

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

DISSERTATION

Untersuchungen zur Expression konstitutiver und induzierbarer
Untereinheiten des Proteasoms in mononukleären Zellen in
peripherem Blut bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und
Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Herrn Welisara Arachchige Surath Perera

aus Hamburg

Datum der Promotion: 09.09.2016

Meinen Eltern Sarath und Visaka Perera, sowie meiner Frau Merlene Jane Sophia Perera
gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Abstrakt	1
1.1. Deutsch.....	1
1.2. Englisch.....	3
2. Einleitung	5
2.1. Epidemiologie und Definition der koronaren Herzerkrankung und des akuten Koronarsyndroms.....	6
2.2. Arteriosklerose und Thrombusbildung.....	8
2.3. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS).....	12
2.3.1. Ubiquitin.....	13
2.3.2. Das Proteasom.....	14
2.3.3. Das Immunoproteasom.....	15
2.4. Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems bei Arteriosklerose und Myokardinfarkt.....	16
2.5. Zielsetzung.....	18
3. Material und Methoden	19
3.1. Gruppenbestimmung.....	19
3.1.1. Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS).....	19
3.1.2. Patienten mit stabiler Angina pectoris-Symptomatik mit Erstdiagnose einer koronaren Herzerkrankung (SAP).....	19
3.1.3. Patienten mit Ausschluss einer KHK (AK).....	19
3.1.4. Gesunde Probanden (GP).....	20
3.2. Ein- und Ausschlusskriterien.....	20
3.3. Arbeitsschritte.....	21
3.3.1. Ethikantrag.....	21
3.3.2. Patienten- und Probandeneinschluss.....	21
3.3.3. Aufklärung.....	22
3.3.4. Blutabnahme.....	22
3.4. Verarbeitung der Blutproben.....	23
3.4.1. PBMC-Isolierung.....	23
3.4.2. RNA-Isolierung.....	24
3.4.3. Bestimmung des RNA-Gehaltes mittels Spektrophotometer (Nanodrop®).....	25
3.4.4. Reverse Transkription (c-DNA-Erststrangsynthese).....	25
3.4.5. Real-Time (RT) TaqMan™ Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
3.5. Literaturrecherche.....	30
3.6. Software.....	30
3.7. Statistik.....	30
4. Ergebnisse	31
4.1. Baseline-Charakteristika.....	31
4.2. Relative mRNA-Expression der proteasomalen Untereinheiten.....	33
4.2.1. α 3-Untereinheit (PSMA3).....	33
4.2.2. β 5-Untereinheit (PSMB5).....	34
4.2.3. β 5i-Untereinheit (PSMB8).....	35
4.2.4. β 1-Untereinheit (PSMB6).....	36

4.2.5. β 1i-Untereinheit (PSMB9).....	37
4.3. Vergleich der relativen mRNA-Expression der proteasomalen Untereinheiten zwischen den GP- und AK-Gruppen.....	38
4.3.1. α 3-Untereinheit (PSMA3).....	38
4.3.2. β 5-Untereinheit (PSMB5).....	39
4.3.3. β 5i-Untereinheit (PSMB5).....	40
4.3.4. β 1-Untereinheit (PSMB6).....	41
4.3.5. β 1i-Untereinheit (PSMB9).....	42
4.4. Relative mRNA-Expression der proteasomalen Untereinheiten in Abhängigkeit von kardiovaskulären Risikofaktoren und Alter	43
4.5. Veränderte Expression der proteasomalen Untereinheiten unter Interferontherapie	45
4.6. Verhältnis zwischen der Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms	46
4.6.1. ACS-Gruppe	46
4.6.2. SAP-Gruppe.....	47
4.6.3. GP-Gruppe	48
4.7. Korrelationen.....	49
4.7.1. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 5- und β 5i-Untereinheiten in der ACS-Gruppe	49
4.7.2. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 1- und β 1i-Untereinheiten in der ACS-Gruppe	50
4.7.3. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 5- und β 5i-Untereinheiten in der SAP-Gruppe.....	51
4.7.4. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 1- und β 1i-Untereinheiten in der SAP-Gruppe.....	52
4.7.5. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 5- und β 5i-Untereinheiten in der GP-Gruppe	53
4.7.6. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 1- und β 1i-Untereinheiten in der GP-Gruppe	54
4.8. Subgruppenanalyse der ACS-Gruppe.....	56
5. Diskussion	57
5.1. ACS-Gruppe	58
5.2. SAP-Gruppe.....	60
5.3. AK- und GP-Gruppen	62
5.4. Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms.....	63
5.5. Studienlimitationen	64
5.6. Schlussfolgerung.....	64
6. Verzeichnisse.....	65
6.1. Literaturverzeichnis.....	65
6.2. Abbildungsverzeichnis	73
6.3. Tabellenverzeichnis.....	75
6.4. Abkürzungsverzeichnis.....	76
7. Anhang	80
7.1. Eidesstattliche Versicherung.....	80
7.2. Lebenslauf.....	81
7.3. Danksagung	83

1. Abstrakt

1.1. Deutsch

Hintergrund

Kardiovaskuläre Erkrankungen, die hauptsächlich durch chronisch inflammatorische Prozesse im Gefäßsystem verursacht werden, sind die häufigste Todesursache weltweit [1]. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist für 70–90 % des Proteinabbaus der Zelle verantwortlich [2]. Das 20S-Proteasom besteht aus α - und β -Untereinheiten [3].

Ziel

In der Literatur gibt es bis dato keine Daten zu veränderter Expression der proteasomalen Untereinheiten in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) oder Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung (KHK). Ziel dieser Arbeit ist es daher zu überprüfen, ob eine veränderte Expression der proteasomalen Untereinheiten in PBMCs bei den o.g. Krankheitsbildern auf Transkriptionsebene vorliegt. Zusätzlich wird überprüft, ob kardiovaskuläre Risikofaktoren und das Alter zu einer veränderten Expression der proteasomalen Untereinheiten führen.

Methodik

Insgesamt wurden 61 Probanden in folgende Gruppen eingeteilt: Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS), Patienten mit stabiler Angina pectoris (SAP), Patienten mit invasivem Ausschluss einer KHK (AK) und gesunde Probanden (GP). Die PBMCs wurden aus dem peripheren Blut von den Patienten gewonnen, ihre mRNA isoliert und die relative mRNA-Expression der folgenden proteasomalen Untereinheiten bestimmt: $\alpha 3$, $\beta 5$, $\beta 5i$, $\beta 1$ und $\beta 1i$. Um eine Normierung der Ergebnisse zu erreichen, wurde die proteasomale Expression relativ zur Expression des Hauskeeping-Gens (RPL 19) berechnet.

Ergebnisse

Es zeigte sich in der ACS-Gruppe im Vergleich zu den AK- und SAP-Gruppen ein statistisch signifikanter Anstieg der relativen mRNA-Expression der $\beta 5$ -Untereinheit um 150 % und 122 % sowie eine Abnahme der Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit um -54 % und -71 %. Andere proteasomalen Untereinheiten ($\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 1i$) zeigten in der ACS-Gruppe nur im Vergleich zur SAP-Gruppe eine signifikant niedrigere Expression (-33 %, -30 % und -24 %).

In der SAP-Gruppe konnte im Vergleich zur AK-Gruppe in keiner der untersuchten proteasomalen Untereinheiten Expressionsunterschiede nachgewiesen werden. Die α 3- und β 5i-Untereinheiten wurden in der AK-Gruppe im Vergleich zur GP-Gruppe 2,3-fach höher exprimiert. Zudem konnte zwischen CRP und der β 5-Untereinheit in der ACS-Gruppe eine positive Korrelation nachgewiesen werden.

Diskussion

Die β 5-Untereinheit zeigte eine erhöhte Expression bei Patienten mit ACS, während die β 5i-Untereinheit niedriger exprimiert wurde. Die Assoziation von der β 5-Untereinheit und CRP in der ACS-Gruppe deutet auf eine proinflammatorische Induktion dieser Untereinheit hin. Bei stabiler KHK hingegen ist das Expressionsmuster von β 5 und β 5i anders reguliert.

Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass unter akuter inflammatorischer Aktivierung bei ACS eine veränderte Expression der β 5- und β 5i-Untereinheiten vorliegt. Darüber hinaus tragen Alter, arterielle Hypertonie und Hyperlipoproteinämie zur veränderten Expression der α 3- und β 5i- Untereinheiten bei.

1.2. Englisch

Background

Cardiovascular diseases, mainly caused by chronic inflammatory processes of the vascular system, are one of the most frequent causes of death worldwide. The ubiquitin-proteasome system (UPS) is responsible for degrading 70–90% of intracellular proteins. The 20S proteasome consist of both α and β subunits.

Objective

No clinical data exist to date to prove that a modified expression of proteasome subunits occurs in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with acute coronary syndrome (ACS) and stable coronary artery disease (CAD). Therefore, this study aims to determine whether modified expression of proteasome subunits occurs on transcriptional level in PBMC in the aforementioned clinical situations. Furthermore we investigate whether cardiovascular risk factors and age contribute to modified expression of proteasome subunits.

Method

Altogether 61 subjects were allocated to the following groups: patients with acute coronary syndrome (ACS), those with stable Angina pectoris (SAP), invasively proven disease-free patients (AK) and healthy subjects (GP). PBMCs were extracted from patients' peripheral blood, mRNA isolated and relative mRNA expression of the $\alpha 3$, $\beta 5$, $\beta 5i$, $\beta 1$ and $\beta 1i$ subunits measured. For normalisation, proteasome expression was calculated relative to the expression of the housekeeping gene (RPL 19).

Results

When compared to the AK and SAP groups, we found significantly increased relative mRNA expression of the $\beta 5$ (150% and 122%) and reduced expression of the $\beta 5i$ subunit (-54% and -71%) in the ACS group. Other subunits ($\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 1i$) showed significantly reduced expression in the ACS group only compared to the SAP group (-33%, -30% and -24%). Compared to the AK group, no difference was found in the expression of any of the investigated proteasome subunits in the SAP group.

Furthermore, expression levels of the $\alpha 3$ and $\beta 5i$ subunits were 2.3 times higher in the AK group compared to the GP group. A positive correlation could also be established between CRP and $\beta 5$ in the ACS group.

Discussion

$\beta 5$ showed an increased expression in patients with ACS, whilst there was a reduced expression of $\beta 5i$. The relationship between the expression of $\beta 5$ and CRP in the ACS group indicates proinflammatory induction of this subunit. The expression of $\beta 5$ and $\beta 5i$ in patients with stable CAD is, however, regulated differently than in those with ACS.

In conclusion, modified expression of the $\beta 5$ and $\beta 5i$ subunits occurs under acute inflammatory activation in patients with ACS. Furthermore age, arterial hypertension and hyperlipoproteinemia contribute to modified expression of $\alpha 3$ and $\beta 5i$.

2. Einleitung

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist die wichtigste Determinante des intrazellulären Proteinabbaus [2]. Daher spielt eine mögliche Dysfunktion des UPS bei der Entstehung von diversen Krankheiten eine große Rolle.

Die Gruppe von Powell konnte zeigen, dass eine Veränderung des UPS zu kardiovaskulären Erkrankungen führt [4]. Dazu werden die Myokardischämie und familiäre und idiopathische Kardiomyopathien gezählt [5]. Hinweise auf eine verminderte proteasomale Aktivität in Myokardgewebe bei akuter Ischämie lieferte Bulteau et al. im Jahr 2001 im Rattenmodell [6]. Allerdings fehlen bis zum heutigen Tag Studien, die eine mögliche Veränderung des Expressionsmusters der einzelnen Untereinheiten des Proteasoms bei einem akuten Myokardinfarkt beim Menschen untersucht haben.

Daher wurde die hier vorliegende Pilotstudie in der Klinik für Kardiologie und Angiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, initiiert, um zu untersuchen, ob eine veränderte Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms in mononukleären Zellen in peripherem Blut (PBMC) bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom und bei Patienten mit Erstdiagnose einer stabilen koronaren Herzerkrankung vorliegt.

In den folgenden Abschnitten werden zunächst die pathophysiologischen Vorgänge der koronaren Herzerkrankung und des akuten Koronarsyndroms sowie strukturelle Merkmale des Proteasomsystems dargestellt. Anschließend wird auf die Expression der einzelnen Untereinheiten des Proteasoms eingegangen.

2.1. Epidemiologie und Definition der koronaren Herzerkrankung und des akuten Koronarsyndroms

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit [1]. Laut dem Statistischen Bundesamt sind im Jahr 2013 in Deutschland 354.493 Menschen an einer Krankheit des Herz-Kreislauf-Systems gestorben – 54.538 davon an einem akuten Myokardinfarkt [7]. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) prognostiziert bis zum Jahr 2030 einen Zuwachs von bis zu 30 Millionen Todesfällen pro Jahr durch kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit [8]. Die Arteriosklerose des Gefäßsystems ist die Hauptursache der koronaren Herzerkrankung [9].

Eine lebensbedrohliche klinische Manifestation der Arteriosklerose ist das akute Koronarsyndrom (ACS). Das ACS und die KHK sind durch das Missverhältnis von Sauerstoffangebot und –bedarf des Kardiomyozyten gekennzeichnet. Es resultiert die Nekrose der myokardialen Zellen [10].

Das ACS ist durch drei verschiedene Entitäten gekennzeichnet:

- den ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI)
- den Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI)
- die instabile Angina pectoris (IAP)

Ein STEMI ist durch die Kombination einer ST-Strecken-Hebung oder eines neu aufgetretenen Linksschenkelblocks im 12-Kanal-EKG, erhöhte Troponinwerte im Blut und klinisch durch ein akutes Engegefühl in der Brust (Angina pectoris) bzw. Brustschmerzen (> 20 min.) mit ggf. einer Schmerzausstrahlung definiert. Ein NSTEMI wird paraklinisch durch erhöhte Troponinwerte im Blut und die o.g. typischen klinischen Symptome diagnostiziert. Bei Patienten mit einem NSTEMI wird elektrokardiographisch keine ST-Hebung beobachtet, dafür aber häufig indirekte Ischämiezeichen wie ST-Strecken-Senkungen oder Repolarisationsstörungen und eine T-Wellen-Negativierung. Patienten mit instabiler Angina pectoris weisen EKG-morphologisch gelegentlich die o.g. indirekten Ischämiezeichen und die klinischen Symptome auf [11]. Laut Registerdaten werden mehr Patienten mit einem NSTEMI als mit einem STEMI hospitalisiert [12]. Die Mortalitätsrate im Krankenhaus ist bei einem STEMI höher als bei einem NSTEMI (7 % vs. 3–5 %). Nach sechs Monaten gleichen sich aber die Mortalitätsraten beider Formen an (12 % vs. 13 %) [13].

Der häufigste Grund für einen STEMI ist der akute, thrombotische Verschluss eines Koronargefäßes. Dagegen sind ein NSTEMI oder eine IAP durch eine progrediente Stenosierung der Herzkranzgefäße mit konsekutiv immer weiter abnehmendem Blutfluss gekennzeichnet. Dadurch kann der myokardiale Sauerstoffbedarf im nachgeschalteten Versorgungsgebiet nicht mehr gedeckt werden. In seltenen Fällen wird ein ACS nicht primär durch arteriosklerotische Veränderungen verursacht. Zu den anderen pathophysiologischen Ursachen zählen Arteriitiden, Koronardissektionen, koronare Thrombembolien oder auch kongenitale Herzanomalien [14].

Die bei stabiler KHK auftretende Angina pectoris ist durch Episoden des Ungleichgewichts von Sauerstoffangebot und -bedarf gekennzeichnet, die durch physische und psychische Belastung induzierbar und reproduzierbar sind. Solche Episoden können in ein ACS münden. Die stabile Angina pectoris-Symptomatik wird durch die CCS-Klassifikation definiert [15] und ist in Tabelle 1 dargestellt. Aufgrund der enormen Bedeutung einer Früherkennung und Therapie der stabilen KHK wurde im Jahr 2013 eine neue ESC-Leitlinie zu dieser Krankheitsentität herausgebracht [16]. Zur stabilen KHK zählen nicht nur Patienten mit Verengung der epikardialen Herzkranzgefäße, sondern auch Patienten mit einer mikrovaskulären Herzerkrankung (*small vessel disease*) [16].

Stadium	Definition
CCS I	Keine Einschränkung der normalen körperlichen Aktivität Angina pectoris nur bei starker Belastung
CCS II	Leichte Einschränkung der normalen körperlichen Aktivität Angina pectoris beim Gehen von > 100 m oder nach Treppensteigen > 1 Etage
CCS III	Deutliche Einschränkung der normalen körperlichen Aktivität Angina pectoris beim Gehen von < 100 m oder nach Treppensteigen von 1 Etage
CCS IV	Angina pectoris bei jeder körperlichen Belastung oder in Ruhe

Tabelle 1: CCS-Klassifikation [15]

2.2. Arteriosklerose und Thrombusbildung

Die Arteriosklerose ist eine inflammatorische Systemerkrankung der Arterienwand, die durch eine progressive Akkumulation von LDL-Partikeln charakterisiert ist. Pathophysiologisch handelt es um eine komplexe Interaktion zwischen Blutzellen und der Arterienwand. Durch die Progression der Arteriosklerose entstehen nach mitunter Jahrzehnten kardio- und zerebrovaskuläre Erkrankungen wie die KHK und der ischämische Schlaganfall (Apoplex).

Die Arterienwand besteht aus drei Schichten. Die Wandschichten sind histologisch, von innen nach außen aufgezählt, wie folgt benannt:

- Tunica intima
- Tunica media
- Tunica adventitia

Die Tunica intima ist aus einer Endothelzellschicht aufgebaut. Die Endothelzellschicht liegt auf der Basalmembran, die überwiegend aus Kollagen Typ IV und Laminin besteht. Die Tunica media ist ausschließlich aus glatten Muskelzellen aufgebaut. Die glatten Muskelzellen sind in einer interstitiellen Matrix eingebettet, die überwiegend aus Kollagen Typ I besteht. Die Tunica adventitia setzt sich aus Bindegewebe, Fibroblasten, Kapillaren und Fettzellen zusammen [17].

Die Arteriosklerose beginnt mit der Infiltration von LDL-Partikeln in die Tunica intima und der Aktivierung dieser Endothelzellen [18]. Das Transportprotein des LDLs und das Apolipoprotein B-100 binden an das negativ geladene Proteoglycan der extrazellulären Matrix und haften die LDL-Partikel an die Tunica intima an. Durch Sauerstoffradikale werden die LDL-Partikel oxidiert. Die oxidierten LDL-Partikel induzieren dann die Transkription und Freisetzung von Chemokinen aus den Endothelzellen, die die Infiltration von Leukozyten (Monozyten und T-Zell-Lymphozyten) in die Tunica intima bewirken.

Die chronische Schädigung der Tunica intima, hervorgerufen durch oxidative Radikale aus dem Zigarettenrauch oder Cholesterin – aber auch durch physikalische Noxen wie Scherstress bei Bluthochdruck – resultiert in einer endothelialen Dysfunktion.

Die endotheliale Dysfunktion ist hauptsächlich durch die verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und die herabgesetzte Vasodilatation zu erklären. NO wird durch die

endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert. Die o.g. chronische Schädigung der Tunica intima führt zu einem Verlust der eNOS, der wiederum zur endothelialen Dysfunktion beiträgt. Jedoch ist die endotheliale Dysfunktion multifaktoriell bedingt. Es ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen der Reduktion der NO-Produktion oder der Inaktivierung des bereits freigesetzten Stickstoffmonoxids und dem Ungleichgewicht von Faktoren, die für die verminderte Relaxation und damit erhöhte Kontraktion der Endothelzellen wichtig sind. Dies komplexe Zusammenspiel pathophysiologischer Prozesse wird für die endotheliale Dysfunktion verantwortlich gemacht [19].

Neben der Bildung einer protektiven Barriere zwischen dem Gefäßlumen und den glatten Muskelzellen des Blutgefäßes haben Endothelzellen eine übergreifende Funktion. Dies beinhaltet die Regulation des Blutflusses, die Aktivierung von Lymphozyten, Thrombozyten und Komplementfaktoren. Endothelzellen modulieren Kardiomyozyten in ihrem Wachstum, Metabolismus, in ihrer Kontraktilität und Apoptose, indem sie verschiedene Moleküle synthetisieren und ausschütten [20]. Die Barrierefunktion der Endothelzellen gegen Inflammation wird abgeschwächt, indem Oberflächenproteine wie Integrine hochreguliert werden, was wiederum die Bindung von Leukozyten und Thrombozyten an der Gefäßoberfläche begünstigt. Die Permeabilität der Tunica intima ist erhöht, die Adhäsion und Infiltration von Monozyten und T-Zell-Lymphozyten wird erleichtert [21].

Monozyten weisen sowohl beim Menschen als auch im Mausmodell eine Heterogenität auf [22]. In einem Mausmodell zur Arteriosklerose-Entstehung beschrieben Arnold et al. einen Anstieg der Konzentration überwiegend proinflammatorisch ausgerichteter Monozyten im Blut, die sie *Ly-6C^{hi}*-Monozyten nannten [23]. Diese Zellen infiltrieren vermehrt arteriosklerotische Läsionen im Gegensatz zu den *Ly-6C^{lo}* genannten eher antiinflammatorisch ausgerichteten Monozyten. Es erfolgt eine Interaktion zwischen dem P-Selectin-Glycoprotein-Liganden I (*PSGL I*) der Monozyten und des Selectins des Endothels [24]. Des Weiteren induziert die Aggregation von Thrombozyten auf dem Endothel die Interaktion zwischen Monozyten und Endothelzellen durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB)* [25]. Durch andere Transkriptionsfaktoren wie den Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (*M-CSF*) werden Monozyten zu Makrophagen oder dendritischen Zellen umgewandelt. Ferner können *Toll-like-Rezeptoren* – Teil des angeborenen Immunsystems – beim Kontakt mit den oxidierten LDL-Partikeln aktiviert werden und eine

Signalkaskade initiieren, die wiederum Makrophagen aktiviert. Die aktivierten Makrophagen nehmen die oxidierten LDL-Partikel über die Scavenger-Rezeptoren auf, die sich auf ihrer Zelloberfläche befinden – es entsteht eine Schaumzelle [26].

Schaumzellen schütten proinflammatorisch wirksame Zytokine und Wachstumsfaktoren aus, die ein vaskuläres Remodelling verursachen. Beispielsweise stimuliert Interferon- γ (INF- γ) die Immunantwort von T1-Helferzellen, die wiederum Makrophagen aktivieren [27].

Haupthistokompatibilitätskomplexe, die sich an Zelloberflächen befinden, sind körpereigene Antigene, die der Immunerkennung dienen. In der Arteriosklerose werden durch Haupthistokompatibilitätskomplexe die oxidierten LDL-Partikel erkannt und T-Lymphozyten präsentiert. Der Haupthistokompatibilitätskomplex-II (MHC-Klasse-II-Komplex) präsentiert LDL-Partikel den CD4+ T-Lymphozyten und der Haupthistokompatibilitätskomplex-I (MHC-Klasse I-Komplex) den CD8+ T-Lymphozyten [27, 28].

Nachdem oxidierte LDL-Partikel an T-Lymphozytenrezeptoren gebunden haben, werden durch eine kaskadenartige Reaktion proinflammatorisch wirksame Zytokine ausgeschüttet [29]. Die aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten produzieren Zytokine wie den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) [29]. Dadurch wandern glatte Muskelzellen in Richtung des Blutgefäßlumens (Abb. 1) und bilden die Kappe einer Plaque.

Die erste makroskopisch sichtbare Läsion der Arteriosklerose wird *fatty streak* genannt. *Fatty streaks* beinhalten Schaumzellen, Apolipoprotein B und dendritische Zellen.

Durch proinflammatorische Zytokine, Proteasen, Sauerstoffradikale und prokoagulatorisch wirksame Faktoren wird eine Plaque aktiviert und ist zunehmend rupturgefährdet. Die mitunter über Jahre stabile Formation der Plaquekappe wird durch das Herauslösen von Kollagenfasern brüchig. Weiche, lipidreiche Plaques sind für Patienten gefährlicher als harte, kollagenreiche Plaques, weil sie instabiler und in höherem Maße thrombogen sind [30] und eine Thrombusformation begünstigen [31].

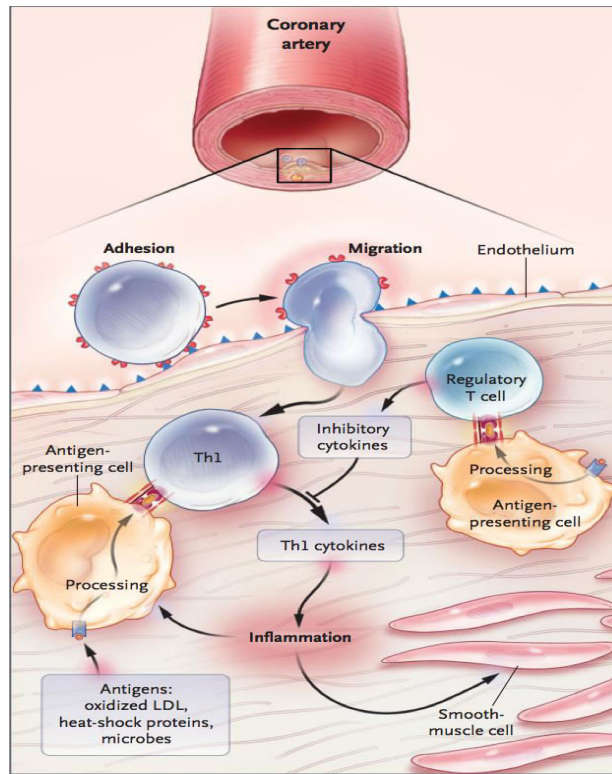


Abbildung 1: T-Lymphozyten-Aktivierung und Plaqueinflammation [32]. Abb. entnommen aus Hansson et al. (2005). With permission from The New England Journal of Medicine, Copyright Massachusetts Medical Society.

Im Wesentlichen werden zwei Proteasen-Typen für eine Plaque-Aktivierung verantwortlich gemacht: Matrix-Metalloproteasen (MMP) und Cystein-Proteasen (CP) [33, 34]. Die Aktivität von MMPs ist auf verschiedenen Stufen reguliert. Zum einen induzieren proinflammatorische Zytokine die Expression von MMP-Genen, zum anderen aktiviert Plasmin die Vorstufen der Proteasen – ein zentraler Mechanismus der Plaqueruptur.

Jedoch können diese Vorgänge durch Inhibitorproteine gehemmt werden. Durch das Zusammenspiel von den o.g. Faktoren wird eine initial stabile Plaque zu einer instabilen, vulnerablen Plaque umgewandelt (Abb. 2). Durch Schädigung der Kappe haben freiliegende Kollagenfasern und Lipidmoleküle direkten Kontakt mit dem Blutfluss. Thrombozyten haften an, ein Thrombus wird gebildet [35]. Durch den Thrombus wird das Blutgefäß mitunter komplett okkludiert – ein akuter Myokardinfarkt entsteht.

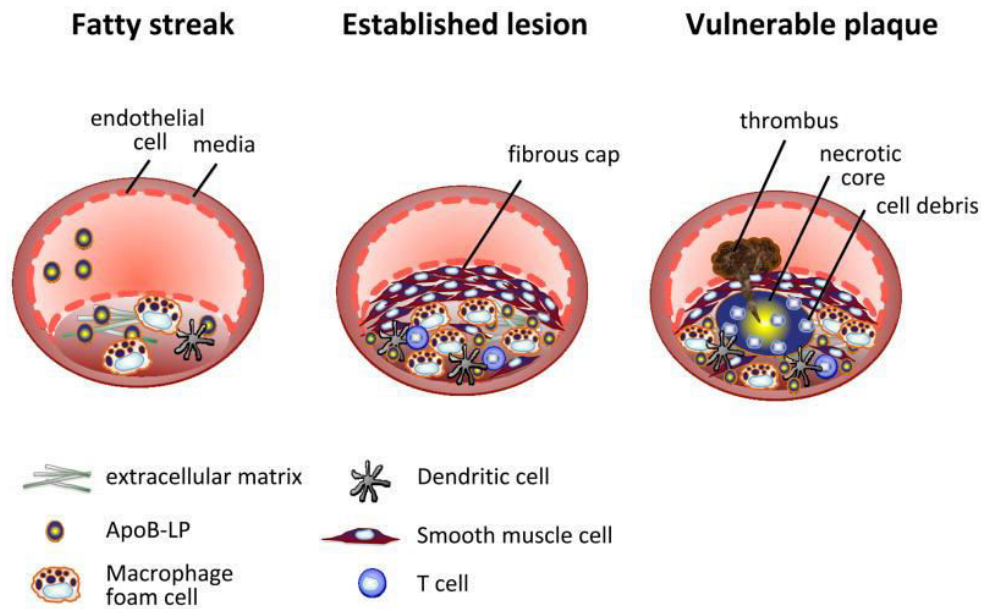


Abbildung 2: Entstehung einer vulnerablen Plaque sowie Thrombusformation [36]. Abb. entnommen aus Moore KJ. et al. (Cell, 2011). With permission from Elsevier Limited, UK.

2.3. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) wurde erstmals 1979 in der Fachliteratur beschrieben [37]. Für ihre herausragende Arbeit über das UPS wurden Rose, Hershko und Ciechanover im Jahr 2004 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt [38]. Das UPS ist aus den beiden Einheiten Ubiquitin und Proteasom zusammengesetzt, und sowohl im eukaryotischen Zellkern als auch im Zytosol lokalisiert. Seine Hauptaufgabe ist der Proteinabbau: 70–90 % des Proteinabbaus erfolgt über das UPS [2].

Das UPS ist auch an der Kontrolle des Zellzyklus durch Regulation der Zellproliferation, Signaltransduktion, Transkription, DNA-Replikation und Zellapoptose beteiligt [39]. Viele Studien haben eine Dysfunktion des UPS als eine der Hauptursachen für verschiedene Pathologien des Herzens identifiziert, insbesondere bei familiären und idiopathischen Kardiomyopathien [5], bei Arteriosklerose [6, 40] und bei Myokardischämien [41].

2.3.1. Ubiquitin

Das Ubiquitin ist ein Polypeptid, das aus 76 Aminosäuren in globulärer Form aufgebaut ist und eine Molekülmasse von 8,5 kDa besitzt. Die wichtigste Funktion des Ubiquitins ist das Markieren von den Proteinen, die abgebaut werden sollen. Von der Aminosäurekette dient das C-terminale Glycin an Position 76 als Bindungsstelle für das abzubauen Protein. Über das Lysin an Position 48 und 63 der Kette werden Ubiquitinmoleküle aneinander gebunden, damit gleichzeitig mehrere Proteine zum Abbau bereitgestellt werden können [42].

Das Markieren von Proteinen durch Ubiquitin wird auch als „Ubiquitinierung“ bezeichnet. Die Ubiquitinierung ist ein aktiver Prozess, der ATP verbraucht und folgende Schritte beinhaltet [43] (Abb. 3):

- die Aktivierung des Ubiquitins durch das aktivierende Enzym (E1)
- den Transfer des aktivierten E1 auf das Protein durch das konjugierende Enzym (E2)
- das Abgeben des Ubiquitins an das Substratprotein durch die Ubiquitin-Protein-Ligase (E3)

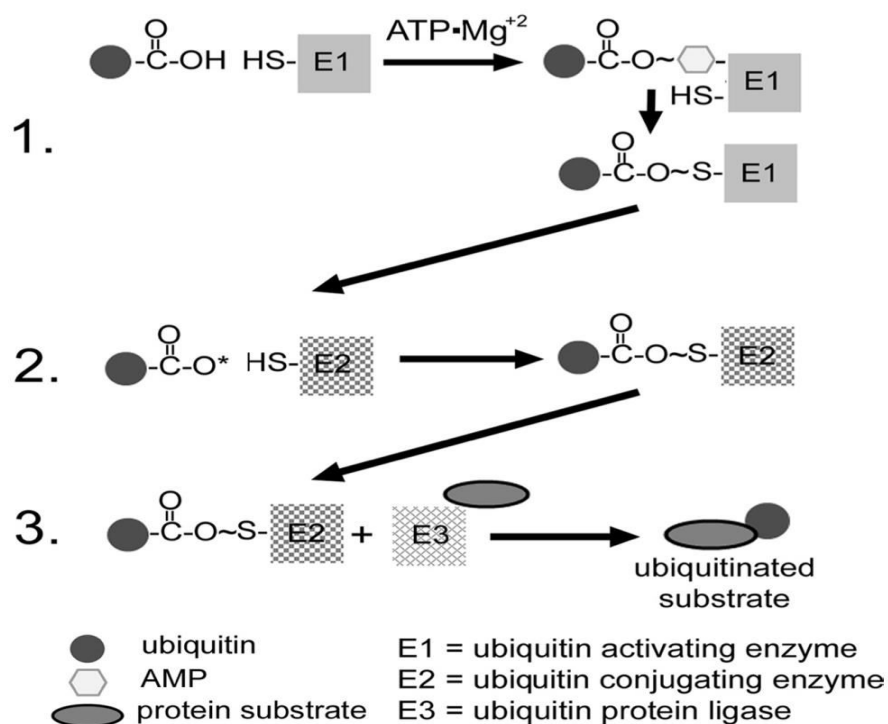


Abbildung 3: Ubiquitinierung [41]. Abb. entnommen aus Powell SR. et al. (Cardiovascular Research, 2010). By permission of Oxford University Press.

Die Aktivierung des Ubiquitins erfolgt durch eine Thioester-Bindung zwischen dem Cystein des E1-Enzyms und der C-terminalen Carboxygruppe des Ubiquitins. Danach wird das Ubiquitin an das E2-Enzym transferiert. Zum Schluss wird das Ubiquitin durch das E3-Enzym an das Zielprotein übertragen. Hierbei entsteht eine Isopeptid-Bindung zwischen der Aminosäure Lysin des Zielproteins und dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins [44].

2.3.2. Das Proteasom

Das 26S-Proteasom ist eine zylinderförmige, ca. 20 kDa-wiegende Struktur, die aus einem proteolytischen 20S-Proteasom sowie aus 1–2 regulatorischen 19S-Proteasomen besteht [43, 45]. Das 20S-Proteasom hat ein Molekulargewicht von ca. 700–800 kDa, die multiplen Untereinheiten des 20S-Proteasoms ca. 20–30 kDa [46].

An beiden Enden des 20S-Proteasoms sind zwei 19S-Proteasomen verankert. Das 19S-Proteasom besteht aus 18 Untereinheiten und ist aus zwei Teilen zusammengesetzt: das *Lid* und das *Base* (Abb. 4). Das *Lid* beinhaltet insgesamt 10 Untereinheiten: Rpn3–12. Das *Base* ist mit 8 Untereinheiten ausgestattet: Rpt1–6 und Rpn1–2. Rpt1–6 stellen die Untereinheiten mit ATP-asen und Rpn die Untereinheiten mit nicht-ATP-asen dar. Das *Base* bindet ans 20S-Proteasom und besitzt die Fähigkeit es für die Proteindegeneration zu aktivieren. Die Aktivierung erfolgt durch die Öffnung eines Kanals im 20S-Proteasom. Für diesen Prozess werden beide Teile des 19S-Proteasoms benötigt. Elektronenmikroskopisch stellt sich das *Base* proximal, das *Lid* distal des 20S-Proteasoms dar [47].

Das 20S-Proteasom besteht aus jeweils zwei Ringen von β - und α -Untereinheiten, die einen Hohlraum umschließen [3]. Die Ringe beinhalten jeweils 7 β -Untereinheiten (β 1–7) und 7 α -Untereinheiten (α 1–7). Die beiden α -Ringe sind außen, die beiden β -Ringe innen platziert [48]. Die α -Untereinheiten weisen keine proteolytische Aktivität auf. Von den 7 β -Untereinheiten weisen nur 3 Untereinheiten (β 1, β 2 und β 5) eine proteolytische Aktivität auf [49]. Basische Aminosäuren werden durch die β 2-Untereinheiten (*trypsin-like*), hydrophobe Aminosäuren durch die β 5-Untereinheiten (*chymotrypsin-like*) und saure Aminosäuren durch die β 1-Untereinheiten (*caspase-like*) gespalten [43, 50]. Die α -Untereinheiten besitzen eine Barriere-Funktion, die den willkürlichen Eintritt des Substrates in den Hohlraum des 20S-Proteasoms versperrt [49]. Damit wird eine ungesteuerte Proteindegeneration der Zelle verhindert. In vielen

Studien konnte belegt werden, dass das Proteasom nicht zu den bekannten vier klassischen Proteasotypen (Serin-, Cystein-, Asperat-, Metalloproteasen) [51], sondern zu den Threonin-Proteasen gehört [52, 53].

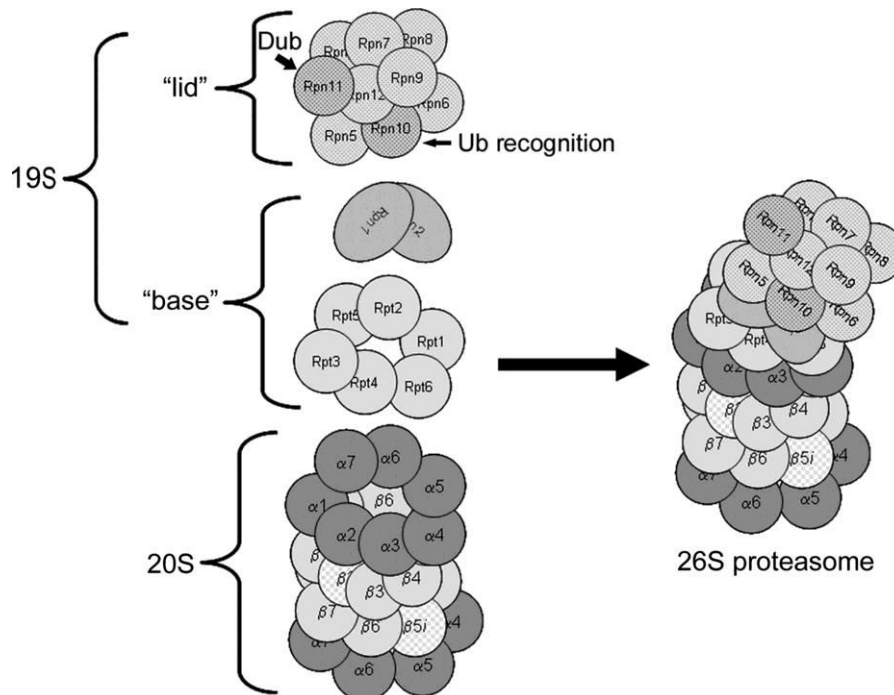


Abbildung 4: Struktur des 26S-Proteasoms [54]. Abb. entnommen aus Calise et al. (American Journal of Physiology, 2012)

2.3.3. Das Immunoproteasom

Unter besonderen proinflammatorischen Situationen – insbesondere bei Ausschüttung von $\text{INF-}\gamma$ – werden die konstitutiven proteasomalen Untereinheiten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ durch die induzierbaren Untereinheiten $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (LMP10) und $\beta 5i$ (LMP7) – auch Immunoproteasomen genannt – ersetzt [41]. Durch verschiedene Analysen des proteasomalen Musters vom Herzmuskelgewebe wurde gezeigt, dass das Proteasom anstelle einer homogenen Struktur eine Heterogenität aufweist [55]. Dies bedeutet, dass innerhalb eines β -Ringes sowohl konstitutive als auch immunoproteasomale Untereinheiten konfiguriert sind (Abb. 5). Diese Heterogenität der Untereinheiten und Posttranslationsmodifikationen können die Aktivität des Proteasoms modulieren. Als möglicher Erklärungsansatz zur Entstehung von diversen Krankheiten wie eines Myokardinfarkts oder einer Kardiomyopathie wird die Heterogenität der

Proteasomkonfiguration und die dadurch veränderte resultierende Proteindegeneration diskutiert. Es wurden 3 Posttranslationsmodifikationen wie folgt nachgewiesen [55, 56].:

- N-terminale Acetylierung der 19S proteasomalen Untereinheiten (Rpn1, Rpn5, Rpn6, Rpt3 und Rpt6) und der 20S-Untereinheiten ($\alpha 2$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 3$ und $\beta 4$)
- N-terminale Myristoylierung (Rpt2)
- Phosphorylierung ($\alpha 7$)

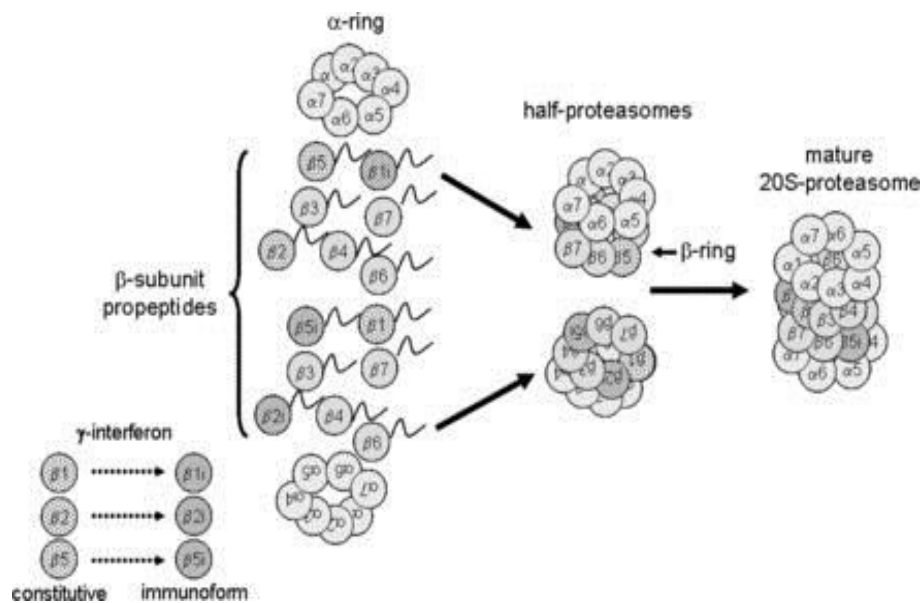


Abbildung 5: Zusammensetzung der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms [54]. Abb. entnommen aus Calise et al. (American Journal of Physiology, 2012)

2.4. Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems bei Arteriosklerose und Myokardinfarkt

Wie in Kapitel 2.2 schon erwähnt wurde, ist Arteriosklerose eine chronisch inflammatorische Erkrankung der Arterienwand, die durch oxidativen Stress, vaskuläres Remodelling und Apoptose gekennzeichnet ist. All diese Merkmale, die unten näher erläutert werden, werden durch das UPS gesteuert, so dass die Rolle des UPS bei Arteriosklerose verdeutlicht wird.

Durch die Aktivierung von dem Transkriptionsfaktor NF- κ B werden proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder Interleukin-6 reguliert und die Gefäßinflammation aktiviert.

Ein wichtiges Inhibitormolekül von NF- κ B ist das I κ B α (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*). In einer kaskadenartigen Reaktion (*canonical pathway*) wird durch das UPS das Inhibitormolekül I κ B α abgebaut [57]. Durch Degradierung des Inhibitors wird wiederum NF- κ B aktiviert und die atherogenen Signale angestoßen.

Eine wichtige Funktion des UPS ist die transkriptionelle Qualitätskontrolle mit Abbau von fehlgefalteten Proteinen der Zelle. Diese fehlgefalteten Proteine verursachen eine Exposition von hydrophoben Regionen, welche durch Chaperone der Hitzeschockproteine erkannt werden. Die Chaperone tragen nicht nur zur erneuten Faltung der Proteine bei, sondern interagieren auch mit Enzymen wie der Ubiquitin-Protein-Ligase (E3), welches die Polyubiquitinierung der fehlgefalteten Proteine triggert. Diese so markierten Proteine werden durch das UPS abgebaut. Falls die fehlgefalteten Proteine die Kapazität des UPS übersteigen, aggregieren diese Proteine und tragen zum oxidativen Stress der Zelle mit bei [58].

Es gibt verschiedene Pathomechanismen des vaskulären Remodellings bei der Entstehung von Arteriosklerose. Einen davon stellt die Plaque-Neovaskularisation dar. Im Laufe der Arteriosklerose-Entstehung mit Plaqueformation ist diese von der Neoangiogenese abhängig. Einer der Mediatoren, die für die Neovaskularisation verantwortlich sind, ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (*VEGF*) – ein Mediator, der durch den hypoxie-induzierten Faktor (*HIF-1 α*) kontrolliert wird. Diese Prozesse werden auch vom UPS gesteuert [40].

Einen möglichen Mechanismus zur Bildung von arteriosklerotischen Läsionen kann die Suppression der Apoptose des Makrophagen darstellen. Das LDL-induzierte-Gen, das hierfür wichtig ist, exprimiert das Enzym E2-25K, welches wiederum für die Ubiquitinierung von p53 wichtig ist [59]. Das Tumorsuppressorprotein p53 reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression von Genen, die an der Induktion der Zellapoptose und der DNA-Reparatur beteiligt sind. Ein anderer Mechanismus kann durch das *adipose differentiation-related protein (adrp)* erklärt werden. Dieses Protein weist eine Assoziation mit Lipidtropfen in der Schaumzelle auf. Es wird vermutet, dass das UPS für die Regression dieser Zellen benötigt wird [60].

Darüber hinaus wird durch Studienergebnisse die Rolle des UPS bei Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen unterstrichen. Die Arbeitsgruppe von Faries et al. konnte zum Beispiel die Expression des PA28/11S-Proteasoms in arteriosklerotisch veränderten

Venenbypässen nachweisen [61]. Außerdem wurde von der Arbeitsgruppe von Hermann et al. eine erhöhte Ubiquitin-Expression in den Plaques von Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom gezeigt [62]. Darüber hinaus zeigten Marfella et al. in ihrer Arbeit eine erhöhte proteasomale Aktivität in PBMC bei Patienten mit arteriosklerotischen Plaques in den extrakraniellen Gefäßen [63]. Zusammenfassend wird es durch die oben ausgeführten Studiendaten klar, dass das UPS bei Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen maßgeblich mitwirkt.

Insbesondere bei Entstehung eines akuten Myokardinfarkts wurde in diversen tierexperimentellen Modellen die Bedeutung des UPS nachgewiesen [6, 64, 65]. Nach einem akuten Myokardinfarkt konnte eine verminderte Aktivität sowohl des 20S- als auch des 26S-Proteasoms bei vermehrt ubiquitinierten Proteinen im Myokard nachgewiesen werden [64]. Der Mechanismus, der sich hinter der verminderten proteasomalen Aktivität verbirgt, ist noch nicht hinreichend erforscht. Allerdings wurde die Hypothese formuliert, dass unter oxidativem Stress bestimmte proteasomale Untereinheiten inaktiviert werden [66, 67]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass nach Vorbehandlung von isolierten Rattenherzen mit Antioxidantien wie Vitamin E-Analoga postischämisch die proteasomale Funktion erhalten bleibt [68]. Die Arbeitsgruppe von Powell et al. fand, dass das Ausmaß der proteasomalen Dysfunktion nach der Myokardischämie von der Zeitdauer der Ischämie abhängt und mit der Menge der oxidierten und ubiquitinierten Proteinen korreliert [64]. Tatsache ist, dass bei einem Myokardinfarkt eine Dysregulation bzw. Dysfunktion des UPS in verschiedenen Untereinheiten in unterschiedlicher Ausprägung vorliegt. Somit spielt das UPS bei Entstehung und Progression der Arteriosklerose und bei einem akuten Myokardinfarkt eine bedeutende Rolle.

2.5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob eine veränderte Expression proteasomaler Untereinheiten in mononukleären Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom und einer stabilen koronaren Herzerkrankung vorliegt. Außerdem soll überprüft werden, ob kardiovaskuläre Risikofaktoren und das Patientenalter eine veränderte Expression der proteasomalen Untereinheiten bedingen.

3. Material und Methoden

3.1. Gruppenbestimmung

Alle Patienten wurden in der Klinik für Kardiologie und Angiologie, bzw. über die Rettungsstelle der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, in die Studie eingeschlossen. Zudem wurde als Kontrollgruppe ein gesundes Probandenkollektiv rekrutiert. Alle Patienten und Probanden wurden im Zeitraum zwischen 30.08.2010 und 31.12.2013 in vier verschiedene Gruppen eingeschlossen. Die Gruppen wurden wie folgt definiert:

3.1.1. Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS)

Patienten mit einem ACS wurden über die Rettungsstelle der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, aufgenommen. ACS war definiert als ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI), nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI) sowie instabile Angina-pectoris (IAP). Die Diagnose eines ACS wurde anhand eines 12-Kanal-Ruhe-EKGs, des Troponin-Schnelltests und ggf. weiterer serieller Troponinbestimmungen und klinischer Beschwerden gestellt.

3.1.2. Patienten mit stabiler Angina pectoris-Symptomatik mit Erstdiagnose einer koronaren Herzerkrankung (SAP)

Patienten, die sich elektiv mit einer stabilen Angina pectoris-Symptomatik vorstellten und bei denen invasiv die Erstdiagnose einer KHK gestellt wurde, wurden in diese Gruppe eingeschlossen. Die Patienten in dieser Gruppe unterscheiden sich klinisch von den Patienten mit ACS, da sie über Wochen und Monate pektanginöse Beschwerden aufwiesen.

3.1.3. Patienten mit Ausschluss einer KHK (AK)

In diese Gruppe wurden Patienten mit einem invasiven Ausschluss einer koronaren Herzerkrankung (KHK) als Kontrollgruppe zu den o.g. Gruppen eingeschlossen.

3.1.4. Gesunde Probanden (GP)

Ein gesundes Probandenkollektiv wurde in diese Gruppe eingeschlossen. Sie dient dazu, das Expressionsmuster bzw. das Verhältnis zwischen konstitutivem Proteasom zu Immunoproteasom in der gesunden Population zu untersuchen.

3.2. Ein- und Ausschlusskriterien

Die Ein- und Ausschlusskriterien der Gruppen sind tabellarisch wie folgt dargestellt (Tbl. 2):

Gruppe	Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
ACS	<ul style="list-style-type: none"> • Klinischer, EKG- oder laborchemischer Nachweis eines ACS 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine
AK	<ul style="list-style-type: none"> • Invasiver Ausschluss einer KHK • Männer: 40–80 J 	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiomyopathien mit hochgradig reduzierter linksventrikulärer Pumpfunktion (LVEF \leq 35 %) • Karzinomen • Endo-, Myo- und Perikarditis • Perikarderguss • Z.n. Herzklappenersatz / Bypass-OP • Z.n. elektrophysiologischer Untersuchung (EPU) mit Ablation
SAP	<ul style="list-style-type: none"> • Stabile Angina pectoris-Symptomatik • Männer: 40–80 J • Invasive Erstdiagnose einer KHK 	<ul style="list-style-type: none"> • Kardiomyopathien mit hochgradig reduzierter linksventrikulärer Pumpfunktion (LVEF \leq 35 %) • Karzinomen • Endo-, Myo- und Perikarditis • Perikarderguss • Z.n. Herzklappenersatz / Bypass-OP • Z.n. elektrophysiologischer Untersuchung (EPU) mit Ablation
GP	<ul style="list-style-type: none"> • Gesunde Männer • Alter < 40 J 	<ul style="list-style-type: none"> • Raucher • Chronische Erkrankungen

Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien

3.3. Arbeitsschritte

3.3.1. Ethikantrag

Der Ethikantrag wurde an die Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin eingereicht und bewilligt (Antragsnummer: EA1/199/09 vom 11.11.2010).

3.3.2. Patienten- und Probandeneinschluss

Die Patienten und Probanden wurden zunächst anhand eines standardisierten Anamnesebogens anamnestiziert und gründlich untersucht (Tbl. 3).

Charakteristika	Daten
Allgemeinanamnese	<ul style="list-style-type: none">• Alter• Geschlecht• Gewicht• Größe
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	<ul style="list-style-type: none">• Hypertonie• Diabetes mellitus• Adipositas• Nikotinkonsum• positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen
Symptome	<ul style="list-style-type: none">• Angina pectoris-Symptomatik (CCS-Klassifikation)• Dyspnoe (NYHA-Klassifikation)
Medikamentenanamnese	<ul style="list-style-type: none">• ASS/Clopidogrel/Heparin• Statine• β-Blocker• ACE-Hemmer / AT₁-Antagonisten

Tabelle 3: Anamnesebogen

3.3.3. Aufklärung

Die Patienten wurden über die Studienzwecke, Anonymisierung der Studienergebnisse und über die RNA-Analysen der Blutproben ausführlich aufgeklärt und ihr Einverständnis mittels Aufklärungsblatt eingeholt.

3.3.4. Blutabnahme

Zur Isolierung der PBMC wurden die Blutproben von Patienten der ACS-Gruppe innerhalb von 45 Minuten nach Aufnahme und vor der Herzkatheteruntersuchung abgenommen, zentrifugiert und eingefroren. Somit konnten in der akuten Phase des Herzinfarktes Blutproben gewonnen werden. In den SAP- und AK-Gruppen wurde am Tag vor der Herzkatheteruntersuchung Blut abgenommen. Die Materialien, die für die Blutabnahme verwendet wurden, sind in Tabelle 4 dargestellt. In der GP-Gruppe wurde bei allen Probanden am Tag des Studieneinschlusses Nüchternblut abgenommen.

Material	Hersteller
Butterflyset	BD Vacutainer® Safety-Lok™ Sicherheitsblutentnahmeset – Heidelberg
Blutröhrchen	BD Vacutainer® EDTA-Röhrchen (5ml) – Heidelberg BD Vacutainer® EDTA-Röhrchen (10ml) – Heidelberg BD Vacutainer® Heparin-Röhrchen (5ml) – Heidelberg

Tabelle 4: Materialien für Blutabnahme

Zur Bestimmung des Lipidstatus und der Blutzuckerwerte wurde in den AK-, SAP- und ACS-Gruppen am Tag nach der Herzkatheteruntersuchung Nüchternblut abgenommen. Aus dem entnommenen Blut wurden folgende Parameter im Zentrallabor der Charité, Campus Mitte, bestimmt (Tbl. 5).

Blutröhrchen	Blutmenge	Zweck/Parameter
2x EDTA	20 ml	PBMC-Isolierung
1x EDTA	5 ml	Bestimmung von Differenzialblutbild und HbA1c-Wert
1x Heparin	5 ml	Bestimmung von Lipid- und CRP-Werten

Tabelle 5: Blutröhrchen und Parameter

Das Differenzialblutbild und die Lipidwerte beinhalten folgende Parameter (Tbl. 6):

Blutuntersuchung	Parameter
Differenzialblutbild	Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, MCV, MCH, MPV, RD, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, unreife Granulozyten, basophile Granulozyten, Erythroblasten
Lipidwerte	Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, Lipoprotein (a)

Tabelle 6: Aufschlüsselung von Differenzialblutbild und Lipidwerten

3.4. Verarbeitung der Blutproben

3.4.1. PBMC-Isolierung

Auf zwei mit jeweils 3 ml Ficoll®-Lösung gefüllte 15 ml-Falcon™-Röhrchen wurde vorsichtig EDTA-Blut überschichtet. Danach wurden die Proben 15 min bei Raumtemperatur (23°C) stehen gelassen und anschließend bei 1.200 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der oberste Überstand (1–2 ml) abgenommen. Die Proben wurden für weitere 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach bei 1.900 rpm erneut zentrifugiert. Nach zwei Durchgängen wurden die weißen Zellringe mit einer Pipette abgenommen. Die Zellringe wurden in zwei leere Falcon™-Röhrchen überführt und es wurde jeweils 13 ml PBS® hinzugegeben. Zum Schluss wurde nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1.000 rpm der Überstand abgossen,

die Röhrcchen zum Abtrocknen auf Filterpapier gestellt und das Pellet aus PBMCs anschließend bei -80°C eingefroren. Die Materialien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Material	Hersteller
Falcon™-Röhrcchen	VWR International GmbH – Darmstadt
Ficoll®-Lösung	Biochemica – Darmstadt
Pipette	Eppendorf® – Hamburg
Megafuge®1.0 R	Heraeus® – Langenselbold
PBS-Buffer	Biochrom – Berlin
Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf® – Hamburg

Tabelle 7: Materialien für PBMC-Isolierung

3.4.2. RNA-Isolierung

Die isolierten PBMC-Pellets wurden gesammelt und zu einem späteren Zeitpunkt zur RNA-Isolierung verwendet. Die RNA wurde mittels *Roti®-quick-Kit* isoliert. Dies beinhaltet drei verschiedene Lösungen, die zur RNA-Isolierung bereits fertiggestellt sind (RQ1, RQ2 und RQ3). Die Proben wurden nach folgenden Schritten aufgearbeitet: Die Pellets wurden in 400 µl RQ1-Lösung homogenisiert und auf- und abpipettiert. Nun wurden 520 µl RQ2-Lösung kräftig geschüttelt, in die Röhrcchen gegeben und gevortext. Die Proben wurden danach 10 min auf Eis herabgekühlt. Bei 4°C wurden die Proben mit 10.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Im Anschluss wurde die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Mikrogefäß überführt. Zudem wurden 400 µl RQ3-Lösung und ca. 20 µl % 5M Ammoniumacetat addiert. Die RNA wurde über Nacht bei -20°C ausgefällt. Am nächsten Tag wurden die Proben zunächst bei 4°C für 30 min mit 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das übriggebliebene Pellet mit ca. 500 µl 70 %-iger Ethanollösung zweimal gewaschen. Erneut wurde der Überstand abgenommen und das Mikrogefäß ca. 5 min zum Trockenen gelassen. Danach wurde das Pellet in Wasser gelöst und mittels Spektrophotometer (Nanodrop®) der RNA-Gehalt der jeweiligen Probe vermessen und tabellarisch dargestellt. Die Materialien, die für die RNA-Isolierung verwendet wurden, sind in der Tabelle 8 dargestellt.

Material	Hersteller
Roti®-quick-Kit	Carl Roth GmbH & Co. KG – Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH – Hamburg
Ethanol	J.T. Baker® – USA
Thermocycler	Biometra® – Göttingen
Centrifuge 5415R	Eppendorf® – Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries – New York, USA
Ammoniumacetat	J.T. Baker® – USA
Nanodrop®	Thermo Scientific – Wilmington, USA

Tabelle 8: Materialien für RNA-Isolierung

3.4.3. Bestimmung des RNA-Gehaltes mittels Spektrophotometer (Nanodrop®)

Mit Hilfe eines Spektrophotometers wurde aus einer Probe der RNA-Gehalt qualitativ gemessen. Hier wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Zunächst wird mit destilliertem Wasser eine Baselinekurve gebildet, dann 1 µl RNA 1:50 verdünnt auf das Gerät aufgetragen. Die Konzentration von RNA wird nach folgender Formel berechnet:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{Absorption 260 nm} \cdot \text{Verdünnung} \cdot K$$

(K = optische Dichte; für RNA 40 µg/ml)

Die Reinheit der Proben wurde durch den Quotient $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ bestimmt und sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

3.4.4. Reverse Transkription (c-DNA-Erststrangsynthese)

Die reverse Transkription dient dazu, die isolierte RNA in eine komplementäre DNA (*Complementary DNA*) umzuschreiben, damit diese mittels PCR quantitativ bestimmt werden kann. Für die reverse Transkription wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Materialien verwendet.

Material	Hersteller
Personal Cycler	Biometra® – Göttingen
DNase I (2U/μl)	Ambion® – Life Technologies GmbH – Darmstadt
Hexamer-Primer DN6 Hexamer	TIB Molbiol – Berlin
Aqua ad iniectabilia	Braun Melsungen Deutschland

Tabelle 9: Materialien für die reverse Transkription (c-DNA-Erststrangsynthese)

Von den gewonnenen Proben wurden pro Patient 350 ng RNA zur Weiterbearbeitung extrahiert. Der RNA-Gehalt wurde in Volumen (μl) umgerechnet und bis auf ein Maximalvolumen von 9 μl mit Wasser aufgefüllt. Für die Umschreibung von RNA in den c-DNA-Erststrang wurde reverse Transkriptase hinzugegeben. Als erster Schritt wurde die mit Wasser aufgefüllte RNA-Probe mit 0,5 μl DNase (2U/μl) vermischt und zentrifugiert. Danach wurde sie für 15 min auf 37°C und anschließend 5 min auf 95°C im *Cycler* erhitzt. Abschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt und auf Eis gestellt. In einem zweiten Schritt wurde 2 μl Hexamer-Primer (0,5 μg/μl) den Proben zugegeben. Anschließend wurden die Proben im *Cycler* für 10 min auf 70°C erhitzt und dann auf 4°C abgekühlt. Danach wurden sie 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend auf Eis gestellt. In einem dritten Schritt wurde den Proben ein Enzymcocktail (Mastermix) zugegeben. Der Mastermix pro Probe besteht aus folgenden Komponenten (Tbl. 10):

Mastermix	Hersteller
4,0 μl 5 x reverse Transkriptase-Puffer	Invitrogen Life Technologies GmbH – Darmstadt
2,0 μl DTT (100 mM)	Invitrogen Life Technologies GmbH – Darmstadt
1,0 μl dNTP (10 mM)	Biozym – Hessisch Oldendorf, Deutschland
0,5 μl Protector RNase Inhibitor (40 U/μl)	Roche – Basel, Schweiz
1,0 μl M-MLV reverse Transkriptase (200 U/ μl)	Invitrogen Life Technologies GmbH – Darmstadt

Tabelle 10: Zusammensetzung des Mastermixes

Je nach Anzahl von Proben wurde das Volumen des Mastermixes berechnet, zusammengemischt und den einzelnen Proben beigemischt. Nach allen o.g. Schritten ergibt sich ein Gesamtvolumen von 20 µl. Dieses wurde 60 min im *Cycler* bei 37°C belassen und anschließend auf 4°C gekühlt. Die Proben wurden dann bei -20°C gelagert.

3.4.5. Real-Time (RT) TaqMan™ Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um die mRNA-Sequenzen zu quantifizieren, wurde eine Real-Time TaqMan™ Polymerasekettenreaktion genutzt. Dazu wurden die unten angegebenen Materialien verwendet (Tbl. 11). Die RT-PCR ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter der Annahme einer 100 %-igen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt. Sie wird mathematisch nach der unten genannten Formel berechnet:

$$Y = X (1+E)^n$$

Y = Menge des hergestellten Amplifikats

X = Startkopienzahl zu Beginn der PCR

E = Effizienz der Reaktion

n = die Anzahl der PCR-Zyklen

Material	Hersteller
Real-Time GeneAmp 5700 Sequence Detection System	Applied Biosystems – Life Technologies GmbH – Darmstadt
TaqMan™ Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems
96-Well-Platte	Applied Biosystems

Tabelle 11: Materialien für Real-Time TaqMan™ PCR

Die synthetisierte c-DNA (wie im Schritt 3.4.4 erläutert) wurde als Ausgangsmaterial zur PCR benutzt. Durch Verwendung von spezifischen Primern (Tbl. 14) sowie einer fluoreszierenden Sonde wird ein Segment der c-DNA markiert und repliziert. Ein Primer ist ein Strang von Nukleinsäuren, welcher zur Markierung des Startpunktes der DNA-Synthese dient. Die fluoreszierende Sonde, die aus einem Oligonukleotid besteht, ist am 5'-Ende mit einem

Reporterfarbstoff (Fluoreszeinderivat) sowie am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff (Rodaminderivat) markiert und durch einen Phosphatrest blockiert. Wenn die Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt wird, wird die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs durch einen Energietransfer des Quencherfarbstoffs unterdrückt. Während dieser Prozedur hybridisiert zunächst die Sonde mit den Primern. In der Extensionsphase wird die Sonde durch die Taq-Polymerase verdrängt und durch die AmpliTaq-DNA-Polymerase geschnitten. Je mehr PCR-Produkte gebildet werden, desto mehr die Fluoreszenz des Reporters ansteigt. Die Veränderung der Fluoreszenz wird durch das Real-Time GeneAmp 5700 Sequence Detection System erfasst.

Mit Hilfe eines passiven Referenzstoffs (ROX) werden die störenden Fluktuationen normalisiert. So wird der Quotient zwischen der Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes und der Emissionsintensität des passiven Referenzfarbstoffes gebildet – der sogenannte ΔRn -Wert. Zum Schluss wird die Anzahl der PCR-Zyklen gemessen, die nötig sind, um den ΔRn -Wert zu erreichen. Die Anzahl der PCR-Zyklen wird als Ct-Wert angegeben. Zur Erstellung einer Standardkurve wird die o.g. Gleichung in ihre logarithmierte Form umgeschrieben:

$$Y = \log X + n \log (1+E)$$

Die graphische Darstellung erfolgt mit dem Ct-Wert über dem log der Startkopienzahl. Um eine Normalisierung der experimentellen Ergebnisse zu erreichen, wurde eine aktive Referenz – eine sogenannte endogene Amplifikationskontrolle, das Housekeeping-Gen – angewendet. Die relative mRNA-Expression der Gene wird mit dem 2^{-dCt} -Wert berechnet. Dieser wird aus dem Ct-Wert generiert und relativ für die Expression des Hauskeeping-Gens (RPL 19) berechnet. Die RT-PCR erfolgt in einer 96-Well-Platte mit einer Gesamtmenge von 25 μ l TaqMan™ Universal PCR Mastermix. Das folgende Pipettierschema wurde dazu verwendet (Tbl. 12).

Probe	Inhalt	Volumen
Ansatz 1	F-Primer und R-Primer + Aqua+ 5 nM TaqMan™ Sonde	11,5 μ l
Ansatz 2	TaqMan™ Universal PCR Mastermix c-DNA	12,5 μ l 1,0 μ l
		25,0 μl

Tabelle 12: Pipettierschema für Mastermix

Die PCR-Replikation wurde nach dem o.g. Pipettierschema im Real-Time GeneAmp 5700 Sequence Detection System durchgeführt. Dabei wurde die Denaturierung der c-DNA mit 40 Zyklen nach u.a. Zeit- und Temperaturschema erreicht (Tbl. 13).

Temperatur	Zeit
95°C	10 min
95°C	15 sec
60°C	1 min

Tabelle 13: Zeit- und Temperaturschema für Denaturierung der c-DNA

Die folgenden Forward- und Reverse-Primer wurden für die Real-Time RT-PCR verwendet (Tbl. 14).

Name	Gen	Primer	Sequenz	Konz.	Sonde
$\alpha 3$	PSMA3	FW RV Sonde	acagtgtgaatgacggtgcg gcagcttgccctggctttg tgaccatcaggtgtttcatcacggttattg	300 nM 900 nM	FAM - BHQ1
$\beta 5$	PSMB5	FW RV Sonde	aggaatcgaatgcttcatgga gtaagcaccgctgtagccc accacctggccttcaagtccgc	300 nM 300 nM	FAM - BHQ1
$\beta 5i$	PSMB8	FW RV Sonde	agtactgggagcgcctget ccgacactgaaatcgttctcca tcgcagatagtacagcctgcattccttg	300 nM 300 nM	FAM - BHQ1
$\beta 1$	PSMB6	FW RV Sonde	acacctattcacgaccgattt gtaggtgacagcatcagctactgc ctgtcgtcaggtcagctgctgatac	300 nM 900 nM	FAM - BHQ1
$\beta 1i$	PSMB9	FW RV Sonde	cgttgatgggttctgattcc gacagcttgtaaacactcggtt caccgcctcgctgcagacact	300 nM 300 nM	FAM - BHQ1
60S ribosomal protein L19	RPL19	FW RV Sonde	gagaccaatgaaatcgcaatg gcgatgatcagcccatctt caactcccgtcagcagatccggaa	300 nM 900 nM	FAM - TAMRA

Tabelle 14: Für RT-PCR verwendete Forward- und Reverse-Primer

3.5. Literaturrecherche

Die Literaturrecherche wurde mit Hilfe der Datenbank PubMed Central® durchgeführt.

3.6. Software

Folgende Software-Programme wurden in dieser Arbeit verwendet:

- Microsoft Word® für Mac 2011, Version 14.4.3. zum Erstellen des Layouts
- EndNote X7 zur Literaturverwaltung
- Microsoft Excel® für Mac 2011, Version 14.4.3. zur Erstellung von Tabellen
- SPSS Version 22, IBM® Corporation zur Erstellung von Diagrammen und zur statistischen Auswertung

3.7. Statistik

Die statistische Auswertung wurde nach Beratung im Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, mit der Software SPSS Version 22 (IBM® Corporation) durchgeführt.

Die Baseline-Charakteristika mit nominalen Variablen sind als Prozentzahl und mit skalierten Variablen als Medianwert und Minimum-Maximumwert dokumentiert. Die statistische Signifikanz (p-Werte) für die nominalen Variablen wurde mit dem Chi-Quadrat-Test und die p-Werte für die skalierten Variablen mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Mann-Whitney-U-Test berechnet.

Die Ergebnisse wurden zunächst in Microsoft Excel® und danach in SPSS tabellarisch zusammengetragen. Da die Fallzahl < 25 Patienten pro Gruppe beträgt, wurde die statistische Signifikanz für alle Gruppen (GP, AK, SAP und ACS) mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test überprüft. Danach wurde die statistische Signifikanz zwischen zwei Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Die graphische Darstellung erfolgte in Boxplots. Die statistische Signifikanz wurde durch eine Wahrscheinlichkeit (p) zur Annahme der Nullhypothese von $p < 0,05$ (zweiseitig) definiert. Die Ergebnisse sind als Medianwert und Minimum- bis Maximumwert angegeben.

Im Abschnitt 4.6. wird das Verhältnis zwischen der Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms dargestellt. Da innerhalb einer Patientengruppe konstitutive und induzierbare Untereinheiten verbundene Variablen sind, wurde die statistische Signifikanz mit dem Wilcoxon-Test untersucht und ebenfalls mit Boxplots dargestellt.

Im Abschnitt 4.7. wird die Korrelation zwischen der Expression der o.g. Untereinheiten präsentiert. Da es hier um einen nicht parametrischen Datensatz handelt, wurde die Korrelation mit dem Spearman-Rho-Test berechnet.

4. Ergebnisse

4.1. Baseline-Charakteristika

Die Baseline-Charakteristika sind in der Tabelle 15 dargestellt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden nur die Gruppen AK, SAP und ACS in der Baseline-Tabelle ausgewertet. Die GP-Gruppe dient als Vergleichsgruppe ohne Arteriosklerose im Alter < 40 Jahren. Diese Gruppe soll ein Querschnitt der jungen gesunden Bevölkerung repräsentieren. Die Ergebnisse der skalierten Variablen sind als Medianwert und Minimum- bis Maximumwert und die der nominalen Variablen als Prozentzahl präsentiert.

Im Differentialblutbild wurde ein statistisch signifikanter Unterschied nur in der Höhe der Leukozytenanzahl zwischen den ACS- und AK-Gruppen ($p = 0,033$) und zwischen den ACS- und SAP-Gruppen ($p = 0,002$) errechnet.

<u>Charakteristika</u>	GP	AK	SAP	ACS	p-Werte (AK vs SAP vs ACS)
Patientenanzahl	13	14	16	18 STEMI: 5 NSTEMI: 13	
Alter	29 (24-39)	56 (20-81)	71 (50-79)	62 (43-79)	0,090
<u>Risikofaktoren n (%)</u>					
Hypertonie	0 (0)	10 (71,4)	16 (100)	18 (100)	0,060
Diabetes	0 (0)	5 (35,7)	5 (31,2)	2 (11,1)	0,224
Nikotinkonsum	0 (0)	6 (42,8)	4 (25,0)	11 (61,1)	0,360
Adipositas	0 (0)	6 (42,8)	6 (26,7)	5 (36,0)	0,661
Positive FA	4 (30,8)	3 (21,4)	3 (18,7)	2 (11,1)	0,699
HLP	3 (23,1)	10 (71,4)	10 (56,2)	8 (44,4)	0,316
RR-Sys (mmHg)	120 (110-130)	125 (110-170)	130 (120-160)	130 (90-199)	0,787
RR-Dia (mmHg)	80 (70-80)	80 (75-85)	80 (70-100)	78 (61-100)	0,582
BMI (Kg/m²)	22,2 (18,9-26)	28,3 (19-32)	28,5 (23,7-32,7)	25,7 (19,4-29,4)	0,225
CRP (mg/dl)	0,04 (0,03-0,27)	0,71 (0,05-3,4)	1,68 (0,03-8,1)	0,34 (0,03-3,82)	0,114
Cholesterin (mg/dl)	172 (123-258)	221 (128-284)	205 (133-272)	189 (159-291)	0,601
HbA1C (%)	5,1 (4,7-5,7)	5,7 (5,2-11,6)	5,9 (4,9-7,6)	5,5 (5,0-7,9)	0,078
Leukozyten (B/nl)	5,3 (3,7-15,3)	7,7 (4,8-10,3)	6,4 (4,2-11,6)	8,85 (5,11-15,3)	0,050
Monozyten (B/nl)	0,44 (0,22-0,68)	0,54 (0,2-0,75)	0,12 (0,04-0,88)	0,7 (0,3-1,16)	0,069
Lymphozyten (B/nl)	2,02 (1,19-3)	1,87 (1,41-3,14)	1,63 (0,88-2,77)	1,8 (0,82-4,88)	0,339

Tabelle 15: Baseline-Charakteristika

4.2. Relative mRNA-Expression der proteasomalen Untereinheiten

4.2.1. α 3-Untereinheit (PSMA3)

In der ACS-Gruppe konnte die niedrigste Expression ($1,0 \cdot 10^{-2}$; $0,4-1,5 \cdot 10^{-2}$) und in der SAP-Gruppe die höchste Expression der α 3-Untereinheit ($1,5 \cdot 10^{-2}$; $0,6-4,2 \cdot 10^{-2}$) mit einem statistisch signifikanten Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,03$; prozentualer Unterschied: 33 %). In den ACS- und SAP-Gruppen wurden im Vergleich zur AK-Gruppe ($1,4 \cdot 10^{-2}$; $0,4-3,1 \cdot 10^{-2}$) keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen ($p = 0,11$; $p = 0,75$), (Abb. 6).

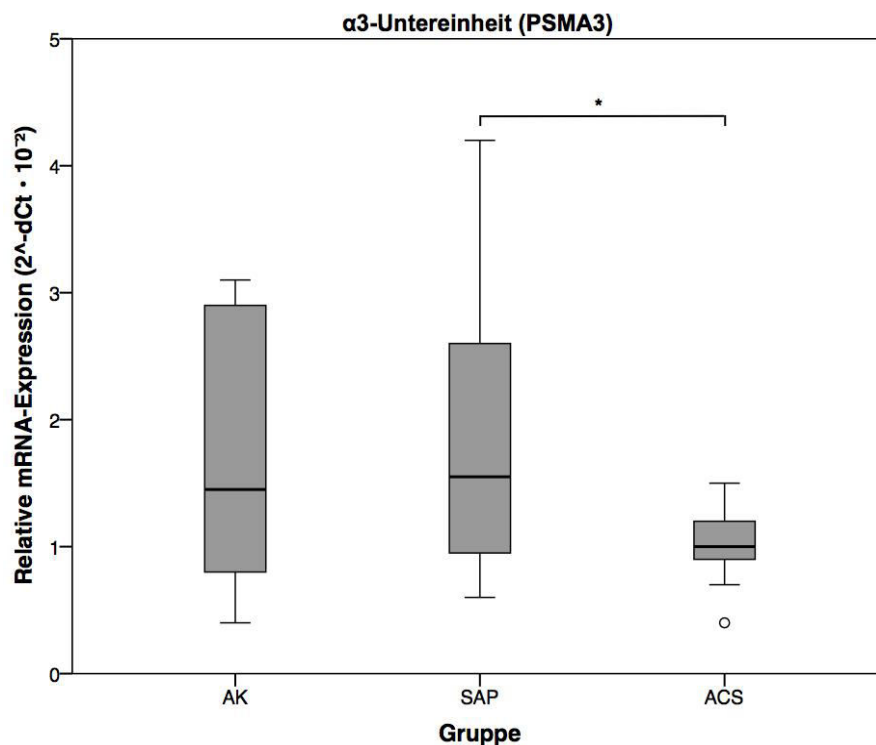


Abbildung 6: Die relative mRNA-Expression der α 3-Untereinheit ist als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

AK = Ausschluss KHK, SAP = stabile Angina pectoris, ACS = akutes Koronarsyndrom
* $p < 0,05$

4.2.2. β 5-Untereinheit (PSMB5)

In der ACS-Gruppe zeigte sich die höchste Expression ($2 \cdot 10^{-2}$; $0,6-3,2 \cdot 10^{-2}$) und in der SAP-Gruppe die niedrigste Expression der β 5-Untereinheit ($0,8 \cdot 10^{-2}$; $0,4-2,5 \cdot 10^{-2}$). Dies war statistisch signifikant ($p = 0,007$; prozentualer Unterschied: 150 %). Im Vergleich zur AK-Gruppe ($0,9 \cdot 10^{-2}$; $0,5-2,5 \cdot 10^{-2}$) konnte in der ACS-Gruppe eine vermehrte Expression mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,004$; prozentualer Unterschied: 122 %) nachgewiesen werden. Die Expression der β 5-Untereinheit in der SAP-Gruppe war im Vergleich zur AK-Gruppe ohne signifikanten Unterschied ($p = 0,68$), (Abb. 7).

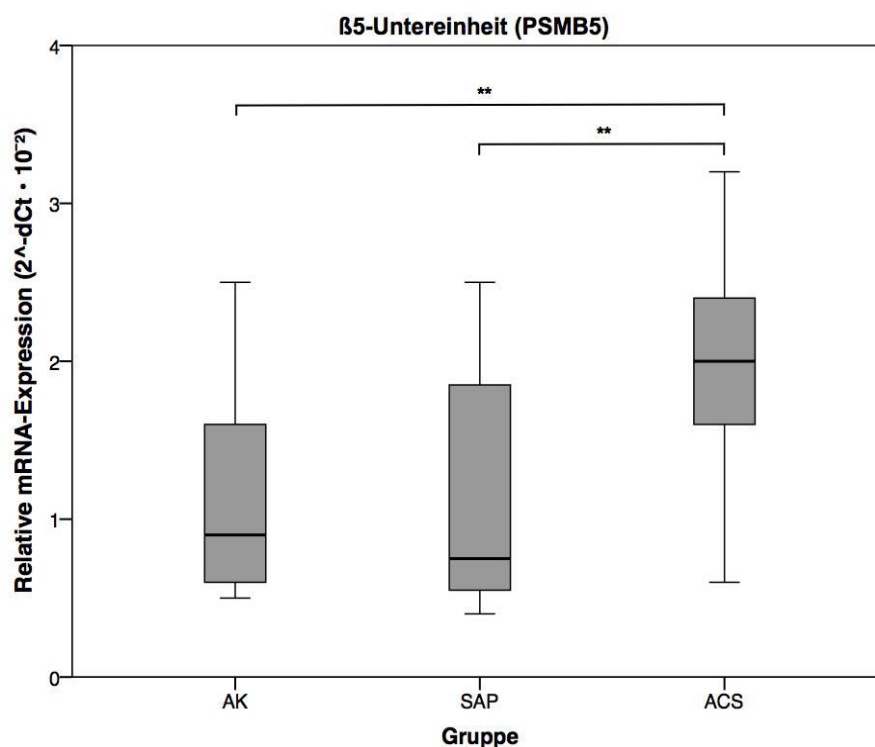


Abbildung 7: Die relative mRNA-Expression der β 5-Untereinheit ist als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

AK = Ausschluss KHK, SAP = stabile Angina pectoris, ACS = akutes Koronarsyndrom

** $p < 0,01$

4.2.3. $\beta 5i$ -Untereinheit (PSMB8)

In der ACS-Gruppe zeigte sich die niedrigste Expression ($5,4 \cdot 10^{-2}$; $3,3-9,2 \cdot 10^{-2}$) und in der SAP-Gruppe die höchste Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit ($18,9 \cdot 10^{-2}$; $4,5-32,9 \cdot 10^{-2}$). Hier wurde ein statistisch signifikanter Unterschied betrachtet ($p < 0,001$; prozentualer Unterschied: 71 %). Im Vergleich zur AK-Gruppe ($11,7 \cdot 10^{-2}$; $3,7-37,9 \cdot 10^{-2}$) war in der ACS-Gruppe ebenfalls eine statistisch signifikant niedrigere Expression der o.g. Untereinheit zu sehen ($p = 0,028$; prozentualer Unterschied: 54 %). Im Vergleich zur AK-Gruppe ist in der SAP-Gruppe die Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,52$), (Abb. 8).

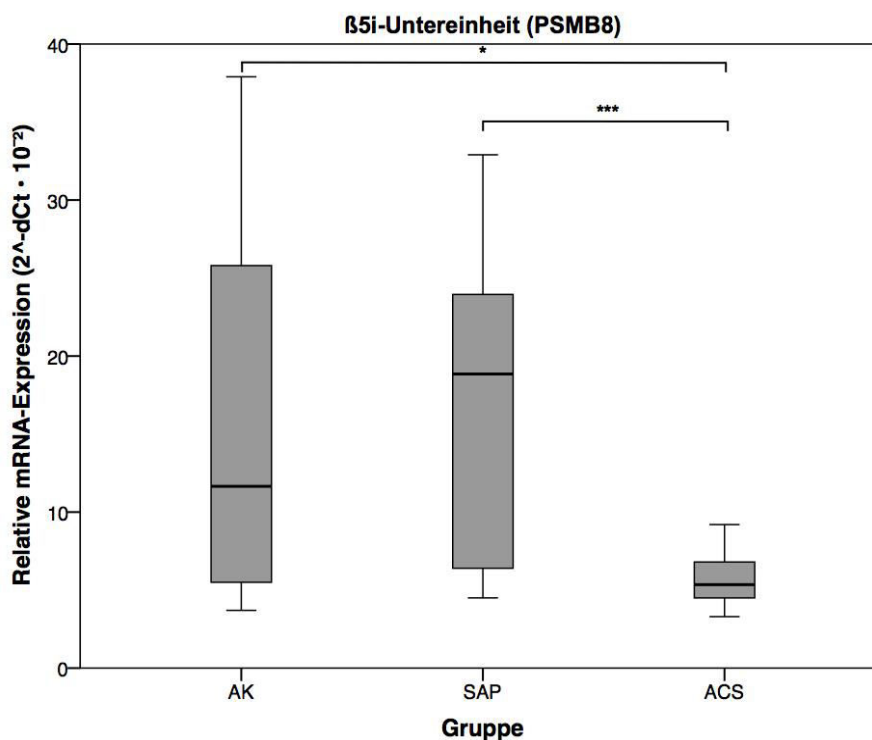


Abbildung 8: Die relative mRNA-Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit ist als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

AK = Ausschluss KHK, SAP = stabile Angina pectoris, ACS = akutes Koronarsyndrom
* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

4.2.4. β 1-Untereinheit (PSMB6)

In der ACS-Gruppe konnte die niedrigste Expression ($5,9 \cdot 10^{-2}$; $3,2-21,3 \cdot 10^{-2}$) und in der SAP-Gruppe die höchste Expression der β 1-Untereinheit ($8,5 \cdot 10^{-2}$; $6,9-20 \cdot 10^{-2}$) mit einem statistisch signifikanten Unterschied gemessen werden ($p = 0,009$; prozentualer Unterschied: 30 %). Die Expression in den ACS- und SAP-Gruppen war im Vergleich zur AK-Gruppe ($7,1 \cdot 10^{-2}$; $4,4-13,3 \cdot 10^{-2}$) ohne signifikanten Unterschied ($p = 0,23$; $p = 0,09$), (Abb. 9).

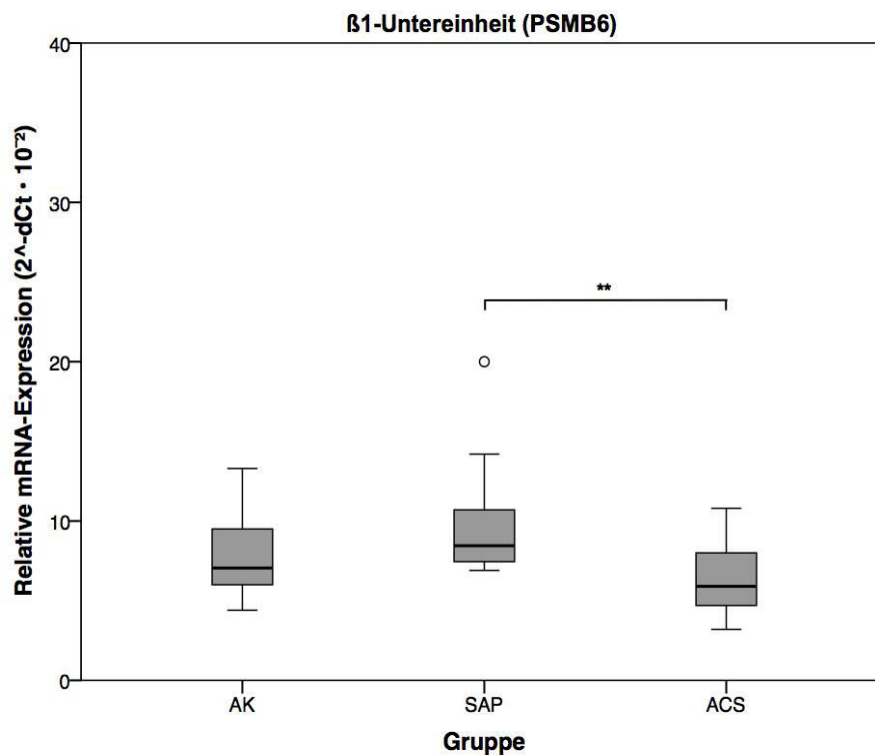


Abbildung 9: Die relative mRNA-Expression der β 1-Untereinheit ist als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

AK = Ausschluss KHK, SAP = stabile Angina pectoris, ACS = akutes Koronarsyndrom

** $p < 0,01$

4.2.5. β 1i-Untereinheit (PSMB9)

Bei der β 1i-Untereinheit zeigte sich analog zur β 1-Untereinheit die niedrigste Expression in der ACS-Gruppe ($13,9 \cdot 10^{-2}$; $9,4$ – $26,7 \cdot 10^{-2}$) und die höchste Expression in der SAP-Gruppe ($18,3 \cdot 10^{-2}$; $13,6$ – $29,1 \cdot 10^{-2}$) mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,043$; prozentualer Unterschied: 24 %). Es konnten im Vergleich zur AK-Gruppe ($16,2 \cdot 10^{-2}$; $9,4$ – $36,3 \cdot 10^{-2}$) sowohl in der ACS-Gruppe als auch in der SAP-Gruppe keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden ($p = 0,36$; $p = 0,34$), (Abb. 10).

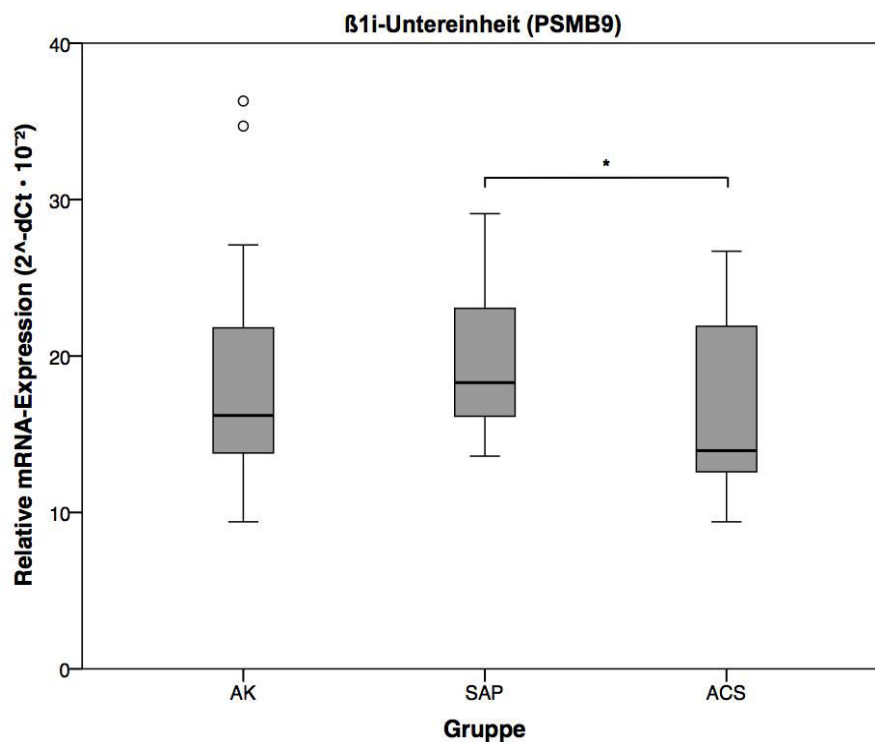


Abbildung 10: Die relative mRNA-Expression der β 1i-Untereinheit ist als $2^{-dCt} \cdot 10^2$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

AK = Ausschluss KHK, SAP = stabile Angina pectoris, ACS = akutes Koronarsyndrom
* $p < 0,05$

4.3. Vergleich der relativen mRNA-Expression der proteasomalen Untereinheiten zwischen den GP- und AK-Gruppen

4.3.1. $\alpha 3$ -Untereinheit (PSMA3)

Die AK-Gruppe zeigte mit statistisch signifikantem Unterschied ($p < 0,001$) eine 2,3-fach erhöhte Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit ($1,4 \cdot 10^{-2}$; $0,4-3,1 \cdot 10^{-2}$) im Vergleich zur GP-Gruppe ($0,6 \cdot 10^{-2}$; $0,3-1 \cdot 10^{-2}$), (Abb. 11).

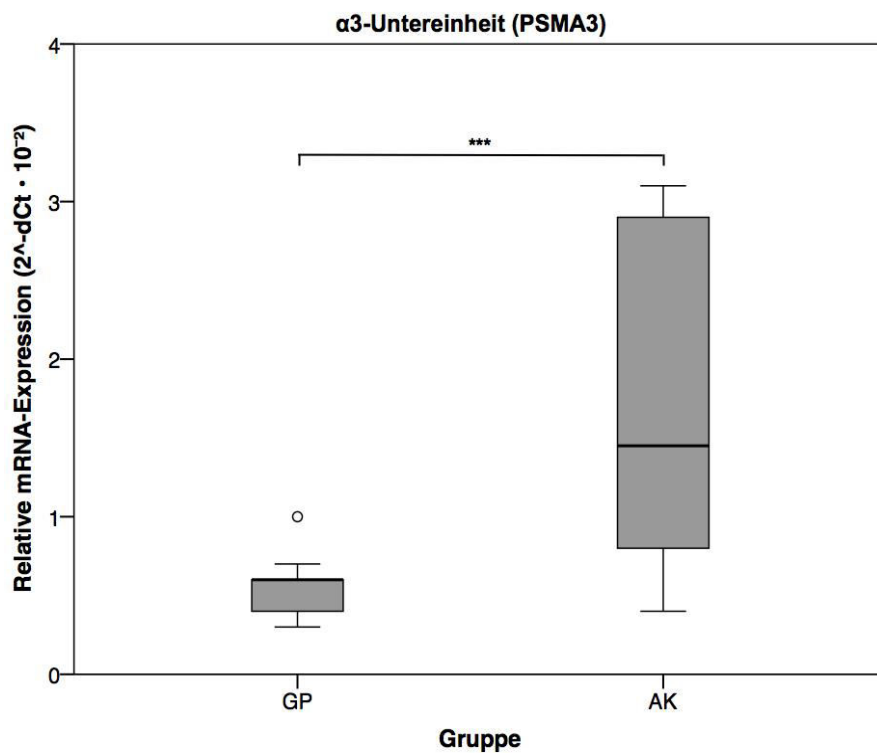


Abbildung 11: Die relative mRNA-Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit ist in den AK- und GP-Gruppen als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

GP = gesunde Probanden, AK = Ausschluss KHK, *** $p < 0,001$

4.3.2. β 5-Untereinheit (PSMB5)

Die Expression der β 5-Untereinheit in der AK-Gruppe ($0,9 \cdot 10^{-2}$; $0,5-2,5 \cdot 10^{-2}$) und in der GP-Gruppe ($1,1 \cdot 10^{-2}$; $0,7-2,5 \cdot 10^{-2}$) war ohne statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,23$), (Abb. 12).

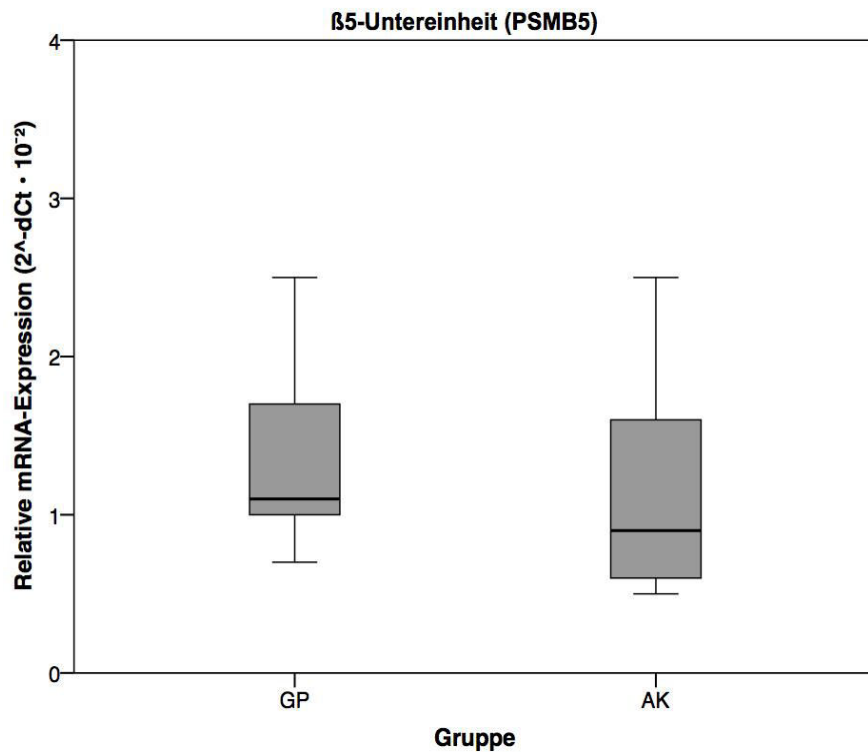


Abbildung 12: Die relative mRNA-Expression der β 5-Untereinheit in den AK- und GP-Gruppen ist als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

GP = gesunde Probanden, AK = Ausschluss KHK

4.3.3. $\beta 5i$ -Untereinheit (PSMB5)

Es zeigte sich mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,014$) eine 2,3-fach erhöhte Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit in der AK-Gruppe ($11,7 \cdot 10^{-2}$; $4,3\text{--}37,9 \cdot 10^{-2}$) im Vergleich zur GP-Gruppe ($5,1 \cdot 10^{-2}$; $3,2\text{--}8,8 \cdot 10^{-2}$), (Abb. 13).

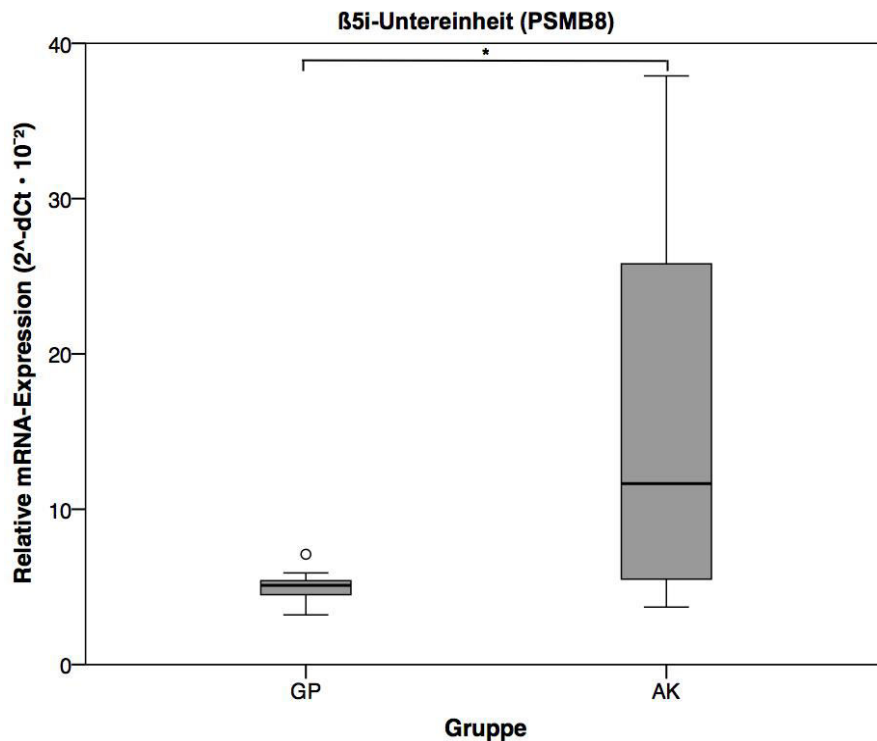


Abbildung 13: Die relative mRNA-Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit in den AK- und GP-Gruppen ist als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

GP = gesunde Probanden, AK = Ausschluss KHK, * $p < 0,05$

4.3.4. β 1-Untereinheit (PSMB6)

Die Expression der β 1-Untereinheit in der AK-Gruppe ($7,1 \cdot 10^{-2}$; $4,4\text{--}13,3 \cdot 10^{-2}$) und in der GP-Gruppe ($6 \cdot 10^{-2}$; $4,2\text{--}11,8 \cdot 10^{-2}$) zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,14$), (Abb. 14).

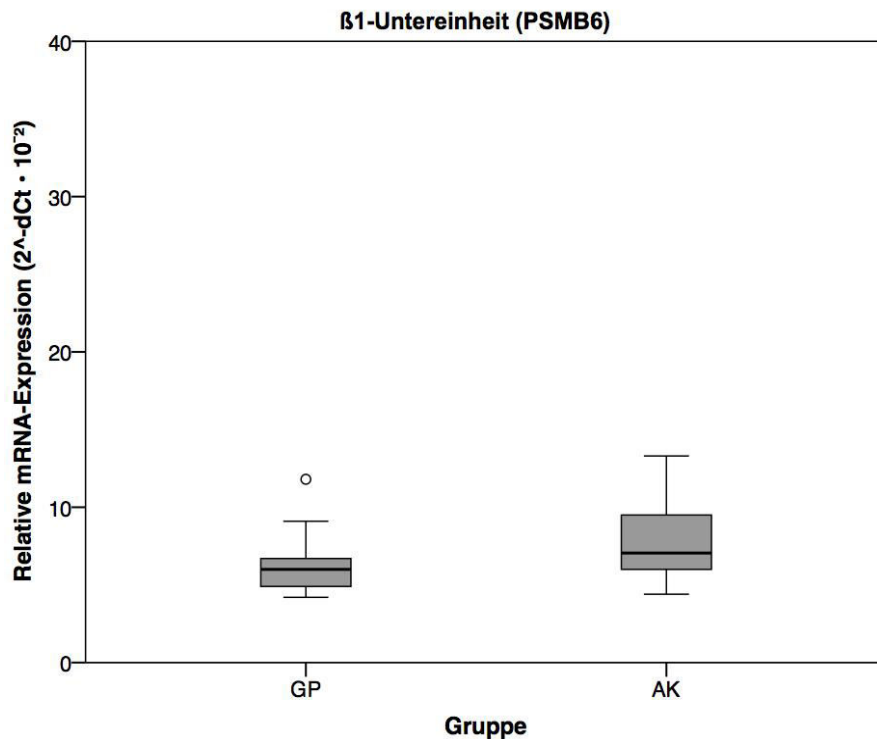


Abbildung 14: Die relative mRNA-Expression der β 1-Untereinheit in den AK- und GP-Gruppen ist als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

GP = gesunde Probanden, AK = Ausschluss KHK

4.3.5. β 1i-Untereinheit (PSMB9)

Die Expression der β 1i-Untereinheit war in der AK-Gruppe ($16,2 \cdot 10^{-2}$; $9,4\text{--}36,3 \cdot 10^{-2}$) und in der GP-Gruppe ($13,3 \cdot 10^{-2}$; $9,2\text{--}31,1 \cdot 10^{-2}$) analog zur β 1-Untereinheit ohne signifikanten Unterschied ($p = 0,14$), (Abb. 15).

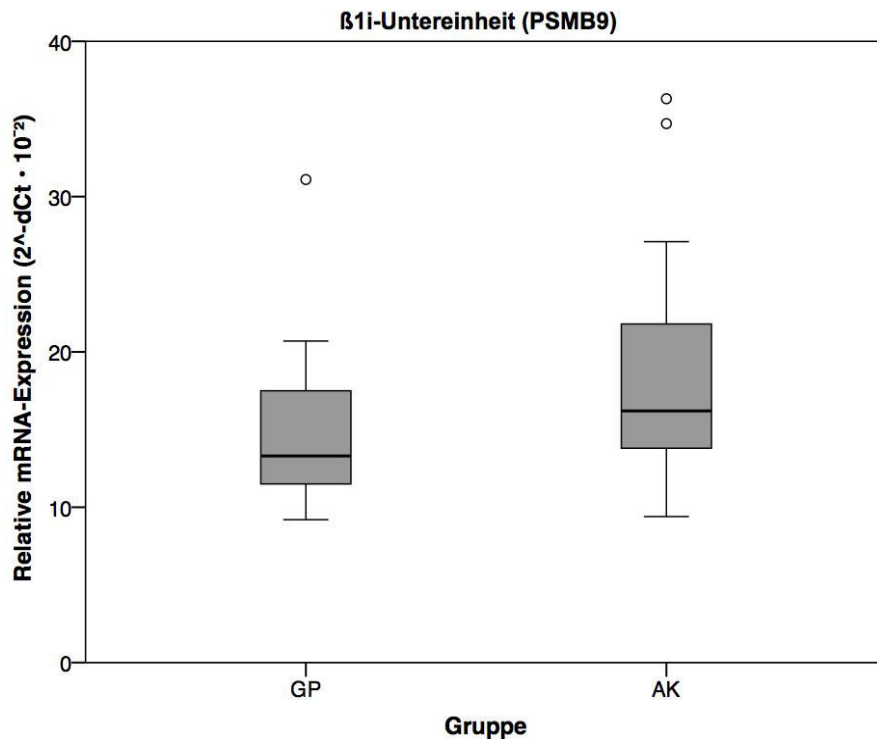


Abbildung 15: Die relative mRNA-Expression der β 1i-Untereinheit ist in den AK- und GP-Gruppen als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

GP = gesunde Probanden, AK = Ausschluss KHK

4.4. Relative mRNA-Expression der proteasomalen Untereinheiten in Abhängigkeit von kardiovaskulären Risikofaktoren und Alter

Da im Vergleich der AK- und GP-Gruppen die relative mRNA-Expression der $\alpha 3$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten sich unterscheidet, wurde mittels Mann-Whitney-U-Test das Vorhandensein der einzelnen Risikofaktoren mit der relativen mRNA-Expression der o.g. Untereinheiten überprüft. Hier zeigte sich mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,005$) eine 2,2-fach erhöhte Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit bei Patienten mit arterieller Hypertonie ($1,3 \cdot 10^{-2}$; $0,6-3,1 \cdot 10^{-2}$) im Vergleich zu Patienten ohne Hypertonie ($0,6 \cdot 10^{-2}$; $0,3-2,9 \cdot 10^{-2}$), (Abb. 16). Zudem wurde eine Tendenz zur erhöhten Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit ohne signifikanten Unterschied ($p = 0,102$) bei Patienten mit arterieller Hypertonie beobachtet.

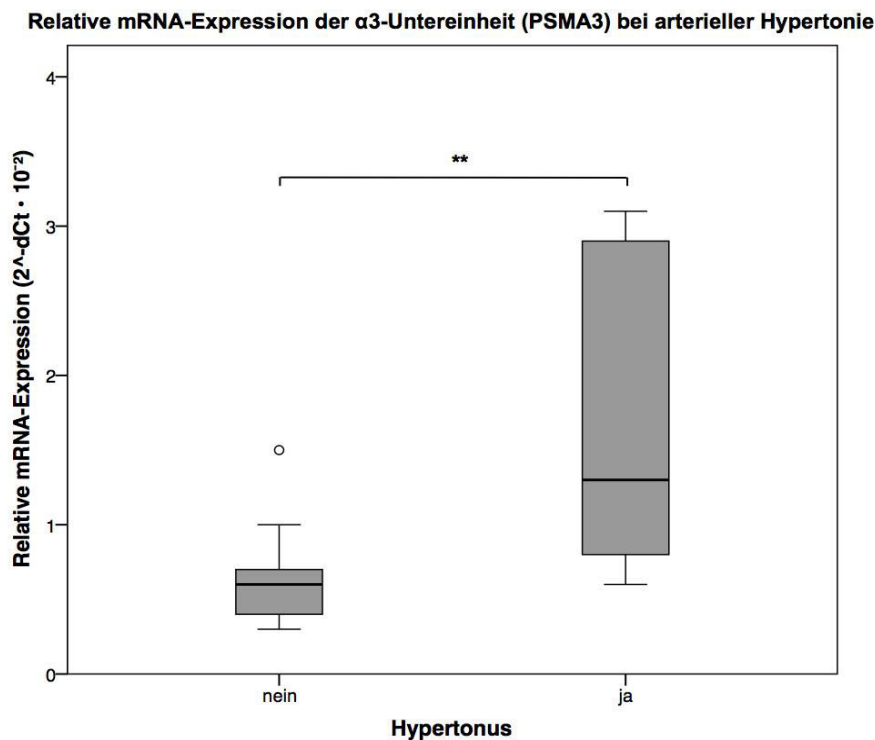


Abbildung 16: Die relative mRNA-Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit ist in Abhängigkeit von der arteriellen Hypertonie als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

** $p < 0,01$

Darüber hinaus konnte eine signifikante 2,3-fach erhöhte Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie ($1,4 \cdot 10^{-2}$; $0,4-3,1 \cdot 10^{-2}$) im Vergleich zu Patienten ohne Hyperlipoproteinämie ($0,6 \cdot 10^{-2}$; $0,3-1,5 \cdot 10^{-2}$) gezeigt werden ($p = 0,017$), (Abb. 17).

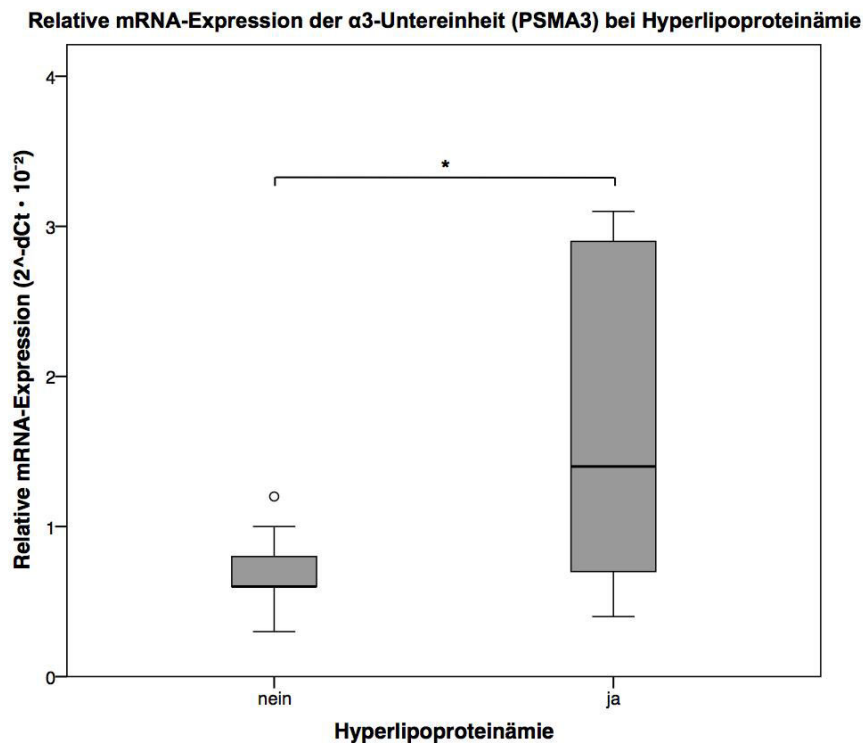


Abbildung 17: Die relative mRNA-Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit ist in Abhängigkeit von Hyperlipoproteinämie als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

* $p < 0,05$

Des Weiteren wurde in den AK- und GP-Gruppen untersucht, ob die relative mRNA-Expression der proteasomalen Untereinheiten altersabhängig ist. Dafür wurden die o.g. Parameter miteinander korreliert. Hier konnte nur eine Tendenz zur positiven Korrelation ($r = 0,33$) zwischen Alter und relativer mRNA-Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit ohne statistische Signifikanz ($p = 0,91$) nachgewiesen werden.

4.5. Veränderte Expression der proteasomalen Untereinheiten unter Interferontherapie

In der GP-Gruppe konnte bei einem Probanden im Vergleich zu den anderen Probanden eine geringe Tendenz zur vermehrten Expression insbesondere der induzierbaren Untereinheiten beobachtet werden (Abb. 18). Bei dem Probanden wurde anamnestisch eine Interferontherapie bei einer akuten Hepatitis-B-Infektion durchgeführt. Daher wurde diese Beobachtung zur Untersuchung einer möglichen Veränderung der proteasomalen Untereinheiten unter Interferon genutzt. Bei dem Einzelbeispiel wurde keine statistische Analyse durchgeführt.

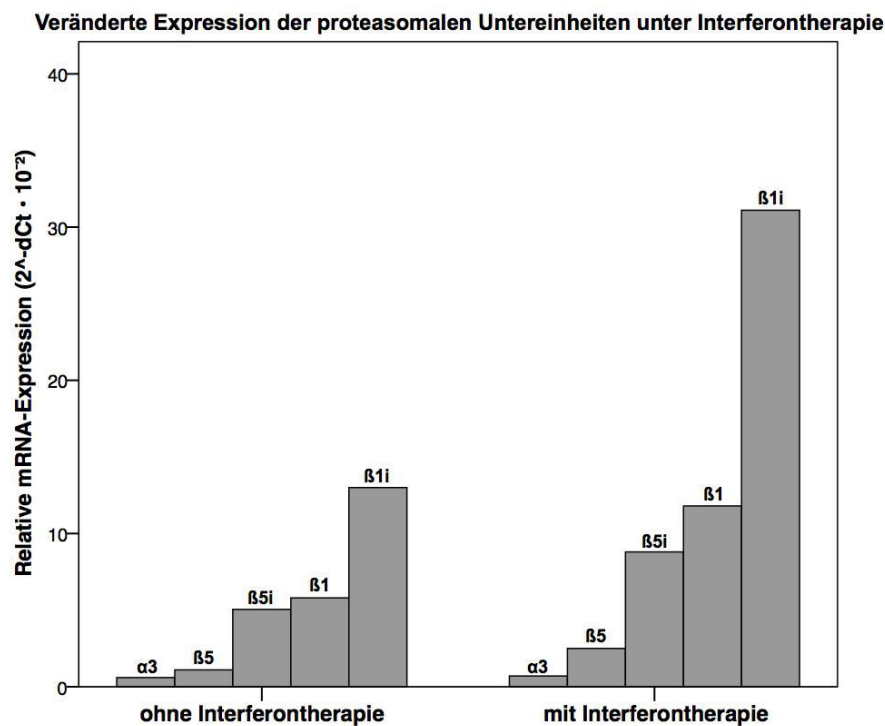


Abbildung 18: Die relative mRNA-Expression der proteasomalen Untereinheiten ist in Abhängigkeit von Interferontherapie als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Medianwert präsentiert.

$\alpha 3$ = PSMA3, $\beta 5$ = PSMB5, $\beta 5i$ = PSMB8, $\beta 1$ = PSMB6, $\beta 1i$ = PSMB9

4.6. Verhältnis zwischen der Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms

4.6.1. ACS-Gruppe

In der ACS-Gruppe zeigte sich mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) eine 2,7-fach erhöhte Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit ($5,4 \cdot 10^{-2}$; $3,3-9,2 \cdot 10^{-2}$) im Vergleich zur $\beta 5$ -Untereinheit ($2 \cdot 10^{-2}$; $0,6-3,2 \cdot 10^{-2}$). Ebenfalls war die Expression der $\beta 1i$ -Untereinheit ($13,9 \cdot 10^{-2}$; $9,4-26,7 \cdot 10^{-2}$) mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) 2,4-fach höher als die Expression der $\beta 1$ -Untereinheit ($5,9 \cdot 10^{-2}$; $3,2-21,3 \cdot 10^{-2}$). Somit wurde eine erhöhte Expression der induzierbaren Untereinheiten im Vergleich zu den konstitutiven Untereinheiten des Proteasoms in der ACS-Gruppe nachgewiesen (Abb. 19).

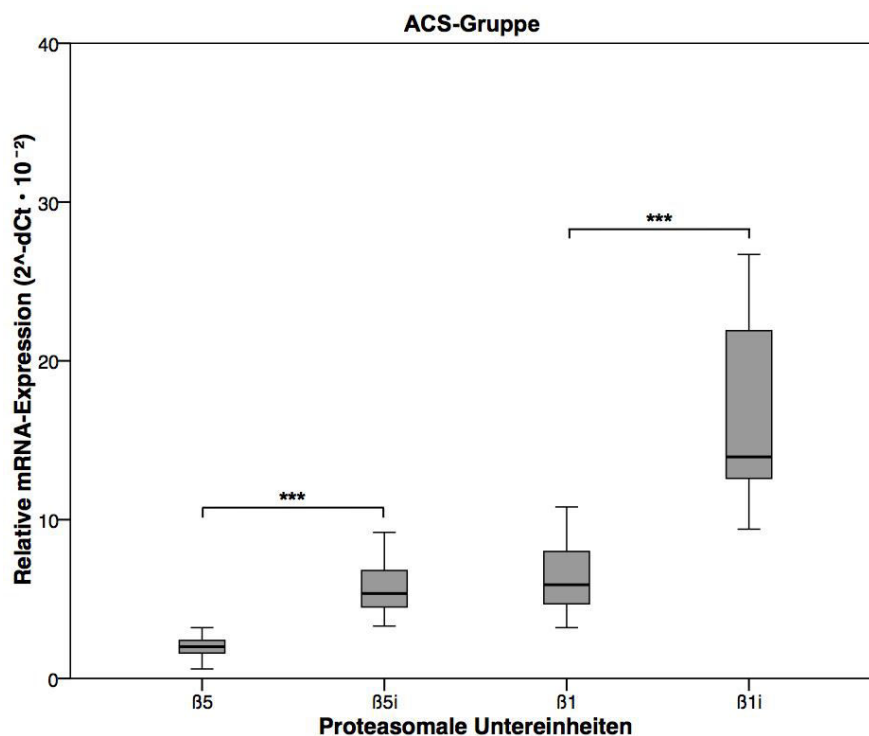


Abbildung 19: Die Relation zwischen der Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms in der ACS-Gruppe. Die relative mRNA-Expression der untersuchten Untereinheiten ist als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

ACS = akutes Koronarsyndrom, $\beta 5$ = PSMB5, $\beta 5i$ = PSMB8, $\beta 1$ = PSMB6, $\beta 1i$ = PSMB9,

*** $p < 0,001$

4.6.2. SAP-Gruppe

In der SAP-Gruppe war eine 24-fach erhöhte Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit ($18,9 \cdot 10^{-2}$; $4,5\text{--}32,9 \cdot 10^{-2}$) im Vergleich zur $\beta 5$ -Untereinheit ($0,8 \cdot 10^{-2}$; $0,4\text{--}2,5 \cdot 10^{-2}$) nachzuweisen ($p < 0,001$). Ferner war mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,001$) die Expression der $\beta 1i$ -Untereinheit ($18,3 \cdot 10^{-2}$; $13,6\text{--}29,1 \cdot 10^{-2}$) 2,2-fach höher als die Expression der $\beta 1$ -Untereinheit ($8,5 \cdot 10^{-2}$; $6,9\text{--}20 \cdot 10^{-2}$). Damit konnte eine erhöhte Expression der induzierbaren Untereinheiten auch in dieser Patientengruppe nachgewiesen werden (Abb. 20).

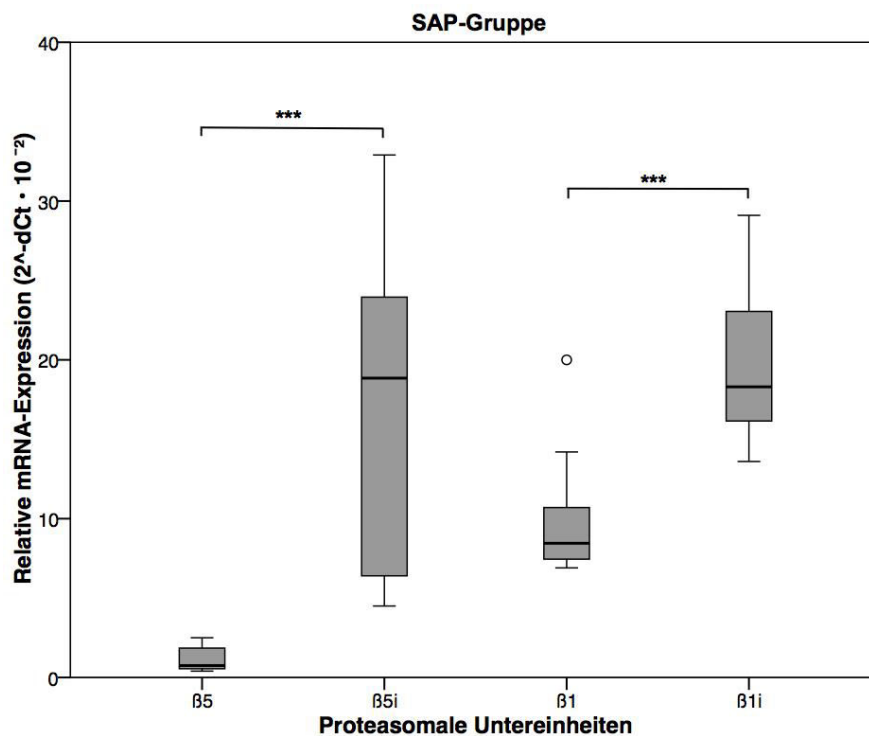


Abbildung 20: Die Relation zwischen der Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms in der SAP-Gruppe. Die relative mRNA-Expression für die untersuchten Untereinheiten ist als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

SAP = stabile Angina pectoris, $\beta 5$ = PSMB5, $\beta 5i$ = PSMB8, $\beta 1$ = PSMB6, $\beta 1i$ = PSMB9, *** $p < 0,001$

4.6.3. GP-Gruppe

Die GP-Gruppe zeigte eine statistisch signifikant 4,6-fach höhere Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit ($5,1 \cdot 10^{-2}$; $3,2-8,8 \cdot 10^{-2}$) im Vergleich zur $\beta 5$ -Untereinheit ($1,1 \cdot 10^{-2}$; $0,7-2,5 \cdot 10^{-2}$), ($p < 0,001$). Ebenfalls war die Expression der $\beta 1i$ -Untereinheit ($13,3 \cdot 10^{-2}$; $9,2-31,1 \cdot 10^{-2}$) statistisch signifikant ($p < 0,001$) und 2,2-fach höher als die Expression der $\beta 1$ -Untereinheit ($6 \cdot 10^{-2}$; $4,2-11,8 \cdot 10^{-2}$). Somit konnte eine erhöhte Expression der induzierbaren Untereinheiten im Vergleich zu den konstitutiven Untereinheiten des Proteasoms auch in der GP-Gruppe nachgewiesen werden (Abb. 21).

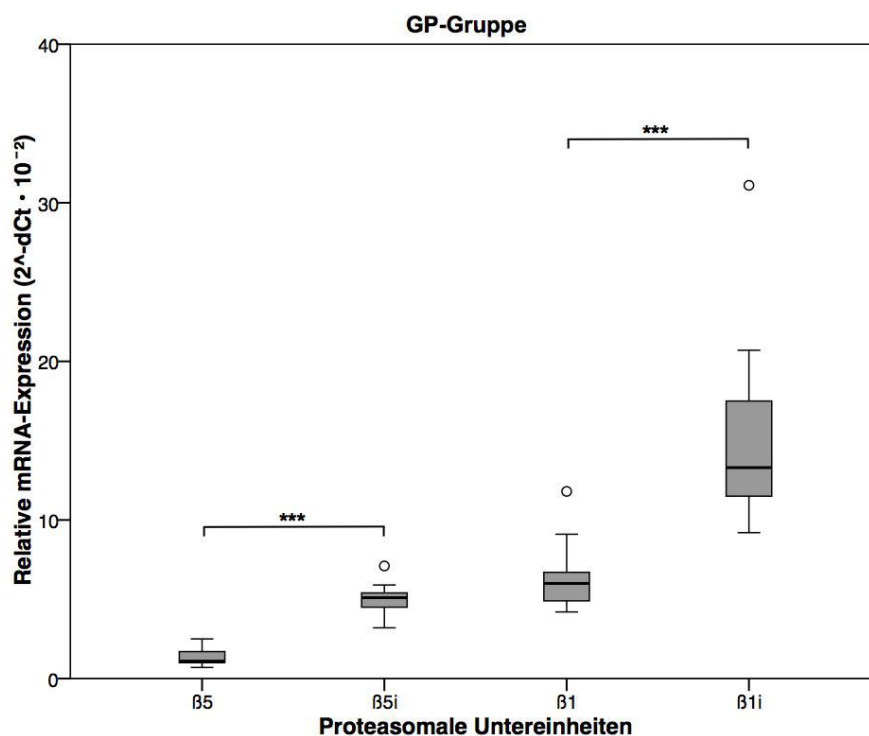


Abbildung 21: Die Relation zwischen der Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms in der GP-Gruppe. Die relative mRNA-Expression ist für die untersuchten Untereinheiten als $2^{-dCt} \cdot 10^2$ dargestellt. Die Ergebnisse sind als Median mit 25/75 Perzentile (Boxen) und Minimum- bis Maximumwert (Whisker) präsentiert.

GP = gesunde Probanden, $\beta 5$ = PSMB5, $\beta 5i$ = PSMB8, $\beta 1$ = PSMB6, $\beta 1i$ = PSMB9, *** $p < 0,001$

4.7. Korrelationen

Da sich in den oben dargestellten Gruppen die Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms statistisch signifikant unterscheiden, wurde die Korrelation zwischen der Expression der beiden Untereinheiten untersucht. Die Ergebnisse sind gruppenweise dargestellt.

4.7.1. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 5$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten in der ACS-Gruppe

Hier zeigte sich eine positive Korrelation zwischen $\beta 5$ und $\beta 5i$ mit einer statistischen Signifikanz ($r = 0,7$; $p = 0,001$), (Abb. 22).

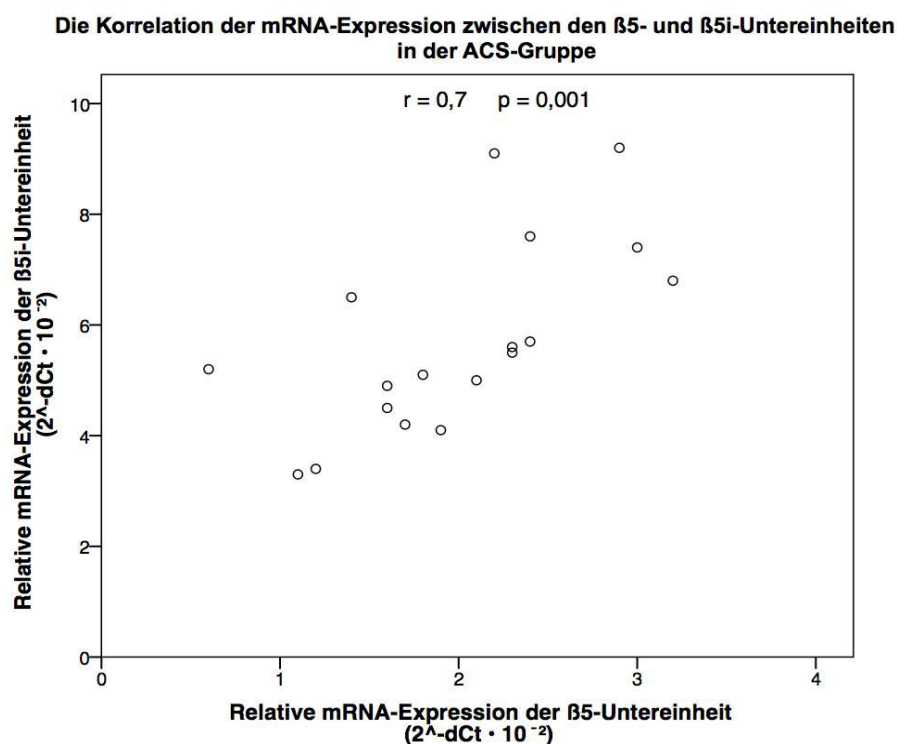


Abbildung 22: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 5$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten in der ACS-Gruppe. Die relative mRNA-Expression ist für die untersuchten Untereinheiten als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt.

ACS = akutes Koronarsyndrom, $\beta 5$ = PSMB5, $\beta 5i$ = PSMB8, r = Korrelationskoeffizient, p = statistische Signifikanz

4.7.2. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 1i$ -Untereinheiten in der ACS-Gruppe

Zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 1i$ -Untereinheiten zeigte sich ebenfalls eine positive Korrelation mit einer statistischen Signifikanz ($r = 0,79$; $p < 0,0001$), (Abb. 23).

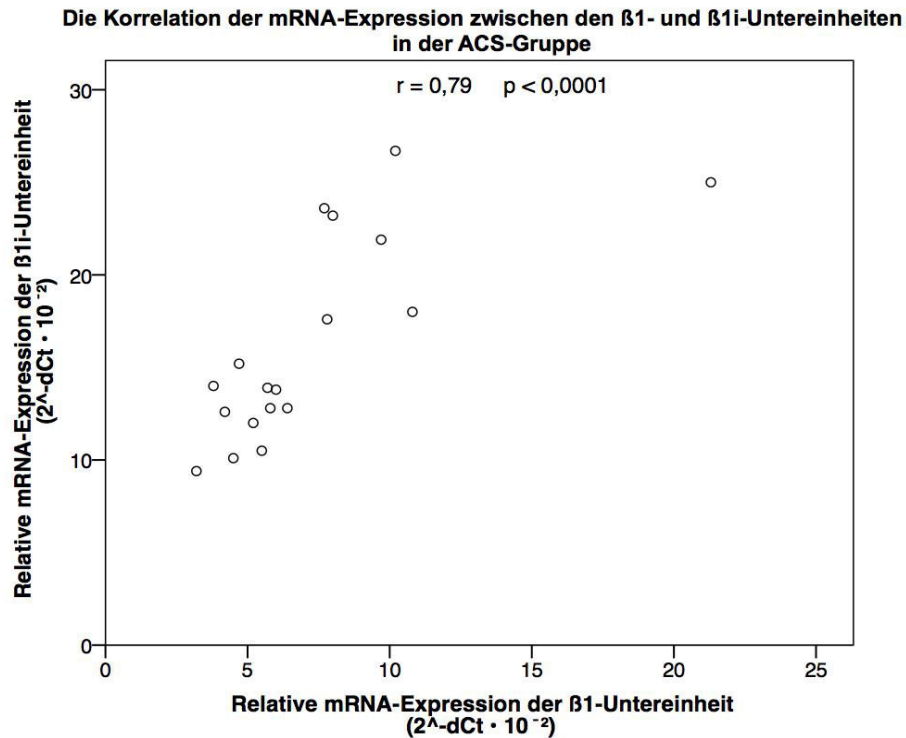


Abbildung 23: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 1i$ -Untereinheiten in der ACS-Gruppe. Die relative mRNA-Expression ist für die untersuchten Untereinheiten als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt.

ACS = akutes Koronarsyndrom, $\beta 1$ = PSMA6, $\beta 1i$ = PSMA9, r = Korrelationskoeffizient, p = statistische Signifikanz

4.7.3. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 5$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten in der SAP-Gruppe

Zwischen den $\beta 5$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten in der SAP-Gruppe zeigte sich eine inverse Korrelation ($r = -0,54$). Dies war statistisch signifikant ($p = 0,03$), (Abb. 24).

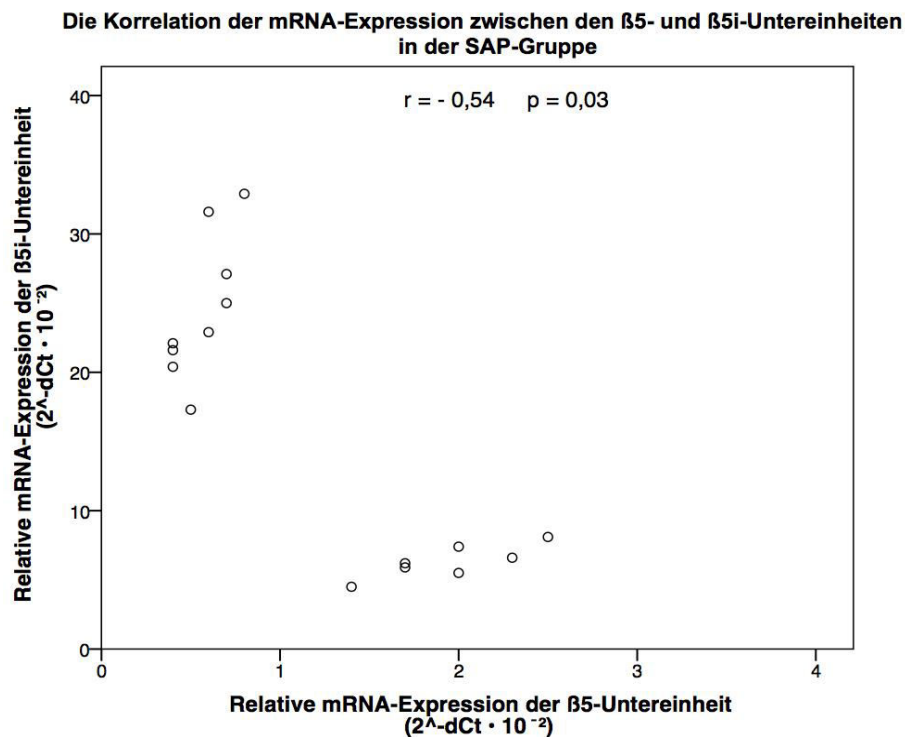


Abbildung 24: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 5$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten in der SAP-Gruppe. Die relative mRNA-Expression ist für die untersuchten Untereinheiten als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt.

SAP = stabile Angina pectoris, $\beta 5$ = PSMB5, $\beta 5i$ = PSMB8, r = Korrelationskoeffizient, p = statistische Signifikanz

4.7.4. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 1i$ -Untereinheiten in der SAP-Gruppe

Hier zeigte sich zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 1i$ -Untereinheiten eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,61 und einer statistischen Signifikanz ($p = 0,012$); (Abb. 25).

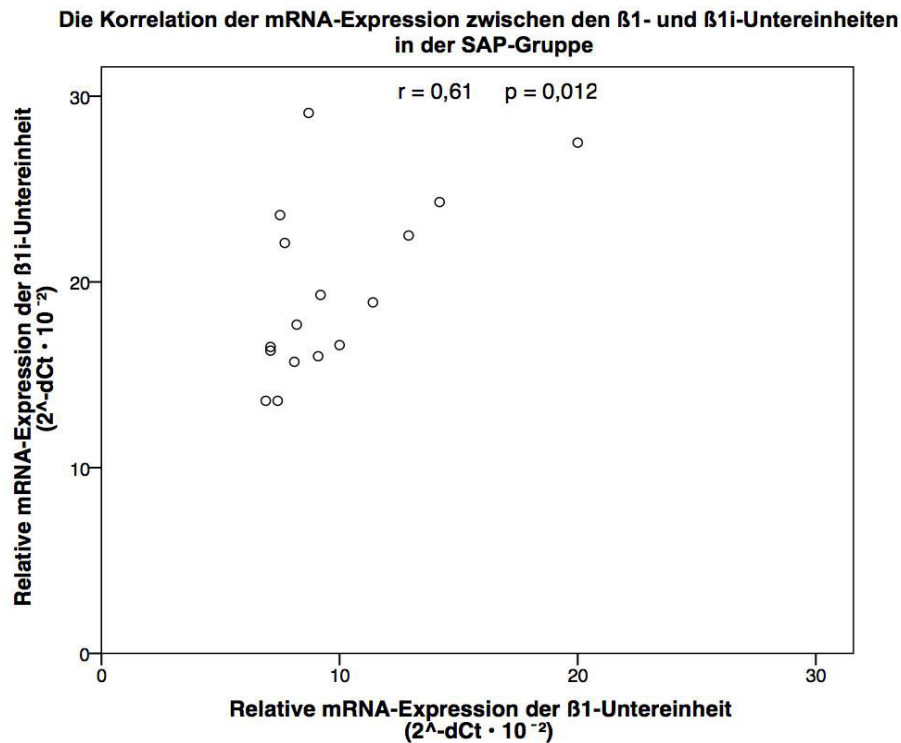


Abbildung 25: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 1i$ -Untereinheiten in der SAP-Gruppe. Die relative mRNA-Expression ist für die untersuchten Untereinheiten als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt.

SAP = stabile Angina pectoris, $\beta 5$ = PSMB5, $\beta 5i$ = PSMB8, r = Korrelationskoeffizient, p = statistische Signifikanz

4.7.5. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 5$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten in der GP-Gruppe

Hier zeigte sich zwischen den $\beta 5$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten eine starke positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,8 und einer statistischen Signifikanz ($p < 0,001$), (Abb. 26).

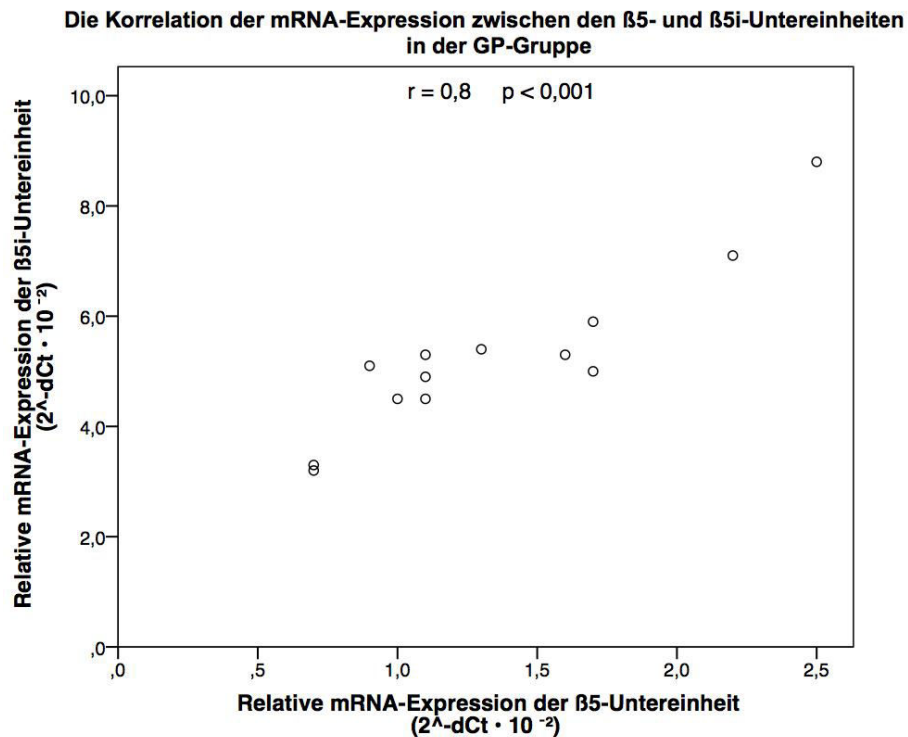


Abbildung 26: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 5$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten in der GP-Gruppe. Die relative mRNA-Expression ist für die untersuchten Untereinheiten als $2^{-dCt} \cdot 10^{-2}$ dargestellt.

GP = gesunde Patienten, $\beta 5$ = PSMB5, $\beta 5i$ = PSMB8, r = Korrelationskoeffizient, p = statistische Signifikanz

4.7.6. Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 1i$ -Untereinheiten in der GP-Gruppe

Zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 1i$ -Untereinheiten konnte ebenfalls eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,76 und einer statistischen Signifikanz ($p = 0,003$) errechnet werden (Abb. 27).

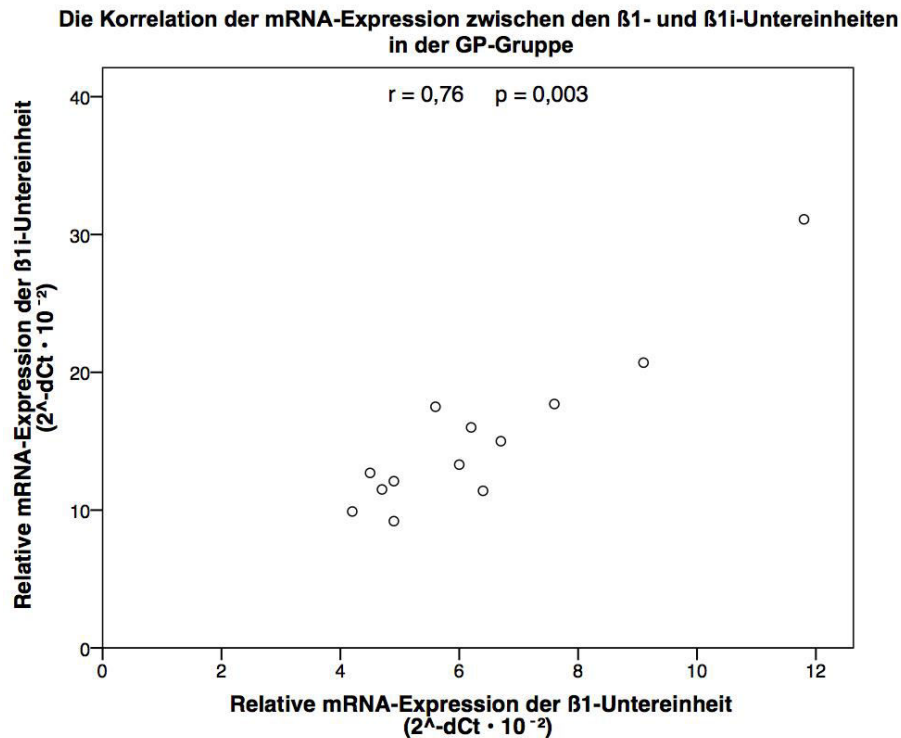


Abbildung 27: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 1i$ -Untereinheiten in der GP-Gruppe. Die relative mRNA-Expression ist für die untersuchten Untereinheiten als $2^{-dCt} \cdot 10^2$ dargestellt.

GP = gesunde Probanden, $\beta 1$ = PSMB6, $\beta 1i$ = PSMB9, r = Korrelationskoeffizient, p = statistische Signifikanz

Außerdem wurde bei den Patientengruppen ACS und SAP die Korrelation zwischen Inflammationsmarkern wie Leukozyten, CRP, Monozyten oder Lymphozyten mit der Expression sowohl von konstitutiven als auch induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms analysiert. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 16 und 17 dargestellt. Es konnte nur in der ACS-Gruppe eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen dem CRP-Wert und der $\beta 5$ -Untereinheit festgestellt werden (Abb. 28).

Inflamations- marker	Statistische Parameter	$\alpha 3$	$\beta 5$	$\beta 5i$	$\beta 1$	$\beta 1i$
CRP	r	0,28	0,46	0,13	0,25	0,2
	p	0,25	0,05	0,61	0,32	0,42
Leukozyten	r	-0,19	0,04	-0,2	-0,11	-0,43
	p	0,44	0,89	0,42	0,67	0,73
Lymphozyten	r	-0,15	-0,2	-0,55	-0,27	-0,14
	p	0,55	0,43	0,83	0,28	0,58
Monozyten	r	0,32	0,3	0,2	0,27	0,23
	p	0,2	0,21	0,42	0,28	0,35

Tabelle 16: Die Korrelation zwischen den Inflammationsmarkern und der Expression der proteasomalen Untereinheiten in der ACS-Gruppe

r = Korrelationskoeffizient, p = statistische Signifikanz, $\alpha 3$ = PSMA3, $\beta 5$ = PSMB5, $\beta 5i$ = PSMB8, $\beta 1$ = PSMB6, $\beta 1i$ = PSMB9

Inflamations- marker	Statistische Parameter	$\alpha 3$	$\beta 5$	$\beta 5i$	$\beta 1$	$\beta 1i$
CRP	r	0,34	-0,37	0,36	0,14	-0,09
	p	0,12	0,16	0,17	0,61	0,73
Leukozyten	r	0,21	0,14	0,08	0,12	0,26
	p	0,44	0,6	0,78	0,64	0,33
Lymphozyten	r	0,03	-0,12	0,04	0,14	-0,05
	p	0,91	0,67	0,9	0,6	0,84
Monozyten	r	-0,29	0,4	-0,22	-0,03	0,09
	p	0,27	0,12	0,41	0,91	0,73

Tabelle 17: Die Korrelation zwischen den Inflammationsmarkern und der Expression der proteasomalen Untereinheiten in der SAP-Gruppe

r = Korrelationskoeffizient, p = statistische Signifikanz, $\alpha 3$ = PSMA3, $\beta 5$ = PSMB5, $\beta 5i$ = PSMB8, $\beta 1$ = PSMB6, $\beta 1i$ = PSMB9

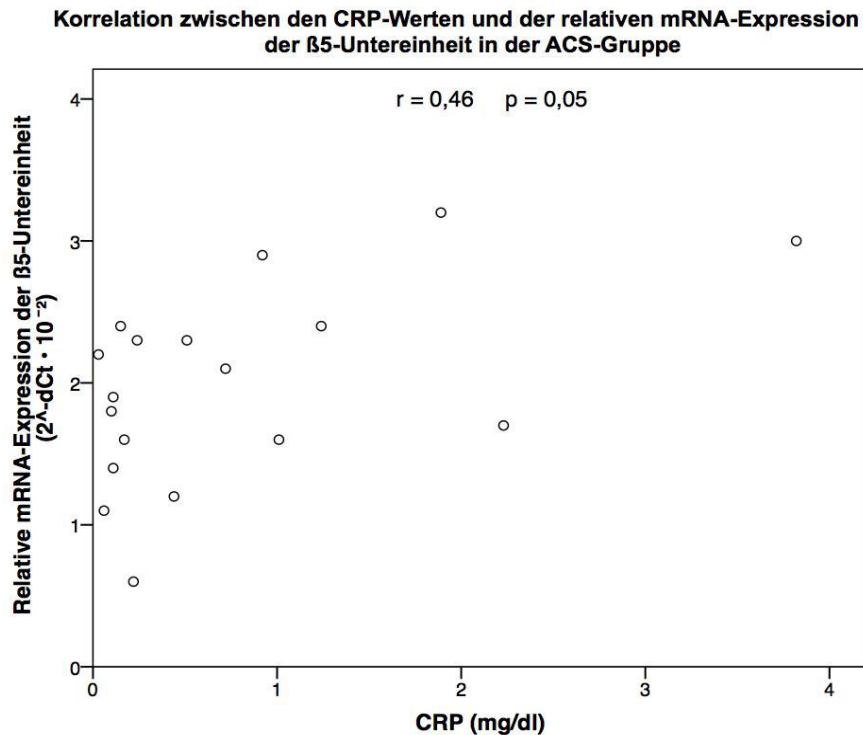


Abbildung 28: Die Korrelation zwischen den CRP-Werten und mRNA-Expression der $\beta 5$ -Untereinheit in der ACS-Gruppe. Die relative mRNA-Expression ist für die untersuchte Untereinheit als $2^{-dCt} \cdot 10^2$ dargestellt.

ACS = akutes Koronarsyndrom, $\beta 5$ = PSMB5, CRP = C-reaktives Protein, r = Korrelationskoeffizient, p = statistische Signifikanz

4.8. Subgruppenanalyse der ACS-Gruppe

In der Subgruppenanalyse der ACS-Gruppe konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede bzgl. der Expression proteasomaler Untereinheiten zwischen Patienten mit STEMI und NSTEMI nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine veränderte Expression proteasomaler Untereinheiten in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (ACS) und stabiler KHK vorliegt. Außerdem sollte überprüft werden, ob kardiovaskuläre Risikofaktoren und das Patientenalter eine veränderte Expression proteasomaler Untereinheiten bedingen.

Die größte Herausforderung dieser Studie war es, bei Patienten in der akuten klinischen Situation des ACS Erkenntnisse über die Expressionmuster proteasomaler Untereinheiten zu gewinnen. Der einzige ethisch gangbare und logistisch mögliche Weg, Untereinheiten des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) in für die Fragestellung relevanten Zellen zu untersuchen, war die Verwendung von PBMCs und die Analyse von UPS-Untereinheiten in diesem Zelltyp.

Bis dato gibt es keine Humanstudien, die in einem klinischen Setting des ACS und stabiler KHK die Expression proteasomaler Untereinheiten in den PBMCs untersucht haben. Hingegen gibt es aus tierexperimentellen Modellen Daten zu einem kardialen Zelltyp – den Kardiomyozyten – unter den experimentellen Bedingungen der Hypoxie oder Anoxie durch Induktion von Stenosen oder kompletter Gefäßokklusion. In den unten zu besprechenden Studien wurde die Expression des Proteasomsystems in Kardiomyozyten in Gewebeproben untersucht. Im Vergleich zu unserer humanen Studiensituation ist der entscheidende Unterschied, dass die Kardiomyozyten im Gegensatz zu den Monozyten des peripheren Blutes bei Stenosierung oder Okklusion eines Koronargefäßes einer Hypoxie/Anoxie ausgesetzt sind. Somit kann die Expression proteasomaler Untereinheiten in hypoxischen Kardiomyozyten sehr wohl anders als in den PBMCs sein und es kann keinesfalls eine Gleichsinnigkeit der Expressionsmuster von den PBMCs und Kardiomyozyten unterstellt werden.

Obwohl aus erwähnten Überlegungen nicht von den Expressionsmustern der Monozyten des peripheren Blutes auf die von Kardiomyozyten rückgeschlossen werden kann, konnten in unserer Studie in den PBMCs bei einigen proteasomalen Untereinheiten gleiche Tendenzen der Expression wie in den Kardiomyozyten unter Hypoxiebedingungen im Tiermodell beobachtet werden. Dies wird in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

5.1. ACS-Gruppe

Ein wichtiges Ergebnis unserer Studie ist, dass in der ACS-Gruppe eine höhere Expression der β 5-Untereinheit in den PBMCs im Vergleich zur AK-Gruppe und auch im Vergleich zur SAP-Gruppe bestand. Außerdem zeigte sich in der Analyse zwischen Inflammationsmarkern und der Expression proteasomaler Untereinheiten eine signifikante Korrelation zwischen CRP und der Expression der β 5-Untereinheit. Diese Korrelation gibt Hinweise darauf, dass proinflammatorische Marker und Mediatoren möglicherweise eine Hochregulation von β 5-Untereinheiten bedingen.

Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass bei akutem Koronarsyndrom die β 5-Untereinheit inflammationsbedingt als einzige konstitutive Untereinheit in den PBMCs vermehrt exprimiert wird.

Im Mausmodell wurde Epoxomicin – ein spezifischer Inhibitor der β 5-Untereinheit – und seine Effekte in Kardiomyozyten während eines akuten Myokardinfarkts untersucht [69]. Epoxomicin bewirkte eine partielle Reversibilität des kardialen Remodellings und verbesserte die Kontraktilität des linken Ventrikels. Diese Effekte wurden dadurch erklärt, dass Epoxomicin eine Suppression der NF- κ B-Aktivität bewirkt. Die proteasomale Aktivität wurde hier aus extrahierten Gewebeproben untersucht.

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass im akuten Myokardinfarkt die β 5-Untereinheit in den Kardiomyozyten vermehrt exprimiert wird und über sie möglicherweise schädliche Effekte wie negative Inotropie sowie die Suppression des frühen myokardialen Remodellings nach Infarkt mediiert werden. Wie oben erwähnt, konnte hier zwischen diesen Daten und unseren Ergebnissen eine gleichgerichtete Tendenz ohne kausalen Zusammenhang beobachtet werden.

Als weiterer Befund unserer Studie konnten wir zeigen, dass in der ACS-Gruppe die Expression der β 5i-Untereinheit in den PBMCs niedriger als in den AK- und SAP-Gruppen war. Eine erniedrigte Expression fand sich auch für die β 1i-Untereinheit – allerdings nur im Vergleich zur SAP-Gruppe.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei akutem Koronarsyndrom in den PBMCs induzierbare Untereinheiten – insbesondere β 5i-Untereinheiten – niedriger exprimiert werden.

Tierexperimentell konnte eine geringere Expression induzierbarer Untereinheiten in Kardiomyozyten im Infarkt erstmals von Bulteau et al. im Rattenmodell gezeigt werden [6]. In Kardiomyozyten fanden sie eine Abnahme der *chymotrypsin-, caspase- und trypsin-like* proteolytischen Aktivitäten nach 30 minütiger Okklusion des Ramus interventricularis anterior (RIVA) und somit eine verringerte Expression der induzierbaren Untereinheiten $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$. Diese Befunde wurden von den Autoren durch eine erhöhte Suszeptibilität dieser Untereinheiten gegen oxidativen Stress erklärt. Als mögliche Mechanismen für die niedrigere Expression induzierbarer Untereinheiten des Proteasoms während einer Ischämie werden diskutiert: ATP-Depletion, direkte Inhibition der proteasomalen Untereinheiten durch Proteinaggregate und Oxidation sowie posttranslationale Modifikation proteasomaler Untereinheiten [41].

Eine ATP-Depletion als Erklärung für die Abnahme der proteolytischen Aktivitäten wird durch die Beobachtung gestützt, dass ATP für die UPS-Aktivierung sowie für die Konversion von konstitutiven Untereinheiten in induzierbare Untereinheiten des Proteasoms gebraucht wird, jedoch bei myokardialer Ischämie nicht ausreichend nachgebildet werden kann [70]. Die Tatsache, dass die Myokardzellen bei akutem Koronarsyndrom einer Hypoxie ausgesetzt sind, legt die Vermutung nahe, dass die ATP-Nachbildung in den Zellen des Myokards geringer als in den PBMCs – ohne Hypoxie – ist. Als Resultat könnte die Expression der induzierbaren Untereinheiten des UPS in Kardiomyozyten noch niedriger als in den PBMCs sein. Außerdem wird vermutet, dass während einer myokardialen Ischämie Proteine oxidiert und modifiziert werden, akkumulieren und dann vom UPS nur unzureichend degradiert werden können [71, 72]. Darüber hinaus wird die Oxidation von proteasomalen Untereinheiten und die damit bedingte Strukturänderung als mögliche Ursache für die niedrigere Expression der Untereinheiten diskutiert [73, 74]. In diesem Zusammenhang konnte tierexperimentell eine verminderte Aktivität sowohl des 20S- als auch des 26S-Proteasoms bei vermehrtem Anfall ubiquitiniertes Proteine im Myokard gezeigt werden [64].

Wir sahen in unserer Studie in den Monozyten eine Tendenz zur verminderten Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit in der ACS-Gruppe im Vergleich zur AK-Gruppe. Jedoch war in der ACS-Gruppe die $\alpha 3$ -Untereinheit niedriger als in der SAP-Gruppe exprimiert.

Bulteau et al. konnten im Rattenmodell in Kardiomyozyten nur für die $\alpha 3$ -Untereinheit eine Inaktivierung bei akutem Myokardinfarkt nachweisen [6]. Des Weiteren wurde von den Autoren

gezeigt, dass mit Ausnahme der α 3-Untereinheit die α 1– α 7 Untereinheiten gegen die Exposition von Oxidantien, z.B. 4-Hydroxynonenal, weitgehend geschützt sind.

In drei europäischen genombasierten Humanstudien wurde der Zusammenhang zwischen einem Myokardinfarkt und der Expression der α 6-Untereinheit untersucht [75-77]. Im Ergebnis fand sich keine veränderte Expression der α 6-Untereinheit bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt.

Im Gegensatz dazu fanden ebenfalls zwei ähnliche Humanstudien aus Asien einen Zusammenhang zwischen der veränderten Expression der α 6-Untereinheit und dem Infarktereignis [78, 79].

In der Zusammenschau bisher publizierten Studien zur Expression der α -Untereinheiten bei akutem Myokardinfarkt sind die Ergebnisse nicht konsistent. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Expression der α -Untereinheit vielleicht rassenspezifisch ist [80]. Dies würde die unterschiedlichen Ergebnisse der asiatischen Studien und der europäischen Studien erklären.

5.2. SAP-Gruppe

In der SAP-Gruppe waren in den PBMCs im Vergleich zur AK-Gruppe die α 3-Untereinheit, die konstitutive Untereinheit β 1 und im Vergleich zur ACS-Gruppe die induzierbaren Untereinheiten β 5i und β 1i höher exprimiert.

Auch bei stabiler KHK gibt es derzeit in der Literatur keine humanen Daten zu UPS-Expressionsmustern. Daten im Menschen – gemessen in PBMCs – gibt es jedoch für zwei andere chronisch inflammatorische Krankheitsentitäten. Da beide analog zur stabilen KHK einen chronisch inflammatorischen Zustand darstellen und die Expression proteasomaler Untereinheiten ebenfalls in den PBMCs gemessen wurde, sind diese Studien hier präsentiert.

Im Jahr 2006 konnten Krause et al. zeigen, dass beim Sjögren-Syndrom eine erhöhte Expression der β 1i- und β 2i-Untereinheiten in den PBMCs im Vergleich zu gesunden Probanden vorliegt [81].

In einer weiteren Studie sahen Coppo et al. bei Patienten mit IgA-Nephropathie in den PBMCs eine erhöhte Expression der $\beta 2i$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten im Vergleich zu gesunden Probanden [82]. Die Autoren fanden ein unterschiedliches Expressionsmuster der induzierbaren Untereinheiten im Vergleich zu Patienten mit akuten gastrointestinalen und pulmonalen Infektionen. Bei IgA-Nephropathie war $\beta 2i$ supprimiert, $\beta 1i$ jedoch hochreguliert.

Die Autoren berichten von einem Ersatz konstitutiver Untereinheiten durch induzierbare Untereinheiten bei systemischer Inflammation. Wie vorhin erwähnt, sind das Sjögren-Syndrom sowie die IgA-Nephropathie zwei Krankheitsentitäten, die analog zur stabilen KHK eine subakute oder chronische Entzündungsreaktion des Organismus aufweisen. Bei beiden Erkrankungen wurde eine erhöhte Expression induzierbarer Untereinheiten des Proteasoms in den PBMCs wie bei stabiler KHK in unserer Studie nachgewiesen.

Die vermehrte Expression induzierbarer Untereinheiten in der SAP-Gruppe könnte, wie bereits im Abschnitt 5.1. ausgeführt, wie folgt erklärt werden. Da vermutet werden kann, dass bei stabiler KHK inflammatorische Vorgänge weniger intensiv als im ACS ablaufen, könnte der ATP-Verbrauch geringer sein. Bei stabiler KHK besteht in der Regel ein besseres Sauerstoffangebot an den Kardiomyozyten im Vergleich zur Situation im ACS, somit kann folglich mehr ATP nachgebildet werden. Dadurch könnten die induzierbaren Untereinheiten vermehrt exprimiert werden. Ebenso ist die direkte Proteinaggregation vermutlich bei stabiler KHK geringer als im ACS. Ferner kann vermutet werden, dass die Oxidation proteasomaler Untereinheiten in stabiler KHK geringer ausgeprägt als im ACS ist. Mutmaßlich ist bei geringer Akkumulation von Proteinaggregaten und reduzierter Oxidation proteasomaler Untereinheiten eine geringere Abnahme der proteolytischen Aktivitäten zu erwarten.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass bei chronischer bzw. subakuter Inflammation wie bei stabiler KHK die induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms vermehrt exprimiert werden und damit eine Veränderung des Expressionsmusters im Vergleich zur akuten Inflammation vorliegt.

Von allen Untereinheiten in dieser Gruppe wies nur die $\beta 5$ -Untereinheit eine niedrigere Expression im Vergleich zur ACS-Gruppe auf. Die Unterschiede in der Höhe der CRP-Werte und der Leukozytenzahl zwischen den ACS- und SAP-Gruppe könnten als Hinweise auf eine unterschiedliche Intensität inflammatorischer Vorgänge in beiden Gruppen interpretiert werden.

Die niedrigere Expression der $\beta 5$ -Untereinheit in der SAP-Gruppe im Vergleich zur ACS-Gruppe stützt die Hypothese, dass diese Untereinheit inflammationsbedingt exprimiert wird. Es wurde bereits gezeigt, dass eine geringere Expression der $\beta 5$ -Untereinheit mit einer verbesserten kardialen Funktion assoziiert ist [69].

5.3. AK- und GP-Gruppen

Im Gegensatz zu den ACS- und SAP-Gruppen haben die beiden Kontrollgruppen AK und GP keine stenosierende Arteriosklerose oder sogar morphologisch unauffällige Koronarien. Sie unterscheiden sich aber hinsichtlich des Alters und des kardiovaskulären Risikoprofils.

Wir fanden in der AK-Gruppe im Vergleich zur GP-Gruppe in den PBMCs eine vermehrte Expression der $\alpha 3$ - und $\beta 5i$ -Untereinheiten. In einer multivariaten Analyse erwiesen sich die Risikofaktoren Hypertonie und Hyperlipoproteinämie als alleinige Determinanten dieses Unterschiedes. Alter zeigte eine nicht signifikante Tendenz zur Korrelation.

Zusammenhänge zwischen UPS und kardiovaskulären Risikofaktoren sind bisher wenig untersucht worden. Lediglich bei Kindern bis zum Alter von 17 Jahren wurde zwischen der Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit und kardiovaskulären Risikofaktoren – hier Hyperlipoproteinämie und einer positiven Familienanamnese für Adipositas – ein Zusammenhang beschrieben [83]. Hierbei wurde ähnlich wie in unserer Studie die Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit des Proteasoms in Zellen des peripheren Blutes bestimmt.

In einer Studie von Li et al. wurde die proteasomale Expression in Abhängigkeit vom Alter im Mausmodell untersucht. Es wurde eine Zunahme der Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit, des 26S-Proteasoms und der α -Untereinheiten mit zunehmendem Alter sowie eine erniedrigte Expression der konstitutiven β -Untereinheiten des 20S-Proteasoms gezeigt [84]. Allenfalls erfolgte hier die Messung der Expression der o.g. Untereinheiten im Vergleich zu unserer Messung in Kardiomyozyten.

Die Autoren formulieren die Hypothese, dass im Mausmodell im höheren Lebensalter in Kardiomyozyten die durch das 26S-Proteasom induzierte, ubiquitin-abhängige Proteolyse unverändert weiterläuft, während die durch das 20S-Proteasom induzierte, nicht ubiquitin-abhängige Proteolyse abnimmt. In diesem Zusammenhang kann postuliert

werden, dass in Kardiomyozyten im höheren Lebensalter aufgrund von Substraten des 26S-Proteasomes, beispielsweise Transkriptionsfaktoren, eine vermehrte Expression der $\beta 5i$ -Untereinheiten gewährleistet wird.

Ferner konnte in einer Einzelbeobachtung eines Probanden, der sich einer Interferontherapie bei akuter Hepatitis-B-Infektion untertragen hatte, eine deutlich erhöhte Expression der induzierbaren Untereinheiten gezeigt werden.

In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf eine durch $\text{INF-}\gamma$ hochregulierte Expression der induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms beim Menschen. Erstmals konnten im Jahr 1994 Akiyama et al. nachweisen, dass induzierbare Untereinheiten des Proteasoms – insbesondere $\beta 5i$ -Untereinheiten – in menschlichen Nierenzellen durch $\text{INF-}\gamma$ hochreguliert werden [85]. Später konnten Coppo et al. durch $\text{INF-}\gamma$ einen Ersatz konstitutiver Untereinheiten durch induzierbare Untereinheiten in mononukleären Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit IgA-Nephropathie beobachten [82].

5.4. Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, das Verhältnis der Expression der proteasomalen Untereinheiten zu einander zu untersuchen.

In der Korrelationsanalyse zeigte sich in der ACS-Gruppe eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der Expression konstitutiver und induzierbarer Untereinheiten. Diese Beobachtung traf jeweils für die beiden untersuchten konstitutiven Untereinheiten ($\beta 5/\beta 1$) und der korrespondierenden induzierbaren Untereinheiten ($\beta 5i/\beta 1i$) zu. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom kann das bedeuten, dass gleichsinnig konstitutive und induzierbare Untereinheiten gebildet werden.

Im Gegensatz dazu fanden wir in der SAP-Gruppe nur zwischen den $\beta 1$ - und $\beta 1i$ -Untereinheiten eine positive Korrelation. $\beta 5$ - und $\beta 5i$ -Expression waren invers korreliert.

In der GP-Gruppe zeigte sich für die untersuchten konstitutiven und die korrespondierenden induzierbaren Untereinheiten eine positive Korrelation.

5.5. Studienlimitationen

Da diese Studie als Pilotstudie konzipiert war, wurde mit 61 Patienten nur eine vergleichsweise geringe Patientenzahl betrachtet.

Weiterhin bestand eine gewisse Inhomogenität in der Gruppe mit akutem Koronarsyndrom. In unsere Studie wurden 5 Patienten mit STEMI und 13 Patienten mit der Diagnose eines NSTEMI eingeschlossen.

Außerdem wurden nur männliche Patienten in die ACS-Gruppe eingeschlossen, so dass die gefundenen Ergebnisse nicht zwangsläufig auf Frauen übertragen werden können.

Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass die Expression der proteasomalen Untereinheiten nur auf der Transkriptionsebene und nicht auf der Proteinebene untersucht wurde.

5.6. Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Vergleich zu Patienten mit invasivem Ausschluss einer koronaren Herzerkrankung eine statistisch signifikante erhöhte Expression der $\beta 5$ -Untereinheiten und eine erniedrigte Expression der $\beta 5i$ -Untereinheiten in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes auf der Transkriptionsebene nachgewiesen werden.

6. Verzeichnisse

6.1. Literaturverzeichnis

1. Cardiovascular diseases. January 2015. Fact sheet N°317, World Health Organization, (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>)
2. Depre, C., S.R. Powell, and X. Wang, The role of the ubiquitin-proteasome pathway in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 2010. 85(2): p. 251-2.
3. Zwickl, P., et al., Primary structure of the Thermoplasma proteasome and its implications for the structure, function, and evolution of the multicatalytic proteinase. *Biochemistry*, 1992. 31(4): p. 964-72.
4. Powell, S.R., The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006. 291(1): p. H1-H19.
5. Predmore, J.M., et al., Ubiquitin proteasome dysfunction in human hypertrophic and dilated cardiomyopathies. *Circulation*, 2010. 121(8): p. 997-1004.
6. Bulteau, A.L., et al., Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion. *J Biol Chem*, 2001. 276(32): p. 30057-63.
7. Todesursachen. 2012. 12(4), Statistisches Bundesamt, (<https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400127004.pdf>)
8. Cardiovascular diseases. March 2013. Fact sheet N°317, World Health Organization, (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>)
9. Davies, M.J., Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*, 1996. 94(8): p. 2013-20.
10. Thygesen, K., et al., Third universal definition of myocardial infarction. *Glob Heart*, 2012. 7(4): p. 275-95.
11. Task Force, M., et al., 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for

- the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 2015.
12. Yeh, R.W., et al., Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2010. 362(23): p. 2155-65.
 13. Mandelzweig, L., et al., The second Euro Heart Survey on acute coronary syndromes: Characteristics, treatment, and outcome of patients with ACS in Europe and the Mediterranean Basin in 2004. *Eur Heart J*, 2006. 27(19): p. 2285-93.
 14. Hamm, C.W., et al., ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, 2011. 32(23): p. 2999-3054.
 15. Campeau, L., Letter: Grading of angina pectoris. *Circulation*, 1976. 54(3): p. 522-3.
 16. Task Force, M., et al., 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*, 2013. 34(38): p. 2949-3003.
 17. Newby, A.C., An overview of the vascular response to injury: a tribute to the late Russell Ross. *Toxicol Lett*, 2000. 112-113: p. 519-29.
 18. Badimon, L., R.F. Storey, and G. Vilahur, Update on lipids, inflammation and atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 2011. 105 Suppl 1: p. S34-42.
 19. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980. 288(5789): p. 373-6.
 20. Singhal, A.K., et al., Role of Endothelial Cells in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Vasc Dis Prev*, 2010. 7: p. 1-14.
 21. Stary, H.C., et al., A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*, 1994. 14(5): p. 840-56.

22. Swirski, F.K., et al., Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytoysis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*, 2007. 117(1): p. 195-205.
23. Arnold, L., et al., Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med*, 2007. 204(5): p. 1057-69.
24. Mestas, J. and K. Ley, Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 2008. 18(6): p. 228-32.
25. Koenen, R.R., et al., Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nat Med*, 2009. 15(1): p. 97-103.
26. Peiser, L., S. Mukhopadhyay, and S. Gordon, Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 2002. 14(1): p. 123-8.
27. Stemme, S., et al., T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(9): p. 3893-7.
28. Hansson, G.K., Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. 21(12): p. 1876-90.
29. Szabo, S.J., et al., Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol*, 2003. 21: p. 713-58.
30. Fernandez-Ortiz, A., et al., Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*, 1994. 23(7): p. 1562-9.
31. Amento, E.P., et al., Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*, 1991. 11(5): p. 1223-30.
32. Hansson, G.K., Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 2005. 352(16): p. 1685-95.

33. Jones, C.B., D.C. Sane, and D.M. Herrington, Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. *Cardiovasc Res*, 2003. 59(4): p. 812-23.
34. Liu, J., et al., Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(8): p. 1359-66.
35. Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993. 362(6423): p. 801-9.
36. Moore, K.J. and I. Tabas, Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 2011. 145(3): p. 341-55.
37. Hershko, A., A. Ciechanover, and I.A. Rose, Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(7): p. 3107-10.
38. The Nobel Prize in Chemistry 2004. 2004; nobelprize.org, (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2004/)
39. Hershko, A., Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. 9(6): p. 788-99.
40. Herrmann, J., L.O. Lerman, and A. Lerman, On to the road to degradation: atherosclerosis and the proteasome. *Cardiovasc Res*, 2010. 85(2): p. 291-302.
41. Powell, S.R. and A. Divald, The ubiquitin-proteasome system in myocardial ischaemia and preconditioning. *Cardiovasc Res*, 2010. 85(2): p. 303-11.
42. Hershko, A., A. Ciechanover, and A. Varshavsky, Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med*, 2000. 6(10): p. 1073-81.
43. Orłowski, M. and S. Wilk, Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys*, 2000. 383(1): p. 1-16.
44. DeMartino, G.N., Purification of PA700, the 19S regulatory complex of the 26S proteasome. *Methods Enzymol*, 2005. 398: p. 295-306.

45. Yoshimura, T., et al., Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol*, 1993. 111(3): p. 200-11.
46. Tanaka, K., et al., A high molecular weight protease in the cytosol of rat liver. I. Purification, enzymological properties, and tissue distribution. *J Biol Chem*, 1986. 261(32): p. 15197-203.
47. Glickman, M.H., et al., A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, 1998. 94(5): p. 615-23.
48. Lowe, J., et al., Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, 1995. 268(5210): p. 533-9.
49. Groll, M., et al., Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 1997. 386(6624): p. 463-71.
50. Orłowski, M., The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry*, 1990. 29(45): p. 10289-97.
51. Brannigan, J.A., et al., A protein catalytic framework with an N-terminal nucleophile is capable of self-activation. *Nature*, 1995. 378(6555): p. 416-9.
52. Seemuller, E., et al., Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*, 1995. 268(5210): p. 579-82.
53. Seemuller, E., et al., The proteasome from *Thermoplasma acidophilum* is neither a cysteine nor a serine protease. *FEBS Lett*, 1995. 359(2-3): p. 173-8.
54. Calise, J. and S.R. Powell, The ubiquitin proteasome system and myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013. 304(3): p. H337-49.
55. Gomes, A.V., et al., Mapping the murine cardiac 26S proteasome complexes. *Circ Res*, 2006. 99(4): p. 362-71.
56. Gomes, A.V., et al., Contrasting proteome biology and functional heterogeneity of the 20 S proteasome complexes in mammalian tissues. *Mol Cell Proteomics*, 2009. 8(2): p. 302-15.

57. Monaco, C., et al., Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(15): p. 5634-9.
58. Goldberg, A.L., Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 2003. 426(6968): p. 895-9.
59. Kikuchi, J., et al., Induction of ubiquitin-conjugating enzyme by aggregated low density lipoprotein in human macrophages and its implications for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. 20(1): p. 128-34.
60. Masuda, Y., et al., ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells. *J Lipid Res*, 2006. 47(1): p. 87-98.
61. Faries, P.L., et al., Relationship of the 20S proteasome and the proteasome activator PA28 to atherosclerosis and intimal hyperplasia in the human vascular system. *Ann Vasc Surg*, 2001. 15(6): p. 628-33.
62. Herrmann, J., et al., Increased ubiquitin immunoreactivity in unstable atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 2002. 40(11): p. 1919-27.
63. Marfella, R., et al., Increased activity of the ubiquitin-proteasome system in patients with symptomatic carotid disease is associated with enhanced inflammation and may destabilize the atherosclerotic plaque: effects of rosiglitazone treatment. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 47(12): p. 2444-55.
64. Powell, S.R., et al., Oxidized and ubiquitinated proteins may predict recovery of postischemic cardiac function: essential role of the proteasome. *Antioxid Redox Signal*, 2005. 7(5-6): p. 538-46.
65. Asai, M., et al., PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in in vivo canine hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. 46(4): p. 452-62.
66. Osna, N.A., et al., Peroxynitrite alters the catalytic activity of rodent liver proteasome in vitro and in vivo. *Hepatology*, 2004. 40(3): p. 574-82.

67. Reinheckel, T., et al., Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem J*, 1998. 335 (Pt 3): p. 637-42.
68. Das, S., et al., Cardioprotection with palm tocotrienol: antioxidant activity of tocotrienol is linked with its ability to stabilize proteasomes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(1): p. H361-7.
69. Hedhli, N., et al., Proteasome activation during cardiac hypertrophy by the chaperone H11 Kinase/Hsp22. *Cardiovasc Res*, 2008. 77(3): p. 497-505.
70. Jennings, R.B. and C. Steenbergen, Jr., Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. *Annu Rev Physiol*, 1985. 47: p. 727-49.
71. Divald, A. and S.R. Powell, Proteasome mediates removal of proteins oxidized during myocardial ischemia. *Free Radic Biol Med*, 2006. 40(1): p. 156-64.
72. Sarikas, A., et al., Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovasc Res*, 2005. 66(1): p. 33-44.
73. Davies, K.J., S.W. Lin, and R.E. Pacifici, Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J Biol Chem*, 1987. 262(20): p. 9914-20.
74. Davies, K.J., M.E. Delsignore, and S.W. Lin, Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J Biol Chem*, 1987. 262(20): p. 9902-7.
75. Takashima, N., et al., Validation of the association between the gene encoding proteasome subunit alpha type 6 and myocardial infarction in a Japanese population. *Circ J*, 2007. 71(4): p. 495-8.
76. Sjakste, T., et al., SNPs of PSMA6 gene--investigation of possible association with myocardial infarction and type 2 diabetes mellitus. *Genetika*, 2007. 43(4): p. 553-9.
77. Barbieri, M., et al., The -8 UTR C/G polymorphism of PSMA6 gene is associated with susceptibility to myocardial infarction in type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis*, 2008. 201(1): p. 117-23.
78. Ozaki, K., et al., A functional SNP in PSMA6 confers risk of myocardial infarction in the Japanese population. *Nat Genet*, 2006. 38(8): p. 921-5.

79. Liu, X., et al., The functional variant rs1048990 in PSMA6 is associated with susceptibility to myocardial infarction in a Chinese population. *Atherosclerosis*, 2009. 206(1): p. 199-203.
80. Sjakste, T., et al., PSMA6 (rs2277460, rs1048990), PSMC6 (rs2295826, rs2295827) and PSMA3 (rs2348071) genetic diversity in Latvians, Lithuanians and Taiwanese. *Meta Gene*, 2014. 2: p. 283-98.
81. Krause, S., et al., Immunoproteasome subunit LMP2 expression is deregulated in Sjogren's syndrome but not in other autoimmune disorders. *Ann Rheum Dis*, 2006. 65(8): p. 1021-7.
82. Coppo, R., et al., Upregulation of the immunoproteasome in peripheral blood mononuclear cells of patients with IgA nephropathy. *Kidney Int*, 2009. 75(5): p. 536-41.
83. Kupca, S., et al., Association of obesity with proteasomal gene polymorphisms in children. *J Obes*, 2013. 2013: p. 638154.
84. Li, F., et al., Aging and dietary restriction effects on ubiquitination, sumoylation, and the proteasome in the heart. *Mech Ageing Dev*, 2008. 129(9): p. 515-21.
85. Aki, M., et al., Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem*, 1994. 115(2): p. 257-69.

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: T-Lymphozyten-Aktivierung und Plaqueinflammation.....	11
Abbildung 2: Entstehung einer vulnerablen Plaque sowie Thrombusformation.....	12
Abbildung 3: Ubiquitinierung	13
Abbildung 4: Struktur des 26S-Proteasoms	15
Abbildung 5: Zusammensetzung der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms	16
Abbildung 6: Die relative mRNA-Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit.....	33
Abbildung 7: Die relative mRNA-Expression der $\beta 5$ -Untereinheit.....	34
Abbildung 8: Die relative mRNA-Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit.....	35
Abbildung 9: Die relative mRNA-Expression der $\beta 1$ -Untereinheit.....	36
Abbildung 10: Die relative mRNA-Expression der $\beta 1i$ -Untereinheit.....	37
Abbildung 11: Die relative mRNA-Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit in den AK- und GP-Gruppen	38
Abbildung 12: Die relative mRNA-Expression der $\beta 5$ -Untereinheit in den AK- und GP-Gruppen	39
Abbildung 13: Die relative mRNA-Expression der $\beta 5i$ -Untereinheit in den AK- und GP-Gruppen	40
Abbildung 14: Die relative mRNA-Expression der $\beta 1$ -Untereinheit in den AK- und GP-Gruppen	41
Abbildung 15: Die relative mRNA-Expression der $\beta 1i$ -Untereinheit ist in den AK- und GP-Gruppen	42
Abbildung 16: Die relative mRNA-Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit in Abhängigkeit von der arteriellen Hypertonie.....	43
Abbildung 17: Die relative mRNA-Expression der $\alpha 3$ -Untereinheit in Abhängigkeit von Hyperlipoproteinämie.....	44
Abbildung 18: Die relative mRNA-Expression der proteasomalen Untereinheiten in Abhängigkeit von Interferontherapie	45
Abbildung 19: Die Relation zwischen der Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms in der ACS-Gruppe.....	46

Abbildung 20: Die Relation zwischen der Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms in der SAP-Gruppe	47
Abbildung 21: Die Relation zwischen der Expression der konstitutiven und induzierbaren Untereinheiten des Proteasoms in der GP-Gruppe.....	48
Abbildung 22: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 5- und β 5i-Untereinheiten in der ACS-Gruppe	49
Abbildung 23: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 1- und β 1i-Untereinheiten in der ACS-Gruppe	50
Abbildung 24: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 5- und β 5i-Untereinheiten in der SAP-Gruppe.....	51
Abbildung 25: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 1- und β 1i-Untereinheiten in der SAP-Gruppe.....	52
Abbildung 26: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 5- und β 5i-Untereinheiten in der GP-Gruppe	53
Abbildung 27: Die Korrelation der mRNA-Expression zwischen den β 1- und β 1i-Untereinheiten in der GP-Gruppe	54
Abbildung 28: Die Korrelation zwischen den CRP-Werten und mRNA-Expression der β 5-Untereinheit in der ACS-Gruppe	56

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CCS-Klassifikation	7
Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien	20
Tabelle 3: Anamnesebogen	21
Tabelle 4: Materialien für Blutabnahme	22
Tabelle 5: Blutröhrchen und Parameter	23
Tabelle 6: Aufschlüsselung von Differenzialblutbild und Lipidwerten.....	23
Tabelle 7: Materialien für PBMC-Isolierung.....	24
Tabelle 8: Materialien für RNA-Isolierung.....	25
Tabelle 9: Materialien für die reverse Transkription (c-DNA-Erststrangsynthese).....	26
Tabelle 10: Zusammensetzung des Mastermixes.....	26
Tabelle 11: Materialien für Real-Time TaqMan™ PCR	27
Tabelle 12: Pipettierschema für Mastermix	28
Tabelle 13: Zeit- und Temperaturschema für Denaturierung der c-DNA.....	29
Tabelle 14: Für RT-PCR verwendete Forward- und Reverse-Primer.....	29
Tabelle 15: Baseline-Charakteristika	32
Tabelle 16: Die Korrelation zwischen den Inflammationsmarkern und der Expression der proteasomalen Untereinheiten in der ACS-Gruppe	55
Tabelle 17: Die Korrelation zwischen den Inflammationsmarkern und der Expression der proteasomalen Untereinheiten in der SAP-Gruppe.....	55

6.4. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
Abb.	Abbildung
ACE-Hemmer	Hemmer des Angiotensin Converting Enzymes
ACS	Acute coronary syndrom (Akutes Koronarsyndrom)
AT ₁ -Antagonisten	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1-Antagonisten
ASS	Acetylsalicylsäure
adrp	Adipose differentiation-related protein
AK	Patienten mit Ausschluss einer koronaren Herzerkrankung
BD	Becton Dickinson
BHQ1	Black-Hole-Quencher 1
BMI	Body-Mass-Index
CCS-Klassifikation	Klassifikation der Canadian Cardiovascular Society
CD4	Cluster of differentiation 4
CD8	Cluster of differentiation 8
c-DNA	Complementary DNA
Cit	Citrat
Ct	Cycle threshold
CP	Cysteine-Protease
CRP	C-reaktives Protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dl	Deziliter
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogram
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FA	Familienanamnese

FAM	Fluorescein
FW	Forward
GC	Guanylatzyklase
GTP	Guanosintriphosphat
GRK2	G-protein-coupled receptor kinase 2
GP	Gesunde Probanden
HbA1c	Glykohämoglobin
HDL	High-density lipoprotein
Hep	Heparin
HF	Herzfrequenz
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor
HLP	Hyperlipoproteinämie
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
H ₂ O	Aqua
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low-density lipoprotein
LMP	Low molecular mass protein
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
Ly-6C-hi	Monozyten Subtyp-hi
Ly-6C-lo	Monozyten Subtyp-low
IAP	Instabile Angina pectoris
I κ B α	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
m ²	Quadratmeter
Mac	Macintosh
M-CSF	Macrophage-colony stimulation factor
MCH	Mean Corpuscular Haemoglobin (Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt)
MCV	Mean Corpuscular Volume (Mittleres korpuskuläres Volumen)
mg	Milligramm
min	Minute(n)

MPV	Mean platelet volume
MHC-Klasse	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplexe)
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
NO	Nitrogen Monoxide (Stickstoffmonoxid)
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt
NYHA-Klassifikation	Klassifikation der New York Heart Association
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PDF	Portable Document Format
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
ROX	Passive Reference
rpm	Rotations per minute
RQ	RNA Qualified
RR-sys	Systolischer Blutdruck
RR-dia	Diastolischer Blutdruck
PSGL I	P-Selectin Glycoprotein Ligand I
PSMA3	Proteasome subunit alpha type-3
PSMB	Proteasome subunit beta
RPL 19	Ribosomal protein L19 (Hauskeeping Gen)
RV	Reverse
SAP	Patienten mit stabiler Angina pectoris
Se	Serum
STEMI	ST-Strecken-Hebungsinfarkt
TAMRA	Tetramethylrhodamine

Tbl.	Tabelle
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
μ l	Mikroliter
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vaskuläre-endothel Wachstumsfaktor)

7. Anhang

7.1. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Welisara Arachchige Surath Perera, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Untersuchungen zur Expression konstitutiver und induzierbarer Untereinheiten des Proteasoms in mononukleären Zellen in peripherem Blut bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung

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.

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

Berlin, den 27.04.2016

Welisara Arachchige Surath Perera

7.2. Lebenslauf

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

7.3. Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit gelingt nur mit Unterstützung. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei den Menschen bedanken, die mir das Erstellen dieser Dissertation erst möglich gemacht haben.

Im Besonderen möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Verena Stangl und Herrn Prof. Dr. med. Karl Stangl bedanken, die durch ihr großes Engagement in der Forschung über das Ubiquitin-Proteasom-System diese Dissertation überhaupt erst möglich gemacht haben.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Michael Laule, für die Überlassung des Themas, tatkräftige Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Gert Baumann bedanke ich mich für die Möglichkeit, in der Medizinischen Klinik für Kardiologie CCM sowie im kardiologischen Forschungslabor zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Robert Felix Wetzstein für die Mithilfe bei der Datensammlung sowie für seine konstruktive, wertvolle Kritik und unendliche Hilfsbereitschaft während der ganzen Arbeit. Frau Dr. rer. nat. Antje Ludwig sei herzlich gedankt für ihre gründliche Einarbeitung in die Labormethodik, ihr wissenschaftliches Engagement und ihre hilfreiche Anregungen.

Liebes Team im Forschungslabor und im Herzkatheterlabor: nur mit eurer Hilfe konnte ich die Blutproben der Patienten gewinnen und aufarbeiten. Ein großer Dank gilt Frau Anke Stach und Frau Andrea Weller für die tatkräftige Mitarbeit und Unterstützung im Forschungslabor. Herrn Dr. med. Bernd Hewing gilt mein herzlicher Dank für die Unterstützung bei der statistischen Analyse.

Meiner Frau Merlene Jane Sophia Perera möchte ich sagen: ohne deine Mut, Aufmunterung, Geduld und Liebe wäre es nie möglich gewesen, dass diese Arbeit nun gedruckt in den Händen des Lesers liegt.