

Aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Kardiologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Defizienz der immunoproteasomalen Untereinheit LMP7  
auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Cristian Ioan Dan  
aus Kronstadt / Braşov (Rumänien)

Datum der Promotion: 05.03.2021

## Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Hewing, B. Ludwig, A. **Dan, C.** Pötzsch, M. Hannemann, C. Petry, A. Lauer, D. Gorlach, A. Kaschina, E. Muller, D. N. Baumann, G. Stangl, V. Stangl, K. Wilck, N., Immunoproteasome subunit  $\beta 5i$ /LMP7-deficiency in atherosclerosis. Scientific Reports, 2017.

Wir suchen absolute Antworten in einer relativen Welt.

## Inhaltsverzeichnis

Vorwort .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	III
Abkürzungen .....	VI
Zusammenfassung .....	VIII
Abstract .....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Atherosklerose .....	1
1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose .....	1
1.2 Ubiquitin-Proteasom-System .....	4
1.2.1 Proteasomale Subpopulationen.....	6
1.3 UPS und Atherosklerose.....	8
1.3.1 Schnittstellen LMP7-vermittelter Regulation mit der Atherogenese.....	9
1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	12
2 Methodik.....	13
2.1 Verwendete Materialien, Lösungen und Geräte.....	13
2.2 Mausmodell.....	14
2.2.1 Erzeugung von LDLR <sup>-/-</sup> /LMP7 <sup>-/-</sup> Mäusen.....	14
2.2.2 Tierhaltung.....	15
2.2.3 Gewichtsbestimmung und Observation .....	15
2.2.4 Versuchsaufbau.....	15
2.3 Genotypisierung .....	17
2.3.1 Isolierung der DNA .....	17
2.3.2 Photometrische Konzentrationsmessung der DNA.....	17
2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion .....	18
2.3.4 Gelelektrophorese mit Agarosegel .....	19
2.4 Präparatgewinnung .....	20
2.4.1 Serumgewinnung.....	21
2.4.2 Herstellung von en-face-Präparaten.....	21

2.4.3	Herstellung von Gefrierschnitten .....	22
2.4.4	Proteinisolation .....	23
2.4.5	Proteinisolation für native Gele .....	24
2.5	Messung von Gesamtcholesterin, HDL und Triglyzeriden .....	24
2.6	Histologische Färbungen .....	26
2.6.1	Prinzip der Fettfärbung .....	26
2.6.2	Sudan IV-Färbung .....	26
2.6.3	Ölrot-O-Färbung .....	27
2.6.4	Movat-Pentachrom-Färbung .....	28
2.7	Immunhistochemische Färbungen .....	30
2.7.1	Die immunologische Methode .....	30
2.7.2	FK2 Polyubiquitin-färbung .....	31
2.8	Immunfluoreszenzfärbungen .....	33
2.8.1	Mac-2 Makrophagenfärbung .....	33
2.8.2	FK2 und Mac-2 Doppelfärbung .....	34
2.9	Western Blot .....	35
2.9.1	Proteinquantifizierung .....	35
2.9.2	SDS-PAGE .....	36
2.9.3	Native PAGE .....	37
2.9.4	Extraktion von 26S-Proteasom .....	38
2.9.5	Blotten .....	39
2.9.6	Proteindetektion .....	40
2.9.7	Ladekontrolle .....	41
2.9.8	Oxyblot .....	41
2.10	Statistik .....	42
3	Ergebnisse .....	43
3.1	Charakterisierung des Tiermodells .....	43
3.1.1	Erzeugung von LDR <sup>-/-</sup> /LMP7 <sup>-/-</sup> Mäusen .....	43
3.1.2	Phänotypisierung .....	44
3.1.2.1	Allgemeinzustand und Körpergewicht .....	44
3.1.2.2	Cholesterin- und Triglyzeridewerte .....	44
3.2	Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf die Atherosklerose .....	45
3.2.1	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Plaquelast in der frühen Atherosklerose .....	46
3.2.2	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Plaquelast in der fortgeschrittenen Atherosklerose .....	46
3.2.3	Einfluss der LMP7-Defizienz auf den Makrophagengehalt in der fortgeschrittenen Atherosklerose .....	49
3.2.4	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die nekrotischen Areale in der fortgeschrittenen Atherosklerose .....	50

3.2.5	Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Akkumulation polyubiquitinerter Proteine in der fortgeschrittenen Atherosklerose .....	52
3.3	Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf die Proteinoxidation in der Leber .....	54
3.4	Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf die Menge polyubiquitinerter Proteine in Leber und Milz .....	55
3.5	Konfiguration proteolytischer Untereinheiten in LMP7-defizienten Mäusen .....	57
4	Diskussion .....	59
4.1	Die LMP7-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Proteinhomöostase in der FD-induzierten Atherosklerose von LDLR <sup>-/-</sup> Mäusen .....	59
4.2	Die LMP7-Defizienz verändert die proteasomale Komposition .....	62
4.3	Einfluss der LMP7-Defizienz auf Risikofaktoren der Atherosklerose .....	63
4.4	Einfluss der LMP7-Defizienz auf inflammatorische Prozesse der Atherosklerose .....	64
4.5	Perspektiven der LMP7-Blockade in der Atherosklerose .....	65
A	Literaturverzeichnis .....	VI
B	Eidesstattliche Versicherung .....	XII
C	Anteilsenkärung .....	XIII
D	Lebenslauf .....	XIV
E	Publikationsverzeichnis .....	XV
F	Danksagung .....	XVI

## Abkürzungen

A.	arteria
Aa.	arteriae
APS	Ammoniumpersulfat
BMDM	bone marrow-derived macrophages
BSA	bovine serum albumin
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
CCR	Center for Cardiovascular Research
CD	cluster of differentiation
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FD	Hochfett-Diät
FITC	fluorescein isothiocyanate
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNP	2,4-Dinitrophenylhydrazon
GC	Gesamtcholesterin
GP	Gesamtprotein
HDL	high-density lipoprotein
HRP	horseradish peroxidase
IL	Interleukin
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IP	Immunoproteasom
KG	Körpergewicht
LDL	low-density lipoprotein
LDLR	low-density lipoprotein receptor
LK	Ladekontrolle
LMP	low molecular mass protein
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MECL-1	multicatalytic endopeptidase complex like 1

MHC	major histocompatibility complex
MxP	Intermediärproteasom
MMP	Matrix-Metalloprotease
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes LDL
PAGE	polyacrylamid gel electrophoresis
ND	Normal-Diät
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PI	Proteasominhibitor
PRR	pattern recognition receptor
PSMB8	proteasome subunit beta type-8
PVDF	Polyvinylidenfluorid
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
SDS	sodium dodecyl sulfate
Tab.	Tabelle
TEA	Thrombendarteriektomie
TG	Triglyzeride
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SP	Standardproteasom
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th	T-Helferzellen
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VSMC	vascular smooth muscle cell



## **Zusammenfassung**

Die Atherosklerose ist eine chronisch entzündliche Gefäßerkrankung, die erheblich zur globalen Morbidität und Mortalität beiträgt. Die Atherogenese geht mit einer Dysregulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) einher. Aktuelle Studien berichteten über eine besondere Rolle der immunoproteasomalen (IP) Untereinheit LMP7 bei der Erhaltung der Proteinhomöostase in Anwesenheit von Zytokin-induziertem oxidativen Stress. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Initiation und Progression der Atherosklerose in der *low-density lipoprotein receptor*-defizienten (LDLR<sup>-/-</sup>) Maus untersucht.

Durch Kreuzung wurden LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäuse generiert. Als Kontrollgruppe dienten LDLR<sup>-/-</sup> Wurfgeschwister. Die Fütterung einer Hochfett-Diät (FD) über 6 oder 24 Wochen induzierte ein frühes bzw. spätes Atherosklerosestadium. In beiden Stadien war die in Gefrierschnitten der Aortenwurzel und en-face-Präparaten der Aorta gemessene Plaquelast beim Vergleich der Genotypen nicht unterschiedlich. Die LMP7-Defizienz beeinflusste weder den Makrophagengehalt noch die Größe des nekrotischen Areals und nicht die Anzahl der Plaquezellen mit Polyubiquitin-Konjugaten von Läsionen der Aortenwurzel. Western-Blot-Untersuchungen zeigten gleiche Mengen an oxidierten und ubiquitinierten Proteinen in Leber und Milz von LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Serumwerte von Gesamt- sowie HDL-Cholesterin, Triglyzeriden und der Gewichtszuwachs unter FD waren durch das Fehlen von LMP7 nicht wesentlich beeinflusst. Die Expression von IP-Untereinheiten in Leber und Milz war unter LMP7-Defizienz verringert und die Inkorporation von Standard-Untereinheiten in isolierten Milz-Proteasomen war erhöht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen der immunoproteasomalen Untereinheit LMP7 die Initiation und Progression der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen nicht verändert.

### **Schlagwörter:**

Atherosklerose, Proteinhomöostase, Ubiquitin-Proteasom-System, LMP7

## **Abstract**

Atherosclerosis is a chronic inflammatory vascular disease with significant contribution to global morbidity and mortality. In atherogenesis protein homeostasis is disturbed and the major intracellular degradation system, the ubiquitin-proteasome-system (UPS), is dysregulated. Recent studies highlighted the role of the immunoproteasome (IP) subunit LMP7 in maintenance of protein homeostasis under cytokine induced oxidative stress. The present study aims to investigate the effect of LMP7-deficiency on initiation and progression of atherosclerosis as a model of a chronic inflammatory, immune cell driven disease.

LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> and LDLR<sup>-/-</sup> littermate mice were generated and fed a high-fat diet for either 6 or 24 weeks to induce early and advanced stage atherosclerosis. Lesion burden in aortic root cryosections and en face prepared aorta was similar between genotypes in both stages. Macrophage content, necrotic core size and abundance of polyubiquitin conjugates in aortic root plaques were unaltered by LMP7-deficiency. A similar amount of oxidized and ubiquitinated proteins was determined in liver and spleen from LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> and LDLR<sup>-/-</sup> mice. Western Blot analyses of proteasome subunits showed decreased expression of IP subunits in liver and spleen and increased incorporation of standard proteasome subunits into 26S-proteasomes in LMP7-deficient mice.

Deficiency of IP subunit LMP7 does not disturb protein homeostasis and does not aggravate initiation and progression of atherosclerosis in LDLR<sup>-/-</sup> mice.

### **Keywords:**

Atherosclerosis, protein homeostasis, Ubiquitin-proteasome-system, LMP7

# **1 Einleitung**

## **1.1 Atherosklerose**

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind mit einem Anteil von ca. 30% die führende Ursache globaler Mortalität. Die Atherosklerose ist die zugrunde liegende Pathologie der meisten kardiovaskulären Erkrankungen. Die Prävalenz von Risikofaktoren und die hohe Lebenserwartung sind für das pandemische Ausmaß der Atherosklerose maßgeblich verantwortlich. Im Wesentlichen begünstigen die Folgen von Bewegungsmangel und Überernährung, nämlich Adipositas, Hypertonie, Hypercholesterin- und Hyperglykämie, die Atherosklerose. Auf globaler Ebene wird weiterhin ein Anstieg der Betroffenen prognostiziert [1].

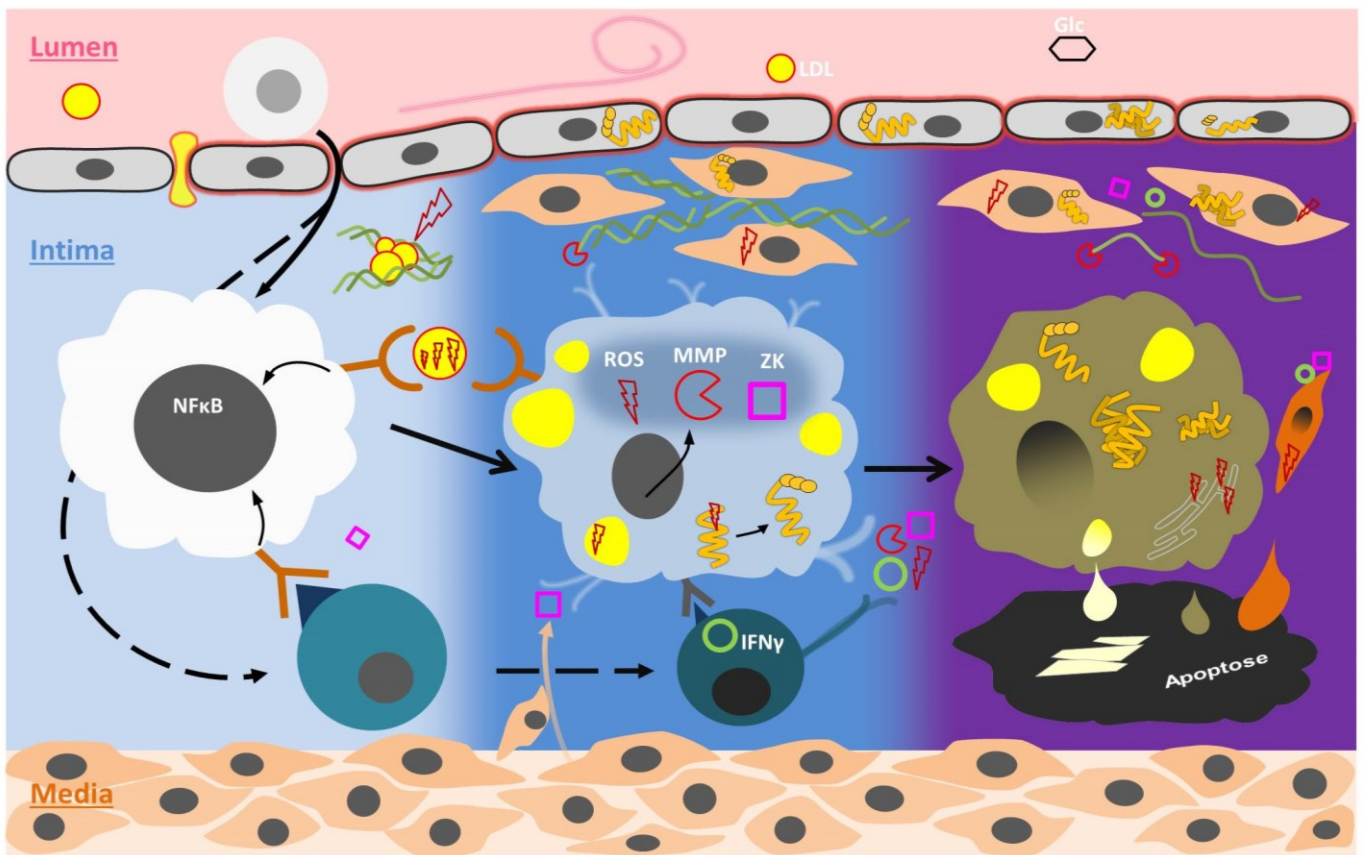
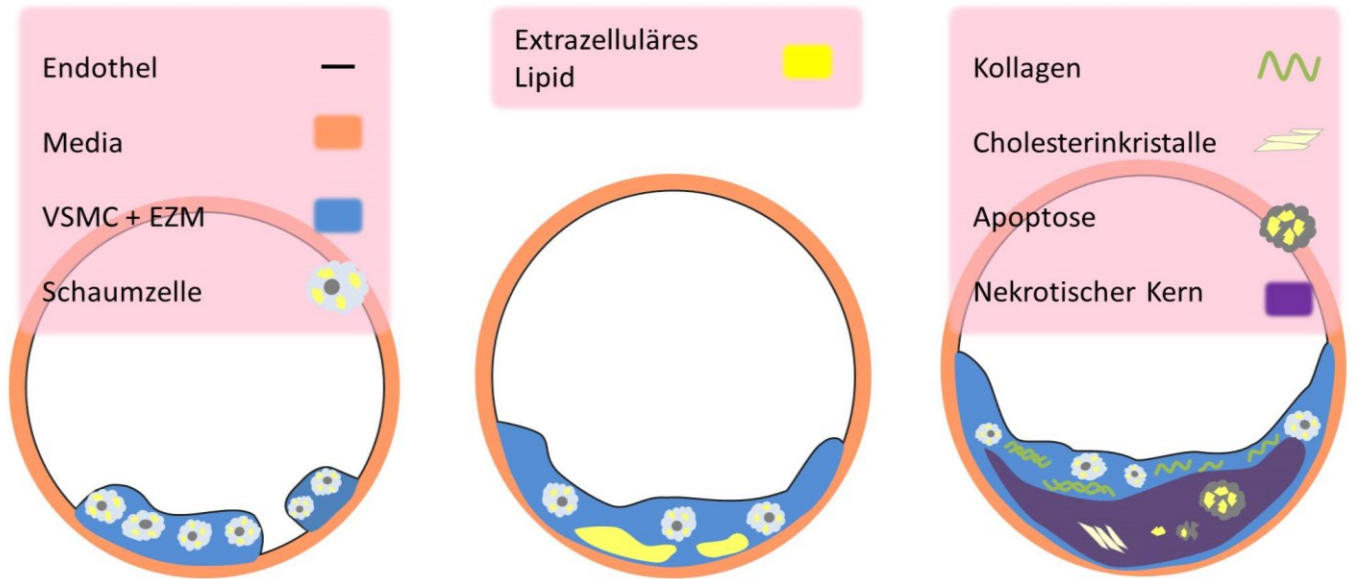
Die Atherosklerose wird als chronisch-progrediente Gefäßentzündung verstanden [2]. Sie entwickelt sich über Jahrzehnte in einem stummen Prozess und wird erst im höheren Alter symptomatisch. Gefäßstenosen führen zu ischämischen Krankheitsbildern wie beispielsweise der koronaren Herzkrankheit, Nierenarterienstenose und peripheren arteriellen Verschlusskrankheit. In einer späten Krankheitsphase kann es zu thrombembolischen Ereignissen kommen, welche zu akuten und fatalen Verläufen (Organinfarkte) führen [3].

Obwohl die Inflammation zu allen Phasen der Atherogenese beiträgt, beschränkte sich die Therapie bisher auf die Reduktion von Hypertonie und Hypercholesterinämie. Jüngst wurde im Rahmen der CANTOS-Studie erstmals die Wirksamkeit einer anti-inflammatorischen Therapie (IL-1 $\beta$ -Antikörper) nachgewiesen [4]. Um dahingehende Therapieansätze voranzutreiben, ist ein tiefergehendes Verständnis von Angriffspunkten in inflammatorischen Prozessen der Atherosklerose notwendig.

### **1.1.1 Pathogenese der Atherosklerose**

Für die Entstehung der Atherosklerose sind zwei Prozesse von wesentlicher Bedeutung: die Dysfunktion der luminalen Gefäßschicht (Endothel) und die Ablagerung von Lipoproteinen in der Gefäßwand [5]. Die uneingeschränkte Funktion des Endothels spielt eine zentrale Rolle in der vaskulären Homöostase. Das Endothel bildet eine selektive Barriere gegenüber löslichen Blutbestandteilen und reguliert den Gefäßtonus. Kardiovaskuläre Risikofaktoren (Rauchen, Hypertonie, Hyperglykämie, Hyperlipidämie) führen zu oxidativem Stress und stören das komplexe Zusammenspiel regulativer

Faktoren (z.B. Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und Tetrahydrobiopterin, Produktion von Endothelin 1) des Endothels. Das aktivierte Endothel exprimiert Adhäsionsmoleküle wie *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und sezerniert chemotaktische Stoffe (*monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1)), wodurch die Migration von Immunzellen in das Subendothel ermöglicht wird [6, 7]. Das *low-density lipoprotein* (LDL) lagert sich ebenfalls in der Intima ab, wo es unter dem fortlaufenden Einfluss von oxidativem Stress Modifikationen unterliegt. Das oxidierte LDL (oxLDL) hat bioaktive Eigenschaften und interagiert mit Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors* PRR) von Endothelzellen und Immunzellen [8]. Dadurch wird die endotheliale Dysfunktion weiter gesteigert. *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) wird ausgeschüttet und fördert die Differenzierung von eingewanderten Monozyten zu Makrophagen. Diese können über ihre PRR (Transmembranproteine CD36, Scavenger- und Toll-like Rezeptoren) das oxLDL internalisieren. In Folge dessen entstehen Schaumzellen, in denen intrazelluläre Lipidinklusionen sichtbar werden. Die Aktivierung pro-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFκB) findet statt. Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNFα), Interleukin 1β (IL-1β) und 6 (IL-6) werden freigesetzt und co-stimulatorische Rezeptoren (CD40) exprimiert [9]. In diesem Milieu führt die Migration und Differenzierung weiterer Zellen – so auch von T-Helferzellen (Th) und vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) – zur Progression der Läsion [10]. VSMC wandern aus der Media in die Intima ein. Durch die Produktion von extrazellulärer Matrix sind sie an der Stabilisierung der Läsion und Bildung der fibrösen Kappe beteiligt [11]. Th1-Lymphozyten sezernieren Interferon γ (IFNγ) und TNFα. Dadurch wird die inflammatorische Reaktion in den Makrophagen weiter amplifiziert und die Plaque zunehmend destabilisiert. Die Einwirkung von Zytokinen, die Reaktion auf das oxLDL und die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verursachen eine pro-apoptotische Stimulation. Es kommt zum Niedergang von Plaquezellen. Vitale Makrophagen sind in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium nicht mehr zu einer effektiven Efferozytose (Säuberung der Zellreste) in der Lage. In Folge dessen bildet sich ein nekrotischer Kern. Die Ruptur der Plaque wird durch den Niedergang von VSMC (u.a. induziert durch TNFα) und den Abbau von Kollagen (durch Matrix-Metalloproteasen (MMP) aus Makrophagen) in der fibrösen Kappe begünstigt. Dadurch gelangt der thrombogene Inhalt der atherosklerotischen Läsion in Kontakt mit dem Gerinnungssystem [12] (Abbildung 1.1).



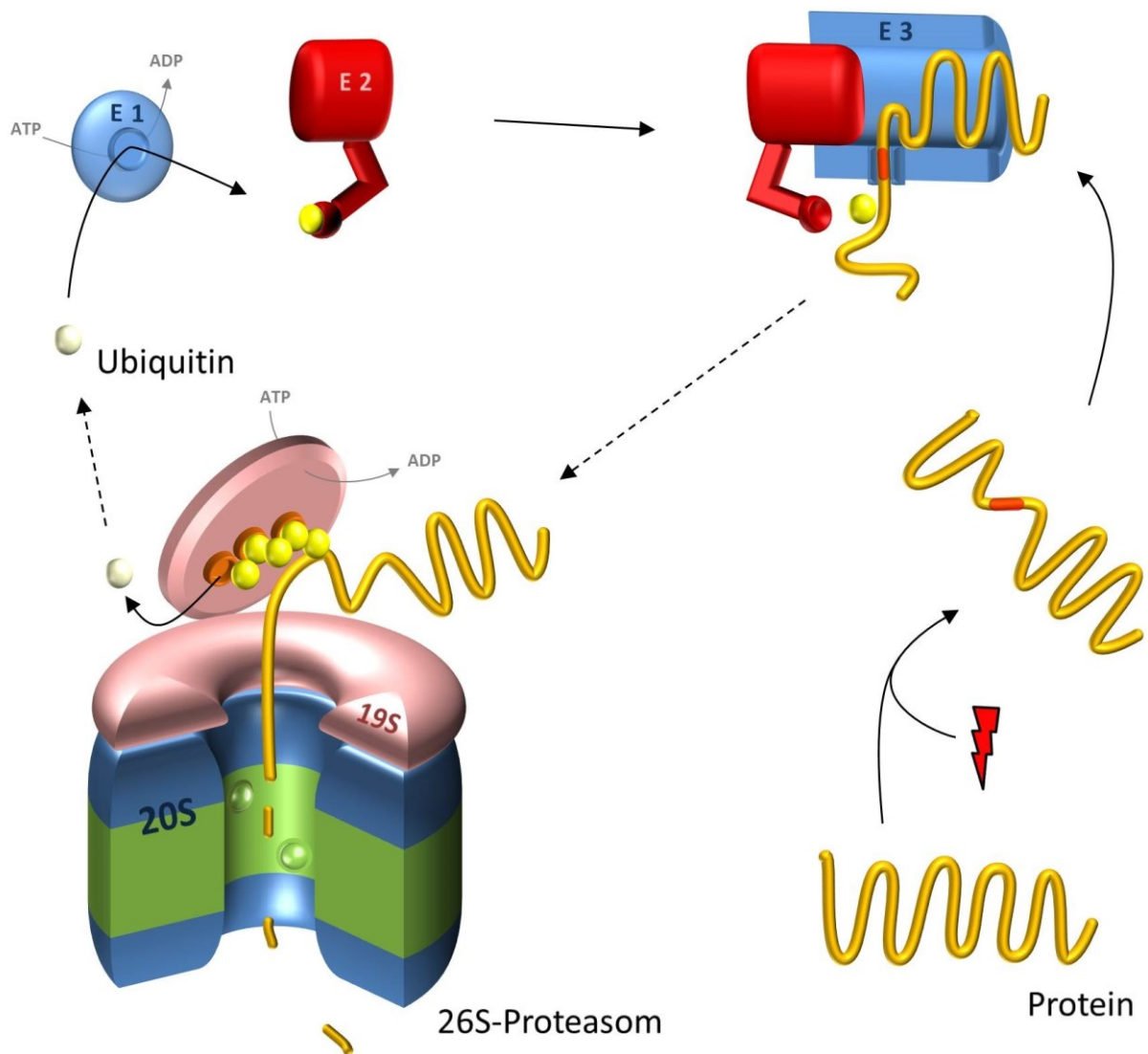
**Abbildung 1.1: Atherogenese, morphologische Aspekte (oben).** Intimales Xanthoma (links), pathologische intimale Verdickung (zentral) und Fibroatherom (rechts) im Gefäßquerschnitt. **Pathophysiologische Aspekte (unten).** Gestörter laminarer Blutfluss, Dyslipidämie (LDL), Hyperglykämie (Glc) aktivieren das Endothel (roter Saum). Migrierende Leukozyten differenzieren sich zu Makrophagen (bzw. Schaumzellen) (durchgehende Pfeile) und zu Th1-Zellen (gestrichelte Pfeile). Inflammatorische Mediatoren sind verantwortlich für Chemotaxis von VSMC aus der Media, oxidativen Stress, Abbau von Extrazellulärmatrizen, Bildung von Proteinaggregaten und Apoptose. ROS – reaktive Sauerstoffspezies, MMP – Matrix-Metalloproteasen, ZK – Zytokine.

Morphologisch präsentieren sich frühe Prozesse der Atherogenese in einer Verbreiterung der Intima. Mit dem Auftreten von Schaumzellen werden die Läsionen Xanthoma (*xanthos* – griech. ‘gelb’) oder auch *fatty streaks* genannt. Ihr Vorkommen wird bereits im Kindesalter beobachtet. Die frühen Krankheitsausprägungen sind allerdings reversibel und zeigen eine geringe Progressionstendenz. Ab der 3. Lebensdekade treten die ersten Läsionen auf, die als Vorläufer der symptomatischen Atherosklerose gesehen werden. Sie werden pathologische intimale Verdickungen genannt. Kennzeichnend ist eine extrazelluläre Lipidansammlung in der vaskulären Wand, die von Schaumzellen umgeben wird [3]. Im weiteren Verlauf entsteht ein Fibroatherom, welches aus einem nekrotischen Kern besteht, der von einer fibrösen Kappe überlagert wird. Mit zunehmender Makrophageninfiltration und Größe des nekrotischen Kerns sowie abnehmender Dicke der fibrösen Kappe, steigt die Vulnerabilität und damit die Rupturwahrscheinlichkeit der Plaque [13] (Abbildung 1.1).

## **1.2 Ubiquitin-Proteasom-System**

Die Entdeckung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) wurde im Jahr 2004 mit dem Chemie-Nobelpreis geehrt. Das UPS ist in Eukaryoten die bedeutendste Funktionseinheit für den gerichteten Proteinabbau. Dysfunktionale, überschüssige und geschädigte Proteine sind seine Substrate. Dadurch nimmt das zelluläre Abbausystem Einfluss auf die zelluläre Proteinhomöostase [14]. Die Proteolyse kann auch regulatorische Effekte ausüben, die Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Inflammation betreffen [15]. Das UPS besteht aus zwei Multikomponenten-Systemen, die für die Ubiquitin-vermittelte Proteinselektion und die proteasomale Hydrolyse der Peptidbindung zuständig sind (Abbildung 1.2).

Ubiquitin ist ein Polypeptid, welches repetitiv an proteasomale Substrate gebunden wird und diese dadurch zum Abbau markiert [16]. In einer enzymatischen Reaktionsfolge wird Ubiquitin zunächst energieabhängig aktiviert (E1), übertragen (E2) und an ein spezifisches Protein gebunden. Die Spezifität des letzten Schrittes wird über die Vielzahl der E3-Ligasen ermöglicht, die sogenannte Degradationssignale in den Eiweißen identifizieren können [17].



**Abbildung 1.2: Gerichteter Proteinabbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System.**

Die Nomenklatur der Bestandteile des Proteasoms richtet sich nach dem Sedimentationskoeffizienten des jeweiligen Komplexes. Der Wert der katalytisch aktiven Kerneinheit beträgt 20 Svedberg. Das 20S-Proteasom wird von jeweils zwei homologen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ringen gebildet, die übereinander gelagert einen Hohlzylinder formen. In dessen Zentrum begrenzen die beiden antiparallel angeordneten  $\beta$ -Heptamere die proteolytische Kammer (Abbildung 1.3). Die Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  hydrolysieren dabei Peptidverbindungen mit Schnittstellenpräferenzen, die Ähnlichkeiten zu Serinproteasen und Caspasen aufweisen. Dementsprechend wird von Caspase-, ( $\beta 1$ ), Trypsin- ( $\beta 2$ ) und Chymotrypsin-ähnlicher ( $\beta 5$ ) Aktivität gesprochen, die Peptidbindungen nach sauren, basischen und hydrophoben Aminosäureresten trennt [18]. Einzigartig an den proteasomalen Proteasen ist, dass Threonin als funktionelle

Aminosäure im aktiven Zentrum an der nukleophilen Spaltung beteiligt ist [19]. Die außen gelegenen  $\alpha$ -Heptamere verschließen den Eingang ins proteolytische Zentrum, um die unkontrollierte Proteolyse zu verhindern [20]. Auch wenn vermutet wird, dass die Eintrittspforte durch hydrophobe Reste oxidierter Proteine geöffnet werden kann [21], gelten regulatorische Komplexe als wichtigste proteasomale Aktivatoren. Es sind 6 Regulatoren bekannt, die in verschiedenen Kombinationen an die  $\alpha$ -Ringe binden können [22]. Der prominenteste Vertreter ist der 19S-Regulator. In Verbindung mit der Kerneinheit entsteht das 26S-Proteasom [23]. Der 19S-Regulator vermittelt die Erkennung Polyubiquitin-markierter Proteine und deren energieabhängige Entfaltung. Anschließend ermöglicht er die Öffnung des  $\alpha$ -Rings und die Translokation des Substrats in die Kerneinheit, wo es in Polypeptide, bestehend aus durchschnittlich 8 bis 10 Aminosäuren, hydrolysiert wird [24].

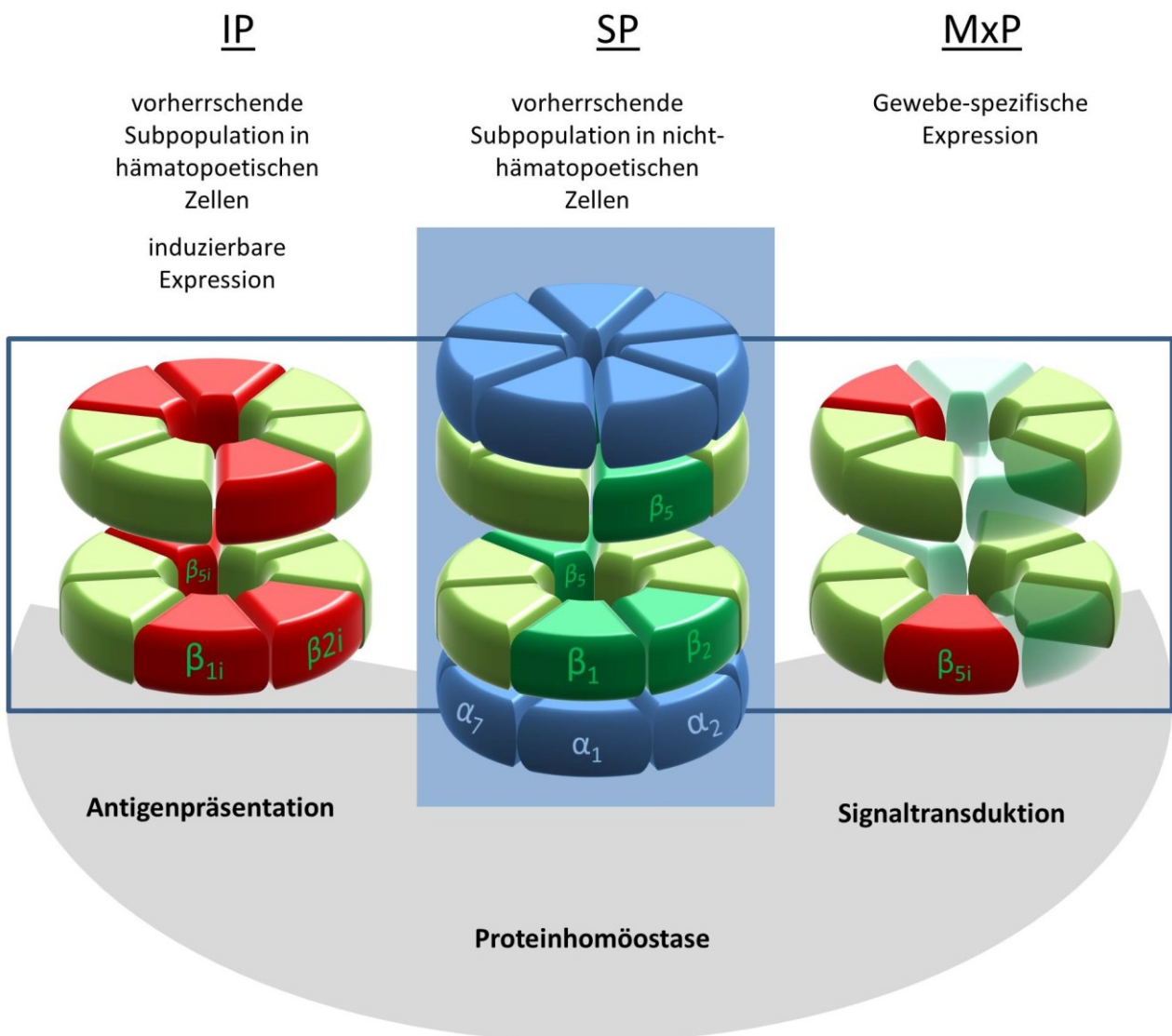
### 1.2.1 Proteasomale Subpopulationen

Die Diversität proteasomaler Subpopulationen ist Gegenstand der aktuellen Forschung [22]. Neben dem Standardproteasom (SP) sind das Immunproteasom (IP) und verschiedene Intermediärproteasomen (MxP) identifiziert worden. Für IP und MxP sind die Inkorporation alternativer proteolytischer Untereinheiten in die 20S-Kerneinheit kennzeichnend (Abbildung 1.3). Die IP-Untereinheiten LMP2 ( $\beta$ 1i), MECL-1 ( $\beta$ 2i) und LMP7 ( $\beta$ 5i) zeigen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den SP-Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 [25]. Die *low molecular weight protein* (LMP)-Gene sind in der (MHC Klasse II) Region der Antigenpräsentation lokalisiert [26]. Das IP optimiert die Präsentation intrazellulärer Antigene über den MHC-Klasse-I-Komplex und ist damit an der Immunantwort von CD8+ Lymphozyten beteiligt [27].

Neuere Forschungsarbeiten deuten auf weitere Implikationen des IP in zelluläre Prozesse [28]. Zellen hämatopoetischen Ursprungs zeigen eine konstitutive Expression von IP im Gegensatz zu den übrigen Zellen, die hauptsächlich SP assemblieren [29]. Inflammatorische Mediatoren wie IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  und infektiöse Reize induzieren die Transkription der IP-Untereinheiten und die Biosynthese von IP (Review [25]). Aber auch weniger spezifische Stressoren wie Hitzeschock [30], Altern [31, 32] und oxidativer Stress [33] konnten die Assemblierung von IP einleiten. In Anbetracht dieser Beobachtungen wurde vermutet, dass die Ausbildung von IP einen protektiven Mechanismus als Reaktion auf zelluläre Stressoren darstellt [25].



Die Proteasomenpopulation besteht in verschiedenen Geweben zu unterschiedlichen Anteilen aus SP, IP und Intermediärproteasom. Dadurch tragen die Isoformen zu unterschiedlichen Anteilen zur proteolytischen Kapazität der Zelle bei [34, 35]. Obwohl die Substratspezifitäten von IP und SP zu einem Großteil überlappen, sind dennoch spezifische Unterschiede erkennbar, die auf bestimmte Weise die Regulation zellulärer Prozesse beeinflussen könnten [36].



**Abbildung 1.3 : Eigenschaften, Aufbau und Funktion proteasomaler Subpopulationen.** Darstellung eines 20S-Standardproteasoms (SP) und der Komposition der  $\beta$ -Heptamere für das Immunoproteasom (IP) und für ein Intermediärproteasom (MxP).

### 1.3 UPS und Atherosklerose

Das UPS ist ein Bestandteil des zellulären Proteinmetabolismus und der Proteinqualitätskontrolle. Dadurch ist es in bedeutende Prozesse der physiologischen und pathologischen Gefäßfunktion involviert. Durch die Vielzahl proteasomaler Substrate (Zellzyklus-Regulatoren, Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktoren) werden Prozesse wie Inflammation, Proliferation, Apoptose und die Bewältigung von oxidativem Stress reguliert [37, 38]. So ist das UPS beispielsweise an der Bildung, der Translokation und dem Abbau des Transkriptionsfaktors NfκB beteiligt [39]. Die Bindung von NfκB an seine Promotorregion ermöglicht die Transkription vieler Gene, die in der Atherogenese eine bedeutende Rolle spielen, wie endotheliale Adhäsionsmoleküle und Chemokine [40]. Andererseits ist das UPS für die Proteolyse dysfunktionaler Proteine zuständig. Das Vorkommen von Chaperonen (Hitzeschockprotein 70 und 60) [41], Amyloid [42] sowie die Aktivierung der *unfolded protein response* (Antwort auf fehlgefaltete Proteine) [43] in Atheromen werden als Reaktionen auf eine Anhäufung modifizierter Proteine verstanden [37]. Post-mortem Analysen in Koronararterien und Untersuchungen von Thrombendarteriektomie (TEA)-Präparaten der A. carotis zeigten eine Häufung von Ubiquitin in humanen Läsionen mit erhöhter Vulnerabilität [44-46]. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die Atherosklerose – ähnlich wie neurodegenerative Krankheiten – eine Störung der Proteinqualitätskontrolle aufweist [47]. Eine Dysregulation des UPS präsentierte sich auch bei Untersuchungen der proteasomalen Aktivität in TAE-Präparaten der A. carotis, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen. Versari et al. berichteten von einer verminderten proteasomalen Aktivität bei erhöhtem Nachweis von oxidativem Stress und Apoptose [44]. Im Gegensatz dazu konnten Marfella et al. eine vermehrte proteasomale Aktivität bei erhöhter Entzündung beobachten [45].

Es entwickelte sich die Hypothese einer dualen Rolle der proteasomalen Aktivität in der Atherosklerose [48]. Im initialen Krankheitsgeschehen fördert ein (über)aktives UPS, beispielsweise durch die Aktivierung von NfκB, die Inflammation und die Progression der Gefäßkrankheit. In einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium nimmt die proteolytische Aktivität zunehmend ab. Es kommt zur zytotoxischen Aggregation von fehlerhaften Proteinen, was zu apoptotischen Vorgängen und zur Destabilisierung der Plaque beitragen soll.

Die Annahme, dass die Aktivität des UPS Auswirkungen auf die Atherogenese hat, wird durch Ergebnisse aus Tierversuchen mit Proteasominhibitoren (PI) gestützt. In diesen wurden abhängig von Dosis und Krankheitsstadium sowohl atherogene als auch anti-atherogene Effekte auf die Atherosklerose gefunden. Hoch-dosierte PI verstärkte die Krankheitsausprägung in der initialen und fortgeschrittenen Atherosklerose [49, 50]. Bei geringem Inhibitionsgrad der proteasomalen Aktivität und in einem frühen Krankheitsstadium wurden positive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf beobachtet [51, 52]). In einer kürzlich publizierten Studie konnten wir die Hypothese eines stadien-abhängigen Effekts der PI auf die Atherosklerose unterstützen. Während niedrig-dosierte PI die Entstehung eines frühen Atherosklerostadiums in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen hemmte [51], führte eine identische Intervention in Tieren mit bereits vorhandener fortgeschrittener Atherosklerose zur Plaquedestabilisierung [53].

### **1.3.1 Schnittstellen LMP7-vermittelter Regulation mit der Atherogenese**

Experimentelle Arbeiten deuten darauf hin, dass die Aktivität des IP sowohl für die Erhaltung der Proteinhomöostase als auch für die inflammatorische Signaltransduktion bedeutsam ist. Prozesse (oxidativer Stress [33], Hyperglykämie [54]) und Mediatoren (CD40 [55], NFκB, IFNγ, TNFα, NO (Review [25])), die für die Atherogenese von Bedeutung sind, wurden als Induktoren von IP-Untereinheiten identifiziert. Zudem exprimieren in die Läsion einwandernde Lymphozyten und Monozyten konstitutiv das IP. Die Funktion des IPs in der Atherosklerose ist allerdings noch unerforscht. Dabei weist insbesondere die Funktion der IP-Untereinheit LMP7 Schnittstellen mit pathogenetischen Prozessen der Atherosklerose auf.

#### Proteinhomöostase

Die Arbeitsgruppe um Pickering untersuchte zelluläre Anpassungsreaktionen auf oxidativen Stress. Als Antwort auf eine Wasserstoffperoxid-Exposition konnten sie einen Anstieg der Expression von IP, der proteolytischen Kapazität und der Fähigkeit oxidierte Proteine abzubauen feststellen. SP und IP wiesen eine ähnliche Degradationsrate für oxidierte Substrate auf [56]. Ein Mechanismus, der die Steigerung der proteolytischen Kapazität und die Induktion von IP-Untereinheiten verbindet, wurde von Joeris et al. vorgeschlagen. Sie konnten feststellen, dass der LMP7-Präkursor (prä-LMP7) die proteasomale Reifung im Vergleich zu prä-β5 beschleunigte, wodurch sich die Anzahl von Proteasomen in prä-LMP7-exprimierenden Zellen signifikant erhöhte [57]. Weiterhin

war in Organen von LMP2<sup>-/-</sup> Mäusen das Vorkommen oxidativ-geschädigter Proteine erhöht [58] und in retinalen Pigmentepithelzellen von LMP7<sup>-/-</sup>/MECL-1<sup>-/-</sup> Mäusen wurde eine größere Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress gemessen als in C57BL/6 Mäusen [59]. In Anbetracht dieser Daten wurde vorgeschlagen, dass die Induktion des IP einen protektiven Mechanismus zur Anpassung an oxidativen Stress darstellt [25]. Die Arbeitsgruppen um Seifert und Nathan befassten sich tiefergehend mit dieser Annahme. Dabei machten sie jedoch widersprüchliche Beobachtungen. So zeigten Seifert und Kollegen, dass LMP7 eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der zellulären Homöostase unter Zytokin-induziertem oxidativen Stress spielt. Sie beobachteten in Organen von LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu ihren LMP7<sup>+/+</sup> Wurfgeschwistern eine erhöhte Menge an oxidierten und polyubiquitinierten Proteinen nach Applikation eines bakteriellen Antigens. Darüber hinaus wurde in einem Tiermodell der multiplen Sklerose in LMP7-defizienten Tieren die Ausbildung zellulärer Proteinaggregate nachgewiesen [60]. Ähnliche Effekte der LMP7-Defizienz auf die Proteinhomöostase wurden in einem Tierversuch der viralen Myokarditis gefunden [61]. Es wurde vorgeschlagen, dass eine spezifische Rolle des IP darin bestünde, die im Zuge der Inflammation auftretende Akkumulation von geschädigten Proteinen durch eine erhöhte Proteolyse zu verhindern [60]. Unter solchen Bedingungen fördere die Defizienz von LMP7 die Proteinaggregation und würde dadurch Zellen wie beispielsweise Makrophagen [61] zur Apoptose sensibilisieren. Allerdings konnten Nathan et al. die experimentellen Ergebnisse von Seifert et al. nicht reproduzieren. In ihrer Studie schlussfolgerten sie, dass SP und IP sich in der Eigenschaft ubiquitinierte Proteine zu degradieren nicht unterscheiden würden [62]. Die Funktion von LMP7 beim Erhalt der Proteinhomöostase in entzündlichen Erkrankungen ist somit Gegenstand einer aktuellen wissenschaftlichen Debatte [63].

### Inflammation

Zahlreiche Hinweise sprechen für eine Rolle der LMP7-Aktivität in inflammatorischen Prozessen. So wurden als Ursache auto-inflammatorischer Syndrome verschiedene Mutationen im LMP7-Gen (PSMB8) identifiziert. Bei Betroffenen finden sich eine erhöhte Produktion inflammatorischer Zytokine im Serum, eine Anhäufungen ubiquitiniertes Proteine in den Zellen und eine verminderte proteasomale Aktivität [64]. In Tiermodellen inflammatorischer Erkrankungen wie Colitis [65-69], Asthma [70], Meningitis [71] und Adipositas [72] verringerte die LMP7-Defizienz die

Krankheitsausprägungen. Dabei war im Gewebe der LMP7<sup>-/-</sup> Mäuse die Infiltration von Lymphozyten (Th1, Th2, Th17) und Myelozyten (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) [66, 69, 70, 72] sowie der Zytokingehalt, beispielsweise von TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-17, IFN $\gamma$ , MCP-1 [65, 69], erniedrigt. Für diese anti-inflammatorischen Effekte wird eine Regulation von Zytokinproduktion und Zelldifferenzierung durch die LMP7-Expression in Immunzellen angenommen [73]. So wurde in LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet, dass die Konversion zu Th1 und Th17 Effektorzellen [66] sowie die Reifung von dendritischen Zellen [70] im Vergleich zu LMP7-ausprägenden Tieren gehemmt war und, dass die Bildung von regulatorischen T-Zellen [66] und von anti-inflammatorischen M2-Makrophagen begünstigt wurde [72, 74].

Dennoch scheint der protektive Einfluss der LMP7-Defizienz in Tierexperimenten von der spezifischen Erkrankung und den untersuchten Geweben abhängig zu sein [72]. Denn das Fehlen von LMP7 hatte auf die Ausprägung experimenteller Modelle von multipler Sklerose [60, 75], Hausstaubmilben-induziertem Asthma [70], Myokarditis [61] und Pneumonie [76] entweder keinen oder einen pro-inflammatorischen Einfluss.

### Metabolismus

Kimura et al. untersuchten die Entstehung von Adipositas in LMP7<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäusen, die mit einer Hochfett-Diät (FD) gefüttert wurden. In LMP7-defizienten Tieren waren neben der inflammatorischen Antwort, die Entgleisung metabolischer Parameter (Serumglukose und -lipide) und das Wachstum von weißem Fettgewebe erniedrigt gewesen. Diese Beobachtungen waren auch auf Effekte in nicht-hämatopoetischen Zellen (Pankreas, Adipozyten), die die Sekretion von Enzymen (Lipase) und Hormonen (Adiponektin) betrafen, zurückzuführen [72].

### Zusammenfassung

Die Pathogenese der Atherosklerose umfasst entzündliche Vorgänge und eine Störung der Proteinqualitätskontrolle. Für die Regulation beider Prozesse wurde der IP-Untereinheit LMP7 eine wichtige Rolle zugesprochen. Dies ist von besonderem Interesse, da gegenwärtig eine kontroverse Diskussion über die Bedeutung von LMP7 bei der Erhaltung der Proteinhomöostase in inflammatorischen Erkrankungen geführt wird.

## 1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

In einem Tierversuch soll der Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Entstehung und die Progression der Atherosklerose von LDL-Rezeptor-defizienten ( $LDLR^{-/-}$ ) Mäusen, einem etablierten Atherosklerosemodell, untersucht werden. Dazu sollen Wurfgeschwister mit  $LDLR^{-/-}/LMP7^{+/+}$  und  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  Genotyp generiert und verglichen werden. In Anbetracht der potenziellen Schnittpunkte der Funktion von LMP7 mit atherogenetischen Prozessen werden folgende Ziele und Fragestellungen geäußert:

- Generierung eines Atherosklerosemodells mit LMP7-Defizienz:

Beeinflusst die LMP7-Defizienz metabolische Risikofaktoren der Atherosklerose?

- Untersuchung der initialen Atherosklerose:

Hat die LMP7-Defizienz einen Effekt auf die Ausbildung der frühen Atherosklerose?

- Untersuchung der fortgeschrittenen Atherosklerose:

Hat die LMP7-Defizienz in der späten Krankheitsphase Auswirkungen auf

- a) die Proteinhomöostase,
- b) apoptotische Vorgänge oder
- c) inflammatorische Prozesse?

- Untersuchung der proteasomalen Komposition:

Wie verändert der Mangel an LMP7 die proteasomale Komposition?

## 2 Methodik

### 2.1 Verwendete Materialien, Lösungen und Geräte

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Aceton	J.T. Baker
Ammoniumsulfat-Puffer, 10x	Bioline
Essigsäure	Roth
Ethanol, 70%	Herbeta-Arzneimittel
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Formaldehyd, 4%	Roth
Glycin	Roth
Isopropanol	J.T. Baker
Methanol	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich
Polyoxyethylen (20)-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Serva
Tris(hydroxymethyl-aminomethan)	Roth
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30%	Roth
96-er Lochplatte	Greiner
Eppendorftubes	Eppendorf
Durchlichtmikroskop HM-LUX 3	Leitz
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Wippe WT 12	Biometra
Zentrifuge 5415C	Eppendorf
Kamera AxioCamMR3	Zeiss
Mirkroskop Axiovert 200 M	Zeiss
Optovar-Vergrößerungslinse	1,6x
EC Plan-Neofluar	5x/0,16
N-Archoplan	10x/0,25
Plan-Apochromat	40x/0,95

## 2.2 Mausmodell

### 2.2.1 Erzeugung von LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen

LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln auf Basis des defizienten LDL-Rezeptors in Kombination mit einer cholesterinreichen Diät Atherosklerose. Um den Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Atherogenese untersuchen zu können, musste eine Maus mit kombinierter Gendefizienz für den LDL-Rezeptor und die proteolytische Untereinheit LMP7 gezüchtet werden. Dazu wurden LDLR<sup>-/-</sup> (B6.129S7-Ldlrtm1Her/J; JAX Mice, Boston) und LMP7<sup>-/-</sup> (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Antje Vogt, Institut für Biochemie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) Mäuse verwendet. Für beide Genotypen erfolgte eine Rückkreuzung von mindestens 10 Generationen mit der Inzuchtlinie C57BL/6.

Zur Zucht wurden zwei Weibchen im gebärfähigen Alter mit einem Männchen verpaart. Daraus ging eine erste Filialgeneration hervor, die eine heterozygote Ausprägung der defizitären Gene des LDLR und von LMP7 aufwies (Abbildung 3.1). Nach erneuter Kreuzung wurden männliche homozygote Wurfgeschwister vom LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>+/+</sup> Genotyp in der zweiten Filialgeneration gezeugt, welche zur Untersuchung des Effekts der LMP7-Defizienz in der Atherosklerose verwendet wurden (Abbildung 2.1).

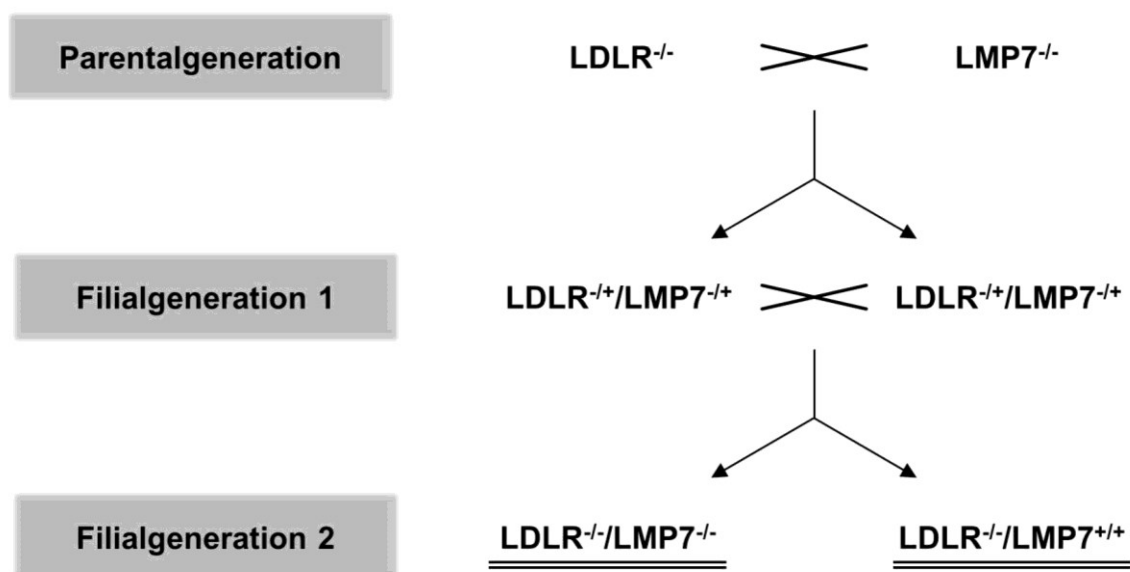


Abbildung 2.1: Zuchtschema für die Zeugung von LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen.



### **2.2.2 Tierhaltung**

Die Haltung und Zucht erfolgte in der Tierexperimentellen Einrichtung des Center for Cardiovascular Research (CCR), Hessische Str. 3-4, 10115 Berlin, unter Einhaltung der gesetzlich vorgegebenen Richtlinien. Die Genehmigung der Tierexperimente erteilte das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, Deutschland (G138/09). Bis zu 3 adulte Tiere wurden in einem Typ II Makrolonkäfig bei konstanter Temperatur (22°C) und unter Einhaltung eines 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Mäuse waren durch Ohrmarkierungen gekennzeichnet. Sie erhielten *ad libitum* Trinkwasser und Futter.

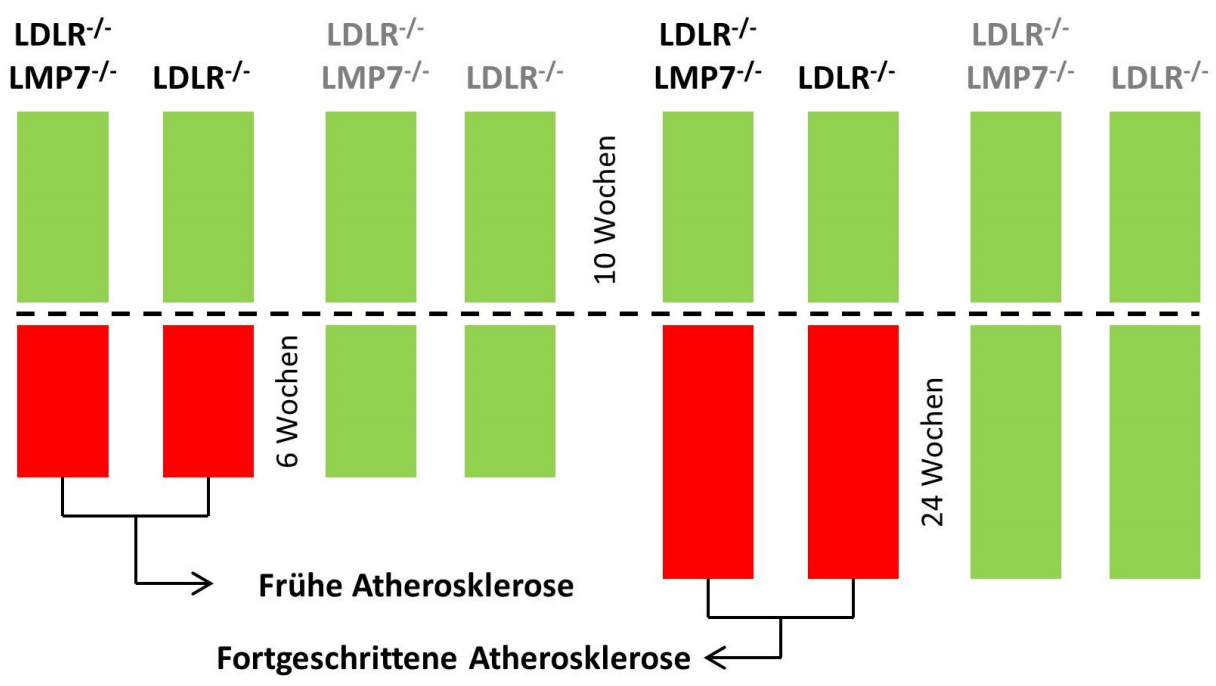
### **2.2.3 Gewichtsbestimmung und Observation**

Wöchentlich erfolgte eine Gewichtsbestimmung. Dabei wurden das Erscheinungsbild (Fellqualität, Größe, Physiognomie) und Verhalten (Essverhalten, Aggressivität, Explorationstrieb) dokumentiert.

### **2.2.4 Versuchsaufbau**

LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäuse wurden ab der 10. Lebenswoche über 6 oder 24 Wochen mit einer Hochfett-Diät (FD) mit 21% Milchfett, 17% Kasein und 0,21% Cholesterin (Western Type Diet, Ssniff, Soest, Deutschland) gefüttert, um ein frühes bzw. ein spätes Atherosklerosestadium zu induzieren. Um den Einfluss der FD untersuchen zu können, erhielten Baselinegruppen beider Genotypen über 6 und 24 Wochen eine Normal-Diät (ND). Abbildung 2.2 gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau und über Parameter, die in dieser Arbeit analysiert wurden.

Versuchsgruppen	n=11	Hochfett-Diät	Normal-Diät
Baselinegruppen	n=11		



<b>Phänotypisierung</b>	Gewicht	Lipidwerte (Serum)
<b>Plaquelast</b>	Gefrierschnitte (Aortenwurzel)	en-face Methode (Aorta)
<b>Plauekomposition</b>	Makrophagen	nekrotische Areale
<b>proteasomale Substrate</b>	Polyubiquitin- Konjugate (Plaue, Leber, Milz)	carbonylierte Proteine (Leber)
<b>proteasomale Untereinheiten</b>	Proteinlysate (Leber, Milz)	26S-Proteasom (Milz)

Abbildung 2.2: Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses der LMP7-Defizienz auf die Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen.

## 2.3 Genotypisierung

### 2.3.1 Isolierung der DNA

Protokoll:

- Schwanzspitzen-Biopsat von 3 mm Länge in ein Eppendorfgefäß übertragen
- Zellyse über 90 Minuten durch Zugabe von 0,5 ml Lysepuffer und 2,5 µl Proteinase K
- Zentrifugation bei 13 000 U/min und 4°C über 15 Minuten
- Fällung der DNA durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol zu 1,5 ml des Überstandes
- Zentrifugation bei 13 000 U/min und 4°C über 15 Minuten, Überstand verwerfen
- separierte DNA bei 4°C mit 0,5 ml Ethanol waschen
- Lufttrocknung der Probe über 5 Minuten
- Lösen der Probe mit 50 µl Aqua dest.

### Material

---

Proteinase K (20 mg/dl)

Qiagen

---

#### *Lysepuffer*

Tris-Base, pH=7,5	100 mM
NaCl	200 mM
EDTA	5 mM
SDS	0,2%

### 2.3.2 Photometrische Konzentrationsmessung der DNA

Die Konzentration der DNA wurde in einem Spektralphotometer DU 640 (Beckmann) bei einer Absorption von 260 nm bestimmt. Bei dieser Wellenlänge und einer optischen Dichte von 1 ( $OD_{260}$ ) beträgt die Konzentration von doppelsträngiger DNA 50 µg/ml. Für die weitere Verwendung wurde die DNA auf 10 ng/µl konzentriert. Dabei wurde die Reinheit der Proben gesichert, indem der Quotient aus  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  über 1,8 lag, was auf eine geringe Verunreinigung der Proben hinwies.

### 2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Vervielfältigung der DNA-Abschnitte wurde durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [77] realisiert. Dabei werden in einem zyklischen Prozess definierte Gensequenzen amplifiziert. Bei jeder Wiederholung kommt es zur Verdopplung der DNA-Fragmente und somit zu einer exponentiellen Anreicherung. Der Prozess basiert auf drei Reaktionsschritten:

Denaturierung: Bei einer Temperatur von 95°C kommt es zur Trennung der Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Strängen der Doppelhelix.

Primerhybridisierung: Die Abkühlung auf 58°C ermöglicht die Anlagerung der gegenläufigen Oligonukleotid-Primer an den kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Strang.

Polymerisation: Die hitzestabile Taq-Polymerase synthetisiert den komplementären Einzelstrang bei 72°C.

10 µl der DNA-Proben wurden entweder mit LDLR -oder mit LMP7-Mastermix versetzt. Anschließend erfolgte die PCR im Thermocycler UNO II (Biotmetra) unter folgenden Bedingungen:

Schritt	Dauer	Temperatur	
Initialisierung	5 Minuten	95°C	
-----			} 34 Zyklen
Denaturierung	40 Sekunden	95°C	
Primer-Anlagerung	40 Sekunden	58°C	
Polymerisation	45 Sekunden	72°C	
-----			
	5 Minuten	72°C	
Abkühlung		4°C	

## Material

---

PCR Nukleotide	Roche
BIOTAQ DNA Polymerase	Bioline

---

### Mastermix

PCR Nukleotide 10 nM	1 $\mu$ l
BIOTAQ DNA Polymerase	0,5 $\mu$ l
Ammoniumsulfat-Puffer, 10x	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 $\mu$ l
LMP7 oder LDLR-Primer je Primer	0,5 $\mu$ l

---

Primer	BioTez
--------	--------

<u>LMP7</u>	5' → 3'
mLMP7-F	GGA CCA GGA CTT TAC TAC GTA GAT G
mLMP7-R	CTT GTA CAG CAG GTC ACT GAC ATC G
mLMP7-Neo	CCG ACG GCG AGG ATC TCG TCG TGA

<u>LDLR</u>	5' → 3'
WT-LDL-163	ACC CCA AGA CGT GCT CCC AGG ATG
WT-LDL-164	CGC AGT GCT CCT CAT CTG ACT TGT C
LDL-NEO 128S	AGG ATC TCG TCG TGA CCC ATG GCG A
LDL-NEO 148S	GAG CGG CGA TAC CGT AAA GCA CGA GG

### 2.3.4 Gelelektrophorese mit Agarosegel

Mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese konnten die in der PCR amplifizierte Genabschnitte sichtbar gemacht werden. An das poröse Agarosegel wurde eine Spannung angelegt, entlang derer die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld wanderten. Durch den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid ließ sich die DNA im ultravioletten Licht identifizieren. Der DNA-Standardmarker lief parallel mit den Proben und ermöglichte deren Größenbestimmung.

#### Protokoll:

- 0,7 g Agarose in 50 ml TAE-Puffer lösen (1,4% Gel) und in der Mikrowelle aufkochen
- 2,5  $\mu$ l Ethidiumbromid hinzufügen und das Gel gießen
- 10  $\mu$ l der DNA-Probe mit 5  $\mu$ l DNA-Probenpuffer versetzen

- Proben bzw. Standardmarker in Geltaschen applizieren
- Durchführung der Elektrophorese bei einer Spannung von 90 mV
- Fotodokumentation unter ultraviolettem Licht

## Material

Agarose	VWR
DNA loading buffer, blue	Bioline
Ethidium Bromid Solution (ultra Pure)	Gibco
Standard-Marker Hyper Ladder™ II	Bioline
<i>TAE-Puffer, pH=8</i>	
Tris-Base	50 mM
Essigsäure	50 mM
EDTA	1 mM
Elektrophorese System - Easy-Cast #B2	Owl
Power Pack P25	Biometra
Geldokumentationssystem - Intas, Gel Jet Imager	Biometra

## 2.4 Präparatgewinnung

Für die Präparation wurden die Mäuse aus der tierexperimentellen Einrichtung des CCR ins Labor transportiert, gewogen und nach einer Nahrungskarenz von etwa zwei Stunden mit Isofluran narkotisiert. Auf einem Präparationstisch erfolgte die Fixierung in Rückenlage. Nach Desinfektion des Torsos mit 70% Ethanol wurden die Körperhöhlen durch einen medianen Hautschnitt eröffnet. Der Zugang zum Herzen wurde durch das Entfernen des Sternums und der Rippen gewährleistet. Das Tier wurde durch Blutentnahme aus dem rechten Ventrikel getötet. Anschließend wurde durch den linken Ventrikel eine isotonische Lösung zur Säuberung der Organe über das Gefäßsystem appliziert. Die Milz und Leber wurden freipräpariert und nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -23°C gelagert. Unter Entfernung von nicht benötigten Geweben (Gastrointestinaltrakt, Perikard, Lunge), wurde die Aorta dargestellt. Das Herz wurde distal der Aortenwurzel vom Gefäßsystem getrennt und entnommen. Die verbliebene Aorta wurde von der dorsalen Rumpfwand bis hin zur iliacalen Bifurkation gelöst und in Formalin bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

## Material

---

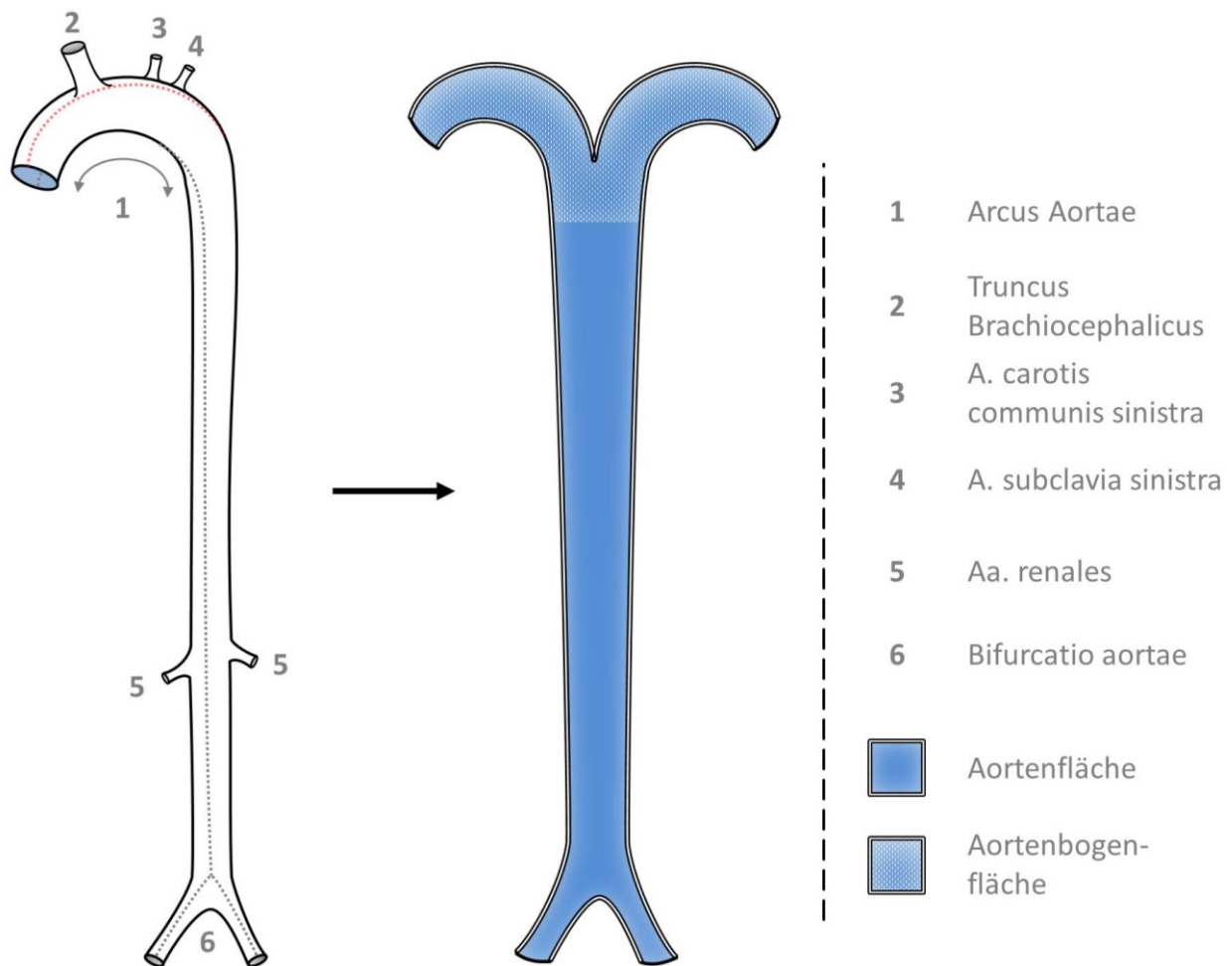
Injektionskanülen und Spritzen	Braun
Isofluran (Forene 100%)	Abbott
Mikrofederschere OC498R	Aesculap
Präparationsbesteck	Braun

### 2.4.1 Serumgewinnung

Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -23°C gelagert.

### 2.4.2 Herstellung von en-face-Präparaten

Die in Formalin gelagerten Aorten wurden zur Untersuchung der intravasalen Oberfläche nach der en-face-Methode präpariert. Dazu wurde die Aorta entlang ihres Verlaufs eröffnet und mit Minutien-Nadeln auf einer silikonbeschichteten Petrischale befestigt (Abbildung 2.3). Gefäßabgänge sowie adventitielles Fettgewebe wurden entfernt. Die Probenlagerung erfolgte in PBS bei 4°C.



**Abbildung 2.3: Präparation der Aorta für die en-face-Analyse** Die gepunktete Linie illustriert die Schnittführung (links). Die luminalen Fläche (blau) des Aortenbogens und der Aorta wurde für die Plaquemessung der frühen bzw. späten Atherosklerose analysiert (rechts).

### 2.4.3 Herstellung von Gefrierschnitten

Nach Entnahme des Herzens aus der Maus wurde dieses über die Aortenwurzel mit PBS sowie einem Tissue-Tek/PBS-Gemisch (2:1) gespült und anschließend in einem Eppendorfgefäß mit Tissue-Tek eingebettet. Zur Fixierung wurde das Präparat über wenige Sekunden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei  $-23^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Jeweils 2 Gefrierschnitte von  $5\ \mu\text{m}$  Dicke wurden mit dem Kryotom Jung CM 3000 bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  in der Kryostatkammer auf einen Objektträger übertragen. Der Querschnitt der Aortenwurzel war durch den luminalen Aspekt der Taschenklappen-Kommissuren gekennzeichnet. Im Durchschnitt wurden pro Aortenwurzel etwa 40 Objektträger gesammelt und bei  $-23^{\circ}\text{C}$  gelagert. In Vorbereitung



auf histologische Färbungen wurden die Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

## Material

---

Modulares Kryostat System Jung CM 3000	Leica
Objektträger Super Frost Plus	R.Langenbrick
Tissue-Tek	Sakura

### 2.4.4 Proteinisolation

Die Proteinextraktion aus Leber und Milz erfolgte vorbereitend auf die Western-Blot-Untersuchung.

Protokoll:

- ein Stück des untersuchten Organs in einem Eppendorfgefäß mit 500 µl Lysepuffer und 2 Edelstahlkugeln ( $\varnothing=4$  mm) in einer Kugelmühle für 30 Sekunden bei 30 Hz lysieren
- Proben für 10 Minuten auf Eis inkubieren
- Zentrifugation über 15 Minuten bei 14 000 U/min bei 4°C
- 100 µl des Überstandes mit 400 µl Aqua dest. in einem Eppendorfgefäß verdünnen
- Lagerung für die Proteinmessung bei -80°C

## Material

---

Glucose	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich
Triton X100	Roth

---

*Lysepuffer, pH=7,4*

Tris-HCL	50 mM
KCl	1,15%
Glucose	5 mM
Triton X100	1%
EDTA	500 µM

---

Kugelmühle MM301	Retsch
------------------	--------

## 2.4.5 Proteinisolation für native Gele

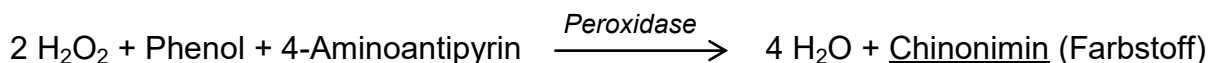
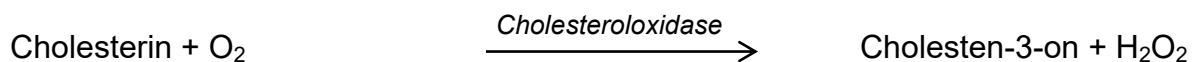
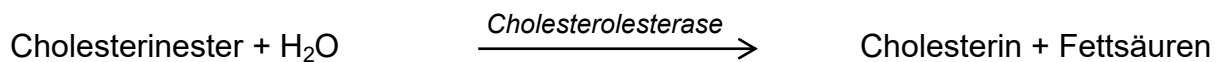
Protokoll:

- ein Stück der Milz in einem Eppendorfgefäß mörsern und mit 200 µl Aqua dest. vermengen
- die Probe zur Lyse über 3 Durchgänge abwechselnd in flüssigem Stickstoff einfrieren und im Wasserbad wiederauftauen
- Zentrifugation über 15 Minuten bei 14 000 U/min und 4°C
- 50 µl des Überstandes mit 450 µl Aqua dest. verdünnen und für die Proteinmessung bei -80°C lagern

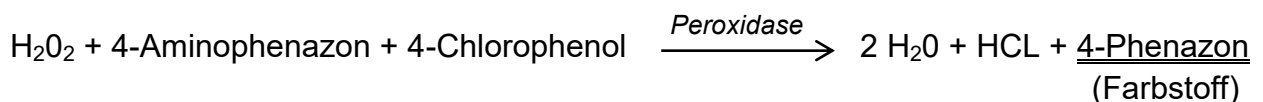
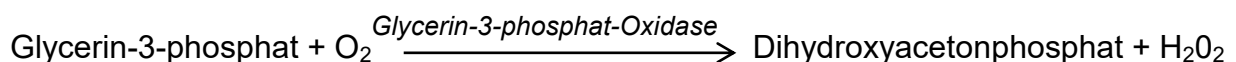
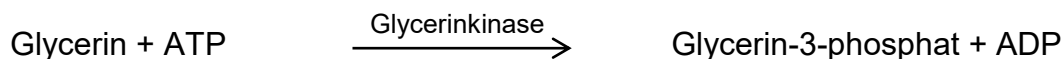
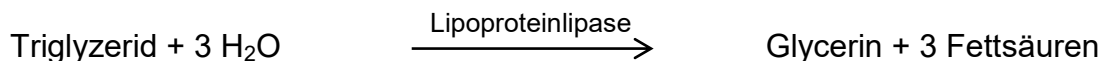
## 2.5 Messung von Gesamtcholesterin, HDL und Triglyzeriden

Die Serumkonzentrationen von Gesamt- und HDL-Cholesterin sowie Triglyzeriden wurden kolorimetrisch bestimmt. In der Folge enzymatischer Reaktionen entsteht ein roter Farbstoff, dessen Farbintensität direkt proportional zur Lipidkonzentration ist. Die Farbintensität kann über die Extinktion photometrisch bestimmt werden. Die Konzentration lässt sich anhand einer Standardkurve berechnen.

Enzymatische Cholesterinbestimmung:



Enzymatische Triglyzeridbestimmung:



Protokoll:

- 4 µl der Serumproben bzw. der Standardreihe und 400 µl des Arbeitsreagenzes R1 miteinander vermischen und über 30 Sekunden schütteln (Vortex)
- 195 µl jeder Probe in zwei Vertiefungen einer 96-er Lochplatte zur Doppel-messung pipettieren
- Inkubation bei 37°C
- Ermittlung der Extinktion bei 546nm

Proben von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen, die eine FD erhalten hatten, wurden zuvor 5-fach verdünnt.

Der HDL-Gehalt wurde nach Präzipitation des LDL-Cholesterins ermittelt [78]:

- 50 µl Serum mit 6,25 µl Präzipitationslösung inkubieren und mischen (Vortex)
- Zentrifugation bei 14 000 U/min und 4°C
- Überstand für Cholesterinmessung verwendet

## Material

---

Elisa Kit Fluitest Chol

Analyticon

### *Arbeitsreagenz R1*

Pipes Puffer, pH=6,9	90 mM
Phenol	26 mM
Cholesterinoxidase	200 U/l
Cholesterinesterase	300 U/l
Peroxidase	1250 U/l
4-Aminophenazon	0,4 mM

### *Standardlösung R4*

Cholesterin	5,17 mM
-------------	---------

Elisa Kit Fluitest TG

Analyticon

### *Arbeitsreagenz R1*

Pipes Puffer, pH=7,8	50 mM
p-Chlorophenol	2 mM
Lipoproteinlipase	150 000 U/l
Glycerinkinase	800 U/l
Glycerol-3-Phosphat-Oxidase	4000 U/l
Peroxidase	440 U/l
4-Aminophenazon	0,3 mM
ATP	0,7 mM
Mg <sup>2+</sup>	0,3 mM

Natriumcholat	40 mM
Kaliumhexacyanidoferrat (II)	1 mM

#### Standardlösung R4

Glycerol	2,28 mM
----------	---------

---

#### Präzipitationslösung

1 g Phosphorwolframsäure in 25ml 16% Natriumhydroxid	2,5 ml
2 M Magnesiumcholid	625 µl

## 2.6 Histologische Färbungen

### 2.6.1 Prinzip der Fettfärbung

Die Atherogenese ist durch intra- und extrazelluläre Fettanreicherungen in der Gefäßwand gekennzeichnet. Lipidfarbstoffe wie die Diazoverbindungen Ölrot-O und Sudan IV werden deshalb zur Identifikation der Läsionen genutzt (Abbildung 2.4). Aufgrund ihrer hohen Löslichkeit in lipoiden Substanzen, diffundieren sie aus ihren Lösungsmitteln (Aceton, Isopropanol) zur intravasalen Fettablagerung.

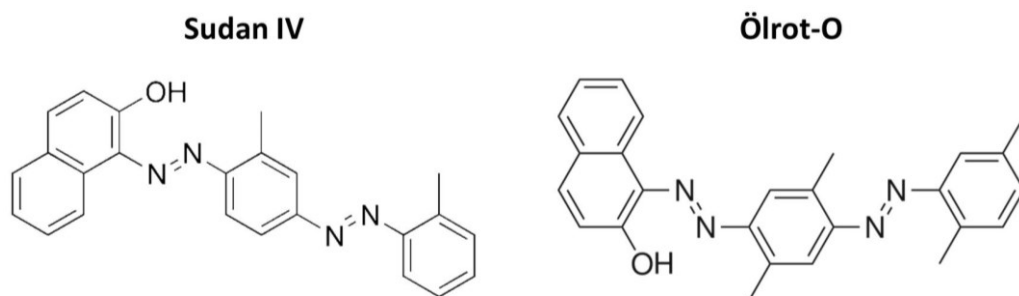


Abbildung 2.4: Strukturformel der Azofarbstoffe Sudan IV und Ölrot-O.

### 2.6.2 Sudan IV-Färbung

Von jedem Tier wurden die en-face-Präparate zur Darstellung vaskulärer Läsionen mit Sudan IV angefärbt.

**Auswertung:** Mit einer am Stereomikroskop adaptierten Digitalkamera wurde das gefärbte Areal der Aortenbogen von Mäusen, die über 6 Wochen eine FD erhielten, fotografiert. Die Bilder wurden in das Programm Adobe Photoshop importiert, um Artefakte und den Bildhintergrund zu entfernen. Anschließend erfolgte die verblindete Messung von Plaqueflächen und Aortenbogenflächen in der NIH Freeware ImageJ. Zur

Selektion der rot gefärbten Plaques wurden Schwellenwerte im 8-bit Graustufenmodus verwendet.

Tiere, die nach 24 Wochen FD eine fortgeschrittene Atherosklerose aufwiesen, entwickelten flächige Läsionen. Die Größe dieser Flächen wurden ebenso wie die aortale Gesamtfläche mit dem Konturwerkzeug des Programms Axiovision 4.8 (Zeiss) bestimmt (Abbildung 2.3). Die Plaquelast wurde als prozentualer Anteil der Plaquelast an der Aortenbogen- bzw. Aortenfläche angegeben.

Protokoll:

<b>Schritt</b>	<b>Dauer bei RT</b>	<b>Bemerkungen</b>
PBS entfernen		
50% Methanol	10 Minuten	Aktivierung
Sudan IV-Färbelösung	10 Minuten	Färbung
70% Ethanol	kurz	Differenzierung
Aqua dest.	kurz	Waschen
PBS		Lagerung

### **Material**

Sudan IV	Sigma-Aldrich
----------	---------------

#### *Färbelösung*

Aceton	50 ml
70% Ethanol	50 ml
Sudan IV	0,3 g

Stereomikroskop MZ-6	Leica
Lichtquelle KL 1500	Leica
Spiegelreflexkamera EOS 550D	Canon
Objektiv EF-S 18-55mm 3,5-5,6 IS	Canon

### **2.6.3 Ölrot-O-Färbung**

Zur Detektion intimaler Läsionen wurden je Maus 4 Objektträger mit Gefrierschnitten der Aortenwurzel mit Ölrot-O angefärbt. Die Gebrauchslösung wurde aufgrund der begrenzten Haltbarkeit für maximal 2 Stunden verwendet.

Protokoll:

<b>Schritt</b>	<b>Dauer bei RT</b>	<b>Bemerkungen</b>
4% Formalin (Roti-Histofix)	15 Minuten	Fixierung
Aqua dest.	2 Minuten	Waschen
60% Isopropanol	5 Minuten	Aktivieren
1,2%ige Ölrot-O Gebrauchslösung	10 Minuten	Färben
Isopropanol	20 Sekunden	Differenzieren
Aquatex		Eindecken

**Auswertung:** Die Gefrierschnitte wurden bei 50- bzw. 80-facher Vergrößerung (zur Analyse der frühen bzw. späten Atherosklerose) fotografiert. Zur Quantifizierung der Plaqueflächen wurde das Konturinstrument der Software Axiovision verwendet.

### **Material**

Eindeckmittel Aquatex	Merck
Oil Red O	Sigma-Aldrich

#### *Stammlösung, 3%ig (filtriert)*

Ölrot-O	0,75 g
Isopropanol	250 ml

#### *Gebrauchslösung, 1,2%ig*

3%ige Stammlösung	120 ml
H <sub>2</sub> O	80 ml

### **2.6.4 Movat-Pentachrom-Färbung**

Zur Einschätzung der Plaquemorphologie wurden Movat-Pentachrom-Färbungen nach VERHÖFF von Gefrierschnitten der Aortenwurzel angefertigt. Mit Hilfe der 5 Farbstoffe konnten Strukturen der Plaque analysiert werden (Herstellerangaben):

<b>Struktur</b>	<b>Farbe</b>
Zellkerne	blauschwarz
Muskel	rot
Grundsubstanz	blau
Knorpelgewebe	rötlich-gelblich
Knochen	dunkelrot

Protokoll:

<b>Schritt</b>	<b>Dauer bei RT</b>	<b>Bemerkungen</b>
Roti-Histofix 4%	15 Minuten	Fixation
Aqua dest.	2 Minuten	Waschen
Essigsäure 3%	30 Sekunden	Vorbehandeln
Alcianblau 1%	30 Minuten	Färben
Aqua	2 Minuten	Wässern
Verhoeff Gebrauchslösung	8 Minuten	Färben der Kerne
Eisen(III)Chlorid Lösung 1%	1 Minuten	Beizen
Aqua	10 Minuten	Wässern
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	6 Minuten	Färben Zellplasma
Essigsäure 1%	30 Sekunden	Differenzieren
Phosphorwolframsäure 2%	15 Minuten	Beizen
Essigsäure 1%	1 Minuten	Differenzieren
Ethanol 99% vergällt	3 Minuten	Entwässern
Ethanol 99% vergällt	15 Minuten	Entwässern
Safron du Gatinais	15 Minuten	Färben der Fasern
Ethanol 99% vergällt	2 Minuten	Entwässern
Ethanol 99% vergällt	2 Minuten	Entwässern
2-Propanol	3 Minuten	Entwässern
Xylol	2 x 10 Minuten	Entwässern
Entellan		Eindecken

**Auswertung:** Die Gefrierschnitte wurden bei 50-facher Vergrößerung unter Verwendung der Software Axiovision fotografiert. Für die Messung nekrotischer Areale wurden Flächen, in denen Zellkerne und Zytoplasma fehlten, mit Hilfe des Konturinstruments umfahren.

## Material

Xylol	J.T. Baker
Entellan Eindeckmittel	Merck
Färbekit: Movat's Pentachrom nach VERHÖFF	Morphisto
Alcianblau	1%

VERHÖFF Stammlösung A, B und C	
Eisen(III)-Chlorid	1%
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	
Phosphorwolframsäure	2%
Safron du Gatinais	
Essigsäure	12%

## 2.7 Immunhistochemische Färbungen

### 2.7.1 Die immunologische Methode

Bei immunologischen Verfahren wird die Eigenschaft von Antikörpern, ein spezifisches Antigen zu binden, genutzt. Das Präparat wird zunächst mit einem Primärantikörper inkubiert. Dieser zeichnet sich durch eine hohe Affinität gegen spezifische Epitope aus. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wird über Detektionssysteme sichtbar gemacht, die entweder direkt mit dem Primärantikörper oder mit einem gegen diesen gerichteten Sekundärantikörper konjugiert sind. In der vorliegenden Arbeit werden dazu entweder Reporterenzyme genutzt, die die Bildung von Chromogenen (DAB) und Luminophoren (Luminol) katalysieren oder Fluorochrome (FITC, Cy3), die zur Lichtemission angeregt werden (Abbildung 2.5).

Bei jeder Färbung wurden Negativkontrollen, d.h. Objektträger, die anstatt des Primärantiköpers mit Ab-Diluent inkubiert wurden, mitgeführt. Die immunologische Methode ist Grundlage der immunhistochemischen und immunfluoreszenten Färbungen sowie des Western Blots.

### Material

---

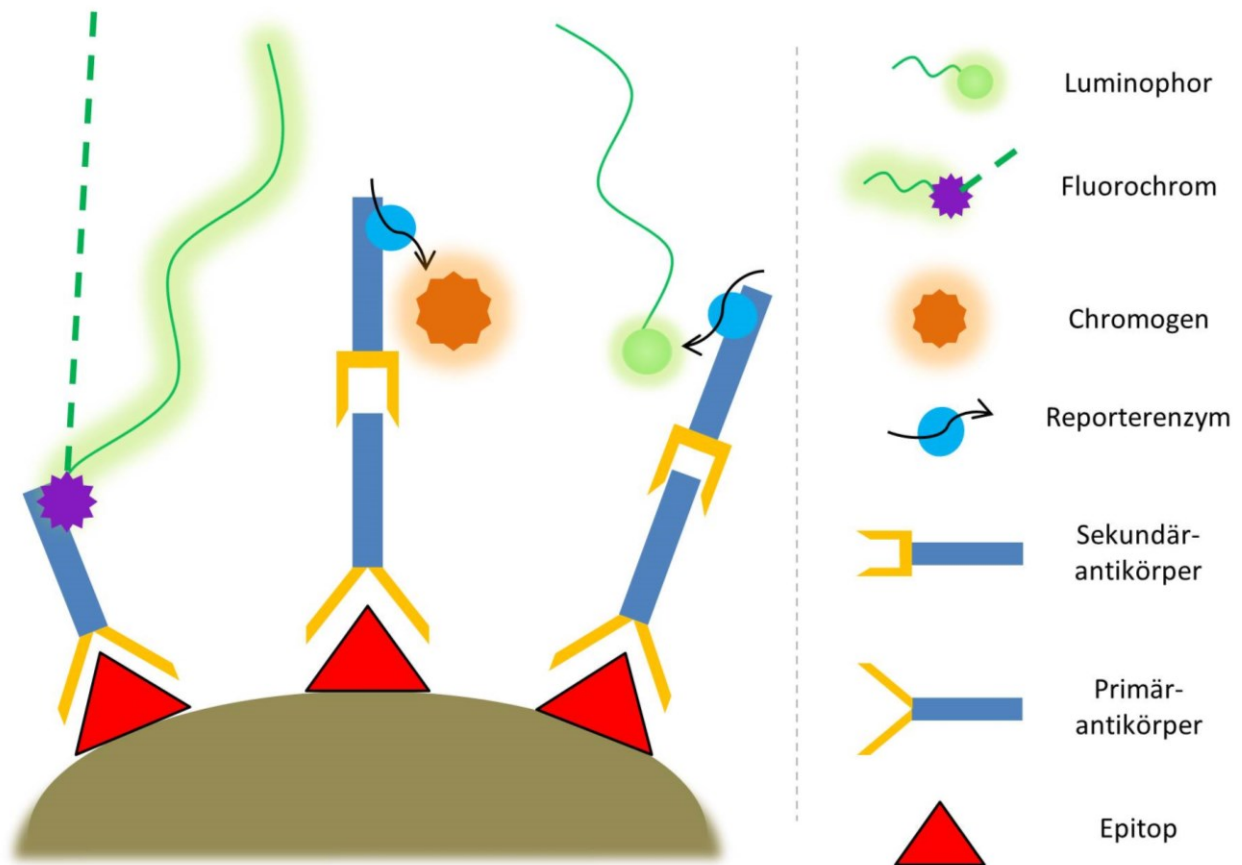
Ab-Diluent	Thermo Scientific
Eindeckmedium Immu-Mount	Thermo Scientific
Eindeckmedium mit DAPI Vectashield®	Vector
PAP-Pen	Abcam
Ziegen-Serum (non immune goat) 10%	Invitrogen

---

### *PBS/T-Waschpuffer*

PBS	1x
Tween 20®	0,05%





**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung verwendeter immunologischer Detektionsmethoden.** Der Primärantikörper identifiziert das spezifische Epitop eines Eiweißes (braun). Darstellung von Primär- (links) oder Sekundärantikörper (zentral, rechts) gekoppelten Detektionssystemen. Fluorochrome werden zur Lichtemission (grüne Welle) angeregt (grün-gestrichelt). Reporterenzyme katalysieren Farbstoffproduzierende Reaktion von Chromogenen und Luminiphoren.

### 2.7.2 FK2 Polyubiquitininfärbung

Für die Detektion von mono- und polyubiquitinierten Proteinen in Aortenwurzel-Plaques wurde die immunohistochemische Färbung mit dem FK2 Antikörper etabliert. Folgende Schritte wurden zur Optimierung der Färbung durchgeführt:

Da Zellschrott, Kalzifikationen, Cholesterinkristalle und Kollagen in der Plaque unspezifische Bindungsstellen für Antikörper darstellen, wurde nicht-immunogenes Ziegen Serum verwendet, um diese zu blockieren.

Um eine unspezifische Reaktion des Sekundärantikörpers mit endogenen Fc-Fragmenten im Mausgewebe zu verhindern, wurden die Bindungsstellen durch einen Antikörper blockiert (IgG-Block). Dies war notwendig, da der FK2 Primärantikörper aus Mäusen gewonnen wurde und somit ein Maus Fc-Fragment besitzt.

Zur besseren Abgrenzung der Zellkerne, wurde das in der Hellfeldmikroskopie unsichtbare Fluorochrom DAPI (Kapitel 2.8) für die Kernfärbung verwendet.

Protokoll:

<b>Schritt</b>	<b>Dauer bei RT</b>	<b>Bemerkung</b>
Mikrowelle 600 Watt	1 Minuten	Hitzedenaturierung
Aceton	10 Minuten	Fixierung (bei 4°C)
Lufttrocknen	30 Minuten	Trocknen
PBS	2 x 5 Minuten	Waschen
<i>Schnitte mit PAP-PEN-Stift umfahren um Austrocknung zu verhindern.</i>		
Ziegen-Serum, 10%	30 Minuten	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
PBS/T	3 x 5 Minuten	Waschen
Ig-G-Block Antikörper, unkonjugiert	2-3 Stunden	Blockierung endogener Fc-Fragmente
PBS/T	3 x 5 Minuten	Waschen
Primärantikörper anti-FK2	Über Nacht	Antigendetektion (bei 4°C)
PBS/T (Spritzflasche)		Waschen
PBS/T	1 x 5 Minuten 2 x 2 Minuten	Waschen
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol	20 Minuten	Verbrauch endogener Peroxidase Aktivität
PBS	1 x kurz 2 x 5 Minuten	Waschen
Sekundärantikörper, Biotin-konjugiert	30 Minuten	Detektion des Primärantikörpers
PBS/T (Spritzflasche)		Waschen
PBS/T	5 Minuten	Waschen
PBS	2 x 2 Minuten	Waschen
HRP-Streptavidin	10 Minuten	Reporterenzym
PBS	3 x 2 Minuten	Waschen
DAB-Inkubation	45 Sekunden	Färbung
Aqua dest.	1 x kurz 2 x 5 Minuten	Waschen
Eindeckmedium mit DAPI		DAPI-Kernfärbung, Eindecken
<i>Arbeitsschritt in feuchter Kammer</i>		

**Auswertung:** Die Zellkernfärbung und die Polyubiquitin-färbung wurden separat bei 100-facher Vergrößerung fotografiert und als zwei Kanäle eines Bildes in Axiovision gespeichert. Dadurch erhielt man ein überlappendes Bild, auf dem mit dem Ereignis-Werkzeug die Anzahl DAB bzw. DAPI gefärbter Plaquezellen bestimmt wurde.

## Material

---

Antikörper (Verdünnung in Ab-Diluent)

mouse anti-FK2 ubiquitin (1:100)	Enzo Life Sciences
goat anti-IgG, unkonjugiert (1:10)	Jackson
goat anti-mouse IgG, Biotin-konjugiert (1:500)	Jackson

---

DAB-Kit

Zymed

Streptavidin-Peroxidase

Zymed

## 2.8 Immunfluoreszenzfärbungen

Fluorochrome sind an Erst- oder Zweitantikörper gebunden und können durch eine bestimmte elektromagnetische Wellenlänge zur Emission von Licht angeregt werden. Im Gegensatz zur Reporterenzym-gekoppelten Detektion ist die Amplifikation des Signals geringer und die räumliche Auflösung höher. Das Detektionssystem eignet sich gut, um auf einem Objektträger mehrere Epitope gleichzeitig anzufärben.

Für die Färbung des Zellkerns wurde das fluoreszierende 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet. Es interkaliert in die AT-reichen Regionen der DNA. Bei Anregung durch UV-Licht kommt es zur Emission von blauem Licht (462 nm).

### 2.8.1 Mac-2 Makrophagenfärbung

Das Glykoprotein Mac-2 wird auf vielen Makrophagenlinien und inflammatorischen Makrophagen exprimiert und wird deshalb als Makrophagenmarker verwendet. Pro Versuchstier wurden 4 Objektträger angefärbt (Protokoll siehe Kapitel 2.8.2).

**Auswertung:** Die Gefrierschnitte wurden am Tag der Färbung mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 50-facher Vergrößerung fotografiert. Unter Verwendung von Axiovision konnte anhand einer Schwellenwertermittlung die rot gefärbte Fläche innerhalb der Plaque bestimmt werden.

## Material

---

Antikörper (Verdünnung in Ab-Diluent)

rat anti-Mac-2 (1:400)	Cedarlane Laboratories
donkey anti-rat IgG, Cy3-konjugiert (1:500)	Jackson Immunoresearch

## 2.8.2 FK2 und Mac-2 Doppelfärbung

Die fluoreszente Doppelfärbung mit anti-Mac-2 und -FK2 Antikörpern diente dem qualitativen Nachweis von Makrophagen und Polyubiquitin-Konjugaten in der fortgeschrittenen Atherosklerose. Dadurch sollte zum einen die Spezifität der immunhistochemischen FK2 Färbung verifiziert (Kapitel 2.7.2) und die Lokalisation von Makrophagen und polyubiquitinierten Proteinen in der Plaque analysiert werden.

Der Nachweis erfolgte nach dem Mac-2 Färbeprotokoll mit dem Unterschied, dass als zusätzlicher Primärantikörper der FITC-konjugierte anti-FK2 Antikörper (Verdünnung 1:200 in Ab-Diluent) verwendet wurde.

Protokoll:

<b>Schritt</b>	<b>Dauer bei RT</b>	<b>Bemerkungen</b>
Aceton	10 Minuten	Fixierung (bei 4°C)
	30 Minuten	Trocknen
PBS	2 x 5 Minuten	Waschen
<i>Schnitte mit PAP-PEN-Stift umfahren um Austrocknung zu verhindern.</i>		
Ziegen-Serum, 10%	30 Minuten	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
PBS/T	3 x 5 Minuten	Waschen
Primärantikörper anti-Mac-2 (+ anti-FK2, FITC-konjugiert) PBS/T (Spritzflasche)	Über Nacht	Antigendetektion (bei 4°C) (Kapitel 2.8.2) Waschen
PBS/T	1 x 5 Minuten 2 x 2 Minuten	Waschen
Sekundärantikörper, Cy3-konjugiert PBS/T (Spritzflasche)	30 min	Detektion des Primärantikörpers Waschen
PBS/T	5 Minuten	Waschen
PBS	2 x 2 Minuten	Waschen
Eindeckmedium mit DAPI		DAPI-Kernfärbung, Eindecken
Nagellackversiegelung		
<i>Arbeitsschritt in feuchter Kammer</i>		

## Material

anti-FK2 ubiquitin, FITC konjugiert (1:200)

Enzo Life Sciences

## 2.9 Western Blot

Der qualitative und semiquantitative Nachweis von Proteinen erfolgte mittels Western Blot. Das Verfahren beinhaltet die Separation (SDS-PAGE), den Transfer (Blotten) und die Detektion von Eiweißen.

### 2.9.1 Proteinquantifizierung

Zunächst wurde der Proteingehalt der Milz- und Leberlysate mit Hilfe des „BCA Protein Assay Kits“ bestimmt. Die Messung basiert auf der Eigenschaft von Proteinen, zweiwertiges Kupfer (Lösung B) zu reduzieren. Das daraus hervorgehende einwertige Kupfer bildet mit Bicinchoninsäure (Lösung A) einen violetten Farbkomplex, über den die Probe photometrisch quantifiziert werden kann.

Protokoll:

- Proteinprobe im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. verdünnen
- Als Kontrolle verdünnten Lysepuffer bzw. Aqua dest. (native PAGE) verwenden
- 10 µl der Probe mit 200 µl Reaktionsreagenz (BCA und Kupfersulfatlösung) vermengen und in jeweils zwei Vertiefungen der 96-Loch Platte pipettieren
- Als Standard BSA-Lösung mit bekannter Konzentrationen von 0,1 bis 1 µg/µl verwenden
- Inkubation bei 37°C für 30 Minuten
- Extinktionsmessung bei 570 nm im ELISA-Reader
- Proteinkonzentrationsbestimmung mit WinRead Software

### Material

---

BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce
BSA-Standardlösung	Pierce

---

Wärmeschrank	Heraeus
ELISA Reader	Anthos

## 2.9.2 SDS-PAGE

Bei der *Sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel electrophoresis* (SDS-PAGE) werden Proteine durch die Wirkung eines elektrischen Feldes in einem Polyacrylamidgel nach ihrer Molekülgröße getrennt. Zuvor werden diese durch Kochen im SDS-Probenpuffer denaturiert und erhalten durch Anlagerung von SDS eine negative Ladung.

Protokoll:

- 10 µg Protein mit 5 µl des 5x Probenpuffers für 5 Minuten bei 95°C in einem Thermoblock erhitzen und anschließend kurz zentrifugieren
- Proben in Geltaschen auftragen
- für 15 Minuten (bis zum Eintritt der Proben in das Trenngel) eine Stromstärke von 10 mA einstellen
- Über 90 Minuten (proteolytische Untereinheiten) bzw. 120 Minuten (Oxyblot und Ubiquitin) Elektrophorese bei 15 mA durchführen
- Entnahme des Gels aus Elektrophoresekammer
- Inkubation des Trenngels über 15 Minuten im Blotpuffer

Das Gel entsteht durch die Polymerisation der Acrylamidmonomere und die Quervernetzung durch N,N-Methylenbisacrylamid. Die Polymerisation wird radikalisch durch Ammoniumpersulfat initiiert und durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Die Porengröße ist abhängig von der Acrylamidkonzentration. Für den Nachweis ubiquitiniertes und carbonylierter Proteine wurden 8%ige und für die Detektion von proteasomalen Untereinheiten 12%ige Trenngele benutzt. Die genaue Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele ist nachfolgend aufgelistet.

	<b>Sammelgel</b>	<b>Trenngel 8%</b>	<b>Trenngel 12%</b>
Aqua dest.	3,65 ml	3,28 ml	2,69 ml
1,5 M Tris, pH=8,8	–	1,56 ml	1,56 ml
1 M Tris, pH=6,8	625 µl	–	–
Acrylamid 40%	625 µl	1,28 ml	1,89 ml
SDS 10%	62,5 µl	62,5 µl	62,5 µl
APS 10%	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	4µl

## Material

---

Acrylamid, 40%		Roth
Ammoniumpersulfat (APS), 10%		Sigma-Aldrich
Bromphenolblau		Biomol
$\beta$ -Mercaptoethanol		Sigma-Aldrich
Glycerol		Sigma-Aldrich
Molekulargewichtsmarker		Thermo Scientific
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED)		Sigma-Aldrich

---

<i>10x SDS-Laufpuffer</i>		<b>(Oxyblot)</b>	
Tris-Base	30,3 g	30,3 g	
Glycin	144 g	144 g	
SDS	10 g	12 g	
Aqua dest.	ad 1000 ml	1000 ml	
<i>5x SDS-Probenpuffer</i>			
1 M Tris, pH=6,8	655 $\mu$ l		
99% Glycerol	2 ml		
$\beta$ -Mercaptoethanol	500 $\mu$ l		
10% SDS	2,3 ml		
Bromphenolblau	10 mg		
Aqua dest.	ad 10 ml		

---

Elektrophoresekammer TV100	Roth
Power Supply EPS 600	GE Healthcare
Thermoblock	Eppendorf
Zentrifuge 5415C	Eppendorf

### 2.9.3 Native PAGE

Um die Komposition von 26S-Proteasomen untersuchen zu können, wurde eine native PAGE durchgeführt, d.h. dass keine Zerstörung der Proteinstruktur erfolgte. Dazu wurden 10  $\mu$ g des Proteins je Bahn auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und über 4 Stunden bei 120 V unter ständiger Kühlung getrennt. Anschließend wurde das Gel über 30 Minuten im Entwicklungspuffer inkubiert, der ATP und SLLVY enthielt. Letzteres ist ein Substrat, welches nach proteasomaler Degradation fluoresziert, sodass mit Hilfe einer UV-Lampe die Lage von Proteasomen detektiert werden konnte.

## Material

---

ATP	Sigma-Aldrich
SLLVY	Bachem
Tris-Acetat Polyacrylamid-Gel, 3-8%	Life Technologies

---

### *Probenpuffer nativ*

Tris-HCL, pH=6,8	120 mM
Glycerol	20%

### *Entwicklungspuffer*

ATP	5 $\mu$ M
SLLVY	100 $\mu$ M

## 2.9.4 Extraktion von 26S-Proteasom

Die fluoreszierende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in einem Eppendorfgefäß zerkleinert. Nachdem die Gelstücken bei 4°C über Nacht im Proben-Puffer inkubiert wurden, erfolgte die Zentrifugation über 30 Minuten bei 14000 U/min unter Verwendung eines Zentrifugationsfilters. Das filtrierte Proteinlysate wurde zur Lagerung eingefroren. Die approximative Bestimmung der Proteinmenge wurde über die Darstellung der  $\alpha$ 4-Untereinheit im Western Blot und deren densitometrische Auswertung unter Verwendung des Programms Fusion Solo durchgeführt. Anhand dieser Messung konnten annähernd gleiche Mengen von 26S-Proteasom aus LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen für die Darstellung der proteolytischen  $\beta$ -Untereinheiten im Western Blot aufgetragen werden. Die  $\alpha$ 4-Untereinheit diente als Ladekontrolle.

## Material

---

DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Zentrifugationsfilter Amicon Ultra-2	Millipore

---

### *Proben-Puffer (4°C)*

Tris-HCL, pH=6,8	120 mM
DTT	200 $\mu$ M
SDS	4%
Bromphenol Blau	0,002%
Glycin	20%





## 2.9.6 Proteindetektion

Protokoll:

Schritt	Dauer bei RT	Bemerkungen
Roti-Block BSA-Puffer (Oxyblot)	1,5 Stunden	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen
TBS/T	3 x 10 Minuten	Waschen
Primärantikörper	Über Nacht	Antigendetektion (bei 4°C)
TBS/T PBS/T (Oxyblot)	1 x 5 Minuten 3 x 10 Minuten	Waschen
Sekundärantikörper, Peroxidase-konjugiert	2 Stunden	Detektion des Primärantikörpers
TBS/T PBS/T (Oxyblot)	1 x 5 Minuten 3 x 10 Minuten	Waschen
ECL-Inkubation	3 Minuten	Luminophor
FUSION SOLO		Chemilumineszenzfotografie

*Arbeitsschritt in dunkler Kammer*

**Auswertung:** Die Detektion der Proteine auf der PVDF-Membran Proteine erfolgte über die Chemilumineszenz des Luminophor Luminol in einer digitalen Dunkelfotokammer.

### Material

#### *Primärantikörper (Verdünnung in Roti-Block)*

anti-β5 (1:1000)	Abcam
anti-β2 (1:2000)	Abcam
anti-β1 (1:2000)	Abcam
anti-β1i/LMP2 (1:2000)	Abcam
anti-β5i/LMP7 (1:2000)	Epitomics
anti-β2i/MECL-1 (1:2000)	Institut für Biochemie
anti-α4 (1:20 000)	Institut für Biochemie
anti-ubiquitin (1:1000)	Dako

#### *Sekundärantikörper*

goat anti-rabbit IgG, HRP-konjugiert (1:10 000)	Santa Cruz
goat anti-mouse IgG, HRP-konjugiert (1:10 000)	Santa Cruz

Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma-Aldrich
Roti-Block	Roth

### 10x TBS-Waschpuffer, pH=7,4

Tris	30 g
NaCl	80 g

### TBS/T-Waschpuffer

1x TBS
0,1% Tween 20®

### (Oxyblot)

1x TBS
0,05% Tween

### Blockpuffer

Roti-Block	1 Teil	BSA
PBS	9 Teile	

---

Abbildungssystem FUSION SOLO

Vilbert

Enhanced Chemiluminescence Solution

Amersham

## 2.9.7 Ladekontrolle

Der Diazofarbstoff Amido black wurde genutzt, um eine gleichmäßige Proteinbeladung der einzelnen Geltaschen nachzuweisen.

Protokoll:

- Färbung der PVDF-Membran in Amido-black-Lösung für 10 Minuten
- Waschen der Membran für 30 Minuten in Entfärbelösung
- Fotografie der Membran mit Digitalkamera

## Material

---

Amido black Staining Solution

Sigma-Aldrich

100% Essigsäure (Eisessig)

Merck

### Entfärbelösung

Isopropanol	25%
Essigsäure	10%

## 2.9.8 Oxyblot

Oxidative Modifikationen von Proteinen führen zur Bildung von Carbonylgruppen in den Aminosäureseitenketten. Carbonylierungen können mit Hilfe des Oxyblot detektiert werden. Das Verfahren beruht auf der nukleophilen Addition von 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) an die Carbonylgruppen. Als Produkt dieser

Derivatisierungsreaktion wurde 2,4-Dinitrophenylhydrazon (DNP) im Western Blot durch einen Antikörper detektiert. Der Nachweis wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

## **Material**

---

OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit

Millipore

2,4-Dinitrophenylhydrazine

Neutralisierungslösung

Standard-Protein-Mischung mit DNP Residuen

Primärantikörper Rabbit Anti-DNP Antibody (Verdünnung in BSA-Puffer)

Sekundärantikörper Goat Anti-Rabbit IgG (HRP-konjugiert)

Derivatisierungs-Kontroll Lösung

## **2.10 Statistik**

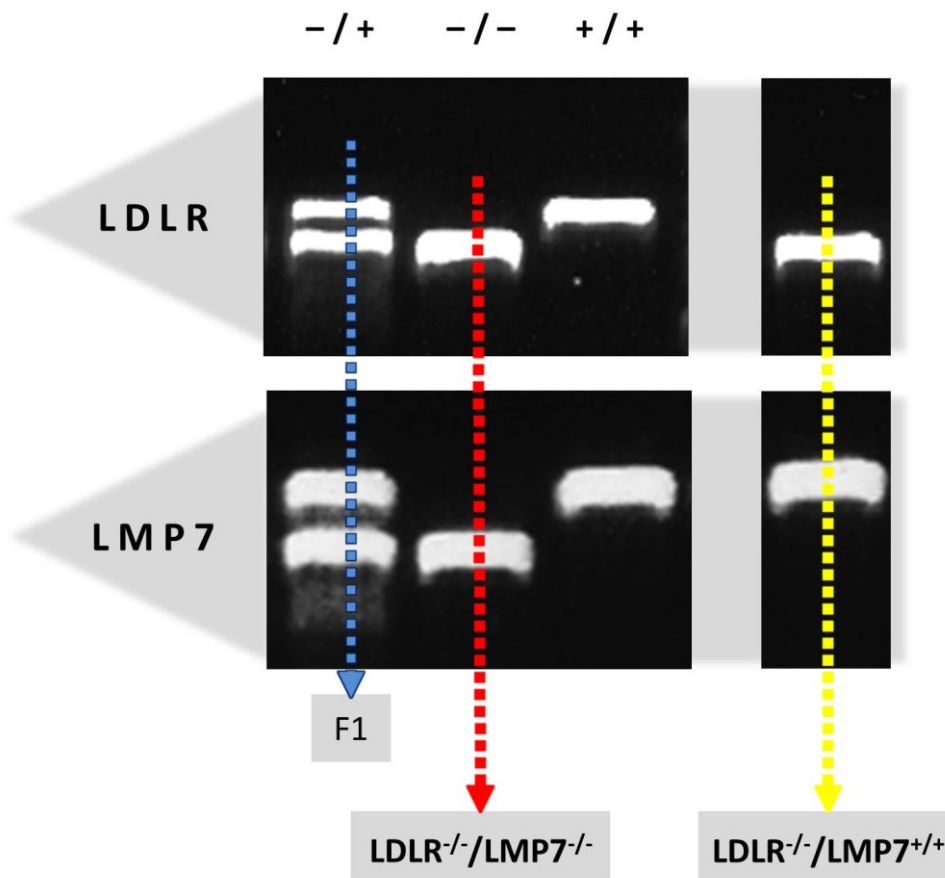
Die statistische Auswertung wurde unter Verwendung der GraphPad Prism Software durchgeführt. Der Shapiro-Wilk-Test wurde genutzt um zu überprüfen, ob eine Normalverteilung der Stichprobe vorliegt. Mit Hilfe des F-Tests wurde bei normalverteilten Messwerten errechnet, ob sich diese hinsichtlich ihrer Varianz wesentlich unterscheiden. Für normalverteilte Variablen ohne wesentliche Varianzunterschiede wurde der ungepaarte-T-Test und für solche mit wesentlichen Varianzunterschieden der Welch-Test verwendet. Bei nicht-normalverteilten Werten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung des Tiermodells

##### 3.1.1 Erzeugung von $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$ Mäusen

Um die Auswirkungen der LMP7-Defizienz in der Atherosklerose untersuchen zu können, wurden erstmals Mäuse mit  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  Genotyp generiert. Als Kontrollen wurden  $LDLR^{-/-}/(LMP7^{+/+})$  Wurfgeschwister verwendet. Die Genotypen wurden mit Hilfe der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte durch die PCR identifiziert. In genetischem Material von  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  Mäusen konnten keine intakten Genabschnitte für den LDL-Rezeptor und für LMP7 nachgewiesen werden (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1: Genotypisierung von  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  und  $LDLR^{-/-}/(LMP7^{+/+})$  Mäusen.** Die Banden repräsentieren defizitäre ( $-/-$ ), intakte ( $+/+$ ) oder heterozygote ( $-/+$ ) Allele des LMP7 bzw. LDLR-Gens. Zur Genotypisierung wurden spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert, elektrophoretisch getrennt und auf dem Agarose-Gel kenntlich gemacht. Beispielhaft zeigen die Pfeile das Bandenmuster für die homozygoten Versuchsgruppen (rot, gelb) und heterozygote Filialgeneration 1 (hellblau).

### 3.1.2 Phänotypisierung

Um einen Einfluss der LMP7-Defizienz auf pathogenetische Faktoren der Atherosklerose zu untersuchen, wurden phänotypische Parameter analysiert.

#### 3.1.2.1 Allgemeinzustand und Körpergewicht

Die Tiere wurden im Abstand von 7 Tagen regelmäßig observiert und gewogen. LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten dabei im Erscheinungsbild (Fellqualität, Größe, Physiognomie), Verhalten (Essverhalten, Aggressivität, Explorationstrieb) und der Sterblichkeit keine Auffälligkeiten im Vergleich zu den LDLR<sup>-/-</sup> Wurfgeschwistern.

[g]	6 Wochen ND / FD		P	24 Wochen ND / FD		P
	LDLR <sup>-/-</sup>	LDLR <sup>-/-</sup> / LMP7 <sup>-/-</sup>		LDLR <sup>-/-</sup>	LDLR <sup>-/-</sup> / LMP7 <sup>-/-</sup>	
KG	26,6 ± 2,3	26,7 ± 1,7	0,967	30,7 ± 2,0	27,9 ± 3,5	0,034
	31,2 ± 1,5	29,4 ± 2,2	0,045	36,6 ± 4,5	34,6 ± 5,5	0,36
Δm	6,6 ± 2,0	6,4 ± 1,2	0,732	12,1 ± 4,3	10,0 ± 5,6	0,323

**Tabelle 3.1: Die LMP7-Defizienz hat keinen Effekt auf den FD-induzierten Gewichtszuwachs.** Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung des Körpergewichts (KG) am Tag der Opferung und des FD-induzierten Gewichtszuwachses (Δm) von jeweils 11 Tieren. Die Mäuse erhielten ab der 10. Lebenswoche über 6 bzw. 24 Wochen eine ND oder FD.

LMP7-defiziente Mäuse hatten nach 6-wöchiger ND ein ähnliches und nach 24-wöchiger ND ein signifikant niedrigeres Endgewicht als LMP7-ausbildende Tiere.

Unter FD war das Endgewicht in LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant niedriger nach 6-wöchiger und gleich nach 24-wöchiger Fütterung. Beim Vergleich der FD-induzierten Gewichtszunahme beider Genotypen wurde jedoch kein signifikanter Unterschied gemessen (Tabelle 3.1).

#### 3.1.2.2 Cholesterin- und Triglyzeridewerte

Die Entwicklung der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen basiert auf einer Diät-induzierten Hypercholesterinämie. Die Charakterisierung der Serumlipide ist in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Nach Fütterung einer ND über 6 oder 24 Wochen wiesen LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse ähnliche Serumwerte von Gesamt- und HDL-Cholesterin auf. Die Triglyzeridkonzentration war beim Vergleich beider Genotypen in LMP7-defizienten

Tieren sowohl nach 6 Wochen ND (signifikant) als auch nach 24 Wochen (nicht signifikant) erniedrigt.

Unter FD zeigte sich eine massive Erhöhung der Serumlipidwerte im Vergleich zur ND. Die Konzentrationen von Gesamt- und HDL-Cholesterin unter 6- und 24-wöchiger FD unterschieden sich zwischen LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen nicht signifikant. Die Triglyzeridkonzentration nach 6-wöchiger FD war in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant höher als in LMP7<sup>-/-</sup> Tieren. Nach 24 Wochen FD hatten beide Genotypen ähnliche Triglyzeridwerte.

[mg/dl]	6 Wochen ND / FD			24 Wochen ND / FD		
	LDLR <sup>-/-</sup>	LDLR <sup>-/-</sup> / LMP7 <sup>-/-</sup>	<i>P</i>	LDLR <sup>-/-</sup>	LDLR <sup>-/-</sup> / LMP7 <sup>-/-</sup>	<i>P</i>
<b>GC</b>	286,7 ± 33,3	284,7 ± 54,7	0,92	290,2 ± 22,1	276,4 ± 31,1	0,245
	1318,7 ± 138,6	1281,2 ± 181,0	0,591	1289,5 ± 269,4	1398,4 ± 417,1	0,47
<b>HDL</b>	90,9 ± 19,2	96,3 ± 7,4	0,40	128,1 ± 42,3	124,8 ± 19,8	0,818
	127,7 ± 23,4	135,6 ± 24,7	0,448	247,6 ± 74,6	247,1 ± 78,3	0,989
<b>TG</b>	164,9 ± 38,5	121,6 ± 48,2	0,034	94,4 ± 13,5	81,2 ± 20,0	0,083
	593,7 ± 165,7	708,2 ± 187,3	0,023	393,9 ± 155,6	482,4 ± 195,8	0,26

**Tabelle 3.2: Einfluss der LMP7-Defizienz auf Serumlipidwerte.** Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung der Serumwerte von Gesamt- (GC) und HDL-Cholesterin (HDL) sowie von Triglyzeriden (TG) von jeweils 11 Tieren pro Gruppe. Sie erhielten ab der 10. Lebenswoche über 6 bzw. 24 Wochen eine ND oder FD. Das Serum wurde am Tag des Ablebens durch eine intrakardiale Punktion gewonnen und die Lipidwerte wurden photometrisch quantifiziert.

**Fazit: Es wurden erstmals Mäuse mit LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Genotyp generiert. Beim Vergleich mit ihren LDLR<sup>-/-</sup> Wurfgeschwistern waren keine phänotypischen Auffälligkeiten festzustellen. Das Fehlen von LMP7 zeigte keine wesentlichen Auswirkungen auf die Serumcholesterinwerte.**

### **3.2 Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf die Atherosklerose**

Um den Effekt der LMP7-Defizienz auf die Atherosklerose zu untersuchen, erfolgten Analysen der Plaquelast und der Plaquekomposition. Im frühen und späten Krankheitsstadium wurde die Größe der Läsionen sowohl auf der aortalen Gefäßfläche als auch im Querschnitt der Aortenwurzel bestimmt. Die Plaquekomposition (Makrophagengehalt, nekrotische Areale, Polyubiquitin-Konjugate) wurde in fortgeschrittenen Läsionen der Aortenwurzel analysiert.

### **3.2.1 Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Plaquelast in der frühen Atherosklerose**

Auf der Gefäßfläche des Aortenbogens und im Aortenwurzel-Querschnitt von LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen wurden Fettablagerungen in den Gefäßwänden aller Tiere nachgewiesen. Da in der en-face-Methode nahezu keine Sudan IV gefärbten Areale unterhalb des Aortenbogens vorhanden waren, wurde die Quantifizierung der Plauefläche auf den Aortenbogen beschränkt. Die streifenförmigen, leicht erhabenen Läsionen entsprachen der Gestalt eines *fatty streaks* (Abbildung 3.2 A und B). In den Gefrierschnitten der Aortenwurzel wurden intrazelluläre Lipideinlagerungen in einzelnen Bereichen, die eine Verbreiterung der Intima aufwiesen (intimales Xanthoma), angefärbt (Abbildung 3.2 C). Somit zeigten beide Untersuchungen morphologische Aspekte der frühen Atherosklerose.

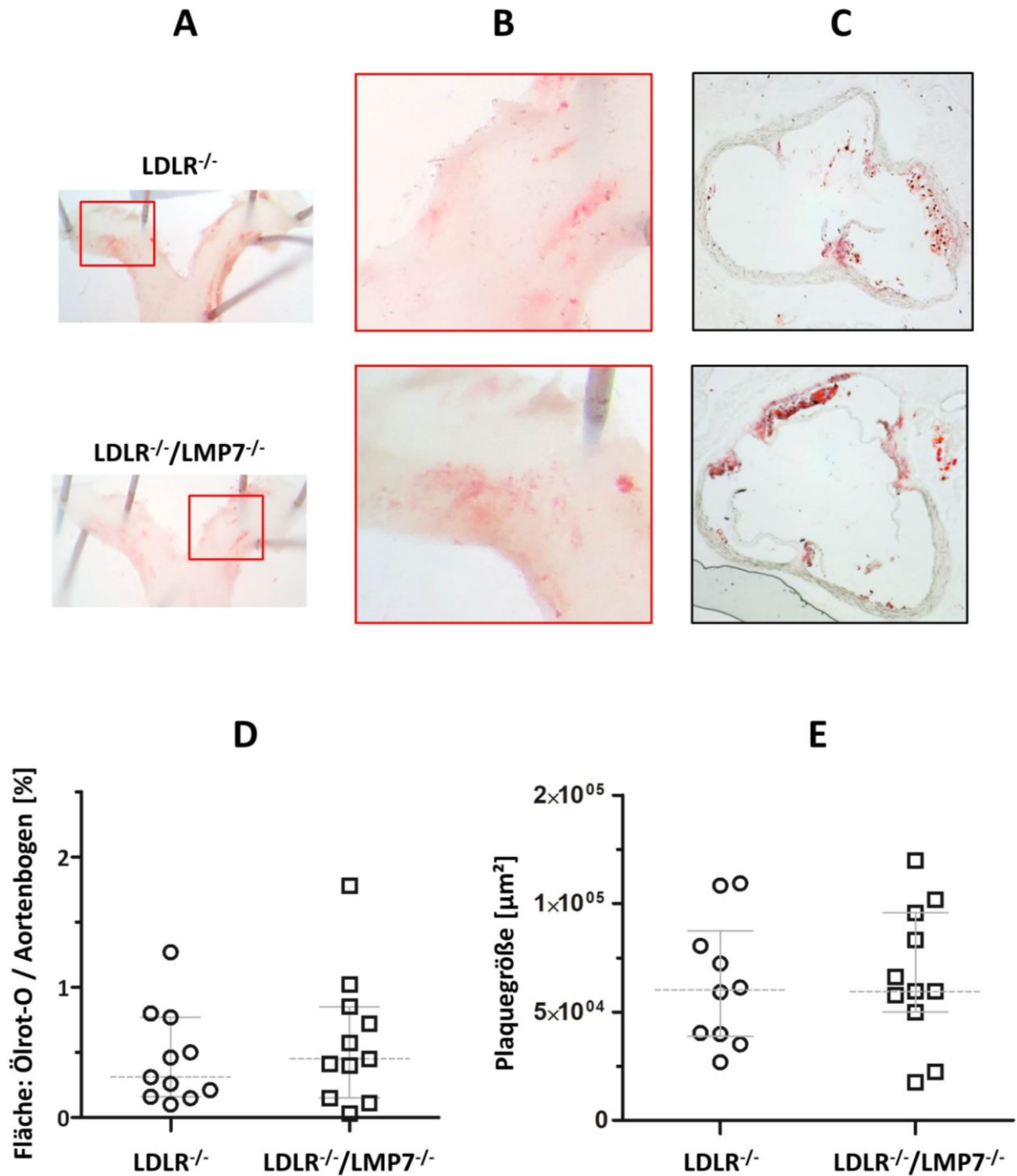
Sowohl der Anteil der Plaque an der Aortenbogenfläche ( $0,45 \pm 0,11\%$  vs.  $0,59 \pm 0,15\%$ ;  $p=0,474$ ) als auch die Plauefläche in der Aortenwurzel ( $63290 \pm 9268 \mu\text{m}^2$  vs.  $66640 \pm 9546 \mu\text{m}^2$ ;  $p=0,805$ ) zeigten beim Vergleich von LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 3.2 D und E).

### **3.2.2 Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Plaquelast in der fortgeschrittenen Atherosklerose**

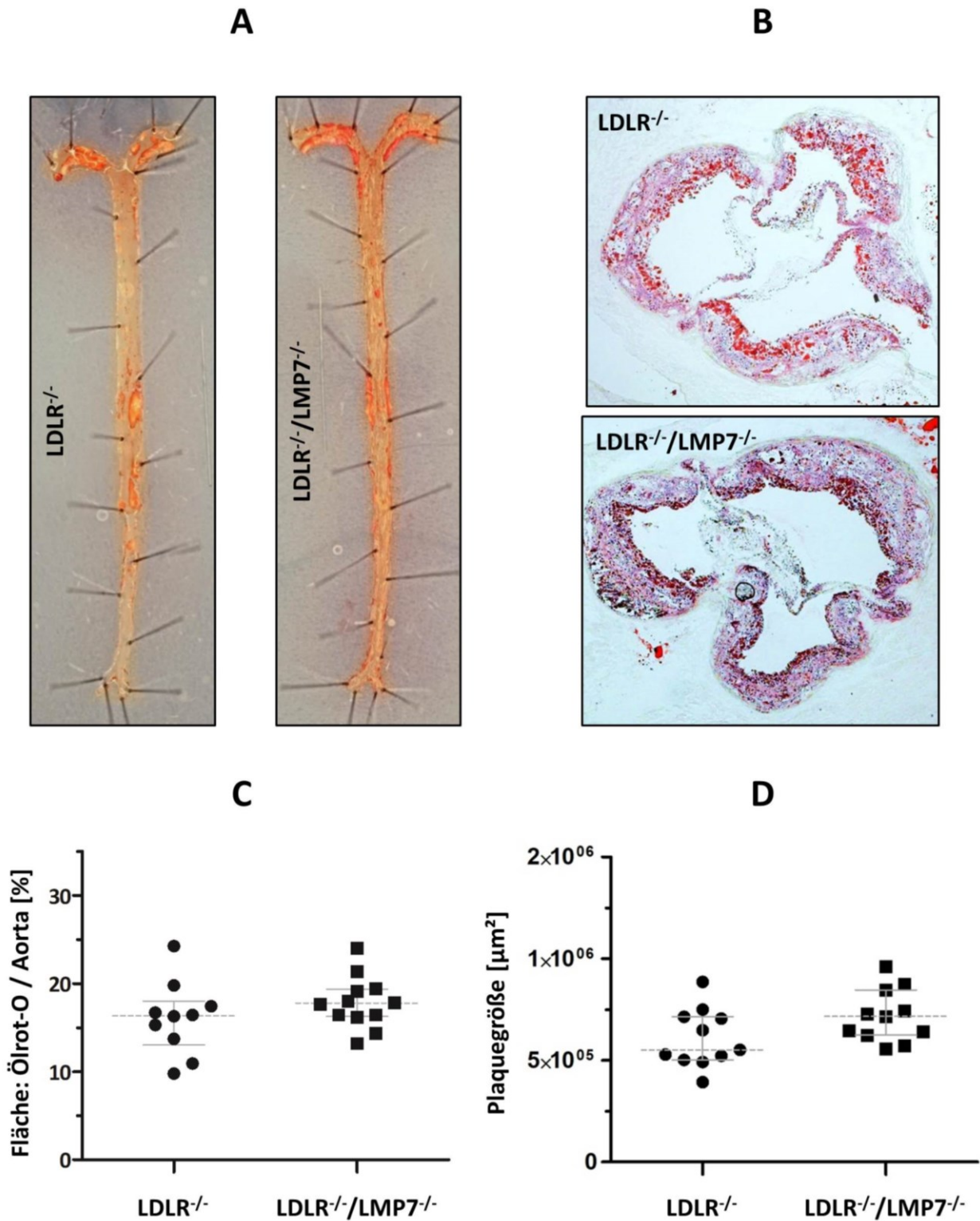
In der en-face-Methode wurden flächige und erhabene Gefäßveränderungen von Sudan IV angefärbt. Die Läsionen waren insbesondere in der Nähe großer Gefäßabgänge (Truncus brachiocephalicus, A. carotis communis und A. subclavia sinistra, Aa. renales) aufzufinden (Abbildung 3.3 A). In den Gefrierschnitten der Aortenwurzel war zu erkennen, dass der Großteil der Gefäßwand aus einer Ölrot-O anreichernden Verbreiterung der Intima bestand (Abbildung 3.3 B).

Der Anteil der Plauefläche an der Aortenfläche war in LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen ähnlich und zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $16,07 \pm 1,31\%$  vs.  $17,86 \pm 0,85\%$ ;  $p=0,250$ ) (Abbildung 3.3 C). Ebenso war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen beim Vergleich der Plauelast im Aortenwurzelquerschnitt festzustellen ( $608508 \pm 43447 \mu\text{m}^2$  vs.  $719585 \pm 39064 \mu\text{m}^2$ ;  $p=0,072$ ) (Abbildung 3.3 D).





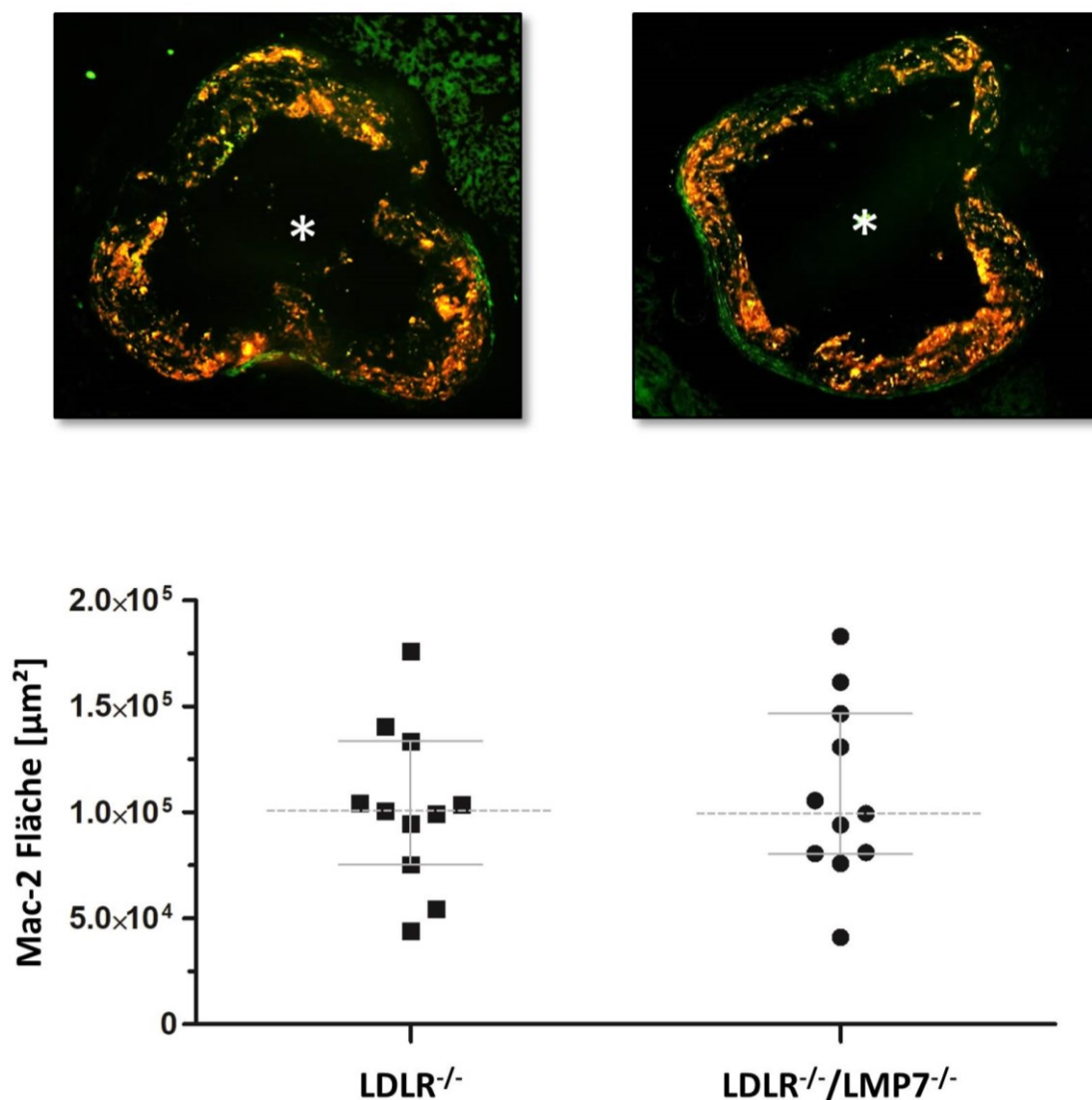
**Abbildung 3.2: Die LMP7-Defizienz zeigt keinen Effekt auf die Plaquelast im frühen Atherosklerose-Stadium.** LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäuse wurden nach 6-wöchiger FD-Fütterung geopfert. Die Analyse der Plaquelast erfolgte in en-face präparierten Aorten (je n=11) und in Gefrierschnitten der Aortenwurzel (n=10 und n=11). **A** Repräsentative Abbildungen Sudan IV gefärbter Aortenbögen (in **B** vergrößert dargestellt). **C** Repräsentative Abbildungen Ölrot-O gefärbter Gewebeschnitte der Aortenwurzel. Die Graphen zeigen individuelle Werte der Anteile der Plaqueflächen an den Aortenbogenflächen (**D**) und der Plaqueflächen im Aortenwurzelquerschnitt sowie Median und Interquartilbereich (**E**).



**Abbildung 3.3: Die LMP7-Defizienz zeigt keinen Effekt auf die Plaquelast im fortgeschrittenen Atherosklerose-Stadium.** LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäuse wurden nach FD-Fütterung über 24 Wochen geopfert. Die Analyse der Plaquelast erfolgte in en-face präparierten Aorten (n=10 und n=12) und in Gefrierschnitten der Aortenwurzel (je n=11). **A** Repräsentative Abbildung Sudan IV gefärbter Aorten. **B** Repräsentative Abbildungen Ölrot-O gefärbter Gewebeschnitte der Aortenwurzel. Die Graphen zeigen individuelle Werte der Anteile der Plaque an der aortalen Fläche (**C**) und der Plaqueflächen im Aortenwurzelquerschnitt sowie Median und Interquartilbereich (**D**).

### 3.2.3 Einfluss der LMP7-Defizienz auf den Makrophagengehalt in der fortgeschrittenen Atherosklerose

Um den Effekt der LMP7-Defizienz auf den Makrophagengehalt in der Plaque zu untersuchen, wurde das Oberflächenantigen Mac-2 mit Hilfe eines Fluoreszenzantikörpers angefärbt (Abbildung 3.4 A). In subendothelialen Bereichen der Läsion war die Färbung besonders intensiv. Die Mac-2-positiven Plaques von  $LDLR^{-/-}$  und  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  Mäusen unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $102477 \pm 11424 \mu\text{m}^2$  vs.  $109050 \pm 12703 \mu\text{m}^2$ ;  $p=0,705$ ) (Abbildung 3.4 B).

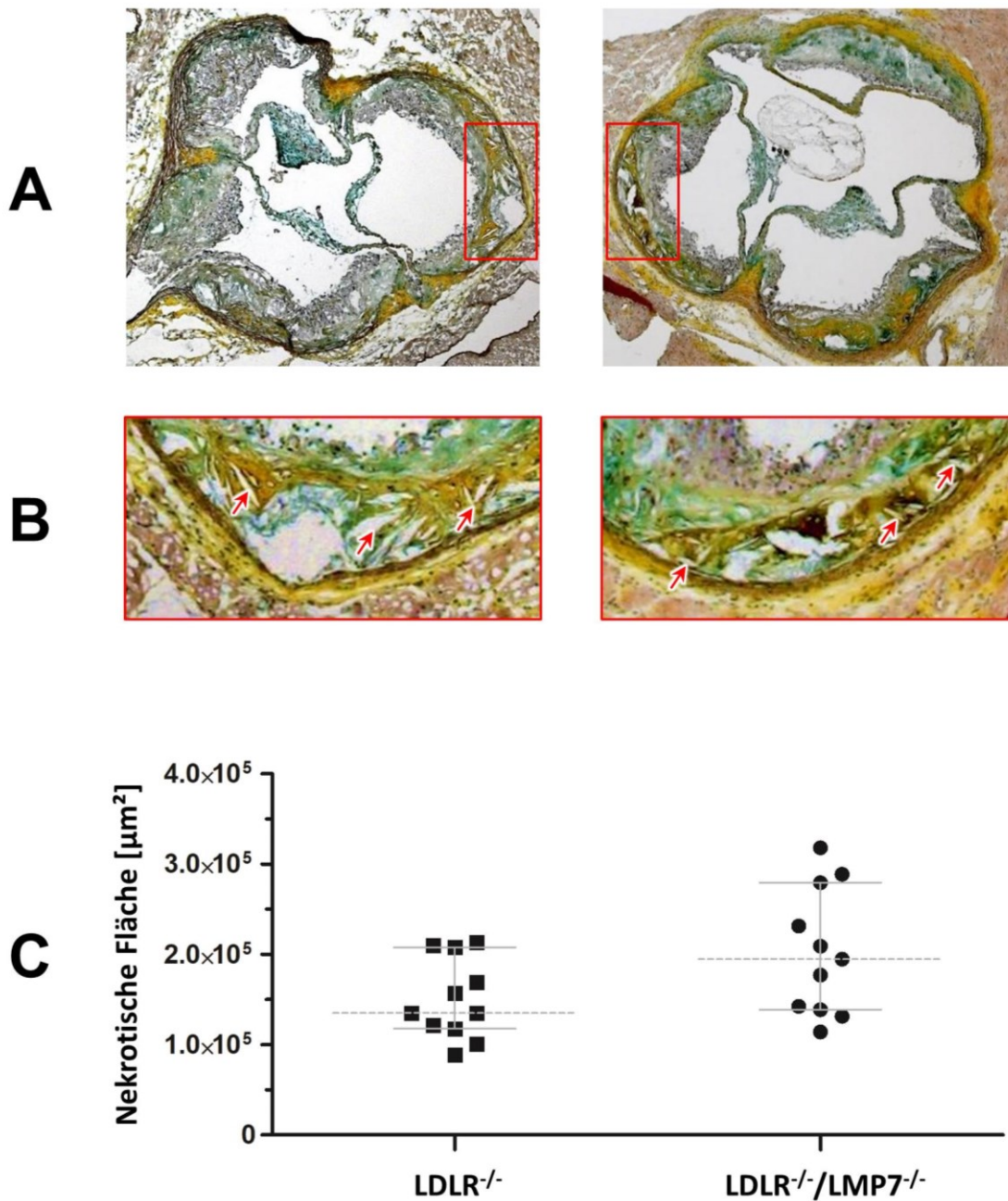


**Abbildung 3.4:** Die LMP7-Defizienz zeigt keinen Effekt auf den Makrophagengehalt im fortgeschrittenen Atherosklerose-Stadium.  $LDLR^{-/-}$  und  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  Mäuse wurden nach FD-Fütterung über 24 Wochen geopfert. Von der Aortenwurzel jeder Maus wurden 4 Mac-2 gefärbte Gefrierschnitte ausgewertet. **A** Repräsentative Gewebeschnitte des jeweiligen Genotyps, Gefäßlumen (Stern). **B** Makrophagenfläche von jeweils 11 Tieren mit Median und Interquartilsbereich.

### **3.2.4 Einfluss der LMP7-Defizienz auf die nekrotischen Areale in der fortgeschrittenen Atherosklerose**

Um zu überprüfen, ob die LMP7-Defizienz Einfluss auf die Größe des nekrotischen Areals nimmt, erfolgte die Färbung mit Movat-Pentachrom. In den Läsionen konnten die fibröse Kappe, der nekrotischen Kern (azelluläre Bereiche) und Cholesterin(kristall)-Lücken aufgefunden werden (Abbildung 3.5 B). Damit sind diese als Fibroatherome zu klassifizieren [3].

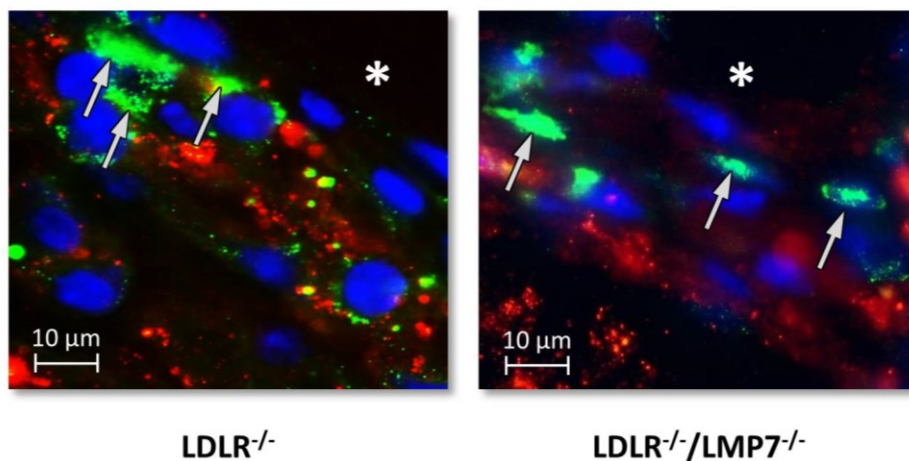
Die Größe der nekrotischen Flächen von Plaques der Aortenwurzel aus LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen unterschied sich nicht signifikant voneinander ( $150637 \pm 13395 \mu\text{m}^2$  vs.  $202379 \pm 21075 \mu\text{m}^2$ ;  $p=0,051$ ) (Abbildung 3.5 C).



**Abbildung 3.5: Die LMP7-Defizienz zeigt keinen Effekt auf die Größe der nekrotischen Areale im fortgeschrittenen Atherosklerose-Stadium.** LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäuse wurden nach FD-Fütterung über 24 Wochen geopfert. Von der Aortenwurzel jeder Maus wurden Movat-Pentachrom gefärbte Gefrierschnitte ausgewertet. **A** Repräsentative Gewebeschnitte des jeweiligen Genotyps. **B** Vergrößerung nekrotischer Areale. Im Färbeverfahren herausgelöste Cholesterinkristalle sind durch Pfeile markiert. **C** Nekrotische Fläche von jeweils 11 Tieren mit Median und Interquartilbereich.

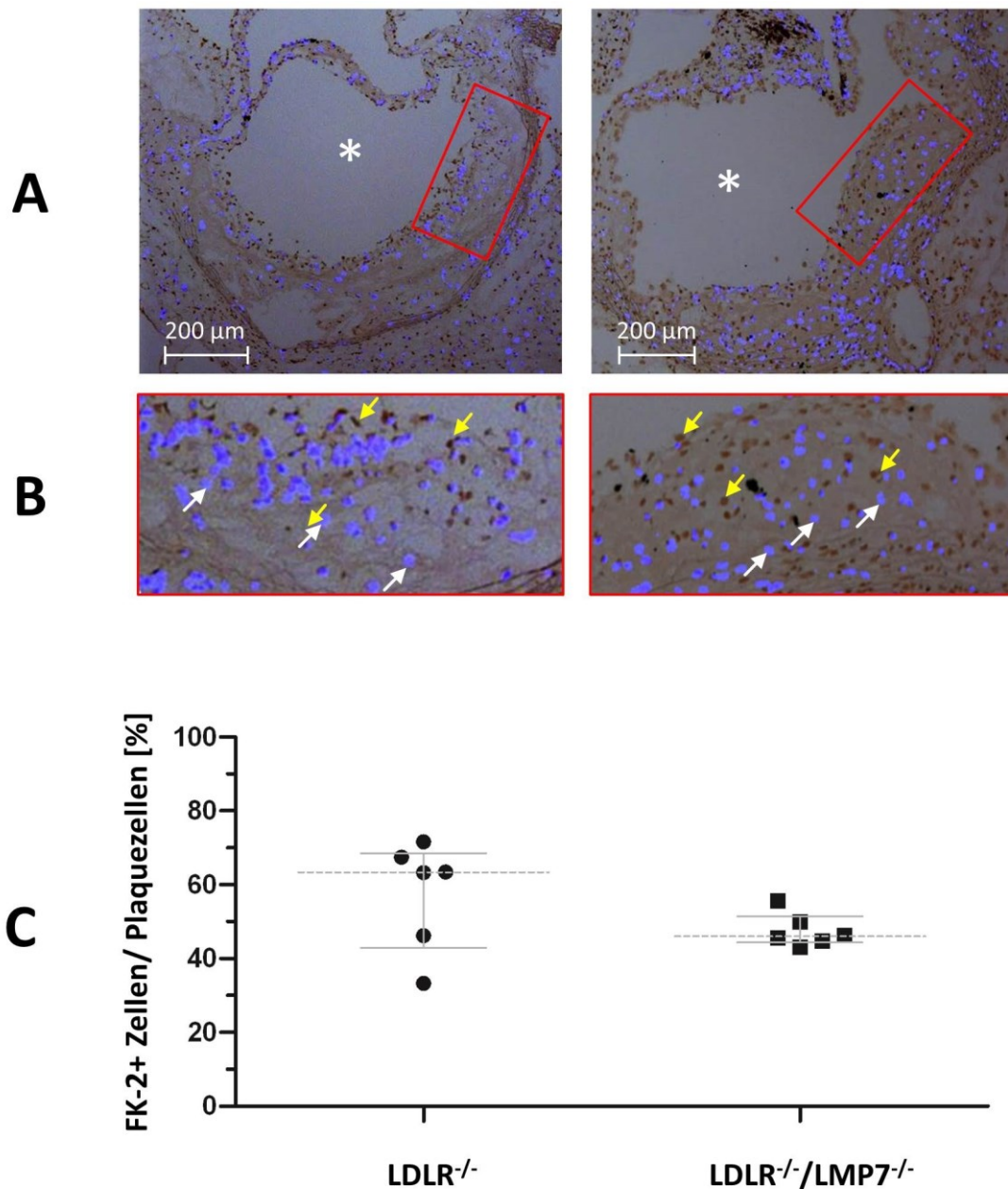
### 3.2.5 Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Akkumulation polyubiquitinerter Proteine in der fortgeschrittenen Atherosklerose

Um polyubiquitinierte Proteine in einem fortgeschrittenen Fibroatherom von  $LDLR^{-/-}$  und  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  Mäusen genau zu lokalisieren, erfolgte eine Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen FK2 (Polyubiquitin) und Mac-2 (Makrophagen) sowie die Darstellung der Zellkerne mit DAPI. Eine Ansammlung von polyubiquitinierten Konjugaten war insbesondere in Makrophagen nachzuweisen. Die FK2 Färbung war perinukleär lokalisiert und überlagerte (teilweise) die DAPI-Färbung (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Polyubiquitin-Konjugate befinden sich in der fibrösen Kappe von  $LDLR^{-/-}$  und  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  Mäusen.**  $LDLR^{-/-}$  und  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  Mäuse wurden nach FD-Fütterung über 24 Wochen geopfert. Von Gefrierschnitten der Aortenwurzel jedes Genotyps wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen FK2 (Polyubiquitin) und Mac-2 (Makrophagen) angefertigt. Eine Kolokalisation von Polyubiquitin-Konjugaten (grün) und Makrophagen (rot) war in der fibrösen Kappe erkennbar. Die perinukleäre FK2 Färbung überlagert teilweise DAPI gefärbte Zellkerne (Pfeile). Gefäßlumen (Stern).

Für einen quantitativen Nachweis von Polyubiquitin-Konjugaten in Atheromen von  $LDLR^{-/-}$  und  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  Mäusen erfolgte eine immunhistochemische Färbung mit FK2 Antikörper und dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Abbildung 3.7 A). In Übereinstimmung mit den Beobachtungen der Immunfluoreszenzfärbung, waren polyubiquitinierte Proteine (braun) bevorzugt perinukleär und luminal lokalisiert (Abbildung 3.7 B). Der Anteil FK2 gefärbter Plaqueszellen zeigte keinen signifikanten Unterschied beim Vergleich beider Genotypen ( $57,55 \pm 6\%$  vs.  $47,64 \pm 1,86\%$ ;  $p=0,176$ ) (Abbildung 3.7 C).

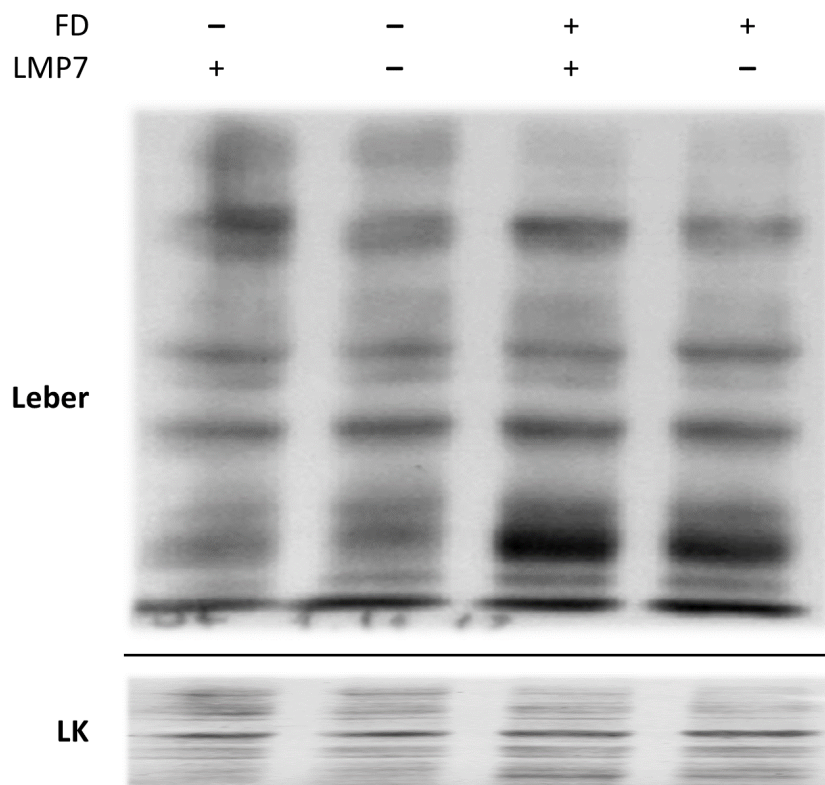


**Abbildung 3.7: Die LMP7-Defizienz hat keinen Effekt auf die Anzahl von Zellen mit Polyubiquitin-Konjugaten in fortgeschrittenen Läsionen der Aortenwurzel.**  $LDLR^{-/-}$  und  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  Mäuse wurden nach FD-Fütterung über 24 Wochen geopfert. Von der Aortenwurzel jeder Maus wurden FK2 und DAPI gefärbte Gefrierschnitte ausgewertet. **A** Repräsentative Präparate des jeweiligen Genotyps. **B** Vergrößerte Plaqueausschnitte. Die Pfeile markieren Zellen mit (gelb) und ohne (weiß) perinukleären Polyubiquitin-Konjugate. Gefäßlumen (Stern). **C** Anteil FK2 gefärbter Plaquezellen von je 6 Tieren mit Median und Interquartilbereich.

**Fazit: Die LMP7-Defizienz hatte weder einen Einfluss auf die Plaquelast in der frühen und späten Atherosklerose noch auf die Komposition von Fibroatheromen in  $LDLR^{-/-}$  Mäusen.**

### 3.3 Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf die Proteinoxidation in der Leber

Zur Beurteilung des Effekts der LMP7-Defizienz auf die Menge oxidativ veränderter Proteine, wurden carbonylierte Proteine in zusammengeführten Leberlysaten der Versuchsgruppen mittels Western Oxyblot nachgewiesen. Nach 6 Wochen FD war in LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen eine höhere Anreicherung von oxidativ geschädigten Proteinen zu beobachten als nach 6 Wochen ND. Die Menge carbonylierter Proteine beider Genotypen unterschied sich weder unter ND noch unter FD voneinander (Abbildung 3.8).



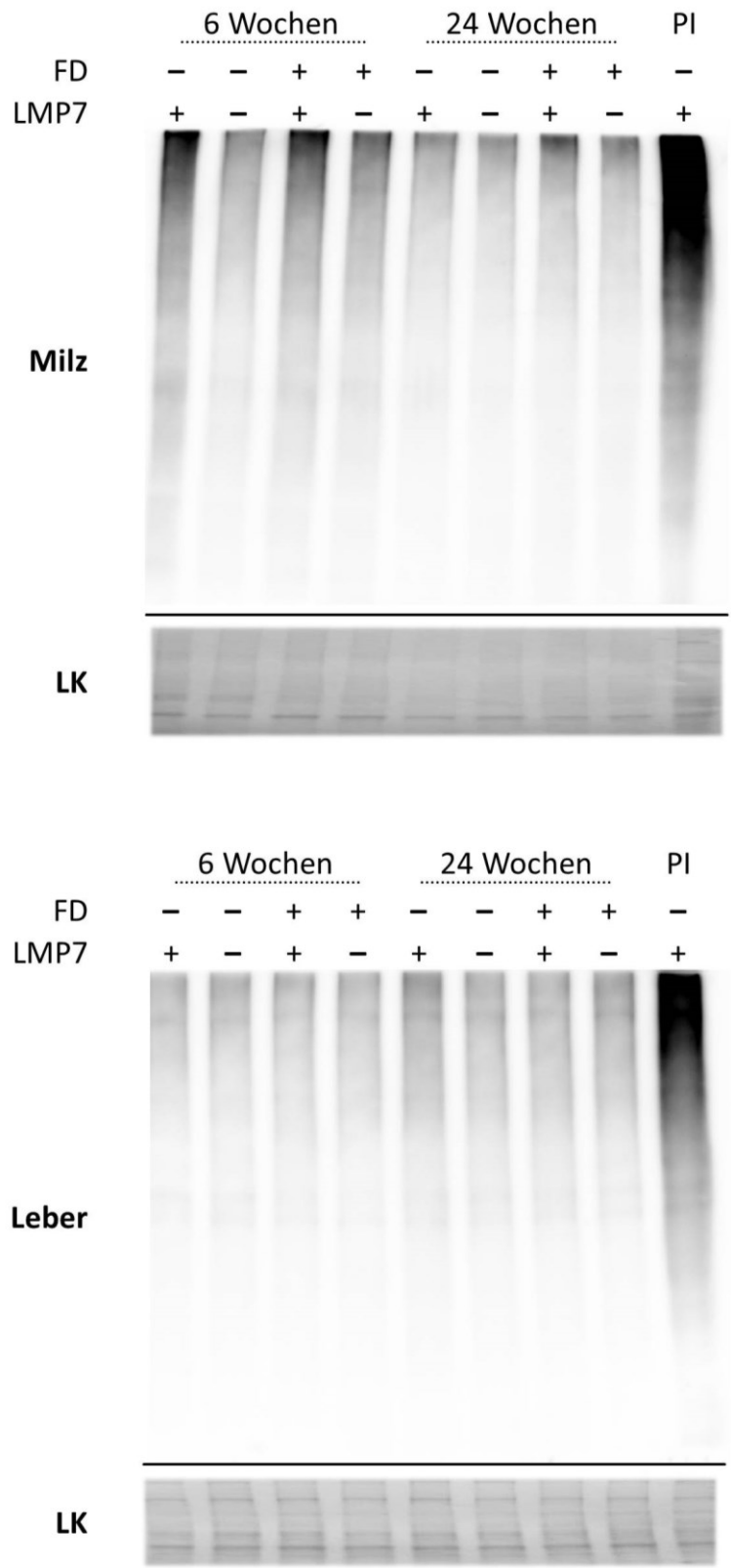
**Abbildung 3.8: Proteinoxidationen in der Leber sind von der LMP7-Defizienz unbeeinflusst und unter FD erhöht.** Im Western Oxyblot wurden carbonylierter Proteine in zusammengeführten Leberlysaten von jeweils 11 LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen (LMP7 + und -), die über 6 Wochen ND oder FD (FD - oder +) erhielten, dargestellt. Eine Derivatisierungskontroll-Lösung verifiziert die Spezifität der Antikörperinteraktion. Als Ladekontrolle (LK) diente die Amido-Black-Färbung.



### **3.4 Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf die Menge polyubiquitinerter Proteine in Leber und Milz**

Um den Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Akkumulation polyubiquitinerter Proteinen zu untersuchen, wurde im Western Blot ein anti-Ubiquitin Antikörper verwendet. Als Positivkontrolle wurde eine Probe von einer mit dem Proteasominhibitor (PI) Bortezomib behandelten LDLR<sup>-/-</sup> Maus mitgeführt. Im Vergleich zu dieser war in den zusammengeführten Leber- und Milzlysaten von LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen keine wesentliche Akkumulation ubiquitinerter Proteine zu beobachten. Die Menge polyubiquitinerter Proteine unterschied sich weder zwischen LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen noch zwischen FD und ND (Abbildung 3.9).

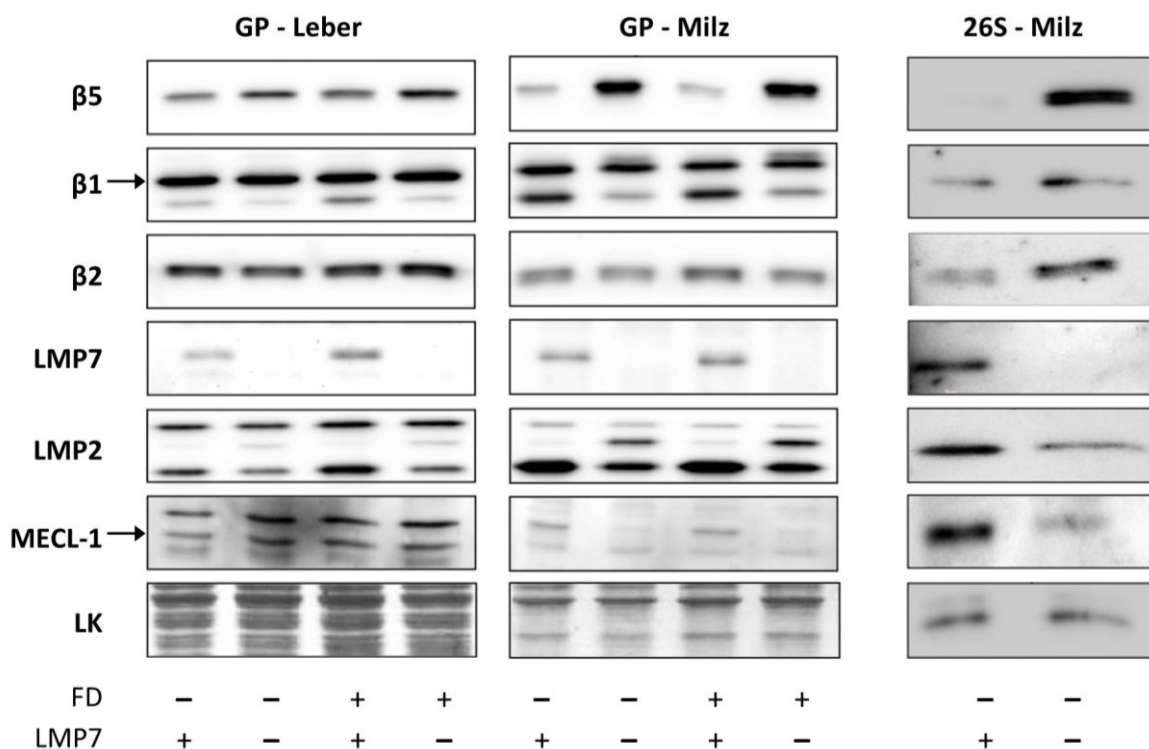
**Fazit: Die LMP7-Defizienz hatte keinen Einfluss auf die Menge von oxidierten und ubiquitinierten Proteinen in Leber und Milz.**



**Abbildung 3.9: Weder die LMP7-Defizienz noch die FD hatten einen Einfluss auf die Menge ubiquitiniertes Proteine.** Im Western Blot wurden ubiquitinierte Proteine in zusammengeführten Leber- und Milzlysaten von jeweils 11 LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen (LMP7 + und -), die über 6 und 24 Wochen ND oder FD (FD - oder +) erhielten, dargestellt. Als Positivkontrolle dient die Bande einer mit dem Proteasominhibitor (PI) Bortezomib (500 mg/kg KG) behandelten LDLR<sup>-/-</sup> Maus.

### 3.5 Konfiguration proteolytischer Untereinheiten in LMP7-defizienten Mäusen

Um zu überprüfen, inwieweit sich die Expression proteolytischer Untereinheiten in Folge der LMP7-Defizienz verändert, wurden Western-Blot-Untersuchungen von Gesamtproteinlysaten aus Leber und Milz durchgeführt. Weiterhin wurden proteolytische Untereinheiten in isolierter 26S-Proteasomen aus Milzlysaten dargestellt, um Einflüsse des LMP7 Mangels auf die proteasomale Komposition zu untersuchen (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10: Die LMP7-Defizienz beeinflusst die Expression von proteolytischen Untereinheiten und Konfiguration von 26S-Proteasomen.** SP- und IP-Untereinheiten wurden im Gesamtproteinlysate (GP) von Leber und Milz und in aus Milzlysate isolierten 26S-Proteasom (26S) von  $LDLR^{-/-}$  und  $LDLR^{-/-}/LMP7^{-/-}$  Mäusen (LMP7 + und -), die über 6 Wochen ND oder FD (FD - oder +) erhielten, mittels Western Blot nachgewiesen. Als Ladekontrollen (LK) dienten die Amido Black-Färbung (GP) und die proteasomale Untereinheit  $\alpha 4$  (26S).

In  $LDLR^{-/-}$  Mäusen konnte im Gesamtproteinlysate von Leber und Milz die Expression von allen SP- ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ ) und IP-Untereinheiten (LMP2 ( $\beta 1i$ ), MECL-1 ( $\beta 2i$ ), LMP7 ( $\beta 5i$ )) nachgewiesen werden. In diesen Organen wurde auch in den LMP7-defizienten

Tieren die Ausbildung aller SP-Untereinheiten und der reifen IP-Untereinheiten LMP2 und MECL-1 nachgewiesen.

Beim Vergleich der Proteinbanden zwischen LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte sich kein Unterschied für die Ausprägung der Untereinheiten  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2 in Leber und Milz sowie von MELC-1 in der Leber. Die Menge der SP-Untereinheit  $\beta$ 5, die mit der defizienten IP-Untereinheit LMP7 korrespondiert, war in LMP7-defizienten Mäusen erhöht. In diesen Tieren war in Leber und Milz im Vergleich zu den LMP7-ausbildenden Wurfgeschwistern die Menge des reifen LMP2 erniedrigt und des Präkursors prä-LMP2 erhöht, während ausschließlich in der Milz eine erniedrigte Expression von MECL-1 nachzuweisen war.

In beiden Organlysaten von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen war eine höhere Menge an LMP7 unter FD als unter ND zu beobachten.

Die Analyse der proteolytischen Untereinheiten zeigte, dass in Milz-26S-Proteasomen der LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse alle SP- und IP-Untereinheiten inkorporiert wurden, wobei die Menge an assemblierten  $\beta$ 5 sehr gering war. Demnach bildeten diese Tiere hauptsächlich MxP- und IP in der Milz aus. In den Milzen von LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen konnte erwartungsgemäß kein LMP7 detektiert werden. Im Vergleich zu LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen war in LMP7-defizienten Wurfgeschwistern die Menge der assemblierten SP-Untereinheiten  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 und  $\beta$ 5 erhöht, während eine Reduktion der IP-Untereinheiten LMP2 und MECL-1 zu beobachten war.

**Fazit: Die LMP7-Defizienz hat einen Einfluss auf die proteasomale Komposition, indem sie die Expression und den Einbau reifer IP-Untereinheiten hemmt.**

## **4 Diskussion**

### **4.1 Die LMP7-Defizienz hat keinen Einfluss auf die Proteinhomöostase in der FD-induzierten Atherosklerose von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen**

Das Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass die Defizienz der IP-Untereinheit LMP7 die Entstehung und Progression der chronisch-entzündlichen Gefäßerkrankung Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen nicht beeinflusst. Dies ist von besonderem Interesse, da vorgeschlagen wurde, dass die Expression von LMP7 eine Voraussetzung zur effizienten Eliminierung geschädigter Proteine nach Zytokin-induziertem oxidativem Stress sei [60] und die LMP7-Defizienz den Verlauf entzündlicher Erkrankungen aggraviere [60, 61]. Später konnte in einer anderen Studie unter Verwendung gleicher Methoden weder ein Einfluss der LMP7-Defizienz auf den Abbau polyubiquitinerter Proteine noch auf die Ausprägung inflammatorischer Erkrankungen gefunden werden [62], was zu einer Debatte über die Rolle von LMP7 in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen führte [63]. In diesem Kontext unterstützt die vorliegende Studie nicht die Annahme, dass die LMP7-Defizienz den Abbau polyubiquitinerter Proteinen unter inflammatorischen Bedingungen behindert.

Nach gegenwärtiger Auffassung ist das UPS in der Atherosklerose dysfunktional [37, 38]. In humanen Präparaten war die Assoziation von Ubiquitin-Konjugaten und apoptotischen Vorgängen in Zellen sowie eine Erniedrigung der proteasomalen Aktivität in fortgeschrittenen Plaques beobachtet worden [44, 79]. Tierexperimente, die Auswirkungen des PI Bortezomib auf die Atherosklerose untersuchten, unterstützen die Hypothese einer verminderten proteolytischen Aktivität und eines damit zusammenhängenden Einflusses auf die zelluläre Viabilität in fortgeschrittenen Läsionen. Die Applikation von niedrig-dosiertem PI in LDLR<sup>-/-</sup> und ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen mit fortgeschrittener Atherosklerose erhöhte die Vulnerabilität der Läsionen (Vergrößerung des nekrotischen Areals, Verkleinerung der fibrösen Kappe) [50, 51], während die gleiche Intervention in einem frühen Atherosklerosestadium keinen bzw. einen abschwächenden Effekt auf die Krankheitsausprägung hatte [50, 53]. Auch die in dieser Arbeit beobachtete Akkumulation von Polyubiquitin-Konjugaten in Fibroatheromen bekräftigt die Annahme eines dysfunktionalen UPS im Tiermodell der späten

Atherosklerose. Angesichts der vorgeschlagenen Bedeutung von LMP7 bei der Beseitigung geschädigter Proteine [60], wäre eine Aggravation der Atherosklerose in LMP7-defizienten Mäusen denkbar gewesen. Allerdings konnte in den fortgeschrittenen Plaques kein Unterschied bei der Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen zwischen LMP7-defizienten und LMP7-ausbildenden Tieren detektiert werden. In Übereinstimmung mit anderen Autoren war die Menge oxidativ geschädigter Proteine in den Lebern der FD-gefütterten Tiere erhöht [80]. Dennoch unterschieden sich weder die Menge oxidiertes noch ubiquitiniertes Proteine im Leber- und Milzgewebe von LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen. Demzufolge gibt es keinen Hinweis auf einen gestörten Abbau von geschädigten Proteinen in LMP7-defizienten Tieren.

Makrophagen sind die prädominanten Immunzellen in der Atherosklerose und prägen konstitutiv das IP aus. Sie sind Produzenten von Protein-schädigenden Radikalen und werden im Krankheitsverlauf dysfunktional. So tragen sie durch ihren Zelltod zur Ausbildung des nekrotischen Kerns bei [9]. Es wurde berichtet, dass Zytokin-induzierter Stress Fibroblasten [60] und Makrophagen [61] von LMP7-defizienten Tieren stärker zur Apoptose sensibilisiert als Zellen von LMP7-ausbildenden Mäusen. In einem viralen Myokarditismodell konnten im entzündeten Herzgewebe von LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen apoptotische Vorgänge und DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden, jedoch nicht in LMP7-ausbildenden Tieren [61]. Allerdings war in der vorliegenden Arbeit in der Atherosklerose von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen der Anteil an Makrophagen und T-Zellen [81] sowie die Größe des nekrotischen Kerns in Fibroatheromen durch die LMP7-Defizienz nicht beeinflusst worden. Diese Beobachtungen sprechen gegen eine pro-apoptotische Sensibilisierung im entzündeten Gewebe von LMP7-defizienten Mäusen.

Die Beobachtung, dass die Plaquelast und die Plaquekomposition in der frühen und in der späten Atherosklerose durch die LMP7-Defizienz nicht signifikant verändert wurden, spricht gegen die Annahme, dass die LMP7-Defizienz eine Auswirkung auf die Erhaltung der Proteinhomöostase unter inflammatorischen Bedingungen hat. Dies wird durch weitere Ergebnisse unseres Labors gestützt, welche zeigten, dass beim Vergleich von aus dem Knochenmark von LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen isolierten Makrophagen (BMDM) weder die Menge von ubiquitinierten Proteinen nach IFN $\gamma$ - und Wasserstoffperoxid-Exposition noch das zelluläre Überleben unter variierenden Wasserstoffperoxid-Konzentrationen unterschiedlich war [81]. In Übereinstimmung

damit wurde berichtet, dass die durch Entzündung induzierte Apoptose von BMDM, die mit Pneumokokken inkubiert wurden, nicht durch die LMP7-Defizienz verändert wurde [76].

Die Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf die Proteinhomöostase wurden bisher in experimentellen Modellen der Myokarditis und multiplen Sklerose untersucht. Einerseits waren dabei durch die Arbeitsgruppen um Seifert und um Opitz eine Aggravation der Krankheitsausprägungen sowie die Akkumulation ubiquitiniertes Proteine in den entzündeten Geweben (Herz, Gehirn) von LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen beschrieben worden [60, 61]. Andererseits konnten Nathan et al. in einer weiteren Studie beim Vergleich von LMP7<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäusen weder eine Verstärkung der multiplen Sklerose noch einen Hinweis auf die Beeinträchtigung des Proteinabbaus nach Zytokin-induziertem Stress in LMP7-defizienten Zellen beobachten. Es wurde vorgeschlagen, dass die diskrepanten Ergebnisse bezüglich der Rolle von LMP7 in inflammatorischen Krankheiten darauf beruhen könnten, dass Nathan et al. keine durch heterozygote Paarung gezeugten Wurfgeschwister als Kontrollgruppe verwendeten [63], da Mäuse verschiedener Kolonien genetische und epigenetische Unterschiede aufweisen können [82]. Im Gegensatz zu den Studien von Seifert et al. und Opitz et al. konnte in der vorliegenden Arbeit beim Vergleich von LMP7-defizienten Mäusen mit ihren Wurfgeschwistern weder eine Aggravation der Krankheitsausprägung noch eine Akkumulation von Ubiquitinkonjugaten beobachtet werden. Dass die LMP7-Defizienz die Ausprägung der experimentellen Atherosklerose im Vergleich zur multiplen Sklerose und Myokarditis nicht beeinflusst, könnte in pathogenetischen Aspekten der jeweiligen Erkrankung begründet liegen. Beispielsweise nimmt in der Atherosklerose das angeborene Immunsystem eine dominierende Rolle ein, wohingegen die multiple Sklerose und Myokarditis vorrangig durch Zellen der adaptiven Immunität vermittelt werden.

Weiterhin beobachteten Seifert et al. nach intraperitonealer Applikation des bakteriellen Antigens LPS sowohl eine Ansammlung von oxidierten als auch polyubiquitinierten Proteinen in Lebern LMP7-defizienter Mäuse. In dieser Arbeit wiesen LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup> Wurfgeschwister unter FD eine erhöhte Menge oxidativ-veränderter Proteine in der Leber auf. Dennoch unterschieden sich LMP7-defiziente nicht von LMP7-ausbildenden Mäusen hinsichtlich des Aufkommens polyubiquitiniertes Proteine in diesem Organ. Möglicherweise könnte die invasive Applikation und die starke

Immunogenität des bakteriellen Antigens eine intensivere Entzündungsreaktion verursacht haben als die chronische Inflammation im Verlauf der Atherosklerose und dadurch einen funktionellen Unterschied des UPS erst sichtbar gemacht haben.

#### **4.2 Die LMP7-Defizienz verändert die proteasomale Komposition**

Die Expression von LMP7 hat einen bedeutenden Einfluss auf die Biogenese und die Komposition von Proteasomen [57, 83]. Durch die LMP7-Defizienz verursachte Unterschiede in der proteasomalen Aktivität wurden für die Akkumulation proteasomaler Substrate in LMP7-defizienten Mäusen verantwortlich gemacht [60]. In der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Expression und proteasomale Inkorporation von proteolytischen Untereinheiten untersucht. In Leber und Milz bildeten LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse sowohl SP- als auch IP-Untereinheiten aus. Demnach wäre das Vorkommen verschiedener proteasomaler Subpopulationen (SP, IP MxP) denkbar, wie sie bereits für diese Organe beschrieben wurden [34, 35, 57, 84, 85]. In LMP7-defizienten Mäusen war neben einer Erhöhung der korrespondierenden SP-Untereinheit  $\beta 5$  eine erniedrigte Expression reifer IP-Untereinheiten LMP2 (Leber und Milz) und MECL-1 (Milz) nachzuweisen. Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen anderer Autoren überein. So konnten Kirschner et al. in der Leber von LMP7-defizienten Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen zeigen, dass  $\beta 5$  vermehrt und LMP2 sowie MECL-1 erniedrigt ausgebildet wurde [76]. Weiterhin war in isolierten 20S-Proteasomen aus Milz und Leber unter LMP7-Defizienz eine verringerte LMP2 und erhöhte  $\beta 5$ -Expression zu beobachten. Im Gegenzug zur erniedrigten Ausbildung reifer IP-Untereinheiten war in der vorliegenden Arbeit die Menge der Präkursoren prä-LMP2 (Leber und Milz) und prä-MECL-1 (nur Milz) in LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> höher als in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen, was auf eine gestörte Reifung von Proteasomen hindeutet, die IP-Untereinheiten assemblieren [57, 83]. Letztlich konnte in isolierten 26S-Proteasomen aus der Milz nachgewiesen werden, dass LMP7-defiziente Tiere im Vergleich zu den LMP7-ausbildenden Wurfgeschwistern geringere Mengen der IP-Untereinheiten LMP2, MECL-1 und vermehrt die SP-Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  inkorporierten. Ähnliche Beobachtungen machten wir und andere Arbeitsgruppen in 26S- bzw. 20S-Proteasomen aus BMDM [76, 81]. Demnach hemmt der Mangel von LMP7 die Reifung und den Einbau von IP-Untereinheiten. Es wurde berichtet, dass isolierte Proteasomen mit unterschiedlicher Komposition an proteolytischen Untereinheiten eine veränderte katalytische Aktivität (Schnittstellen,



Geschwindigkeit) besitzen [34, 62, 86]. Wir konnten beim Vergleich der proteolytischen Aktivität der gesamten Proteasomenpopulation aus BMDM von LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen keinen Unterschied feststellen [81]. Darüber hinaus unterstützen die Beobachtungen aus dem Atherosklerosemodell, in dem eine gleiche Menge an ubiquitinierten Proteinen in verschiedenen Geweben (Atherom, Leber, Milz) beider Genotypen gefunden wurde, die Annahme, dass die LMP7-Defizienz keine bedeutenden Auswirkungen auf die proteasomale Gesamtaktivität hatte.

### **4.3 Einfluss der LMP7-Defizienz auf Risikofaktoren der Atherosklerose**

Dyslipidämie, Übergewicht und Insulinresistenz zählen zu den wichtigsten Risikofaktoren der Atherosklerose. Kimura et al. berichteten von einem protektiven Effekt der LMP7-Defizienz auf die Entgleisung metabolischer Parameter in einem Modell der FD-induzierten Adipositas [72]. Nach 8-wöchiger FD waren Gesamtcholesterin-, Triglyzerid-, Insulin- und Glukose-Serumwerte ebenso wie der Gewichtszuwachs in LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant niedriger als in C57BL/6 Tieren. In der vorliegenden Arbeit konnte nach 6 bzw. 24 Wochen FD weder ein Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Gewichtszunahme, noch auf die Serumkonzentration von Gesamt-, HDL- und LDL-Cholesterin festgestellt werden. Ebenso wurde in unserem Labor beim Vergleich von LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der Serumglukosewerte gemessen [81].

Nach 6-wöchiger FD war eine signifikante Erhöhung der Triglyzeridkonzentration in LMP7-defizienten Mäusen im Vergleich zu den LMP7-ausbildenden Wurfgeschwistern beobachtet worden. Die Hypertriglyzeridämie wurde als unabhängiger atherogener Faktor identifiziert [87] und hätte somit Einfluss auf die Entwicklung der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen haben können. Jedoch konnte kein Unterschied zwischen LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen in der frühen Atherosklerose festgestellt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein noch unbekannter Faktor einen potenziellen Einfluss der Hypertriglyzeridämie in der frühen Atherosklerose maskiert haben könnte.

Allerdings ist davon auszugehen, dass der atherogene Effekt einer signifikant erhöhten Hypertriglyzeridämie in LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen (708,2 ± 187,3 mg/dl vs. 593,7 ± 165,7 mg/dl in LDLR<sup>-/-</sup> Wurfgeschwistern, p=0,023) gering ist, da LPL<sup>-/-</sup> Mäuse (C57BL/6 Hintergrund) mit Triglyzeridkonzentrationen über 1900 mg/dl (und physiologischen

Serumcholesterinwerten) erst nach 15 Monaten vergleichsweise kleine atherosklerotische Läsionen ausbilden [88].

Der signifikante Unterschied zwischen den Triglyzeridkonzentrationen von LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen nach 6 Wochen FD könnte auf die hohe biologische Variabilität des Wertes zurückzuführen sein [89-91]. Darauf deuten auch die divergierenden Ergebnisse beim Vergleich der Triglyzeridwerte von LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Wurfgeschwistern nach 6 Wochen ND (signifikant erniedrigt in LMP7-defizienten Tieren), 6 Wochen FD (signifikant erhöht in LMP7-defizienten Tieren) und 24 Wochen FD und ND (kein Unterschied) sowie die hohe Standardabweichung der Messungen. Zur Überprüfung dieser Hypothese müsste die Stichprobengröße erhöht werden.

Zusammenfassend kann der von Kimura et. al. beschriebene Einfluss der LMP7-Defizienz auf metabolische Parameter in der vorliegenden Arbeit nicht wiedergefunden werden. Die diskrepanten Beobachtungen könnten einerseits durch die Maskierung eines vergleichsweise geringen Effekts der LMP7-Defizienz auf die Cholesterinkonzentration erklärbar sein, die durch eine erhöhte Streubreite der Werte in Folge der LDLR-Defizienz (, die in Kombination mit der FD zusätzlich verstärkt wurde,) entstanden sein könnte. Andererseits ist aufgrund des Vergleichs von Mäusen unterschiedlicher Kolonien durch Kimura et al. nicht auszuschließen, dass genetische und epigenetische Faktoren für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sind (Kapitel 4.1: Wurfgeschwister-Kontrollen) [82].

#### **4.4 Einfluss der LMP7-Defizienz auf inflammatorische Prozesse der Atherosklerose**

Inflammatorische Prozesse spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose. Die Ausprägung entzündlicher Erkrankungen in LMP7<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäusen wurde in mehreren Tierversuchen untersucht. In experimentellen Modellen von Adipositas [72], (Ovalalbumin-induziertem) Asthma [70], Colitis [65, 66] und Meningitis [71, 92] wurden anti-inflammatorische Effekte der LMP7-Defizienz beobachtet. Auf die Ausprägung von (Hausstaubmilben-induziertem) Asthma [70] und multipler Sklerose [75] hatte der Mangel an LMP7 keine Auswirkungen, während Seifert et al. von einer Aggravation der experimentellen multiplen Sklerose berichteten [60]. Aufgrund der unterschiedlichen Einflüsse der LMP7-Defizienz postulierten Kimura et al., dass die

Expression von LMP7 die Initiation und Progression entzündlicher Erkrankungen in Abhängigkeit der spezifischen Eigenschaften der jeweiligen Pathologie bzw. des untersuchten Gewebes beeinflusse [72].

Verschiedene Studien untersuchten die Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf die Differenzierung und Polarisierung von Immunzellen. Beim Vergleich von naiven T-Lymphozyten aus LMP7<sup>-/-</sup> und C57BL/6 Mäusen war in ersteren die Differenzierung zu Th1 sowie Th17-Zellen reduziert und die Reifung regulatorischer T-Zellen erhöht [66]. Des Weiteren wurde ein begünstigender Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Polarisation von Alveolarmakrophagen zum anti-inflammatorischen M2-Subtyp beobachtet [72, 74]. Diese Befunde könnten hinsichtlich der Atherosklerose hochrelevant sein. Die beschriebenen potenziell anti-atherogenen Auswirkungen der LMP7-Defizienz auf die Differenzierungsprozesse von T-Zellen und Makrophagen würden hypothetisch zu einer Milderung des Krankheitsverlaufes der Atherosklerose führen. In der vorliegenden Arbeit fanden sich allerdings keine Hinweise dafür, dass inflammatorische Vorgänge in der Atherosklerose durch den Mangel von LMP7 beeinflusst wurden. Die Größe der Gefäßläsionen in LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Wurfgeschwistern war im frühen und späten Atherosklerosestadium gleich. Ebenso waren in fortgeschrittenen Fibroatheromen die Anteile des nekrotischen Kerns sowie von Makrophagen und T-Zellen [81] in beiden Genotypen nicht unterschiedlich. Darüber hinaus konnte in unserem Labor auch kein Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Polarisation von M1 bzw. M2 Makrophagen gefunden werden [81]. Insgesamt sprechen diese Beobachtungen gegen einen anti-inflammatorischen Einfluss der LMP7-Defizienz auf die FD-induzierte Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen.

#### **4.5 Perspektiven der LMP7-Blockade in der Atherosklerose**

Die pharmakologische Inhibition von LMP7 hatte in Tierexperimenten begünstigende Effekte auf die Ausprägung von autoimmunen (Review [73], [93, 94]), viralen [71, 95] und neoplastischen Erkrankungen [67, 68]. In den betroffenen Geweben war die Infiltration von Immunzellen (Lymphozyten, Myelozyten), die genetische Expression von Zytokinen (INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IL-17, IL-23, IL-1 $\beta$ ) und Adhäsionsmolekülen (I-CAM, V-CAM) sowie des Chemokins MCP-1 reduziert [67, 69, 75, 95-97]. Basler et al. schlugen vor, dass der Einfluss der LMP7-Inhibition auf die Differenzierung von Immunzellen und auf die Sekretion von Mediatoren für die anti-inflammatorischen Effekte verantwortlich

sei [73]. Die Applikation des spezifischen LMP7-Inhibitors ONX 0914 beeinträchtigte die Reifung von Th1, Th17 [66, 93] und dendritischen Zellen [98], während er die Differenzierung und Polarisierung anti-inflammatorischer Effektoren (regulatorische T-Zellen [66] und M2-Makrophagen [99]) begünstigte. Gleichzeitig verminderte derselbe Inhibitor die Zytokinsekretion (IL-6, IFN $\gamma$ , IL-23, TNF $\alpha$ , GM-CSF) von stimulierten Monozyten und T-Zellen (Review [73]) sowie die VCAM-1-Expression in mit TNF $\alpha$  behandelten Endothelzellen [67].

Aktuelle Ergebnisse klinischer Studien wie CIRT und CANTOS, die die Wirkung antientzündlicher Therapien auf die Atherosklerose untersuchten, führten zu der Annahme, dass die Reduktion der inflammatorischen Mediatoren IL-1 $\beta$ , IL-6 und CRP für eine anti-atherogene Wirkung entscheidend ist.

Unter Berücksichtigung der genannten Beobachtungen stellt sich die Frage, ob die Erforschung des Einflusses der LMP7-Inhibition in der Atherosklerose von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen gerechtfertigt wäre, obwohl die LMP7-Defizienz in dem vorliegenden Atherosklerosemodell ohne Effekt auf die Krankheitsausprägung blieb.

#### Defizienz und Inhibition von LMP7

Es wurde beobachtet, dass der Effekt der Inhibition von LMP7 auf die Ausprägungen der experimentellen multiplen Sklerose sich vom Effekt der LMP7-Defizienz deutlich unterschied [75]. So beeinflusste die LMP7-Defizienz die Ausbildung der Krankheit nicht, während ein spezifischer LMP7-Inhibitor Initiation und Progression der Autoimmunerkrankung abschwächte. Da auf ähnliche Weise der Krankheitsverlauf durch die spezifische Inhibition von  $\beta 5$  in LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen gemildert wurde, schlugen die Autoren der Studie vor, dass die Inhibition der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität in Immunzellen, die durch  $\beta 5$  in LMP7-defizienten und durch LMP7 in LMP7-ausbildenden Mäusen vermittelt wird, die günstigen Auswirkungen der PI auf die Krankheitsausprägung erklärt.

Die hemmende Wirkung von ONX 0914 auf die LMP7-Aktivität wurde in Lysaten mononukleärer Zellen des peripheren Blutes gezeigt [96]. In Abgrenzung zum Effekt der LMP7-Inhibition konnten wir keinen Einfluss der LMP7-Defizienz auf die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität von proteasomalen Populationen in BMDM aus LDLR<sup>-/-</sup> und LDLR<sup>-/-</sup>/LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen feststellen [81].

### PI in experimentellen Atherosklerosemodellen

Weitere Argumente, die für die Erforschung des therapeutischen Potentials eines spezifischen LMP7-Inhibitors sprechen, liefern experimentelle Atherosklerose-Studien, die die Wirkung des PI Bortezomib untersuchten. Bortezomib blockiert die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, indem er (äquivalent) an die Untereinheiten  $\beta 5$  und LMP7 bindet [96]. Wilck et al. zeigten, dass die Applikation von Bortezomib durch anti-inflammatorische und anti-oxidative Effekte die Entwicklung der frühen Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen abschwächte. Die Senkung der Serumkonzentration von MCP-1 und IL-6 in diesen Tieren war ein Effekt, der vermutlich durch die inhibitorische Wirkung von Bortezomib auf die Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität in Makrophagen, also auf die Hemmung von LMP7, zurückzuführen war [51].

Für die fortgeschrittene Atherosklerose wird angenommen, dass aufgrund der bereits verminderten UPS-Aktivität die PI eine apoptotische Wirkung auf Plaquezellen ausübt [37, 53]. Bereits niedrige Dosen von Bortezomib führten zu einer instabileren Plaquemorphologie in LDLR<sup>-/-</sup> und ApoE<sup>-/-</sup> Mäusen [50, 51]. Van Herck et al. zeigten, dass die PI mit Bortezomib die Apoptose von Makrophagen und von VSMC innerhalb der Läsion förderte [50]. Im Vergleich zu Bortezomib hat ONX 0914 eine wesentlich höhere (bis zu 40-fach) Selektivität zu LMP7 als zu  $\beta 5$ . Deshalb ist davon auszugehen, dass sich seine Wirkung hauptsächlich auf Leukozyten beschränkt und toxische Effekte auf Zellen, die konstitutiv das SP ausbilden, minimiert würden [96]. In diesem Zusammenhang konnte in dem oben erwähnten Modell der multiplen Sklerose gezeigt werden, dass die positiven Effekte von ONX 0914 auf die Hemmung von LMP7 in Immunzellen zurückzuführen sind. Denn die PI milderte den Krankheitsverlauf in Mäusen, die nach der Zerstörung von Knochenmarkszellen (Myeloablation) mit einer Knochenmarkstransplantation aus C57Bl/6 Mäusen rekonstituiert wurden, wohingegen sich kein Effekt der LMP7-Inhibition auf die Pathologie nach Rekonstitution mit Zellen aus LMP7<sup>-/-</sup> Mäusen zeigte [75].

Weiterhin beobachteten Muchamuel et al. bei der Charakterisierung von ONX 0914, dass der spezifische Inhibitor im Vergleich zum dualen  $\beta 5$ -LMP7-Inhibitor Carfilzomib unter gleichen Konzentrationen keine Akkumulation von Ubiquitin bewirkte und dass die effektive LMP7-Inhibition in mononukleären Zellen des peripheren Blutes die Proteolyse durch LMP2 und MECL-1 nicht beeinträchtigt [96]. Demzufolge könnte der in der späten Atherosklerose durch Bortezomib vermittelte proteotoxische Effekt auf Plaquezellen

möglicherweise durch die Verwendung eines spezifischen LMP7-Inhibitors minimiert werden.

Zusammenfassend wird aufgrund der dargestellten Ergebnisse vorgeschlagen, den Einfluss eines spezifischen LMP7-Inhibitors wie ONX 0914 in der frühen und späten Atherosklerose zu untersuchen. Der mögliche Versuchsaufbau wurde in Abbildung 4.1 dargestellt.

#### *Dosierung und Applikation:*

Für den Wirkstoff ONX 0914 wurde eine maximal tolerable Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht ermittelt, wobei eine effektive Wirkung auf inflammatorische Erkrankungen unter deutlich geringeren Konzentrationen erzielt wurde. Eine Applikation von 10mg/kg Körpergewicht stellte sich in vorangegangenen Experimenten als wirkungsvoll heraus und wurde gut von Mäusen toleriert. Der Inhibitor ist gut gewebeängig und kann intravasal, intraperitoneal und subkutan appliziert werden [96]. In Anlehnung an vorangegangene Atherosklerose-Studien mit PI und bereits mit ONX 0914 durchgeführte Studien sollte der Wirkstoff 3 Mal wöchentlich intraperitoneal verabreicht werden [51, 53].

#### *Versuchsaufbau:*

Zur Untersuchung der frühen Atherosklerose erhalten zwei auf Körpergewicht und Serumcholesterinwerte abgegliche Gruppen von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen über 6 Wochen eine atherogene FD. In der Interventionsgruppe wird der PI ONX 0914 und in der Kontrollgruppe Kochsalzlösung appliziert.

Für die Untersuchung des Effekts der LMP7-Inhibition auf die Progression bereits vorhandener fortgeschrittener Atherosklerose werden 2 Gruppen von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen über 24 Wochen mit einer FD gefüttert, wobei die letzten 6 Wochen entweder ONX 0914 oder Kochsalzlösung verabreicht wird. Die Baselinegruppen erhalten über 6 bzw. 24 Wochen eine ND.

Neben den Messungen der Plaquelast und -komposition, metabolischer Parameter sowie des Körpergewichts sollten die proteolytische Aktivität in der Aorta, Zytokine im Blut (MCP-1 und IL-6) und deren Produktion in aktivierten Makrophagen sowie die Differenzierung von Monozyten und Polarisierung von Makrophagen untersucht werden.

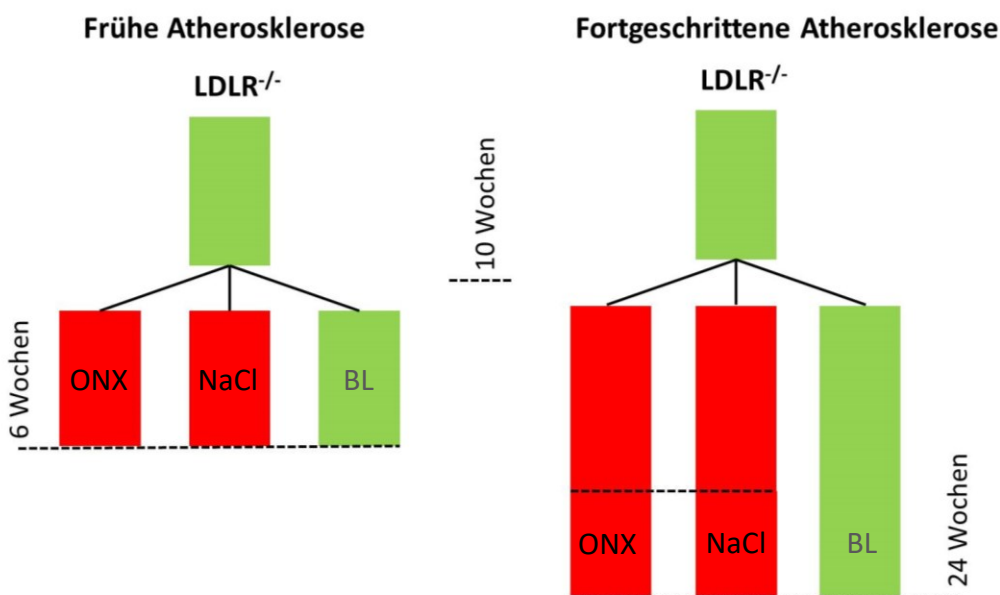
ONX: 3x/Woche i.p. Applikation von 10µg/kg KG ONX 0914

Hochfett-Diät

NaCl: 3x/Woche i.p. Applikation NaCl

Normal-Diät

BL: Baseline



Serum	Zytokine	Lipidwerte
Plaquelast	Gewebeschnitte (Aortenwurzel, <i>A. brachiocephalica</i> )	en-face Methode (Aorta)
Plaue- komposition	Makrophagen, T-Zellen	Nekrotische Areale, fibröse Kappe
UPS-Status	Polyubiquitin- Konjugate (Plaue)	Proteasomale Aktivität (Aorta)
Isolierte BMDM	Differenzierung/ Polarisierung von Makrophagen	UPS-Status

Abbildung 4.1: Vorgeschlagener Versuchsaufbau zur Untersuchung des Einflusses der LMP7-Inhibition auf die Initiation und Progression der Atherosklerose in LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen.

## A Literaturverzeichnis

1. Barquera, S., Pedroza-Tobias, A., Medina, C., Hernandez-Barrera, L., Bibbins-Domingo, K., Lozano, R., and Moran, A.E., *Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease*. Arch Med Res, 2015. **46**(5): p. 328-38.
2. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2045-51.
3. Virmani, R., Kolodgie, F.D., Burke, A.P., Farb, A., and Schwartz, S.M., *Lessons From Sudden Coronary Death: A Comprehensive Morphological Classification Scheme for Atherosclerotic Lesions*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2000. **20**(5): p. 1262-75.
4. Ridker, P.M., Everett, B.M., Thuren, T., MacFadyen, J.G., Chang, W.H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S.D., Kastelein, J.J.P., Cornel, J.H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., Vida-Simiti, L., Flather, M., Shimokawa, H., Ogawa, H., Dellborg, M., Rossi, P.R.F., Troquay, R.P.T., Libby, P., and Glynn, R.J., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1119-31.
5. Wu, M.Y., Li, C.J., Hou, M.F., and Chu, P.Y., *New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(10).
6. Galkina, E. and Ley, K., *Leukocyte influx in atherosclerosis*. Curr Drug Targets, 2007. **8**(12): p. 1239-48.
7. Galkina, E. and Ley, K., *Vascular adhesion molecules in atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2292-301.
8. Stocker, R. and Kearney, J.F., *Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis*. Vol. 84. 2004. 1381-478.
9. Moore, Kathryn J. and Tabas, I., *Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis*. Cell, 2013. **145**(3): p. 341-55.
10. Hansson, G.K. and Hermansson, A., *The immune system in atherosclerosis*. Nat Immunol, 2011. **12**(3): p. 204-12.
11. Lim, S. and Park, S., *Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis*. BMB Rep, 2014. **47**(1): p. 1-7.
12. Badimon, L. and Vilahur, G., *Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture*. J Intern Med, 2014. **276**(6): p. 618-32.
13. Sakakura, K., Nakano, M., Otsuka, F., Ladich, E., Kolodgie, F.D., and Virmani, R., *Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression*. Heart Lung Circ, 2013. **22**(6): p. 399-411.
14. Goldberg, A.L., *Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 895-9.
15. Powell, S.R., Herrmann, J., Lerman, A., Patterson, C., and Wang, X., *The ubiquitin-proteasome system and cardiovascular disease*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **109**: p. 295-346.
16. Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M., *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal*. EMBO J, 2000. **19**(1): p. 94-102.
17. Glickman, M.H. and Ciechanover, A., *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 373-428.
18. Dick, T.P., Nussbaum, A.K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanovic, S., Wolf, D.H., Huber, R., Rammensee, H.G., and Schild, H., *Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants*. J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25637-46.
19. Wlodawer, A., *Proteasome: a complex protease with a new fold and a distinct mechanism*. Structure, 1995. **3**(5): p. 417-20.



20. Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D., *A gated channel into the proteasome core particle*. Nat Struct Biol, 2000. **7**(11): p. 1062-7.
21. Raynes, R., Pomatto, L.C., and Davies, K.J., *Degradation of oxidized proteins by the proteasome: Distinguishing between the 20S, 26S, and immunoproteasome proteolytic pathways*. Mol Aspects Med, 2016. **50**: p. 41-55.
22. Dahlmann, B., *Mammalian proteasome subtypes: Their diversity in structure and function*. Arch Biochem Biophys, 2016. **591**: p. 132-40.
23. Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W., *The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 1015-68.
24. Luciani, F., Kesmir, C., Mishto, M., Or-Guil, M., and de Boer, R.J., *A mathematical model of protein degradation by the proteasome*. Biophys J, 2005. **88**(4): p. 2422-32.
25. Ferrington, D.A. and Gregerson, D.S., *Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012. **109**: p. 75-112.
26. Ortiz-Navarrete, V., Seelig, A., Gernold, M., Frentzel, S., Kloetzel, P.M., and Hammerling, G.J., *Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex*. Nature, 1991. **353**(6345): p. 662-4.
27. Sijts, E.J. and Kloetzel, P.M., *The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(9): p. 1491-502.
28. Kaur, G. and Batra, S., *Emerging role of immunoproteasomes in pathophysiology*. Immunol Cell Biol, 2016. **94**(9): p. 812-20.
29. Ebstein, F., Kloetzel, P.M., Kruger, E., and Seifert, U., *Emerging roles of immunoproteasomes beyond MHC class I antigen processing*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(15): p. 2543-58.
30. Callahan, M.K., Wohlfert, E.A., Menoret, A., and Srivastava, P.K., *Heat shock up-regulates Imp2 and Imp7 and enhances presentation of immunoproteasome-dependent epitopes*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8393-9.
31. Gavilan, M.P., Castano, A., Torres, M., Portavella, M., Caballero, C., Jimenez, S., Garcia-Martinez, A., Parrado, J., Vitorica, J., and Ruano, D., *Age-related increase in the immunoproteasome content in rat hippocampus: molecular and functional aspects*. J Neurochem, 2009. **108**(1): p. 260-72.
32. Mishto, M., Bellavista, E., Santoro, A., Stolzing, A., Ligorio, C., Nacmias, B., Spazzafumo, L., Chiappelli, M., Licastro, F., Sorbi, S., Pession, A., Ohm, T., Grune, T., and Franceschi, C., *Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains*. Neurobiol Aging, 2006. **27**(1): p. 54-66.
33. Pickering, A.M., Koop, A.L., Teoh, C.Y., Ermak, G., Grune, T., and Davies, K.J., *The immunoproteasome, the 20S proteasome and the PA28alpha proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes*. Biochem J, 2010. **432**(3): p. 585-94.
34. Dahlmann, B., Ruppert, T., Kuehn, L., Merforth, S., and Kloetzel, P.M., *Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymatic properties*. J Mol Biol, 2000. **303**(5): p. 643-53.
35. Drews, O., Wildgruber, R., Zong, C., Sukop, U., Nissum, M., Weber, G., Gomes, A.V., and Ping, P., *Mammalian proteasome subpopulations with distinct molecular compositions and proteolytic activities*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(11): p. 2021-31.
36. Winter, M.B., La Greca, F., Arastu-Kapur, S., Caiazza, F., Cimermancic, P., Buchholz, T.J., Anderl, J.L., Ravalin, M., Bohn, M.F., Sali, A., O'Donoghue, A.J., and Craik, C.S., *Immunoproteasome functions explained by divergence in cleavage specificity and regulation*. Elife, 2017. **6**.
37. Wilck, N. and Ludwig, A., *Targeting the Ubiquitin-Proteasome System in Atherosclerosis: Status Quo, Challenges, and Perspectives*. Antioxid Redox Signal, 2014.
38. Wang, F., Lerman, A., and Herrmann, J., *Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in atherosclerotic cardiovascular disease*. Am J Cardiovasc Dis, 2015. **5**(1): p. 83-100.

39. Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., and Maniatis, T., *The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B*. Cell, 1994. **78**(5): p. 773-85.
40. Monaco, C. and Paleolog, E., *Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis*. Vol. 61. 2004. 671-82.
41. Berberian, P.A., Myers, W., Tytell, M., Challa, V., and Bond, M.G., *Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries*. Am J Pathol, 1990. **136**(1): p. 71-80.
42. Rocken, C., Tautenhahn, J., Buhling, F., Sachwitz, D., Vockler, S., Goette, A., and Burger, T., *Prevalence and pathology of amyloid in atherosclerotic arteries*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(3): p. 676-7.
43. Zhou, J., Lhotak, S., Hilditch, B.A., and Austin, R.C., *Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice*. Circulation, 2005. **111**(14): p. 1814-21.
44. Versari, D., Herrmann, J., Gossel, M., Mannheim, D., Sattler, K., Meyer, F.B., Lerman, L.O., and Lerman, A., *Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in human carotid atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(9): p. 2132-9.
45. Marfella, R., D'Amico, M., Di Filippo, C., Baldi, A., Siniscalchi, M., Sasso, F.C., Portoghese, M., Carbonara, O., Crescenzi, B., Sangiuolo, P., Nicoletti, G.F., Rossiello, R., Ferraraccio, F., Cacciapuoti, F., Verza, M., Coppola, L., Rossi, F., and Paolisso, G., *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.
46. Herrmann, J., Edwards, W.D., Holmes, D.R., Jr., Shogren, K.L., Lerman, L.O., Ciechanover, A., and Lerman, A., *Increased ubiquitin immunoreactivity in unstable atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndromes*. J Am Coll Cardiol, 2002. **40**(11): p. 1919-27.
47. Herrmann, J., Soares, S.M., Lerman, L.O., and Lerman, A., *Potential Role of the Ubiquitin-Proteasome System in Atherosclerosis: Aspects of a Protein Quality Disease*. Journal of the American College of Cardiology, 2008. **51**(21): p. 2003-10.
48. Di Filippo, C., Marfella, R., and D'Amico, M., *Possible dual role of ubiquitin-proteasome system in the atherosclerotic plaque progression*. J Am Coll Cardiol, 2008. **52**(16): p. 1350-1; author reply 1.
49. Herrmann, J., Saguner, A.M., Versari, D., Peterson, T.E., Chade, A., Olson, M., Lerman, L.O., and Lerman, A., *Chronic proteasome inhibition contributes to coronary atherosclerosis*. Circ Res, 2007. **101**(9): p. 865-74.
50. Van Herck, J.L., De Meyer, G.R.Y., Martinet, W., Bult, H., Vrints, C.J., and Herman, A.G., *Proteasome inhibitor bortezomib promotes a rupture-prone plaque phenotype in ApoE-deficient mice*. Basic Research in Cardiology, 2009. **105**(1): p. 39.
51. Wilck, N., Fechner, M., Dreger, H., Hewing, B., Arias, A., Meiners, S., Baumann, G., Stangl, V., Stangl, K., and Ludwig, A., *Attenuation of early atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by proteasome inhibition*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(6): p. 1418-26.
52. Feng, B., Zhang, Y., Mu, J., Ye, Z., Zeng, W., Qi, W., Luo, Z., Guo, Y., Yang, X., and Yuan, F., *Preventive effect of a proteasome inhibitor on the formation of accelerated atherosclerosis in rabbits with uremia*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **55**(2): p. 129-38.
53. Wilck, N., Fechner, M., Dan, C., Stangl, V., Stangl, K., and Ludwig, A., *The Effect of Low-Dose Proteasome Inhibition on Pre-Existing Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(4).
54. Zu, L., Bedja, D., Fox-Talbot, K., Gabrielson, K.L., Van Kaer, L., Becker, L.C., and Cai, Z.P., *Evidence for a role of immunoproteasomes in regulating cardiac muscle mass in diabetic mice*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2010. **49**(1): p. 5-15.
55. Moschonas, A., Kouraki, M., Knox, P.G., Thymiakou, E., Kardassis, D., and Eliopoulos, A.G., *CD40 induces antigen transporter and immunoproteasome gene expression in carcinomas via the*

- coordinated action of NF-kappaB and of NF-kappaB-mediated de novo synthesis of IRF-1.* Mol Cell Biol, 2008. **28**(20): p. 6208-22.
56. Pickering, A.M. and Davies, K.J., *Differential roles of proteasome and immunoproteasome regulators Pa28alpha, Pa28gamma and Pa200 in the degradation of oxidized proteins.* Arch Biochem Biophys, 2012. **523**(2): p. 181-90.
  57. Joeris, T., Schmidt, N., Ermert, D., Krienke, P., Visekruna, A., Kuckelkorn, U., Kaufmann, S.H., and Steinhoff, U., *The proteasome system in infection: impact of beta5 and LMP7 on composition, maturation and quantity of active proteasome complexes.* PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39827.
  58. Ding, Q., Martin, S., Dimayuga, E., Bruce-Keller, A.J., and Keller, J.N., *LMP2 knock-out mice have reduced proteasome activities and increased levels of oxidatively damaged proteins.* Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(1-2): p. 130-5.
  59. Hussong, S.A., Kappahn, R.J., Phillips, S.L., Maldonado, M., and Ferrington, D.A., *Immunoproteasome deficiency alters retinal proteasome's response to stress.* J Neurochem, 2010. **113**(6): p. 1481-90.
  60. Seifert, U., Bialy, L.P., Ebstein, F., Bech-Otschir, D., Voigt, A., Schroter, F., Prozorovski, T., Lange, N., Steffen, J., Rieger, M., Kuckelkorn, U., Aktas, O., Kloetzel, P.M., and Kruger, E., *Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress.* Cell, 2010. **142**(4): p. 613-24.
  61. Opitz, E., Koch, A., Klingel, K., Schmidt, F., Prokop, S., Rahnefeld, A., Sauter, M., Heppner, F.L., Volker, U., Kandolf, R., Kuckelkorn, U., Stangl, K., Kruger, E., Kloetzel, P.M., and Voigt, A., *Impairment of immunoproteasome function by beta5i/LMP7 subunit deficiency results in severe enterovirus myocarditis.* PLoS Pathog, 2011. **7**(9): p. e1002233.
  62. Nathan, J.A., Spinnenhirn, V., Schmidtke, G., Basler, M., Groettrup, M., and Goldberg, A.L., *Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins.* Cell, 2013. **152**(5): p. 1184-94.
  63. Ebstein, F., Voigt, A., Lange, N., Warnatsch, A., Schroter, F., Prozorovski, T., Kuckelkorn, U., Aktas, O., Seifert, U., Kloetzel, P.M., and Kruger, E., *Immunoproteasomes are important for proteostasis in immune responses.* Cell, 2013. **152**(5): p. 935-7.
  64. McDermott, A., Jacks, J., Kessler, M., Emanuel, P.D., and Gao, L., *Proteasome-associated autoinflammatory syndromes: advances in pathogenesis, clinical presentations, diagnosis, and management.* Int J Dermatol, 2015. **54**(2): p. 121-9.
  65. Schmidt, N., Gonzalez, E., Visekruna, A., Kuhl, A.A., Loddenkemper, C., Mollenkopf, H., Kaufmann, S.H., Steinhoff, U., and Joeris, T., *Targeting the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit LMP7 attenuates experimental colitis.* Gut, 2010. **59**(7): p. 896-906.
  66. Kalim, K.W., Basler, M., Kirk, C.J., and Groettrup, M., *Immunoproteasome subunit LMP7 deficiency and inhibition suppresses Th1 and Th17 but enhances regulatory T cell differentiation.* J Immunol, 2012. **189**(8): p. 4182-93.
  67. Vachharajani, N., Joeris, T., Luu, M., Hartmann, S., Pautz, S., Jenike, E., Pantazis, G., Prinz, I., Hofer, M.J., Steinhoff, U., and Visekruna, A., *Prevention of colitis-associated cancer by selective targeting of immunoproteasome subunit LMP7.* Oncotarget, 2017. **8**(31): p. 50447-59.
  68. Koerner, J., Brunner, T., and Groettrup, M., *Inhibition and deficiency of the immunoproteasome subunit LMP7 suppress the development and progression of colorectal carcinoma in mice.* Oncotarget, 2017. **8**(31): p. 50873-88.
  69. Basler, M., Dajee, M., Moll, C., Groettrup, M., and Kirk, C.J., *Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome.* J Immunol, 2010. **185**(1): p. 634-41.
  70. Volkov, A., Hagner, S., Loser, S., Alnahas, S., Raifer, H., Hellhund, A., Garn, H., and Steinhoff, U., *beta5i subunit deficiency of the immunoproteasome leads to reduced Th2 response in OVA induced acute asthma.* PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60565.
  71. Mundt, S., Engelhardt, B., Kirk, C.J., Groettrup, M., and Basler, M., *Inhibition and deficiency of the immunoproteasome subunit LMP7 attenuates LCMV-induced meningitis.* Eur J Immunol, 2016. **46**(1): p. 104-13.

72. Kimura, H., Usui, F., Karasawa, T., Kawashima, A., Shirasuna, K., Inoue, Y., Komada, T., Kobayashi, M., Mizushina, Y., Kasahara, T., Suzuki, K., Iwasaki, Y., Yada, T., Caturegli, P., and Takahashi, M., *Immunoproteasome subunit LMP7 Deficiency Improves Obesity and Metabolic Disorders*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 15883.
73. Basler, M., Mundt, S., Bitzer, A., Schmidt, C., and Groettrup, M., *The immunoproteasome: a novel drug target for autoimmune diseases*. *Clin Exp Rheumatol*, 2015. **33**(4 Suppl 92): p. S74-9.
74. Chen, S., Kammerl, I.E., Vosyka, O., Baumann, T., Yu, Y., Wu, Y., Irmeler, M., Overkleeft, H.S., Beckers, J., Eickelberg, O., Meiners, S., and Stoeger, T., *Immunoproteasome dysfunction augments alternative polarization of alveolar macrophages*. *Cell Death Differ*, 2016. **23**(6): p. 1026-37.
75. Basler, M., Mundt, S., Muchamuel, T., Moll, C., Jiang, J., Groettrup, M., and Kirk, C.J., *Inhibition of the immunoproteasome ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis*. *EMBO Mol Med*, 2014. **6**(2): p. 226-38.
76. Kirschner, F., Reppe, K., Andresen, N., Witzenrath, M., Ebstein, F., and Kloetzel, P.M., *Proteasome beta5i Subunit Deficiency Affects Opsonin Synthesis and Aggravates Pneumococcal Pneumonia*. *PLoS One*, 2016. **11**(4): p. e0153847.
77. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. 1986. *Biotechnology*, 1992. **24**: p. 17-27.
78. Lopes-Virella, M.F., Stone, P., Ellis, S., and Colwell, J.A., *Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods*. *Clin Chem*, 1977. **23**(5): p. 882-4.
79. Wang, Z., Guo, D., Yang, B., Wang, J., Wang, R., Wang, X., and Zhang, Q., *Integrated analysis of microarray data of atherosclerotic plaques: modulation of the ubiquitin-proteasome system*. *PLoS One*, 2014. **9**(10): p. e110288.
80. Matsuzawa-Nagata, N., Takamura, T., Ando, H., Nakamura, S., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Yokoyama, M., Honda, M., Miyamoto, K., and Kaneko, S., *Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity*. *Metabolism*, 2008. **57**(8): p. 1071-7.
81. Hewing, B., Ludwig, A., Dan, C., Potzsch, M., Hannemann, C., Petry, A., Lauer, D., Gorchach, A., Kaschina, E., Muller, D.N., Baumann, G., Stangl, V., Stangl, K., and Wilck, N., *Immunoproteasome subunit ss5i/LMP7-deficiency in atherosclerosis*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 13342.
82. Holmdahl, R. and Malissen, B., *The need for littermate controls*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(1): p. 45-7.
83. Griffin, T.A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., Kaer, L.V., Monaco, J.J., and Colbert, R.A., *Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits*. *J Exp Med*, 1998. **187**(1): p. 97-104.
84. Guillaume, B., Chapiro, J., Stroobant, V., Colau, D., Van Holle, B., Parvizi, G., Bousquet-Dubouch, M.P., Theate, I., Parmentier, N., and Van den Eynde, B.J., *Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(43): p. 18599-604.
85. Pelletier, S., Schuurman, K.G., Berkers, C.R., Ovaa, H., Heck, A.J.R., and Raijmakers, R., *Quantifying cross-tissue diversity in proteasome complexes by mass spectrometry*. *Molecular BioSystems*, 2010. **6**(8): p. 1450-3.
86. Mishto, M., Liepe, J., Textoris-Taube, K., Keller, C., Henklein, P., Weberruss, M., Dahlmann, B., Enenkel, C., Voigt, A., Kuckelkorn, U., Stumpf, M.P., and Kloetzel, P.M., *Proteasome isoforms exhibit only quantitative differences in cleavage and epitope generation*. *Eur J Immunol*, 2014.
87. Hokanson, J.E. and Austin, M.A., *Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies*. *J Cardiovasc Risk*, 1996. **3**(2): p. 213-9.
88. Zhang, X., Qi, R., Xian, X., Yang, F., Blackstein, M., Deng, X., Fan, J., Ross, C., Karasinska, J., Hayden, M.R., and Liu, G., *Spontaneous atherosclerosis in aged lipoprotein lipase-deficient mice with severe hypertriglyceridemia on a normal chow diet*. *Circ Res*, 2008. **102**(2): p. 250-6.

89. Bookstein, L., Gidding, S.S., Donovan, M., and Smith, F.A., *Day-to-day variability of serum cholesterol, triglyceride, and high-density lipoprotein cholesterol levels. Impact on the assessment of risk according to the National Cholesterol Education Program guidelines.* Arch Intern Med, 1990. **150**(8): p. 1653-7.
90. Klop, B., Cohn, J.S., van Oostrom, A.J.H.H.M., van Wijk, J.P.H., Birnie, E., and Cabezas, M.C., *Daytime triglyceride variability in men and women with different levels of triglyceridemia.* Clinica Chimica Acta, 2011. **412**(23): p. 2183-9.
91. Samson, C.E., Galia, A.L.B., Llave, K.I.C., Zacarias, M.B., and Mercado-Asis, L.B., *Postprandial Peaking and Plateauing of Triglycerides and VLDL in Patients with Underlying Cardiovascular Diseases Despite Treatment.* Int J Endocrinol Metab, 2012. **10**(4): p. 587-93.
92. Kremer, M., Henn, A., Kolb, C., Basler, M., Moebius, J., Guillaume, B., Leist, M., Van den Eynde, B.J., and Groettrup, M., *Reduced immunoproteasome formation and accumulation of immunoproteasomal precursors in the brains of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice.* J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5549-60.
93. Liu, H., Wan, C., Ding, Y., Han, R., He, Y., Xiao, J., and Hao, J., *PR-957, a selective inhibitor of immunoproteasome subunit low-MW polypeptide 7, attenuates experimental autoimmune neuritis by suppressing Th17-cell differentiation and regulating cytokine production.* FASEB J, 2017. **31**(4): p. 1756-66.
94. Liu, R.T., Zhang, P., Yang, C.L., Pang, Y., Zhang, M., Zhang, N., Yue, L.T., Li, X.L., Li, H., and Duan, R.S., *ONX-0914, a selective inhibitor of immunoproteasome, ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by modulating humoral response.* J Neuroimmunol, 2017. **311**: p. 71-8.
95. Althof, N., Goetzke, C.C., Kespohl, M., Voss, K., Heuser, A., Pinkert, S., Kaya, Z., Klingel, K., and Beling, A., *The immunoproteasome-specific inhibitor ONX 0914 reverses susceptibility to acute viral myocarditis.* EMBO Mol Med, 2018.
96. Muchamuel, T., Basler, M., Aujay, M.A., Suzuki, E., Kalim, K.W., Lauer, C., Sylvain, C., Ring, E.R., Shields, J., Jiang, J., Shwonek, P., Parlati, F., Demo, S.D., Bennett, M.K., Kirk, C.J., and Groettrup, M., *A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis.* Nat Med, 2009. **15**(7): p. 781-7.
97. Guo, Y., Chen, X., Li, D., Liu, H., Ding, Y., Han, R., Shi, Y., and Ma, X., *PR-957 mediates neuroprotection by inhibiting Th17 differentiation and modulating cytokine production in a mouse model of ischaemic stroke.* Clin Exp Immunol, 2018.
98. Al-Homsi, A.S., Lai, Z., Roy, T.S., and Kouttab, N., *Effect of novel proteasome and immunoproteasome inhibitors on dendritic cell maturation, function, and expression of I $\kappa$ B and NF $\kappa$ B.* Transpl Immunol, 2013.
99. Chen, X., Zhang, X., Wang, Y., Lei, H., Su, H., Zeng, J., Pei, Z., and Huang, R., *Inhibition of immunoproteasome reduces infarction volume and attenuates inflammatory reaction in a rat model of ischemic stroke.* Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1626.

## **B Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Cristian Dan, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Einfluss der Defizienz der immunoproteasomalen Untereinheit LMP7 auf die Entwicklung und Progression der Atherosklerose“

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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. . Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

## **C Anteilserklärung**

Ich, Cristian Dan, hatte folgenden Anteil an der Publikation

Hewing, B. Ludwig, A. **Dan, C.** Potzsch, M. Hannemann, C. Petry, A. Lauer, D. Gorlach, A. Kaschina, E. Muller, D. N. Baumann, G. Stangl, V. Stangl, K. Wilck, N., **Immunoproteasome subunit  $\beta 5i$ /LMP7-deficiency in atherosclerosis**. Scientific Reports, 2017.

Beiträge:

- Ko-Autorenschaft
- Hauptanteil an der Durchführung und Auswertung der Experimente:
  - En-face Plaqueanalyse, Histologische Plaqueanalyse (Ölrot-O: Plaquelast, Movat-Pentachrom: nekrotischer Kern) Abbildungen 1 A und B, Genotypisierung, Phänotypisierung (Gewicht, Triglyzerid, Cholesterol, HDL, LDL) Tabelle 1, Tabelle S1, Western Blot (Proteasomale Untereinheiten (nativ) Abbildung 3 A und B Milz, S6 Leber.
  - Etablierung und Auswertung immunhistochemischer Plaqueanalysen (FK2/DAPI: Ubiquitin-Konjugate, FK2/ Mac-2: Makrophagen und Ubiquitinkon) Abbildung 1 B.
- Wesentlicher Anteil an der Aufarbeitung und Darstellung der erhobenen Daten in Abbildungen.
- Korrektur des zur Publikation führenden Manuskripts sowie Mitarbeit an der Revision im Rewiever-Prozess.

---

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **D Lebenslauf**

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



## **E Publikationsverzeichnis**

1. Hewing, B. Ludwig, A. **Dan, C.** Potzsch, M. Hannemann, C. Petry, A. Lauer, D. Gorch, A. Kaschina, E. Muller, D. N. Baumann, G. Stangl, V. Stangl, K. Wilck, N., Immunoproteasome subunit  $\beta 5i$ /LMP7-deficiency in atherosclerosis. Scientific Reports, 2017
2. Wilck, N. Fechner, M. **Dan, C.** Stangl, V. Stangl, K. Ludwig, A., The Effect of Low-Dose Proteasome Inhibition on Pre-Existing Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice. International Journal of Molecular Science, 2017

## **F Danksagung**

Ich bedanke mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Antje Ludwig und Herrn Dr. med. Nicola Wilck für die Überlassung des Themas, für das in mich gesetzte Vertrauen sowie die Möglichkeit im kardiologischen Forschungslabor der medizinischen Klinik für Kardiologie und Angiologie CCM zu arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Antje Ludwig für die umfassende wissenschaftliche Betreuung, die geistreichen Anregungen und ihre Herzlichkeit.

Weiterhin möchte ich mich insbesondere bei Frau Anke Stach und Susanne Metzkow sowie bei allen anderen Mitarbeitern des kardiologischen Forschungslabors bedanken, die mit Rat und Tat zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu guter Letzt danke ich meiner lieben Familie und meinen Freunden für ihre bedingungslose Unterstützung.