

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Kardiologie und Angiologie der Medizinischen
Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expressionsanalyse immunoproteasomaler
Untereinheiten nach Stimulation von Makrophagen,
glatten Muskelzellen und Endothelzellen mit
atheroskleroserelevanten Mediatoren

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Ertl
aus Dachau

Datum der Promotion: 05.06.2016

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ubiquitin Proteasom System	1
1.1.1	Aufbau des Proteasoms	1
1.1.2	Funktionen des UPS	3
1.2	Immunoproteasom	5
1.3	Atherosklerose	7
1.3.1	Atherosklerotische Gefäßwandveränderungen	7
1.4	Proatherosklerotische Mediatoren und Zytokine	10
1.4.1	OxLDL in der Atherosklerose	10
1.4.2	IFN γ in der Atherosklerose	11
1.4.3	TNF α in der Atherosklerose	11
1.4.4	Weitere Zytokine in der Atherosklerose	12
1.5	UPS und Atherosklerose	13
1.6	Immunoproteasom und Atherosklerose	14
1.7	Ziel der Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Lipoproteingewinnung und -aufbereitung	17
2.1.1	Isolierung humaner Lipoproteine	17
2.1.2	Dialyse des LDL	18
2.1.3	Oxidation des LDL	18
2.1.4	Bestimmung des Oxidationsgrades	18
2.2	Zellkultur	19
2.2.1	THP-1 Zellen	20
2.2.2	Humane Nabelschnur-Endothelzellen	20
2.2.3	Humane aortale glatte Muskelzellen	21
2.2.4	Zellstimulation	21
2.3	Materialgewinnung	22
2.3.1	Isolierung von Proteinen	22
2.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	23
2.3.3	Isolierung von RNA	23
2.3.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA	23
2.4	Western Blot	24
2.4.1	Elektrophorese	25
2.4.2	Blotten	25
2.4.3	Umsetzung der Blots mit Antikörpern	26
2.4.4	Ladekontrollen der Western Blots	26
2.5	RNA-Analyse	27
2.5.1	Reverse Transkription, DNase-Verdau	27
2.5.2	Real-Time-RT-PCR	28
2.6	Durchflusszytometrie	29

2.7	Ölrot-O-Färbung	30
2.8	Häufig verwendete Materialien und Lösungen	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Induzierbarkeit immunoproteasomaler Untereinheiten in atheroskleroserelevanten Zellen	33
3.2	Immunoproteasomale Untereinheiten in Makrophagen	35
3.2.1	Charakterisierung der verwendeten THP1-Zellen	35
3.2.2	Stimulation von THP1-Makrophagen mit $IFN\gamma$	37
3.2.3	Stimulation von THP1-Makrophagen mit oxLDL	38
3.2.4	Stimulation von THP1-Makrophagen mit IL-12 und IL-18	40
3.2.5	Stimulation von THP1-Makrophagen mit IL-1 β	41
3.2.6	Stimulation von THP1-Makrophagen mit $TNF\alpha$	44
3.3	Immunoproteasomale Untereinheiten in vaskulären glatten Muskelzellen	46
3.3.1	Stimulation von HAoSMC mit $IFN\gamma$	46
3.3.2	Stimulation von HAoSMC mit IL-1 β oder $TNF\alpha$	46
3.4	Immunoproteasomale Untereinheiten in Endothelzellen	49
3.4.1	Stimulation von HUVEC mit $IFN\gamma$	49
3.4.2	Stimulation von HUVEC mit oxLDL	49
3.4.3	Stimulation von HUVEC mit IL-1 β oder $TNF\alpha$	49
3.5	Übersicht über alle Stimulationen in Tabellenform	53
4	Diskussion	55
4.1	Expression von immunoproteasomalen Untereinheiten in der Plaque	56
4.2	$IFN\gamma$ - potentester Induktor von immunoproteasomalen Untereinheiten in atheroskleroserelevanten Zellen	57
4.3	$TNF\alpha$ - Modulator der immunoproteasomalen Expression	58
4.4	Immunoproteasomale Untereinheiten werden durch IL-12, IL-18 und IL-1 β nicht induziert	59
4.4.1	Interleukin-12 und Interleukin-18	59
4.4.2	Interleukin-1 β	60
4.5	OxLDL hat keinen Einfluss auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten	60
4.6	Ausblick	61

Zusammenfassung

Atherosklerose wird als eine multifaktoriell bedingte, chronische Inflammation der Gefäßwand verstanden.

Das Ubiquitin Proteasom System (UPS) ist nicht nur der Hauptdegradationsweg intrazellulärer Proteine, sondern auch entscheidend beteiligt an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Vorgänge. Neben dem konstitutiven 26S Proteasom existiert eine weitere, induzierbare Form des Proteasoms, das Immunoproteasom. Immunoproteasomen zeigen eine hohe Grundexpression in immunologisch relevanten Zellen, während sie in nichtimmunologischen Geweben basal sehr niedrig exprimiert sind, jedoch durch Zytokine induziert werden können.

Wichtige, vom UPS beeinflusste Prozesse wie Inflammation, Proliferation, Zellzyklus und Apoptose sind auch von zentraler Bedeutung für die Initiation und Progression der Atherosklerose. Erste experimentelle Daten lassen vermuten, dass das UPS an den pathophysiologischen Prozessen der Atherogenese beteiligt ist. Darüber hinaus könnte eine eigenständige Bedeutung, unabhängig vom konstitutiven Proteasom für das Immunoproteasom vermutet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grundexpression und die Induzierbarkeit von immunoproteasomalen Untereinheiten in Endothelzellen, Makrophagen und vaskulären glatten Muskelzellen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass in diesen für die Atherosklerose wichtigen Zelltypen Immunoproteasomen neben $\text{IFN}\gamma$ auch durch $\text{TNF}\alpha$ induzierbar sind. Für weitere proinflammatorische Zytokine (IL- 1β , IL-12, IL-18) sowie oxidativ modifiziertes LDL (oxLDL) konnte keine Beeinflussung der Expression immunoproteasomaler Untereinheiten gezeigt werden.

Die vorliegende Arbeit bestätigt $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ als potente Regulatoren der immunoproteasomalen Expression und zeigt, dass IL- 1β , IL-12, IL-18 und oxLDL keinen Einfluss auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten ausüben.

Schlagerwörter: Proteasom, Immunoproteasom, Atherosklerose, vaskuläre Zellen, Zytokine

Abstract

Atherosclerosis is a consequence of oxidative stress and chronic inflammation of the vessel wall.

The Ubiquitin Proteasome System (UPS) is not only the main degradation pathway of intracellular proteins but is also important for the regulation of many cellular processes. There are two types of proteasomes: the constitutive 26S type and an inducible type known as the immunoproteasome. Immunoproteasomes show high basic expression in immunologically relevant cells and can be induced by cytokines in non-immunologic tissues.

Important processes influenced by the UPS such as inflammation and immunoresponse, proliferation, cell cycle and apoptosis are of central importance in the initiation and progression of atherosclerosis. First experimental data suggest that the UPS is involved in pathophysiological processes of atherosclerosis. Furthermore a distinct role of the immunoproteasome, independent of the constitutive proteasome could be suggested.

This study examines the basic expression and inducibility of immunoproteasomal subunits in endothelial cells, macrophages and vascular smooth muscle cells.

I show that in cell types most relevant to atherosclerosis, immunoproteasomes can be induced not only by $\text{IFN}\gamma$ but also by $\text{TNF}\alpha$. Other proinflammatory cytokines ($\text{IL-1}\beta$, IL-12 , IL-18) as well as oxidatively modified LDL (oxLDL) had no effect on the expression of immunoproteasomal subunits.

This study confirms $\text{IFN}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$ as potent regulators of immunoproteasomal expression and shows that $\text{IL-1}\beta$, IL-12 , IL-18 and oxLDL have no influence on the expression of immunoproteasomal subunits.

Keywords: proteasome, immunoproteasome, atherosclerosis, vascular cells, cytokines

1 Einleitung

1.1 Ubiquitin Proteasom System

Die Proteindegradation in eukaryoten Zellen wird durch zwei vorherrschende Systeme realisiert. Neben dem vakuolären System, vertreten durch Lysosomen und Phagosomen, besteht ein Adenosin Triphosphat (ATP)-abhängiges, durch Ubiquitin vermitteltes System, das Ubiquitin Proteasom System (UPS). Während durch Phagozytose aufgenommene Proteine vorwiegend über das vakuoläre System abgebaut werden, sind vor allem intrazelluläre Proteine Substrate der proteasomalen Degradation [48, 80].

Um vom UPS erkannt und im Folgenden durch das Proteasom hydrolysiert zu werden, wird das zu degradierende Protein zunächst durch eine enzymatische Reaktionskaskade mit Ubiquitin kovalent verbunden. Dabei werden in mehreren Durchläufen multiple Ubiquitinmoleküle an das zu degradierende Protein geheftet. Drei Enzyme, Enzym-1 (E1), das Ubiquitin aktivierende Enzym, Enzym-2 (E2), das Ubiquitin konjugierende Enzym und Enzym-3 (E3), die Ubiquitin-Protein-Ligase, katalysieren diese Polyubiquitinierung. Nach Erkennung des Polyubiquitinsignals durch Regulatorkomplexe des Proteasoms wird das Substrat entfaltet, ATP-abhängig in die proteolytische Kammer des Proteasoms transloziert und dort zu kurzen Peptiden hydrolysiert (siehe Abb. 1.1) [25].

1.1.1 Aufbau des Proteasoms

Das 26S-Proteasom

Das 26S-Proteasom (siehe Abb. 1.2) - die zentrale Komponente des UPS - ist ein hochkonservierter 2,5 MDa schwerer, multikatalytischer Proteinasekomplex mit einer Größe von ca. 17 x 11 nm. In eukaryoten Zellen kommt dieser Komplex ubiquitär vor und kann bis zu 1%

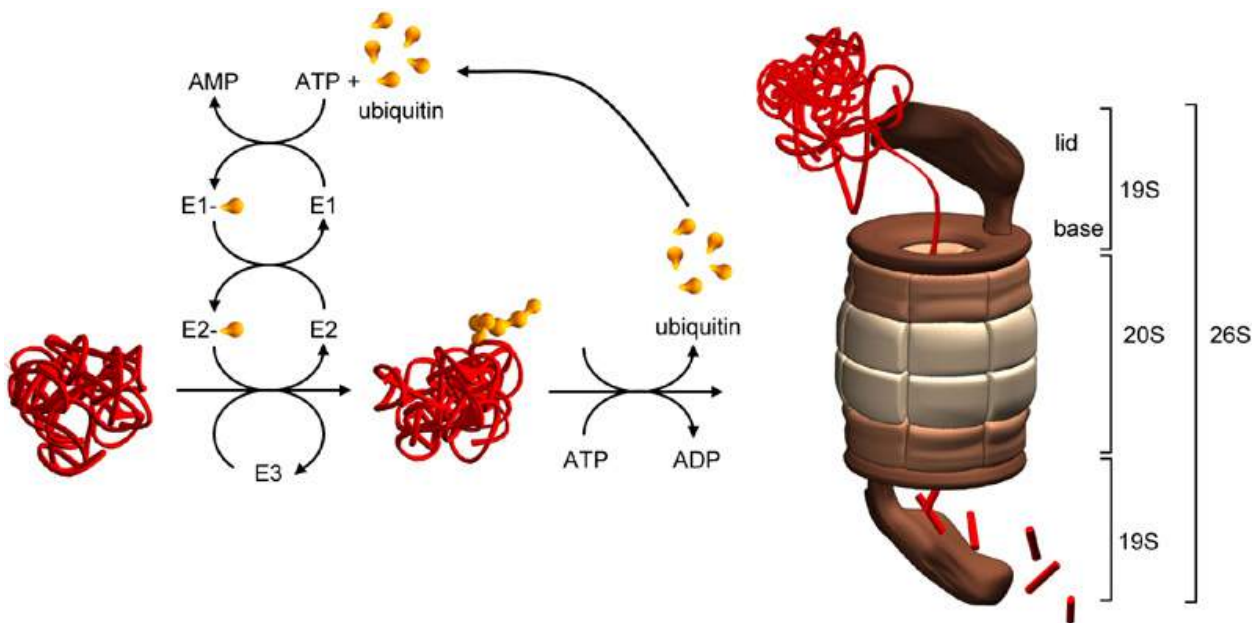


Abbildung 1.1: **Das Ubiquitin-Proteasom-System**

Das UPS besteht aus mehreren Komponenten: dem 26S-Proteasom sowie den Ubiquitin-Ligasen (E1, E2, E3). Durch die Ubiquitin-Ligasen werden Ubiquitin-Moleküle an zu degradierende Proteine angehängt. Diese Polyubiquitinketten dienen als Erkennungssignal für die Degradation durch das 26S-Proteasom. Das 26S-Proteasom setzt sich zusammen aus dem 20S-Kernpartikel sowie zwei, an dessen Enden angelagerten 19S-Regulatorkomplexen. Die 19S-Regulatorkomplexe sind aus zwei Subkomplexen -„base“ und „lid“ - aufgebaut. Die „base“ interagiert direkt mit dem 20S-Proteasom und ist in der Lage die zu degradierenden Proteinsubstrate zu entfalten und ATP-abhängig in die proteolytische Kammer des 20S-Proteasoms zu translozieren (Modifiziert nach Meiners und Ludwig 2008; [70]).

der löslichen Zellproteine ausmachen. Innerhalb der Zelle selbst liegen Proteasomen sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch vor [94].

Das 26S-Proteasom ist aus mehreren Komponenten aufgebaut: einem zylinderförmigen, katalytisch aktiven 20S-Kernpartikel und aussen angelagerten Regulatorkomplexen [100, 25].

20S-Proteasom

Das 20S-Proteasom ist aus vier heptameren Ringen zusammensetzt (siehe Abb. 1.2). Dabei umschließen die beiden außen liegenden α -Ringe die inneren β -Ringe. Die jeweils sieben homologen Untereinheiten der einzelnen Ringe werden entsprechend mit α 1-7, bzw. β 1-7 bezeichnet. Drei der β -Untereinheiten (β 1, β 2, β 5) sind hydrolytisch aktiv und zeigen jeweils eine charakteristische, proteolytische Aktivität: Caspase-, Trypsin-, oder Chymotrypsin-

ähnlich [48, 92].

Die aussen liegenden α -Ringe bilden eine Art „Tor“ und verschließen in Abwesenheit von Regulatorkomplexen durch ihre N-Termini die zentrale Öffnung des Proteasoms [55, 56].

19S-Regulatorkomplex

Der 19S-Regulatorkomplex kann sich an die Enden des zylindrischen 20S-Kernpartikels anlagern und besteht aus mehreren Untereinheiten, die in zwei funktionell verschiedenen Subkomplexen angeordnet sind: „base“ und „lid“ (siehe Abb. 1.2) [83].

Der „lid“ ist aus acht Untereinheiten aufgebaut, die zur Erkennung der polyubiquitinmarkierten Substrate und deren Deubiquitinierung wichtig sind [26].

Die „base“ interagiert mit den α -Ringen des 20S-Proteasoms und besteht aus insgesamt neun Untereinheiten, wovon sechs ATPase-Aktivität zeigen [82]. Die durch ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie wird zur Auflösung der Tertiärstruktur der zu degradierenden Proteine eingesetzt. Die „base“ ist neben der Entfaltung des zu degradierenden Proteinsubstrates auch für dessen Translokation ins katalytische Zentrum des Proteasoms verantwortlich.

1.1.2 Funktionen des UPS

Das UPS ist das zentrale Proteinabbausystem der Zelle und besetzt eine Schlüsselstelle in der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse. Ein funktionierendes UPS ist essentiell für die zelluläre Homöostase.

Eine der Hauptfunktionen des UPS ist der Abbau dysfunktionaler Proteine. Ein großer Teil der Substrate besteht dabei aus fehlerhaft synthetisierten, bzw. fehlgefalteten Proteinen, sogenannten Defective Ribosomal Products (DRIP's), aber auch aus posttranslational, zum Beispiel durch oxidativen Stress beschädigten Proteinen [86, 29, 7].

Eine weitere wichtige Funktion des UPS besteht darüber hinaus in der Antigenprozessierung im Rahmen der Immunabwehr. Dazu werden die nach proteasomaler Degradation entstehenden Peptide in den Major Histocompatibility Complex I (MHC I) integriert und auf der Zelloberfläche präsentiert [55, 56].

Da Proteine mit regulatorischer Funktion zu den proteasomalen Substraten zählen, beeinflusst das Proteasom auch Zellregulation, Zellzyklus und Apoptose. Über gesteigerte oder verminderte Proteolyse regulatorischer Proteine ist es dem UPS möglich, in essentielle zelluläre Prozesse einzugreifen. Zu den proteasomalen Substraten zählen dabei unter anderem

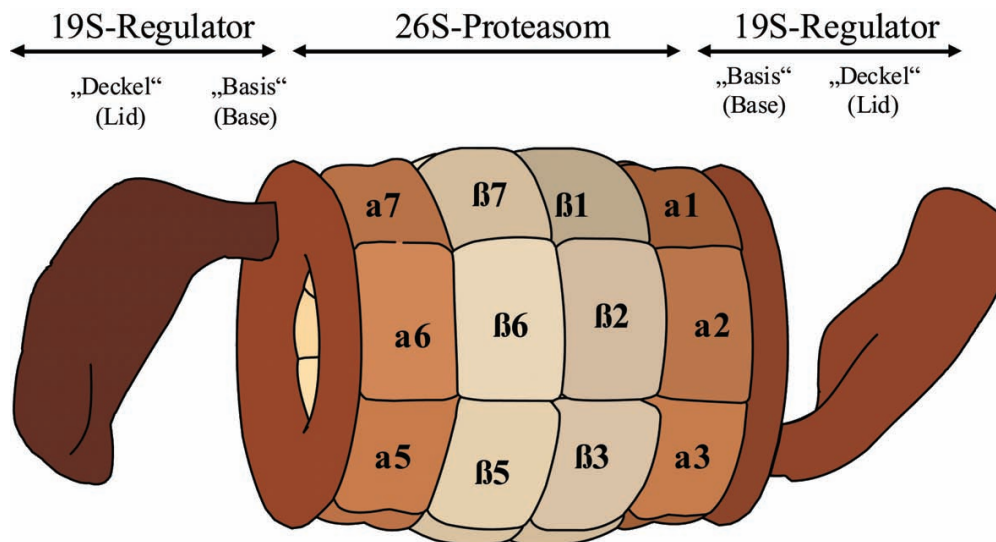


Abbildung 1.2: **Aufbau des 26S-Proteasom**

Das konstitutive 26S-Proteasom setzt sich zusammen aus einem katalytisch aktiven Zentrum, dem 20S-Proteasom, und zwei 19S-Regulatorkomplexen. Das 20S-Proteasom besteht aus vier aneinandergelagerten, heptameren Ringen. Die einzelnen Ringe werden als α - und β -Ringe bezeichnet. Zwei identische β -Ringe, bestehend aus den Untereinheiten $\beta 1$ - $\beta 7$ werden von zwei identischen α -Ringen, bestehend aus den Untereinheiten $\alpha 1$ - $\alpha 7$ umschlossen. Jeder der beiden β -Ringe enthält drei katalytisch aktive Untereinheiten, $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$. Der 19S-Regulatorkomplex, der an beiden Enden des 20S-Proteasoms angelagert ist, besteht aus zwei Anteilen, einer „base“, die mit den α -Ringen des 20S-Proteasoms interagiert, und einem „lid“, dessen Funktion in Substratbindung und Deubiquitinierung besteht. (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. A. Ludwig)

Transkriptionsfaktoren wie $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Nuclear Factor κB) [90], Nrf2 (NF-E2 related factor 2) [11] und Hif-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) [49]) sowie wichtige Regulatoren von Zellzyklus und Apoptose wie p53 und Bcl-2 (B Cell Lymphoma-2 Protein) [47, 5, 9].

In Reaktion auf verschiedene physiologische und pathologische Veränderungen ist eine Anpassung der Proteasomaktivität essentiell für eine normale Funktion der Zelle. Ein funktionell eingeschränktes UPS wird daher im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen gesehen.

Mittlerweile konnte eine Dysregulation des UPS in der Pathophysiologie maligner Erkrankungen, genetischer Syndrome und neurodegenerativer Erkrankungen [78, 14, 51] gezeigt werden.

Immer mehr Daten unterstützen aktuell die Hypothese, dass das UPS auch eine wichtige

Rolle in der Initiation und Progression der Atherosklerose spielen könnte [40, 43, 104].

1.2 Immunoproteasom

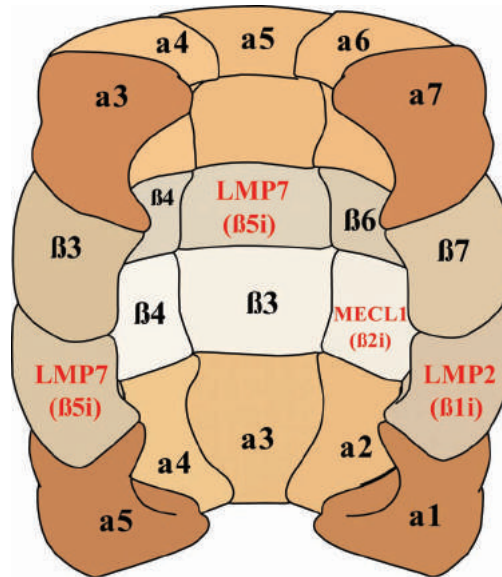


Abbildung 1.3: **Aufbau des Immunoproteasoms**

IFN γ kann die Expression dreier alternativer katalytisch aktiver proteasomaler β -Untereinheiten induzieren. Diese Untereinheiten sind homolog zu den konstitutiven proteasomalen Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 und werden bezeichnet mit LMP2 (β_{1i}), MECL1 (β_{2i}) und LMP7 (β_{5i}) bezeichnet. Immununtereinheiten können ausschließlich in de novo synthetisierte Proteasomen integriert werden. 20S-Proteasomen mit inkorporierten Immununtereinheiten werden als Immunoproteasomen bezeichnet (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. A. Ludwig).

IFN γ kann die Synthese dreier proteasomaler β -Untereinheiten mit katalytischer Aktivität induzieren. Diese können in neu entstehende Proteasomen inkorporiert werden und die konstitutiv exprimierten katalytisch aktiven β -Untereinheiten (β_1 , β_2 , β_5) ersetzen. Entsprechend ihrer homologen, konstitutiven Untereinheit werden diese induzierbaren Untereinheiten als Immununtereinheiten bezeichnet und mit β_{1i} , β_{2i} und β_{5i} benannt. Synonym wird β_{1i} auch als Low Molecular weight Protein 2 (LMP2), β_{2i} als Multicatalytic Endopeptidase Complex-Like 1 (MECL1) und β_{5i} als Low Molecular weight Protein 7 (LMP7) bezeichnet [55, 37].

Der Einbau der Immununtereinheiten findet überwiegend in *de novo* synthetisierte Pro-

teasomen statt, wobei der Einbau von LMP2 den naszierenden Komplex auf ein Immunoproteasom festlegt [27, 28, 52]. Da der Einbau von Immununtereinheiten nicht absolut stringent erfolgt, werden in geringem Umfang auch Hybridproteasomen mit sowohl konstitutiven als auch induzierbaren proteasomalen Untereinheiten generiert [52, 13, 12].

In immunologisch aktiven Zellen von Thymus, Milz und Lymphknoten werden Immunoproteasomen konstitutiv exprimiert und sind in hohen Konzentrationen nachweisbar [16, 66, 75, 91, 20]. Eine generell hohe Expression immunoproteasomaler Untereinheiten ließ sich auch in immunprivilegierten Geweben wie Auge und Gehirn zeigen [89].

Im Vergleich zur Entstehung konstitutiver Proteasomen ist die Entstehung von Immunoproteasomen deutlich beschleunigt, während gleichzeitig deren Halbwertszeit stark vermindert ist. Für humane Immunoproteasomen konnte eine Halbwertszeit von 27 Stunden ermittelt werden, während im Gegensatz dazu die Halbwertszeit konstitutiver Proteasomen zwischen acht und zwölf Tagen liegt [93, 38].

Damit zeigen Immunoproteasomen typische Charakteristika zytokinmodulierter Enzyme und können als schnelle, transiente Antwort der Zelle auf veränderte Anforderungen verstanden werden.

Auch wenn eine der wichtigsten Funktionen des Immunoproteasoms bisher im Rahmen der Antigenpräsentation verstanden wird, ist davon auszugehen, dass es weitere zelluläre Prozesse gibt, die durch Immunoproteasomen maßgeblich beeinflusst werden [106].

Es gibt Hinweise darauf, dass eine erhöhte Expression von Immunoproteasomen in entzündlich verändertem Gewebe in direktem Zusammenhang mit einer erhöhten Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ steht.

$\text{NF}\kappa\text{B}$ ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression inflammatorischer Proteine induziert. In unstimulierten Zellen liegt $\text{NF}\kappa\text{B}$ als Dimer, gebunden an ein inhibitorisches Protein, $\text{I}\kappa\text{B}$, im Zytosol vor. Das UPS ist durch die Katalysierung zweier essentieller Schritte an der Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ beteiligt, zum einen an der Prozessierung der funktionell aktiven p50-Untereinheit aus einem Vorläuferprotein und zum anderen an der Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}$ [47].

Es konnte gezeigt werden, dass Immunoproteasomen $\text{I}\kappa\text{B}$ -Proteine deutlich schneller ab-

bauen als konstitutive Proteasomen [99] und damit inflammatorische Prozesse anders beeinflussen als das konstitutive Proteasom.

Weiterhin konnte in tierexperimentellen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass mit zunehmendem Lebensalter der relative Anteil immunoproteasomaler Untereinheiten auch in nichtimmunologischen Geweben, wie postmitotischen Nerven- und Muskelzellen, steigt. Deshalb wird im Rahmen von Alterungsprozessen eine weitere, nicht mit dem Immunsystem in Zusammenhang stehende Funktion des Immunoproteasoms, vermutet [18].

1.3 Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind führend in der weltweiten Todesursachenstatistik und werden Schätzungen der World Health Organisation zufolge in den kommenden Jahren weiter an Bedeutung gewinnen [68]. Atherosklerose ist als Hauptursache kardiovaskulärer und zerebrovaskulärer Ereignisse entscheidend verantwortlich für die Mortalität in der industrialisierten, westlichen Welt [30, 65].

Atherosklerose wird heute als eine multifaktoriell bedingte, chronische Inflammation des Endotheliums und Subendotheliums verstanden. Die chronische Inflammation der arteriellen Gefäßwand resultiert aus einer Interaktion zwischen in die Gefäßwand eingelagerten, oxidativ modifizierten Lipoproteinen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Makrophagen, Lymphozyten und einer Vielzahl von modulierenden Zytokinen und Mediatoren [33, 81].

In die Pathogenese der Atherosklerose sind sowohl genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren involviert. Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Atherosklerose zählen arterielle Hypertonie, Hyperlipoproteinämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Lebensalter und familiäre Prädisposition [65].

1.3.1 Atherosklerotische Gefäßwandveränderungen

Die atherosklerotische Plaque (siehe Abb. 1.4) lässt sich nach ihrem histologischen Bild in mehrere Stadien einteilen (siehe Tab. 1.1). Ausgelöst durch oxidative Belastung und veränderte Strömungsverhältnisse kommt es initial zu einer Endothelschädigung mit morphologischen und funktionellen Alterationen des Endotheliums [81].

Eine der ersten nachweisbaren Veränderungen im Rahmen der Atherosklerose ist dabei die

endotheliale Dysfunktion, die Verminderung oder gar der Verlust der endothelvermittelten Vasodilatation, die für alle Stadien der Atherosklerose charakteristisch ist [21].

Die Schädigung der Endothelzellen führt zu gesteigerter endothelialer Permeabilität und intimaler Lipoproteinablagerung. Im subintimalen Raum können Low Density Lipoproteine (LDL) von freien Radikalen geschädigt werden und zur Entstehung von oxidativ modifizierten LDL (oxLDL) führen. Zunehmende Akkumulation von oxLDL regt Endothelzellen zur Expression von Chemokinen (Monocyte Chemoattractant Protein-1(MCP-1)), Adhäsionsmolekülen (E-Selektin, P-Selektin, Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 (ICAM-1)), Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)), Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Macrophage Colony Stimulation Factor (M-CSF)) an, wodurch Monozyten und T-Lymphozyten vermehrt in den subintimalen Raum transmigrieren können. Gefördert von M-CSF wird eine Umwandlung von Monozyten in Makrophagen angeregt, welche wiederum durch übersteigerte oxLDL-Phagozytose zu lipid- und cholesterinüberladenen Makrophagen, sogenannten Schaumzellen werden [33].

Als sichtbare atherosklerotische Frühveränderung entstehen subendothelial gelegene Fettstreifen („fatty streaks“). Diese bestehen im wesentlichen aus intimal retinierten, amorphen Lipidtropfen, Schaumzellen und Lymphozyten [35]. Durch zelluläre Interaktion und Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wird die entzündliche Reaktion in der entstehenden Plaque gefördert und aufrechterhalten [79].

Persistierende inflammatorische Prozesse führen über die Ausschüttung von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 (IL-1) und Basic-Fibroblast-Growth-Factor zur Migration glatter Muskelzellen in den subendothelialen Raum. Beeinflusst durch die lokale Mikroumgebung proliferieren die glatten Muskelzellen und entwickeln sich von rein kontraktiven Zellen zu einem synthetisierenden Phänotyp und setzen extrazelluläre Matrixproteine frei. Es kommt zunehmend zu Fibrosierungen und zur Ausbildung einer bindegewebigen Kappe über der Plaqueregion, die letztlich regressiv verkalkt [79].

Im weiteren Verlauf kommt es im zentralen Bereich der Plaque zunehmend zu Apoptose. Das im Rahmen der entzündlichen Prozesse freigesetzte $\text{IFN}\gamma$ hemmt die Produktion von extrazellulärer Matrix. Zusätzlich destabilisieren von Makrophagen freigesetzte Matrixmetalloproteinasen die fibröse Kappe der atherosklerotischen Läsion. Dies kann insbesondere im Randbereich der Plaque zum Auftreten von Ulzerationen und zur Entstehung von Plaquesfissuren führen. Durch Freisetzung von cholesterinhaltigem Plaquematerial und thrombogenem

Tabelle 1.1: **Stadien atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen; modifiziert nach W. Böcker [101] und R. Virmani [79]**

Typ	Läsionstyp	Morphologie
I	Initialläsion	Einlagerung oxidativ modifizierter Lipoproteine und Makrophagen in die Gefäßwand; Ansammlung von lipid- und cholesterinüberladenen Makrophagen (Schaumzellen)
II	„fatty streak“	überwiegend intrazelluläre Akkumulation von Lipiden und oxidierten Lipiden; Myofibroblastenproliferation und Migration glatter Muskelzellen aus der Media in den subintimalen Raum; Freisetzung von M-CSF
III	Intermediärläsion	(Prä-Atherom); Fettstreifen mit zunehmend auch extrazellulärer Lipidanreicherung sog. Lipidplaques
IV	Atherom	deutliche extrazelluläre Lipidablagerungen mit abgrenzbarem Lipidkern
V	Fibroatherom	Läsion mit teilweise Verkalkungen und Kollagenschicht zum Gefäßlumen hin
VI	komplizierte Läsion	fibroatheromatöse Plaque mit Oberflächendefekt/Plauefissur; Hämorrhagien; Thrombenbildung

Tissue-Factor können Thromben entstehen und damit akute vaskuläre Ereignisse auftreten [79].

1.4 Proatherosklerotische Mediatoren und Zytokine

1.4.1 OxLDL in der Atherosklerose

Die physiologische Funktion von LDL ist der Transport von Cholesterin zu peripheren Geweben. LDL-Partikel bestehen aus einem hydrophoben Kern, einer oberflächlichen Schicht von polaren Lipiden und Apolipoprotein B-100 (ApoB-100). Im peripheren Gewebe werden die LDL-Partikel über LDL-Rezeptoren, die eine N-terminale Domäne des ApoB-100 erkennen, nach intrazellulär aufgenommen. Erhöhte LDL-Cholesterinwerte im Serum korrelieren positiv mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse [24].

Durch oxidative Modifikationen kann es zu Veränderungen sowohl im Lipid- als auch im Proteinanteil des LDL und damit zur Entstehung von oxLDL kommen. Während minimal oxidiertes oxLDL noch über LDL-Rezeptoren gebunden und metabolisiert werden kann, werden massiv veränderte oxLDL nicht mehr von diesen Rezeptoren erkannt. Stark veränderte

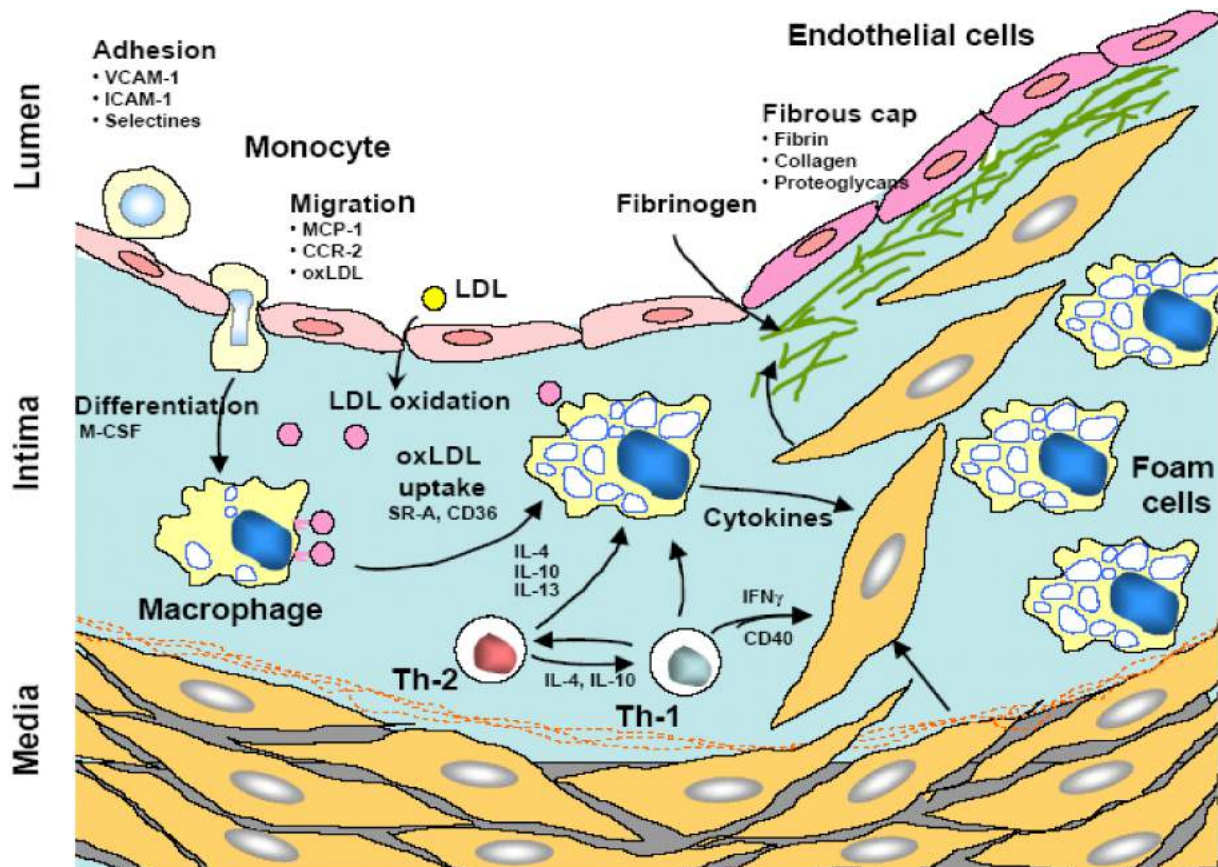


Abbildung 1.4: **Prozesse in der atherosklerotischen Plaque**

Aktivierte Endothelzellen exprimieren Adhäsionsmoleküle wodurch die Transmigration von Monozyten in den subendothelialen Raum begünstigt wird. Durch exzessive oxLDL-Phagozytose entstehen aus Makrophagen sogenannte Schaumzellen. Durch Zell-Zell-Interaktionen und freigesetzte Zytokine wird ein chronisch-inflammatorischer Prozess aufrechterhalten. Eingewanderte glatte Muskelzellen sezernieren Matrixproteine, wodurch es zur Ausbildung einer fibrösen, den nekrotischen Kern der Plaque bedeckenden Kappe kommt. (Modifiziert nach Glass und Witztum 2001; [24])

oxLDL-Partikel werden vor allem über Scavenger Rezeptoren (SR) gebunden und phagozytiert [61, 24]. SR werden nicht wie LDL-Rezeptoren über Feedback-Mechanismen reguliert [4]. Exzessive Phagozytose von oxLDL über SR führt zu zellulärer Überladung mit Cholesterin und oxLDL. Aus Makrophagen und auch aus glatten Muskelzellen können so Schaumzellen entstehen [105].

Neben Endothelzellaktivierung [33], Chemoattraktion von Leukozyten [105], proinflammatorischen und proapoptotischen Effekten [81, 105, 24, 74] durch oxLDL kann es im Rahmen der Atherogenese auch zur Ausbildung autoreaktiver Antikörper gegen oxLDL-Bestandteile kommen [45, 98].

Durch oxLDL-Moleküle wird demnach ein proatherosklerotischer, inflammatorischer „circulus viciosus“ in der Gefäßwand initialisiert und aufrechterhalten.

1.4.2 IFN γ in der Atherosklerose

IFN γ ist ein proinflammatorisches Zytokin, das in der atherosklerotischen Plaque von aktivierten Lymphozyten, und Makrophagen/Schaumzellen freigesetzt wird [69]. Die Effekte von IFN γ auf die Zielzelle sind pleiotrop. Im Rahmen der Atherosklerose konnten durch mehrere Tierstudien deutliche proatherosklerotische Effekte von IFN γ gezeigt werden.

Die Administration von IFN γ in ApoE $^{-/-}$ Mäusen führt schneller zur Entstehung atherosklerotischer Veränderungen als in der unbehandelten Kontrollgruppe, wohingegen IFN γ -Rezeptor-Defizienz eine weniger ausgeprägte Atherosklerose zur Folge hat [22]. Sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen bewirkt IFN γ die Expressionssteigerung von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) und fördert durch Freisetzung von Chemokinen wie MCP-1 die Monozyten- und Lymphozyteninfiltration in das Subendothelium [69, 85].

Durch Steigerung der Expression von SR-A und CD36 fördert IFN γ die oxLDL-Phagozytose durch Makrophagen. Bei gleichzeitiger Suppression des zellulären Cholesterin-Efflux führt dies zu gesteigerter Schaumzellenentstehung [69].

Im fortgeschrittenen Plaque bewirkt IFN γ durch Inhibition der glattmuskulären Proliferation und Differenzierung eine verminderte Kollagenproduktion, was zur Destabilisierung der fibrösen Kappe führt und Rupturen begünstigt [69, 63, 32, 57].

1.4.3 TNF α in der Atherosklerose

TNF α wird vor allem von Monozyten und Makrophagen freigesetzt und übt durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B vielfältige biologische Wirkungen aus, worunter vor allem zytotoxische und inflammatorischer Effekte zu betonen sind. TNF α -Effekte werden dabei über zwei Rezeptoren vermittelt, TNF-Rezeptor-1 (TNFR1) und TNF-Rezeptor-2 (TNFR2). Für die Mehrheit der biologischen Effekte ist TNFR1 verantwortlich [54].

Nicht nur für die Atherosklerose, sondern auch im Rahmen metabolischer und inflammatorischer Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Adipositas und rheumatoider Arthritis konnte eine TNF α -Beteiligung nachgewiesen werden [54].

TNF α kann in humanen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. In vitro Studien konnten zeigen, dass TNF α die Permeabilität von Endothelzellen erhöht, die Expression von Adhäsionsmolekülen induziert, sowie die Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren steigert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TNF α die Lipoproteinlipase supprimiert, eine Hypertriglyzeridämie verursacht und damit ungünstigen Einfluss auf den Lipidmetabolismus nimmt [22, 84]. Vermittelt durch NF κ B triggert TNF α eine vaskuläre Inflammation und induziert in Endothelzellen die Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies sowie proteolytischen und prothrombotischen Faktoren [34].

Ein *in vivo*-Modell an Mäusen konnte unter Inhibition von TNF α eine reduzierte Ausprägung der Atherosklerose zeigen [8], während andere Tierstudien an TNFR1-defizienten Mäusen eine unveränderte Plaqueprogression [6] oder sogar eine Zunahme der atherosklerotischen Plaques nachweisen konnten [84].

1.4.4 Weitere Zytokine in der Atherosklerose

Interleukin-1 β

IL-1 zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und kommt in zwei Formen vor, IL-1 α und IL-1 β . Beide Formen wirken über den IL-1-Rezeptor und haben ähnliche biologische Funktionen.

IL-1 β ist in der Plaque nachweisbar und kann von Monozyten/Makrophagen, aber auch glattmuskulären Zellen und Endothelzellen gebildet und freigesetzt werden. Über auto- und parakrine Stimulation und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B löst IL-1 β Effekte

in der Zielzelle aus. In Endothelzellen bewirkt IL-1 β eine Expressionssteigerung von Adhäsionsmolekülen und gesteigerte Transmigration von Leukozyten.

In Tierversuchen konnte durch Suppression von IL-1-Effekten eine insgesamt reduzierte Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen gezeigt werden [54, 53].

Interleukin-12

IL-12 wird in der atherosklerotischen Plaque hauptsächlich von Makrophagen freigesetzt und stimuliert die Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten. IL-12 löst seine Effekte durch Aktivierung von Signal Transducer and Activator of Transkription (STAT)-3 und STAT-4 aus. In T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen induziert IL-12 die Produktion von IFN γ [22, 54].

Die Aorta von ApoE $^{-/-}$ Mäusen zeigte nach Administration von IL-12 größere atherosklerotische Läsionen als die Kontrollgruppe [62]. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigten sich nach funktioneller Blockade des endogenen IL-12 eine um fast 70 % reduzierte Atherosklerose und eine erhöhte Plaquestabilität [36].

Interleukin-18

IL-18 wirkt über Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF κ B und ist ein potenter Induktor von IFN γ . IL-18 zeigt funktionelle Ähnlichkeit mit IL-12, wird aber anders als IL-12 auch in nicht hämatopoetischen Zellen (Nebennierenrindenzellen, Keratinozyten, Osteoblasten, intestinalen Epithelzellen) exprimiert [76].

IL-18 steigert die Expression und Funktion des Fas-Liganden auf T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen und kann die Produktion von Granulozyten Makrophagen-Colony Stimulation Factor (GM-CSF) anregen [76].

Zusammen mit IL-12 ist IL-18 ein sehr potenter Induktor der IFN γ -Freisetzung aus T-Lymphozyten [76, 73, 95].

Die IL-18-Administration ergab eine Vergrößerung der atherosklerotischen Läsionen in ApoE $^{-/-}$ -Mäusen [103], entsprechend konnte auch gezeigt werden, dass IL-18-Defizienz atherosklerotische Veränderungen trotz erhöhter Serumcholesterolvere reduzierte [17].

1.5 UPS und Atherosklerose

Das UPS ist essentiell für das Überleben und die Homöostase aller eukaryoten Zellen. Wichtige vom UPS entscheidend beeinflusste Prozesse wie Inflammation, der Abbau oxidativ modifizierter Proteine, die Proliferation von Zellen, der Zellzyklus und die Apoptose sind auch von zentraler Bedeutung für die Initiation und Progression der Atherosklerose [48, 40, 43]. Folglich könnte eine Dysfunktion des UPS die Atherosklerose begünstigen. Gegenwärtig ist jedoch unklar, in welchem Aktivitätszustand dem UPS eine proatherosklerotische Rolle zukommt. Es wird eine „duale Rolle“ des UPS im Rahmen der Atherosklerose diskutiert [19]. Demnach könnte eine erhöhte Aktivität des UPS über eine gesteigerte Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors $\text{NF}\kappa\text{B}$ die Atherosklerose fördern, andererseits könnte eine Unterfunktion des Systems über eine verminderte Degradation dysfunktionaler Proteine ebenfalls zur Atherosklerose beitragen. Für beide Zustände - erhöhte und verminderte Proteasomaktivität - finden sich Hinweise in der Literatur. Entscheidend scheint dabei die Phase der Atherogenese zu sein, in der ein betroffenes Gefäß auf seine proteasomale Aktivität hin untersucht wird [19, 41]. In frühen Phasen der Atherosklerose könnte die Aktivität des UPS erhöht sein [39, 42]. Vorliegende Daten zur proteasomalen Aktivität in späten Stadien der Atherosklerose sind widersprüchlich. Sowohl eine Aktivitätssteigerung [67] als auch eine reduzierte Aktivität [96] konnten nachgewiesen werden.

Es ist vorstellbar, dass je nach dem Stadium der Atherosklerose der proteasomale Aktivitätszustand einen protektiven oder auch einen schädigenden Effekt ausüben kann. So könnte eine in den Anfangsstadien der Atherogenese erhöhte Proteasomaktivität zu gesteigerter Inflammation und stärkerer Ausprägung der Atherosklerose führen. In fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose ist dagegen denkbar, dass gesteigerte proteasomale Aktivität zu einer Verminderung oxidativ modifizierter Proteine führt und dadurch antiatherogene Effekte zeigt [43].

1.6 Immunoproteasom und Atherosklerose

Publizierte Studien zum UPS in der Atherosklerose beziehen sich entweder ausschließlich auf das konstitutive Proteasom oder untersuchen proteasomale Aktivität, welche in dieser Form nicht zwischen konstitutivem Proteasom und Immunoproteasom zu unterscheiden vermag.

Die Expression und Rolle des Immunoproteasoms in der Atherogenese ist in der erhältlichen Literatur nicht untersucht.

Bislang konnte gezeigt werden, dass gesteigerte immunoproteasomale Aktivität protektiv gegen oxidativen Stress zu wirken und die Akkumulation oxidiertes Proteine zu reduzieren scheint [59, 15]. Auch wird eine immunoproteasomale Beteiligung an der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen und T-Lymphozyten diskutiert [72]. Weiterhin wurden Regulatoren der immunoproteasomalen Expression identifiziert wie Stickstoffmonoxid (NO) und Hitzeschock, die auch im Rahmen der Atherogenese relevant sind [59, 10]. Eine Studie zur Pathophysiologie des M. Crohn ergab, dass ein erhöhter Anteil von Immunoproteasomen in entzündlich verändertem Gewebe in direktem Zusammenhang mit einer gesteigerten NF κ B-Aktivität zu stehen scheint [99, 60].

Diese Studien deuten an, dass Immunoproteasomen pathophysiologische Vorgänge in der Atherogenese beeinflussen könnten. Durch die konstitutive Expression des Immunoproteasoms in Zellen des Immunsystems (Makrophagen, T-Zellen, dendritische Zellen) könnte dem Immunoproteasom möglicherweise eine entscheidende Rolle zukommen.

1.7 Ziel der Arbeit

Wie im vorangehenden Abschnitt dargelegt, kann für das Immunoproteasom eine Rolle im Rahmen der Atherogenese vermutet werden.

In Paraffinschnitten humaner atherosklerotischer Plaques konnte N. Wilck (Kardiologisches Forschungslabor der Klinik für Kardiologie, Charité Berlin Mitte; unveröffentlichte Daten) neben einer ausgeprägten Expression der immunoproteasomalen Untereinheit LMP7 eine deutliche Kolo-kalisation mit CD68, einem Makrophagenmarker zeigen.

Eine systematische Untersuchung der Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in für die Atherosklerose relevanten Zelltypen ist bisher nicht publiziert.

Für die vorliegende Arbeit ergab sich daraus die folgende Fragestellung:

- Ist die Expression von immunoproteasomalen Untereinheiten durch pro-atherogenetische Stimulation in Atherosklerose-relevanten Zelltypen *in vitro* induzierbar? Untersucht werden sollen Endothelzellen, vaskuläre glatte Muskelzellen und Makrophagen.

2 Material und Methoden

2.1 Lipoproteingewinnung und -aufbereitung

Zur Gewinnung von LDL aus humanem Serum wurde die fraktionierte Ultrazentrifugation durchgeführt.

Tabelle 2.1: Material zur LDL-Präparation

Material	Hersteller
L-70 Ultrazentrifuge mit Rotor SW41	Beckmann
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
UV-Lampe	Biometra
EDTA-Monovetten (9ml)	Sarstedt
Ultra-Clear Zentrifugenröhrchen	Beckmann
Dialysierschlauch aus Zellulose	Roth
Sterilfilter ($2\mu\text{m}$)	Sarstedt
Paragon Lipogel-Kit	Beckmann Coulter

2.1.1 Isolierung humaner Lipoproteine

Als Ausgangsmaterial zur LDL-Präparation dienten pro Präparationszyklus 100 ml humanes Vollblut, welches in 9 ml EDTA-Monovetten gesammelt wurde. Nach Zentrifugation bei 4500 rpm für 15 Minuten wurden die zellulären Bestandteile verworfen. Das gewonnene Plasma wurde gleichmäßig auf insgesamt sechs Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und mit je 3,5 ml Dichtelösung 1 (s. Tabelle 2.2) vorsichtig überschichtet. Im Anschluss daran erfolgte ein 20 stündiger Ultrazentrifugationsschritt mit 40 000 rpm im Vakuum bei 17 °C. Nach diesem Schritt ist eine Aufteilung der Plasmabestandteile in verschieden gefärbte Banden zu erkennen. Im obersten Abschnitt befinden sich in einer milchig-weißen Schicht oberhalb der klaren Dichtelösung 1 die Chylomikronen. Dieser Bereich wurde abpipetiert und verworfen. Die Dichtelösung 1 sowie die zuunterst befindliche goldgelbe Lage, welche sowohl die LDL- als auch die HDL-Partikel enthält, wurden getrennt voneinander abgenommen und gepoolt. Im

nächsten Schritt erfolgte die vollständige Resuspension der LDL-Fraktion in Dichtelösung 1 in einem Gesamtvolumen von 42 ml. Nach Zugabe von 21 ml Dichtelösung 2 (s. Tabelle 2.2) fand der zweite Ultrazentrifugationsschritt unter den oben genannten Zentrifugationseinstellungen statt. Nach Beendigung befindet sich im obersten, gelb gefärbten Abschnitt der Flüssigkeitssäule das native LDL.

Tabelle 2.2: **Dichtelösungen zur LDL-Präparation**

Dichtelösung 1 (1,006 g/ml)	Dichtelösung 2 (1,184 g/ml)
11,4 g NaCl	24,98 g NaBr/100 ml
0,1 g Na ₂ EDTA	Dichtelösung 1
1 ml 1N NaOH	
Aqua bidest. ad 1 Liter	

2.1.2 Dialyse des LDL

Durch Dialyse erfolgte der Austausch der salzhaltigen, das LDL-umgebenden Dichtelösung gegen PBS. Dazu wurde ein Dialysierschlauch aus regenerierter Zellulose verwendet. Nach fünfstündiger Dialyse in einem Liter PBS unter Rühren erfolgte ein PBS-Wechsel und eine Fortsetzung der Dialyse über Nacht bei 4 °C.

2.1.3 Oxidation des LDL

Die LDL-Oxidation wurde mittels ultraviolettem Licht durchgeführt. Mit PBS wurde die Konzentration der LDL-Lösung auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Je 3,5 ml dieser LDL-Lösung wurden in 6 cm Petrischalen gefüllt und für eine Stunde unter UV-Licht oxidiert. Alle 10 Minuten erfolgte eine fünfminütige Kühlung auf Eis sowie die Zugabe von 30 μl destilliertem Wasser zum Ausgleich von Verdunstungsverlusten.

Im Anschluss an den Oxidationsvorgang wurde die oxLDL-Lösung mittels eines Sterilfilters sterilisiert. Die Konzentration wurde mittels BCA-Assay (siehe 2.3.2) bestimmt, der Oxidationsgrad wurde anhand einer Lipogel-Gelelektrophorese ermittelt.

2.1.4 Bestimmung des Oxidationsgrades

Durch Oxidation von LDL-Partikeln wird der Proteinanteil dahingehend verändert, dass zunehmend anionische Valenzen entstehen. Dadurch nimmt auch die anionische, elektrophoretische Migration des LDL zu. Diese Vorgänge macht sich die Lipogel-Gelelektrophorese zu

Nutze. Die Laufstrecke des oxLDL nimmt dabei, als eine Funktion von Partikelgröße und elektrischer Ladung, mit zunehmendem Oxidationsgrad stetig zu. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Charakterisierung des Oxidationsgrades der oxLDL-Partikel die Laufstrecke, des mit UV-Licht behandelten oxLDL, im Vergleich zu nicht behandeltem LDL bestimmt. Die Oxidationsgradbestimmung erfolgte mittels des Paragon Lipogel-Kit und wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2 Zellkultur

Sofern bei den einzelnen Unterpunkten nicht gesondert erwähnt, wurden für die Zellkultur die in Tabelle 2.3 aufgeführten Materialien verwendet.

Tabelle 2.3: **Zellkulturmaterial**

Material	Hersteller
Brutschrank	Heraeus Instruments
Lichtmikroskop	Leica
Zentrifuge 5415C	Heraeus Instruments
Sterilbank (Lamin Air, HBB2448)	Heraeus Instruments
Wasserbad 1902	GFL
THP1-Zelllinie	ATCC
RPMI 1640	Gibco
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	SIGMA
Erythrosin B Stain Solution	ATCC
HUVEC	Selbstpräparation
Kollagenase TypII	Biochrom
HAoSMC	Provitro
DMEM-Medium	Invitrogen
Selen	Sigma
EZ-Medium	
MCDB 131	Gibco
2% Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
20 ng/ml Endothelzell-Wachstumsfaktor (ECGF)	Promocell
0,1 ng/ml Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Biomol
1,1 mg/ml basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	Biomol
1 mg/ml Hydrocortison	Sigma
5 U/ml Heparin	Biochrom
5 U/ml Penicillin/Streptomycin	Biochrom
2 mM L-Glutamin	Gibco
100 nM Selen	Sigma

2.2.1 THP-1 Zellen

Die humane Monozytenzelllinie THP1 wurde entsprechend den Herstellerangaben kultiviert. Nach dem Auftauen erfolgte eine Vermehrung der Zellen in Suspensionskultur mit RPMI 1640, welches mit 10% fetalem Kälberserum sowie 1% Penicillin/Streptomycin supplementiert und alle zwei bis drei Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt wurde. Als Suspensionszellen wurden die THP1-Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen bei 37 °C, mit 5% CO_2 -Begasung und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in Begasungsbrutschränken kultiviert. Das Passagieren und Splitten der Zellen erfolgte alle sieben Tage. Die Zellen wurden für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in frischem Nährmedium resuspendiert. Zur Vitalitätsprüfung und Zellzahlbestimmung wurden die Zellen wöchentlich vor dem Splitten mit Erythrosin gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Nährmedium auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt und zu je 12 ml auf frische 25 cm^2 Zellkulturflaschen verteilt. Zur Stimulation wurden nur THP1-Zellen bis maximal Passage 15 eingesetzt, die eine Vitalität von über 95 % zeigten.

Makrophagendifferenzierung

Die Ausdifferenzierung der Monozyten zu adhärenenten Makrophagen erfolgte durch 72 h Inkubation der Zellen mit 20 ng/ml Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) in Kulturmedium. Hierzu wurden die Zellen für 5 min mit 1000 rpm abzentrifugiert, das Medium gewechselt, und die Zelldichte mit frischem Medium auf $3,5 \times 10^5$ /ml eingestellt. Nach PMA-Zugabe wurde die Zellsuspension zu je 4 ml auf 6 cm Petrischalen verteilt. Nach Ausdifferenzierung der Monozyten zu Makrophagen und der damit einhergehenden Adhäsion der Zellen, erfolgten zwei Waschschrirte mit 2 ml HBSS sowie ein Mediumwechsel. Im Anschluss an 24 Stunden Nachdifferenzierungszeit in Kulturmedium erfolgte die Zellstimulation der THP1-abgeleiteten Makrophagen in RPMI 1640 supplementiert mit 1% FCS sowie 1% Penicillin/Streptomycin.

2.2.2 Humane Nabelschnur-Endothelzellen

HUVEC-Isolierung

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) wurden durch Kollagenase-Verdau aus humanen Nabelschnüren in einer Standardtechnik isoliert und in Endothelzell (EZ)-Medium

kultiviert. Dazu wurde die Umbilikalvene der Nabelschnur mit 2 x 20 ml 37°C warmem HBSS und, um HBSS-Rückstände zu entfernen, anschließend mit einigen Tropfen Kollagenase Typ-II gespült. Um die Endothelzellen herauszulösen wurde die Umbilikalvene an einer Seite abgeklemmt, die Vene vollständig mit Kollagenase gefüllt und für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Kollagenase und herausgelöste Endothelzellen wurden in einem 50 ml Plastikröhrchen aufgefangen. Mit 2 x 20 ml HBSS wurde nachgespült. Es erfolgten 5 Minuten Zentrifugation bei 1200 rpm. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in EZ-Medium resuspendiert und zu je 15 ml in 75 cm² Zellkulturflaschen überführt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Die HUVEC-Reinheit wurde durch morphologische Kriterien (cobblestone-shape) kontrolliert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt. Bei 80% Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert und bis maximal Passage drei für die Zellstimulation verwendet.

Trypsinieren und Ausplattieren der HUVEC

Nach Absaugen des EZ-Mediums wurden die adhärennten Zellen mit 8 ml 37 °C warmem HBSS gespült und mit 2,5 ml Trypsin benetzt. Durch Klopfen der Zellkulturflasche wurden die Zellen abgelöst. Durch Zugabe von 8 ml EZ-Medium wurde der Trypsinierungsvorgang gestoppt, die Zellen im Anschluss in weiteren 25 ml Medium resuspendiert und auf Zellkulturschalen aufgeteilt.

2.2.3 Humane aortale glatte Muskelzellen

HAoSMC (Human Aortic Smooth Muscle Cells) wurden von der Firma Provitro bezogen, in DMEM-Medium mit 10% inaktiviertem FCS, 5% Penicillin/Streptomycin und 100 nM Selen kultiviert. Voll konfluente Zellkulturschalen wurden gesplittet. Die Zellstimulationen wurde bei 80% Konfluenz durchgeführt. HAoSMC wurden bis maximal Passage 15 für die Versuche eingesetzt.

2.2.4 Zellstimulation

THP1-abgeleitete Makrophagen, HAoSMC und HUVEC wurden für 24 Stunden mit oxLDL (10 µg/ml oder 50 µg/ml), IFN γ (100 U/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-18 (100 ng/ml), IL-1 β (1 ng/ml oder 10 ng/ml) oder TNF α (2 ng/ml oder 5 ng/ml) stimuliert. Als Kontrolle wurden jeweils Zellen im entsprechenden Lösungsmittel mitgeführt.

Tabelle 2.4: **Material für Zellstimulation**

Material	Hersteller
oxLDL	Selbstpräparation
IFN γ (rekombinant, human)	Biomol
TNF α (rekombinant, human)	Biomol
IL-1 β (rekombinant, human)	Biomol
IL-12 (rekombinant, human)	Biomol
IL-18 (rekombinant, human)	Medical+Biological Laboratories

2.3 Materialgewinnung

Sofern bei den einzelnen Unterpunkten nicht gesondert erwähnt, wurden für die Materialgewinnung die in Tabelle 2.5 angeführten Materialien verwendet.

Tabelle 2.5: **Materialien für die RNA- und Proteinisolierung**

Material	Hersteller
Centrifuge 5415R	Eppendorf (Deutschland)
Wärmeschrank	Heraeus Instruments
Spectrophotometer DU 640	Beckmann
ELISA Reader	Anthos Labtec Instr.
WinRead-Software	Anthos Labtec
Cellscrapper	Falcon
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
BSA-Standardlösung	Pierce
96-well-Platte	Greiner Labortechnik
TRIZOL Reagent	Invitrogen
Isopropanol	J.T. Baker
Chloroform	Merck
Ethanol	J.T. Baker
DEPC(Diethylpyrocarbonat)-Wasser	Sigma

2.3.1 Isolierung von Proteinen

Nach der Stimulationsbehandlung wurden die Zellkulturschalen zweimal mit 2 ml 37 °C warmem HBSS gespült, auf Eis gestellt, mit 70 μ l Lysepuffer überspült und für 5 Minuten inkubiert. Mit dem Cellscrapper wurden noch adhärenente Zellen abgelöst und in vorbereitete Eppendorfgefäße transferiert. Ein 10 Minuten Zentrifugationsschritt bei 10 000 rpm und 4 °C erfolgte, der Überstand wurde abpipetiert und in ein neues Eppendorfgefäß transferiert, das Pellet verworfen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Gesamtproteinbestimmung mit der Bicinchinonsäure (BCA)-Methode zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit und eine geringe Störanfälligkeit aus.

Der Proteinnachweis dieser Methode beruht darauf, dass Proteine mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bilden (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Bestandteile dieses Komplexes werden zu Cu^{+} -Ionen reduziert, die mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden. Die Absorption dieses Farbkomplexes kann bei 562 nm photometrisch bestimmt werden.

Der BCA-Assay wurde in 96-well-Platten entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt und gegen einen mitgeführten Albuminstandard abgeglichen.

2.3.3 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA) erfolgte unter Verwendung von TRIzol zur Lyse der Zellen. Pro 6 cm Zellkulturschale wurde 1 ml TRIzol verwendet. Nach 5 Minuten Inkubation wurden die Zellen durch Spülen aus der Schale gelöst und in ein Eppendorfgesäß überführt. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform und kräftigem Schütteln ruhten die Proben für drei Minuten bei Raumtemperatur und wurden danach mit 10 000 rpm für 12 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Im Eppendorfgesäß ließen sich nun drei Phasen unterscheiden: zuoberst eine klare Flüssigkeit in welcher die RNA gelöst ist, mittig eine weißliche Schicht, die die Proteine enthält und in der unteren, rötlich eingefärbten Schicht die DNA. 600 μ l der RNA-haltigen Lösung wurden abgenommen und in Eppendorfgesäße mit 500 μ l Isopropanol, zur Reinigung der RNA überführt. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch 30 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 10 000 rpm die RNA abzentrifugiert. Der Isopropanol-Überstand wurde abgenommen, durch 1,5 ml 70 % Ethanol in DEPC-Wasser ersetzt und dadurch die RNA ausgefällt. Nach kurzem Vortexen erfolgte ein 20 Minuten Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 10 000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen, das RNA-Pellet in 30 μ l Aqua ad injectabilia gelöst und die jeweilige RNA-Konzentration ermittelt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

2.3.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die RNA in einem Verhältnis von 1:50 mit Aqua bidest verdünnt und die Extinktion im Photometer

Tabelle 2.7: Lösungen für Western Blot 1

TBS	SDS-Laufpuffer	5x SDS-Probenpuffer
50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	2,5 mM Tris	655 μ l 1 M Tris pH 6,8
150 mM NaCl	19,2 mM Glycin	2,0 ml 99% Glycerol
pH 7,4	0,01% SDS	500 μ l β -Mercaptoethanol
	pH 8,8	2,3 ml 10% SDS
		10 mg Bromphenolblau ad 10 ml mit Aqua bidest.

bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit der RNA und sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

2.4 Western Blot

Sofern bei den einzelnen Unterpunkten nicht gesondert erwähnt, wurden für die Western Blots die in Tabelle 2.6 angeführten Materialien verwendet.

Tabelle 2.6: Material für Western Blot

Material	Hersteller
Elektrophoresekammer TV100	Carl Roth GmbH
Power Supply EPS 600	Pharmacia Biotech
semi-dry-Blotkammer	peqlab Biotechnologie GmbH
Thermoblock	Liebisch Bielefeld
Nitrozellulosemembran	Immobilon, Millipore
Whatmanpapier	Whatman International
Amido Black	Sigma
Rotiphorese Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH
Tween 20	Serva
N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Bromphenolblau	Biomol
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Kit	Amersham, UK
Prestained Protein Marker	New England Biolabs
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Ponceau S	Sigma

Tabelle 2.8: **Lösungen für Western Blot 2**

Blotpuffer	Blocklösung	Waschpuffer (TBS-T)
48 mM (5,82 g/l) Tris	10x Roti-Block	TBS
39 mM (2,93 g/l) Glycin	1:10 in PBS	+0,1% Tween 20
20% (200 ml/l) Methanol		

2.4.1 Elektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde eine SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat PolyAcrylamid GelElektrophorese) als eindimensionale Gelelektrophorese durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinlysate erfolgte in 12%igen, Sodium Dodecylsulfat (SDS)-haltigen Polyacrylamidgelen mit aufgesetztem Sammelgel (siehe Tab. 2.9). Die Gelelektrophorese erfolgte pro Gel für 15 Minuten bei 10 mA und 1,5 Stunden bei 15 mA. Die jeweilige Probe wurde mit 5x Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock aufgekocht und in die Geltaschen des Sammelgels gefüllt. Von THP1-Lysaten wurden 5 µg, von HUVEC-Lysaten 10 µg und von HAoSMC-Lysaten 5 µg Gesamtprotein eingesetzt.

Tabelle 2.9: **Gele für SDS-PAGE**

	Sammelgel	Trenngel (12%)
Aqua bidest.	3,65 ml	2,69 ml
1,5 M Tris pH 8,8	-	1,56 ml
1 M Tris pH 6,8	625 µl	-
SDS 10%	50 µl	62,5 µl
Acrylamid 40%	625 µl	1,28 µl
APS 10%	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

2.4.2 Blotten

Blotten ist eine Methode zur Übertragung von Proteinen aus dem Elektrophoresegel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran. Vor dem Blot-Vorgang wurde die PVDF-Membran zur Aktivierung 1 Minute in Methanol, 5 Minuten in Aqua bidest und 10 Minuten in Blotpuffer inkubiert (siehe Tab. 2.8). Die Gele wurden nach der Elektrophorese ebenfalls für 10 Minuten in Blotpuffer inkubiert. Auf drei kathodenseitige, in Blotpuffer getränkte Whatman-Papiere wurde die Membran gelegt, darauf das Gel und darauf wieder drei getränkte Whatman-Papiere. Geblottet wurde bei 400 mA über 1,5 Stunden. Nach dem Blotten wurde mittels Ponceau S-Färbung der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran

kontrolliert. Anschließend wurden die Membranen in Roti-Block inkubiert.

2.4.3 Umsetzung der Blots mit Antikörpern

Zunächst wurden die Membranen für zwei Stunden in Roti-Block geschwenkt, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu besetzen und eine spezifische Antikörperbindung zu gewährleisten. Alle in Tabelle 2.10 aufgelisteten Antikörper wurden mit Roti-Block auf die angegebene Konzentration verdünnt. Die PVDF-Membranen wurden einzeln in jeweils 10 ml Antikörperlösung inkubiert. Dabei fand die Inkubation mit Primärantikörpern bei 4 °C über Nacht statt, während für Sekundärantikörper zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach jedem Inkubationsschritt erfolgten drei 10 Minuten Waschschrte in TBS/T (siehe Tab. 2.8). Zur Sichtbarmachung der antikörpermarkierten Proteine wurden die Membranen abgetropft und mit ECL-Reagenz entsprechend den Herstellerangaben behandelt. Die durch am Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase und das Luminol des ECL-Reagenz, entstehende Lichtemission wurde durch Auflegen eines Films in einer Kassette registriert.

Tabelle 2.10: **Antikörper für Western Blot**

Primärantikörper/ Hersteller	Verdünnung	Sekundärantikörper/ Hersteller	Verdünnung
anti-LMP2 Biomol	1:1000	goat-anti-mouse Santa-Cruz-Biotechnology	1:10000
anti-LMP7 Biomol	1:1000	goat-anti-mouse Santa-Cruz-Biotechnology	1:10000
anti MECL1 Biomol	1:10000	goat-anti-rabbit Santa-Cruz-Biotechnology	1:10000
anti- β 1 Biomol	1:1000	goat-anti-mouse Santa-Cruz-Biotechnology	1:10000

2.4.4 Ladekontrollen der Western Blots

Zum Nachweis einer gleichmäßigen Proteinbeladung der einzelnen Geltaschen erfolgte eine Proteinfärbung mit Amido-Black. Dazu wurde die PVDF-Membran nach der Entwicklung für 10 Minuten auf dem Schüttler in 10 ml Amido-Black-Lösung inkubiert, danach in mehreren Waschschrten gleichmäßig entfärbt, bis die einzelnen Proteinbahnen optimal zu unterscheiden waren.

2.5 RNA-Analyse

Sofern bei den einzelnen Unterpunkten nicht gesondert erwähnt, wurden für die RNA-Analyse die in Tabelle 2.11 angeführten Materialien verwendet.

Tabelle 2.11: **Material für die PCR**

Material	Hersteller
Personal Cyclor	Biometra
Taqman-Maschine	Applied Biosystems
DNase I (2U// <i>mul</i>)	Ambion
Hexamer-Primer DN6 Hexamer	TIB Molbiol
Taqman-Sonden	TIB Molbiol
RT-Mastermix	
4,0 μ l 5x Reverse Transkriptase Puffer	Invitrogen
2,0 μ l DTT (100mM)	Invitrogen
1,0 μ l dNTPs (10mM)	Biozym
0,5 μ l RNase Inhibitor 40	Protector
1,0 μ l M-MLV Reverse Transkriptase (200U/ μ l)	Invitrogen

2.5.1 Reverse Transkription, DNase-Verdau

Die isolierte messenger RNA (mRNA) wurde durch Reverse-Transkriptions(RT)-Reaktion in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben, um im Anschluss in der PCR eingesetzt zu werden. Für die RT wurde die M-MLV (Moloney-Murine Leukemia Virus) Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet. Als Primer wurden Random-Hexamere eingesetzt, welche an die Poly(A)-Schwänze der mRNA binden.

Eingesetzt wurden 50 ng Gesamt-RNA in einem Volumen von 9 μ l Aqua ad injectabilia. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, erfolgte als erster Schritt ein 15 Minuten DNase I Verdau bei 37 °C im Cyclor. Zur Inaktivierung der DNase I wurden die Proben für 5 Minuten auf 75 °C erhitzt. Um eine vollständige Anlagerung der Primer an die mRNA zu erreichen, wurden nach Zugabe von 2 μ l Hexamer-Primer alle Proben für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Nach Kühlung der Proben für 5 Minuten auf Eis wurden pro Ansatz 8,5 μ l RT-Mastermix zupipetiert. Nach 5 Minuten Annealing bei 25 °C erfolgte die Elongation der cDNA bei 37 °C über einen Zeitraum von 60 Minuten.

Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -80 °C, wobei die Durchführung der PCR innerhalb einer Woche nach Fertigstellung der cDNA stattfand.

2.5.2 Real-Time-RT-PCR

Die Taqman-PCR ist ein automatisierter PCR-Assay, bei dem die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan möglich sind. Bei der Taqman-PCR wird bei den zu quantifizierenden Proben das entstehende Amplifikat nach jedem Zyklus über ein Fluoreszenzsignal detektiert. Zur Detektion werden dabei eine fluoreszenzmarkierte Sonde und die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase genutzt. Im ersten Schritt der PCR hybridisieren die spezifischen Primer und die fluoreszenzmarkierte Sonde an den Matrizen-Strang. Die Taqman-Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) markiert, dessen Fluoreszenz von einem „Quencher“-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) am 3'-Ende der Taqman-Sonde aufgrund der räumlichen Nähe durch Energietransfer unterdrückt wird. Bei der DNA-Extension verdrängt die Taq-Polymerase die Sonde, welche durch 5'-3'-Exonuklease-Aktivität hydrolysiert wird. Dabei wird der Reporter-Farbstoff abgetrennt und kann ein Fluoreszenz-Signal erzeugen, welches Proportional zur Menge des PCR-Produktes ist. Das Signal wird während der PCR-Zyklen von einer Kamera detektiert und über ein entsprechendes Software-Programm prozessiert. Der Zeitpunkt bei dem ein signifikanter Anstieg des Signals erfolgt erlaubt Rückschlüsse auf die Ausgangskonzentration der zu quantifizierenden Nukleinsäure.

Tabelle 2.12: **Materialien für die Real-Time RT-PCR**

Material	Hersteller
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems
7003 Real Time PCR System	Applied Biosystems

Zur Quantifizierung der mRNA-Sequenzen wurde die Real-Time RT-PCR verwendet. Dabei wurde als Ausgangsprodukt die generierte cDNA eingesetzt. Die Real-Time RT-PCR erfolgte in einer 96-well-Platte in einem Gesamtvolumen von 25 μ l pro Reaktionsansatz. Für alle Proben wurden Doppelwerte bestimmt und gemittelt. Tabelle 2.13 zeigt die verwendeten Cyklingparameter.

Tabelle 2.13: **Thermocycler-Einstellungen für die Durchführung der TaqMan-PCR**

	Aktivierung/ Inkubation	Polymerase Aktivierung	Denaturierung	Anneal/ Extend
Zeit	2 min	10 min	15 sec	1 min
Temp.	50 Grad C	95 Grad C	95 Grad C	60 Grad C

Die erhobenen Daten wurden mittels 7003 System Sequence Detection Software von Applied Biosystems ausgewertet. Die Berechnung der Expression der verschiedenen Zielsequenzen erfolgte nach der $\Delta \Delta$ -CT-Methode relativ auf die Expression des Housekeeping-Gens RPL19.

Tabelle 2.14: **Für Real-Time RT-PCR verwendete Sonden, Forward- und Reverse-Primer und eingesetzte Konzentrationen.**

Gen	Sequenz	Konz. in nM
PSMB6-F	5'-acacctattcagcaccgcat-3'	300
PSMB6-R	5'-gtaggtgacagcatcagctactgc-3'	900
PSMB6-Sonde	5' FAM-ctgtcgctcaggctcagctgctgatac-TAMRA3'	5
PSMB8-F	5'-agtactgggagcgcctgct-3'	300
PSMB8-R	5'-ccgacactgaaatacgttctcca-3'	300
PSMB8-Sonde	5' FAM-tcgcagatagtagcagcctgcattcctgg-TAMRA3'	5
PSMB9-F	5'-cgttgtgatgggttctgattcc-3'	300
PSMB9-R	5'-gacagctgtcaaactcgggtt-3'	300
PSMB9-Sonde	5' FAM-caccgctcgctgcagacact-TAMRA3'	5
PSMB10-F	5'-tgctgaggacactgagctc-3'	50
PSMB10-R	5'-gctgtggttccaggcacaaa-3'	50
PSMB10-Sonde	5' FAM-cccgtgaagaggtctggccgctac-TAMRA3'	5
RPL19-F	5'-gagaccaatgaaatcgccaatg-3'	300
RPL19-R	5'-gcggatgatcagccatctt-5'	300
RPL19-Sonde	5' FAM-caactcccgtcagcagatccggaa-TAMRA3'	5

2.6 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Oberflächenrezeptoren und damit Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten THP-1-Zellen vor und nach PMA-Stimulation wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt.

Tabelle 2.15: **Materialien für die Flowzytometrie**

Material	Hersteller
Flow Cytometer	Dako Cytomation
EDTA in HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	Gibco
CD11b-APC Antikörper	BD Biosciences
CD36-FITC Antikörper	BD Biosciences
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fluka

Nach Absaugen des Mediums wurden die adhärennten Zellen mittels 0,5 ml calcium- und magnesiumfreier EDTA-Lösung aus der Kulturschale gelöst, in ein Falcon überführt und für

5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in PBS resuspendiert, pro ml Zellsuspension wurden 5 μ l Antikörper (1:200) zugegeben, gevortext, für 10 Minuten abgedunkelt auf Eis inkubiert und flowzytometrisch vermessen. Pro Ansatz wurden jeweils 10 000 Zellen vermessen.

2.7 Ölrot-O-Färbung

Zur optischen Darstellung und Nachweis der OxLDL-Phagozytose durch die Makrophagen erfolgte eine Lipidfärbung mittels Ölrot-O. Als Stocklösung wurden 0,3 g Ölrot-O gelöst in 100 ml Isopropanol angesetzt. Zur Herstellung der Arbeitsverdünnung wurden 3 Teile Stocklösung mit 2 Teilen Wasser verdünnt und für 10 Minuten stehen gelassen, filtriert und innerhalb von zwei Stunden verwendet. Die Ölrot-O-Färbung wurde direkt in der 6 cm Zellkulturschale vorgenommen. Nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Waschen mit 2 ml HBSS wurden die Zellen für 10 Minuten in 4 %igem Formaldehyd in HBSS fixiert. Es folgte ein Waschschritt mit 2 x 2 ml HBSS und eine Vorbehandlung mit 1 ml 60 % Isopropanol für 2 Minuten vor dem eigentlichen Färbvorgang. Zum Färben wurden die Zellen für 10 Minuten in 1 ml Ölrot-O-Lösung inkubiert, welche danach durch zweimaliges Spülen mit 3 ml HBSS wieder entfernt wurde. Die Kerngegenfärbung bestand aus einer 20 Sekunden Behandlung mit 1 ml Hämalaun. Es folgten drei Waschschrte mit je 2 ml HBSS sowie das Eindeckeln mittels Aquatex.

Tabelle 2.16: **Material für Ölrot-O-Färbung**

Material	Hersteller
Ölrot-O	Sigma
Formaldehyd	Sigma
Aquatex	Merck
Deckgläser	Marienfeld
Objektträger	Marienfeld
Hämalaun	Sigma

2.8 Häufig verwendete Materialien und Lösungen

Tabelle 2.17: Häufig verwendetes Material

Material	Hersteller
Methanol	Merck
Glycin	Roth
Petrischalen	Falcon
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco
Zellkulturflaschen	Sarstedt
Pipetten	Costar
Zentrifugenröhrchen (50ml)	Falcon
Hanks balancierte Salzlösung (HBSS)	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Eppendorfgefäße	Eppendorf
Aqua ad injectabilia	Braun
Isopropanol (60 %)	J.T. Baker

3 Ergebnisse

Der vorliegenden Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass das Immunproteasom eine wichtige Rolle in der Atherosklerose spielt. Jedoch ist die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in vaskulären Zellen unzureichend charakterisiert. Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung der Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in für die Atherosklerose relevanten Zellen. Dabei soll sowohl die Expression unter basalen Bedingungen als auch unter proatherogener Stimulation im Zellkulturmodell untersucht werden.

3.1 Induzierbarkeit immunoproteasomaler Untereinheiten in atheroskleroserelevanten Zellen

Es wurden HAoSMC und HUVEC als vaskulär residente Zellen und eine humane Monozytenzelllinie (THP1-Zellen) als Vertreter immunkompetenter Zellen ausgewählt. Zunächst wurden alle drei Zelltypen auf ihre Grundexpression von immunoproteasomalen Untereinheiten hin untersucht. Zusätzlich wurde die Induzierbarkeit von immunoproteasomalen Untereinheiten durch $\text{IFN}\gamma$ in diesen drei Zelltypen bestimmt. Als Methode wurde dazu der Western Blot ausgewählt.

THP1-Makrophagen zeigen, anders als HUVEC und HAoSMC, basal eine hohe Expression von LMP7, LMP2 und MECL1. Unter $\text{IFN}\gamma$ -Einfluss kann die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen trotz der hohen Grundexpression noch deutlich gesteigert werden. Die Western Blot-Ergebnisse der HAoSMC und HUVEC zeigen eine schwache Grundexpression von immunoproteasomalen Untereinheiten. Durch $\text{IFN}\gamma$ sind in HAoSMC und HUVEC alle drei Untereinheiten induzierbar (siehe Abb. 3.1).

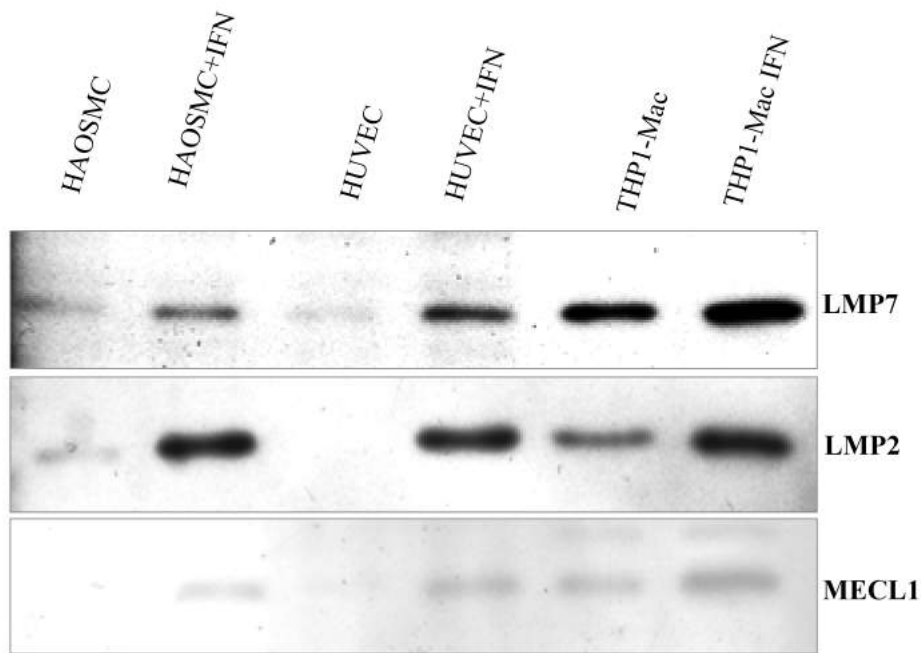


Abbildung 3.1: **Basale Expression und Induzierbarkeit von immunproteasomalen Untereinheiten in atheroskleroserelevanten Zellen im Western Blot.**

Gezeigt ist die basale Expression immunproteasomaler Untereinheiten in HAoSMC, HUVEC und THP1-Makrophagen sowie die Expression nach 24 h Stimulation mit IFN γ (100 U/ml). Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.2 Immunoproteasomale Untereinheiten in Makrophagen

THP1-Zellen wurden verwendet, um im Zellkulturmodell die Expression und Stimulierbarkeit immunoproteasomaler Untereinheiten in Makrophagen und Schaumzellen zu untersuchen.

3.2.1 Charakterisierung der verwendeten THP1-Zellen

Durchflusszytometrie

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete humane Zelllinie THP1 wurde durch 72 Stunden Behandlung mit PMA zu adhärenenten Makrophagen differenziert. Zur Charakterisierung des Phänotyps der THP1-Zellen nach PMA-Differenzierung wurden flowzytometrische Analysen durchgeführt.

Während unbehandelte THP1-Monozyten eine homogene Zellpopulation mit nur geringer Variation in den lichtstreuenden Eigenschaften darstellen, zeichnen sich die durch PMA differenzierten THP1-Makrophagen durch stärkere Lichtstreuung aus (siehe Abb. 3.2). Dies ist ein Zeichen für eine größere Variabilität in der Zellgröße und das Vorhandensein zytoplasmatischer Vesikel. Übereinstimmend mit diesen veränderten flowzytometrischen Eigenschaften zeigen THP1-Makrophagen auch lichtmikroskopisch eine größere Heterogenität in der Zellform und eine erhöhte intrazelluläre Granularität.

Zur weiteren Charakterisierung der verwendeten THP1-Makrophagen wurde die Expression von CD11b und CD36, zwei für Makrophagen charakteristische Oberflächenmarker, vor und nach PMA-Behandlung analysiert.

PMA-differenzierte, adhärenente Makrophagen zeigen eine flowzytometrisch messbare, erhöhte Expression von CD11b und CD36 (siehe Abb. 3.3).

Ölrot-O-Färbung

Zur Kontrolle der oxLDL-Internalisierung durch THP1-Makrophagen und zum Nachweis der Entstehung von Schaumzellen wurden Ölrot-O-Lipidfärbungen durchgeführt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

Es konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten THP1-Makrophagen oxLDL internalisieren. Darüber hinaus konnte eine konzentrationsabhängige Aufnahme und intrazelluläre Speicherung von oxLDL nachgewiesen werden. Dem Bild einer Schaumzelle entsprechend

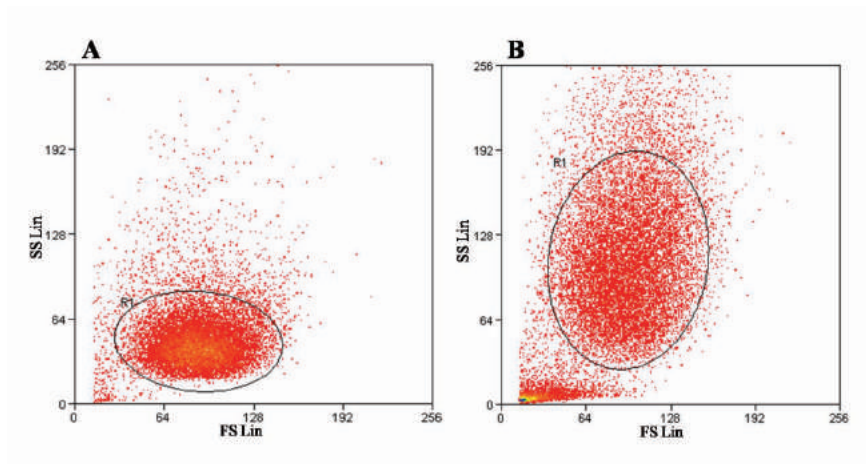


Abbildung 3.2: **Flowzytometrische Darstellung der THP1-Monozyten und THP1-Makrophagen.**

A FS/SS Plot der THP1-Monozyten **B** FS/SS Plot nach PMA-Differenzierung in Makrophagen. Eine repräsentative Abbildung aus drei unabhängigen Experimenten wurde ausgewählt.

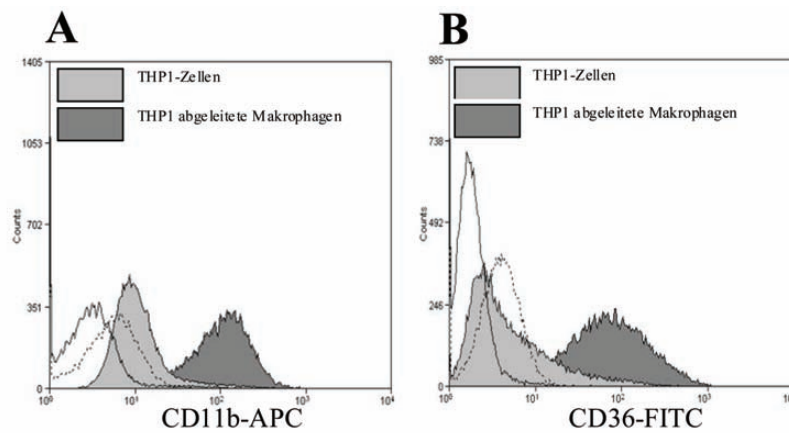


Abbildung 3.3: **Flowzytometrische Bestimmung von CD11b und CD36 auf THP1-Monozyten und THP1-Makrophagen.**

A zeigt die Zunahme der Oberflächenexpression von CD11b während der Differenzierung zu THP1-Makrophagen. **B** zeigt den Anstieg der CD36-Oberflächenexpression auf THP1-Makrophagen. Durchgehende Linie: ungefärbte THP1-Zellen; gestrichelte Linie: ungefärbte THP-1 abgeleitete Makrophagen Repräsentative Abbildung aus drei unabhängigen Experimenten.

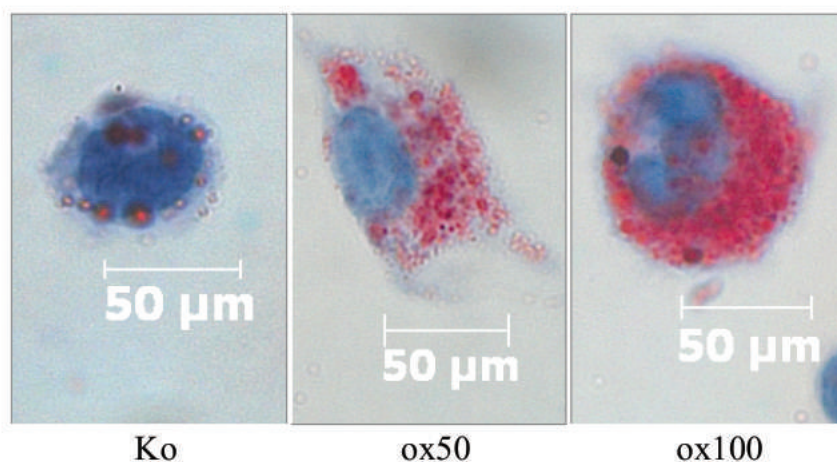


Abbildung 3.4: **Aufnahme von oxLDL durch THP1-Makrophagen.** Die lichtmikroskopischen Abbildungen zeigen die konzentrationsabhängige Aufnahme und zytosolische Speicherung von oxLDL in THP1-Makrophagen nach Anfärbung mit Ölrot-O in 400-facher Vergrößerung; THP1-Makrophagen wurden über 24 h mit 50 $\mu\text{g/ml}$ oder 100 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL inkubiert. Ko: Lösungsmittel; repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten.

zeigten die mit oxLDL inkubierten THP1-Makrophagen im mikroskopischen Bild eine Größenzunahme, sowie eine Zunahme der Ölrot-O-positiven zytosolische Vakuolen (siehe Abb. 3.4). Bei vergleichbarer Lipidaufnahme durch die Makrophagen erfolgten die anschließenden Untersuchungen zur Stimulierbarkeit immunproteasomaler Untereinheiten durch oxLDL in submaximaler Konzentration.

3.2.2 Stimulation von THP1-Makrophagen mit $\text{IFN}\gamma$

$\text{IFN}\gamma$ wurde zur Zellstimulation eingesetzt, da es als potenter Induktor immunproteasomaler Untereinheiten gilt und als proinflammatorisches Zytokin in der Atherogenese von besonderer Bedeutung ist.

In THP1-Makrophagen führt ein $\text{IFN}\gamma$ -Stimulus zu einer deutlichen Steigerung der mRNA-Expression immunproteasomaler Untereinheiten. Durch 24 Stunden Behandlung mit $\text{IFN}\gamma$ werden in THP1-Makrophagen alle immunproteasomalen Untereinheiten auf mRNA- und Proteinebene induziert (siehe Tab. 3.1 und Abb. 3.5).

Stellvertretend für die konstitutiven proteasomalen Untereinheiten wurde die zu LMP2 homologe, konstitutive Untereinheit $\beta 1$ untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die kon-

Tabelle 3.1: **Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen nach IFN γ -Stimulation.**

Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM.	LMP7	LMP2	MECL1	β 1
Kontrolle	1,00 +/- 0,16	1,00 +/- 0,13	1,00 +/- 0,16	1,00 +/- 0,14
IFN γ	3,82 +/- 0,51	7,61 +/- 1,09	7,37 +/- 1,22	1,70 +/- 0,09

stitutive Untereinheit β 1 anders als die immunoproteasomalen Untereinheiten durch IFN γ -Stimulus auf mRNA-Ebene nur gering induziert wird, im Western Blot stellte sich sogar eine Abnahme von β 1-Protein dar (siehe Tab. 3.1 und Abb. 3.5D).

3.2.3 Stimulation von THP1-Makrophagen mit oxLDL

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, nehmen THP1-Makrophagen oxLDL konzentrationsabhängig nach intrazellulär auf und entwickeln sich dadurch zu Schaumzellen, einem der wichtigsten Zelltypen im Rahmen der Atherogenese. Die generierten Schaumzellen wurden nachfolgend auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten untersucht.

Es wurde untersucht, ob oxLDL-Phagozytose zu einer vermehrten Expression von immunoproteasomalen Untereinheiten führt. Dazu wurden die THP1-Makrophagen für 24 Stunden mit 10 μ g/ml oder 50 μ g/ml oxLDL inkubiert. Als Positivkontrolle für die Induktion der immunoproteasomalen Untereinheiten diente eine Stimulation mit IFN γ .

Die relative mRNA-Expression von LMP7 zeigt sich nach oxLDL-Stimulation unverändert zur Kontrollbehandlung. Die Western Blot-Ergebnisse für LMP7 zeigen übereinstimmend mit den mRNA-Daten eine unveränderte Proteinexpression von LMP7. Auch die relative mRNA-Expression von LMP2 wird durch oxLDL im Vergleich zur Kontrollbehandlung nicht verändert. Dementsprechend kann eine gleichbleibene LMP2-Proteinexpression im Western Blot gezeigt werden. MECL1 zeigt, ebenso wie die konstitutive Untereinheit β 1 auf mRNA- und Proteinebene ein unverändertes relatives Expressionsniveau nach oxLDL-Stimulation.

Es konnte gezeigt werden, dass THP1-Makrophagen nach oxLDL-Stimulation alle untersuchten immunoproteasomalen und proteasomalen Untereinheiten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene unverändert exprimieren (siehe Tab. 3.2 und Abb. 3.5).

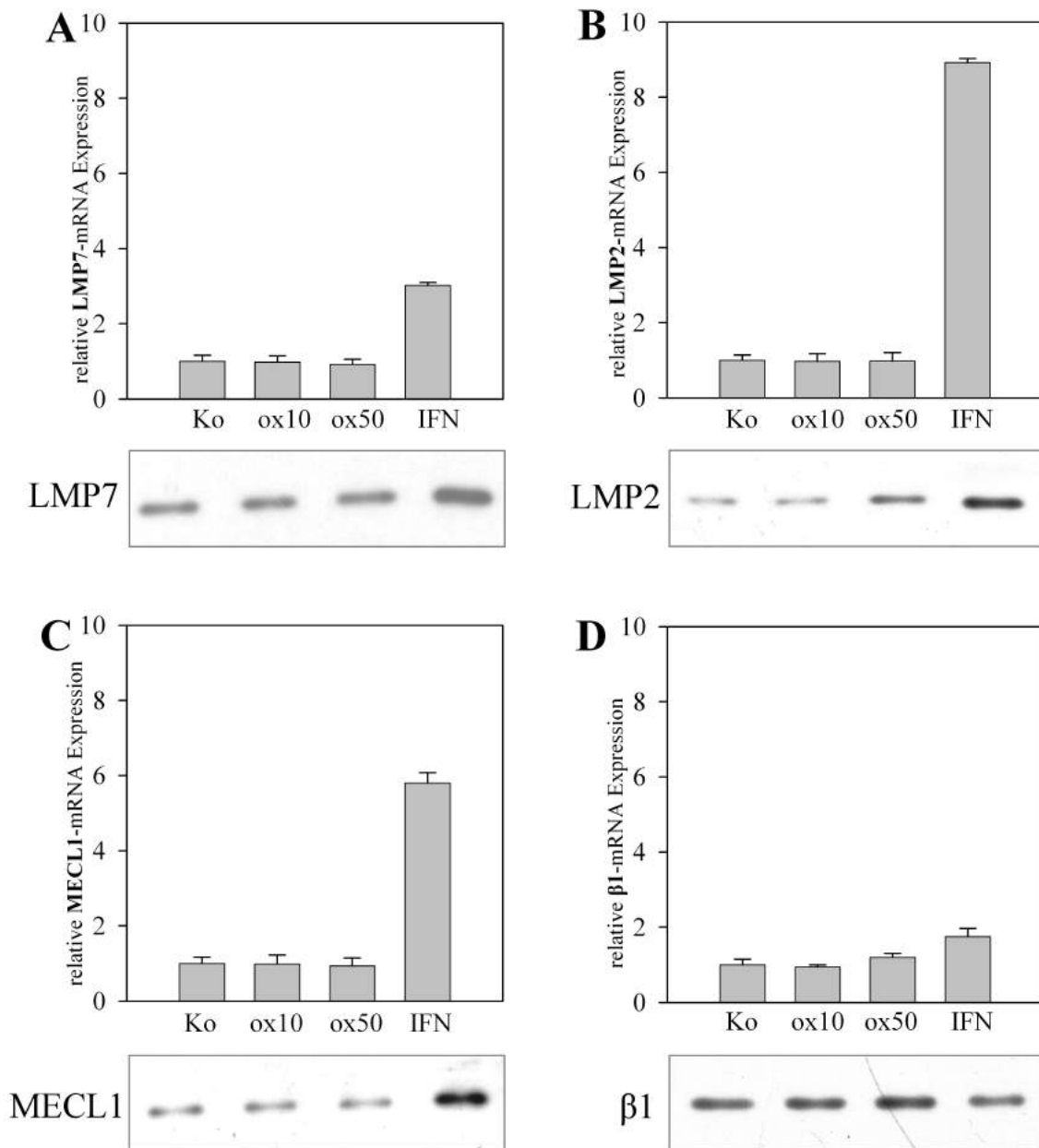


Abbildung 3.5: **Relative mRNA- und Proteinexpression immunoproteasomaler Untereinheiten in Makrophagen nach Stimulation mit oxLDL.**

THP1-Makrophagen wurden mit 10 μ g/ml oxLDL und 50 μ g/ml oxLDL über 24 Stunden inkubiert. **A** LMP7-Expression; **B** LMP2-Expression; **C** MECL1-Expression; **D** β 1-Expression. Ko: Lösungsmittelkontrolle; IFN: 100 U/ml IFN γ . Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM sind dargestellt. Die Proteinexpression ist im Western Blot darunter abgebildet. Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3.2: **Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen nach oxLDL-Stimulation.**

Angegeben sind	Mittelwerte	aus	drei unabhängigen	Experimenten	+/- SEM.
	LMP7	LMP2	MECL1	β 1	
Kontrolle	1,00 +/- 0,16	1,00 +/- 0,13	1,00 +/- 0,16	1,00 +/- 0,14	
10 μ g/ml oxLDL	0,98 +/- 0,16	0,97 +/- 0,20	0,98 +/- 0,23	0,94 +/- 0,05	
50 μ g/ml oxLDL	0,91 +/- 0,14	0,97 +/- 0,22	0,93 +/- 0,21	1,19 +/- 0,11	
IFN	3,02 +/- 0,07	8,91 +/- 0,11	5,08 +/- 0,27	1,75 +/- 0,22	

3.2.4 Stimulation von THP1-Makrophagen mit IL-12 und IL-18

IL-12 und IL-18 gelten als proinflammatorische Zytokine, können IFN γ induzieren und sind in der atherosklerotischen Plaque nachweisbar.

Um zu untersuchen, inwiefern die proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-18 die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen beeinflussen, wurden IL-12 und IL-18 entweder einzeln oder in Kombination für 24 Stunden mit THP1-Makrophagen inkubiert. Als Positivkontrolle für die Induktion immunoproteasomaler Untereinheiten diente eine Stimulation mit IFN γ .

Stimulation von THP1-Makrophagen mit IL-12

Eine Stimulation von THP1-Makrophagen mit IL-12 führt nicht zu Änderungen in der Expression der immunoproteasomalen Untereinheiten im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene zeigt sich ein gleichbleibendes Expressionsniveau. Auch die konstitutive proteasomale Untereinheit β 1 zeigt sich nach IL-12-Stimulation im Western Blot und in der relativen mRNA-Expression unverändert (siehe

Tabelle 3.3: **Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen nach Stimulation mit IL-12 und IL-18.**

Angegeben sind	Mittelwerte	aus	drei unabhängigen	Experimenten	+/- SEM.
	LMP7	LMP2	MECL1	β 1	
Kontrolle	1,00 +/- 0,79	1,00 +/- 0,23	1,00 +/- 1,16	1,00 +/- 0,08	
IL-12 (10 ng/ml)	1,19 +/- 0,22	1,21 +/- 0,16	1,71 +/- 0,28	1,21 +/- 0,33	
IL-18 (100 ng/ml)	1,17 +/- 0,32	1,19 +/- 0,12	1,66 +/- 0,31	1,07 +/- 0,21	
IL-12 + IL-18	1,04 +/- 0,34	1,22 +/- 0,11	1,53 +/- 0,35	1,25 +/- 0,00	
IFN γ	4,79 +/- 0,40	5,44 +/- 0,74	9,78 +/- 0,17	1,15 +/- 0,24	

Abb. 3.6 und Tab. 3.3).

Stimulation von THP1-Makrophagen mit IL-18

Die relative mRNA-Expression von LMP7, LMP2 und MECL1 wird durch Stimulation von THP1-Makrophagen mit IL-18 nicht verändert. Übereinstimmend mit diesen mRNA-Ergebnissen ist auch im Western Blot die Proteinexpression der immunoproteasomalen Untereinheiten nach IL-18-Stimulation gleichbleibend. Die konstitutive proteasomale Untereinheit $\beta 1$ wird nach Inkubation von THP1-Makrophagen mit IL-18 auf mRNA- und Proteinebene unverändert zur Kontrollbehandlung exprimiert (siehe Abb. 3.6 und Tab. 3.3).

Ko-Stimulation von THP1-Makrophagen mit IL-12 und IL-18

Ko-Stimulation von THP1-Makrophagen mit IL-12 und IL-18 führt nicht zu Veränderungen in der Expression immunoproteasomaler Untereinheiten. So zeigen sich LMP7, LMP2 und MECL1 sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene in ihrer Expression unverändert zur Kontrollbehandlung. Auch die konstitutive proteasomale Untereinheit $\beta 1$ zeigt eine auf mRNA- und Proteinebene unveränderte Expression (siehe Abb. 3.6 und Tab. 3.3).

3.2.5 Stimulation von THP1-Makrophagen mit IL-1 β

IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von vielen in der atherosklerotischen Plaque vorkommenden Zellen freigesetzt werden kann.

Um den IL-1 β -Effekt auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen zu analysieren, wurden die Zellen für 24 Stunden mit zwei verschiedenen Konzentrationen von IL-1 β (1 ng/ml und 10 ng/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle für die Induktion immunoproteasomaler Untereinheiten diente eine Stimulation mit IFN γ .

Sowohl die Stimulation mit 1 ng/ml IL-1 β als auch die Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β zeigt für alle immunoproteasomalen Untereinheiten eine zur Kontrollbehandlung unveränderte relative mRNA-Expression. Dementsprechend zeigt sich auch eine gleichbleibende Proteinexpression im Western Blot. Durch IL-1 β -Stimulation werden auch die relative mRNA-Expression und Proteinexpression der konstitutiven Untereinheit $\beta 1$ in THP1-Makrophagen nicht verändert (siehe Abb. 3.7 und Tab. 3.4).

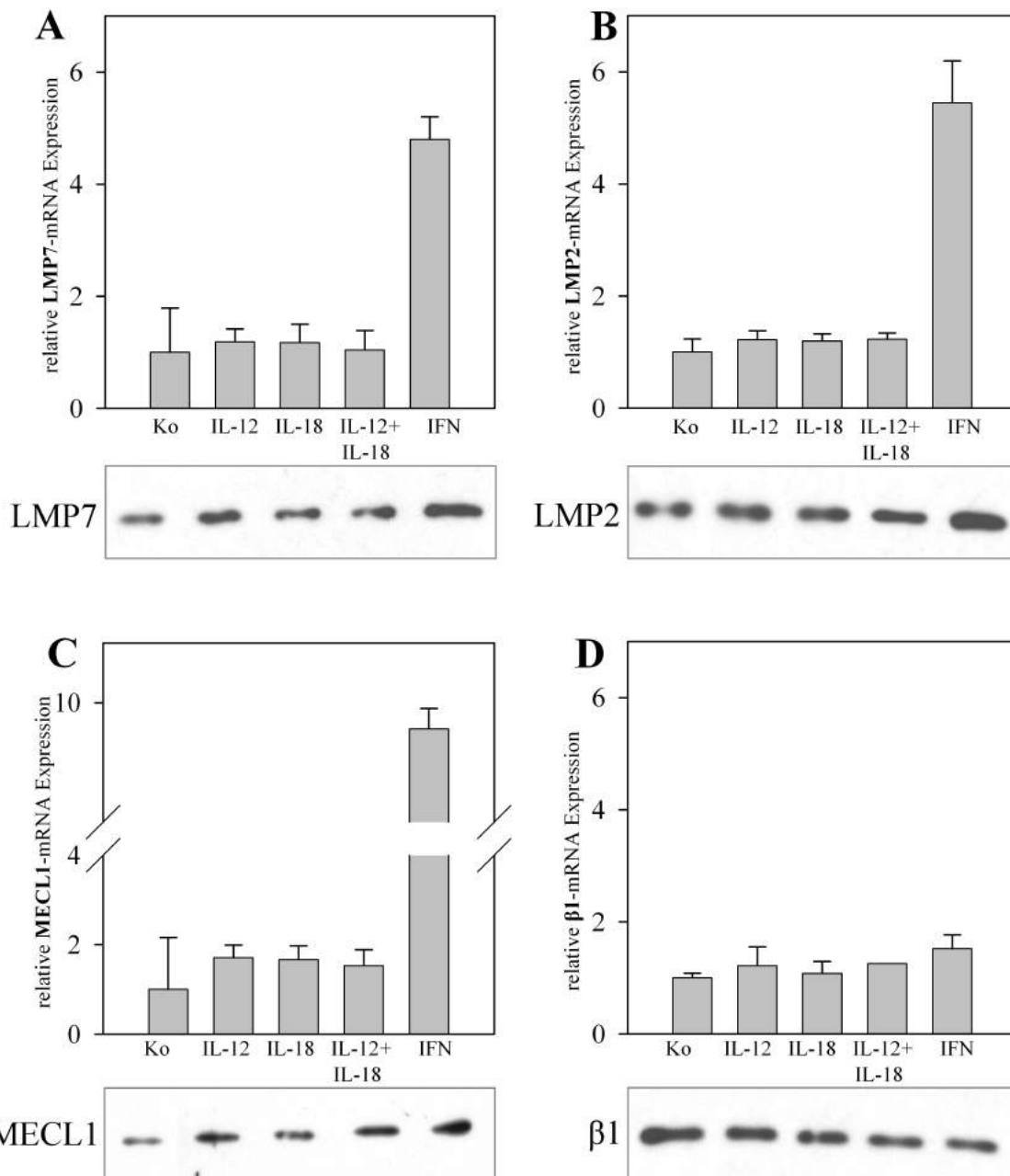


Abbildung 3.6: **Relative mRNA- und Proteinexpression immunoproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen nach Stimulation mit IL-12 und IL-18.**

Die THP1-Makrophagen wurden mit 10 ng/ml IL-12 und/oder 100 ng/ml IL-18 über 24 Stunden inkubiert. **A** LMP7-Expression; **B** LMP2-Expression; **C** MECL1-Expression; **D** β 1-Expression. Ko: Lösungsmittelkontrolle; IFN: 100 U/ml IFN γ . Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM sind dargestellt. Die Proteinexpression ist im Western Blot darunter abgebildet. Gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

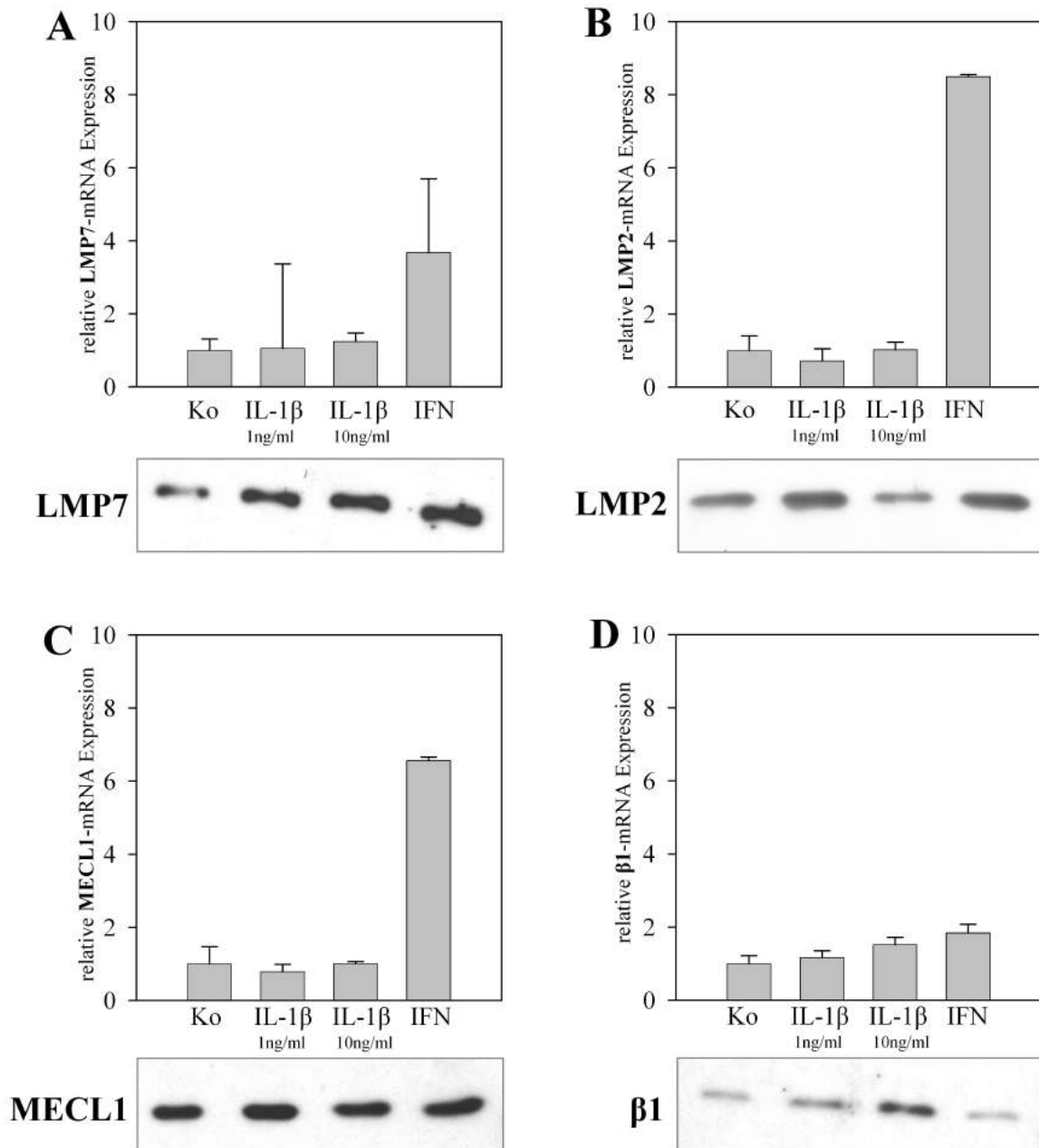


Abbildung 3.7: **Relative mRNA- und Proteinexpression immunproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen nach Stimulation mit IL-1 β .**

Die THP1-Makrophagen wurden mit 1 ng/ml IL-1 β und 10 ng/ml IL-1 β über 24 Stunden inkubiert. **A** LMP7-Expression; **B** LMP2-Expression; **C** MECL1-Expression; **D** β 1-Expression. Ko: Lösungsmittelkontrolle; IFN: 100 U/ml IFN γ . Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM sind dargestellt. Die Proteinexpression ist im Western Blot darunter abgebildet. gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3.4: **Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in Makrophagen nach Stimulation mit IL-1 β .**

Angegeben sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM.	LMP7	LMP2	MECL1	β 1
Kontrolle	1,00 +/- 0,30	1,00 +/- 0,39	1,00 +/- 0,47	1,00 +/- 0,22
IL-1 β (1 ng/ml)	1,05 +/- 2,31	0,71 +/- 0,32	0,78 +/- 0,20	1,16 +/- 0,18
IL-1 β (10 ng/ml)	1,24 +/- 0,22	1,02 +/- 0,21	1,00 +/- 0,05	1,51 +/- 0,20
IFN γ	3,67 +/- 2,01	8,49 +/- 0,05	6,55 +/- 0,09	1,84 +/- 0,23

3.2.6 Stimulation von THP1-Makrophagen mit TNF α

TNF α kommt in der atherosklerotischen Plaque vor, wird vor allem von Makrophagen freigesetzt und hat inflammatorische und zytotoxische Effekte.

Um zu untersuchen, ob TNF α in THP1-Makrophagen die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten beeinflusst, wurde TNF α in einer Konzentration von 2 ng/ml und 5 ng/ml über 24 Stunden zur Stimulation eingesetzt. Als Positivkontrolle für die Induktion immunoproteasomaler Untereinheiten diente eine Stimulation mit IFN γ .

Nach 24 Stunden Inkubation der THP1-Makrophagen mit 2 ng/ml oder 5 ng/ml TNF α zeigt sich auf mRNA-Ebene ein zur Kontrollbehandlung unverändertes relatives Expressionsniveau für die immunoproteasomalen Untereinheiten. Übereinstimmend zeigen auch die Western Blot-Ergebnisse eine zur Kontrollbehandlung unveränderte Proteinexpression (siehe Abb. 3.8 und Tab. 3.5).

Für die konstitutive Untereinheit β 1 kann jedoch auf Proteinebene eine gesteigerte Expression nach 24 Stunden Stimulation mit 5 ng/ml TNF α gezeigt werden, während die relative β 1-mRNA-Expression zur Kontrolle unverändert ist (siehe Abb. 3.8 und Tab. 3.5). Dieser Effekt trat bei Stimulation mit 2 ng/ml TNF α nicht auf.

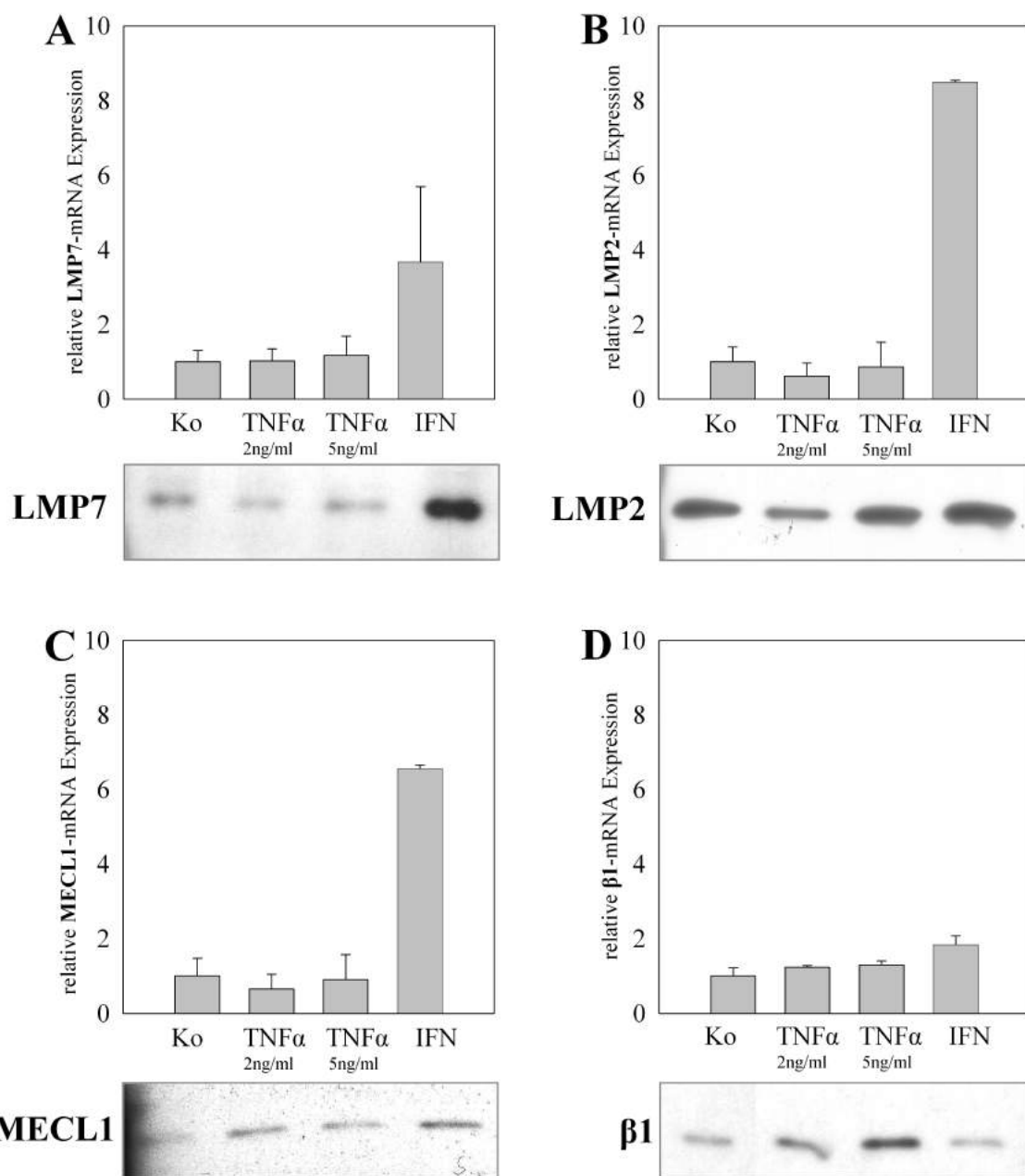


Abbildung 3.8: **Relative mRNA- und Proteinexpression immunoproteasomaler Untereinheiten in Makrophagen nach Stimulation mit TNF α .**

Die THP1-Makrophagen wurden mit 2 ng/ml TNF α und 5 ng/ml TNF α über 24 Stunden inkubiert. **A** LMP7-Expression; **B** LMP2-Expression; **C** MECL1-Expression; **D** β 1-Expression. Ko: Lösungsmittelkontrolle; IFN: 100 U/ml IFN γ . Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM sind dargestellt. Die Proteinexpression ist im Western Blot darunter abgebildet. gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

3.3 Immunoproteasomale Untereinheiten in vaskulären glatten Muskelzellen

3.3.1 Stimulation von HAoSMC mit IFN γ

IFN γ steigert, wie in den Vorversuchen zunächst auf Proteinebene gezeigt werden konnte (siehe Abb. 3.1), auch auf mRNA-Ebene die Expression aller drei untersuchter immunoproteasomaler Untereinheiten in HAoSMC (siehe Abb. 3.9 und Tab. 3.6).

Die relative mRNA-Expression der konstitutiven Untereinheit $\beta 1$ wird durch IFN γ -Stimulus in HAoSMC nicht beeinflusst. Die Western Blot Daten zeigen jedoch eine Abnahme der konstitutiven Untereinheit $\beta 1$ auf Proteinebene (siehe Abb. 3.9 D).

3.3.2 Stimulation von HAoSMC mit IL-1 β oder TNF α

Zur Untersuchung des Effektes von IL-1 β und TNF α auf die immunoproteasomale Expression in HAoSMC wurden diese Zellen mit 10 ng/ml IL-1 β oder 5 ng/ml TNF α für 24 Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle für die Induktion immunoproteasomaler Untereinheiten diente eine Stimulation mit IFN γ , zur Kontrolle wurde das Lösungsmittel eingesetzt.

Stimulation von HAoSMC mit Interleukin-1 β

Stimulation von HAoSMC mit IL-1 β hat keinen Einfluss auf die relative mRNA-Expression der immunoproteasomalen Untereinheiten. Auch die relative mRNA-Expression der konstitutiven proteasomalen Untereinheit $\beta 1$ ist nach IL-1 β -Stimulation unverändert. Auch im Western Blot zeigt sich die Proteinexpression der immunoproteasomalen Untereinheiten und der konstitutiven proteasomalen Untereinheit $\beta 1$ nach IL-1 β -Stimulation unverändert zur Lösungsmittelkontrolle (siehe Abb. 3.9 und Tab. 3.7).

Tabelle 3.5: **Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in Makrophagen nach Stimulation mit TNF α .**

Angegeben sind	Mittelwerte	aus drei unabhängigen Experimenten	+/- SEM.
	LMP7	LMP2	MECL1
			$\beta 1$
Kontrolle	1,00 +/- 0,30	1,00 +/- 0,39	1,00 +/- 0,09
TNF α (2 ng/ml)	1,02 +/- 0,32	0,61 +/- 0,35	0,65 +/- 0,39
TNF α (5 ng/ml)	1,17 +/- 0,51	0,86 +/- 0,66	0,90 +/- 0,67
IFN γ	3,67 +/- 2,01	8,49 +/- 0,05	6,55 +/- 0,09

Tabelle 3.6: **Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in HAoSMC nach IFN γ -Stimulation.**

Angegeben sind	Mittelwerte	aus drei	unabhängigen	Experimenten	+/- SEM.
	LMP7	LMP2	MECL1		β 1
Kontrolle	1,00 +/- 0,00	1,00 +/- 0,07	1,00 +/- 0,03		1,00 +/- 0,10
IFN γ	5,42 +/- 0,01	14,49 +/- 0,06	6,71 +/- 0,00		0,98 +/- 0,24

Tabelle 3.7: **Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in HAoSMC nach Stimulation mit IL1 β oder TNF α .**

Angegeben sind	Mittelwerte	aus drei	unabhängigen	Experimenten	+/- SEM.
	LMP7	LMP2	MECL1		β 1
Kontrolle	1,00 +/- 0,00	1,00 +/- 0,07	1,00 +/- 0,03		1,00 +/- 0,10
IL-1 β (10 ng/ml)	0,95 +/- 0,05	0,87 +/- 0,13	1,12 +/- 0,15		1,18 +/- 0,03
TNF α (5 ng/ml)	1,29 +/- 0,17	1,74 +/- 0,18	1,46 +/- 0,09		1,15 +/- 0,09
IFN γ	5,42 +/- 0,01	14,49 +/- 0,06	6,71 +/- 0,00		0,98 +/- 0,24

Stimulation von HAoSMC mit TNF α

Nach Stimulation mit TNF α konnte in HAoSMC eine diskrete Steigerung der relativen mRNA-Expression für alle drei immunoproteasomalen Untereinheiten gezeigt werden. Im Western Blot zeigt sich jedoch eine zur Lösungsmittelkontrolle unveränderte Proteinexpression. Die konstitutive Untereinheit β 1 wird durch TNF α -Stimulation von HAoSMC auf mRNA- und Proteinebene nicht induziert (siehe Tab. 3.7 und Abb. 3.9).

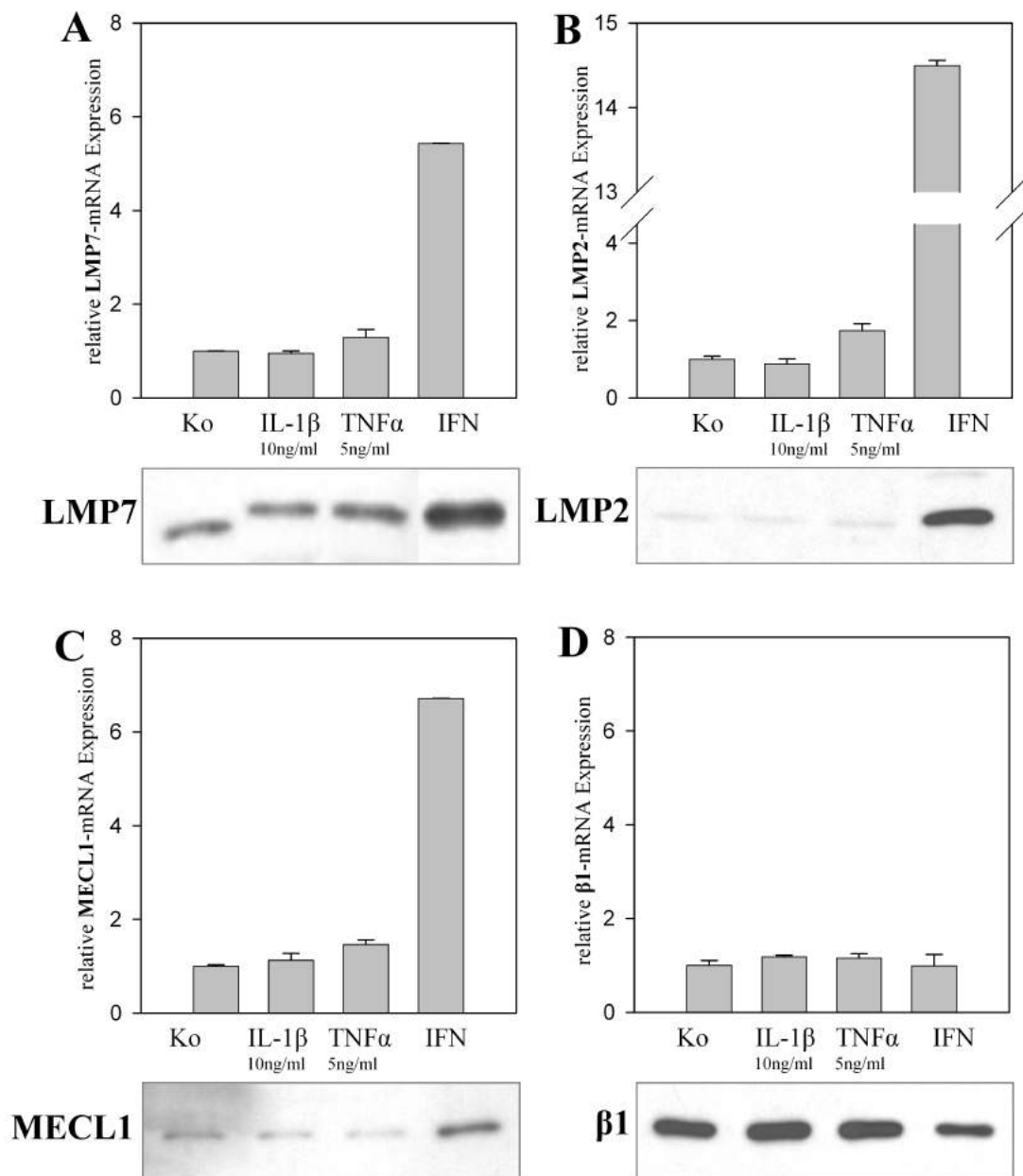


Abbildung 3.9: Relative mRNA- und Proteinexpression immunoproteasomaler Untereinheiten in HAoSMC nach Stimulation mit IL-1 β oder TNF α .

HAoSMC wurden mit 10 ng/ml IL1 β und 5 ng/ml TNF α über 24 Stunden inkubiert. **A** LMP7-Expression; **B** LMP2-Expression; **C** MECL1-Expression; **D** β 1-Expression. Ko: Lösungsmittelkontrolle; IFN: 100 U/ml IFN γ . Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM sind dargestellt. Die Proteinexpression ist im Western Blot darunter abgebildet. gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

3.4 Immunoproteasomale Untereinheiten in Endothelzellen

3.4.1 Stimulation von HUVEC mit IFN γ

Eine Stimulation mit IFN γ über 24 Stunden induziert in HUVEC die relative mRNA-Expression aller immunoproteasomaler Untereinheiten. Auch auf Proteinebene zeigt sich nach IFN γ -Stimulation eine Steigerung der Expression von LMP2, LMP7 und MECL1 (siehe Abb. 3.1).

Die relative mRNA-Expression der konstitutiven Untereinheit β 1 wird durch IFN γ -Stimulus in HUVEC im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle nicht beeinflusst. Die Western Blot-Daten für β 1 zeigen eine im Vergleich zur Kontrollbehandlung geringere β 1-Proteinexpression nach IFN γ -Stimulation (siehe Tab. 3.8 und Abb. 3.10).

3.4.2 Stimulation von HUVEC mit oxLDL

Zur Untersuchung des oxLDL-Effektes auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in HUVEC wurden die Zellen für 24 Stunden mit 10 μ g/ml oder 50 μ g/ml oxLDL inkubiert.

OxLDL führt nach Inkubation von HUVEC in beiden eingesetzten Konzentration nicht zu Änderungen der relativen mRNA-Expression von LMP2, LMP7, MECL1 oder β 1. Korrespondierend werden auch auf Proteinebene immunoproteasomale Untereinheiten und β 1 in HUVEC durch oxLDL-Stimulation nicht beeinflusst (siehe Tab. 3.9 und Abb.3.10).

3.4.3 Stimulation von HUVEC mit IL-1 β oder TNF α

Zur Untersuchung des Effektes von IL-1 β und TNF α auf die immunoproteasomale Expression in HUVEC wurden diese Zellen mit 10 ng/ml IL-1 β oder 5 ng/ml TNF α für 24 Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle für die Induktion immunoproteasomaler Untereinheiten diente eine Stimulation mit IFN γ , zur Kontrollbehandlung wurde das Lösungsmittel eingesetzt

Tabelle 3.8: **Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in HUVEC nach IFN γ -Stimulation.**

Angegeben sind	Mittelwerte	aus drei unabhängigen Experimenten	+/- SEM.	
	LMP7	LMP2	MECL1	β 1
Kontrolle	1,00 +/- 0,85	1,00 +/- 1,20	1,00 +/- 0,85	1,00 +/- 0,26
IFN γ	6,57 +/- 0,79	92,02 +/- 73,96	6,04 +/- 1,60	0,87 +/- 0,19

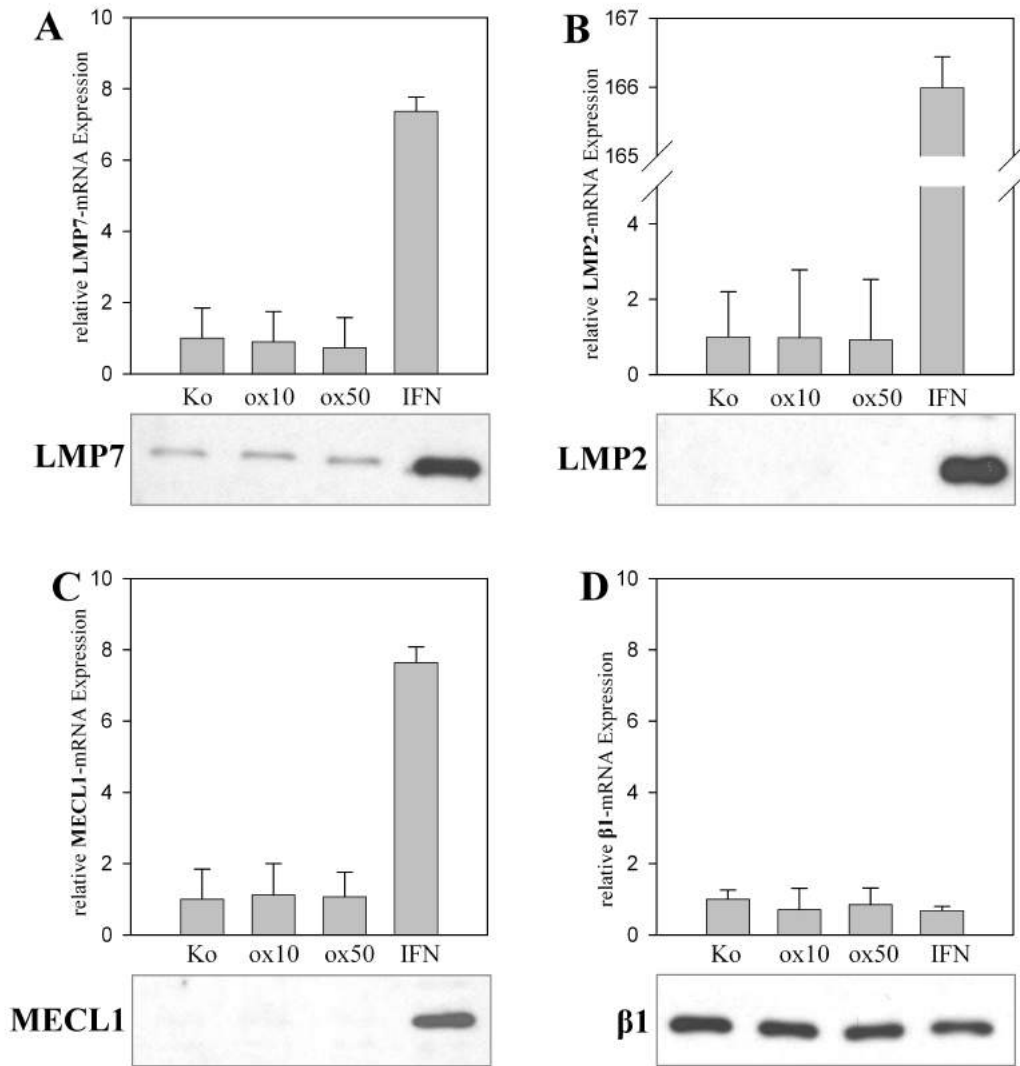


Abbildung 3.10: **Relative mRNA- und Proteinexpression in HUVEC nach Stimulation mit oxLDL.**

HUVEC wurden mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oxLDL und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oxLDL über 24 Stunden inkubiert. **A** LMP7-Expression; **B** LMP2-Expression; **C** MECL1-Expression; **D** $\beta 1$ -Expression. Ko: Lösungsmittelkontrolle; IFN: 100 U/ml IFN γ . Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM sind dargestellt. Die Proteinexpression ist im Western Blot darunter abgebildet. gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3.9: **Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in HUVEC nach oxLDL-Behandlung.**

Angegeben sind	Mittelwerte	aus drei unabhängigen Experimenten	+/- SEM.
	LMP7	LMP2	MECL1 β 1
Kontrolle	1,00 +/- 0,85	1,00 +/- 1,20	1,00 +/- 0,85 1,00 +/- 0,26
10 μ g/ml oxLDL	0,90 +/- 0,85	0,98 +/- 1,80	1,12 +/- 0,88 0,71 +/- 0,60
50 μ g/ml oxLDL	0,73 +/- 0,85	0,92 +/- 1,61	1,07 +/- 0,69 0,85 +/- 0,47
IFN γ	7,37 +/- 0,40	165,99 +/- 0,45	7,64 +/- 0,44 0,68 +/- 0,12

Tabelle 3.10: **Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in HUVEC nach IL1 β - oder TNF α -Behandlung.**

Angegeben sind	Mittelwerte	aus drei unabhängigen Experimenten	+/- SEM.
	LMP7	LMP2	MECL1 β 1
Kontrolle	1,00 +/- 1,51	1,00 +/- 2,49	1,00 +/- 1,12 1,00 +/- 0,05
IL-1 β (10 ng/ml)	1,06 +/- 0,50	1,13 +/- 0,87	0,79 +/- 0,50 0,99 +/- 0,10
TNF α (5 ng/ml)	1,48 +/- 0,55	2,28 +/- 0,68	0,95 +/- 0,55 0,94 +/- 0,13
IFN	5,78 +/- 0,45	18,06 +/- 1,06	4,44 +/- 0,41 1,06 +/- 0,19

Stimulation von HUVEC mit IL-1 β

Die immunoproteasomalen Untereinheiten und die konstitutive Untereinheit β 1 werden nach IL-1 β -Stimulation von HUVEC auf mRNA- und Proteinebene zur Lösungsmittelkontrolle unverändert exprimiert (siehe Tab. 3.10 und Abb. 3.11).

Stimulation von HUVEC mit TNF α

Die Behandlung von HUVEC mit TNF α führt zu gesteigerter relativer mRNA-Expression von LMP2 und LMP7. Die LMP7-Expression zeigt sich auch auf Proteinebene erhöht, eine entsprechende Steigerung von LMP2-Protein kann nicht gezeigt werden. MECL1 und die konstitutive Untereinheit β 1 zeigen sich auf mRNA-Ebene und Proteinebene unverändert exprimiert (siehe Tab. 3.10 und Abb. 3.11).

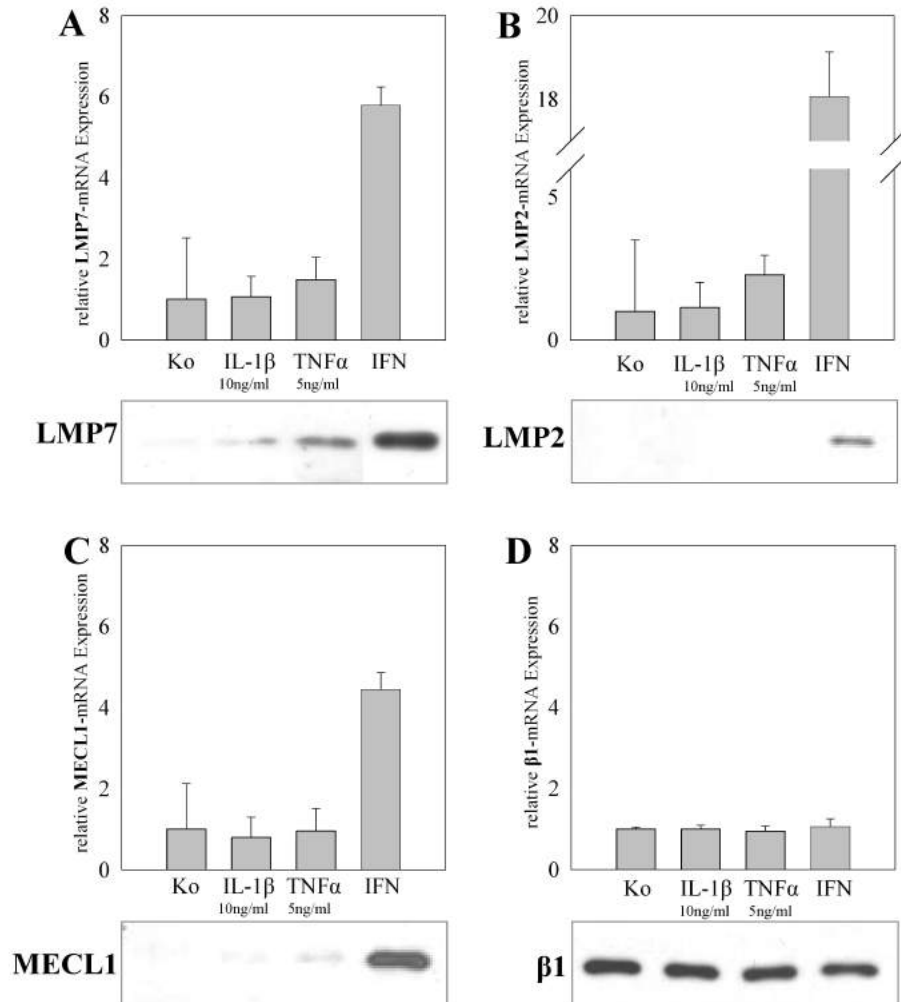


Abbildung 3.11: **Relative mRNA- und Proteinexpression immunoproteasomaler Untereinheiten in HUVEC nach Stimulation mit IL-1 β oder TNF α .**

HUVEC wurden mit 10 ng/ml IL1 β und 5 ng/ml TNF α über 24 Stunden inkubiert. **A** LMP7-Expression; **B** LMP2-Expression; **C** MECL1-Expression; **D** β 1-Expression. Ko: Lösungsmittelkontrolle; IFN: 100 U/ml IFN γ . Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten +/- SEM sind dargestellt. Die Proteinexpression ist im Western Blot darunter abgebildet. gezeigt sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten.

3.5 Übersicht über alle Stimulationen in Tabellenform

Tabelle 3.11: Zellstimulationen im Überblick

	THP1	P	R	HAoSMC	P	R	HUVEC	P	R
IFN γ	LMP2	↑	↑	LMP2	↑	↑	LMP2	↑	↑
	LMP7	↑	↑	LMP7	↑	↑	LMP7	↑	↑
	MECL1	↑	↑	MECL1	↑	↑	MECL1	↑	↑
	β 1	↓	↑	β 1	↓	=	β 1	↓	=
TNF α	LMP2	=	=	LMP2	=	↑	LMP2	=	↑
	LMP7	=	=	LMP7	=	↑	LMP7	↑	↑
	MECL1	=	=	MECL1	=	↑	MECL1	=	=
	β 1	=	↑	β 1	=	=	β 1	=	=
oxLDL	LMP2	=	=	nicht bestimmt			LMP2	=	=
	LMP7	=	=				LMP7	=	=
	MECL1	=	=				MECL1	=	=
	β 1	=	=				β 1	=	=
IL-12	LMP2	=	=	nicht bestimmt			nicht bestimmt		
	LMP7	=	=						
	MECL1	=	=						
	β 1	=	=						
IL-18	LMP2	=	=	nicht bestimmt			nicht bestimmt		
	LMP7	=	=						
	MECL1	=	=						
	β 1	=							
IL-12 + IL-18	LMP2	=	=	nicht bestimmt			nicht bestimmt		
	LMP7	=	=						
	MECL1	=	=						
	β 1	=	=						
IL-1 β	LMP2	=	=	LMP2	=	=	LMP2	=	=
	LMP7	=	=	LMP7	=	=	LMP7	=	=
	MECL1	=	=	MECL1	=	=	MECL1	=	=
	β 1	=	↑	β 1	=	=	β 1	=	=

Proteingehalt: P, relativer mRNA-Gehalt: R, unveränderte Konzentration: =, erhöhte Konzentration: ↑, verminderte Konzentration: ↓

4 Diskussion

Das UPS beeinflusst wichtige Prozesse der Atherogenese [104]. Eine Dysfunktion des UPS könnte zur Krankheitsprogression der Atherosklerose beitragen. Fokus bisheriger Untersuchungen zum Proteasom in der Atherogenese war das konstitutive Proteasom mit seinen katalytisch aktiven β -Untereinheiten ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$). Es ist jedoch bekannt, dass in Reaktion auf proinflammatorische Zytokine wie zum Beispiel $\text{IFN}\gamma$ alternative proteasomale Untereinheiten - sogenannte immunoproteasomale Untereinheiten (LMP7, LMP2, MECL1) - in das Proteasom eingebaut werden. Die entstehenden Immunoproteasomen haben eine veränderte Peptidaseaktivität und Schnittstellenpräferenz. Derzeit wird diskutiert, ob Immunoproteasomen auch eine erhöhte proteolytische Aktivität besitzen, welche möglicherweise eine verbesserte Clearance dysfunktionaler Proteine zur Folge hat [87]. Eine derartige Regulation könnte auch für die Atherogenese relevant sein. Zur Rolle von Immunoproteasomen in der Atherosklerose ist bisher wenig bekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, inwiefern die Expression von Immunoproteasomen in für die Atherogenese relevanten Zellen durch proatherogene Stimuli induzierbar ist. Hierzu wurden Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Makrophagen/Schaumzellen untersucht.

Eine Inkubation mit $\text{IFN}\gamma$ führte in allen untersuchten Zelltypen zu einer ausgeprägten Zunahme der Expression immunoproteasomaler Untereinheiten. Darüber hinaus konnte nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation eine verminderte Expression der konstitutiven proteasomalen Untereinheit $\beta 1$ gezeigt werden.

Für einen weiteren proinflammatorischen Mediator, $\text{TNF}\alpha$, konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen zur Steigerung der mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten führt. Auf die Immunoproteasomale Expression in Makrophagen hatte $\text{TNF}\alpha$ keinen Einfluss.

Durch oxLDL-Beladung von THP1-Makrophagen konnte nachgewiesen werden, dass die Transformation eines Makrophagen in eine mit oxLDL überladene Schaumzelle die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten nicht beeinflusst.

Auch die Stimulation mit IL-1 β , IL-12 und IL-18 führte in dem von mir gewählten Zellkulturmodell nicht zu einer veränderten Expression von Immunoproteasomen.

Nachfolgend werden diese Ergebnisse näher erläutert und in den Kontext der bisher publizierten Daten gesetzt.

4.1 Expression von immunoproteasomalen Untereinheiten in der Plaque

Grundexpression und Induzierbarkeit von Immunoproteasomen in der atherosklerotischen Plaque sind abhängig vom Zelltyp

Makrophagen zeigen als Zellen des angeborenen Immunsystems eine, bereits unter Basalbedingungen, vergleichsweise hohe Expression immunoproteasomaler Untereinheiten, wohingegen in vaskulären Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen immunoproteasomale Untereinheiten ohne Zytokinstimulation kaum detektierbar sind (siehe Abb. 3.1).

Publizierte Daten zeigen eine basal hohe, konstitutive Expression von Immunoproteasomen in immunologisch relevanten Zellen [75], während die meisten anderen Gewebe Immunoproteasomen konstitutiv auf einem sehr niedrigen Niveau exprimieren [91, 20]. In der vorliegenden Arbeit konnte dies mittels des eingesetzten Zellkulturmodells auch für atheroskleroserelevante Zellen bestätigt werden.

Durch Stimulation mit IFN γ konnte eine ausgeprägte Induktion von immunoproteasomalen Untereinheiten in allen untersuchten Zelltypen gezeigt werden. Der stimulationsabhängige Konzentrationsanstieg von Immunoproteasomen in Endothelzellen und glatten Muskelzellen war deutlich ausgeprägter als in Makrophagen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch die bereits hohe Grundexpression immunoproteasomaler Untereinheiten in Makrophagen durch IFN γ zusätzlich stimulierbar ist.

In der Atherogenese sind die Zellen der Gefäßwand veränderten Umgebungsbedingungen ausgesetzt. Eine Vielzahl von Zytokinen, Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

und Zell-Zell-Interaktionen führen zu einer durch chronische Inflammation und oxidative Belastung charakterisierten Mikroumgebung.

Dieser veränderten Mikroumgebung sind auch Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen im Rahmen der Atherogenese ausgesetzt. Durch Stimulationsuntersuchungen im Zellkulturmodell wurde in der vorliegenden Arbeit exemplarisch und stark vereinfacht die Mikroumgebung der atherosklerotischen Plaque imitiert, um die Effekte der einzelnen Mediatoren auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten näher charakterisieren zu können.

Die in meiner Arbeit gezeigte, durch proatherogene Mediatoren induzierte Hochregulation immunoproteasomaler Untereinheiten könnte als primär stressinduzierte Zelladaptation auf ein verändertes Umgebungsmilieu gedeutet werden. Immunoproteasomale Aktivität würde in diesem Zusammenhang der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase unter gesteigerter oxidativer Belastung dienen. Seifert et al. [87] konnten zeigen, dass Immunoproteasomen oxidativ beschädigte Proteine schneller und effektiver abbauen können als konstitutive Proteasomen. Vor diesem Hintergrund ist es möglich, dass Expression und katalytische Aktivität von Immunoproteasomen vasoprotektiv und antiatherogen wirken.

4.2 IFN γ - potentester Induktor von immunoproteasomalen Untereinheiten in atheroskleroserelevanten Zellen

IFN γ spielt als proatherosklerotisches und proinflammatorisches Zytokin eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch *in vitro*-Stimulation eine ausgeprägte IFN γ -vermittelte Steigerung der Expression von LMP7, LMP2 und MECL1 in Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen gezeigt werden. Eine vergleichbar hohe Induktion immunoproteasomaler Untereinheiten konnte mit keinem weiteren untersuchten Mediator erreicht werden. IFN γ -Stimulation führte darüber hinaus nicht nur zur Steigerung immunoproteasomaler Untereinheiten, sondern auch zu vermindertem zellulärem Gehalt der konstitutiven proteasomalen Untereinheit β 1. Überraschenderweise zeigte sich auf mRNA-Ebene eine gleichbleibende bis geringfügig erhöhte Expression von β 1.

Publizierte Daten ergaben auch für humane Nierenzellen eine reziproke Regulation der

immunoproteasomalen und proteasomalen Untereinheiten nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation [2]. Dieses Expressionsmuster konnte auch für Makrophagen, Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. In der erwähnten Studie zu humanen Nierenzellen zeigte sich bei gleichbleibender mRNA-Expression nur die Proteinkonzentration verändert [2, 44]. Ursächlich wird hier eine posttranskriptionale Regulation diskutiert. Dies könnte auch für die immunoproteasomale Regulation in den untersuchten Zelltypen der vorliegenden Arbeit zutreffen.

In Makrophagen, Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen konnten wir eine reziproke Regulation von LMP2 und $\beta 1$ nachweisen. Dies macht eine entsprechende Regulation auch der anderen immunoproteasomalen Untereinheiten LMP7 und MECL1 in den atheroskleroserelevanten Zellen wahrscheinlich. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht, könnte jedoch Inhalt weiterführender Studien sein.

Durch die gezeigte reziproke Regulation von LMP2 und $\beta 1$ ergeben sich Hinweise darauf, dass es in der atherosklerotischen Plaque unter anhaltendem $\text{IFN}\gamma$ -Einfluss möglicherweise zu einem Austausch von konstitutiven Proteasomen durch Immunoproteasomen kommt. Dem Immunoproteasom könnte somit in der Pathophysiologie der Atherosklerose größere Bedeutung zukommen als bislang angenommen.

4.3 $\text{TNF}\alpha$ - Modulator der immunoproteasomalen Expression

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha$ die Expression von LMP7 in Endothelzellen steigert. In Makrophagen hatte $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation keinen Einfluss auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten, führte jedoch konzentrationsabhängig zu gesteigerter Expression der konstitutiven proteasomalen Untereinheit $\beta 1$.

$\text{TNF}\alpha$ weist im Vergleich mit $\text{IFN}\gamma$ eine deutlich geringere Potenz zur Induktion immunoproteasomaler Untereinheiten auf. Auch lassen sich $\text{TNF}\alpha$ -Effekte auf die immunoproteasomale Expression nur in Endothelzellen und glattmuskulären Zellen jedoch nicht in Makrophagen nachweisen.

Insgesamt sind $\text{TNF}\alpha$ -Effekte auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten

differenzierter und weniger einheitlich als die durch $\text{IFN}\gamma$ ausgelösten Effekte. Dies ist mit der bislang veröffentlichten Literatur vereinbar und spiegelt sich auch in den Daten aktueller Publikationen.

So zeigen mehrere Veröffentlichungen, dass $\text{TNF}\alpha$ -Monostimulation keinen Einfluss auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in humanen Endothelzellen [20], Kolonkarzinomzellen und Monozyten [1] hat. Gavilan et al [23] konnten im Gegensatz dazu durch $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation eine gesteigerte immunoproteasomale Expression nachweisen. Allerdings konnten sie auch eine eventuelle Verunreinigungen durch $\text{IFN}\gamma$ nicht sicher ausschließen.

Bei uneinheitlichen Ergebnissen zu $\text{TNF}\alpha$ -Monostimulationen und Expression von Immunoproteasomen liegen jedoch eindeutige Daten über ko-stimulatorische Effekte von $\text{TNF}\alpha$ vor. Stimulation von $\text{TNF}\alpha$ zusammen mit $\text{IFN}\gamma$ oder $\text{IL-1}\beta$ bewirkt eine deutlichere Zunahme von immunoproteasomalen Untereinheiten als eine $\text{TNF}\alpha$ -Monostimulation [1, 3].

Da in der vorliegenden Arbeit keine Ko-Stimulationen mit $\text{TNF}\alpha$ und zusätzlichen Zytokinen durchgeführt wurden, sind die Daten der vorliegenden Arbeit nur teilweise mit den vorhandenen Veröffentlichungen vergleichbar.

$\text{TNF}\alpha$ könnte in der atherosklerotischen Gefäßläsion vor allem ko-stimulatorisch aktiv sein und die Expression von immunoproteasomalen Untereinheiten abhängig von umgebendem Zytokinmilieu und Aktivitätszustand der Zelle beeinflussen.

4.4 Immunoproteasomale Untereinheiten werden durch IL-12, IL-18 und IL-1 β nicht induziert

4.4.1 Interleukin-12 und Interleukin-18

IL-12 und IL-18 werden zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt und werden auch in der atherosklerotischen Plaque exprimiert. Sie gelten als potente Induktoren der Freisetzung von $\text{IFN}\gamma$ durch T-Lymphozyten. Vor allem durch Ko-Stimulation können IL-12 und IL-18 eine starke $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung in der Zielzelle bewirken [58, 77, 71].

Munder et al. [73] gelang der Nachweis, dass durch Ko-Stimulation von IL-12 und IL-18 Makrophagen zur Freisetzung von $\text{IFN}\gamma$ angeregt werden, was wiederum über autokrine Stimulation zu weiterer Makrophagenaktivierung führen kann.

Ausgehend von diesen Publikationen sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob in THP1-abgeleiteten Makrophagen durch IL-12 und/oder IL-18-Stimulation Immunoproteasomen induziert werden können.

IL-12 und IL-18 sind im gewählten Zellkulturmodell nicht in der Lage Immunoproteasomen in Makrophagen zu induzieren, scheinen also auch durch Ko-Stimulation keine Freisetzung von $\text{IFN}\gamma$ durch die THP1-Makrophagen zu bewirken und über diesen Weg indirekt Immunoproteasomen zu induzieren.

Es bleibt zu diskutieren ob das gewählte Zellkulturmodell oder eventuell der gewählte Stimulationszeitraum ursächlich für den ausbleibenden IL-12 und IL-18-Effekt sind.

4.4.2 Interleukin-1 β

IL-1 β kann von Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen produziert werden und ist in der atherosklerotischen Plaque nachweisbar [54].

In der vorliegenden Arbeit wurde der IL-1 β -Einfluss auf die Expression von immunoproteasomalen Untereinheiten im Zellkulturmodell an atheroskleroserelevanten Zellen systematisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass IL-1 β -Stimulation keinen Einfluss auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in den untersuchten Zelltypen hat.

Loukissa et al. [64], die verschiedene Mediatoren (u.a. IL-1, IL-10, IL-6, $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$) auf deren Potenz zur Induktion immunoproteasomaler Untereinheiten in HUVEC untersuchten, konnten übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit keinen Effekt von IL-1 auf die Expression von LMP7 zeigen.

Somit scheint IL-1 β nicht an der Regulation der Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in Makrophagen, Endothelzellen und vaskulären, glatten Muskelzellen beteiligt zu sein.

4.5 OxLDL hat keinen Einfluss auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten

OxLDL spielen in der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle (vgl. Abschnitt 1.4.1). OxLDL-Exposition von Monozyten und Makrophagen hat eine Reihe überwiegend als proatherosklerotisch zu wertende biologische Konsequenzen, die sowohl durch spezifische

Signaltransduktionswege als auch unspezifische Effekte wie zum Beispiel die Ausbildung großer Proteinkonglomerate ausgelöst werden [33, 81, 24, 105, 74].

Durch oxLDL werden Genexpression und Proteom von Monozyten und Makrophagen moduliert und reguliert und Signaltransduktionswege, inflammatorische Prozesse, Zellproliferation und Apoptose beeinflusst [74, 50, 88, 102, 31]. Die Effekte von oxLDL auf ausdifferenzierte Makrophagen sind dabei vielfältig und komplex und noch nicht vollständig verstanden.

Der Zusammenhang von oxLDL-Stimulation in Makrophagen und Expressionsniveau von Genen und Proteinen des Immunoproteasoms wurde bislang kaum untersucht. Auch zu oxLDL-Effekten auf die IFN γ -Expression, dem potentesten Induktor von Immunoproteasomen lassen sich kaum veröffentlichte Daten finden.

Aufgrund der konstitutiv hohen Expression von Immunoproteasomen in Makrophagen, der nachgewiesenen Expression in humanen Plaques (unpublizierte Daten, siehe Einleitung), sowie den ausgeprägten morphologischen Veränderungen der Makrophagen nach oxLDL-Phagozytose, war in der vorliegenden Arbeit ein nachweisbarer Effekt von oxLDL auf die Expression immunoproteasomaler Untereinheiten erwartet worden. Überraschenderweise konnte ein solcher Effekt nicht gezeigt werden.

Daten zur Beeinflussung der immunoproteasomalen Aktivität durch oxLDL liegen bislang nicht vor. Für konstitutive Proteasomen ist jedoch bekannt, dass oxLDL einen bisphasischen Effekt auf deren Aktivität ausüben kann [97]. Neben einer initialen Aktivitätszunahme des UPS nach oxLDL-Exposition konnte gezeigt werden, dass anhaltende oxLDL-Exposition die proteasomale Aktivität hemmt, wodurch es schließlich zu Proteinakkumulation und Apoptose kommt [97].

4.6 Ausblick

Im Zusammenhang mit der Atherosklerose stand bislang vor allem das konstitutive Proteasom im Fokus der Untersuchungen. Daher liegen kaum Daten zur Rolle des Immunoproteasoms vor.

Die vorliegende Arbeit ist in ihrem systematischen und deskriptiven Ansatz eine der ersten grundlegenden Untersuchungen zur Induzierbarkeit von Immunoproteasomen in atheroskle-

roserelevanten Zellen. Zwei wichtige proatherosklerotische Mediatoren, $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$, konnten als potente Induktoren immunoproteasomaler Untereinheiten in kardiovaskulären Zellen identifiziert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Stimulation mit weiteren proinflammatorischen Zytokinen (IL-12, IL-18, IL-1 β) oder oxLDL keinen Einfluss auf die Expression von Immunoproteasomen in Makrophagen, vaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen hat. Dies lässt den Schluss zu, dass die Expression von Immunoproteasomen in vaskulären Zellen spezifisch induziert wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen keine Aussage darüber zu, ob Vorhandensein oder Aktivität des Immunoproteasoms als pro- oder antiatherogen zu werten ist. Jedoch kann eine generelle Induzierbarkeit von Immunoproteasomen in an der Plaquebildung beteiligten Zellen auf proatherogene Stimuli hin gezeigt werden. Eine Publikation von Seifert et al. [87] zeigte eine Hochregulation immunoproteasomaler Untereinheiten als Reaktion auf oxidativen Stress. Gleichzeitig scheint das Immunoproteasom besser in der Lage zu sein die Proteinhomeostase und damit das Zellüberleben aufrechtzuerhalten als das konstitutive Proteasom. Auch wenn diesbezüglich aktuell noch widersprüchliche Daten bestehen [46] könnten Immunoproteasomen im Rahmen der Atherogenese zu einer Reduktion der durch oxidativen Stress modifizierten Proteine beitragen.

Vor diesem Hintergrund erscheinen weiterführende Untersuchungen sinnvoll. Aufgrund der schwierigen Simulation der proatherogenen Verhältnisse *in vitro* erscheint der Schritt ins Tiermodell sinnvoll. Hier könnten Mausmodelle der Atherosklerose, zum Beispiel die LDL-Rezeptor-Knockout-Maus oder die Apo-E-Knockout-Maus mit immunoproteasomdefizienten Tieren gekreuzt werden. Diese Modelle würden die Untersuchung der Expression immunoproteasomaler Untereinheiten im Gefäß im Zeitverlauf ermöglichen. Ergänzt werden könnten diese Daten mit Untersuchungen zur proteasomalen Aktivität in den verschiedenen Stadien der Atherosklerose. Dabei könnten zunächst Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität des Immunoproteasoms in den verschiedenen Stadien der Atherosklerose weiteren Aufschluss über funktionelle und pathophysiologische Zusammenhänge geben.

Literaturverzeichnis

- [1] AKI, M. ; SHIMBARA, N. ; TAKASHINA, M. ; AKIYAMA, K. ; KAGAWA, S. ; TAMURA, T. ; TANAHASHI, N. ; YOSHIMURA, T. ; TANAKA, K. ; ICHIHARA, A. : Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. In: *J Biochem* 115 (1994), Feb, Nr. 2, S. 257–269
- [2] AKIYAMA, K. ; YOKOTA, K. ; KAGAWA, S. ; SHIMBARA, N. ; TAMURA, T. ; AKIOKA, H. ; NOTHWANG, H. G. ; NODA, C. ; TANAKA, K. ; ICHIHARA, A. : cDNA cloning and interferon gamma down-regulation of proteasomal subunits X and Y. In: *Science* 265 (1994), Aug, Nr. 5176, S. 1231–1234
- [3] BANDMAN, O. ; COLEMAN, R. T. ; LORING, J. F. ; SEILHAMER, J. J. ; COCKS, B. G.: Complexity of inflammatory responses in endothelial cells and vascular smooth muscle cells determined by microarray analysis. In: *Ann N Y Acad Sci* 975 (2002), Dec, S. 77–90
- [4] BERLINER, J. A. ; HEINECKE, J. W.: The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. In: *Free Radic Biol Med* 20 (1996), Nr. 5, S. 707–727
- [5] BERNASSOLA, F. ; CIECHANOVER, A. ; MELINO, G. : The ubiquitin proteasome system and its involvement in cell death pathways. In: *Cell Death Differ* 17 (2010), Jan, Nr. 1, 1–3. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.189>. – DOI 10.1038/cdd.2009.189
- [6] BLESSING, E. ; BEA, F. ; KUO, C. chou ; CAMPBELL, L. A. ; CHESEBRO, B. ; ROSENFIELD, M. E.: Lesion progression and plaque composition are not altered in older apoE^{-/-} mice lacking tumor necrosis factor-alpha receptor p55. In: *Atherosclerosis* 176 (2004), Oct, Nr. 2, 227–232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2004.05.033>. – DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2004.05.033
- [7] BREUSING, N. ; GRUNE, T. : Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. In: *Biol Chem* 389 (2008), Mar, Nr. 3, 203–209. <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2008.029>. – DOI 10.1515/BC.2008.029
- [8] BRĂNÉN, L. ; HOVGAARD, L. ; NITULESCU, M. ; BENGTSSON, E. ; NILSSON, J. ; JOVINGE, S. : Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (2004), Nov, Nr. 11, 2137–2142. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000143933.20616.1b>. – DOI 10.1161/01.ATV.0000143933.20616.1b
- [9] BROEMER, M. ; MEIER, P. : Ubiquitin-mediated regulation of apoptosis. In: *Trends Cell Biol* 19 (2009), Mar, Nr. 3, 130–140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2009.01.004>. – DOI 10.1016/j.tcb.2009.01.004
- [10] CALLAHAN, M. K. ; WOHLFERT, E. A. ; MÉNORET, A. ; SRIVASTAVA, P. K.: Heat shock up-regulates lmp2 and lmp7 and enhances presentation of immunoproteasome-dependent epitopes. In: *J Immunol* 177 (2006), Dec, Nr. 12, S. 8393–8399

- [11] CHAPPLE, S. J. ; SIOW, R. C. M. ; MANN, G. E.: Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. In: *Int J Biochem Cell Biol* 44 (2012), Aug, Nr. 8, 1315–1320. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.021>. – DOI 10.1016/j.biocel.2012.04.021
- [12] DAHLMANN, B. ; RUPPERT, T. ; KLOETZEL, P. M. ; KUEHN, L. : Subtypes of 20S proteasomes from skeletal muscle. In: *Biochimie* 83 (2001), Nr. 3-4, S. 295–299
- [13] DAHLMANN, B. ; RUPPERT, T. ; KUEHN, L. ; MERFORTH, S. ; KLOETZEL, P. M.: Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties. In: *J Mol Biol* 303 (2000), Nov, Nr. 5, 643–653. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.2000.4185>. – DOI 10.1006/jmbi.2000.4185
- [14] DAHLMANN, B. : Role of proteasomes in disease. In: *BMC Biochem* 8 Suppl 1 (2007), S3. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2091-8-S1-S3>. – DOI 10.1186/1471-2091-8-S1-S3
- [15] DING, Q. ; MARTIN, S. ; DIMAYUGA, E. ; BRUCE-KELLER, A. J. ; KELLER, J. N.: LMP2 knock-out mice have reduced proteasome activities and increased levels of oxidatively damaged proteins. In: *Antioxid Redox Signal* 8 (2006), Nr. 1-2, 130–135. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2006.8.130>. – DOI 10.1089/ars.2006.8.130
- [16] ELEUTERI, A. M. ; KOHANSKI, R. A. ; CARDOZO, C. ; ORLOWSKI, M. : Bovine spleen multicatalytic proteinase complex (proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by LMP7, LMP2, and MECL1 and changes in properties and specificity. In: *J Biol Chem* 272 (1997), May, Nr. 18, S. 11824–11831
- [17] ELHAGE, R. ; JAWIEN, J. ; RUDLING, M. ; LJUNGGREN, H.-G. ; TAKEDA, K. ; AKIRA, S. ; BAYARD, F. ; HANSSON, G. K.: Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. In: *Cardiovasc Res* 59 (2003), Jul, Nr. 1, S. 234–240
- [18] FERRINGTON, D. A. ; HUSOM, A. D. ; THOMPSON, L. V.: Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. In: *FASEB J* 19 (2005), Apr, Nr. 6, 644–646. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.04-2578fje>. – DOI 10.1096/fj.04-2578fje
- [19] FILIPPO, C. D. ; MARFELLA, R. ; D'AMICO, M. : Possible dual role of ubiquitin-proteasome system in the atherosclerotic plaque progression. In: *J Am Coll Cardiol* 52 (2008), Oct, Nr. 16, 1350–1; author reply 1351. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2008.06.045>. – DOI 10.1016/j.jacc.2008.06.045
- [20] FOSS, G. S. ; LARSEN, F. ; SOLHEIM, J. ; PRYDZ, H. : Constitutive and interferon-gamma-induced expression of the human proteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1. In: *Biochim Biophys Acta* 1402 (1998), Mar, Nr. 1, S. 17–28
- [21] FURCHGOTT, R. F. ; ZAWADZKI, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. In: *Nature* 288 (1980), Nov, Nr. 5789, S. 373–376
- [22] GALKINA, E. ; LEY, K. : Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). In: *Annu Rev Immunol* 27 (2009), 165–197. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132620>. – DOI 10.1146/annurev.immunol.021908.132620

- [23] GAVILÁN, M. P. ; CASTAÑO, A. ; TORRES, M. ; PORTAVELLA, M. ; CABALLERO, C. ; JIMÉNEZ, S. ; GARCÍA-MARTÍNEZ, A. ; PARRADO, J. ; VITORICA, J. ; RUANO, D. : Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects. In: *J Neurochem* 108 (2009), Jan, Nr. 1, 260–272. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05762.x>. – DOI 10.1111/j.1471-4159.2008.05762.x
- [24] GLASS, C. K. ; WITZTUM, J. L.: Atherosclerosis. the road ahead. In: *Cell* 104 (2001), Feb, Nr. 4, S. 503–516
- [25] GLICKMAN, M. H. ; CIECHANOVER, A. : The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. In: *Physiol Rev* 82 (2002), Apr, Nr. 2, 373–428. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00027.2001>. – DOI 10.1152/physrev.00027.2001
- [26] GLICKMAN, M. H. ; RAVEH, D. : Proteasome plasticity. In: *FEBS Lett* 579 (2005), Jun, Nr. 15, 3214–3223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.04.048>. – DOI 10.1016/j.febslet.2005.04.048
- [27] GRIFFIN, T. A. ; NANDI, D. ; CRUZ, M. ; FEHLING, H. J. ; KAER, L. V. ; MONACO, J. J. ; COLBERT, R. A.: Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. In: *J Exp Med* 187 (1998), Jan, Nr. 1, S. 97–104
- [28] GROETTRUP, M. ; STANDERA, S. ; STOHWASSER, R. ; KLOETZEL, P. M.: The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997), Aug, Nr. 17, S. 8970–8975
- [29] GRUNE, T. ; MERKER, K. ; SANDIG, G. ; DAVIES, K. J. A.: Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. In: *Biochem Biophys Res Commun* 305 (2003), Jun, Nr. 3, S. 709–718
- [30] HALVORSEN, B. ; OTTERDAL, K. ; DAHL, T. B. ; SKJELLAND, M. ; GULLESTAD, L. ; ØIE, E. ; AUKRUST, P. : Atherosclerotic plaque stability—what determines the fate of a plaque? In: *Prog Cardiovasc Dis* 51 (2008), Nr. 3, 183–194. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pcad.2008.09.001>. – DOI 10.1016/j.pcad.2008.09.001
- [31] HAMILTON, T. ; MA, G. ; CHISOLM, G. : Oxidized low density lipoprotein suppresses the expression of tumor necrosis factor-alpha mRNA in stimulated murine peritoneal macrophages. In: *The Journal of Immunology* 144 (1990), Nr. 6, S. 2343–2350
- [32] HANSSON, G. K. ; HELLSTRAND, M. ; RYMO, L. ; RUBBIA, L. ; GABBIANI, G. : Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. In: *J Exp Med* 170 (1989), Nov, Nr. 5, S. 1595–1608
- [33] HANSSON, G. K.: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. In: *N Engl J Med* 352 (2005), Apr, Nr. 16, 1685–1695. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra043430>. – DOI 10.1056/NEJMra043430
- [34] HANSSON, G. K. ; LIBBY, P. : The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. In: *Nat Rev Immunol* 6 (2006), Jul, Nr. 7, 508–519. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1882>. – DOI 10.1038/nri1882

- [35] HANSSON, G. K. ; ROBERTSON, A.-K. L. ; SÖDERBERG-NAUCLÉR, C. : Inflammation and atherosclerosis. In: *Annu Rev Pathol* 1 (2006), 297–329. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100100>. – DOI 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100100
- [36] HAUER, A. D. ; UYTENHOVE, C. ; VOS, P. de ; STROOBANT, V. ; RENAULD, J. C. ; BERKEL, T. J. C. ; SNICK, J. van ; KUIPER, J. : Blockade of interleukin-12 function by protein vaccination attenuates atherosclerosis. In: *Circulation* 112 (2005), Aug, Nr. 7, 1054–1062. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.533463>. – DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.533463
- [37] HEINK, S. : *Die proteasomale Homöostase - Dynamik der Biogenese und Turnover des humanen 20S Proteasoms*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, Diss., 2005
- [38] HEINK, S. ; LUDWIG, D. ; KLOETZEL, P.-M. ; KRÜGER, E. : IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), Jun, Nr. 26, 9241–9246. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0501711102>. – DOI 10.1073/pnas.0501711102
- [39] HERMANN, J. ; GULATI, R. ; NAPOLI, C. ; WOODRUM, J. E. ; LERMAN, L. O. ; RODRIGUEZ-PORCEL, M. ; SICA, V. ; SIMARI, R. D. ; CIECHANOVER, A. ; LERMAN, A. : Oxidative stress-related increase in ubiquitination in early coronary atherogenesis. In: *FASEB J* 17 (2003), Sep, Nr. 12, 1730–1732. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.02-0841fje>. – DOI 10.1096/fj.02-0841fje
- [40] HERRMANN, J. ; CIECHANOVER, A. ; LERMAN, L. O. ; LERMAN, A. : The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases—a hypothesis extended. In: *Cardiovasc Res* 61 (2004), Jan, Nr. 1, S. 11–21
- [41] HERRMANN, J. ; LERMAN, L. O. ; LERMAN, A. : On to the road to degradation: atherosclerosis and the proteasome. In: *Cardiovasc Res* 85 (2010), Jan, Nr. 2, 291–302. <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvp333>. – DOI 10.1093/cvr/cvp333
- [42] HERRMANN, J. ; SAGUNER, A. M. ; VERSARI, D. ; PETERSON, T. E. ; CHADE, A. ; OLSON, M. ; LERMAN, L. O. ; LERMAN, A. : Chronic proteasome inhibition contributes to coronary atherosclerosis. In: *Circ Res* 101 (2007), Oct, Nr. 9, 865–874. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.152959>. – DOI 10.1161/CIRCRESAHA.107.152959
- [43] HERRMANN, J. ; SOARES, S. M. ; LERMAN, L. O. ; LERMAN, A. : Potential role of the ubiquitin-proteasome system in atherosclerosis: aspects of a protein quality disease. In: *J Am Coll Cardiol* 51 (2008), May, Nr. 21, 2003–2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2008.02.047>. – DOI 10.1016/j.jacc.2008.02.047
- [44] HISAMATSU, H. ; SHIMBARA, N. ; SAITO, Y. ; KRISTENSEN, P. ; HENDIL, K. B. ; FUJIWARA, T. ; TAKAHASHI, E. ; TANAHASHI, N. ; TAMURA, T. ; ICHIHARA, A. ; TANAKA, K. : Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. In: *J Exp Med* 183 (1996), Apr, Nr. 4, S. 1807–1816

- [45] HÖRKKÖ, S. ; BINDER, C. J. ; SHAW, P. X. ; CHANG, M. K. ; SILVERMAN, G. ; PALINSKI, W. ; WITZTUM, J. L.: Immunological responses to oxidized LDL. In: *Free Radic Biol Med* 28 (2000), Jun, Nr. 12, S. 1771–1779
- [46] JAMES, N. ; SPINNENHIRN, V. ; SCHMIDTKE, G. ; BASLER, M. ; GROETTRUP, M. ; GOLDBERG, A. : Immuno and Constitutive Proteasomes Do Not Differ in Their Abilities to Degrade Ubiquitinated Proteins. In: *Cell* 152, 1184 till 1194, February 28 (2013)
- [47] JESENBERGER, V. ; JENTSCH, S. : Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002), Feb, Nr. 2, 112–121. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm731>. – DOI 10.1038/nrm731
- [48] JUNG, T. ; CATALGOL, B. ; GRUNE, T. : The proteasomal system. In: *Mol Aspects Med* 30 (2009), Aug, Nr. 4, 191–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2009.04.001>. – DOI 10.1016/j.mam.2009.04.001
- [49] KALLIO, P. J. ; WILSON, W. J. ; O'BRIEN, S. ; MAKINO, Y. ; POELLINGER, L. : Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Mar, Nr. 10, S. 6519–6525
- [50] KANG, J. H. ; KIM, H. T. ; CHOI, M.-S. ; LEE, W. H. ; HUH, T.-L. ; PARK, Y. B. ; MOON, B. J. ; KWON, O.-S. : Proteome analysis of human monocytic THP-1 cells primed with oxidized low-density lipoproteins. In: *Proteomics* 6 (2006), Feb, Nr. 4, 1261–1273. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200500290>. – DOI 10.1002/pmic.200500290
- [51] KELLER, J. N. ; HANNI, K. B. ; MARKESBERY, W. R.: Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. In: *J Neurochem* 75 (2000), Jul, Nr. 1, S. 436–439
- [52] KINGSBURY, D. J. ; GRIFFIN, T. A. ; COLBERT, R. A.: Novel propeptide function in 20 S proteasome assembly influences beta subunit composition. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Aug, Nr. 31, 24156–24162. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M001742200>. – DOI 10.1074/jbc.M001742200
- [53] KIRII, H. ; NIWA, T. ; YAMADA, Y. ; WADA, H. ; SAITO, K. ; IWAKURA, Y. ; ASANO, M. ; MORIWAKI, H. ; SEISHIMA, M. : Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003), Apr, Nr. 4, 656–660. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000064374.15232.C3>. – DOI 10.1161/01.ATV.0000064374.15232.C3
- [54] KLEEMANN, R. ; ZADELAAR, S. ; KOOISTRA, T. : Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. In: *Cardiovasc Res* 79 (2008), Aug, Nr. 3, 360–376. <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvn120>. – DOI 10.1093/cvr/cvn120
- [55] KLOETZEL, P. M.: Antigen processing by the proteasome. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001), Mar, Nr. 3, 179–187. <http://dx.doi.org/10.1038/35056572>. – DOI 10.1038/35056572
- [56] KLOETZEL, P.-M. : The proteasome and MHC class I antigen processing. In: *Biochim Biophys Acta* 1695 (2004), Nov, Nr. 1-3, 225–233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.10.004>. – DOI 10.1016/j.bbamcr.2004.10.004

- [57] KOGA, M. ; KAI, H. ; YASUKAWA, H. ; YAMAMOTO, T. ; KAWAI, Y. ; KATO, S. ; KUSABA, K. ; KAI, M. ; EGASHIRA, K. ; KATAOKA, Y. ; IMAIZUMI, T. : Inhibition of progression and stabilization of plaques by postnatal interferon-gamma function blocking in ApoE-knockout mice. In: *Circ Res* 101 (2007), Aug, Nr. 4, 348–356. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.106.147256>. – DOI 10.1161/CIRCRESAHA.106.147256
- [58] KOHNO, K. ; KATAOKA, J. ; OHTSUKI, T. ; SUEMOTO, Y. ; OKAMOTO, I. ; USUI, M. ; IKEDA, M. ; KURIMOTO, M. : IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. In: *J Immunol* 158 (1997), Feb, Nr. 4, S. 1541–1550
- [59] KOTAMRAJU, S. ; MATALON, S. ; MATSUNAGA, T. ; SHANG, T. ; HICKMAN-DAVIS, J. M. ; KALYANARAMAN, B. : Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. In: *Free Radic Biol Med* 40 (2006), Mar, Nr. 6, 1034–1044. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.052>. – DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.052
- [60] KUHN, D. J. ; HUNSUCKER, S. A. ; CHEN, Q. ; VOORHEES, P. M. ; ORLOWSKI, M. ; ORLOWSKI, R. Z.: Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. In: *Blood* 113 (2009), May, Nr. 19, 4667–4676. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2008-07-171637>. – DOI 10.1182/blood-2008-07-171637
- [61] KUNJATHOOR, V. V. ; FEBBRAIO, M. ; PODREZ, E. A. ; MOORE, K. J. ; ANDERSSON, L. ; KOEHN, S. ; RHEE, J. S. ; SILVERSTEIN, R. ; HOFF, H. F. ; FREEMAN, M. W.: Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Dec, Nr. 51, 49982–49988. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209649200>. – DOI 10.1074/jbc.M209649200
- [62] LEE, T. S. ; YEN, H. C. ; PAN, C. C. ; CHAU, L. Y.: The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (1999), Mar, Nr. 3, S. 734–742
- [63] LEON, M. L. A. ; ZUCKERMAN, S. H.: Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. In: *Inflamm Res* 54 (2005), Oct, Nr. 10, 395–411. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-005-1377-2>. – DOI 10.1007/s00011-005-1377-2
- [64] LOUKISSA, A. ; CARDOZO, C. ; ALTSCHULLER-FELBERG, C. ; NELSON, J. E.: Control of LMP7 expression in human endothelial cells by cytokines regulating cellular and humoral immunity. In: *Cytokine* 12 (2000), Sep, Nr. 9, 1326–1330. <http://dx.doi.org/10.1006/cyto.2000.0717>. – DOI 10.1006/cyto.2000.0717
- [65] LUSIS, A. J.: Atherosclerosis. In: *Nature* 407 (2000), Sep, Nr. 6801, 233–241. <http://dx.doi.org/10.1038/35025203>. – DOI 10.1038/35025203
- [66] MACAGNO, A. ; GILLIET, M. ; SALLUSTO, F. ; LANZAVECCHIA, A. ; NESTLE, F. O. ; GROETTRUP, M. : Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. In: *Eur J Immunol* 29 (1999), Dec, Nr. 12, 4037–4042. <http://dx.doi.org/10.1002/ej.1002>. – DOI 10.1002/ej.1002

- [67] MARFELLA, R. ; D'AMICO, M. ; FILIPPO, C. D. ; BALDI, A. ; SINISCALCHI, M. ; SASSO, F. C. ; PORTOGHESE, M. ; CARBONARA, O. ; CRESCENZI, B. ; SANGI-
UOLO, P. ; NICOLETTI, G. F. ; ROSSIELLO, R. ; FERRARACCIO, F. ; CACCIAPUO-
TI, F. ; VERZA, M. ; COPPOLA, L. ; ROSSI, F. ; PAOLISSO, G. : Increased ac-
tivity of the ubiquitin-proteasome system in patients with symptomatic carotid di-
sease is associated with enhanced inflammation and may destabilize the atheroscle-
rotic plaque: effects of rosiglitazone treatment. In: *J Am Coll Cardiol* 47 (2006),
Jun, Nr. 12, 2444–2455. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2006.01.073>. – DOI
10.1016/j.jacc.2006.01.073
- [68] MATHERS, C. D. ; LONCAR, D. : Projections of global mortality and burden of disease
from 2002 to 2030. In: *PLoS Med* 3 (2006), Nov, Nr. 11, e442. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0030442>. – DOI 10.1371/journal.pmed.0030442
- [69] MCLAREN, J. E. ; RAMJI, D. P.: Interferon gamma: a master regulator of atheroscle-
rosis. In: *Cytokine Growth Factor Rev* 20 (2009), Apr, Nr. 2, 125–135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.11.003>. – DOI 10.1016/j.cytogfr.2008.11.003
- [70] MEINERS, S. ; LUDWIG, A. ; STANGL, V. ; STANGL, K. : Proteasome inhibitors: poisons
and remedies. In: *Medicinal research reviews* 28 (2008), Nr. 2, S. 309–327
- [71] MICALLEF, M. J. ; OHTSUKI, T. ; KOHNO, K. ; TANABE, F. ; USHIO, S. ; NAM-
BA, M. ; TANIMOTO, T. ; TORIGOE, K. ; FUJII, M. ; IKEDA, M. ; FUKUDA, S.
; KURIMOTO, M. : Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cyto-
kine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for
interferon-gamma production. In: *Eur J Immunol* 26 (1996), Jul, Nr. 7, 1647–1651.
<http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830260736>. – DOI 10.1002/eji.1830260736
- [72] MUCHAMUEL, T. ; BASLER, M. ; AUJAY, M. A. ; SUZUKI, E. ; KALIM, K. W. ; LAUER,
C. ; SYLVAIN, C. ; RING, E. R. ; SHIELDS, J. ; JIANG, J. ; SHWONEK, P. ; PARLATI,
F. ; DEMO, S. D. ; BENNETT, M. K. ; KIRK, C. J. ; GROETTRUP, M. : A selective
inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and
attenuates progression of experimental arthritis. In: *Nat Med* 15 (2009), Jul, Nr. 7,
781–787. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.1978>. – DOI 10.1038/nm.1978
- [73] MUNDER, M. ; MALLO, M. ; EICHMANN, K. ; MODOLELL, M. : Murine macrophages
secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-
18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. In: *J Exp Med* 187 (1998),
Jun, Nr. 12, S. 2103–2108
- [74] NAGY, L. ; TONTONNOZ, P. ; ALVAREZ, J. G. ; CHEN, H. ; EVANS, R. M.: Oxidized
LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma.
In: *Cell* 93 (1998), Apr, Nr. 2, S. 229–240
- [75] NODA, C. ; TANAHASHI, N. ; SHIMBARA, N. ; HENDIL, K. B. ; TANAKA, K. : Tissue
distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats. In:
Biochem Biophys Res Commun 277 (2000), Oct, Nr. 2, 348–354. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.3676>. – DOI 10.1006/bbrc.2000.3676
- [76] OKAMURA, H. ; KASHIWAMURA, S. ; TSUTSUI, H. ; YOSHIMOTO, T. ; NAKANISHI,
K. : Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. In: *Curr Opin
Immunol* 10 (1998), Jun, Nr. 3, S. 259–264

- [77] OKAMURA, H. ; TSUTSI, H. ; KOMATSU, T. ; YUTSUDO, M. ; HAKURA, A. ; TANIMOTO, T. ; TORIGOE, K. ; OKURA, T. ; NUKADA, Y. ; HATTORI, K. : Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. In: *Nature* 378 (1995), Nov, Nr. 6552, 88–91. <http://dx.doi.org/10.1038/378088a0>. – DOI 10.1038/378088a0
- [78] PAUL, S. : Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches. In: *Bioessays* 30 (2008), Nov, Nr. 11-12, 1172–1184. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20852>. – DOI 10.1002/bies.20852
- [79] RENU, V. ; KOLODZIE, F. ; BURKE, A. ; FARB, A. : Lessons From Sudden Coronary Death A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions. In: (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1262-1275.) (2000)
- [80] ROCK, K. L. ; GRAMM, C. ; ROTHSTEIN, L. ; CLARK, K. ; STEIN, R. ; DICK, L. ; HWANG, D. ; GOLDBERG, A. L.: Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. In: *Cell* 78 (1994), Sep, Nr. 5, S. 761–771
- [81] ROSS, R. : Atherosclerosis—an inflammatory disease. In: *N Engl J Med* 340 (1999), Jan, Nr. 2, S. 115–126
- [82] SCHMIDT, M. ; LUPAS, A. N. ; FINLEY, D. : Structure and mechanism of ATP-dependent proteases. In: *Curr Opin Chem Biol* 3 (1999), Oct, Nr. 5, S. 584–591
- [83] SCHMIDT, M. ; HANNA, J. ; ELSASSER, S. ; FINLEY, D. : Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. In: *Biol Chem* 386 (2005), Aug, Nr. 8, 725–737. <http://dx.doi.org/10.1515/BC.2005.085>. – DOI 10.1515/BC.2005.085
- [84] SCHREYER, S. A. ; PESCHON, J. J. ; LEBOEUF, R. C.: Accelerated atherosclerosis in mice lacking tumor necrosis factor receptor p55. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Oct, Nr. 42, S. 26174–26178
- [85] SCHRODER, K. ; HERTZOG, P. J. ; RAVASI, T. ; HUME, D. A.: Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. In: *J Leukoc Biol* 75 (2004), Feb, Nr. 2, 163–189. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.0603252>. – DOI 10.1189/jlb.0603252
- [86] SCHUBERT, U. ; ANTÓN, L. C. ; GIBBS, J. ; NORBURY, C. C. ; YEWDELL, J. W. ; BENNINK, J. R.: Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. In: *Nature* 404 (2000), Apr, Nr. 6779, 770–774. <http://dx.doi.org/10.1038/35008096>. – DOI 10.1038/35008096
- [87] SEIFERT, U. ; BIALY, L. P. ; EBSTEIN, F. ; BECH-OTSCHIR, D. ; VOIGT, A. ; SCHRÖTER, F. ; PROZOROVSKI, T. ; LANGE, N. ; STEFFEN, J. ; RIEGER, M. ; KUCKELKORN, U. ; AKTAS, O. ; KLOETZEL, P.-M. ; KRÜGER, E. : Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. In: *Cell* 142 (2010), Aug, Nr. 4, 613–624. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.036>. – DOI 10.1016/j.cell.2010.07.036
- [88] SHIFFMAN, D. ; MIKITA, T. ; TAI, J. T. ; WADE, D. P. ; PORTER, J. G. ; SEILHAMER, J. J. ; SOMOGYI, R. ; LIANG, S. ; LAWN, R. M.: Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Dec, Nr. 48, 37324–37332. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M004732200>. – DOI 10.1074/jbc.M004732200

- [89] SINGH, S. ; AWASTHI, N. ; EGWUAGU, C. E. ; WAGNER, B. J.: Immunoproteasome expression in a nonimmune tissue, the ocular lens. In: *Arch Biochem Biophys* 405 (2002), Sep, Nr. 2, S. 147–153
- [90] SKAUG, B. ; JIANG, X. ; CHEN, Z. J.: The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. In: *Annu Rev Biochem* 78 (2009), 769–796. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.070907.102750>. – DOI 10.1146/annurev.biochem.78.070907.102750
- [91] STOHWASSER, R. ; STANDERA, S. ; PETERS, I. ; KLOETZEL, P. M. ; GROETTRUP, M. : Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1: reciprocally regulated tissue expression of interferon-gamma-modulated proteasome subunits. In: *Eur J Immunol* 27 (1997), May, Nr. 5, 1182–1187. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830270520>. – DOI 10.1002/eji.1830270520
- [92] STREHL, B. ; SEIFERT, U. ; KRÜGER, E. ; HEINK, S. ; KUCKELKORN, U. ; KLOETZEL, P.-M. : Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. In: *Immunol Rev* 207 (2005), Oct, 19–30. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00308.x>. – DOI 10.1111/j.0105-2896.2005.00308.x
- [93] TANAKA, K. ; ICHIHARA, A. : Half-life of proteasomes (multiprotease complexes) in rat liver. In: *Biochem Biophys Res Commun* 159 (1989), Mar, Nr. 3, S. 1309–1315
- [94] TANAKA, K. ; II, K. ; ICHIHARA, A. ; WAXMAN, L. ; GOLDBERG, A. L.: A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. In: *J Biol Chem* 261 (1986), Nov, Nr. 32, S. 15197–15203
- [95] TENGER, C. ; SUNDBORGER, A. ; JAWIEN, J. ; ZHOU, X. : IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN-gamma and CXCL16 expression independently of T cells. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (2005), Apr, Nr. 4, 791–796. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000153516.02782.65>. – DOI 10.1161/01.ATV.0000153516.02782.65
- [96] VERSARI, D. ; HERRMANN, J. ; GÖSSL, M. ; MANNHEIM, D. ; SATTLER, K. ; MEYER, F. B. ; LERMAN, L. O. ; LERMAN, A. : Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in human carotid atherosclerosis. In: *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (2006), Sep, Nr. 9, 2132–2139. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000232501.08576.73>. – DOI 10.1161/01.ATV.0000232501.08576.73
- [97] VIEIRA, O. ; ESCARGUEIL-BLANC, I. ; JÜRGENS, G. ; BORNER, C. ; ALMEIDA, L. ; SALVAYRE, R. ; NÈGRE-SALVAYRE, A. : Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. In: *FASEB J* 14 (2000), Mar, Nr. 3, S. 532–542
- [98] VIRELLA, G. ; LOPES-VIRELLA, M. F.: Atherogenesis and the humoral immune response to modified lipoproteins. In: *Atherosclerosis* 200 (2008), Oct, Nr. 2, 239–246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.03.025>. – DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2008.03.025

- [99] VISEKRUNA, A. ; JOERIS, T. ; SEIDEL, D. ; KROESEN, A. ; LODDENKEMPER, C. ; ZEITZ, M. ; KAUFMANN, S. H. E. ; SCHMIDT-ULLRICH, R. ; STEINHOFF, U. : Proteasome-mediated degradation of IkappaBalpha and processing of p105 in Crohn disease and ulcerative colitis. In: *J Clin Invest* 116 (2006), Dec, Nr. 12, 3195–3203. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI28804>. – DOI 10.1172/JCI28804
- [100] VOGES, D. ; ZWICKL, P. ; BAUMEISTER, W. : The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. In: *Annu Rev Biochem* 68 (1999), 1015–1068. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.1015>. – DOI 10.1146/annurev.biochem.68.1.1015
- [101] WERNER BÖCKER, P. U. H. Helmut Denk D. Helmut Denk: *Pathologie, 4. Auflage*. Urban & Fischer bei Elsevier, 2008
- [102] WHATLING, C. ; BJÖRK, H. ; GREDMARK, S. ; HAMSTEN, A. ; ERIKSSON, P. : Effect of macrophage differentiation and exposure to mildly oxidized LDL on the proteolytic repertoire of THP-1 monocytes. In: *J Lipid Res* 45 (2004), Sep, Nr. 9, 1768–1776. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M400195-JLR200>. – DOI 10.1194/jlr.M400195-JLR200
- [103] WHITMAN, S. C. ; RAVISANKAR, P. ; DAUGHERTY, A. : Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon-gamma. In: *Circ Res* 90 (2002), Feb, Nr. 2, S. E34–E38
- [104] WILCK, N. ; LUDWIG, A. : Targeting the Ubiquitin-Proteasome System in Atherosclerosis: Status Quo, Challenges, and Perspectives. In: *Antioxid Redox Signal* (2014), Mar. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2013.5805>. – DOI 10.1089/ars.2013.5805
- [105] WITZTUM, J. L. ; STEINBERG, D. : Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. In: *J Clin Invest* 88 (1991), Dec, Nr. 6, 1785–1792. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI115499>. – DOI 10.1172/JCI115499
- [106] YEWDELL, J. W.: Immunoproteasomes: regulating the regulator. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), Jun, Nr. 26, 9089–9090. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0504018102>. – DOI 10.1073/pnas.0504018102

Abbildungsverzeichnis

1.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System	2
1.2	Aufbau des 26S-Proteasom	4
1.3	Aufbau des Immunproteasoms	5
1.4	Prozesse in der atherosklerotischen Plaque	9
3.1	Basale Expression und Induzierbarkeit von immunproteasomalen Untereinheiten in atheroskleroserelevanten Zellen im Western Blot.	34
3.2	Flowzytometrische Darstellung der THP1-Monozyten und THP1-Makrophagen.	36
3.3	Flowzytometrische Bestimmung von CD11b und CD36 auf THP1-Monozyten und THP1-Makrophagen.	36
3.4	Aufnahme von oxLDL durch THP1-Makrophagen.	37
3.5	Relative mRNA- und Proteinexpression immunproteasomaler Untereinheiten in Makrophagen nach Stimulation mit oxLDL.	39
3.6	Relative mRNA- und Proteinexpression immunproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen nach Stimulation mit IL-12 und IL-18.	42
3.7	Relative mRNA- und Proteinexpression immunproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen nach Stimulation mit IL-1 β	43
3.8	Relative mRNA- und Proteinexpression immunproteasomaler Untereinheiten in Makrophagen nach Stimulation mit TNF α	45
3.9	Relative mRNA- und Proteinexpression immunproteasomaler Untereinheiten in HAoSMC nach Stimulation mit IL-1 β oder TNF α	48
3.10	Relative mRNA- und Proteinexpression in HUVEC nach Stimulation mit oxLDL.	50
3.11	Relative mRNA- und Proteinexpression immunproteasomaler Untereinheiten in HUVEC nach Stimulation mit IL-1 β oder TNF α	52

Tabellenverzeichnis

1.1	Stadien atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen; modifiziert nach W. Böcker [101] und R. Virmani [79]	10
2.1	Material zur LDL-Präparation	17
2.2	Dichtelösungen zur LDL-Präparation	18
2.3	Zellkulturmaterial	19
2.4	Material für Zellstimulation	22
2.5	Materialien für die RNA- und Proteinisolierung	22
2.7	Lösungen für Western Blot 1	24
2.6	Material für Western Blot	24
2.8	Lösungen für Western Blot 2	25
2.9	Gele für SDS-PAGE	25
2.10	Antikörper für Western Blot	26
2.11	Material für die PCR	27
2.12	Materialien für die Real-Time RT-PCR	28
2.13	Thermocycler-Einstellungen für die Durchführung der TaqMan-PCR	28
2.14	Für Real-Time RT-PCR verwendete Sonden, Forward- und Reverse-Primer und eingesetzte Konzentrationen.	29
2.15	Materialien für die Flowzytometrie	29
2.16	Material für Ölrot-O-Färbung	30
2.17	Häufig verwendetes Material	31
3.1	Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen nach IFN γ -Stimulation.	38
3.2	Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen nach oxLDL-Stimulation.	40
3.3	Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in THP1-Makrophagen nach Stimulation mit IL-12 und IL-18.	40
3.4	Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in Makrophagen nach Stimulation mit IL-1 β	44
3.5	Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in Makrophagen nach Stimulation mit TNF α	46
3.6	Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in HAoSMC nach IFN γ -Stimulation.	47
3.7	Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in HAoSMC nach Stimulation mit IL1 β oder TNF α	47
3.8	Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in HUVEC nach IFN γ -Stimulation.	49
3.9	Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in HUVEC nach oxLDL-Behandlung.	51

3.10	Relative mRNA-Expression immunoproteasomaler Untereinheiten in HUVEC nach IL1 β - oder TNF α -Behandlung.	51
3.11	Zellstimulationen im Überblick	53

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
ApoB-100	ApolipoproteinB-100
ATP	Adenosin Triphosphat
Bcl-2	B Cell Lymphoma-2 Protein
BCA	Bichinonsäure
CD11b	Cluster of Differentiation 11b
CD36	Cluster of Differentiation 36
CD68	Cluster of Differentiation 68
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
DRiPs	Defective Ribosomal Products
E1	Ubiquitin aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin Protein Ligase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszent Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
HAoSMC	Human Aortic Smooth Muscle Cells
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HDL	High Density Lipoprotein
Hif-1 α	hypoxia-inducible factor 1 α
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN γ	Interferon γ
I κ B	Inhibitorprotein von NF κ B
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-12	Interleukin-12
IL-18	Interleukin-18
LDL	Low Density Lipoprotein
LMP7	Low Molecular Weight Protein 7
LMP2	Low Molecular Weight Protein 2
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MECL1	Multicatalytic Endopeptidase Like Protein 1
MHC I	Major Histocompatibility Complex I
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF κ B	Nuclear Factor κ B
Nrf 2	NF-E2 related factor 2
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidativ modifiziertes Low Density Lipoprotein
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure

ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SR	Scavenger Receptor
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
TNFR1	TNF-Rezeptor 1
TNFR2	TNF-Rezeptor 2
UPS	Ubiquitin Proteasom System
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julia Ertl, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel:

Expressionsanalyse immunoproteasomaler Untereinheiten nach Stimulation von Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen mit atheroskleroserelevanten Mediatoren

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern danken, die mir mein Studium und auch diese Dissertation ermöglicht haben. Ich bedanke mich für die Unterstützung und das weitreichende Verständnis mit dem sie mir seit Jahren zur Seite stehen.

Für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit möchte ich Frau Prof. Dr. med. V. Stangl danken.

Dr. med. N. Wilck danke ich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten, die Einführung in die Methodik, die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sowie die wertvolle Betreuung.

Dr. rer. nat. A. Ludwig möchte ich danken für die zahlreichen Anregungen bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Susanne Metzkwow und Andrea Weller danke ich herzlichst für die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Johanna danke für die vielen ermutigenden Gespräche, Ratschläge und die Unterstützung, nicht nur während der Promotionszeit.

Abschließend gilt ein ganz besonderer Dank L. Onken und M. Velikova-Stührk.