenz für die auto- und parakrine Stimulation glatter Muskelzellen durch TGF- β und daraus resultierender Stimulation der Collagen- und Fibronectinsynthese (24, 56). Möglich ist aber auch eine unabhängig von TGF- β durch MAP-Kinasen vermittelte Kollagenproduktion. Die tatsächliche Bedeutung von MPO für fibrotische Veränderungen der Gefäßwand sollte in Zukunft in vivo untersucht werden, auch um den Effekt des verstärkten TGF- β -Signalings genauer charakterisieren zu können. Anhand der erhobenen Daten ist ein profibrotischer Effekt von MPO auf VSMCs allerdings unstrittig.

5.5. MPO aktiviert p38 MAP-Kinase

Eine mögliche Erklärung für die proinflammatorische und profibrotische Wirkung von MPO stellte die Aktivierung von intrazellulären MAP-Kinase Kaskaden dar. Diese sind in einer Vielzahl von Prozessen für die Reaktion der Zelle auf einen extrazellulären Reiz wie zum Beispiel oxidativen Stress verantwortlich. Sie haben bedeutenden Einfluss auf Proliferation und Differenzierung der Zelle (95). In dieser Arbeit konnte experimentell belegt werden, dass MPO in glatten Muskelzellen zu einer Aktivierung von p38 MAP-Kinase führt. Ähnliche Daten sind mittlerweile auch für andere Zellen des kardiovaskulären Systems veröffentlicht worden (75). Die Positivkontrolle mit HOCl zeigt, dass der beobachtete Effekt auf die katalytische Bildung von ROS durch MPO zurückzuführen ist. Der genaue Mechanismus dieser gesteigerten Phosphorylierung von p38 MAPK ist bislang nicht gänzlich geklärt. Lane et al konnten eine vermehrte MAP-Kinasen Aktivierung durch HOCl vermittelte Hemmung einer Protein-Tyrosin-Phosphatase zeigen (71). Weiterhin könnte die Aktivierung sowohl durch die direkte Interaktion von HOCl mit p38 MAPK als auch durch Aktivierung von Upstreamkinasen erfolgen - Mechanismen, die einer weiteren experimentellen Prüfung bedürfen.

Ein etabliertes Target der aktivierten p38 MAPK ist der Transskriptionsfaktor NFκB. Durch seine Aktivierung wird die Expression proinflammatorischer Marker wie CD40 in den VSMCs induziert (67). Neben der Kinasenaktivierung konnte auch eine vermehrte Expression von CD40 als indirektes Zeichen für die Stimulation des MAP-Kinasen-Pathways gezeigt werden. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigt außerdem nicht nur eine gesteigerte Synthese von CD40, sondern zusätzlich eine vermehrte Expression an der Zelloberfläche. CD40-Signalling in VSMCs spielt unter Anderem eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von atheromatösen Läsionen (11). Gerade während des frühen Progresses von "*fatty streak*" Läsionen nimmt die CD40 Expression auf den VSMCs erheblich zu, was eine bedeutende Rolle dieses Signalweges vermuten lässt. Die Effekte der CD40 Aktivierung reichen von der verstärkten Bildung inflammatorischer Zytokine, über die Produktion von ROS bis hin zur Aktivierung von MMPs (127). Hier lässt sich also ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von MPO und der Entwicklung atheromatöser Läsionen herstellen, der über die bisher etablierten Mechanismen der Lipidoxidation und endothelialer Dysfunktion hinausgeht und auf einer Beeinflussung der von VSMCs präsentierten Oberflächenproteine beruht.

5.6. MPO als Faktor in kardiovaskulären Umbauprozessen

Die vorliegende Arbeit zeigt einen bedeutenden Einfluss von MPO auf den Phänotyp glatter Gefäßmuskelzellen. Nach Exposition gegenüber dem MPO-Reaktionssystem zeigten sich Veränderungen in den präsentierten Oberflächenrezeptoren und in der Synthese von Wachstumsfaktoren und Bestandteilen der ECM. Ein solcher synthetischer Phänotyp ist mit einer Vielzahl von kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse erlauben einen neuen Blickwinkel auf einige Erkrankungen, bei denen eine Assoziation mit MPO-Aktivität bereits etabliert ist, so wie Atherosklerose und Vorhofflimmern, lassen aber auch den Schluss auf eine Beteiligung von MPO in anderen Pathomechanismen zu, denen eine Störung der Zusammensetzung und Funktion insbesondere der Tunica media

der Gefäßwand zugrunde liegt, wie beispielsweise die Entwicklung von Aortenaneurysmata im Rahmen eines Marfansyndroms.

Seit einiger Zeit schon ist MPO als wichtiger Bestandteil der Pathophysiologie der Atherosclerose etabliert. Hierbei entfaltet sie ihre proatherosclerotische Wirkung vor allem über Oxidation von Lipoproteinen und Störung des NO-Signallings (73). Diese Arbeit rückt in diesem Zusammenhang erstmals die vaskulären glatten Muskelzellen in den Vordergrund, die den vorherrschenden Zelltyp in fortgeschrittenen atherosclerotischen Läsionen ausmachen (101). Die hier gezeigte Aktivierung von MAP-Kinasen und Expression von CD40 auf den VSMCs beweisen einen erheblichen Einfluss von MPO auf proinflammatorische, intrazelluläre Signalkaskaden. CD40 kommt eine besondere Bedeutung in nahezu allen Stadien der Atheromentwicklung zu, vor allem aber im frühen Progress von atheromatösen Läsionen, da hier die Zunahme an CD40 auf SMCs am größten ist (11). Nach Interaktion mit dem CD40 Ligand, wandert CD40 in die Zelle und initiiert dort die Expression einer Vielzahl proinflammatorischer Gene. Diese beinhalten $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, sowie einige Zytokine. Außerdem wird die Monozytenadhäsion, die Produktion von ROS und die Expression von MMPs gefördert (127). Diese Eigenschaften machen CD40 zu einem der bedeutendsten Vermittler der intramuralen Entzündungsprozesse, die der Atherosclerose zugrunde liegen. Mehrere in vivo Studien haben gezeigt, dass eine Inhibition des CD40-Signallings eine deutlich geringere Ausprägung der Atherosclerose in Mausmodellen nach sich zieht und einen stabilen Plaquephänotyp fördert (81, 83). Durch eine Induktion dieses Pathways kann MPO also sowohl zu der Initiierung als auch zum Progress atheromatöser Plaques beitragen.

Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse hinsichtlich der TGF- β Produktion in VSMCs zeichnen allerdings ein komplexeres Bild. Als Immunmodulator und wichtiger profibrotischer Mediator führt ein vermehrtes TGF- β Signalling zwar zu einem morphologisch größeren, aber gleichzeitig durch starke Fibrosierung stabileren Plaquephänotyp (82). Daher ist die Rolle von TGF- β in der Pathophysiologie der Atherosclerose seit Langem umstritten, es wird heute aber davon ausgegangen, dass TGF- β einen eher protektiven Effekt hat, wenn

es um Komplikationen und Plaqueruptur geht (39). Letztendlich ist das in vitro Setting dieser Arbeit nicht geeignet um zu überprüfen, ob der proinflammatorische Effekt, den MPO durch Expression von CD40 vermittelt oder der antiinflammatorische durch TGF- β überwiegt. Mehrere Zellen sind an der Ausbildung des atherosclerotischen Plaques beteiligt und die Pathophysiologie wird durch ein empfindliches Gleichgewicht verschiedenster Zytokine und Wachstumsfaktoren bestimmt, die unterschiedliche Wirkungen auf verschiedene Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Atheromentwicklung haben. Hinzu kommen einige Unterschiede zwischen Tiermodellen und Menschen in Bezug auf atherogene Prozesse. Mehrere in vivo Studien zeigten allerdings in Menschen eine klare Assoziation von MPO mit der Entwicklung von Atherosclerose assoziierten Komplikationen wie KHK (130) und deren komplizierten Verlauf (6). Spekulationen über einen protektiven Effekt von MPO gegenüber atherogenetischen Prozessen erübrigen sich demnach.

Die vorliegende Arbeit erweitert auch das Verständnis von proarrhythmogenen Effekten von MPO. Zwar wird das Vorhofmykard vorwiegend von Kardiomyozyten gebildet, gerade in der Frühphase der atrialen Fibrose wandern allerdings auch glatte Gefäßmuskelzellen in das Vorhofgewebe mit ein. Weiterhin wurden die hier für VSMCs gezeigten Mechanismen auch in Kardiomyozyten demonstriert (87). Somit fungiert MPO als wichtiger arrhythmogener Faktor sowohl auf Vorhoff- (105) als auch auf Ventrikel Ebene. Als Grund hierfür deckten die Autoren eine vermehrte Vorhoffibrose auf und zeigten in diesem Zusammenhang eine durch MPO alterierte MMP Aktivierung. Der bedeutendste profibrotische Wachstumsfaktor ist TGF- β , der sowohl durch vermehrte Collagenproduktion als auch vermehrte Expression von MMPs eine wichtige Rolle in der Vorhoffibrose spielt (32). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals eine vermehrte Produktion von TGF- β durch Zellen des kardiovaskulären Systems nach Exposition gegenüber MPO. Dies in Zusammenhang mit der beobachteten, vermehrten Collagenproduktion stärkt die Rolle von MPO als wichtigen Initiator fibrotischer Umbauprozesse wie sie beim Vorhofflimmern zu finden sind. Einflüsse von MPO auf die Differenzierung kardiovaskulärer Zellen, wie sie in dieser Arbeit gezeigt werden, wurden vor kurzem auch für Kardiomyocyten beschrieben (87).

Eine Störung der ECM Synthese der VSMCs, wie sie in den durchgeführten Experimenten imponiert, lässt auch Vermutungen einer Beteiligung von MPO an Pathomechanismen zu, denen eine gestörte Bindegewebsstruktur der Media zugrunde liegt. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Entwicklung von Aortenaneurysmata bei Patienten mit Marfansyndrom. Bei dieser autosomal dominant vererbten Krankheit kommt es durch eine Mutation im Fibrillin 1 Gen, einem Bestandteil der ECM, zu einer allgemeinen Bindegewebschwäche. Typischerweise weisen die Patienten ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Aortenaneurysmata auf. Diese zeigen eine Degeneration der Lamina media mit Verlust der elastischen Fasern, übermäßiger Produktion von Collagenen und Proteoglycanen und einem veränderten Phänotyp und Verlust der glatten Muskelzellen (54). TGF- β ist ein klassischer Mediator solcher Remodelingprozesse und tatsächlich haben mehrere Studien ein vermehrtes TGF- β Signalling im Zusammenhang mit Aortenaneurysmata nachweisen können (35, 61). Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Veränderungen der VSMCs in Form von TGF- β Ausschüttung und gesteigerter Synthese von Collagenen und Proteoglycanen in Zusammenhang mit einer gehemmten Proliferation (Daten nicht aufgeführt) ähneln den Veränderungen der Media in marfanassozierten Aneurysmata erheblich. Interessanterweise konnte ein vermindertes vaskuläres Remodeling in Mausmodellen des Marfansyndroms durch Angiotensin II Rezeptorblockade gezeigt werden (40). Im Remodelingprozess des Vorhofflimmerns konnte eine bedeutende Rolle von MPO als Downstreammediator von Angiotensin II gezeigt werden (105). Diese Evidenz in Zusammenschau mit den hier präsentierten Daten lassen die Beteiligung von MPO an der Entwicklung von Aneurysmata der Aorta als vielversprechendes Ziel zukünftiger Forschungsarbeiten erscheinen. Eine beispielsweise durch mechanische Belastung ausgelöste lokale Entzündungsreaktion mit konsekutiver MPO-Ausschüttung und anschließendem Umbau der Media könnte einen wesentliche Schritt in der Initiation des pathologischen Remodelings der Media darstellen.

5.7. Ausblick

Weitere Zellkulturversuche könnten einen Beitrag zur Klärung des Mechanismus der MPO Aufnahme in die Zellen leisten. Interessant wäre in diesem Zusammenhang vor allem, ob ein bestimmter Rezeptor an der Zelloberfläche hierfür verantwortlich ist, ähnlich wie bei der integrinvermittelten Transzytose von MPO durch Endothelzellen (5). Inhibition verschiedener Bestandteile der p38 MAP-Kinase-Kaskade kann weiterhin Aufschluss über der Aktivierung dieses Signalweges zugrunde liegende Ereignisse liefern. Weiterer Klärung bedarf auch die Herkunft des H_2O_2 als obligates Substrat für die katalytische Bildung von HOCl durch MPO. Stimulation von unter anderen Bedingungen kultivierten Zellen durch AT-II stellt hier nach wie vor einen vielversprechenden Ansatz dar, sowie ex vivo Tierversuche. Hierbei kann auch die Möglichkeit untersucht werden, dass andere Reizungen des Gewebes, zum Beispiel mechanischer Natur, im Zusammenhang mit MPO verstärkte Remodelingprozesse nach sich ziehen. Letztendlich bleibt nach wie vor offen, welche intrazelluläre Signalkaskade zur vermehrten Produktion von TGF- β führt. Es steht ein breites Spektrum an Agentien zur Verfügung, die die Inhibition solcher Pathways unter Kulturbedingungen ermöglichen und so die weitere Klärung dieses Sachverhalts ermöglichen.

Besonders interessant ist vor allem der in dieser Arbeit hergestellte mögliche Zusammenhang zwischen MPO und dem Marfansyndrom. Die Studie der Aneurysmaentwicklung in MPO-Knockoutmäusen stellt hier einen reizvollen Forschungsansatz dar. Außerdem könnten klinische Studien analog zu denen, die zur KHK durchgeführt wurden, einen möglichen Zusammenhang zwischen MPO-Plasmaspiegeln und Aneurysmata untersuchen. Auch einige etwas aufwändiger angelegte Zellkulturexperimente, zum Beispiel in organotypischen Kulturen, können diesen neuen Aspekt des MPO-vermittelten, vaskulären Remodelings weiter vertiefen.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des leukozytären Enzyms Myeloperoxidase auf die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden und Produktion profibrotischer Wachstumsfaktoren, sowie von Proteinen der extrazellulären Matrix in vaskulären glatten Muskelzellen untersucht. In den vergangenen Jahren wurden vermehrt Daten erhoben, die einen Zusammenhang von MPO mit inflammatorischen und fibrotischen Veränderungen des kardiovaskulären Systems aufzeigten. Diese waren sowohl auf die katalytische Bildung von ROS als auch auf extrakatalytische Eigenschaften zurückzuführen. Unter Unterscheidung dieser beiden Möglichkeiten deckte diese Arbeit neue Mechanismen für die oben genannten Veränderungen auf und erweiterte das Verständnis der MPO Wirkung auf durch glatte Muskelzellen bedingte Remodelingprozesse.

Versuche an kultivierten rattenaortalen glatten Muskelzellen zeigten eine Aufnahme von MPO in die Zellen und Anreicherung entlang intrazellulärer Membranen. Inkubation der Zellen mit MPO und seinem Substrat führte konzentrationsabhängig zu einer vermehrten Produktion des profibrotischen Wachstumsfaktors TGF- β 1 nach 14 h. Inkubation der Zellen mit einer katalytisch inaktiven Form von MPO zeigte keinen Effekt hierauf, wohl aber die Applikation von hypochloriger Säure (HOCl), des hauptsächlichen Produktes von MPO. Um eine profibrotische Wirkung des gesteigerten TGF- β -Signallings zu demonstrieren, wurde die Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix in der Zellkultur untersucht. Hier zeigte sich eine vermehrte Synthese von Collagen und Fibronectin. Möglicher Vermittler der MPO-Abhängigen Effekte auf die Differenzierung der glatten Muskelzellen ist die p38-MAP-Kinase, deren Aktivierung durch MPO demonstriert werden konnte.

Die hier erhobenen Daten identifizieren die katalytische Bildung von HOCl durch MPO als potenten Induktor pro fibrotischer Umbauprozesse in glatten Muskelzellen und liefern somit neue Ansätze für die Beteiligung dieses Enzyms an kardiovaskulären Krankheitsbildern.

7. Summary

A number of clinical, ex-vivo and in vitro studies have established a connection between the leucocyte protein myeloperoxidase (MPO) and pathogenic changes of the cardiovascular system including inflammation and fibrosis. This work provides new possible pathways for the pro fibrotic alteration of vascular tissue by measuring the effects of myeloperoxidase on the activation of intracellular signalcasacades and production of profibrotic growthfactors and proteins of the extracellular matrix in cultivated vascular smooth muscle cells with a special focus on the importance of the catalytical activity of the enzyme.

Rat-aortal smooth muscle cells where cultivated and treated with the MPO reaktion system. We where able to demonstrate the uptake of the enzyme into the cells. 14 hours after exposition there was a dosedependent increase of TGF- β 1 levels in celllysates. Treatment of the cells with a catalytically inactive speciem of MPO did not have any such effects but aplication of the main product of MPO hypochlorous acid (HOCl) did. To demonstrate actual fibrotic changes in the cells we observed the production of collagene and fibronectin which both where overexpressed in cells treated with MPO. A possible mediator of these changes might be the p38-MAPK-Kinase that was found to be activated by MPO.

Our data identifies the catalytical production of HOCl by MPO as a potential inductor of pro fibrotic remodeling processes in smooth muscle cells and hereby provides new possible approaches for the significance of this enzyme in cardiovascular disease.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABCA-1	ATP-binding cassette Transporter 1
AT-1	Angiotensinrezeptor 1
AT-II	Angiotensin II
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
bidest.	bidestilata
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CREB	<i>cAMP-response binding protein</i>
DMEM	<i>Dulbeccos's modified eagle-medium</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FBS	fetal-bovines Serum
FN	Fibronectin

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gly	Glycin
H ₂ O ₂	Wasserstoff Peroxyd
HCl	Salzsäure
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HOCl	hypochlorige Säure
HSA	humanes Serumalbumin
HSP27	<i>heat shock protein 27</i>
IFN-γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen activated protein-Kinase</i>
MAPKAPK2	<i>mitogen activated protein kinase activated protein kinase 2</i>
MK2	s. MAPKAPK2
MKK	MAP-Kinase-Kinase
MKP	MAP-Kinase Phosphatase
MM-CK	myofibrilläre Creatinkinase

MMP	Matrixmetalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxyd
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PDGF	<i>platelet derived growthfactor</i>
PMN	polymorphkernige neutrophile Blutzelle
RASMCs	rataortic smooth muscle cells (rattenaortale, glatte Muskelzellen)
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAB1	<i>transforming growth faktor-β-aktivated kinase 1 binding protein</i>
TBST	<i>tris-buffered saline with Tween20</i>
TGF- β	<i>transforming growthfactor beta</i>
Thr	Thyrosin
TIM	<i>tissueinhibitor of metalloproteinases</i>

TNF- α	Tumornekrosefaktor α
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i> (glatte Gefäßmuskelzelle)

9. Literaturverzeichnis

1. **Abu-Soud HM, Hazen SL.** Nitric Oxide Is a Physiological Substrate for Mammalian Peroxidases. *J Biol Chem* 275: 37524–37532, 2000.
2. **Aratani Y, Koyama H, Nyui S, Suzuki K, Kura F, Maeda N.** Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun* 67: 1828–1836, 1999.
3. **Aratani Y, Kura F, Watanabe H, Akagawa H, Takano Y, Suzuki K, Maeda N, Koyama H.** Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J Infect Dis* 182: 1276–1279, 2000.
4. **Askari AT, Brennan M-L, Zhou X, Drinko J, Morehead A, Thomas JD, Topol EJ, Hazen SL, Penn MS.** Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Exp Med* 197: 615–624, 2003.
5. **Baldus S, Eiserich JP, Mani A, Castro L, Figueroa M, Chumley P, Ma W, Tousson A, White CR, Bullard DC, Brennan M-L, Lusis AJ, Moore KP, Freeman BA.** Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. *J Clin Invest* 108: 1759–1770, 2001.
6. **Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, Simoons ML, Hamm CW, CAPTURE Investigators.** Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute

- coronary syndromes. *Circulation* 108: 1440–1445, 2003.
7. **Baldus S, Rudolph V, Roiss M, Ito WD, Rudolph TK, Eiserich JP, Sydow K, Lau D, Szöcs K, Klinke A, Kubala L, Berglund L, Schrepfer S, Deuse T, Haddad M, Risius T, Klemm H, Reichenspurner HC, Meinertz T, Heitzer T.** Heparins increase endothelial nitric oxide bioavailability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase. *Circulation* 113: 1871–1878, 2006.
 8. **Beckmann JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR.** Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 375: 81–88, 1994.
 9. **Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald TO, Singh P, Anantharamaiah GM, Chait A, Brunzell J, Geary RL, Oram JF, Heinecke JW.** The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 13032–13037, 2004.
 10. **Brennan M-L, Anderson MM, Shih DM, Qu X-D, 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* 107: 419–430, 2001.
 11. **Bruemmer D, Riggers U, Holzmeister J, Grill M, Lippek F, Settmacher U, Regitz-Zagrosek V, Fleck E, Graf K.** Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions. *Am J Cardiol* 87: 21–27, 2001.
 12. **Burstein B, Nattel S.** Atrial structural remodeling as an antiarrhythmic target. *J Cardiovasc Pharmacol* 52: 4–10, 2008.
 13. **Carey DJ.** Control of Growth and Differentiation of Vascular Cells by Extracellular Matrix Proteins. *Annu Rev Physiol* 53: 161–177, 1991.

14. **Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R.** The smooth muscle cell in culture. *Physiol rev.*
15. **Chen C-L, Huang SKS, Lin J-L, Lai L-P, Lai S-C, Liu C-W, Chen W-C, Wen C-H, Lin C-S.** Upregulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45: 742–753, 2008.
16. **Cohen-Tervaert JW, Jessurun G, Tio RA.** Myeloperoxidase polymorphism related to cardiovascular events in coronary artery disease. *The American journal of ...*, 2004.
17. **Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW.** Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* (1994). doi: 10.1172/JCI117342.
18. **Davies MJ.** Going from immutable to mutable atherosclerotic plaques. *Am J Cardiol* 88: 2F–9F, 2001.
19. **Desrochers PE, Mookhtiar K, Van Wart HE, Hasty KA, Weiss SJ.** Proteolytic inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor and alpha 1-antichymotrypsin by oxidatively activated human neutrophil metalloproteinases. *J Biol Chem* 267: 5005–5012, 1992.
20. **Dijke Ten P, Goumans M-J, Itoh F, Itoh S.** Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 191: 1–16, 2002.
21. **Domigan NM, Charlton TS, Duncan MW, Winterbourn CC, Kettle AJ.** Chlorination of Tyrosyl Residues in Peptides by Myeloperoxidase and Human Neutrophils. *J Biol Chem* 270: 16542–16548, 1995.
22. **Eiserich JP, Baldus S, Brennan M-L, Ma W, Zhang C, Tousson A, Castro L, Luscis AJ, Nauseef WM, White CR, Freeman BA.** Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science* 296: 2391–2394, 2002.

23. **Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A.** Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391: 393–397, 1998.
24. **Epstein FH, Border WA, Noble NA.** Transforming Growth Factor β in Tissue Fibrosis. *N Engl J Med* 331: 1286–1292, 1994.
25. **Epstein FH, Ross R.** Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 340: 115–126, 1999.
26. **F A, C C-B.** NADPH as a co-substrate for studies of the chlorinating activity of myeloperoxidase.
27. **Falk E, Shah PK, Fuster V.** Coronary plaque disruption. *Circulation* 92: 657–671, 1995.
28. **Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R.** Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* 93: 1354–1363, 1996.
29. **Fliss H.** Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leukocyte oxidants. *Mol Cell Biochem* 84: 177–188, 1988.
30. **Forgione MA, Leopold JA, Loscalzo J.** Roles of endothelial dysfunction in coronary artery disease. *Current Opinion in Cardiology* 15: 409, 2000.
31. **Freestone B, Beevers DG, Lip GYH.** The renin-angiotensin-aldosterone system in atrial fibrillation: a new therapeutic target? *J Hum Hypertens* 18: 461–465, 2004.
32. **Friedrichs K, Baldus S, Klink A.** Fibrosis in Atrial Fibrillation - Role of Reactive Species and MPO. *Front Physiol* 3: 214, 2012.
33. **Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW.** Hypochlorous acid

- oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 276: 41279–41287, 2001.
34. **Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW.** Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *J Biol Chem* 278: 28403–28409, 2003.
35. **Fukui D, Miyagawa S, Soeda J, Tanaka K, Urayama H, Kawasaki S.** Overexpression of transforming growth factor beta1 in smooth muscle cells of human abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 25: 540–545, 2003.
36. **Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P.** Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94: 2493–2503, 1994.
37. **Garat C, Van Putten V, Refaat ZA, Dessev C, Han SY, Nemenoff RA.** Induction of smooth muscle alpha-actin in vascular smooth muscle cells by arginine vasopressin is mediated by c-Jun amino-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275: 22537–22543, 2000.
38. **Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, HAN J.** MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295: 1291–1294, 2002.
39. **Grainger DJ.** Transforming growth factor beta and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 399–404, 2004.

40. **Habashi JP, Judge DP, Holm TM, Cohn RD, Loeys BL, Cooper TK, Myers L, Klein EC, Liu G, Calvi C, Podowski M, Neptune ER, Halushka MK, Bedja D, Gabrielson K, Rifkin DB, Carta L, Ramirez F, Huso DL, Dietz HC.** Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* 312: 117–121, 2006.
41. **Hanks SK, Hunter T.** Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9: 576–596, 1995.
42. **Hansson GK, Jonasson L, Holm J, Claesson-Welsh L.** Class II MHC antigen expression in the atherosclerotic plaque: smooth muscle cells express HLA-DR, HLA-DQ and the invariant gamma chain. *Clinical and Experimental Immunology* 64: 261–268, 1986.
43. **Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H.** Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91: 7–11, 2003.
44. **Harrison DG, Cai H.** Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production. *Cardiol Clin* 21: 289–302, 2003.
45. **Harrison DG.** Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 100: 2153–2157, 1997.
46. **Harrison JE, Schultz J.** Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 251: 1371–1374, 1976.
47. **Hazan-Halevy I, Levy T, Wolak T, Lubarsky I, Levy R, Paran E.** Stimulation of NADPH oxidase by angiotensin II in human neutrophils is mediated by ERK, p38 MAP-kinase and cytosolic phospholipase A2. *J Hypertens* 23: 1183–1190, 2005.
48. **Hazen SL, Hsu FF, Mueller DM, Crowley JR, Heinecke JW.** Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *J Clin Invest* 98: 1283–1289, 1996.

49. **Hedin U, Bottger BA, Luthman J, Johansson S, Thyberg J.** A substrate of the cell-attachment sequence of fibronectin (Arg-Gly-Asp-Ser) is sufficient to promote transition of arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype. *Developmental Biology* 133: 489–501, 1989.
50. **Henderson JP, Byun J, Heinecke JW.** Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system of phagocytes produces 5-chlorocytosine in bacterial RNA. *J Biol Chem* 274: 33440–33448, 1999.
51. **Hessler JR, Morel DW, Lewis LJ, Chisolm GM.** Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity. *Arteriosclerosis* 3: 215–222, 1983.
52. **Hirche TO, Gaut JP, Heinecke JW, Belaaouaj A.** Myeloperoxidase plays critical roles in killing *Klebsiella pneumoniae* and inactivating neutrophil elastase: effects on host defense. *J Immunol* 174: 1557–1565, 2005.
53. **Holm TM, Habashi JP, Doyle JJ, Bedja D, Chen Y, van Erp C, Lindsay ME, Kim D, Schoenhoff F, Cohn RD, Loeys BL, Thomas CJ, Patnaik S, Marugan JJ, Judge DP, Dietz HC.** Noncanonical TGF β signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science* 332: 358–361, 2011.
54. **Howell DW, Popovic N, Metz RP, Wilson E.** Regional changes in elastic fiber organization and transforming growth factor β signaling in aortas from a mouse model of marfan syndrome. *Cell Tissue Res* 358: 807–819, 2014.
55. **Ignarro LJ, Degnan JN, Baricos WH, Kadowitz PJ, Wolin MS.** Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta* 718: 49–59, 1982.

56. **Ignotz RA, Massagué J.** Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261: 4337–4345, 1986.
57. **Issac TT, Dokainish H, Lakkis NM.** Role of inflammation in initiation and perpetuation of atrial fibrillation: a systematic review of the published data. *J Am Coll Cardiol* 50: 2021–2028, 2007.
58. **J GD, R KP, M WC, L WP, C MJ.** Transforming growth factor beta decreases the rate of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by extending the G2 phase of the cell cycle and delays the rise in cyclic AMP before entry into M phase.
59. **J HL, R S.** Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages.
60. **Johansson MW, Patarroyo M, Oberg F, Siegbahn A, Nilsson K.** Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18). *J Cell Sci* 110 (Pt 9): 1133–1139, 1997.
61. **Jones JA, Spinale FG, Ikonomidis JS.** Transforming growth factor-beta signaling in thoracic aortic aneurysm development: a paradox in pathogenesis. *J Vasc Res* 46: 119–137, 2009.
62. **Kaufman J, Sime PJ, Phipps RP.** Expression of CD154 (CD40 Ligand) by Human Lung Fibroblasts: Differential Regulation by IFN- and IL-13, and Implications for Fibrosis. *J Immunol* 172: 1862–1871, 2004.
63. **Klebanoff SJ, Clark RA.** *The neutrophil: function and clinical disorders.* 1978.
64. **Klebanoff SJ.** Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77: 598–625, 2005.
65. **Klinke A, Nussbaum C, Kubala L, Friedrichs K, Rudolph TK, Rudolph V, Paust H-J, Schröder C, Benten D, Lau D, Szöcs K,**

- Furtmüller PG, Heeringa P, Sydow K, Duchstein H-J, Ehmke H, Schumacher U, Meinertz T, Sperandio M, Baldus S.** Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood* 117: 1350–1358, 2011.
66. **Kostina DA, Voronkina IV, Smagina LV, Gavriliuk ND, Moiseeva OM, Irtiuga OB, Uspenskiĭ VE, Kostareva AA, Malashicheva AB.** [Functional properties of smooth muscle cells in ascending aortic aneurysm]. *Tsitologija* 55: 725–731, 2013.
67. **Krzesz R, Wagner AH, Cattaruzza M, Hecker M.** Cytokine-inducible CD40 gene expression in vascular smooth muscle cells is mediated by nuclear factor kappaB and signal transducer and activation of transcription-1. *FEBS Lett* 453: 191–196, 1999.
68. **Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, Gothot A.** Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit ? *Acta Haematol* 104: 10–15, 2000.
69. **Labat-Robert J, Szendroi M, Godeau G, Robert L.** Comparative distribution patterns of type I and III collagens and fibronectin in human arteriosclerotic aorta. *Pathol Biol* 33: 261–265, 1985.
70. **Landmesser U, Hornig B, Drexler H.** Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation* 109: 1127–33, 2004.
71. **Lane AE, Tan JTM, Hawkins CL, Heather AK, Davies MJ.** The myeloperoxidase-derived oxidant HOCl inhibits protein tyrosine phosphatases and modulates cell signalling via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in macrophages. *Biochem J* 430: 161–169, 2010.
72. **Lanza F.** Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *J Mol Med* 76: 676–681, 1998.
73. **Lau D, Baldus S.** Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology & Therapeutics* 111: 16–26, 2006.

74. **Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, Gehling UM, Brümmer J, Rudolph V, Münzel T, Heitzer T, Meinertz T, Baldus S.** Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005.
75. **Lau D, Szöcs K, Klinke A, Rudolph T, Rudolph V, Streichert T, Blankenberg S, Baldus S.** Myeloperoxidase upregulates endothelin receptor type B expression. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 69: 76–82, 2014.
76. **Leeuwenburgh C, Rasmussen JE, Hsu F-F, Mueller DM, Pennathur S, Heinecke JW.** Mass Spectrometric Quantification of Markers for Protein Oxidation by Tyrosyl Radical, Copper, and Hydroxyl Radical in Low Density Lipoprotein Isolated from Human Atherosclerotic Plaques. *J Biol Chem* 272: 3520–3526, 1997.
77. **Lefkowitz DL, Mills K, Morgan D, Lefkowitz SS.** Macrophage Activation and Immunomodulation by Myeloperoxidase. *Exp Biol Med (Maywood)* 199: 204–210, 1992.
78. **Lehrer RI, Cline MJ.** Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: the role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection. *J Clin Invest* 48: 1478–1488, 1969.
79. **Lehrer RI, Hanifin J, Cline MJ.** Defective bactericidal activity in myeloperoxidase-deficient human neutrophils. *Nature* 223: 78–79, 1969.
80. **Lehtimäki T, Lehtinen S, Solakivi T, Nikkilä M, Jaakkola O, Jokela H, Ylä-Herttuala S, Luoma JS, Koivula T, Nakkari T.** Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 23–27, 1999.
81. **Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Koteliansky VE, Burkly LC, Daemen MJ.** Both early and delayed anti-CD40L antibody treatment

induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7464–7469, 2000.

82. **Lutgens E, Gijbels M, Smook M, Heeringa P, Gotwals P, Koteliansky VE, Daemen MJAP.** Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 975–982, 2002.
83. **Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P.** Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 394: 200–203, 1998.
84. **Magnusson MK, Mosher DF.** Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 1363–1370, 1998.
85. **Midwinter RG, Vissers MCM, Winterbourn CC.** Hypochlorous Acid Stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Enhances Cell Survival. *Arch Biochem Biophys* 394: 13–20, 2001.
86. **Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR, Bauer JA.** Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* 104: 174–180, 2001.
87. **Mollenhauer M, Friedrichs K, Lange M, Gesenberg J, Remane L, Kerkenpaß C, Krause J, Schneider J, Ravekes T, Maass M, Halbach M, Peinkofer G, Saric T, Mehrkens D, Adam M, Deuschl FG, Lau D, Geertz B, Manchanda K, Eschenhagen T, Kubala L, Rudolph TK, Wu Y, Tang WHW, Hazen SL, Baldus S, Klinke A, Rudolph V.** Myeloperoxidase Mediates Postischemic Arrhythmogenic Ventricular Remodeling. *Circ Res* 121: 56–70, 2017.
88. **Muslin AJ.** MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci* 115: 203–218, 2008.
89. **Naruko T, Ueda M, Haze K, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh**

- A, Komatsu R, Ikura Y, Ogami M, Shimada Y, Ehara S, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE.** Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* 106: 2894–2900, 2002.
90. **Nattel S, Burstein B, Dobrev D.** Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 1: 62–73, 2008.
91. **Oram JF.** HDL apolipoproteins and ABCA1: partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 720–727, 2003.
92. **Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR.** Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiological Reviews* 84: 767–801, 2004.
93. **Owens GK.** Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiological Reviews* 75: 487–517, 1995.
94. **Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ.** Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med* 95: 293–301, 1981.
95. **Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu B-E, Karandikar M, Berman K, Cobb MH.** Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions¹. *Endocrine Reviews* (July 1, 2013). doi: 10.1210/edrv.22.2.0428.
96. **Pecoits-Filho R, Stenvinkel P, Marchlewska A, Heimbürger O, Bárány P, Hoff CM, Holmes CJ, Suliman M, Lindholm B, Schalling M, Nordfors L.** A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients. *Kidney International* 63: S172–S176, 2003.
97. **Pennathur S, Bergt C, Shao B, Byun J, Kassim SY, Singh P, Green PS, McDonald TO, Brunzell J, Chait A, Oram JF, O'Brien K, Geary**

- RL, Heinecke JW.** Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 279: 42977–42983, 2004.
98. **Pickering JG.** Regulation of vascular cell behavior by collagen : form is function. *Circ Res* 88: 458–459, 2001.
99. **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). doi: 10.1172/JCI5549.
100. **Pohlert D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G.** TGF- β and fibrosis in different organs — molecular pathway imprints. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1792: 746–756, 2009.
101. **Raines EW, Ross R.** Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *British Heart Journal* 69: S30–7, 1993.
102. **Reusch P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE.** Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 79: 1046–1053, 1996.
103. **Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR.** A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78: 1027–1037, 1994.
104. **Rudolph TK, Wipper S, Reiter B, Rudolph V, Coym A, Detter C, Lau D, Klinke A, Friedrichs K, Rau T, Pekarova M, Russ D, Knöll K, Kolk M, Schroeder B, Wegscheider K, Andresen H, Schwedhelm E, Boeger R, Ehmke H, Baldus S.** Myeloperoxidase deficiency preserves vasomotor function in humans. *Eur Heart J* 33: 1625–1634, 2012.

105. **Rudolph V, Andrié RP, Rudolph TK, Friedrichs K, Klinke A, Hirsch-Hoffmann B, Schwoerer AP, Lau D, Fu X, Klingel K, Sydow K, Didié M, Seniuk A, Leitner von E-C, Szoecs K, Schrickel JW, Treede H, Wenzel U, Lewalter T, Nickenig G, Zimmermann W-H, Meinertz T, Böger RH, Reichenspurner H, Freeman BA, Eschenhagen T, Ehmke H, Hazen SL, Willems S, Baldus S.** Myeloperoxidase acts as a profibrotic mediator of atrial fibrillation. *Nature Medicine* 16: 470–474, 2010.
106. **Schlumberger W, Thie M, Rauterberg J, Robenek H.** Collagen synthesis in cultured aortic smooth muscle cells. Modulation by collagen lattice culture, transforming growth factor-beta 1, and epidermal growth factor. *Arterioscler Thromb* 11: 1660–1666, 1991.
107. **Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Riehemann K, Wesselborg S.** Regulation of NF-kappa B activation by MAP kinase cascades. *Immunobiology* 198: 35–49, 1997.
108. **Selvamurugan N, Kwok S, Alliston T, Reiss M, Partridge NC.** Transforming growth factor-beta 1 regulation of collagenase-3 expression in osteoblastic cells by cross-talk between the Smad and MAPK signaling pathways and their components, Smad2 and Runx2. *J Biol Chem* 279: 19327–19334, 2004.
109. **Shah NM, Groves AK, Anderson DJ.** Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85: 331–343, 1996.
110. **Shi Y, Massagué J.** Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113: 685–700, 2003.
111. **Siwik DA, Colucci WS.** Regulation of Matrix Metalloproteinases by Cytokines and Reactive Oxygen/Nitrogen Species in the Myocardium. *Heart Fail Rev* 9: 43–51, 2004.
112. **Spinale FG.** Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix

Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function. *Physiological Reviews* 87: 1285–1342, 2007.

113. **Su B, Mitra S, Gregg H, Flavahan S, Chotani MA, Clark KR, Goldschmidt-Clermont PJ, Flavahan NA.** Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *Circ Res* 89: 39–46, 2001.
114. **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* 24: 1309–1314, 2004.
115. **Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P.** Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol* 158: 879–891, 2001.
116. **Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK.** MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75: 487–493, 1993.
117. **Tan EM, Glassberg E, Olsen DR, Noveral JP, Unger GA, Peltonen J, Chu ML, Levine E, Sollberg S.** Extracellular matrix gene expression by human endothelial and smooth muscle cells. *Matrix* 11: 380–387, 1991.
118. **Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariatì S, Cohen P, Comb MJ.** FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J* 15: 4629–4642, 1996.
119. **Thyberg J, Hultgårdh-Nilsson A.** Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently. *Cell Tissue Res* 276: 263–271, 1994.
120. **Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griending KK.** p38 Mitogen-activated Protein Kinase Is a Critical Component of the Redox-

sensitive Signaling Pathways Activated by Angiotensin II ROLE IN VASCULAR SMOOTH

121. **Vasilyev N, Williams T, Brennan M-L, Unzek S, Zhou X, Heinecke JW, Spitz DR, Topol EJ, Hazen SL, Penn MS.** Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation* 112: 2812–2820, 2005.
122. **Verheule S, Sato T, Everett T, Engle SK, Otten D, Rubart-von der Lohe M, Nakajima HO, Nakajima H, Field LJ, Olgin JE.** Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF-beta1. *Circ Res* 94: 1458–1465, 2004.
123. **Vita JA, Brennan M-L, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, Penn MS, Keaney JF, Hazen SL.** Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 110: 1134–1139, 2004.
124. **Wang Y, Rosen H, Madtes DK, Shao B, Martin TR, Heinecke JW, Fu X.** Myeloperoxidase inactivates TIMP-1 by oxidizing its N-terminal cysteine residue: an oxidative mechanism for regulating proteolysis during inflammation. *J Biol Chem* 282: 31826–31834, 2007.
125. **Yang JJ, Preston GA, Pendergraft WF, Segelmark M, Heeringa P, Hogan SL, Jennette JC, Falk RJ.** Internalization of Proteinase 3 Is Concomitant with Endothelial Cell Apoptosis and Internalization of Myeloperoxidase with Generation of Intracellular Oxidants. *Am J Pathol* 158: 581–592, 2001.
126. **ZARUBIN T, HAN J.** Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15: 11–18, 2005.
127. **Zhang B, Wu T, Chen M, Zhou Y, Yi D, Guo R.** The CD40/CD40L system: a new therapeutic target for disease. *Immunol Lett* 153: 58–61, 2013.

128. **Zhang C, Patel R, Eiserich JP, Zhou F, Kelpke S, Ma W, Parks DA, Darley-USmar V, White CR.** Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 281: H1469–75, 2001.
129. **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* 276: 27159–27165, 2001.
130. **Zhang R, Brennan M-L, 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* 286: 2136–2142, 2001.
131. **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* 286: 2136–2142, 2001.
132. **Zheng L, Nukuna B, Brennan M-L, Sun M, Goormastic M, Settle M, Schmitt D, Fu X, Thomson L, Fox PL, Ischiropoulos H, Smith JD, Kinter M, Hazen SL.** Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest* 114: 529–541, 2004.
133. **Zheng L, Settle M, Brubaker G, Schmitt D, Hazen SL, Smith JD, Kinter M.** Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages. *J Biol Chem* 280: 38–47, 2005.
134. **Zou M-H, Shi C, Cohen RA.** Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *J Clin Invest* 109: 817–826, 2002.
135. Prognostic Value of Myeloperoxidase in Patients with Chest Pain —

10. Danksagung

Für die langjährige Betreuung und Unterstützung möchte ich der Gesamten Forschungsgruppe unter Prof. Baldus herzlich danken. Insbesondere Herrn Prof. Dr. Stephan Baldus, Frau Dr. Anna Klinke und Frau Dr. Denise Lau für die sorgfältige und umfassende Ausbildung. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Stefan Blankenberg und Frau Dr. Tanja Zeller für das weitere zur Verfügung stellen der Laboratorien nach Umzug der Forschungsgruppe. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Alexander Schwörer für die sehr hilfreichen Tips zur Erstellung von Grafiken und Fortführung des Mentorings.

11. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

12. Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: