

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Kardiologie, Pulmologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Immunhistochemische Analyse  
der Expression des Immunoproteasoms  
in atherosklerotischen Plaqueläsionen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
Andreana Danielle Coppi  
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. K. Stangl  
2. Prof. Dr. med. U. Seifert  
3. Prof. Dr. med. L. Harms

Datum der Promotion: 23.06.2013

*Für meine liebe Mutter*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
1.1	ATHEROSKLEROSE .....	3
1.1.1	<i>Atherosklerose und ihre Folgekrankheiten .....</i>	<i>3</i>
1.1.2	<i>Kardiovaskuläre Risikofaktoren.....</i>	<i>4</i>
1.1.3	<i>Pathogenese atherosklerotischer Plaques .....</i>	<i>6</i>
1.2	UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM.....	8
1.2.1	<i>Ubiquitinierung von Proteasomsubstraten .....</i>	<i>8</i>
1.2.2	<i>Struktur des Proteasoms.....</i>	<i>9</i>
1.2.3	<i>Ubiquitin-Proteasom-System und die Bedeutung in der Atherosklerose .....</i>	<i>11</i>
1.2.4	<i>Das Immunproteasom.....</i>	<i>13</i>
1.2.5	<i>MHC-Klasse-I vermittelte Antigenpräsentation durch das Proteasom.....</i>	<i>14</i>
1.2.6	<i>CD8-positive T-Lymphozyten und ihre Bedeutung in der Atherosklerose .....</i>	<i>16</i>
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>METHODIK.....</b>	<b>19</b>
3.1	PATIENTENMATERIAL .....	19
3.1.1	<i>Herkunft des Patientenmaterials .....</i>	<i>19</i>
3.1.2	<i>Operatives Vorgehen und Blutentnahmen .....</i>	<i>19</i>
3.1.3	<i>Aufarbeitung und Einbettung der Präparate.....</i>	<i>20</i>
3.2	HERSTELLUNG DER SCHNITTPRÄPARATE .....	21
3.2.1	<i>Materialien und Reagenzien .....</i>	<i>21</i>
3.2.2	<i>Durchführung.....</i>	<i>21</i>
3.3	HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG.....	22
3.3.1	<i>Prinzip .....</i>	<i>22</i>
3.3.2	<i>Materialien und Reagenzien .....</i>	<i>22</i>
3.3.3	<i>Durchführung.....</i>	<i>23</i>
3.4	EINTEILUNG DER PRÄPARATE NACH DER OXFORD KLASSIFIKATION .....	23
3.5	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN FÜR CD8- UND LMP7-DETEKTION .....	25
3.5.1	<i>Prinzip .....</i>	<i>25</i>
3.5.2	<i>Materialien und Reagenzien .....</i>	<i>27</i>
3.5.3	<i>Entparaffinierung und Rehydrierung.....</i>	<i>28</i>
3.5.4	<i>Antigendemaskierung .....</i>	<i>28</i>
3.5.5	<i>Antikörper-Testung.....</i>	<i>29</i>
3.5.6	<i>Positiv- und Negativkontrollen.....</i>	<i>30</i>
3.5.7	<i>Immunhistochemische CD8-Färbung nach der LSAB-Methode.....</i>	<i>31</i>
3.5.8	<i>Immunhistochemische LMP7-Färbung nach der LSAB-Methode .....</i>	<i>32</i>
3.5.9	<i>Auswertung der immunhistochemischen CD8-Färbung .....</i>	<i>33</i>

3.5.10 Auswertung der immunhistochemischen LMP7-Färbung .....	33
3.5.11 Statistische Auswertung .....	35
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>36</b>
4.1 NACHWEIS VON CD8-POSITIVEN T-LYMPHOZYTEN IN ATHEROSKLEROTISCHEN PLAQUES .....	37
4.2 NACHWEIS DER LMP7-EXPRESSION IN ATHEROSKLEROTISCHEN PLAQUES .....	43
4.3 ZUSAMMENHANG CD8-POSITIVER T-LYMPHOZYTEN MIT LMP7-EXPRESSION IN ATHEROSKLEROTISCHEN PLAQUES.....	49
4.4 VERTEILUNG DER KARDIOVASKULÄREN RISIKOFAKTOREN IM PATIENTENKOLLEKTIV .....	52
4.5 ZUSAMMENHANG KARDIOVASKULÄRER RISIKOFAKTOREN MIT CD8-POSITIVEN T-LYMPHOZYTEN .....	53
4.6 ZUSAMMENHANG KARDIOVASKULÄRER RISIKOFAKTOREN MIT LMP7-EXPRESSION .....	57
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
5.1 NACHWEIS VON CD8-POSITIVEN T-LYMPHOZYTEN IN HUMANEN ATHEROSKLEROTISCHEN PLAQUES .....	61
5.2 CD8-POSITIVE T-LYMPHOZYTEN KORRELIEREN NICHT MIT PROGRESSION UND KARDIOVASKULÄREN RISIKOFAKTOREN .....	63
5.3 NACHWEIS VON IMMUNOPROTEASOM IN HUMANEN ATHEROSKLEROTISCHEN PLAQUES .....	65
5.4 IMMUNOPROTEASOM IST UNABHÄNGIG VON CD8-POSITIVEN T-LYMPHOZYTEN .....	66
5.5 BEDEUTUNG DES IMMUNOPROTEASOMS FÜR DIE PROGRESSION ATHEROSKLEROTISCHER PLAQUES.....	67
5.6 LMP7-EXPRESSION IN FORTGESCHRITTENEN ATHEROSKLEROTISCHEN LÄSIONEN KORRELIERT MIT KARDIOVASKULÄREN RISIKOFAKTOREN .....	73
5.7 LIMITATIONEN DER VORLIEGENDEN ARBEIT .....	75
5.8 BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE UND AUSBLICKE.....	76
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>78</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>80</b>
<b>8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>91</b>
<b>9 TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
<b>10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>95</b>
<b>11 ANHANG.....</b>	<b>98</b>
11.1 DANKSAGUNG.....	98
11.2 LEBENS LAUF.....	99
11.3 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....	100

# 1 Einleitung

## 1.1 Atherosklerose

### 1.1.1 Atherosklerose und ihre Folgekrankheiten

Nach Angaben der *Weltgesundheitsorganisation (WHO)* sterben weltweit jährlich 15 Millionen Menschen an den Folgen von kardiovaskulären Erkrankungen [1]. Laut aktuellsten Daten des *Statistischen Bundesamts Deutschland* von 2011 gehören in Deutschland zu den häufigsten Todesursachen 2010, wie auch in den Vorjahren, Erkrankungen des kardiovaskulären Systems. Mit 41,1 % erlag fast jeder zweite Gestorbene an den Folgen einer Herz-Kreislauf-Erkrankung [2].

Atherosklerose ist für einen Großteil der kardiovaskulären Erkrankungen verantwortlich. Die Atherosklerose (Synonym: Arteriosklerose) ist eine chronische und entzündliche Erkrankung der Arterien. Durch die Entstehung von atherosklerotischen Plaques kommt es zu Stenosen bis hin zu Okklusionen, die sich teilweise über mehrere Jahre langsam und symptomlos entwickeln können. Durch ausgeprägte Stenosierungen treten Minderperfusionen und Ischämien im versorgenden Stromgebiet auf. Die schwerwiegendste klinische Komplikation der Atherosklerose resultiert durch einen plötzlichen thrombotischen Arterienverschluss auf dem Boden einer Plaqueruptur [3]. An der Plaque-Bruchstelle kommt es zu Thrombozytenaggregation, wodurch sich ein Thrombus bildet (siehe **Abbildung 1**). Dieses thrombotische Material kann die Arterie akut verschließen oder es wird mit dem Blutstrom zu einem anderen Gefäßabschnitt fortgerissen. Entsprechend des jeweiligen Stromgebietes manifestieren sich vielfältige Erkrankungen. Hierzu zählen insbesondere der Apoplex, die koronare Herzerkrankung (KHK) und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK).

Ist das gehirnversorgende Gefäßsystem, wie in der vorliegenden Arbeit über die *Arteria carotis interna*, durch einen embolischen oder thrombotischen Verschluss betroffen, wird von einem ischämischen **Apoplex** (Synonyme: Schlaganfall, Hirninfarkt) gesprochen. Die *WHO* definiert den Apoplex als ein rasch entwickelndes, neurologisches Defizit vaskulärer Ursache, welches länger als 24 Stunden anhält oder zum Tod führt [4]. 85 % der Apoplexe sind ischämischer und 15 % hämorrhagischer Genese und gehören zu den häufigsten Ursachen für Invalidität im höheren Lebensalter und stehen nach KHK und Myokardinfarkten an Platz zwei der deutschen

Todesursachenstatistiken [5]. Aufgrund der Durchblutungsstörungen manifestieren sich im nachgeschalteten Stromgebiet der *Arteria carotis interna*-Stenosen entsprechende Symptome. Wenn es sich hierbei um kurzfristige reversible neurologische Ausfälle handelt, wird von einer transitorischen ischämischen Attacke (*TIA*) gesprochen bzw. bei einer vorübergehenden Sehstörung von einer *Amaurosis fugax*. *Arteria carotis interna*-Stenosen werden in symptomatische *versus* asymptomatische Stenosen eingeteilt. Bei einer symptomatischen Stenose ist es zur Manifestation eines ischämischen Apoplexes oder einer *TIA* bei Vorliegen eines Stenosegrades von  $\geq 60\%$  innerhalb der letzten 120 Tage vor einer *Thrombendarteriektomie* gekommen [6]. Die *Thrombendarteriektomie* ist ein operatives Verfahren zur Rekanalisierung von Blutgefäßen, die embolisch oder thrombotisch verschlossen wurden. Nach Freilegung der betroffenen Arterie wird mittels Dissektionsspatel der Thrombus einschließlich der ihm anhaftenden *Intima* entfernt (siehe auch **Kapitel 3.1.2**).

Bei der **KHK**, der Manifestation der Atherosklerose in den Herzkranzarterien, treten aufgrund flusslimitierender Koronarstenosen Myokardischämien auf, die sich klinisch durch Angina Pectoris-Beschwerden, Herzrhythmusstörungen, akute Myokardinfarkte und plötzliche Herztode manifestieren [7].

Abhängig vom Stenosegrad und von Kollateralkreisläufen kann sich die Atherosklerose als **PAVK** manifestieren. Bei der PAVK treten aufgrund arterieller Durchblutungsstörung von Aorta und Extremitätenarterien belastungsabhängige ischämische Muskelschmerzen sowie Nekrosen und Gangrän durch Wundheilungsstörungen auf [8].

### 1.1.2 Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Auf die *Framingham-Herz-Studie* basierend, wurde eine Reihe kardiovaskulärer Risikofaktoren definiert [9,10]. Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Adipositas, Hypercholesterinämie, wenig Bewegung und Tabakkonsum gehören zu den typischen Wohlstandsmerkmalen und tragen erheblich zu den kardiovaskulären Risikofaktoren bei [11]. Das Risiko für KHK steigt mit höherem Lebensalter, bei positiver Familienanamnese für KHK, bei dauerhaft erhöhten LDL-Blutwerten (*low density lipoprotein*) und gleichzeitig erniedrigten HDL-Blutwerten (*high density lipoprotein*) weiterhin an [12]. Das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen potenziert sich beim Zusammentreffen mehrerer Risikofaktoren [13].

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Patienten folgende fünf Risikofaktoren evaluiert:

- **Adipositas** bedeutet Übergewicht, d.h. der Anteil der Fettmasse am Körpergewicht übersteigt 20-30 %. Indirekt kann dies durch den Körpermasseindex ( $BMI = \text{body mass index}$ ) eingeschätzt werden. Ab einem BMI ( $\text{kg Körpergewicht/Körpergröße m}^2$ )  $\geq 25$  wird von Adipositas gesprochen [5].
- **Arterielle Hypertonie** ist eine chronische Erhöhung des systolischen und/oder diastolischen Blutdrucks im arteriellen Gefäßsystem. Die *WHO* und die *Europäische Hypertonie Gesellschaft (ESH)* definieren hypertone Blutdruckwerte ab  $\geq 140/90$  mmHg, wobei eine weitere Einteilung in Grad 1 (leichte Hypertonie), Grad 2 (mittelschwere Hypertonie) und Grad 3 (schwere Hypertonie) erfolgt [14]. Ca. 90 % der Hypertonien sind primär dagegen sind ca. 10 % sekundärer Genese [5].
- **Diabetes mellitus** ist eine Gruppe von Stoffwechselerkrankung bei der es aufgrund eines absoluten oder relativen Insulinmangels zu Hyperglykämien kommt, wobei Typ 1-Diabetes mit 5-10 % und Typ 2-Diabetes mit über 90 % in Deutschland am häufigsten vorkommen [15]. Die *WHO* und die *American Diabetes Association (ADA)* definieren Diabetes mellitus bei einem Nüchternblutzucker-Wert  $\geq 126$  mg/dl oder unabhängig von der Nahrungsaufnahme bei einem Blutzuckerwert  $\geq 200$  mg/dl [16]. Beim Diabetes mellitus kommt es zur endothelialen Dysfunktion und demzufolge zur Beschleunigung der Atherogenese [17].
- **Hypercholesterinämie** bedeutet eine Erhöhung des Gesamtcholesterinwertes im Blut von  $> 200$  mg/dl. Zusammen mit erhöhtem LDL-Cholesterin, erniedrigtem HDL-Cholesterin und erhöhter Triglyceride werden sie zu den Hyperlipoproteinämien, Synonym Dyslipoproteinämien oder Hyperlipidämien, gezählt. Eine skandinavische Studie an über 4400 Patienten belegte durch eine medikamentöse Senkung des Gesamt- und LDL-Cholesterinwertes eine Primärprävention für KHK und deren Mortalitäten [18].
- Eine **positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen**, insbesondere KHK bei Männern vor dem 55. Lebensjahr und bei Frauen vor dem 65. Lebensjahr, steigert das Risiko für eine frühzeitige kardiovaskuläre Erkrankung unabhängig von anderen üblichen Risikofaktoren [19]. Eine große Anzahl an Allelen konnten analysiert werden, die mit einem genetischen Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert sind [20]. Zwillings- und Familienstudien belegen ein bis zu achtfach erhöhtes Risiko für Myokardinfarkte bei monozygoten Zwillingen [21].



### 1.1.3 Pathogenese atherosklerotischer Plaques

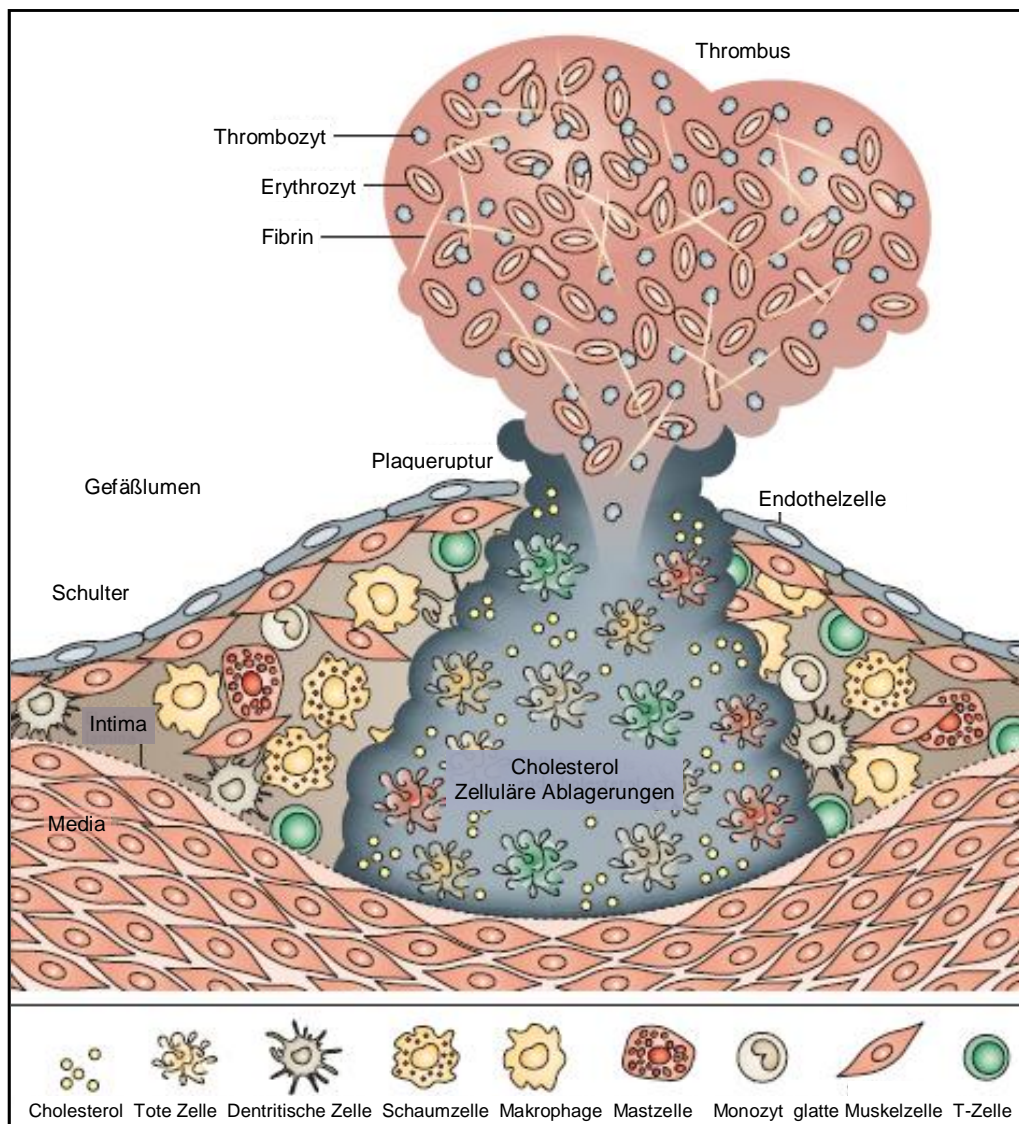
Die Entstehung der Atherosklerose (Atherogenese) muss mechanistisch als ein multifaktorielles Geschehen verstanden werden [13] und wird zumeist als ein inflammatorisches Geschehen im Sinne einer ‚*Response to injury*‘ gesehen [22].

1856 war Rudolf Virchow bereits der Ansicht, dass atherosklerotische Läsionen entzündlicher Genese sind [23]. Russel Ross formulierte 1977 die **Response-to-injury**-Hypothese, bei der es durch Schädigung der Endothelschicht zur Einwanderung von Immunzellen und zur Ablagerung von Lipidkomponenten kommt [24,25]. Den ersten Schritt in der Atherogenese bildet somit die sogenannte endotheliale Dysfunktion.

Vermehrte reaktive Sauerstoffradikale, z.B. Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen und Hydroxylradikale, wodurch es zu Schäden an DNA, Proteinen sowie Lipiden kommen kann und der oxidative Stress in der Zelle steigt, lösen eine initiale Schädigung des vaskulären Endothels aus. Durch die **endotheliale Dysfunktion** kommt es zu einer Störung der homöostatischen Eigenschaften des Endothels, wodurch sich insbesondere für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile die Permeabilität erhöht. Die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen führt auch zu einer deutlichen Verminderung des endothelprotektiven Vasodilators Stickstoffmonoxid (NO) und somit zu einer Herabsetzung der Gefäßrelaxation, die charakteristisch für die endotheliale Dysfunktion ist [26] und die Atherogenese begünstigen [27]. Als Folge der endothelialen Dysfunktion kommt es zu Makrophageninfiltration und der anschließenden Aktivierung humoraler Immunreaktionen in die Gefäßintima im Sinne eines chronisch-entzündlichen Prozesses [28].

Aus dem Blut in die Intima diffundiertes LDL, welches Cholesterol in die Körperperipherie transportiert, wird durch Enzyme und Sauerstoffradikale zu oxLDL (oxidiertes *low density lipoprotein*) modifiziert. Unter dem Einfluss von M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), gebildet von glatten Muskel- und Endothelzellen, differenzieren Monozyten zu Makrophagen. Auf der Makrophagenoberfläche werden *Scavenger*-Rezeptoren exprimiert und vermitteln den Makrophagen auf diese Weise die Aufnahme von oxLDL-Partikeln, wodurch sie sich bei vermehrter Aufnahme zu Schaumzellen im subendothelialen Intimaraum formieren, die makroskopisch zusammen mit T-Lymphozyten sogenannte *fatty streaks* (gelbliche Fettablagerungen) bilden [29].

Im Zentrum der atherosklerotischen Läsion formen Schaumzellen und extrazelluläre Lipide die Kernregion, welche umgeben von einer dünnen fibrösen Kappe aus glatten Muskelzellen und kollagenreicher Matrix ist [28]. Diese fibröse Kappe bildet sich zum Gefäßlumen hin und stabilisiert die Plaque. In der Schulterregion sind besonders viele Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen und einige T-Lymphozyten infiltriert (siehe **Abbildung 1**). Diese eingewanderten Immunzellen produzieren Zytokine, Proteasen, prothrombotische Moleküle und vaskuläre Substanzen, die die Inflammation und vaskuläre Funktion beeinflussen. Im weiteren Verlauf kann es zur Thrombusbildung oder Plaqueruptur mit Manifestation der verschiedenen Krankheitsbilder der Atherosklerose kommen (siehe **Kapitel 1.1.1**) (zur Übersicht [30]).

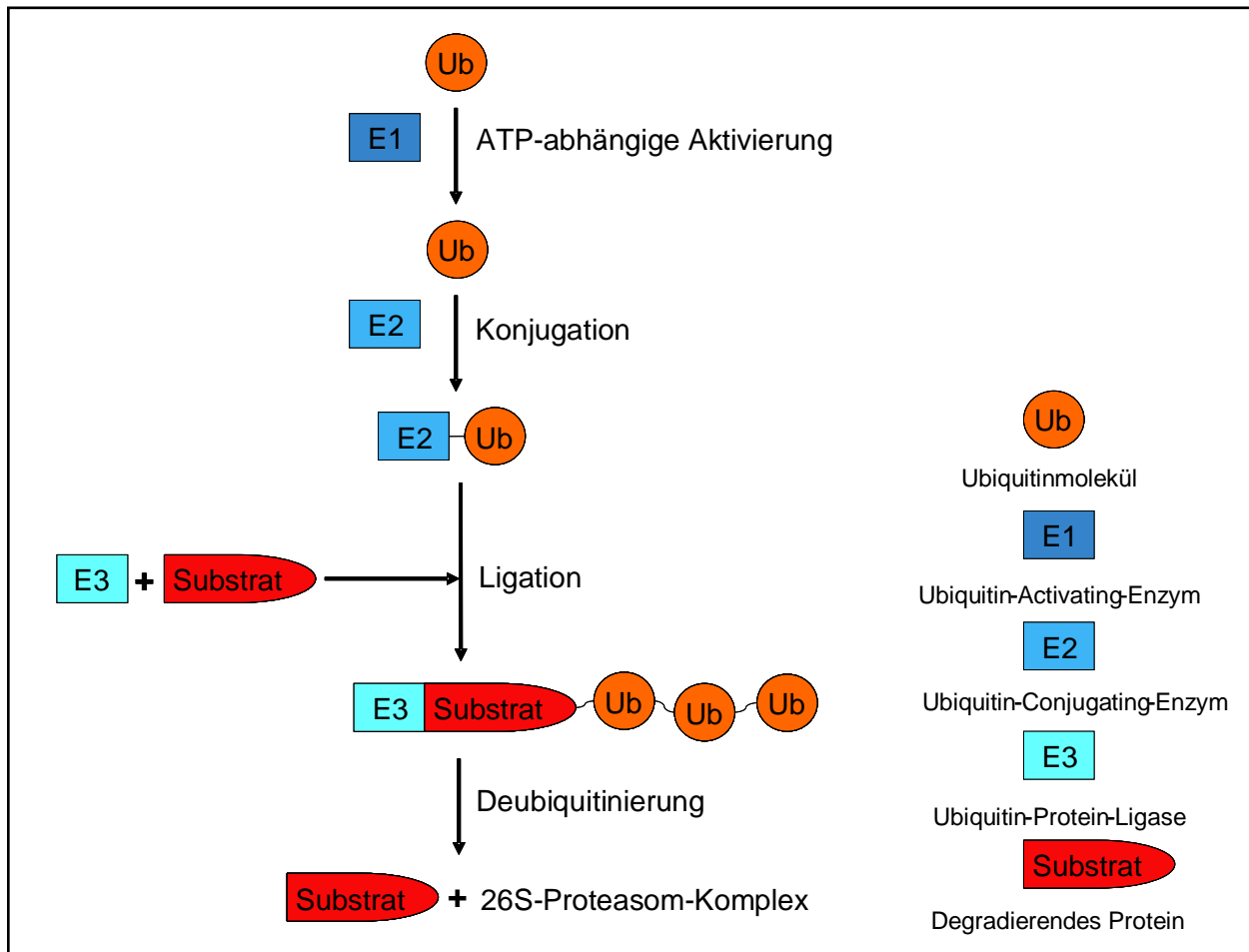


**Abbildung 1:** Zelluläre Anordnung eines atherosklerotischen Plaques mit Plaqueruptur und Thrombusbildung (modifiziert nach [30])

## 1.2 Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System kommt in den Zellen ubiquitär vor, d.h. es ist im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert. Es gehört zum zentralsten Abbauweg intrazellulärer Proteine. Nachdem das abzubauenende Protein mit Ubiquitinmolekülen markiert ist, kann es durch das Proteasom degradiert werden. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist demnach an der Regulierung komplexer Zellvorgänge beteiligt. Es spielt weiter eine zentrale Rolle bei der Generierung von antigenen Peptiden, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen CD8-positiven bzw. zytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert werden.

### 1.2.1 Ubiquitinierung von Proteasomsubstraten



**Abbildung 2:** Vereinfachte Darstellung der Ubiquitinierung von Proteasomsubstraten

Die intrazellulär abzubauenen Substrate müssen zunächst durch kovalente Bindungen mit Ubiquitinmolekülen markiert werden (siehe graphische Darstellung in **Abbildung 2**). Bei der Ubiquitin-Markierung sind drei Enzyme involviert.

Das Polypeptid Ubiquitin wird im ersten Schritt durch das *Ubiquitin-Activating-Enzym E1* in einem ATP-abhängigen Prozess aktiviert und anschließend auf ein Transportprotein übertragen, das sogenannte *Ubiquitin-Conjugating-Enzym E2*. Eine spezifische *Ubiquitin-Protein-Ligase E3* bindet das zu degradierende Substrat und überträgt es auf Ubiquitin. Auf diese Weise entstehen durch mehrere Durchläufe am Substrat Multi-Ubiquitin-Ketten. Vor der Degradierung der Proteine durch das Proteasom kommt es zur Abspaltung der Ubiquitinmoleküle durch das *Deubiquitinating-Enzym* bzw. *Ubiquitin-Recycling-Enzym*, sodass die Ubiquitinmoleküle wieder verwendend werden können (zur Übersicht [31]).

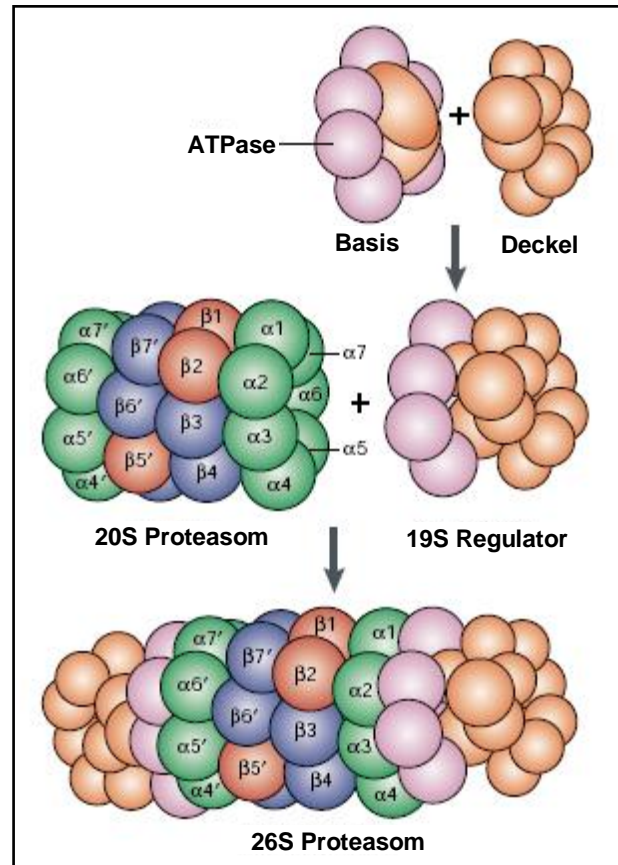
### 1.2.2 Struktur des Proteasoms

Das **20S Proteasom** ist die katalytisch aktive Form aller Proteasomformen. Es setzt sich aus 28 Untereinheiten zusammen. Vier heptamere Ringe bestehend aus  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheiten formen durch ihre Anordnung einen Zylinder. Die  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$  grün in **Abbildung 3**) bilden jeweils einen äußeren Ring und  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta 1$ - $\beta 7$  rot und blau in **Abbildung 3**) bilden zwei innere Ringe des 20S Proteasoms.

Am 20S Proteasom existiert an den  $\alpha$ -Enden jeweils eine Bindungsstelle für regulatorische Proteine. Durch Bindungen des 19S Regulatorprotein und des 11S Regulatorproteins entstehen verschiedene Subformen. Folgende Proteasomkomplexe existieren in eukaryotischen Zellen:

- 19S-20S-19S, das ca. 2000 kDA [32] schwere **26S Proteasom**
- 11S-20S-11S
- 19S-20S-11S, das Hybridproteasom [33].

Das kristalline **19S Regulatorprotein** (auch PA700) setzt sich aus Basis und Deckel zusammen [34]. Die Basis wird aus sechs ATPase- (Adenosintriphosphatase) (violett in **Abbildung 3**) und zwei Non-ATPase-Untereinheiten (orange in **Abbildung 3**) geformt. Der Deckel formt sich aus weiteren acht Non-ATPase-Untereinheiten. Die ATPase-Aktivität scheint Substrate zu entfalten, wodurch die Einschleusung in die katalytische 20S Kammer unterstützt wird (zur Übersicht [35]).



**Abbildung 3:** Der Aufbau des Proteasoms (Abbildung modifiziert nach [35])

Durch das Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) bindet sich das **11S Regulatorprotein** (auch PA28) an die  $\alpha$ -Enden des 20S Proteasoms. Das 11S Regulatorprotein setzt sich ringförmig aus drei  $\alpha$ - und vier  $\beta$ -Untereinheiten zusammen (**siehe Abbildung 4**) [36]. Eine gesteigerte Expression von 11S trägt zu einer verstärkten Antigenprozessierung bei, indem es auf das Proteasom induzierend wirkt und die Substrataufnahme und Abgabe der Peptidprodukte erhöht [37].

Die katalytischen Zentren liegen im Inneren des Zylinders bei den Untereinheiten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 5$  der beiden  $\beta$ -Ringe (rot in **Abbildung 3**) [38]. Nur diese drei  $\beta$ -Untereinheiten besitzen ein N-terminales Threonin als aktives Zentrum und können Peptidbindungen spalten.

Jede aktive proteasomale  $\beta$ -Untereinheit besitzt eine unterschiedliche Aktivität:

- $\beta 1$ -Untereinheit: *caspase-like* Aktivität spaltet nach sauren Aminosäuren
- $\beta 2$ -Untereinheit: *trypsin-like* Aktivität spaltet überwiegend nach basischen Aminosäuren
- $\beta 5$ -Untereinheit: *chymotrypsin-like* Aktivität spaltet nach hydrophoben Aminosäuren [39,40].

### 1.2.3 Ubiquitin-Proteasom-System und die Bedeutung in der Atherosklerose

Das Ubiquitin-Proteasom-System stellt neben den Lysosomen und mitochondrialen Proteasen den wichtigsten Proteinabbau der Zelle dar und degradiert hauptsächlich gealterte und falsch synthetisierte intrazelluläre Proteine [41,42]. Proteasomaler Proteinabbau spielt eine bedeutende Rolle bei der MHC-Klasse-I vermittelten Antigenpräsentation, indem es Peptide zur Verfügung stellt [43]. Bei dieser Antigenerkennung sind u.a. T-Lymphozyten beteiligt (siehe **Kapitel 1.2.5**). T-Lymphozyten vermitteln die zelluläre Immunität, wodurch auch das Ubiquitin-Proteasom-System ein zentraler Bestandteil des zellulären Immunsystems ist.

Weiterhin wirkt das Ubiquitin-Proteasom-System regulatorisch auf viele physiologische und pathophysiologische, zelluläre Prozesse [44]. Neben der Immunüberwachung [45] ist das Ubiquitin-Proteasom-System beim Zellzyklus und bei der Apoptose [46,47] sowie bei der Transkription und Signaltransduktion [47,48] involviert, indem es an der Degradation von Transkriptionsfaktoren, Enzymen und regulatorischen Proteinen maßgeblich beteiligt ist.

Hervorzuheben ist der Transkriptionsfaktor **NFκB** (nukleärer Faktor κB). Bei der Synthese und Aktivitätsregulation von NFκB ist das Ubiquitin-Proteasom-System involviert. Durch eine Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige limitierte Proteolyse erfolgt im Proteasom die Synthese der NFκB Untereinheit p50 aus einem p105-Vorläuferprotein [49]. NFκB spielt des Weiteren eine wesentliche Rolle bei der Atherogenese. In humanen atherosklerotischen Läsionen konnte NFκB in glatten Muskelzellen, Endothelzellen, Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten nachgewiesen werden [50]. Die Reduktion der Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit und erhöhter oxidativer Stress (siehe **Kapitel 1.1.3**) führen zur NFκB-Aktivierung und damit zur Auslösung inflammatorischer und proliferativer Prozesse. Neben Stickstoffmonoxid erfolgt die NFκB-Aktivierung durch mehr als 150 verschiedene Stimuli [51], z.B. durch TNF-α, IL-1, virale Infektionen und deren Genprodukte, UV-Licht oder durch B- und T-Zell-Aktivierung [52]. Dabei ist das Ubiquitin-Proteasom-System maßgeblich an der NFκB-Aktivierung beteiligt, indem es deren Inhibitoren (IκB) degradiert [53]. Ausgelöst durch proinflammatorische Stimuli wird IκB über Kinase-Kaskaden phosphoryliert. Das phosphorylierte IκB wird ubiquitiniert und kann anschließend vom 26S Proteasom degradiert werden. Das freie NFκB kann nun ungehemmt in den Zellkern wandern und die Transkription von inflammatorischen Faktoren veranlassen (zur Übersicht [52]). NFκB steuert die Expression wichtiger inflammatorischer Parameter, z.B. der

Zytokine und Chemokine, der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), der Immunrezeptoren und der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 [51,54]. Durch Proteasominhibitoren können in Endothelzellen sowie in Makrophagen diese NFκB-vermittelten Reaktionen total blockiert werden [55,56]. Die dargestellten NFκB-Kaskaden und der Einfluss auf die Stickstoffmonoxid-Bioverfügbarkeit machen die pathophysiologische Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems in der Atherogenese deutlich.

Ein Schlüsselenzym bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen ist auch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (**eNOS**), welche in Endothelzellen gebildet wird und den Botenstoff **NO** bildet. Die kardioprotektive Wirkung von NO umfasst die Regulation des Blutdrucks durch Vasodilatation, die Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie Leukozytenadhäsion und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [57]. Eine verringerte eNOS-Aktivität oder deren Fehlfunktion begünstigt somit die Atherogenese. Die Expression und die Aktivität der eNOS lässt sich durch Proteasominhibitoren in Endothelzellen steigern, was auf eine Beteiligung des Proteasoms bei der transkriptionellen Regulation der eNOS hindeutet [58].

Eine weitere Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-Systems lassen Ergebnisse in Hinblick auf die Schaumzellenbildung vermuten. Aggregiertes Lipoprotein (**agLDL**) hemmt die Apoptose in lipidbeladenen-Makrophagen vermutlich durch die Ubiquitinierung und anschließende Degradierung des pro-apoptotischen Proteins p53 und fördern dadurch die Schaumzellenbildung und Atherosklerose [59].

Schreitet die Atherosklerose weiter voran, verlieren glatte Gefäßmuskelzellen ihre Kontraktilität. Glatte Gefäßmuskelzellen wandern aus der Gefäßmedia in die Intima, proliferieren und transdifferenzieren vom kontraktilen zum synthetischen Phänotyp. Bei diesem Umbau gehen vor allem die Muskelhauptbestandteile (Myofilamente) verloren. Elektronmikroskopische Analysen von Rattenaorten zeigten, dass das Ubiquitin-Proteasom-System bei der Phänotyp-Änderung vom kontraktilen zum synthetischen Typ eine Hauptrolle spielt, da diese durch Proteasominhibitoren blockiert werden können [60].

Neben Anhaltspunkten in der Initialphase und der Progression der Atherosklerose existieren weiterhin Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem Ubiquitin-Proteasom-System und

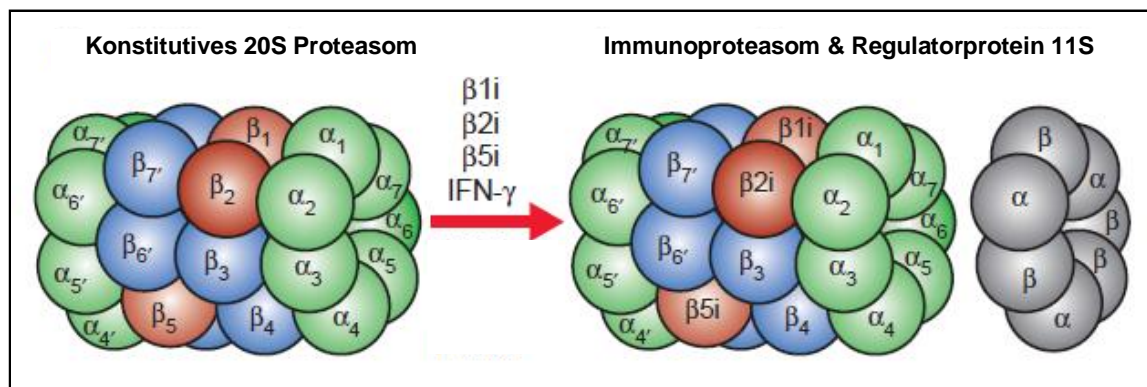
der Plaquestabilität. Die Stabilität der Kappe hängt vom Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese und Matrixabbau ab [61]. An der Destabilisierung der fibrösen Kappe haben Matrixmetalloproteinasen (**MMPs**) eine bedeutende Funktion. MMPs degradieren mit ihrer enzymatischen Funktion extrazelluläre Bindegewebsanteile, vor allem Kollagene. Ausgelöst durch inflammatorische Zytokine und anschließender Aktivierung von NFκB werden MMPs im fortgeschrittenem Stadium der Atherosklerose von Makrophagen, Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen sezerniert. Die Interleukin 1β-induzierte Aktivierung von MMP9 und MMP2 kann durch Proteasominhibitoren in kardialen Rattenfibroblasten verhindert werden [62].

Zusammengefasst zeigen diese Befunde die Beteiligung des Ubiquitin-Proteasom-System in einer Reihe von biologischen Prozessen wie Inflammation, Proliferation und Apoptose, die ein Bestandteil der einzelnen Stadien der Atherosklerose sind.

#### 1.2.4 Das Immunoproteasom

Das Zytokin IFN-γ induziert die Synthese der proteasomalen β-Untereinheiten des konstitutiven 20S Proteasoms, die als immunoproteasomale Untereinheiten bezeichnet werden:

- β1i bzw. LMP2 (*low molecular weight protein 2*)
- β5i bzw. LMP7 (*low molecular weight protein 7*)
- β2i bzw. MECL1 (*multicatalytic endopeptidase complex-like 1*) [63,64], (siehe **Abbildung 4**).



**Abbildung 4:** 20S Proteasom und Immunoproteasom (Abbildung modifiziert nach [64])

Diese fakultativen immunoproteasomalen Untereinheiten formen das Immunoproteasom [65]. Dieser Austausch geht mit einer leicht veränderten Schnittstellenpräferenz des Immunoproteasoms gegenüber dem konstitutiven 20S Proteasom einher (zur Übersicht [35]).



Immunoproteasome sind in hohem Maße vermehrt um das endoplasmatische Retikulum angereichert [66]. Beim Menschen liegen die Kodierungen für LMP2 und LMP7 auf Chromosom 6 zusammen mit dem MHC-Komplex; MECL1 ist auf Chromosom 16 kodiert [67].

**IFN- $\gamma$**  wird nach Antigenstimulation von Lymphozyten freigesetzt und gilt als stärkstes Makrophagen-aktivierendes Zytokin [68,69]. *In vitro*-Studien zeigen durch den Einfluss von IFN- $\gamma$  neben einer erhöhten Synthese der immunoproteasomalen Untereinheit LMP7 auch erhöhte MHC-Klasse-I- und II-Antigenpräsentationen in Endothelzellen (zur Übersicht [70]). Für zahlreiche MHC-Klasse-I-Epitope ist bekannt, dass sie effektiver durch das Immunoproteasom generiert werden und daher auch eine effektivere T-Zell-Antwort gegen infizierte oder entartete Zellen induzieren [35]. Bei vielen viralen Infektionen ist IFN- $\gamma$  vorwiegend für die Induktion des Immunoproteasom verantwortlich [71].

Aktuelle Studienergebnisse zeigen, dass das Immunoproteasom auch eine bedeutende Funktion bei Instandhaltung der Proteinhomöostase durch eine effiziente Degradierung besitzt und Zellen vor IFN- $\gamma$ -induzierten oxidativen Stress schützen kann [72].

### **1.2.5 MHC-Klasse-I vermittelte Antigenpräsentation durch das Proteasom**

Der MHC-Komplex befindet sich auf dem Chromosom 6 und kodiert die MHC-Klasse-I-Gene, die humanen Leukozytenantigene HLA-A, HLA-B und HLA-C [73]. Das MHC-Klasse-I-Molekül ist ein im endoplasmatischen Retikulum gebildetes Glykoprotein und setzt sich aus einem  $\beta$ 2-Mikroglobulin und einer transmembranen  $\alpha$ -Kette, geformt aus  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- und  $\alpha$ 3-Untereinheiten, zusammen. Zwischen der  $\alpha$ 1- und  $\alpha$ 2-Untereinheit bildet sich für die abgebauten Substrate eine antigenbindende Tasche [74].

Antigene Peptide werden in erster Linie durch das Ubiquitin-Proteasom-System generiert und auf jeder kernhaltigen Körperzelle an der Zelloberfläche über MHC (*major histocompatibility complex*)-Klasse-I-Moleküle präsentiert, wodurch das Immunsystem zwischen ‚eigen‘ und ‚fremd‘ unterscheiden kann (zur Übersicht [75]). Zellen werden aufgrund eines andersartigen MHC-Klasse-I-Peptid-Repertoires als ‚fremd‘ identifiziert. Hierzu zählen fremde Zellen im Rahmen von Transplantationen, weshalb eine überwiegend T-Zell-vermittelte akute Abstoßungsreaktion beim Transplantierten die Folge sein kann [68]. Weiterhin werden

virusinfizierte Zellen und mutierte Zellen (Tumorzellen) identifiziert. Speziell CD8-positive T-Lymphozyten erkennen MHC-Klasse-I-Komplexe und eliminieren diese fremden, infizierten oder mutierten Zellen [76].

Circa 30 % der neu synthetisierten Proteine einer Zelle sind fehlerhaft aufgebaut, sogenannte **DRIPs** (*defective ribosomal products*). DRIPs werden, gemäß der DRIPs-Hypothese, nach ihrer Synthese rasch ubiquitinyliert, vom Proteasom wieder abgebaut und stehen als antigene Peptide zur Verfügung [77,78]. Die durch das Ubiquitin-Proteasom-System entstandenen antigenen Peptide und Epitop-Präkursoren werden durch spezifische TAP (*transporter associated with antigen processing*) unter ATP-Verbrauch ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dort können die Peptide durch Aminopeptidasen weiter getrimmt und anschließend mittels verschiedener Chaperone an geeignete MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden und stabilisiert werden. Anschließend erfolgt über den Golgi-Apparat der vesikuläre Transport der Peptid-MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zelloberfläche (siehe graphische Darstellung in **Abbildung 5**, zur Übersicht [64,79]).

Vermutlich haben sich zwei funktionell unterschiedliche Kaskaden der Antigenprozessierung entwickelt. *Strehl et al.* unterscheiden hierbei die ‚*konstitutiv proteolytische Kaskade*‘ von der ‚*immunologisch-adaptiven proteolytischen Kaskade*‘ [45]. Der wesentliche Unterschied besteht für die Autoren in der Quantität der präsentierten MHC-Klasse-I-Antigene an der Zelloberfläche. Mit Hilfe von Assemblierungsfaktoren wird das Immunoproteasom schnell assembliert und arbeitsfähig. Stimuliert durch das Zytokin IFN- $\gamma$  baut die ‚*immunologisch-adaptive proteolytische Kaskade*‘ Proteine sehr schnell zu antigene Peptide ab, die im ER weiter zu Peptid-MHC-Klasse-I-Moleküle geformt und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche präsentiert werden. Das Immunoproteasom ist für eine optimierte Antigenpräsentation verantwortlich (siehe **Kapitel 1.2.4**). Die ‚*konstitutiv proteolytische Kaskade*‘ arbeitet dagegen sehr effizient. Um ein Peptid-MHC-Klasse-I-Komplex letztlich an der Zelloberfläche präsentieren zu können, müssen bis zu 10.000 Kopien von Proteinen degradiert werden [80,81]. Während einer Immunreaktion ändert sich das Gleichgewicht zwischen den beiden parallel existierenden proteolytischen Kaskaden nach *Strehl et al.* vermutlich zugunsten des ‚*immunologisch-adaptiven proteolytischen Systems*‘ [45].

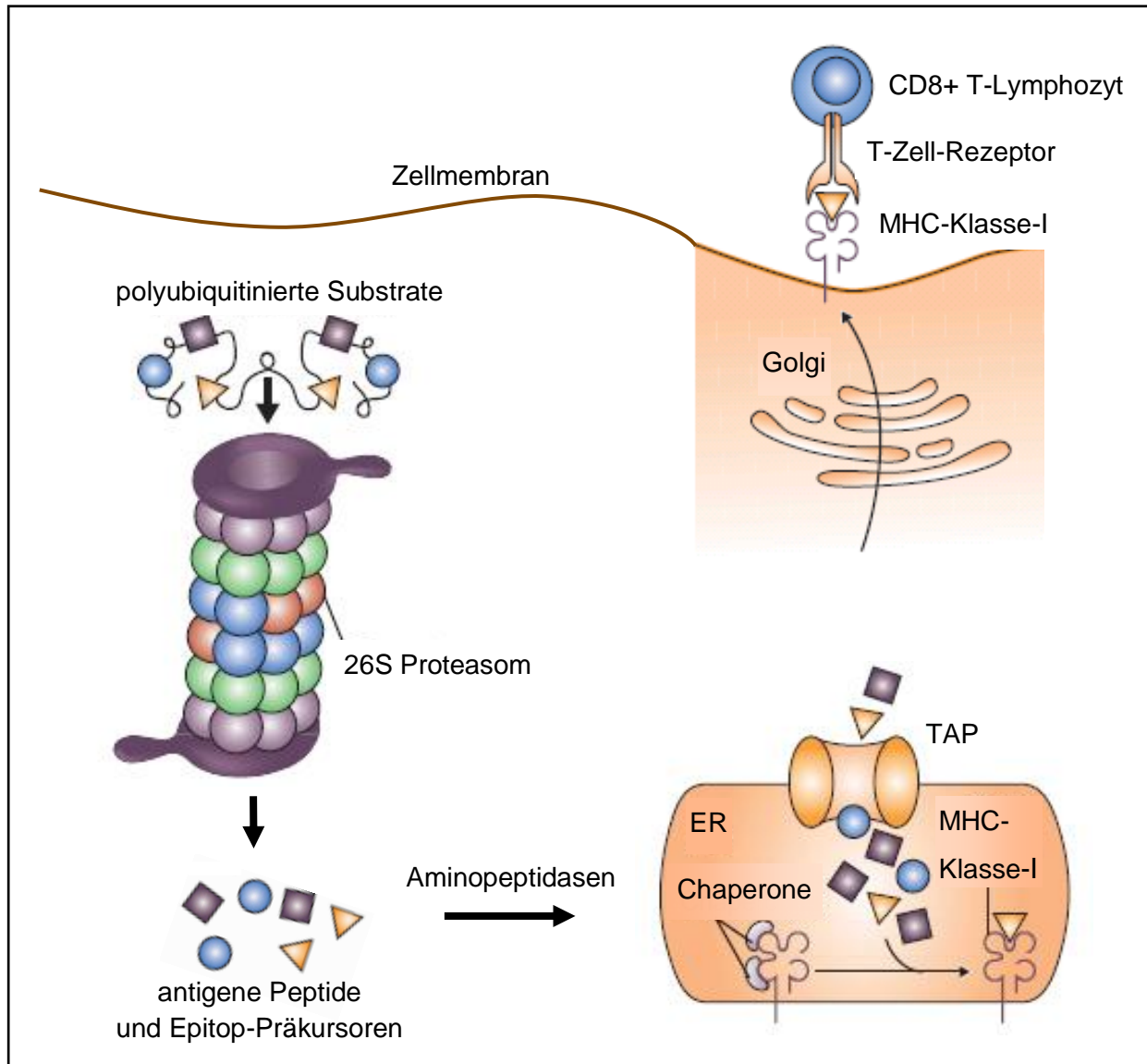


Abbildung 5: MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation durch das Proteasom (modifiziert nach [64])

### 1.2.6 CD8-positive T-Lymphozyten und ihre Bedeutung in der Atherosklerose

CD8-positive T-Lymphozyten (auch zytotoxische T-Zellen) sind Bestandteil der zellulären Immunität und erkennen endogene Antigene (z.B. körpereigene Proteine, Virusproteine, Tumorproteine) über MHC-Klasse-I-Moleküle auf allen kernhaltigen Körperzellen (siehe **Kapitel 1.2.5**). Über spezifische T-Zell-Rezeptoren binden CD8-positive T-Lymphozyten an die antigenpräsentierende Zelle und lösen in ihr mit Hilfe von Zellmembran-zerstörenden Substanzen die Apoptose aus.

Die T-Lymphozyten (auch T-Zellen) stammen aus dem Knochenmark und zirkulieren nach der T-Zell-Reifung im Thymus in der Blutbahn. Wenn sie auf ein spezifisches Antigen treffen, differenzieren sie zu T-Effektorzellen (zytotoxische und regulatorische T-Zellen, T-Helfer-1- und T-Helfer-2-Zellen, T-Gedächtniszellen). Die Einteilung der Subpopulation erfolgt nach ihrem Oberflächenmolekül CD, welches nach der internationalen CD-Nomenklatur (*cluster of differentiation*) bezeichnet ist und als Co-Rezeptor die Antigenerkennung unterstützt (zur Übersicht [69]). Die meisten T-Lymphozyten sind vom Phänotyp CD4, ein kleinerer Teil der T-Lymphozyten exprimiert CD8 [82]. Weiterhin erfolgt die Expression von CD8 auch auf dendritischen Zellen [83].

T-Lymphozyten gehören zu den frühesten Zellen, die am Anfangsstadium der Atherosklerose in die arterielle Intima einwandern [84]. In den anfänglichen bis hin zu den fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen sind zahlreiche zelluläre und molekulare entzündliche Komponente beteiligt, vor allem T-Lymphozyten und Makrophagen produzieren viele wichtige inflammatorische **Zytokine**. In verschiedene Tiermodellen mit ApoE- oder LDLR-*knock-out* Mäusen wurde gezeigt, dass es typische proatherogene (IL-1, IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ , M-CSF, MIF, TNF- $\alpha$ ) und antiatherogene (IL-10) Zytokine gibt. Einige Zytokine weisen sowohl pro- und antiatherogene Effekte auf (GM-CSF, IL-4, IL-6) (zur Übersicht [85]).

Das Zytokin IFN- $\gamma$  spielt hierbei eine zentrale Rolle bei der Progression der Atherosklerose, indem es überwiegend an der Destabilisierung atherosklerotischer Plaques beteiligt ist, z.B. durch den Einfluss auf eine Plaqueruptur durch gesteigerte Produktion von MMPs, Hemmung der Kollagenproduktion oder durch zunehmende Zellinfiltration (zur Übersicht [70]). In einem Tiermodell mit ApoE-*knock-out* Mäusen wurde die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen durch eine cholesterinreiche Diät erreicht. Durch die Einkreuzung von IFN- $\gamma$ -*knock-out* Mäusen konnte anschließend eine deutliche Reduzierung der atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden, was auf einen proatherogenen Effekt von IFN- $\gamma$  hindeutet [86]. CD8-positive T-Lymphozyten sezernieren auch in ähnlicher Weise zu den T-Helfer-1- und T-Helfer-2-Zellen das Zytokin IFN- $\gamma$  und scheinen eine Rolle bei der Progression atherosklerotischer Plaques zu haben. Offenbar sind sie auch bei der Reaktion mykobakterieller Infektionen von Bedeutung, inwiefern CD8-positive T-Lymphozyten aber bei der Atherogenese relevant sind, ist noch nicht geklärt (zur Übersicht [87]).

## 2 Fragestellung der Arbeit

Es gibt Hinweise, dass das Immunoproteasom eine wichtige Rolle im Rahmen der Atherogenese spielt. Ob und in welchem Zusammenhang das Immunoproteasom in der Atherosklerose vorkommt und inwiefern die MHC-Klasse-I vermittelte Antigenprozessierung durch das Immunoproteasom bei der Atherogenese eine Rolle spielt, ist unklar. Um sich dieser Frage zu nähern, wurden in dieser Arbeit humane *Thrombendarteriektomie*-Präparate der *Arteria carotis interna* histologisch und immunhistochemisch untersucht.

Die vorliegende Arbeit stellt sich folgende Fragen:

1. Ist die immunoproteasomale Untereinheit LMP7 in humanen atherosklerotischen Plaques nachweisbar?
2. Sind CD8-positive T-Lymphozyten in den atherosklerotischen Plaques nachweisbar?
3. Gibt es eine Korrelation von LMP7-Expression und dem Vorkommen von CD8-positiven T-Lymphozyten, die auf eine Rolle der MHC-Klasse-I vermittelte Antigenpräsentation in der Atherosklerose schließen lässt?
4. Ist die immunoproteasomale LMP7-Expression und das Vorkommen von CD8-positiven T-Lymphozyten in den humanen atherosklerotischen Plaques durch die Progression und das Vorkommen kardiovaskulärer Risikofaktoren beeinflusst?

## 3 Methodik

### 3.1 Patientenmaterial

#### 3.1.1 Herkunft des Patientenmaterials

Das Patientenmaterial wurde im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation von *Prof. Dr. med. Lutz Harms* und von *Dr. med. Hagen Kunte* aus der *Klinik und Poliklinik für Neurologie* der Medizinischen Fakultät der *Charité* zur Verfügung gestellt, die sich mit dem Thema „Statine und ihr Einfluss auf entzündliche Prozesse in arteriosklerotischen Plaques von Stenosen der *Arteria carotis interna*“ beschäftigten.

Nach Studienzustimmung durch die Ethikkommission der *Charité Campus Mitte* und einer umfassenden ärztlichen Aufklärung wurde im Zeitraum vom Oktober 2001 bis Oktober 2003 bei 94 Patienten mit einer hochgradigen *Arteria carotis interna*-Stenose (Stenosegrad  $\geq 60\%$  in der Dopplersonographie oder digitalen Subtraktionsangiographie) die *Thrombendarteriektomie* durchgeführt. Zu den Ausschlusskriterien zählten nicht primär-atherosklerotische *Arteria carotis interna*-Stenosen, *Arteria carotis interna*-Reststenosen, Anhalt für akute Infekte oder lokale Entzündungsprozesse, Schwangere oder Stillende, Patienten, die aktuell oder innerhalb der letzten 30 Tage an einer Studie teilnehmen oder teilnahmen sowie Patienten, die nicht in der Lage waren ein wirksames Einverständnis zu geben (zur Übersicht [88]). Von insgesamt 83 der 94 einwilligungsfähigen Patienten lag eine erneute schriftliche Einwilligungserklärung vor, ihre Proben und Daten für diese vorliegende Arbeit weiter zu verwenden.

#### 3.1.2 Operatives Vorgehen und Blutentnahmen

Die stenosierenden atherosklerotischen Plaques wurden in der Regel nach dem Verfahren der konventionellen *Thrombendarteriektomie* [89] ausgeschält oder der Operateur zog individuell die *Eversions-Thrombendarteriektomie* [90] vor. Auf diese Art wurde bei beiden Verfahren der atherosklerotische Bereich aus der *Tunica media* herausgelöst und bis in den angrenzenden Bereich mit glattem Internabett entfernt.

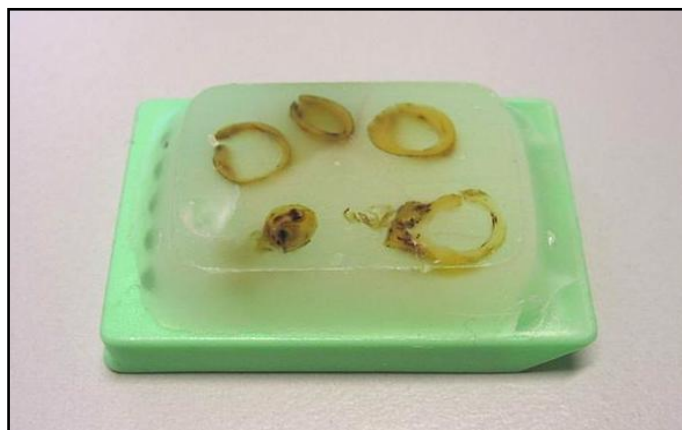
Am Operationstag wurden dem nüchternen Patienten aus einem arteriellen Zugang Blut abgenommen und u.a. das Gesamtcholesterin im *Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité* ermittelt [88].

### 3.1.3 Aufarbeitung und Einbettung der Präparate

Nach der chirurgischen Entfernung wurden die *Thrombendarteriektomie*-Zylinder direkt in physiologische Kochsalzlösung zur Säuberung von Blutbestandteilen geschwenkt. Anschließend erfolgte die Fixierung für 24 Stunden in 4,5 w/v % gepuffertem Formaldehyd [88]. Diese Konservierung verhinderte einerseits die Autolyse durch Inaktivierung lysosomaler Enzyme und andererseits die Verwesung des Gewebematerials durch das Wachstum von Fäulnisbakterien und Schimmelpilzen [91].

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Präparate für weitere 24 Stunden in 0,5 mol/l EDTA-Entkalkerlösung dekalzifiziert, wodurch die spätere Herstellung der Schnittpräparate erleichtert wurde. Der Chelatbildner EDTA reagierte hierbei mit den Kalziumionen aus den Plaques unter Bildung eines Kalzium-EDTA-Komplexes. Die *Thrombendarteriektomie*-Zylinder wurden längs in 3 mm dicke Querschnitte proportioniert und mit ihrem Gefäßquerschnitt nach oben in einen Paraffinblock durch das Eingangslabor des *Instituts für Pathologie der Charité Campus Mitte* gebettet. Die mittlere Anzahl der Gefäßquerschnitte betrug fünf (siehe **Abbildung 6**) (zur Übersicht [88]).

Aufgrund der gewählten Fixationsdauer und da es sich um kleine Proben handelte, wurde ein Einfluss auf die Immunreaktivität durch eine inhomogene Fixationsdauer unwahrscheinlich [92].



**Abbildung 6:** Gefäßquerschnitte eingebettet in Paraffin

## 3.2 Herstellung der Schnittpräparate

### 3.2.1 Materialien und Reagenzien

**Tabelle 1:** Materialien, Reagenzien und ihre Bezugsquellen zur Herstellung der Schnittpräparate

Materialien und Reagenzien	Bezugsquellen
Aqua dest.	Destillationsanlage
Kühlplatte	Parafre
Mikrotom-Einweg-Klingen A35	Feather
Pinsel	Pelikan
Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger Super Frost	Menzel/R. Langenbrinck
Rotationsmikrotom RM2035	Leica
Trockenwärmeschrank	Heraeus Instruments
Wasserbad	Axel Johnson Lab System

### 3.2.2 Durchführung

Mit dem Rotationsmikrotom vom Typ *Leica RM2035* wurden von allen Patientenblöcken sogenannte serielle Schnitte angefertigt. Neben der Problematik, dass sich zu dicke Schnitte vom Objektträger bei der Hitzedemaskierung im Rahmen von immunhistochemischen Färbungen lösen konnten, musste besonders auf eine Mikrometer dünne Schnittdicke geachtet werden, damit einzelne Gewebestrukturen besser voneinander abgrenzbar wurden [93]. Es wurde daher eine Schnittdicke von 1-3  $\mu\text{m}$  gewählt.

Die Paraffinschnitte wurden unter Zuhilfenahme eines Pinsels in ein Wasserbad bei Raumtemperatur gebracht, um sie einzeln von der Wasseroberfläche auf poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger aufzubringen. Anschließend wurde der Objektträger zur Glättung des Schnittes in ein handwarmes Wasserbad getaucht. Für eine dauerhafte Fixierung sorgten kovalente Bindungen zwischen dem Gewebeschnitt und der poly-L-Lysin-Beschichtung des Objektträgers sowie eine Über-Nacht-Trocknung der Präparate im Trockenwärmeschrank bei 58 °C. Fehlermöglichkeiten während des Schneidens, sichtbar am Schnitt durch Scharten und verursacht durch abgenutzte Messerstellen, wurden durch wechselnde Messerklingen entgegengewirkt [93].



### 3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

#### 3.3.1 Prinzip

Die *Hämatoxylin-Eosin*-Färbung (HE-Färbung) dient zur Übersicht histologischer Schnitte (siehe **Abbildung 7** und **Abbildung 8**). Durch den basischen Farbstoff *Hämalaun* werden die sauren bzw. basophilen Zellbestandteile wie die Zellkerne blau gefärbt. Der saure Farbstoff *Eosin* färbt das basische bzw. eosinophile Zytoplasma in Rottönen [94].

#### 3.3.2 Materialien und Reagenzien

**Tabelle 2:** Materialien, Reagenzien und ihre Bezugsquellen für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Materialien und Reagenzien	Bezugsquellen
Acrylhaltiger Kleber	R. Langenbrinck
Aqua dest.	Destillationsanlage
Eosin: - Eosin - 1 ml Essigsäure auf 100 ml Eosinlösung	Chroma Merck
Ethanol	Roth/Merck
Glasküvetten	Assistent
Hämalaun-Lösung nach Mayer: - 1 g Hämatoxylin (Monohydrat) Certistain® - 50 g Aluminium-Kalium-Sulfat-Dodecahydrat - 1 g Citronensäure Monohydrat - 200 mg Natriumiodat - 50 g Chloralhydrat - 1 l Aqua dest.	Merck Merck Merck Merck Merck Destillationsanlage
Objektgläser	Menzel
Objektträgerschaukel	Assistent
Trockenwärmeschränk	Heraeus Instruments
Xylol	Roth
Zellstofftücher	Kleenex

### 3.3.3 Durchführung

Im Anschluss an die Schnittherstellung wurden die Objektträger zum Abschmelzen des Paraffins für 15-20 Minuten bei 70 °C im Trockenwärmeschrank vorbehandelt. Zur weiteren Entparaffinierung wurden diese in einer Objektträgerschaukel fünf Minuten in ein Xylolbad gestellt und anschließend für die Rehydrierung jeweils zehn Sekunden durch eine absteigende Alkoholreihe geschwenkt, welche aus je zwei Glasküvetten absolutem, 96 %igem und 70 %igem Ethanol bestand.

Die Schnitte wurden vier Minuten in Hämalaun-Lösung inkubiert und zum Bläuen weitere fünf Minuten unter fließendes warmes Leitungswasser gestellt. Es schloss sich nach einer Aqua dest.-Spülung die vierminütige Gegenfärbung mit Eosin und anschließender fünfminütiger Leitungswasserspülung an.

Nach erneuter Aqua dest.-Spülung wurden die Objektträger für jeweils zehn Sekunden in die vorhandene Alkoholreihe in aufsteigender Konzentration geschwenkt, um das Gewebe für eine lange Haltbarkeit zu entwässern. Im Anschluss an eine einminütige Klärung in einem Xylolbad erfolgte die Eindeckung der Schnitte mittels acrylhaltigem Kleber und Deckgläschen.

## 3.4 Einteilung der Präparate nach der Oxford Klassifikation

Nach Kriterien der *Oxford Plaque Studie* (siehe **Tabelle 3**) wurden die vorliegenden 83 Patientenpräparate mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin-Färbung eingeteilt [95,96]. Um die Präparate in Abhängigkeit von ihrer Plaquemorphologie untersuchen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit schwer atherosklerotisch veränderte Gefäßabschnitte (fortgeschrittene Läsionen) mit Abschnitten aus dem Randbereich der Plaque verglichen, welche morphologische Kriterien der frühen Atherosklerose aufwiesen (anfängliche Läsionen).

Das Ziel der Einteilung war daher die Klassifizierung einer anfänglichen atherosklerotischen (siehe **Abbildung 7**) und einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion (siehe **Abbildung 8**) pro Patient. Praktisch war das jedoch nicht immer umsetzbar, weshalb aus der Gesamtzahl von 83 Patienten letztendlich 47 anfängliche und fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen in die

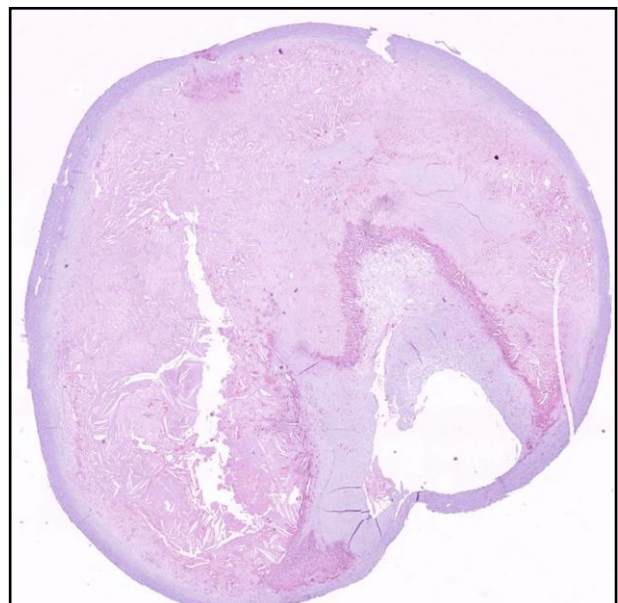
Analyse eingingen. Da es sich um serielle Schnitte handelte, konnte diese Einteilung der Präparate auf die CD8- und LMP7-Immunfärbungen übertragen werden.

**Tabelle 3:** Einteilung der Präparate in anfängliche und fortgeschrittene Läsionen nach morphologischen Kriterien (modifiziert nach [96])

Einteilung	Morphologie	Studieneinteilung
stabil	überwiegend fibröser Plaque mit dicker, intakter Kappe	} <b>anfängliche Läsion</b>
überwiegend stabil	Instabilitätszeichen wie z.B. Inflammation, aber intakte, dicke Kappe	
instabil mit intakter Kappe	dünne Kappe, großer Lipidkern, keine Ruptur und kein Thrombus	} <b>fortgeschrittene Läsion</b>
instabil mit rupturierter Kappe	Ruptur oder Thrombus	



**Abbildung 7:** Repräsentatives Beispiel einer anfänglichen atherosklerotischen Läsion in HE-Färbung (12,5fache Vergrößerung)



**Abbildung 8:** Repräsentatives Beispiel einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion in HE-Färbung (12,5fache Vergrößerung)

## 3.5 Immunhistochemische Färbungen für CD8- und LMP7-Detektion

### 3.5.1 Prinzip

Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen können antigene Komponenten in Zellen oder Gewebeschnitten durch spezifische Antikörper, die durch Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme oder Isotope markiert sind, sichtbar gemacht werden [94].

In dieser Arbeit wurde die *Labelled-Steptavidin-Biotin-Methode* (LSAB) zur Identifizierung von CD8 und LMP7 in atherosklerotischen Plaques der *Arteria carotis interna* angewandt.

Die folgenden Schritte der LSAB-Immunfärbung sind graphisch in **Abbildung 9** dargestellt. Bei dieser sensitiven indirekten Methode bindet im Vergleich zur direkten Methode ein unkonjugierter anti-human-CD8- bzw. LMP7-Primärantikörper an die zu detektierende Antigenstelle (auch Epitop) der Probe (**Schritt 1**).

Anschließend wird ein biotinylierter Sekundärantikörper aufgetragen (**Schritt 2**). Dieser Brückenantikörper besteht aus Multi-Link-Antikörpern, zusammengesetzt aus verschiedenen Tierspezies und daher mit Primärantikörpern verschiedener Tierspezies kombinierbar.

Im nächsten Schritt folgt das Auftragen eines Streptavidin-Enzym-Konjugates (**Schritt 3**). Hier kommt es aufgrund der hohen Affinität zu einer Koppelung zwischen Biotin und Streptavidin. Streptavidin ist ein isoliertes Glykoprotein aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*, welches direkt mit dem Enzym verbunden (*labelled*) ist.

Beim Detektionssystem LSAB AP kommt das Enzym alkalische Phosphatase und beim Detektionssystem LSAB HRP das Enzym Meerrettichperoxidase zum Einsatz. Das farbige Endprodukt entwickelt sich durch eine anschließende Substrat-Chromogen-Reaktion (**Schritt 4**), wobei ein brauner (LSAB HRP) bzw. roter (LSAB AP) Farbstoff am Reaktionsort präzipitiert (zur Übersicht [93]).

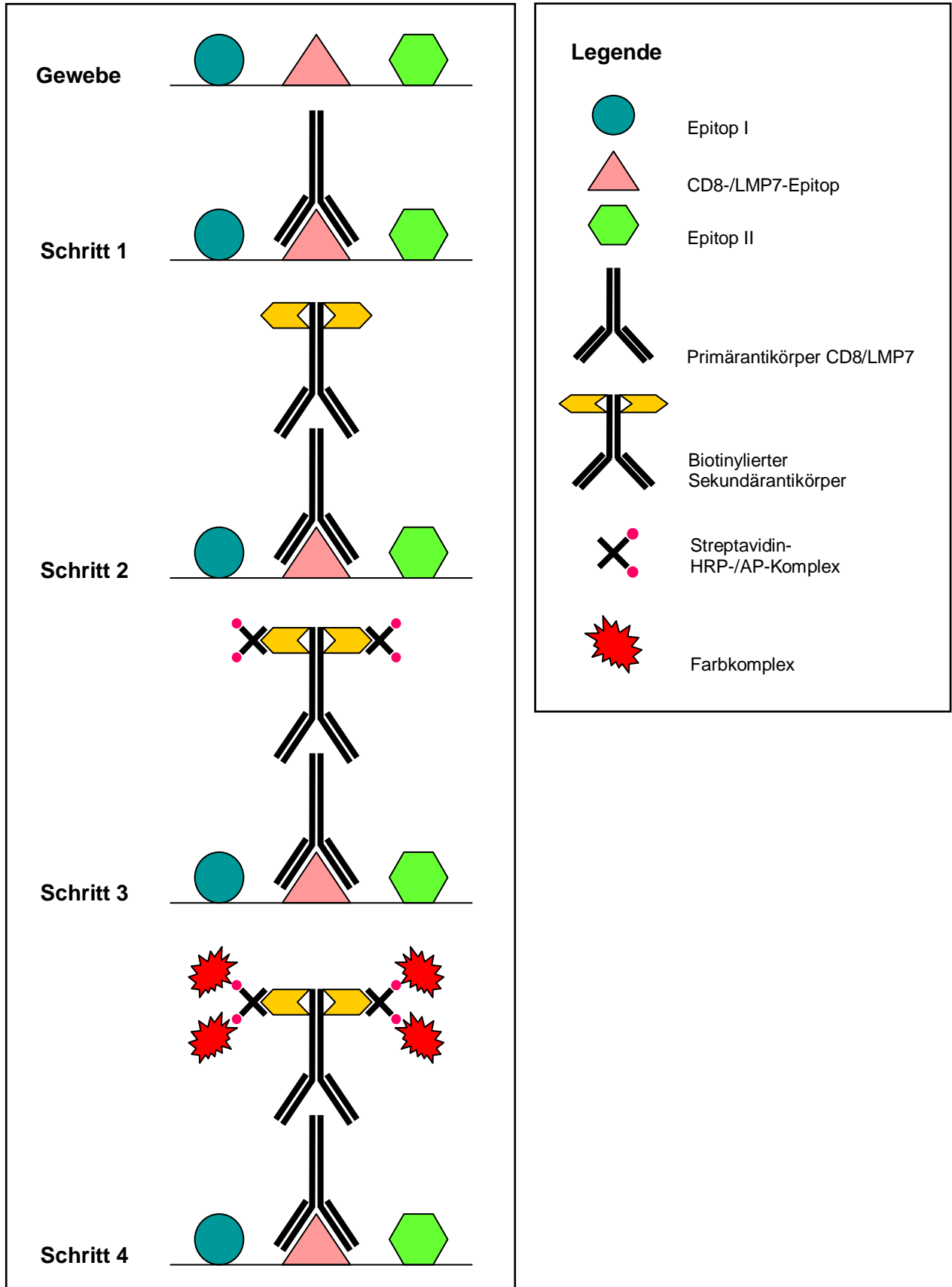


Abbildung 9: Graphische Kurzdarstellung der CD8-/LMP7-Immunfärbung nach der LSAB-Methode

### 3.5.2 Materialien und Reagenzien

**Tabelle 4:** Materialien, Reagenzien und ihre Bezugsquellen für die CD8- und LMP7-Immunfärbungen

<b>Materialien und Reagenzien</b>	<b>Bezugsquellen</b>
Biotin Blocking System	Dako, Code No. X 0590
Citrat-Puffer pH 6,0 - 9 ml 0,1M Zitronensäure - 41 ml 0,1M Natriumcitrat - 450 ml Aqua dest.	Merck Merck Destillationsanlage
DAB Plus Substratlösung	Dako, Code No. K 3468
Detektionssystem LSAB Plus HRP	Dako, Code No. K 0690
Detektionssystem LSAB AP	Dako, Code No. K 0689
EDTA	Serva
EDTA Buffer, Heat-Induced Epitope Retrieval	Lab Vision, REF AP-9004-500
Färbegestell aus Edelstahl	Thermo Shandon
FCS	Biochrom
Feuchtkammer	Thermo Shandon
Fuchsin+Substrate-Chromogen System	Dako, Code No. K 0625
Kamera Axio Cam MRC	Zeiss
Kochplatte	Severin
Levamisole, Alkaline Phosphatase Inhibitor	Dako, Code No. X 3021
Mikroskop DM RBE	Leitz
Objektgläser	Menzel-Gläser
Peroxidase-Blocking-Reagent	Dako, Code No. S 2001
Rührspatel	Sarstedt
Schnellkochtopf 4,5 l	Krüger
Target Retrieval Solution High pH	Dako, Code No. S 3307
Tris-Puffer pH 7,2-7,6 - 9 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan - 68,5 g Tris-HCl (Salzsäure) - 87,8 g Natriumchlorid	Merck Merck Merck

- 10 l Aqua dest.	Destillationsanlage
TWEEN®20 pure	Serva
Wässriges Eindeckmedium Aquatex®	Merck
Zellstofftücher	Kleenex
Zymed Antibody Diluent	Invitrogen GmbH, No. 00-3118

Die verwendeten Materialien für Entparaffinierung, Rehydrierung und Hämalaun-Färbung nach Mayer sind im **Kapitel 3.3.2** aufgelistet.

**Tabelle 5:** Bezugsquellen und Konzentrationen der verwendeten Primärantikörper

Primär-antikörper	Klonalität/Spezies	Verdünnung	Zusatz	Bezugsquellen
CD8	Monoklonal/Maus	1:50	10 % FCS	Dako, Code No. M 7104
LMP7	Monoklonal/Maus	1:100	10 % FCS	Biomol, No. PW 8845

### 3.5.3 Entparaffinierung und Rehydrierung

Vor Beginn der Immunfärbung war eine vollständige Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte notwendig, da dies zu unspezifischen Hintergrundfärbungen führt [91]. In einer Objektträgerschaukel wurden die Objektträger zum Entparaffinieren zehn Minuten in ein Xylolbad und weitere fünf Minuten in ein zweites Xylolbad gestellt. Die Rehydrierung fand jeweils fünf Minuten in einer Alkoholreihe in absteigender Konzentration statt, die aus zwei Glasküvetten absolutem, 96 %igem und 70 %igem Ethanol bestanden. Zuletzt wurden die Objektträger in zwei Aqua dest.-Bäder geschwenkt bis das Wasser gleichmäßig von den Objektträgern abließ.

### 3.5.4 Antigendemaskierung

Da es durch die formalininduzierte Bildung chemischer Quervernetzungen zu einem partiellen oder vollständigen Verlust der Immunreaktivität kommen kann, war eine hitzeinduzierte Demaskierung des antigenen Epitops notwendig [91].

In einem handelsüblichen Schnellkochtopf wurde 1,5 Liter Pufferlösung, die die Objektträgerschaukel ausreichend bedeckte, zum Kochen gebracht. Für die immunhistochemische CD8-Färbung wurde TRIS/EDTA-Puffer mit einem pH=9 und für die LMP7-Färbung Citratpuffer mit einem pH=6 verwendet. Die Schnitte kochten fünf Minuten bei vollem Dampfdruck. Nach vorsichtigem Öffnen des Deckels kühlte der Kochtopf in einem kalten Wasserbad auf Raumtemperatur ab bevor die Objektträger in Aqua dest. zwischengelagert werden konnten.

### **3.5.5 Antikörper-Testung**

Vor Etablierung des Färbeprotokolls für die CD8- und LMP7-Immunfärbung wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Durch die Bestimmung der optimalen Konzentration vom Primärantikörper und der Austestung der unterschiedlichen Demaskierungen sowie der Waschschriffe konnten unspezifische Hintergrundfärbungen weitgehend vermieden werden.

Für die LMP7-Färbung wurde zunächst mit dem polyklonalen Antikörper LMP7 aus dem *Institut für Biochemie* der Medizinischen Fakultät der *Charité* gearbeitet [97]. Eine Verdünnungsreihe mit Primärantikörper im Verdünnungsmedium *Zymed Antibody Diluent* bestehend aus 1:1000, 1:1250, 1:1500, 1:1750 und 1:2000 war Bestandteil der ersten Vorversuche. Da viele unspezifische Färbungen vorlagen, wurden weitere Optimierungsschritte durchgeführt.

Ausgetestet wurden die unterschiedlichen Kombinationen mit dem Detektionssystem LSAB HRP mit Zusatz von 10 % FCS zum Antikörpergemisch, der Beimischung von 0,1 % TWEEN zum TRIS-Waschpuffer sowie die Austestung von *Biotin Blocking Reagenz*. Ebenso wurde das Detektionssystem LSAB AP getestet. Trotz verbesserter Ergebnisse bei jeweiligem Zusatz von 10 % FCS zum Primärantikörper und 0,1 % TWEEN im TRIS-Waschpuffer blieb es bei unspezifischen Färbungen sowohl bei Verwendung des Detektionssystem LSAB HRP wie auch LSAB AP. Als Kontrolle zur Bestimmung der Antikörper-Spezifität auf dem humanen Patientenmaterial wurde eine Immunfärbung mit dem Präimmenserum PräK63 des Kaninchens, von welchem der LMP7 Antikörper gewonnen wurde, durchgeführt. Hier zeigte sich unerwartet ein ähnlich starkes Färbesignal im Vergleich zum LMP7 Antikörper, was darauf hindeutet, dass die Signale des LMP7 Antikörpers auf dem Plaquematerial unspezifischer Natur sind.



Weitere Versuche mit dem monoklonalen LMP7-Antikörper von *Biomol* folgten. Nach Austestung einer Verdünnungsreihe von 1:50, 1:100 und 1:250 und basierend auf den Erfahrungen der vorherigen Vorversuche etablierte sich für die Detektion von LMP7 eine optimale Konzentration von 1:100 mit einem zehnpromtigen Anteil von FCS.

Für die CD8-Immunfärbung wurden ähnliche Vorversuche durchgeführt, um die unspezifischen Hintergrundfärbungen besonders in den Plaqueregionen zu reduzieren.

Bei der Epitopdemaskierung war der TRIS-EDTA-Puffer dem Citratpuffer, der *Target Retrieval Solution* und dem *EDTA Puffer* deutlich überlegen. Die Auftragung von *Biotin Blocking Reagenz* wies keine Unterschiede in Bezug auf die Hintergrundfärbungen auf. Wie bei den immunhistologischen Vorversuchen mit dem LMP7-Antikörper zeigten sich wenige unspezifische Hintergrundfärbungen beim Zusatz von 10 % FCS zum Antikörper und bei Verwendung von 0,1 % TWEEN im TRIS-Waschpuffer. Als optimale Konzentration für die Detektion von CD8 ermittelte sich das Verhältnis von 1:50 mit 10 % FCS-Anteil.

### 3.5.6 Positiv- und Negativkontrollen

Um die Spezifität der Antikörper und die Qualität der immunhistochemischen Färbungen zu überprüfen, wurden während der Vorversuche und der eigentlichen Immunfärbungen stets Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. Die Kontrollen wurden auf gleiche Weise wie die Proben behandelt, wohingegen den Negativkontrollen kein spezifischer Primärantikörper sondern nur *Antibody Diluent* aufgetragen wurde. Abweichungen vom Färbeprotokoll können auf diese Weise am Färbeverhalten der Präparate deutlich sichtbar gemacht werden.

Es etablierten sich für die CD8-Immunfärbungen humane Tonsillenpräparate. Der braune Farbstoff markierte hierbei in den Positivkontrollen CD8-positive T-Lymphozyten (siehe **Abbildung 15 b**) wohingegen in den Negativkontrollen keine Braunfärbungen in den Tonsillenpräparaten sichtbar wurden (siehe **Abbildung 15 c**). Für die LMP7-Immunfärbungen etablierten sich Milzpräparate der Maus, wobei die Positivkontrollen (siehe **Abbildung 18 b**) im Vergleich zu den Negativkontrollen (siehe **Abbildung 18 c**) LMP7-positive Rotfärbungen aufzeigten.

### 3.5.7 Immunhistochemische CD8-Färbung nach der LSAB-Methode

Das Detektionssystem LSAB HRP wurde für die CD8-Immunfärbung (siehe **Abbildung 15 a**) angewendet. Um ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden, erfolgten alle folgenden Inkubationsschritte in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur bzw. die Objektträger standen während der Arbeitsschritte in einer Waschlösung.

Eventuelle unspezifische Färbungen aufgrund von endogener Peroxidase- und Pseudoperoxidaseaktivität im Präparat wurde durch fünfminütige Inkubation mit *Peroxidase Blocking Reagenz* geblockt. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua dest. abgespült und ins Aqua dest.-Bad gestellt.

Die einzelnen Waschschrte wurden mittels einer Spitzflasche stets vorsichtig durchgeführt, um mögliche Ablösungen der Schnitte vom Objektträger zu vermeiden. Um Konzentrationsverdünnungen in den einzelnen Arbeitsschritten zu verhindern, wurden die Objektträger vor Auftragung der nächsten Inkubationslösung auf Zellstoffpapier gut abgeklopft sowie mit Zellstoff dichtmöglich ans Präparat trocken gewischt. Mit Hilfe eines kleinen Rührspatels konnten anschließend die Lösungen sparsam über den gesamten Schnitt verteilt werden.

Der Primärantikörper CD8 im Verdünnungsmedium mit einer Konzentration von 1:50 und 10 % FCS-Anteil wurde 30 Minuten inkubiert und anschließend mit 0,1 % TWEEN/TRIS-Waschpuffer sorgfältig abgespült und in diesem Waschpuffer für zweimal drei Minuten ins Bad gestellt. Es folgte das unverdünnte Auftragen der LSAB-Kitlösungen. Sowohl die biotinylierte Link Reagenz als auch die Streptavidin-HRP Reagenz wurden je 15 Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Abschließend schlossen sich jeweils erneute 0,1 % TWEEN/TRIS-Waschschrte an.

Im vorletzten Schritt erfolgte für die Chromogenreaktion das Auftragen von DAB-Substratlösung. Laut mitgelieferter Anleitung wurde hierfür ein Tropfen DAB+Chromogen in einem Milliliter DAB+Substratpuffer gemischt. Nach 10 Minuten Inkubation konnten die Schnitte mit Aqua dest. gespült werden bevor sich im letzten Arbeitsschritt die Gegenfärbung nach Mayer anschloss. Nach einer drei- bis fünfminütigen Hämalaun-Kernfärbung nach Mayer

(siehe **Kapitel 3.3.3**) wurden die Objekte mit Deckgläschen und wässrigem Eindeckmedium *Aquatex*® versiegelt. Da einige Immunfärbungen sehr empfindlich auf Alkohol mit Entfärbung reagieren, wurde deshalb im Vergleich zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung auf die Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe verzichtet.

### **3.5.8 Immunhistochemische LMP7-Färbung nach der LSAB-Methode**

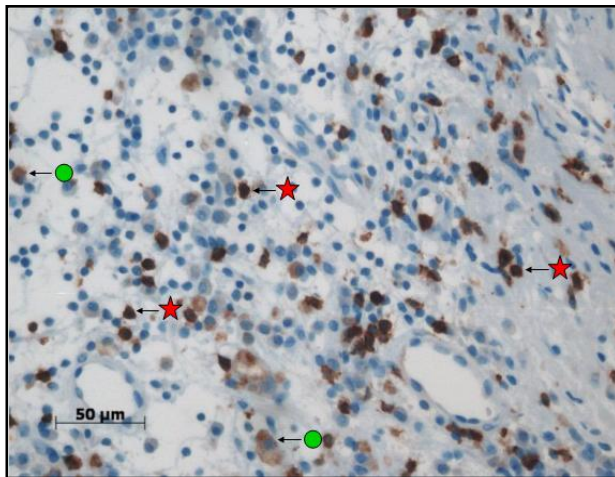
Bei der LMP7-Immunfärbung (siehe **Abbildung 18 a**) kam das Detektionssystem LSAB AP zum Einsatz. Das Protokoll unterscheidet sich daher in einigen Punkten von der in **Kapitel 3.5.7** beschriebene CD8-Immunfärbung nach der LSAB-HRP-Methode.

Zunächst wurde nach der Antigenmaskierung in einer Verdünnung von 1:100 mit 10 % FCS-Anteil das Primärantikörper-Diluent aufgetragen. Nach 30 Minuten Primärantikörper-Inkubation folgten die Inkubationen der LSAB-Kits, bestehend aus biotinmarkierten Sekundärantikörper und Streptavidin-AP Reagenz, für jeweils 15 Minuten. Nach diesen einzelnen Inkubationsschritten schlossen sich wie beim HRP-System sorgfältige Spülungen mit 0,1 % TWEEN/TRIS-Waschpuffer an sowie zweimal dreiminütige 0,1 % TWEEN/TRIS-Bäder.

Nun konnte die Chromogenreaktion durch Auftragen von frisch angesetzter Substrat-Chromogen-Lösung erfolgen. Wie in der mitgelieferten Packungsbeilage beschrieben, wurden hierfür 120 µl Fuchsin+Chromogen mit 120 µl Aktivierungsreagenz gemischt und eine Minute inkubiert. Zusätzlich mit einem Tropfen endogenen alkalischen Phosphatase Inhibitor versetzt, inkubierte dieses Chromogen-Gemisch 10 Minuten lang auf den Präparaten in der Feuchtkammer bevor es mit Aqua dest. gespült wurde. Zuletzt folgte wie bei der immunhistochemischen CD8-Immunfärbung die Hämalaun-Gegenfärbung nach Mayer (siehe **Kapitel 3.3.3**) und das Eindecken der Präparate mit wässrigem Eindeckmedium *Aquatex*® und Deckgläsern.

### 3.5.9 Auswertung der immunhistochemischen CD8-Färbung

Für die CD8-Immunfärbung wurden mit dem *Leitz Mikroskop DM RBE* in 40facher Objektivvergrößerung CD8-positive T-Lymphozyten pro Gefäßquerschnitt manuell gezählt. Als CD8-positive T-Lymphozyten wurden Zellen zugeordnet, die morphologisch durch ihre Zell- und Kernstruktur sowie durch ihre membranständige bzw. zytoplasmatische Braunfärbung T-Lymphozyten glichen (siehe rote Sternchen in **Abbildung 10**). T-Lymphozyten besitzen einen großen runden Zellkern, der fast den gesamten Zellekörper ausfüllt. Durch die Hämalaunfärbung kommt es zur starken Blaufärbung des Zellkernes, wodurch das geringe Zytoplasmavolumen deutlich wird (siehe **Abbildung 11**). In einigen Präparaten kam es zu granulären Anfärbungen, die keinem typischen T-Zellkörper zugeordnet werden konnten. Diese Zellen wurden in der Zählung nicht miterfasst (siehe grüne Kreise in **Abbildung 10**).



**Abbildung 10:** CD8-Immunfärbung innerhalb einer atherosklerotischen Läsion der *Arteria carotis interna* nach der LSAB-HRP-Immunfärbung (40fache Vergrößerung)

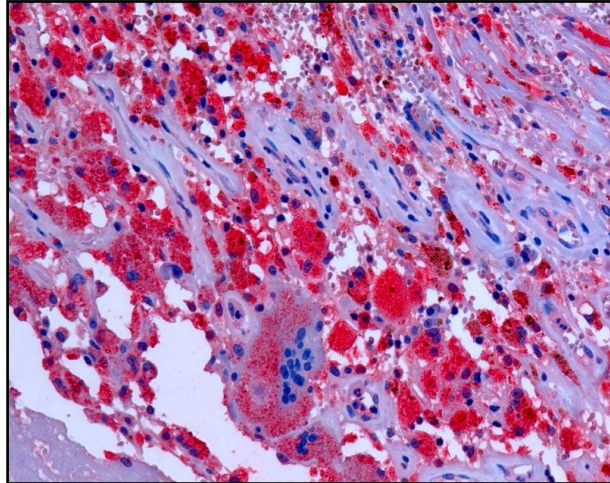


**Abbildung 11:** T-Lymphozyt mit einem großen, runden blaugefärbten Zellkern, wenig Zytoplasma und braungefärbter membranständiger CD8-Immunfärbung (100fache Vergrößerung, Ölimmersion)

### 3.5.10 Auswertung der immunhistochemischen LMP7-Färbung

Die Analyse der immunhistochemischen LMP7-Färbung erfolgte mit Hilfe eines motorisierten *Axioplan 2 Mikroskop-System®* kombiniert mit einer *Axiocam Hrc Digitalkamera®* und der Software *Axioversio 4.2®*. Auffällig bei den atherosklerotischen Läsionen waren die granulär-zytoplasmatischen Rotfärbungen (siehe **Abbildung 12**).

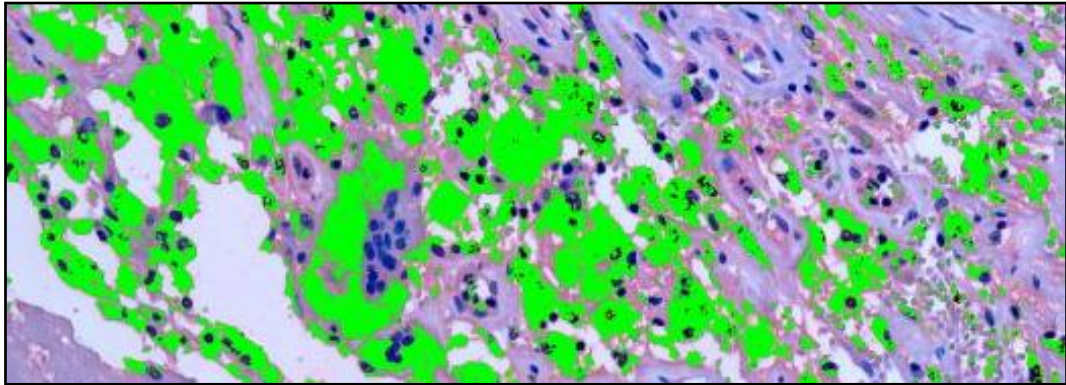
Hochaufgelöste Übersichtsaufnahmen entstanden durch pixelgenaue Bildfusionen von Einzelbildern bei einer 50fachen optischen Vergrößerung durch die Stitching-Technik des Software-Moduls *Panorama*®. Diese Technik ermöglichte auch eine Analyse sehr kleiner Farbbereiche. Im Durchschnitt wurden 43 Einzelfotos pro Gefäßquerschnitt angefertigt.



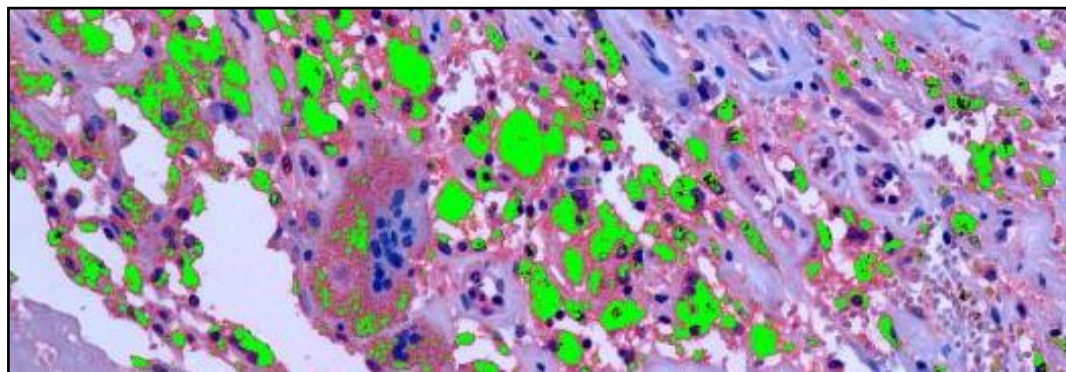
**Abbildung 12:** LMP7-positive, granulär-zytoplasmatische Rotfärbungen nach der LSAB-AP-Immunfärbung innerhalb einer atherosklerotischen Läsion (40fache Vergrößerung)

Die digitale Analyse der einzelnen Präparate erfolgte mit dem Softwaremodule *Automeasure*® semiautomatisch. Für die Reproduzierbarkeit wurden alle Bilder unter den gleichen Voraussetzungen wie Belichtungszeit, Helligkeit, Kontrast, Filter und Farbeinstellung fotografiert. Anschließend musste für die Analyse eine Farbsegmentierung vorgenommen werden. Es wurde eine Farbfrequenzmaske aus einem definierten Rotbereich angefertigt, um die LMP7-Expression umfassend zu detektieren. Es erfolgte jeweils eine Messung mit einer schwachen Farbfrequenzmaske (siehe **Abbildung 13**) und mit einer starken Farbfrequenzmaske (siehe **Abbildung 14**) pro atherosklerotische Läsion. Bei der Messung mit einer starken Farbfrequenzmaske können schwache Farbsignale im Präparat, die unter dem Schwellenwert liegen, verloren gehen. Bei der Wahl einer schwachen Farbfrequenzmaske hingegen werden manche Hintergrundfärbungen mit eingeschlossen. Durch diese Definition wurde das gesamte Farbspektrum des Präparates erfasst. Auf diese Weise konnte auch die Gesamtfläche des Querschnittes planimetrisch mitbestimmt werden. Bezogen auf die Gesamtquerschnittsfläche ließ sich der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Areale ermitteln.

Trotz Etablierung eines optimalen Färbeprotokolls ließen sich unspezifische Färbungen nicht komplett vermeiden. Unspezifische Färbungen lagen typischerweise im Gewebe oder in Gewebefalten ohne Zellkörperassoziation und konnten leicht erkannt werden. Da diese von der definierten Farbfrequenzmaske miterfasst worden wären, wurden unspezifische Färbungen vor dem Messvorgang ausselektiert (zur Übersicht siehe [88]).



**Abbildung 13:** Analyse der LMP7-Expression während des Prozesses der Farbsegmentierung bei Definition einer schwachen Farbfrequenzmaske (Detail aus **Abbildung 12**)



**Abbildung 14:** Analyse der LMP7-Expression während des Prozesses der Farbsegmentierung bei Definition einer starker Farbfrequenzmaske (Detail aus **Abbildung 12**)

### 3.5.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit *SPSS* sowie statistischen Add-Ins für *Microsoft Office Excel 2007*. Eine statistische Beratung erfolgte in Kooperation mit *Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dieter Wernecke*.

## 4 Ergebnisse

Bei Patienten mit einer hochgradigen Stenose der *Arteria carotis interna*, d.h. bei einem Stenosegrad  $\geq 60\%$  in der Dopplersonographie oder in der digitalen Subtraktionsangiographie, wurde die *Thrombendariektomie* durchgeführt. Für jeden Patienten wurde nach Kriterien der *Oxford Plaque Studie* 47 Pärchen aus einer anfänglichen und einer fortgeschrittenen Läsion gebildet.

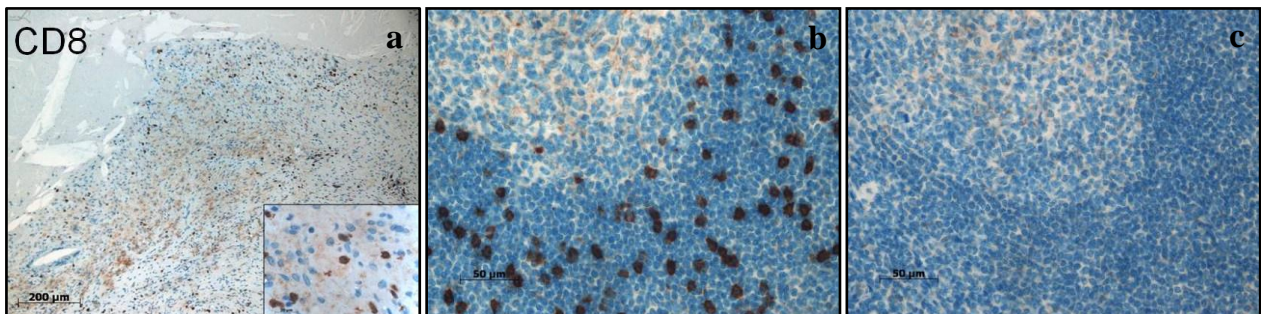
Durch die experimentelle Arbeit gelang es CD8-positive T-Lymphozyten und LMP7-Expression immunhistochemisch zu detektieren. Der Anteil der LMP7-Expression wurde mit einer schwachen und einer starken Maske quantifiziert. Aufgrund des metrischen Datenniveaus besteht die Möglichkeit zur Berechnung des arithmetischen Mittelwertes beider Masken. Um nicht eine Ergebnisverfälschung durch unterschiedliche Gefäßgrößen zu haben, wurde zusätzlich das arithmetische Mittel beider Masken ins Verhältnis zur metrischen Gesamtfläche gesetzt. Die Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten kann ebenfalls ins Verhältnis zur metrischen Gesamtfläche gesetzt werden, um einer Ergebnisverfälschung durch unterschiedliche Gefäßgrößen vorzubeugen, da es sich um serielle Paraffinschnitte handelt.

Nachfolgend werden die Ergebnisse graphisch dargestellt, statistisch untersucht und in Hinblick auf Signifikanz interpretiert.

## 4.1 Nachweis von CD8-positiven T-Lymphozyten in atherosklerotischen Plaques

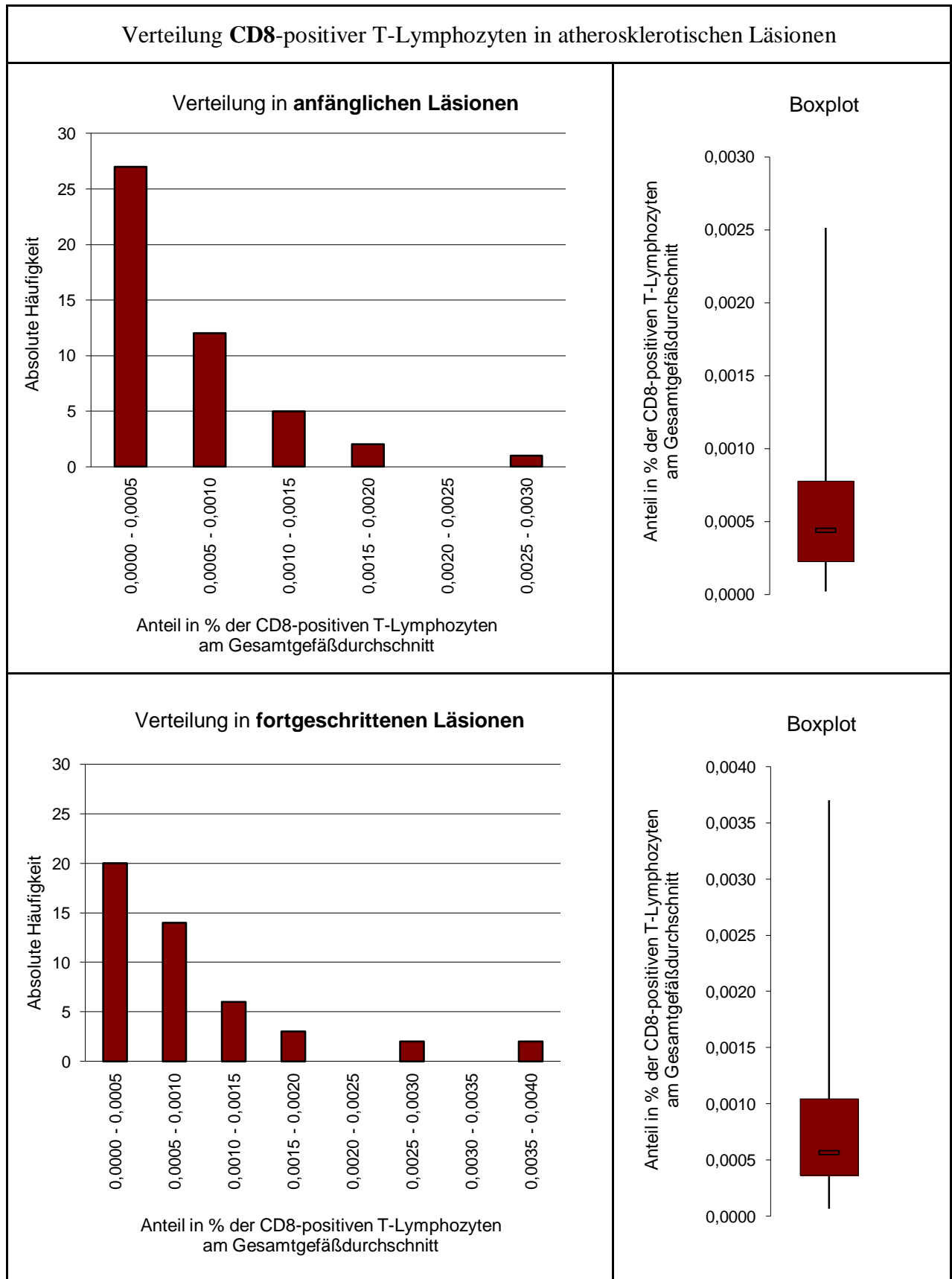
Die **Abbildung 15** zeigt eine Gegenüberstellung einer repräsentativen immunhistochemischen Färbereihe CD8-positiver T-Lymphozyten.

In **Abbildung 15 a** ist die kennzeichnende membranständige bzw. zytoplasmatische Anfärbung CD8-positiver T-Lymphozyten mit Detailausschnitt innerhalb einer atherosklerotischen Plaque der *Arteria carotis interna* dargestellt (siehe auch **Abbildung 11** in 100facher Vergrößerung). Um die Spezifität der Antikörper und die Qualität der immunhistochemischen Färbungen zu überprüfen, wurden während der immunhistochemischen Färbungen stets Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. **Abbildung 15 b** zeigt einen Ausschnitt einer CD8-Positivkontrolle innerhalb eines humanen Tonsillenpräparates. Demgegenüber gestellt in **Abbildung 15 c** eine Negativkontrolle, bei der es zu keiner Anfärbung CD8-positiver T-Lymphozyten kam. Die Spezifität des immunhistochemischen Nachweises CD8-positiver T-Lymphozyten in den vorliegenden atherosklerotischen Läsionen kann daher angenommen werden.



**Abbildung 15: Repräsentative Beispiele der immunhistochemischen Untersuchung CD8-positiver T-Lymphozyten** (braune Färbung), **a**) innerhalb eines atherosklerotischen Plaques der *Arteria carotis interna* mit Detailausschnitt in 20/40facher Vergrößerung, **b**) CD8-Positivkontrolle innerhalb eines humanen Tonsillenpräparates in 40facher Vergrößerung, **c**) CD8-Negativkontrolle innerhalb eines humanen Tonsillenpräparates in 40facher Vergrößerung; (jeweils Paraffinschnitt)

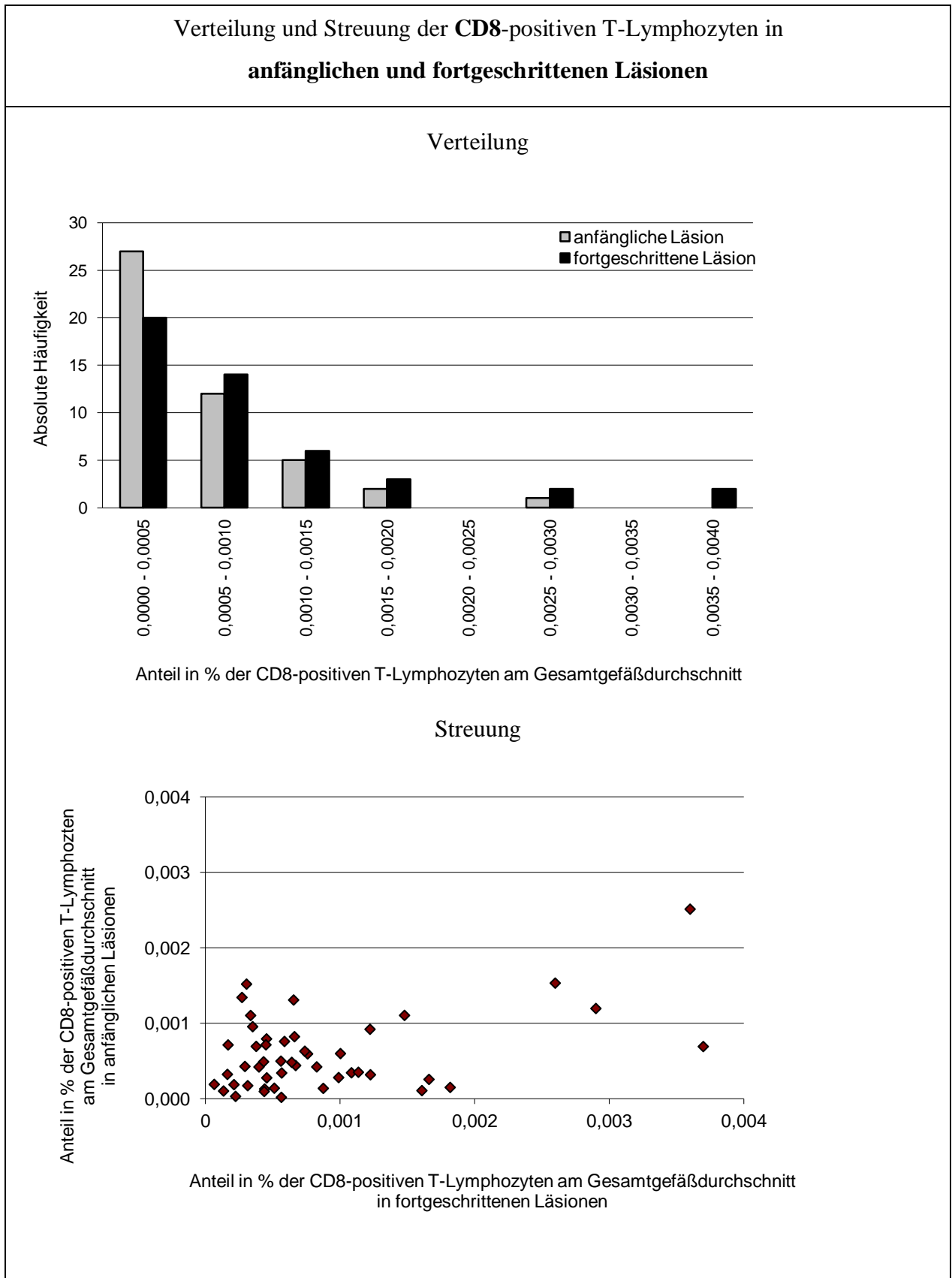




**Abbildung 16:** Verteilung CD8-positiver T-Lymphozyten in atherosklerotischen Läsionen in Prozent

Die Anzahl CD8-positiver T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in den **anfänglichen Läsionen** liegt durchschnittlich bei 0,00059 % (Median von 0,00044 %) bei einer Standardabweichung von 0,0005. Die Streuung der CD8-positiven T-Lymphozyten ist bei der Mehrheit der Patienten relativ gering (siehe **Abbildung 16**).

Die Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in den **fortgeschrittenen Läsionen** liegt durchschnittlich bei 0,00087 % (Median von 0,00057 %) bei einer Standardabweichung von 0,00087. Die Streuung der CD8-positiven T-Lymphozyten ist bei der Mehrheit der Patienten relativ gering (siehe **Abbildung 16**).



**Abbildung 17:** Verteilung und Streuung der CD8-positiven T-Lymphozyten in anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen in Prozent

Die **Abbildung 17** stellt die Verteilungen der anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen gegenüber. Die absolute Häufigkeit in den unteren Wertebereichen ist bei den anfänglichen Läsionen größer. Die fortgeschrittenen Läsionen zeigen vermehrt höhere Ausprägungen der CD8-positiven T-Lymphozyten.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Unterschiede eignet sich der *Mann Whitney* Test (siehe **Tabelle 6**), welcher die Homogenität zweier Verteilungen prüft. Das Streudiagramm zeigt keine statistischen eindeutigen Tendenzen eines Zusammenhangs. Es können weder die Aussage (1) je größer die Werte in den anfänglichen Läsionen, desto größer die Werte in den fortgeschrittenen Läsionen, noch die Aussage (2) je größer die Werte in den anfänglichen Läsionen, desto kleiner die Werte der fortgeschrittenen Läsionen abgeleitet werden. Der Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman* prüft die Signifikanz des statistischen Zusammenhangs (siehe **Tabelle 7**).

**Tabelle 6:** Signifikanztest nach *Mann Whitney* bezüglich Übereinstimmung der Anzahl **CD8**-positiver T-Lymphozyten in den **anfänglichen** und **fortgeschrittenen Läsionen**

Nullhypothese:	Die Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt der anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen stimmen im Mittel überein.
Alternativhypothese:	Die Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt der anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen stimmen im Mittel nicht überein.
Vorgehen:	Nutzung des <i>Mann Whitney</i> Tests
Ergebnisse:	N: 47 p-Wert: 0,082
Schlussfolgerung:	Die Nullhypothese „Die Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt der anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen stimmen im Mittel überein“ kann nicht abgelehnt werden ( $\alpha = 0,05$ ).

Die Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt liegt in den fortgeschrittenen Läsionen statistisch bei einem Sicherheitsintervall von 95 % nicht signifikant höher als in den anfänglichen Läsionen.

**Tabelle 7:** Signifikanztest nach *Spearman* bezüglich Übereinstimmung der Anzahl **CD8**-positiver T-Lymphozyten in den **anfänglichen** und **fortgeschrittenen Läsionen**

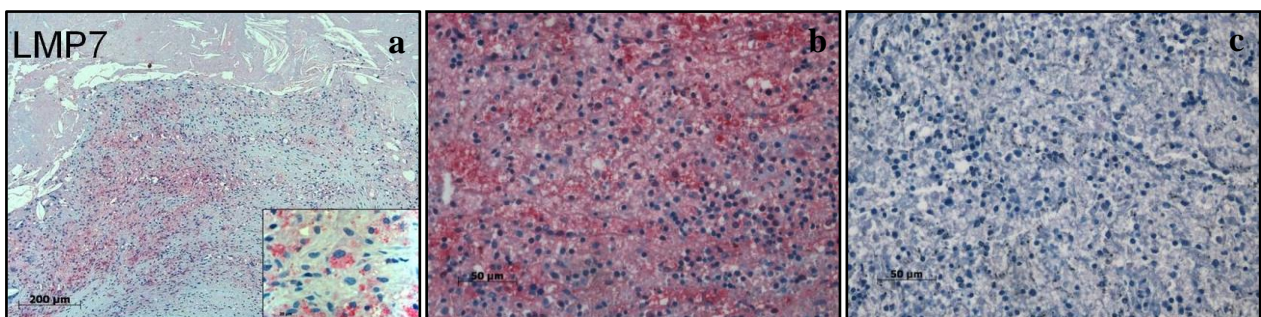
Nullhypothese:	Es ist kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in den anfänglichen Läsionen und der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden.
Alternativhypothese:	Es ist ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in den anfänglichen Läsionen und der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden.
Vorgehen:	Rangkorrelationskoeffizient nach <i>Spearman</i>
Ergebnisse:	N: 47 Rho: 0,18 p-Wert: 0,21
Schlussfolgerung:	Die Nullhypothese „Es ist kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in den anfänglichen Läsionen und der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden“ kann nicht abgelehnt werden ( $\alpha = 0,05$ ).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl CD8-positiver T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in anfänglichen Läsionen und der Anzahl CD8-positiver T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in fortgeschrittenen Läsionen kann nicht festgestellt werden.

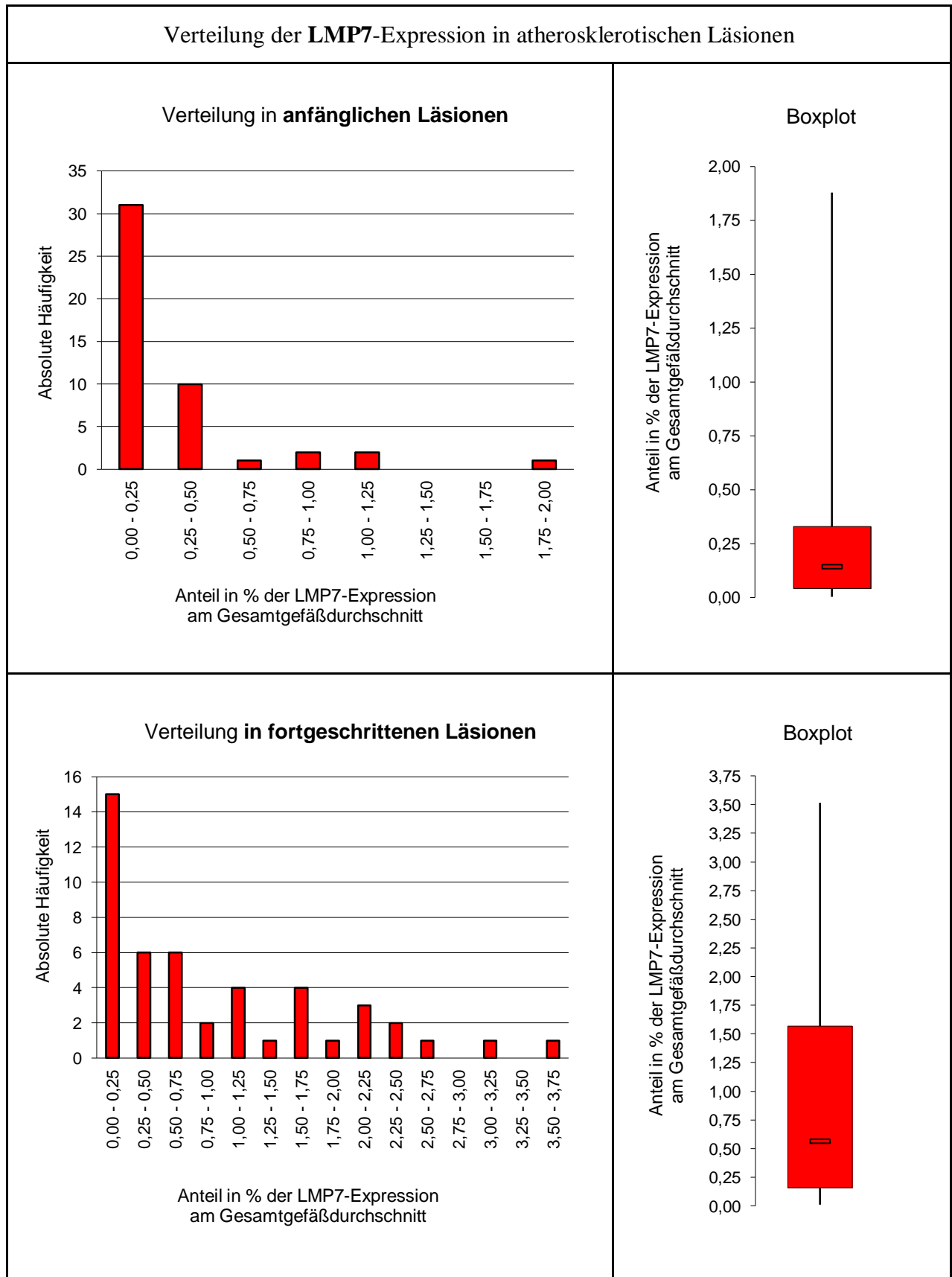
## 4.2 Nachweis der LMP7-Expression in atherosklerotischen Plaques

In **Abbildung 18** werden repräsentative Beispiele der immunhistochemischen Untersuchung der LMP7-Expression gegenübergestellt.

Die LMP7-Expression innerhalb einer atherosklerotischen Plaque der *Arteria carotis interna*, mit der charakteristischen granulär-zytoplasmatischen Rotfärbung, zeigt **Abbildung 18 a**. Um die Spezifität der Antikörper und die Qualität der immunhistochemischen Färbungen zu kontrollieren, wurden während der immunhistochemischen Färbungen stets Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt. **Abbildung 18 b** zeigt einen Ausschnitt einer etablierten Positivkontrolle innerhalb eines murinen Milzpräparates. Demgegenüber steht die Negativkontrolle in **Abbildung 18 c**, die keine Anfärbung aufweist. Eine Spezifität des immunhistochemischen Nachweises der LMP7-Expression kann daher für die vorliegenden atherosklerotischen Plaques angenommen werden.



**Abbildung 18: Repräsentative Beispiele der immunhistochemischen Untersuchung der LMP7-Expression** (rote Färbung), **a**) innerhalb eines atherosklerotischen Plaques der *Arteria carotis interna* mit Detailausschnitt in 20/40facher Vergrößerung, **b**) LMP7-Positivkontrolle innerhalb eines murinen Milzpräparates in 40facher Vergrößerung, **c**) LMP7-Negativkontrolle innerhalb eines murinen Milzpräparates in 40facher Vergrößerung; (jeweils Paraffinschnitt)

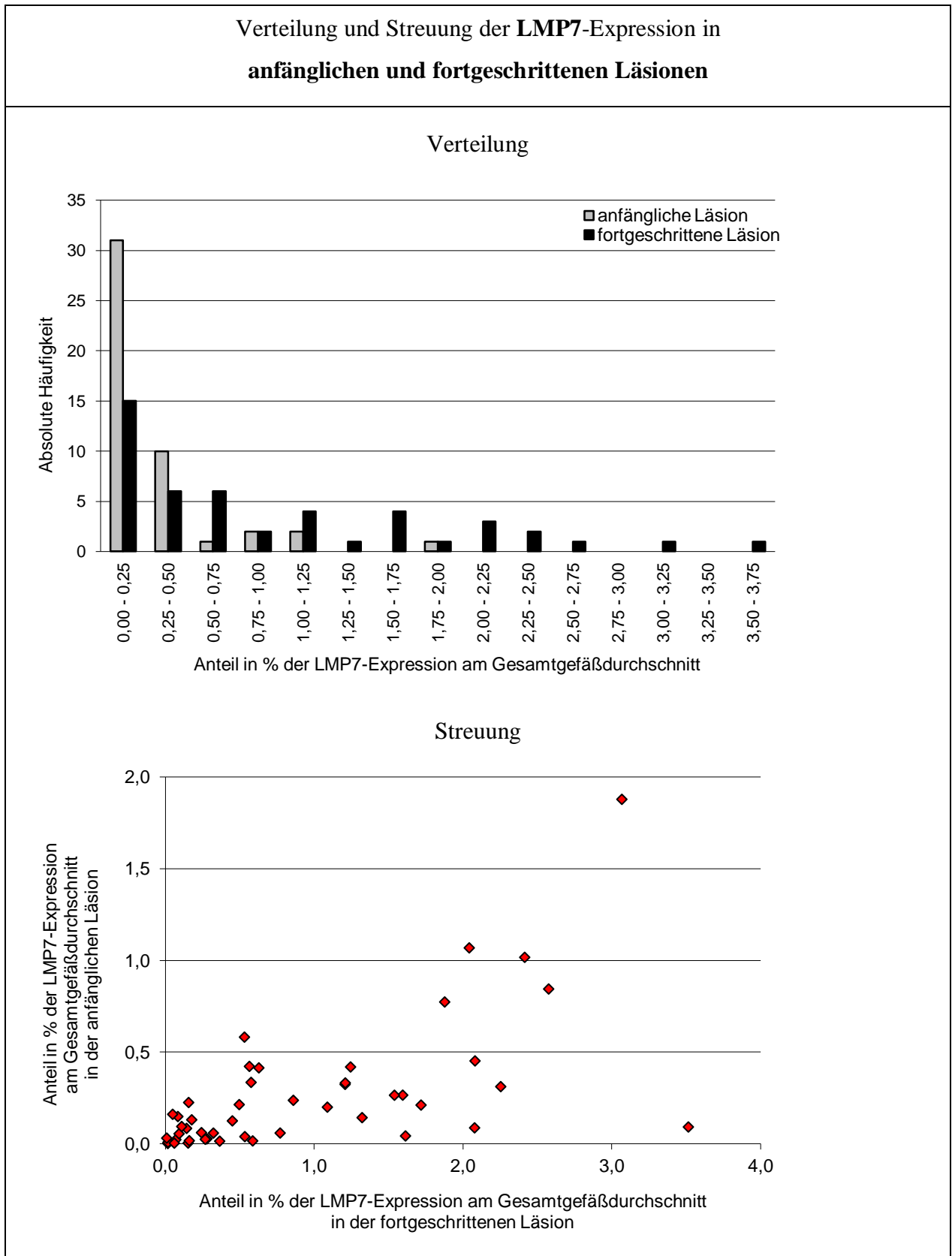


**Abbildung 19:** Verteilung der LMP7-Expression in atherosklerotischen Läsionen in Prozent

Der Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den **anfänglichen Läsionen** liegt durchschnittlich bei 0,26 % (Median von 0,14 %) bei einer Standardabweichung von 0,35. Die Streuung der LMP7-Expression ist bei der Mehrheit der Patienten relativ gering.

Der Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den **fortgeschrittenen Läsionen** liegt durchschnittlich bei 0,92 % (Median von 0,57 %) bei einer Standardabweichung von 0,91. Die Streuung der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt ist bei der Mehrheit der Patienten relativ hoch (siehe **Abbildung 19**).





**Abbildung 20:** Verteilung und Streuung der LMP7-Expression in den anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen in Prozent

Die **Abbildung 20** stellt die Verteilungen der anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen gegenüber. Die absolute Häufigkeit in den unteren Wertebereichen ist bei den anfänglichen Läsionen größer. Die fortgeschrittenen Läsionen zeigen vermehrt höhere Ausprägungen der LMP7-Expression.

Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Unterschiede eignet sich der *Mann Whitney* Tests (siehe **Tabelle 8**), welcher die Homogenität zweier Verteilungen prüft. Das Streudiagramm lässt eine statistische Tendenz eines Zusammenhangs erahnen. Es lässt sich ableiten, dass je größer die Werte in den anfänglichen Läsionen, desto größer die Werte in den fortgeschrittenen Läsionen sind. Der Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman* prüft die Signifikanz des statistischen Zusammenhangs (siehe **Tabelle 9**).

**Tabelle 8:** Signifikanztest nach *Mann Whitney* bezüglich Übereinstimmung der **LMP7**-Expression in den **anfänglichen** und **fortgeschrittenen Läsionen**

Nullhypothese:	Der Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt der anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen stimmt im Mittel überein.
Alternativhypothese:	Der Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt der anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen stimmt nicht im Mittel überein.
Vorgehen:	Nutzung des <i>Mann Whitney</i> Tests
Ergebnisse:	N: 47 p-Wert: 0,00002
Schlussfolgerung:	Die Nullhypothese „Der Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt der anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen stimmt im Mittel überein“ kann abgelehnt werden ( $\alpha = 0,05$ ).

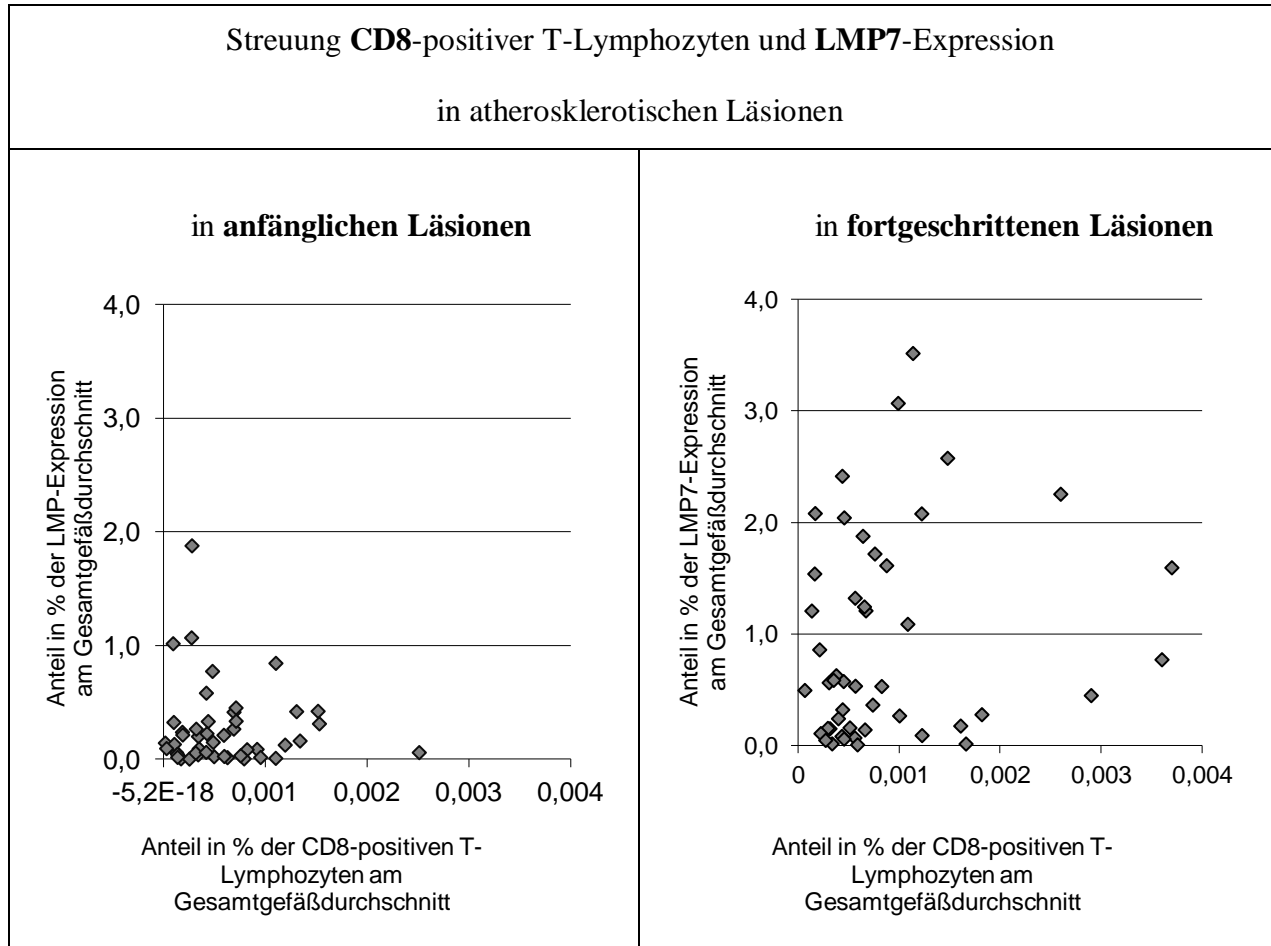
Der Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt liegt in den fortgeschrittenen Läsionen statistisch signifikant höher als in der anfänglichen Läsionen.

**Tabelle 9:** Signifikanztest nach *Spearman* bezüglich Übereinstimmung der **LMP7**-Expression in den **anfänglichen** und **fortgeschrittenen Läsionen**

Nullhypothese:	Es ist kein Zusammenhang zwischen dem Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den anfänglichen Läsionen und dem Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden.
Alternativhypothese:	Es ist ein Zusammenhang zwischen dem Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den anfänglichen Läsionen und dem Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden.
Vorgehen:	Rangkorrelationskoeffizient nach <i>Spearman</i>
Ergebnisse:	N: 47 Rho: 0,66 p-Wert: 0,00
Schlussfolgerung:	Die Nullhypothese „Es ist kein Zusammenhang zwischen dem Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den anfänglichen Läsionen und dem Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden“ kann abgelehnt werden ( $\alpha = 0,05$ ).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in anfänglichen Läsionen und in fortgeschrittenen kann Läsionen festgestellt werden.

### 4.3 Zusammenhang CD8-positiver T-Lymphozyten mit LMP7-Expression in atherosklerotischen Plaques



**Abbildung 21:** Streuung CD8-positiver T-Lymphozyten und LMP7-Expression in atherosklerotischen Läsionen in Prozent

Die **Abbildung 21** zeigt die Streuungen der Anteile CD8-positiver T-Lymphozyten und LMP7-Expression in anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen. Die Streudiagramme zeigen weder in den anfänglichen noch in den fortgeschrittenen Läsionen statistisch eindeutige Tendenzen eines Zusammenhangs. Es können weder die Aussage (1) je größer die Werte in den anfänglichen Läsionen, desto größer die Werte in den fortgeschrittenen Läsionen, noch die Aussage (2) je größer die Werte in den anfänglichen Läsionen, desto kleiner die Werte der fortgeschrittenen Läsionen abgeleitet werden. Der Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman* prüft die Signifikanz des statistischen Zusammenhangs (siehe **Tabelle 10** und **Tabelle 11**).

**Tabelle 10:** Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Anzahl **CD8**-positiver T-Lymphozyten und des Anteils der **LMP7**-Expression in **anfänglichen Läsionen**

Nullhypothese:	Es ist kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und des Anteils der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den anfänglichen Läsionen vorhanden.
Alternativhypothese:	Es ist ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und des Anteils der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den anfänglichen Läsionen vorhanden.
Vorgehen:	Rangkorrelationskoeffizient nach <i>Spearman</i>
Ergebnisse:	N: 47 Rho: 0,05 p-Wert: 0,74
Schlussfolgerung:	Die Nullhypothese „Es ist kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und des Anteils der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den anfänglichen Läsionen vorhanden“ kann nicht abgelehnt werden ( $\alpha = 0,05$ ).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und des Anteils der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt kann in den **anfänglichen Läsionen** nicht festgestellt werden.

**Tabelle 11:** Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Anzahl **CD8**-positiver T-Lymphozyten und des Anteils der **LMP7**-Expression in **fortgeschrittenen Läsionen**

Nullhypothese:	Es ist kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und des Anteils der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden.
Alternativhypothese:	Es ist ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und des Anteils der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden.
Vorgehen:	Rangkorrelationskoeffizient nach <i>Spearman</i>
Ergebnisse:	N: 47 Rho: 0,18 p-Wert: 0,21
Schlussfolgerung:	Die Nullhypothese „Es ist kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und des Anteils der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden“ kann nicht abgelehnt werden ( $\alpha = 0,05$ ).

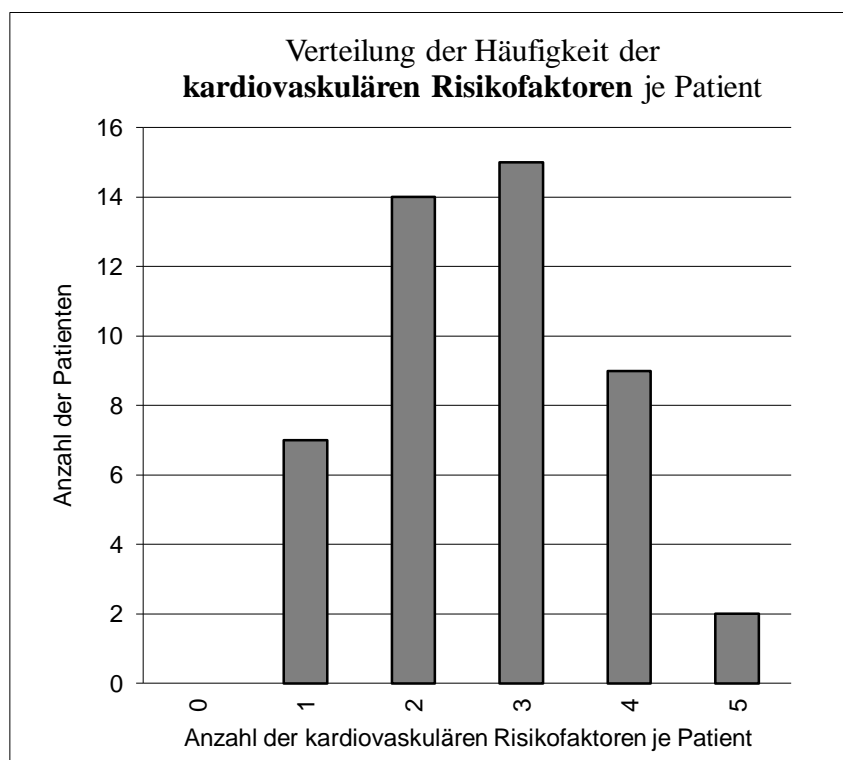
Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und des Anteils der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt kann in den **fortgeschrittenen Läsionen** nicht festgestellt werden.

#### 4.4 Verteilung der kardiovaskulären Risikofaktoren im Patientenkollektiv

Präoperativ wurden kardiovaskuläre Risikofaktoren evaluiert (siehe **Kapitel 1.1.2**). Nachfolgend sind in **Tabelle 12** die absoluten und relativen Häufigkeiten gegenübergestellt. Bedeutende kardiovaskuläre Risikofaktoren liegen bei einer großen Anzahl der Patienten vor. Zu beachten ist, dass teilweise ein Patient mehrere Risikofaktoren aufweist (siehe **Abbildung 22**).

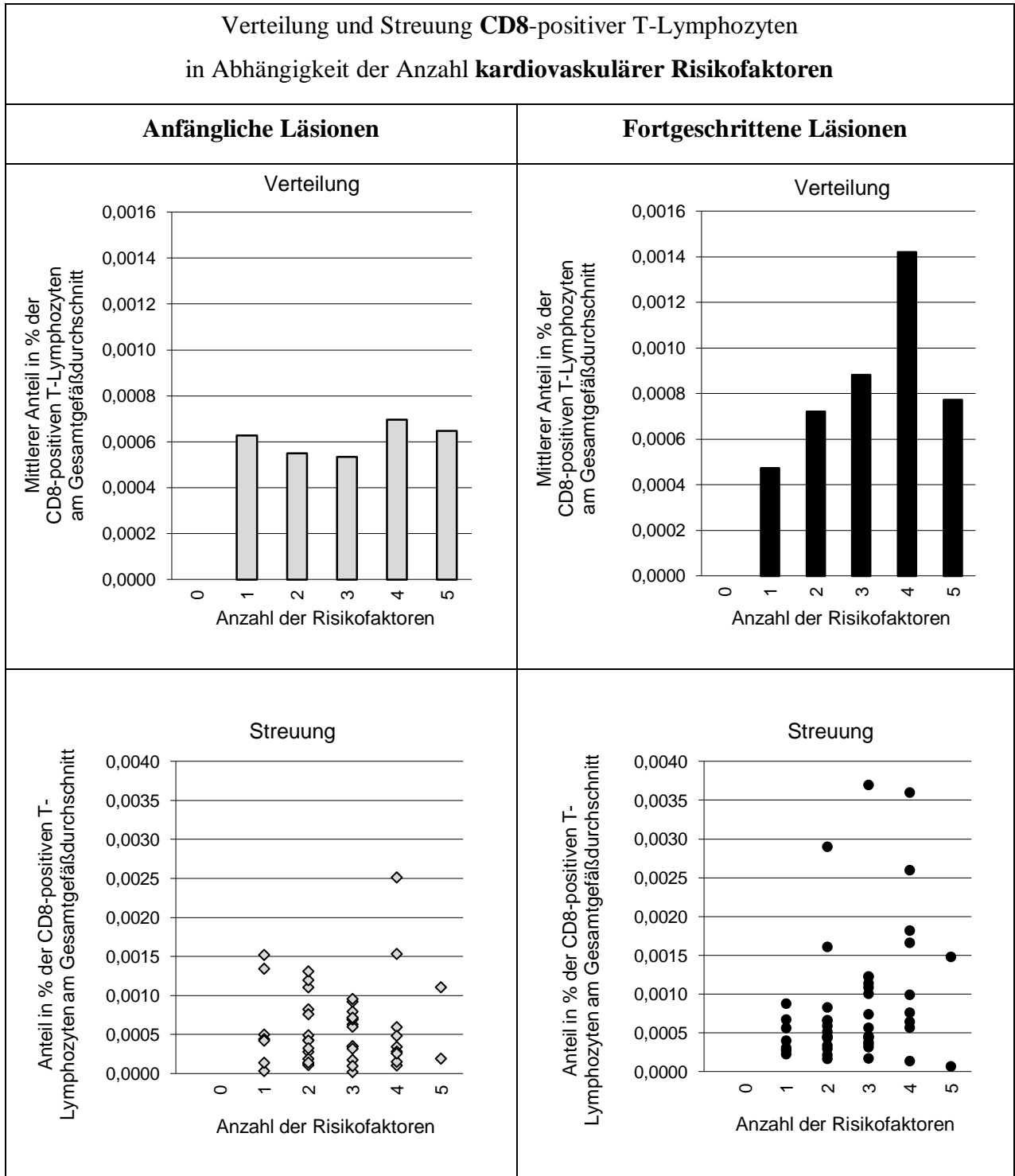
**Tabelle 12:** Absolute und relative Häufigkeiten kardiovaskulärer Risikofaktoren

Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit
Adipositas	30	64 %
Arterielle Hypertonie	44	94 %
Diabetes mellitus	21	45 %
Hypercholesterinämie	12	26 %
Positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen	19	40 %



**Abbildung 22:** Verteilung der Häufigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren je Patient

## 4.5 Zusammenhang kardiovaskulärer Risikofaktoren mit CD8-positiven T-Lymphozyten



**Abbildung 23:** Verteilung und Streuung CD8-positiver T-Lymphozyten in Abhängigkeit der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in Prozent



Die Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren liegt in den **anfänglichen Läsionen** durchschnittlich bei 0,00051 % (Median von 0,00059 %) bei einer Standardabweichung von 0,00023. Die Streuung der CD8-positiven T-Lymphozyten ist bei vorkommenden kardiovaskulären Risikofaktoren relativ gering.

Die Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt in Abhängigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren liegt in den **fortgeschrittenen Läsionen** durchschnittlich bei 0,00071 % (Median von 0,00074 %) bei einer Standardabweichung von 0,00043. Die Streuung der CD8-positiven T-Lymphozyten ist durch den Anstieg der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt bei vier kardiovaskulären Risikofaktoren größer.

Im Vergleich zu den anfänglichen Läsionen zeigen die fortgeschrittenen Läsionen vermehrt höhere Ausprägungen der CD8-positiven T-Lymphozyten. Die Streudiagramme der anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen zeigen keine statistischen eindeutigen Tendenzen eines Zusammenhangs (siehe **Abbildung 23**). Es können weder die Aussage (1) je größer die Werte in den anfänglichen Läsionen, desto größer die Werte in den fortgeschrittenen Läsionen noch die Aussage (2) je größer die Werte in den anfänglichen Läsionen, desto kleiner die Werte der fortgeschrittenen Läsionen abgeleitet werden. Der Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman* prüft die Signifikanz des statistischen Zusammenhangs (siehe **Tabelle 13** und **Tabelle 14**).

**Tabelle 13:** Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Anzahl **CD8**-positiver T-Lymphozyten und der Anzahl **kardiovaskulärer Risikofaktoren** in **anfänglichen Läsionen**

Nullhypothese:	Es ist kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den anfänglichen Läsionen vorhanden.
Alternativhypothese:	Es ist ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den anfänglichen Läsionen vorhanden.
Vorgehen:	Rangkorrelationskoeffizient nach <i>Spearman</i>
Ergebnisse:	N: 47 Rho: -0,03 p-Wert: 0,79
Schlussfolgerung:	Die Nullhypothese „Es ist kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den anfänglichen Läsionen vorhanden“ kann nicht abgelehnt werden ( $\alpha = 0,05$ ).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren kann in den **anfänglichen Läsionen** nicht festgestellt werden.

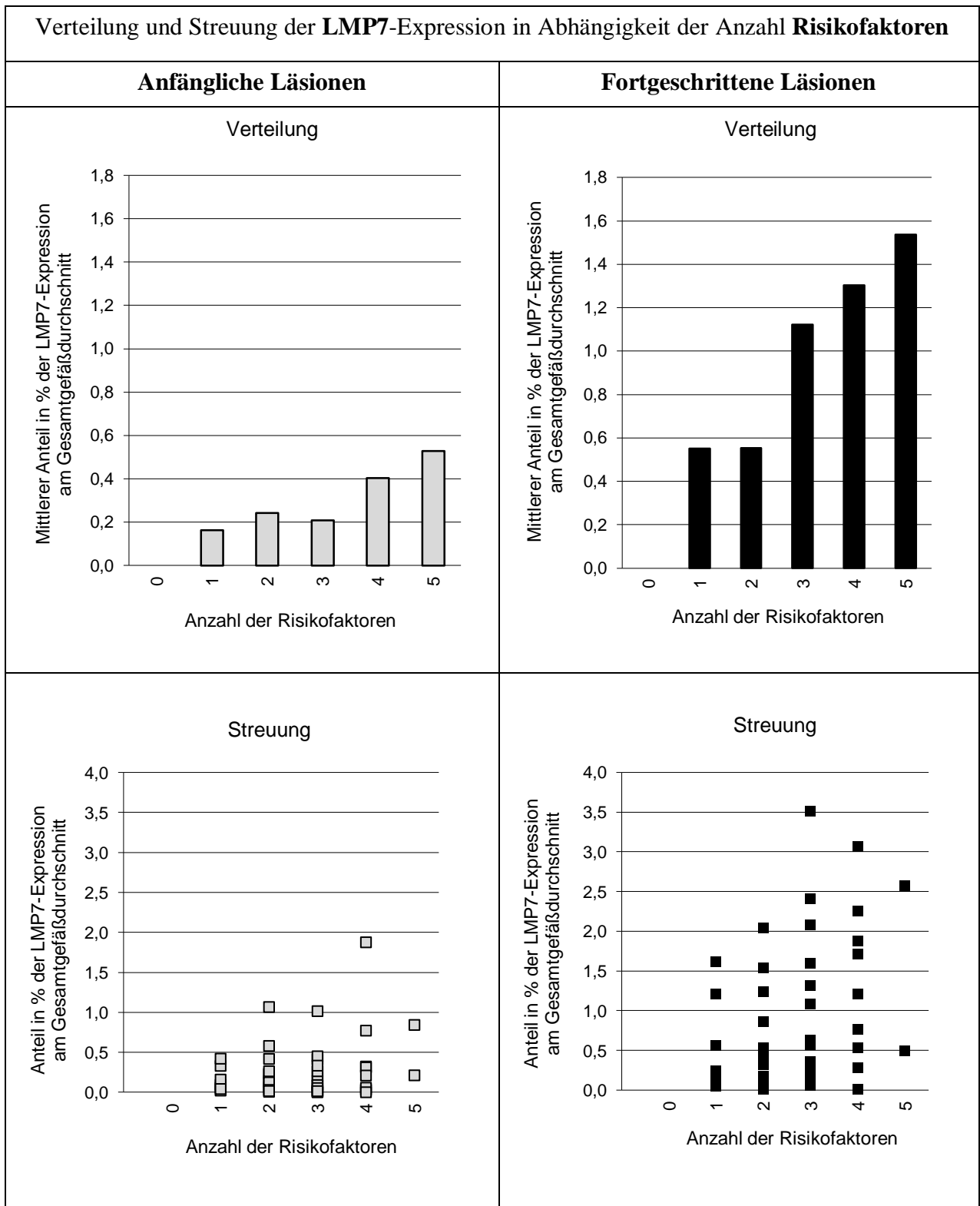
**Tabelle 14:** Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Anzahl **CD8**-positiver T-Lymphozyten und der Anzahl **kardiovaskulärer Risikofaktoren in fortgeschrittenen Läsionen**

Nullhypothese:	Es ist kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden.
Alternativhypothese:	Es ist ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden.
Vorgehen:	Rangkorrelationskoeffizient nach <i>Spearman</i>
Ergebnisse:	N: 47 Rho: 0,16 p-Wert: 0,27
Schlussfolgerung:	Die Nullhypothese „Es ist kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden“ kann nicht abgelehnt werden ( $\alpha = 0,05$ ).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren kann in den **fortgeschrittenen Läsionen** nicht festgestellt werden.

Zusammengefasst kann weder in den anfänglichen noch in den fortgeschrittenen Läsionen ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl der CD8-positiven T-Lymphozyten am Gesamtgefäßdurchschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren festgestellt werden.

## 4.6 Zusammenhang kardiovaskulärer Risikofaktoren mit LMP7-Expression



**Abbildung 24:** Verteilung und Streuung der LMP7-Expression in Abhängigkeit der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in Prozent

Der Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in Abhängigkeit kardiovaskulärer Risikofaktoren liegt in den **anfänglichen Läsionen** durchschnittlich bei 0,258 % (Median von 0,226 %) bei einer Standardabweichung von 0,170. Der Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt steigt mit der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren.

Der Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt in Abhängigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren liegt in den **fortgeschrittenen Läsionen** durchschnittlich bei 0,844 % (Median von 0,837 %) bei einer Standardabweichung von 0,524. Der Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt steigt mit der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren.

Im Vergleich zu den anfänglichen Läsionen zeigen die fortgeschrittenen Läsionen vermehrt höhere Ausprägungen des Anteils der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt.

Das Streudiagramm der **anfänglichen Läsionen** zeigt keine statistischen eindeutigen Tendenzen eines Zusammenhangs (siehe **Abbildung 24**). Es können weder die Aussage (1) je größer die Werte in den anfänglichen Läsionen, desto größer die Werte in den fortgeschrittenen Läsionen noch die Aussage (2) je größer die Werte in den anfänglichen Läsionen, desto kleiner die Werte der fortgeschrittenen Läsionen abgeleitet werden.

Das Streudiagramm der **fortgeschrittenen Läsionen** lässt einen schwachen Zusammenhang vermuten (siehe **Abbildung 24**). Je mehr zutreffende kardiovaskuläre Risikofaktoren, desto höher ist der Anteil der LMP7-Expression am Gesamtgefäßdurchschnitt. Der Rangkorrelationskoeffizient nach *Spearman* prüft die Signifikanz eines statistischen Zusammenhangs (siehe **Tabelle 15** und **Tabelle 16**).

**Tabelle 15:** Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der **LMP7-Expression** und der Anzahl **kardiovaskulärer Risikofaktoren in anfänglichen Läsionen**

Nullhypothese:	Es ist kein Zusammenhang zwischen der LMP7-Expression am Gesamtgefäßquerschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den anfänglichen Läsionen vorhanden.
Alternativhypothese:	Es ist ein Zusammenhang zwischen der LMP7-Expression am Gesamtgefäßquerschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den anfänglichen Läsionen vorhanden.
Vorgehen:	Rangkorrelationskoeffizient nach <i>Spearman</i>
Ergebnisse:	N: 47 Rho: 0,01 p-Wert: 0,94
Schlussfolgerung:	Die Nullhypothese „Es ist kein Zusammenhang zwischen der LMP7-Expression am Gesamtgefäßquerschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den anfänglichen Läsionen vorhanden“ kann nicht abgelehnt werden ( $\alpha = 0,05$ ).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der LMP7-Expression am Gesamtgefäßquerschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren kann in den **anfänglichen Läsionen** nicht festgestellt werden.

**Tabelle 16:** Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der **LMP7-Expression** und der Anzahl **kardiovaskulärer Risikofaktoren** in **fortgeschrittenen Läsionen**

Nullhypothese:	Es ist kein Zusammenhang zwischen der LMP7-Expression am Gesamtgefäßquerschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden.
Alternativhypothese:	Es ist ein Zusammenhang zwischen der LMP7-Expression am Gesamtgefäßquerschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden.
Vorgehen:	Rangkorrelationskoeffizient nach <i>Spearman</i>
Ergebnisse:	N: 47 Rho: 0,31 p-Wert: 0,03
Schlussfolgerung:	Die Nullhypothese „Es ist kein Zusammenhang zwischen der LMP7-Expression am Gesamtgefäßquerschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in den fortgeschrittenen Läsionen vorhanden“ kann abgelehnt werden ( $\alpha = 0,05$ ).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der LMP7-Expression am Gesamtgefäßquerschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren kann in den **fortgeschrittenen Läsionen** festgestellt werden.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der LMP7-Expression am Gesamtgefäßquerschnitt und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren kann nicht in den anfänglichen dafür aber in den fortgeschrittenen Läsionen festgestellt werden.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine immunhistochemische Analyse an humanen atherosklerotischen Plaques durchgeführt. Es wurden *Thrombendariektomie*-Präparate der *Arteria carotis interna* von 47 Patienten durch immunhistochemischen Nachweis der immunoproteasomalen Untereinheit LMP7 und von CD8-positiven T-Lymphozyten analysiert. Erstmals konnte die LMP7-Expression in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Eine potentielle Rolle der MHC-Klasse-I vermittelten Antigenpräsentation in der Atherosklerose konnte aufgrund fehlender Korrelation zwischen LMP7-Expression und dem Vorkommen von CD8-positiven T-Lymphozyten nicht gezeigt werden. Desweiteren zeigten die Untersuchungen, dass LMP7 in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen vermehrt exprimiert wird und mit der Anzahl an vorhandenen kardiovaskulären Risikofaktoren korreliert.

Nachfolgend werden die Ergebnisse erörtert und in den Kontext der vorhandenen Literatur gestellt.

### 5.1 Nachweis von CD8-positiven T-Lymphozyten in humanen atherosklerotischen Plaques

CD8-positive T-Lymphozyten wurden in dieser Arbeit immunhistochemisch in humanen *Thrombendariektomie*-Präparaten der *Arteria carotis interna* nachgewiesen, um über eine Korrelation mit der LMP7-Expression einen indirekten Hinweis bezüglich der Rolle des Immunoproteasoms bei der MHC-Klasse-I vermittelten Antigenprozessierung in der Atherosklerose zu erhalten.

Analog zum vorliegenden Nachweis CD8-positiver T-Lymphozyten wurden CD8-positive T-Lymphozyten auch in anderen Studien immunhistochemisch in humanen *Thrombendariektomie*-Präparaten der *Arteria carotis interna* nachgewiesen [98,99]. Sie gehören zusammen mit den T-Lymphozyten-Subpopulationen der CD3- und CD4-T-Lymphozyten vermutlich zum vorherrschenden Zelltyp an infiltrierten Inflammationszellen in atherosklerotischen Plaques [99]. Es wurden weiterhin CD8-positive T-Lymphozyten in allen Phasen der Atherosklerose auch in Plaques anderer Gefäße gezeigt (zur Übersicht [30]).



Wenngleich in der Literatur CD8-positive T-Lymphozyten in atherosklerotischen Plaques beschrieben sind, ist über ihre Spezifität im Rahmen der Atherosklerose jedoch noch wenig bekannt (zur Übersicht [100]).

Zytotoxische CD8-positive T-Lymphozyten detektieren körperfremde, d.h. virale, bakterielle und mutierte Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen und lysieren mit Hilfe von Perforinen und Granzymen diese körpereigenen Zellen in atherosklerotischen Plaques. Aktivierte CD8-positive T-Lymphozyten produzieren neben diesen Zellmembran-zerstörenden Substanzen auch verschiedene Zytokine und unterstützen CD4-positive T-Lymphozyten. CD4-positive T-Lymphozyten erkennen dagegen auf antigenpräsentierenden Zellen dargebotene Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen und produzieren bekanntermaßen die proatherogenen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (zur Übersicht [101] und siehe **Kapitel 1.2.6**).

Über die Rolle CD8-positiver T-Lymphozyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse bei der Atherogenese finden sich in der Literatur gegensätzliche Befunde. Ein Defizit an CD8-positiven T-Lymphozyten zeigte in hyperlipidämischen *ApoE-knock-out* Mäusen einerseits keinen signifikanten Einfluss auf die Atherogenese [102], andererseits ist ein proatherogener Einfluss über proapoptotische Mechanismen der CD8-positiven T-Lymphozyten vorstellbar (zur Übersicht [103]). Eine Beteiligung CD8-positiver T-Lymphozyten in der Atherogenese konnte durch die transgene Expression von *lacZ* ( $\beta$ -Galaktosidase-Gen) in glatten Muskelzellen gezeigt werden, welche in *ApoE-knock-out* Mäusen die Ausbildung der Atherosklerose verstärkte [104]. Weitere atherosklerotische Befunde von *ApoE-knock-out*-Mäusen lassen ebenfalls vermuten, dass Infektionen mit *Cytomegalie*-Viren und das Auslösen einer zytotoxischen T-Zell-Antwort in Arterien zu einer verstärkten Atherosklerose in diesen Tieren führt [105,106].

## 5.2 CD8-positive T-Lymphozyten korrelieren nicht mit Progression und kardiovaskulären Risikofaktoren

T-Lymphozyten gehören zu den wichtigsten Immunzellen in atherosklerotischen Plaques [99,107]. In der vorliegenden Studie wurden CD8-positive T-Lymphozyten in den anfänglichen und fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen. Die Analyse zeigt unter Berücksichtigung plaquemorphologischer Eigenschaften jedoch keinen Einfluss auf das Vorkommen CD8-positiver T-Lymphozyten mit Progression der Atherosklerose.

Wie in **Kapitel 5.1** dargestellt, kommen CD8-positive T-Lymphozyten in allen Stadien der Atherosklerose vor. Allerdings sind Daten über CD8-positive T-Lymphozyten in Hinblick auf die Progression in atherosklerotischen Plaques kaum vorhanden. *Olofsson et. al* stimulierten CD8-positive T-Lymphozyten in ApoE-*knock-out* Mäusen mit einem CD137-Antikörper und zeigten einen gleichzeitigen Anstieg CD8-positiver T-Lymphozyten sowie die Zunahme der atherosklerotischen Läsionen [108]. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist es vorstellbar, dass CD8-positive T-Lymphozyten mit Progression der Atherosklerose ansteigen können.

Des Weiteren korreliert in dieser Studie das Vorkommen CD8-positiver T-Lymphozyten nicht mit der Anzahl der fünf evaluierten kardiovaskulären Risikofaktoren (Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen). Über den Einfluss einzelner kardiovaskulärer Risikofaktoren auf das Vorkommen CD8-positiver T-Lymphozyten in atherosklerotischen Läsionen existieren in der Literatur vereinzelt Daten.

Einen Anstieg CD8-positiver T-Lymphozyten unter dem Einfluss der **Hypercholesterinämie** in PD1-L1/2-*knock-out*-LDLR-*knock-out* Mäusen konnten *Gotsman et al.* zeigen. Nach einer zehnwöchigen hypercholesterinreichen Diät wurde immunhistochemisch eine signifikant vermehrte Infiltration CD8-positiver T-Lymphozyten in der Intima im Vergleich zu Kontrollgruppe nachgewiesen [109]. Weiterhin zeigten *Kolbus et al.* in atherosklerotischen Läsionen von ApoE-*knock-out* Mäusen eine CD8-positive-T-Zell-Aktivierung und vermuten aufgrund ihrer Untersuchungen, dass die Hypercholesterinämie mit Bildung von Zell-Autoantigenen assoziiert ist [110]. Daher könnte die Hypercholesterinämie wie die

Atherosklerose teilweise mit Aspekten einer Autoimmunerkrankung verglichen werden (siehe **Kapitel 5.5**).

Der kardiovaskuläre Risikofaktor **Diabetes mellitus** scheint ebenfalls einen Einfluss auf CD8-positive T-Lymphozyten auszuüben. So wurden vermehrt CD8-positive T-Lymphozyten in humanen *Thrombendarteriektomie*-Präparaten der *Arteria carotis interna* bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 festgestellt [111]. Es existieren weitere Befunde über gesteigerte CD8-positive T-Lymphozyten-Werte in Vollblutanalysen diabetischer Patienten. Unter dem Einfluss einer akuten Hyperglykämie zeigten *Dworacka et al.* im Vollblut von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 signifikant höhere Werte CD8-positiver T-Lymphozyten im Vergleich zur gesunden Patientengruppe. Die Autoren vermuten daher eine Progression der Atherosklerose durch akute Hyperglykämien bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 [112]. Im Gegensatz zu den genannten Befunden berichtete eine Studie über verringerte Werte CD8-positiver T-Lymphozyten. *Han et al.* wiesen beim kardiovaskulären Risikofaktor Adipositas im peripheren Blut verringerte Werte CD8-positiver T-Lymphozyten bei jungen Probanden *vs.* zur normgewichtigen Kontrollgruppe nach, wobei die klinische Bedeutung im Zusammenhang zur Adipositas noch unklar ist [113].

Die vorliegende Studie zeigt keinen Einfluss auf das Vorkommen CD8-positiver T-Lymphozyten mit der Anzahl von kardiovaskulären Risikofaktoren. Im Unterschied zu den vorliegenden Ergebnissen beschreibt die Literatur überwiegend einen Anstieg CD8-positiver T-Lymphozyten durch den Einfluss einzelner kardiovaskulärer Risikofaktoren. Weiterhin kann die Aussage getroffen werden, dass die MHC-Klasse-I vermittelte Antigenpräsentation und zytotoxische T-Zell-Antwort durch CD8-positive T-Lymphozyten eine untergeordnete Bedeutung für die Progression der Atherosklerose besitzen.

### 5.3 Nachweis von Immunoproteasom in humanen atherosklerotischen Plaques

Stellvertretend für das Immunoproteasom wurde in dieser Arbeit die Expression der Untereinheit LMP7, als immunoproteasomales Äquivalent zur *chymotrypsin-like* Aktivität des konstitutiven Proteasoms gewählt. Die Mehrzahl der Proteine wird überwiegend durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert. Durch die Regulierung komplexer Zellprozesse ist das Ubiquitin-Proteasom-System an der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen maßgeblich beteiligt (siehe **Kapitel 1.2.3**). Erstmals konnte die LMP7-Expression in humanen Plaques der *Arteria carotis interna* immunhistochemisch nachgewiesen werden, wodurch die Grundannahme, dass das Immunoproteasom eine Rolle in der Atherosklerose spielt, unterstützt werden kann.

Die Literatur beschreibt derzeit keine immunhistochemische LMP7-Expression in der *Arteria carotis interna* oder in anderen atherosklerotischen Läsionen. Daten zu den zwei anderen immunoproteasomalen Untereinheiten, LMP2 und MECL1, stehen ebenfalls noch aus.

Dagegen existieren Ergebnisse über das Immunoproteasom in anderen Erkrankungen, die einzelne Aspekte der Atherogenese wie Inflammation und oxidativen Stress aufweisen. So konnte eine vermehrte LMP7-Expression immunhistochemisch in Gehirnen erkrankter Patienten mit der neurodegenerativen Erkrankung *Chorea Huntington* sowie in Gehirnen von HD94-Mäusen [114], in einem *Morbus-Alzheimer*-Modell in Gehirnen transgener *PDAPP*-Mäuse [115] und in humanen Speicheldrüsen beim *Sjögren*-Syndrom [97,116] nachgewiesen werden (siehe **Kapitel 5.5**). Neben diesen Befunden lassen sich Rückschlüsse auf das Immunoproteasom auch aus Zellkulturen gewinnen. In humanen und murinen Kolonkarzinom-Zelllinien wurde eine LMP7-Expressionszunahme durch Hitzeschock, im Vergleich zu einer IFN- $\gamma$ -Stimulation, aufgezeigt [117]. Diese Daten deuten bereits auf eine Rolle des Immunoproteasoms bei Inflammation und oxidativen Stress hin.

## 5.4 Immunoproteasom ist unabhängig von CD8-positiven T-Lymphozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Hinweisen für eine Bedeutung der MHC-Klasse-I vermittelte Antigenprozessierung durch das Immunoproteasom in der Atherogenese gesucht. Um sich dieser Frage zu nähern wurden die beiden immunhistochemisch ermittelten Größen, LMP7-Expression und Vorkommen CD8-positiver T-Lymphozyten unter Berücksichtigung plaquemorphologischer Eigenschaften, miteinander korreliert. Die Analyse konnte keine Korrelation aufzeigen.

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist für die Generierung antigener Peptide verantwortlich und präsentiert diese wie in **Kapitel 1.2.5** dargestellt über MHC-Klasse-I-Moleküle den zytotoxischen CD8-positiven T-Lymphozyten. Für viele MHC-Klasse-I-Epitope ist bekannt, dass sie effektiver durch das Immunoproteasom generiert werden und eine verbesserte T-Zell-Antwort bewirken [35,118]. So konnte in *Adenovirus*-infizierten Zellen bereits bei einem niedrigen Level IFN- $\gamma$ -induzierbarer immunoproteasomaler Untereinheiten eine Steigerung der Antigen-Peptid-Generation und damit eine verbesserte MHC-Klasse-I-Prozessierung gezeigt werden [119]. Aufgrund einer Steigerung der Antigen-Peptid-Generation durch die erhöhte Aktivität des Immunoproteasoms kann eine verbesserte Stimulation CD8-positiver T-Lymphozyten vermutet werden [120].

Aufgrund der fehlenden Korrelation zwischen der LMP7-Expression und dem Vorkommen CD8-positiver T-Lymphozyten in der vorliegenden Studie erscheint eine spezifische Rolle für das Immunoproteasom bei der MHC-Klasse-I vermittelten Antigenprozessierung in der Atherogenese unwahrscheinlich. Abseits der MHC-Klasse-I-Prozessierung vermuten *Seifert et al.* für das Immunoproteasom eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase im Rahmen von inflammatorischen Prozessen. Ihre Untersuchungen zeigten durch das Immunoproteasom in humanen und murinen Zellkulturen (B8 Zellen) unter Einfluss von IFN- $\gamma$  eine rasche Degradierung oxidativ modifizierter und beschädigter Proteine [72]. Das Immunoproteasom scheint demnach vielmehr eine Rolle im Rahmen inflammatorischer Prozesse und bei der Bewältigung des zellulären oxidativen Stresses zu besitzen (zur Übersicht [121] und siehe **Kapitel 5.5**).

## 5.5 Bedeutung des Immunoproteasoms für die Progression atherosklerotischer Plaques

Das Ubiquitin-Proteasom-System spielt eine entscheidende Rolle in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Atherosklerose (zur Übersicht [122]). Die vorliegende Studie zeigt eine statistisch signifikante Erhöhung der LMP7-Expression in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu den anfänglichen Läsionen. Ausgehend von diesem Ergebnis kann eine vermehrte Expression vom Immunoproteasom in den späten Phasen der Atherosklerose im Vergleich zur frühen Phasen vermutet werden. Wie in **Kapitel 5.4** beschrieben, erscheint für das Immunoproteasom eine spezifische Rolle im Rahmen der MHC-Klasse-I vermittelten Antigenprozessierung unwahrscheinlich. Das Immunoproteasom scheint vielmehr Einfluss auf Inflammation und auf die Bewältigung des oxidativen Stresses auszuüben.

Zwischen Immunoproteasom und dem konstitutiven Proteasom besteht ein enger struktureller Zusammenhang (siehe **Kapitel 1.2.4**). Derzeit fehlen weitere immunhistochemische Daten über das Immunoproteasom in atherosklerotischen Läsionen, jedoch können Befunde über das konstitutive Proteasom herangezogen werden.

Die Atherosklerose kommt in verschiedenen Gefäßgebieten vor, wobei die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Atherosklerose beitragen, ähnlich sind [123]. Eine Expression des konstitutiven Proteasoms in atherosklerotisch erkrankten Gefäßwänden wurde überwiegend in glatten Muskelzellen von *Arteria femoralis*, *iliaca*, und *tibialis*, *Aorta* sowie in normalen und stenosierten Venenbypässen durch *Faries et al.* immunhistochemisch an humanem Biopsiematerial nachgewiesen [124]. Es kann vermutet werden, dass auch das Immunoproteasom, ähnlich den Daten zum konstitutiven Proteasom, in unterschiedlichen atherosklerotisch erkrankten Gefäßen nachweisbar ist.

Da das Proteasom ganz im Sinne einer Qualitätskontrolle für den Abbau oxidativ modifizierter Proteine verantwortlich ist (siehe **Kapitel 1.2.3**), kann eine reduzierte proteasomale Aktivität zur Anhäufung dieser Proteine und damit zu einem erhöhten Gehalt reaktiver Sauerstoffmoleküle und zu oxidativen Stress in der Zelle führen (zur Übersicht [125]). Mit Progression der Atherosklerose steigt in der Zelle der oxidative Stress, wobei das 20S Proteasom gegenüber

oxidativen Stress resistenter erscheint als das 26S Proteasom [126,127]. Die oxidativ modifizierten Proteine werden zum Teil als polyubiquitinierte Protein-Konjugate als Einschlusskörperchen in der Zelle abgelagert. Diese Proteine bilden zum Teil jedoch stabile und hochmolekulare Proteinaggregate, die zur weitergehenden Hemmung des Proteinabbaus im Sinne einer ‚Proteasom-Verstopfung‘ beitragen [128].

In der frühen Phase der Atherosklerose zeigten *Herrmann et al.* unter dem Einfluss einer experimentellen Hypercholesterinämie einen Anstieg von Ubiquitin-Konjugaten in Koronararterien von Schweinen. Um bis zu 42 % vermehrte Ubiquitin-Konjugate wurden bei Tieren mit einer hypercholesterinreichen Diät nachgewiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe, die eine Normaldiät bekamen [129]. Neben vermehrten Ubiquitin-Konjugaten in der frühen Phase der Atherosklerose, konnten einzelne Studien auch in den späten Phasen der Atherosklerose vermehrte Ubiquitin-Konjugate in atherosklerotischen Läsionen nachweisen. Die Autoren klassifizierten dabei ihre Präparate nach Kriterien der klinischen Manifestation der *Apoplexie* oder transitorischen ischämischen Attacke (symptomatisch vs. asymptomatisch) bzw. der koronaren Herzerkrankung (stabil vs. instabil).

*Marfella et al.* wiesen immunhistochemisch eine signifikant gesteigerte Ubiquitin-Proteasom-Aktivität in *Thrombendarteriektomie*-Präparaten der *Arteria carotis interna* symptomatischer Patienten vs. asymptomatischer Patienten nach [130]. Eine gesteigerte Ubiquitin-Immunaktivität in Koronararterien zeigten auch *Herrmann et al.* anhand einer Autopsie-basierten Studie. Die Autoren schlussfolgern, dass aufgrund dieser erhöhten Ubiquitin-Immunaktivität in instabilen Koronarläsionen vs. stabilen Koronarläsionen bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt, das Ubiquitin-Proteasom-System bei der Destabilisierung koronarer atherosklerotischer Plaques involviert ist [131]. Eine potentielle Rolle bei der Destabilisierung atherosklerotischer Plaques vermuten auch *Versari et al.* Deren Befunde konnten ähnlich den Befunden zu *Marfella et al.* in *Thrombendarteriektomie*-Präparaten der *Arteria carotis interna* signifikant vermehrte Ubiquitin-Konjugate bei symptomatischen Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe aufzeigen. Interessanterweise zeigten die Befunde von *Versari et al.* im Gegensatz zu den Ergebnissen von *Marfella et al.* jedoch eine verringerte Proteasomaktivität [132]. Eine Rolle bei der Destabilisierung atherosklerotischer Plaques nehmen *Versari et al.* aufgrund der Assoziation zwischen verringerter Proteasomaktivität, vermehrter Ubiquitin-Konjugate und steigendem

oxidativen Stress bei den symptomatischen Patienten im Vergleich zu den asymptomatischen Patienten an [132].

Einen Erklärungsansatz für eine verringerte Proteasomaktivität in der späten Phase der Atherogenese, wie es die Ergebnisse von *Versari et al.* darstellten, können Befunde von *Bence et al.* bieten. Die Daten von *Bence et al.* zeigten, dass oxidativer Stress über die Akkumulation von Ubiquitin-Konjugaten im Sinne einer ‚Proteasom-Verstopfung‘ zu einem Verlust der Proteasomaktivität führen kann [128]. Demzufolge wäre ein *circulus vitiosus* vorstellbar. Verursacht durch diesen Funktionsverlust des Ubiquitin-Proteasom-Systems kommt es aufgrund der reduzierten Abbauproduktivität zusätzlich zu steigendem oxidativen Stress in der Zelle, weiterer Inflammation und folglich zur Progression der Atherosklerose.

Eine alterungsbedingte proteasomale Dysfunktion wird auch für die Progression atherosklerotischer Läsionen diskutiert. Kürzlich wurde eine Aktivitätsverringering des Proteasoms in atherosklerotischen Carotisläsionen mit dem kardiovaskulären Risikofaktor voranschreitendes Patientenalter assoziiert [133]. Es gibt weitere Hinweise, dass die alterungsbedingte chronische Abnahme der proteasomalen Aktivität nicht nur zur Anhäufung oxidativ modifizierter, sondern auch falsch gefalteter Proteine führen kann (zur Übersicht [134]).

Zusammengefasst unterstützen die genannten Studien von *Marfella et al.*, *Herrmann et al.* und *Versari et al.* die Bedeutung des Ubiquitin-Proteasom-Systems in den späten Phasen der Atherosklerose [130-132]. In Anwesenheit eines funktionierenden Ubiquitin-Proteasom-Systems scheint ein funktionierendes Ubiquitin-Proteasom-System eine schützende, d.h. antiatherogene, Funktion gegenüber Komplikationen der Atherosklerose auszuüben, indem das Ubiquitin-Proteasom-System oxidative und beschädigte Proteine abbaut. Vermehrte Ubiquitin-Konjugate stellten sich sowohl in der frühen als auch in der späten Phase der Atherosklerose dar. Allerdings erscheinen vermehrte Ubiquitin-Konjugate sowohl bei erhaltener Proteasomaktivität und vermehrten Anfall abzubauenender Proteine, als auch bei eingeschränkter Proteasomaktivität vorstellbar zu sein. Daten, die die Proteasomaktivität und Ubiquitin-Konjugate in atherosklerotischen Läsionen verschiedener Phasen der Atherosklerose parallel darstellen, stehen weitestgehend aus. Ob eine Über- oder Unteraktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems zur Progression der Atherogenese letztendlich beiträgt, kann demnach noch nicht eindeutig beantwortet werden [135].



Ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischer Immunantwort scheint bei der Entstehung der Atherosklerose kennzeichnend zu sein (zur Übersicht [136]). Viele Studien zeigten in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen der *Arteria carotis interna* vermehrten oxidativen Stress, vermehrte NFκB-Expression und wahrscheinlich auch NFκB-Aktivität, vermehrt Entzündungszellen und nekrotische Areale sowie weniger Kollagengehalt (zur Übersicht [137]). Aspekte wie Inflammation und oxidativer Stress legen nahe, dass das Immunoproteasom im engeren Sinne von Bedeutung ist. *Yang et al.* sensibilisierten isolierte humane Plaqueszellen aus *Thrombendarteriektomie*-Material der *Arteria carotis interna* mit IFN-γ und zeigten das Immunoproteasom als denkbare Verbindung zwischen Inflammation und Apoptose in Plaqueszellen [138].

Abseits des Krankheitsbildes der Atherosklerose sind Befunde zur vermehrten Expression des Immunoproteasoms bei anderen Erkrankungen, wie z.B. *Chorea Huntington* [114], *Morbus Alzheimer* [115] und *Sjögren-Syndrom* [97,116] vorhanden. Da einzelne Aspekte der Pathogenese der Atherosklerose, wie Inflammation und oxidativer Stress, auch in diesen Erkrankungen vorkommen, sind daher Rückschlüsse auf die Atherosklerose in begrenztem Umfang möglich.

Vergleichbar mit den genannten neurodegenerativen Erkrankungen finden sich interessanterweise mit der Progression der Atherosklerose signifikante amyloidogene Ablagerungen in den Arterienwänden vor allem in der *Intima* neben atherosklerotischen Plaques und im nekrotischen Kern [139,140]. Aufgrund dieser Erkenntnisse vergleichen *Herrmann et al.* die Atherosklerose mit Aspekten einer ‚*protein quality disease*‘ (zur Übersicht [141]).

Durch eine eingeschränkte proteolytische Aktivität scheint es zur Entwicklung von irreversiblen neurodegenerativen Erkrankungen zu kommen. Zum Beispiel bei der autosomal-dominanten neurodegenerativen Erkrankung *Chorea Huntington* zeigten immunhistochemische Analysen aus Gehirnen erkrankter Patienten sowie HD94-Mäusen vs. der Kontrollgruppen für LMP7 und LMP2 eine potentielle Rolle bei der Pathogenese der *Chorea Huntington*, da LMP7 und LMP2 in den neurodegenerativ veränderten Neuronen vermehrt nachweisbar waren [114]. Die Konzentrationszunahme des Immunoproteasoms im Gehirn könnte die permanente Inflammation und den oxidativen Stress widerspiegeln (zur Übersicht [142]). Wahrscheinlich ist eine insuffiziente Proteindegradierung bei der Entstehung der *Chorea Huntington* verantwortlich. Durch das Ubiquitin-Proteasom-System wird scheinbar das mutierte Protein des *Huntington-*

Gens (*Huntingtin*) mit Ubiquitin markiert, aber offensichtlich ist *Huntingtin* gegen den Abbau resistent und führt aufgrund der insuffizienten Proteindegradierung zu amyloidogenen Ablagerungen, sogenannten Einschlusskörperchen [143]. Amyloidogene Proteine sind auch für eine endotheliale Dysfunktion bei der zerebralen Amyloid-Angiopathie des *Morbus Alzheimers* mitverantwortlich (zur Übersicht [144]).

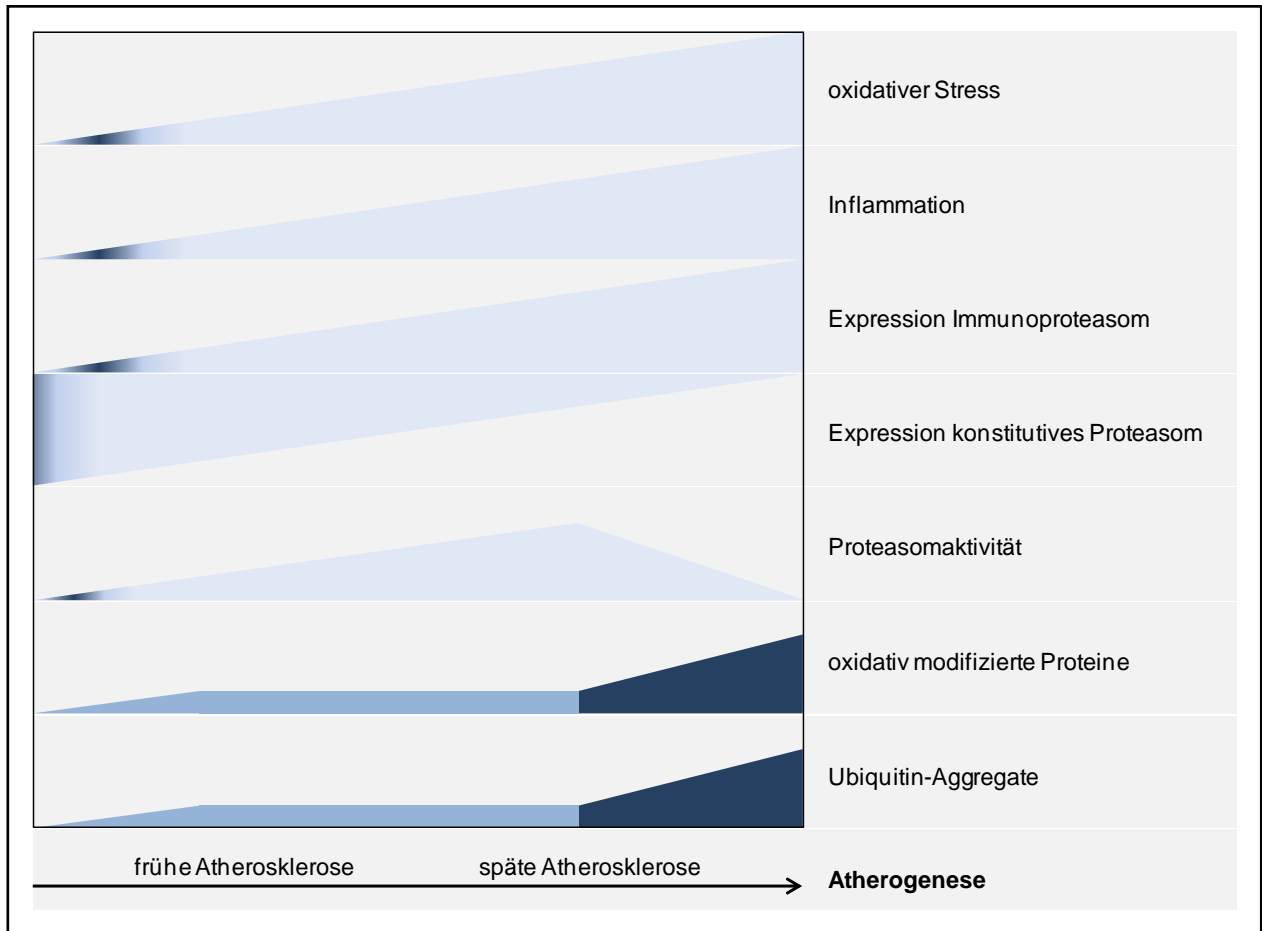
Oxidativer Stress führt zu vermehrter Expression von Chaperonen, speziell der Hitzeschockproteine (HSP), welche eng mit der Atherosklerose assoziiert sind. Insbesondere HSP-60 in atherosklerotischen Carotisbifurkationen immunhistochemisch nachgewiesen, korrelierte mit dem Schweregrad der Atherosklerose und ließ sich vor allem in der Schulterregion und um den nekrotischen Kern atherosklerotischer Plaques nachweisen [145]. Da proinflammatorische Reaktionen auf die körpereigenen Antigene HSP-60 und LDL belegbar sind, kann die Atherosklerose teilweise mit Aspekten einer Autoimmunerkrankung verglichen werden (zur Übersicht [146]). Zu weiteren Aspekten zählen nachgewiesene Leukozyteninfiltrate und autoreaktive T-Lymphozyten sowie die Leukozyten-vermittelte Zellschädigung [147]. LMP7 wurde auch bei der Autoimmunerkrankung *Sjögren-Syndrom* nachgewiesen. Immunhistochemische Untersuchungen mit Speicheldrüsen von Patienten mit einem *Sjögren-Syndrom* zeigten eine LMP7-Hochregulation [97,116]. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse von *Zhen et al.* im Unterschied zu LMP7 keine Hochregulation für LMP2 auf, weshalb die Autoren verschiedene genetische Regulationsmechanismen für LMP7 und LMP2 annehmen [116]. Ob diese Aussage entsprechend auf das Krankheitsbild der Atherosklerose zutrifft, müssen weitere Untersuchungen an atherosklerotischen Plaques prüfen.

Der Expressionsnachweis der immunoproteasomalen Untereinheit LMP7 in der vorliegenden Studie lässt stellvertretend für das Immunoproteasom eine Rolle des Immunoproteasom in der Atherosklerose vermuten. Die Expression des Immunoproteasom nimmt im Verlauf der Progression der Atherosklerose zu. Die Aktivität des konstitutiven Proteasoms nimmt nach aktuellem Stand der Wissenschaft jedoch ab. Das Immunoproteasom wird von *Seifert et al.* mit der Proteinhomeostase zum Schutz der Zellen in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass das Immunoproteasom in humanen und murinen Zellkulturen (B8 Zellen) unter IFN- $\gamma$ -induzierten oxidativen Stress rasch anfallende, oxidativ modifizierte Proteine und DRIPs degradierte [72]. Oxidativer Stress, oxidativ modifizierte Proteine und Inflammation sind zentrale Elemente bei der Entstehung der Atherosklerose. Hierbei nimmt das Zytokin IFN- $\gamma$

durch seinen proatherogenen Einfluss zusätzlich eine bedeutende Rolle bei der Progression der Atherosklerose ein (siehe **Kapitel 1.2.6**).

Unterstützt durch die genannten Befunde und den vorliegenden Studienergebnissen kann spekuliert werden, dass das Immunoproteasom anfallende, oxidativ modifizierte Proteine im Vergleich zum konstitutiven Proteasom rascher abbaut, eine Dysfunktion des konstitutiven Proteasoms gar zeitweise kompensieren könnte. Demzufolge könnte dem Immunoproteasom eine besondere Rolle im Rahmen der Atherosklerose zukommen.

Abschließend kann das folgende Gesamtbild vorgeschlagen werden. Die **Abbildung 25** fasst die einzelnen Größen des Ubiquitin-Proteasom-Systems im Verlauf der Atherogenese graphisch zusammen. Im Verlauf der Atherogenese nehmen der oxidative Stress, die Inflammation und die Expression des Immunoproteasoms stetig zu. Im Gegensatz dazu nimmt die Expression des konstitutiven Proteasoms kontinuierlich ab. Das konstitutive Proteasom verändert seine Wirkungsintensität in den unterschiedlichen Stadien der Atherogenese. Während anfänglich seine Aktivität steigt, kommt es im späten Stadium der Atherogenese zu einem Aktivitätsverlust. Parallel dazu steigt die Anzahl der oxidativ modifizierten Proteine und Ubiquitin-Aggregate, welche bis auf eine kurze Initiierungsphase in ihrer Häufigkeit bis dahin konstant verlaufen.



**Abbildung 25:** Vereinfachte schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems im Verlauf der Atherosklerose

## 5.6 LMP7-Expression in fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen korreliert mit kardiovaskulären Risikofaktoren

Kardiovaskuläre Risikofaktoren haben wie in **Kapitel 1.1.2** beschrieben einen wichtigen proatherogenen Einfluss. In der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl der fünf evaluierten kardiovaskulären Risikofaktoren (Adipositas, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen) mit der Expression von LMP7 analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die LMP7-Expression positiv mit der Progression der atherosklerotischen Läsionen und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren korreliert.

Der Einfluss einzelner kardiovaskulärer Risikofaktoren wurde in Hinblick auf das Immunproteasom oder das Ubiquitin-Proteasom-System bisher wenig untersucht. So zeigten *Zu et al.*, dass LMP7 und die entsprechende *chymotrypsin-like* Aktivität durch Hyperglykämien in Glucose-perfundierten Herzen *Streptozocin*-induzierter diabetischer Mäuse erhöht exprimiert wurde. Die Autoren schlussfolgern, dass ein erhöhtes Glucoseangebot die immunproteasomalen Untereinheiten regulieren und die Proteasomaktivität modifizieren kann [148]. Darüber hinaus demonstrierten *Xu et al. in vitro* mit humanen Endothelzellen (HUVEC), dass diabetische Hyperglykämien das 26S Proteasom über *Peroxyinitrit* aktivieren kann [149]. In der vorliegenden Studie war Adipositas mit 64 % einer der am häufigsten vorkommenden kardiovaskulären Risikofaktoren. Humane Blutanalysen von *Sakamoto et al.* zeigten, dass die *chymotrypsin-like* Proteasom-Aktivität im Plasma mit dem BMI positiv korreliert und legten dadurch nahe, dass das Proteasom ein wichtiger kontrollierender Faktor bei der Entstehung der Adipositas ist. Das in den Adipozyten produzierte TNF- $\alpha$ , welches über das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert wird, ist hierbei für die Apoptose und für die Insulin-Resistenz im Rahmen der Adipositas mitverantwortlich [150]. Plasma-Ubiquitin und 20S Proteasom im Blut werden von *Chang et al.* als potentielle Biomarker zur Adipositas-Risikobewertung vorgeschlagen [151].

Beim Auftreten mehrerer kardiovaskulärer Risikofaktoren potenziert sich das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [13] unabhängig von Alter und Rasse des Individuums [152]. Steigender oxidativer Stress und inflammatorische Prozesse durch kardiovaskuläre Risikofaktoren begünstigen die endotheliale Dysfunktion [26] und tragen folglich zur Entstehung und Progression der Atherosklerose bei. Es kann bezüglich der vorliegenden und genannten Studienergebnisse vermutet werden, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren neben steigendem oxidativen Stress auch zur vermehrten Expression des Immunproteasoms beitragen können.

## 5.7 Limitationen der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Expression von LMP7 in atherosklerotischen Läsionen und sollte herausfinden, ob und in welchem Zusammenhang das Immunoproteasom eine Rolle bei der Progression der Atherosklerose spielt. Um die LMP7-Expression in Abhängigkeit von der Plaquemorphologie und der entsprechenden Phase der Atherogenese zu untersuchen, wurden schwer atherosklerotisch, teilweise rupturierte veränderte Gefäßabschnitte (fortgeschrittene Läsionen) mit Abschnitten aus dem Randbereich der Plaque (anfängliche Läsionen) verglichen, welche morphologische Kriterien der frühen Atherosklerose aufweisen (siehe **Kapitel 3.4**).

Bei dem untersuchten Material handelt es sich um Material erkrankter Patienten, die eine hochgradige Stenose der *Arteria carotis interna* aufwiesen. Es muss daher berücksichtigt werden, dass es sich beim Vergleich der anfänglichen mit den fortgeschrittenen Läsionen um einen Vergleich morphologisch unterschiedlicher Bereiche eines Gefäßpräparates handelt. Eine gesunde Kontrollgruppe war nicht verfügbar. Die Aussagekraft auf die Abhängigkeit von Plaquemorphologie und der entsprechenden Phase der Atherogenese ist demzufolge limitierter. Auch zukünftig ist es ethisch kaum vertretbar Kontrollmaterial von gesunden Patienten zu erhalten. In Folgestudien könnten Arterien als gesundes Vergleichsmaterial im Rahmen von Operationen gewonnen werden. Hierfür würde sich die *Arteria mammaria interna* eignen, die eine relative Resistenz gegenüber der Atherosklerose besitzt und weil das distale Gefäßende im Rahmen der koronaren Bypasschirurgie normalerweise verworfen wird [153]. Alternativ könnte auf Autopsiegewebe zurückgegriffen werden.

In welchen Zellen LMP7 im vorliegenden Material exprimiert wird, kann vorerst aufgrund makroskopischer Kriterien nur angenommen werden. Die immunhistochemische LMP7-Expression gleicht durch die granulär-zytoplasmatische Rotfärbung morphologisch Makrophagen (siehe **Abbildung 12** und **Abbildung 15 a**). Um in den vorliegenden atherosklerotischen Plaques die LMP7-Expression in Makrophagen belegen zu können, könnten zukünftige Doppelfärbungen mit LMP7 und Makrophagenmarkern (z.B. CD68) Auskunft geben.

Neben den genannten Aspekten bezüglich der Präparate, weist die vorliegende Studie auch eine methodische Limitation auf. Im Unterschied zur Auswertung der CD8-positiven T-Lymphozyten

erfolgte die Analyse der LMP-Expression semiautomatisch mit Hilfe eines digitalen Softwareprogrammes und Definierung einer Farbfrequenzmaske (siehe **Kapitel 3.5.10**). Die Auswertung der CD8-positiven T-Lymphozyten erfolgte nach morphologischen Kriterien durch eine manuelle Mehrfachzählung (siehe **Kapitel 3.5.9**). Bei der manuellen Auswertungsmethode besteht das inhärente Risiko der Intraobserver-Variabilität. Damit unterliegen die Ergebnisse der Auswertung der CD8-positiven T-Lymphozyten einem größeren Risiko der Datenungenauigkeit im Vergleich zur semiautomatischen LMP7-Expressionsauswertung.

### **5.8 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblicke**

Oxidativer Stress und Inflammation sind zentrale Elemente der Atherosklerose. Eine pathophysiologische Rolle des Proteasoms in der Atherosklerose konnte durch einige Studien in den letzten Jahrzehnten bereits angenommen werden (zur Übersicht [137]). Durch den Nachweis der immunoproteasomalen Untereinheit LMP7 sowie durch die Expressionszunahme in den späten Stadien der Atherosklerose lässt die vorliegende Studie eine Rolle des Immunoproteasoms in der Atherosklerose vermuten.

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen kann ein positiver Einfluss von kardiovaskulären Risikofaktoren auf die Expression des Immunoproteasoms vermutet werden. Angesichts zunehmender LMP7-Expression in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose ist es vorstellbar, dass LMP7 als immunhistochemischer Marker für schwere, potentiell rupturgefährdete atherosklerotische Läsionen eine Zukunft hat. Zur Identifikation vulnerabler Plaques haben sich derzeit apparative Methoden etabliert, wie z.B. die Dopplersonographie oder die digitale Subtraktionsangiographie, welche in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung des Stenosegrades angewandt wurden. Ebenfalls gut geeignet ist die kernspintomographische Untersuchung zur detaillierten Darstellung [154]. Die Identifizierung vulnerabler Plaques ist essentiell, um die individuelle Mortalität und Morbidität eines Patienten einzustufen zu können und folglich notwendige Therapiestrategien zu planen.

Diese Arbeit hat eine LMP7-Expression nachgewiesen, kann aber nicht zwischen Aktivität, Insuffizienz oder Funktionsverlust des Immunoproteasoms unterscheiden. Ergänzend zu den vorliegenden Expressionsdaten könnte eine Expressionsanalyse in Kombination mit einer

Aktivitätsanalyse des Proteasoms sich der Frage nach der potentiellen Über- oder Unteraktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems im Rahmen der Progression der Atherosklerose nähern. Der Nachweis von Ubiquitin/Ubiquitin-Konjugaten sowie der zwei anderen immunoproteasomalen Untereinheiten (LMP2 und MECL1) über die Expression des Immunoproteasoms in atherosklerotischen Läsionen könnten weitere Aufschlüsse geben.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass das Immunoproteasom in der Atherosklerose keine spezifische Rolle bei der Produktion von MHC-Klasse-I-Antigenen besitzt, sondern vielmehr eine Rolle im Rahmen von inflammatorischen Prozessen und oxidativen Stress hat. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Immunoproteasom im Verlauf der Atherosklerose kompensatorisch auf die Bewältigung der vermehrt anfallenden oxidativen Proteine reagiert (siehe **Kapitel 5.5** und **Abbildung 25**).

Weiterführende Untersuchungen in Hinblick auf zugrundeliegende Mechanismen erscheinen sinnvoll. Strategien, die zu einer Verminderung inflammatorischer Reaktionen oder Reduktion des oxidativen Stresses führen, können multikausale Therapieansätze für die Atherosklerose und den resultierenden kardiovaskulären Erkrankungen bieten. Das Immunoproteasom könnte hierbei ein vielversprechender Ansatzpunkt sein [155].



## 6 Zusammenfassung

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist der zentrale Abbauweg für intrazelluläre Proteine und ist an der Regulierung komplexer Zellvorgänge beteiligt. Die Atherosklerose ist eine chronische inflammatorische Erkrankung und gehört infolge der resultierenden kardiovaskulären Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Eine Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems für die Progression der Atherosklerose wird angenommen. Gänzlich unklar ist, ob und in welchem Zusammenhang das Immunoproteasom in der Atherosklerose vorkommt. Es gibt Hinweise, dass das Immunoproteasom bei der MHC-Klasse-I vermittelten Antigenprozessierung involviert ist.

Die vorliegende Arbeit sollte untersuchen, ob das Immunoproteasom in der Atherosklerose nachweisbar ist, stadienabhängig exprimiert wird und ob Hinweise für eine MHC-Klasse-I vermittelte Antigenprozessierung in der Atherogenese existieren. Dafür wurden 47 humane *Thrombendarteriektomie*-Präparaten der *Arteria carotis interna* analysiert. Die Präparate wurden nach morphologischen Kriterien der frühen und späten Stadien der Atherosklerose in anfängliche und fortgeschrittene Läsionen klassifiziert. Die immunoproteasomale Untereinheit LMP7 und CD8-positive T-Lymphozyten wurden immunhistochemisch dargestellt.

Erstmals wurde die Expression der immunoproteasomalen Untereinheit LMP7 in atherosklerotischen Plaques immunhistochemisch nachgewiesen. Die Daten zeigen eine vermehrte LMP7-Expression in fortgeschrittenen Läsionen. Es zeigte sich keine Korrelation mit dem Auftreten CD8-positiver T-Lymphozyten in den verschiedenen Stadien der Atherosklerose.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird eine Rolle des Immunoproteasoms in der Atherogenese angenommen. Das Immunoproteasom scheint jedoch in der Atherogenese weniger eine Rolle im Rahmen der MHC-Klasse-I vermittelten Antigenprozessierung zu besitzen. Möglicherweise beeinflusst das Immunoproteasom inflammatorische Prozesse und die Bewältigung des zellulären oxidativen Stresses.

### **Schlüsselwörter:**

Atherosklerose, Immunoproteasom, LMP7, Ubiquitin-Proteasom-System, MHC-Klasse-I, CD8

## **Abstract**

The ubiquitin-proteasome-system is associated with the process of degradation of intercellular proteins as well as with the regulation of complex cell processes. Atherosclerosis is a chronically inflammatory disease. In Germany, the majority of deaths are caused by cardiovascular diseases which may be triggered by atherosclerosis. A significant role of the ubiquitin-proteasome-system is assumed in the progression of atherosclerosis. In contrast, the effects of the immunoproteasome in the process of atherosclerosis are still unspecified. There are indications of the involvement of immunoproteasome in MHC-class-I antigen processing.

This study focused on the general detection of the immunoproteasome in atherosclerosis and on the analysis of the existence of immunoproteasome in different stages of atherosclerosis. Furthermore, the analysis of the existence of an interrelation between MHC-class-I antigen processing and atherosclerosis is included. The data were obtained from 47 human thromboendarterectomy specimens of the arteria carotis interna. The lesions were classified by morphological criteria to differentiate initial and advanced stages of atherosclerosis. The immunoproteasomal subunit LMP7 and CD8 t-cells were immunohistochemically stained.

This study is the first of its kind where the expression of the immunoproteasomal subunit LMP7 was immunohistochemically demonstrated in atherosclerotic plaques. In advanced lesions, increased expression of LMP7 was discovered when comparing to initial stages of atherosclerosis. A correlation between CD8 t-cells and LMP7 could neither be perceived in the initial nor in the advanced stage of atherosclerosis.

The results of this study suggest an involvement of immunoproteasome in atherogenesis. However, the data does not support the hypothesis that immunoproteasome plays a role in the MHC-class-I antigen processing. It can be deliberated whether immunoproteasome affects inflammatory processes and the handling of cellular oxidativ stress instead.

### **Keywords:**

atherosclerosis; immunoproteasome; LMP7; ubiquitin-proteasome-system; MHC-class-I; CD8

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] World Health Organization. The world health report 1997: conquering suffering, enriching humanity. Genf: World Health Organization, 1997: 2.
- [2] Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt, 2011.
- [3] Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 2002;8:1257-62.
- [4] Hatano S. Experience from a multicentre stroke register: a preliminary report. *Bull World Health Organ* 1976;54:541-53.
- [5] Herold G, et al. *Innere Medizin - Eine vorlesungsorientierte Darstellung*. Köln: Gerd Herold, 2012.
- [6] North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 1991;325:445-53.
- [7] Kusama Y, Kodani E, Nakagomi A, et al. Variant angina and coronary artery spasm: the clinical spectrum, pathophysiology, and management. *J Nippon Med Sch* 2011;78:4-12.
- [8] Fontaine R, Kim M, Kieny R. Die chirurgische Behandlung der peripheren Durchblutungsstörungen. *Helv Chir Acta* 1954;21:499-533.
- [9] Kannel WB, Feinleib M, McNamara PM, et al. An investigation of coronary heart disease in families. The Framingham offspring study. *Am J Epidemiol* 1979;110:281-90.
- [10] Wilson PW. Established risk factors and coronary artery disease: the Framingham Study. *Am J Hypertens* 1994;7:7S-12S.
- [11] American Heart Association. *Heart Disease and Stroke Statistics - 2008 Update*. Dallas, USA: American Heart Association, 2008.
- [12] Assmann G, Schulte H, von EA, et al. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996;124 Suppl:S11-S20.
- [13] Braesen JH, Niendorf A. Atherosclerosis. Formal pathogenesis, classification and functional significance. *Pathologe* 1997;18:218-27.

- [14] Mancia G, De BG, Dominiczak A, et al. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2007;25:1105-87.
- [15] diabetesDE. Deutscher Gesundheitsbericht - Diabetes 2011. Mainz: Kirchheim Verlag, 2011: 8.
- [16] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004;27 Suppl 1:S5-S10.
- [17] Nesto RW. Correlation between cardiovascular disease and diabetes mellitus: current concepts. *Am J Med* 2004;116 Suppl 5A:11S-22S.
- [18] Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-9.
- [19] Eaton CB, Bostom AG, Yanek L, et al. Family history and premature coronary heart disease. *J Am Board Fam Pract* 1996;9:312-8.
- [20] Ortlepp JR, Lauscher J, Janssens U, et al. Analysis of several hundred genetic polymorphisms may improve assessment of the individual genetic burden for coronary artery disease. *Eur J Intern Med* 2002;13:485-92.
- [21] Wagner A, Schunkert H, Erdmann J. Genetik des Herzinfarktes. Der lange Weg von der positiven Familienanamnese zum Gen. *Chemie in unserer Zeit* 2009;43:288-95.
- [22] Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000;407:233-41.
- [23] Virchow R. Phlogose und Thrombose im Gefäßsystem. Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin. Frankfurt: Meidinger Sohn und Co., 1856.
- [24] Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977;86:675-84.
- [25] Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
- [26] Thomas SR, Chen K, Keaney JF, Jr. Oxidative stress and endothelial nitric oxide bioactivity. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:181-94.
- [27] Schachinger V, Zeiher AM. Atherogenesis - recent insights into basic mechanisms and their clinical impact. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:2055-64.
- [28] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
- [29] Shashkin P, Dragulev B, Ley K. Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des* 2005;11:3061-72.

- [30] Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006;6:508-19.
- [31] Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002;82:373-428.
- [32] Hochstrasser M, Johnson PR, Arendt CS, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-proteasome system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999;354:1513-22.
- [33] Tanahashi N, Murakami Y, Minami Y, et al. Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 2000;275:14336-45.
- [34] Huber EM, Groll M. The 19S Cap Puzzle: A New Jigsaw Piece. *Structure* 2012;20:387-8.
- [35] Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:179-87.
- [36] Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* 2000;345 Pt 1:1-15.
- [37] Stohwasser R, Salzmann U, Giesebrecht J, et al. Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. *Eur J Biochem* 2000;267:6221-30.
- [38] Groll M, Ditzel L, Lowe J, et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 1997;386:463-71.
- [39] Orłowski M, Wilk S. Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* 2000;383:1-16.
- [40] Orłowski M, Cardozo C, Michaud C. Evidence for the presence of five distinct proteolytic components in the pituitary multicatalytic proteinase complex. Properties of two components cleaving bonds on the carboxyl side of branched chain and small neutral amino acids. *Biochemistry* 1993;32:1563-72.
- [41] Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801-47.
- [42] Herrmann J, Ciechanover A, Lerman LO, et al. The ubiquitin-proteasome system in cardiovascular diseases-a hypothesis extended. *Cardiovasc Res* 2004;61:11-21.
- [43] Rock KL, Gramm C, Rothstein L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994;78:761-71.
- [44] Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 2001;8:739-58.

- [45] Strehl B, Seifert U, Kruger E, et al. Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev* 2005;207:19-30.
- [46] Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:112-21.
- [47] Naujokat C, Fuchs D, Berges C. Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773:1389-97.
- [48] Fuchs SY. The role of ubiquitin-proteasome pathway in oncogenic signaling. *Cancer Biol Ther* 2002;1:337-41.
- [49] Fan CM, Maniatis T. Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway. *Nature* 1991;354:395-8.
- [50] Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996;97:1715-22.
- [51] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999;18:6853-66.
- [52] Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-83.
- [53] Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, et al. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994;78:773-85.
- [54] Read MA, Neish AS, Luscinskas FW, et al. The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity* 1995;2:493-506.
- [55] Brand K, Eisele T, Kreusel U, et al. Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1901-9.
- [56] Parry GC, Martin T, Felts KA, et al. IL-1beta-induced monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in endothelial cells is blocked by proteasome inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:934-40.
- [57] Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med* 2005;26:33-65.
- [58] Stangl V, Lorenz M, Meiners S, et al. Long-term up-regulation of eNOS and improvement of endothelial function by inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. *FASEB J* 2004;18:272-9.

- [59] Kikuchi J, Furukawa Y, Kubo N, et al. Induction of ubiquitin-conjugating enzyme by aggregated low density lipoprotein in human macrophages and its implications for atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:128-34.
- [60] Thyberg J, Blomgren K. Effects of proteasome and calpain inhibitors on the structural reorganization and proliferation of vascular smooth muscle cells in primary culture. *Lab Invest* 1999;79:1077-88.
- [61] Higashikata T, Yamagishi M, Higashi T, et al. Altered expression balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human carotid plaque disruption: results of quantitative tissue analysis using real-time RT-PCR method. *Atherosclerosis* 2006;185:165-72.
- [62] Meiners S, Hocher B, Weller A, et al. Downregulation of matrix metalloproteinases and collagens and suppression of cardiac fibrosis by inhibition of the proteasome. *Hypertension* 2004;44:471-7.
- [63] Aki M, Shimbara N, Takashina M, et al. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. *J Biochem* 1994;115:257-69.
- [64] Kloetzel PM. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 2004;5:661-9.
- [65] Tanaka K. Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *J Leukoc Biol* 1994;56:571-5.
- [66] Brooks P, Murray RZ, Mason GG, et al. Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2000;352 Pt 3:611-5.
- [67] Cruz M, Elenich LA, Smolarek TA, et al. DNA sequence, chromosomal localization, and tissue expression of the mouse proteasome subunit Imp10 (Psm10) gene. *Genomics* 1997;45:618-22.
- [68] Kramer M. *Immunologie und Immunpathologie*. 1 ed. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, 1997.
- [69] Löffler G, Petrides P., Heinrich P. *Immunsystem. Biochemie und Pathobiochemie* Berlin: Springer, 2007: 1103-40.
- [70] Leon ML, Zuckerman SH. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res* 2005;54:395-411.
- [71] Shin EC, Seifert U, Kato T, et al. Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. *J Clin Invest* 2006;116:3006-14.
- [72] Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, et al. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 2010;142:613-24.

- [73] Blumberg RS. Current concepts in mucosal immunity. II. One size fits all: nonclassical MHC molecules fulfill multiple roles in epithelial cell function. *Am J Physiol* 1998;274:G227-G231.
- [74] Keller R. *Immunologie und Immunpathologie*. 4 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1994.
- [75] Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 1999;17:739-79.
- [76] Kloetzel PM, Ossendorp F. Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2004;16:76-81.
- [77] Schubert U, Anton LC, Gibbs J, et al. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000;404:770-4.
- [78] Yewdell JW, Schubert U, Bennink JR. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J Cell Sci* 2001;114:845-51.
- [79] York IA, Rock KL. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1996;14:369-96.
- [80] Fruci D, Lauvau G, Saveanu L, et al. Quantifying recruitment of cytosolic peptides for HLA class I presentation: impact of TAP transport. *J Immunol* 2003;170:2977-84.
- [81] Yewdell JW, Bennink JR. Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol* 2001;13:13-8.
- [82] Wick G, Romen M, Amberger A, et al. Atherosclerosis, autoimmunity, and vascular-associated lymphoid tissue. *FASEB J* 1997;11:1199-207.
- [83] Shortman K, Heath WR. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol Rev* 2010;234:18-31.
- [84] Libby P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 2000;247:349-58.
- [85] Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* 2008;79:360-76.
- [86] Gupta S, Pablo AM, Jiang X, et al. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest* 1997;99:2752-61.
- [87] Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1876-90.
- [88] Kunte H. *Der Einfluss von Statinen auf das Ausmaß der Makrophageninfiltration und die MMP-9-Expression in humanen arteriosklerotischen Plaques in der Arteria carotis interna.*: Humboldt Universität Berlin, 2007: 16-27.



- [89] De Bakey ME, Crawford ES, Cooley D.A., et al. Surgical considerations of occlusive disease of innominate, carotid, subclavian, and vertebral arteries. *Ann Surg* 1959;149:690-710.
- [90] Mehta M, Rahmani O, Dietzek AM, et al. Eversion technique increases the risk for post-carotid endarterectomy hypertension. *J Vasc Surg* 2001;34:839-45.
- [91] Boenisch T. *Immunhistochemische Färbungen*. 3 ed. Hamburg: Dako Cytomation GmbH, 2003.
- [92] Fisher CJ, Gillett CE, Vojtesek B, et al. Problems with p53 immunohistochemical staining: the effect of fixation and variation in the methods of evaluation. *Br J Cancer* 1994;69:26-31.
- [93] Noll S., Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. 1 ed. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 2000.
- [94] Romeis B. *Mikroskopische Technik*. 17 ed. Wien: Urban & Schwarzenberg, 1989.
- [95] Lovett JK, Gallagher PJ, Hands LJ, et al. Histological correlates of carotid plaque surface morphology on lumen contrast imaging. *Circulation* 2004;110:2190-7.
- [96] Redgrave JN, Lovett JK, Gallagher PJ, et al. Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms: the Oxford plaque study. *Circulation* 2006;113:2320-8.
- [97] Egerer T, Martinez-Gamboa L, Dankof A, et al. Tissue-specific up-regulation of the proteasome subunit beta5i (LMP7) in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2006;54:1501-8.
- [98] Atik B, Johnston SC, Dean D. Association of carotid plaque Lp-PLA(2) with macrophages and Chlamydia pneumoniae infection among patients at risk for stroke. *PLoS One* 2010;5:e11026.
- [99] Businaro R, Digregorio M, Rigano R, et al. Morphological analysis of cell subpopulations within carotid atherosclerotic plaques. *Ital J Anat Embryol* 2005;110:109-15.
- [100] Gotsman I, Sharpe AH, Lichtman AH. T-cell costimulation and coinhibition in atherosclerosis. *Circ Res* 2008;103:1220-31.
- [101] Ketelhuth DF, Hansson GK. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: Break of tolerance in the artery wall. *Thromb Haemost* 2011;106.
- [102] Elhage R, Gourdy P, Brouchet L, et al. Deleting TCR alpha beta+ or CD4+ T lymphocytes leads to opposite effects on site-specific atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol* 2004;165:2013-8.
- [103] Ohashi R, Mu H, Yao Q, et al. Atherosclerosis: immunopathogenesis and immunotherapy. *Med Sci Monit* 2004;10:RA255-RA260.

- [104] Ludewig B, Freigang S, Jaggi M, et al. Linking immune-mediated arterial inflammation and cholesterol-induced atherosclerosis in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12752-7.
- [105] Hsich E, Zhou YF, Paigen B, et al. Cytomegalovirus infection increases development of atherosclerosis in Apolipoprotein-E knockout mice. *Atherosclerosis* 2001;156:23-8.
- [106] Vliegen I, Herengreen SB, Grauls GE, et al. Mouse cytomegalovirus antigenic immune stimulation is sufficient to aggravate atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Atherosclerosis* 2005;181:39-44.
- [107] Weyand CM, Younge BR, Goronzy JJ. T cells in arteritis and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2008;19:469-77.
- [108] Olofsson PS, Soderstrom LA, Wagsater D, et al. CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 2008;117:1292-301.
- [109] Gotsman I, Grabie N, Dacosta R, et al. Proatherogenic immune responses are regulated by the PD-1/PD-L pathway in mice. *J Clin Invest* 2007;117:2974-82.
- [110] Kolbus D, Ramos OH, Berg KE, et al. CD8+ T cell activation predominate early immune responses to hypercholesterolemia in Apoe(/) mice. *BMC Immunol* 2010;11:58.
- [111] Marfella R, Cacciapuoti F, Grassia A, et al. Role of the ubiquitin-proteasome system in carotid plaque instability in diabetic patients. *Acta Cardiol* 2006;61:630-6.
- [112] Dworacka M, Winiarska H, Borowska M, et al. Pro-atherogenic alterations in T-lymphocyte subpopulations related to acute hyperglycaemia in type 2 diabetic patients. *Circ J* 2007;71:962-7.
- [113] Han SN, Jeon KJ, Kim MS, et al. Obesity with a body mass index under 30 does not significantly impair the immune response in young adults. *Nutr Res* 2011;31:362-9.
- [114] Diaz-Hernandez M, Hernandez F, Martin-Aparicio E, et al. Neuronal induction of the immunoproteasome in Huntington's disease. *J Neurosci* 2003;23:11653-61.
- [115] Ferrer I, Boada RM, Sanchez Guerra ML, et al. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 2004;14:11-20.
- [116] Zhen L, Yu-feng L, Jin-ling C, et al. Expression of proteasome immunosubunit in labial glands of patients with primary Sjogren's syndrome. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2011;33:146-50.
- [117] Callahan MK, Wohlfert EA, Menoret A, et al. Heat shock up-regulates Imp2 and Imp7 and enhances presentation of immunoproteasome-dependent epitopes. *J Immunol* 2006;177:8393-9.

- [118] Seifert U, Bialy LP, Ebstein F, et al. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress. *Cell* 2010;142:613-24.
- [119] Sijts AJ, Standera S, Toes RE, et al. MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J Immunol* 2000;164:4500-6.
- [120] Qureshi N, Vogel SN, Van WC, III, et al. The proteasome: a central regulator of inflammation and macrophage function. *Immunol Res* 2005;31:243-60.
- [121] Kruger E, Kloetzel PM. Immunoproteasomes at the interface of innate and adaptive immune responses: two faces of one enzyme. *Curr Opin Immunol* 2012;24:77-83.
- [122] Willis MS, Townley-Tilson WH, Kang EY, et al. Sent to destroy: the ubiquitin proteasome system regulates cell signaling and protein quality control in cardiovascular development and disease. *Circ Res* 2010;106:463-78.
- [123] Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992;421:277-90.
- [124] Faries PL, Rohan DI, Wyers MC, et al. Relationship of the 20S proteasome and the proteasome activator PA28 to atherosclerosis and intimal hyperplasia in the human vascular system. *Ann Vasc Surg* 2001;15:628-33.
- [125] Breusing N, Grune T. Regulation of proteasome-mediated protein degradation during oxidative stress and aging. *Biol Chem* 2008;389:203-9.
- [126] Reinheckel T, Grune T, Davies KJ. The measurement of protein degradation in response to oxidative stress. *Methods Mol Biol* 2000;99:49-60.
- [127] Strack PR, Waxman L, Fagan JM. Activation of the multicatalytic endopeptidase by oxidants. Effects on enzyme structure. *Biochemistry* 1996;35:7142-9.
- [128] Bence NF, Sampat RM, Kopito RR. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 2001;292:1552-5.
- [129] Herrmann J, Gulati R, Napoli C, et al. Oxidative stress-related increase in ubiquitination in early coronary atherogenesis. *FASEB J* 2003;17:1730-2.
- [130] Marfella R, D'Amico M, Di FC, et al. Increased activity of the ubiquitin-proteasome system in patients with symptomatic carotid disease is associated with enhanced inflammation and may destabilize the atherosclerotic plaque: effects of rosiglitazone treatment. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:2444-55.
- [131] Herrmann J, Edwards WD, Holmes DR, Jr., et al. Increased ubiquitin immunoreactivity in unstable atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1919-27.

- [132] Versari D, Herrmann J, Gossel M, et al. Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in human carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2132-9.
- [133] Marfella R, Di FC, Laieta MT, et al. Effects of ubiquitin-proteasome system deregulation on the vascular senescence and atherosclerosis process in elderly patients. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008;63:200-3.
- [134] Farout L, Friguet B. Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:205-16.
- [135] Di FC, Marfella R, D'Amico M. Possible dual role of ubiquitin-proteasome system in the atherosclerotic plaque progression. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1350-1.
- [136] Milioti N, Bermudez-Fajardo A, Penichet ML, et al. Antigen-induced immunomodulation in the pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Dev Immunol* 2008;2008:723539.
- [137] Herrmann J, Lerman LO, Lerman A. On to the road to degradation: atherosclerosis and the proteasome. *Cardiovasc Res* 2010;85:291-302.
- [138] Yang Z, Gagarin D, St LG, III, et al. Cardiovascular inflammation and lesion cell apoptosis: a novel connection via the interferon-inducible immunoproteasome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1213-9.
- [139] Mucchiano GI, Haggqvist B, Sletten K, et al. Apolipoprotein A-1-derived amyloid in atherosclerotic plaques of the human aorta. *J Pathol* 2001;193:270-5.
- [140] Rocken C, Tautenhahn J, Buhling F, et al. Prevalence and pathology of amyloid in atherosclerotic arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:676-7.
- [141] Herrmann J, Soares SM, Lerman LO, et al. Potential role of the ubiquitin-proteasome system in atherosclerosis: aspects of a protein quality disease. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:2003-10.
- [142] Dahlmann B. Role of proteasomes in disease. *BMC Biochem* 2007;8 Suppl 1:S3.
- [143] Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, et al. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* 2001;12:1393-407.
- [144] Revesz T, Ghiso J, Lashley T, et al. Cerebral amyloid angiopathies: a pathologic, biochemical, and genetic view. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:885-98.
- [145] Kleindienst R, Xu Q, Willeit J, et al. Immunology of atherosclerosis. Demonstration of heat shock protein 60 expression and T lymphocytes bearing alpha/beta or gamma/delta receptor in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1993;142:1927-37.
- [146] Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol* 2009;27:165-97.

- [147] Biedermann BC. Arteriosclerosis - an Autoimmune Disease? Praxis (Bern 1994 ) 2003;92:1781-3.
- [148] Zu L, Bedja D, Fox-Talbot K, et al. Evidence for a role of immunoproteasomes in regulating cardiac muscle mass in diabetic mice. J Mol Cell Cardiol 2010;49:5-15.
- [149] Xu J, Wu Y, Song P, et al. Proteasome-dependent degradation of guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I causes tetrahydrobiopterin deficiency in diabetes mellitus. Circulation 2007;116:944-53.
- [150] Sakamoto K, Sato Y, Sei M, et al. Proteasome activity correlates with male BMI and contributes to the differentiation of adipocyte in hADSC. Endocrine 2010;37:274-9.
- [151] Chang TL, Chang CJ, Lee WY, et al. The roles of ubiquitin and 26S proteasome in human obesity. Metabolism 2009;58:1643-8.
- [152] Berry JD, Dyer A, Cai X, et al. Lifetime risks of cardiovascular disease. N Engl J Med 2012;366:321-9.
- [153] Gansera B, Rohrbach H, Gillrath G, et al. Is there a difference between diabetic and non-diabetic ITAs? Histomorphological and immunohistochemical examinations of internal thoracic arteries. Thorac Cardiovasc Surg 2004;52:255-60.
- [154] Skinner MP, Yuan C, Mitsumori L, et al. Serial magnetic resonance imaging of experimental atherosclerosis detects lesion fine structure, progression and complications in vivo. Nat Med 1995;1:69-73.
- [155] Kuhn DJ, Hunsucker SA, Chen Q, et al. Targeted inhibition of the immunoproteasome is a potent strategy against models of multiple myeloma that overcomes resistance to conventional drugs and nonspecific proteasome inhibitors. Blood 2009;113:4667-76.

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Zelluläre Anordnung eines atherosklerotischen Plaques mit Plaqueruptur und Thrombusbildung (modifiziert nach [30]) .....	7
<b>Abbildung 2:</b> Vereinfachte Darstellung der Ubiquitinierung von Proteasomsubstraten.....	8
<b>Abbildung 3:</b> Der Aufbau des Proteasoms (Abbildung modifiziert nach [35]).....	10
<b>Abbildung 4:</b> 20S Proteasom und Immunoproteasom (Abbildung modifiziert nach [64]).....	13
<b>Abbildung 5:</b> MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation durch das Proteasom (modifiziert nach [64]) .....	16
<b>Abbildung 6:</b> Gefäßquerschnitte eingebettet in Paraffin .....	20
<b>Abbildung 7:</b> Repräsentatives Beispiel einer anfänglichen atherosklerotischen Läsion in HE-Färbung (12,5fache Vergrößerung) .....	24
<b>Abbildung 8:</b> Repräsentatives Beispiel einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion in HE-Färbung (12,5fache Vergrößerung) .....	24
<b>Abbildung 9:</b> Graphische Kurzdarstellung der CD8-/LMP7-Immunfärbung nach der LSAB-Methode .....	26
<b>Abbildung 10:</b> CD8-Immunfärbung innerhalb einer atherosklerotischen Läsion der Arteria carotis interna nach der LSAB-HRP-Immunfärbung (40fache Vergrößerung).....	33
<b>Abbildung 11:</b> T-Lymphozyt mit einem großen, runden blaugefärbten Zellkern, wenig Zytoplasma und braungefärbter membranständiger CD8-Immunfärbung (100fache Vergrößerung, Ölimmersion).....	33
<b>Abbildung 12:</b> LMP7-positive, granulär-zytoplasmatische Rotfärbungen nach der LSAB-AP-Immunfärbung innerhalb einer atherosklerotischen Läsion (40fache Vergrößerung) .....	34
<b>Abbildung 13:</b> Analyse der LMP7-Expression während des Prozesses der Farbsegmentierung bei Definition einer schwachen Farbfrequenzmaske (Detail aus Abbildung 12) .....	35
<b>Abbildung 14:</b> Analyse der LMP7-Expression während des Prozesses der Farbsegmentierung bei Definition einer starker Farbfrequenzmaske (Detail aus Abbildung 12).....	35

<b>Abbildung 15:</b> Repräsentative Beispiele der immunhistochemischen Untersuchung CD8-positiver T-Lymphozyten (braune Färbung), a) innerhalb eines atherosklerotischen Plaques der Arteria carotis interna mit Detailausschnitt in 20/40facher Vergrößerung, b) CD8-Positivkontrolle innerhalb eines humanen Tonsillenpräparates in 40facher Vergrößerung, c) CD8-Negativkontrolle innerhalb eines humanen Tonsillenpräparates in 40facher Vergrößerung; (jeweils Paraffinschnitt) .....	37
<b>Abbildung 16:</b> Verteilung CD8-positiver T-Lymphozyten in atherosklerotischen Läsionen in Prozent .....	38
<b>Abbildung 17:</b> Verteilung und Streuung der CD8-positiven T-Lymphozyten in anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen in Prozent .....	40
<b>Abbildung 18:</b> Repräsentative Beispiele der immunhistochemischen Untersuchung der LMP7-Expression (rote Färbung), a) innerhalb eines atherosklerotischen Plaques der Arteria carotis interna mit Detailausschnitt in 20/40facher Vergrößerung, b) LMP7-Positivkontrolle innerhalb eines murinen Milzpräparates in 40facher Vergrößerung, c) LMP7-Negativkontrolle innerhalb eines murinen Milzpräparates in 40facher Vergrößerung; (jeweils Paraffinschnitt) .....	43
<b>Abbildung 19:</b> Verteilung der LMP7-Expression in atherosklerotischen Läsionen in Prozent ..	44
<b>Abbildung 20:</b> Verteilung und Streuung der LMP7-Expression in den anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen in Prozent .....	46
<b>Abbildung 21:</b> Streuung CD8-positiver T-Lymphozyten und LMP7-Expression in atherosklerotischen Läsionen in Prozent .....	49
<b>Abbildung 22:</b> Verteilung der Häufigkeit der kardiovaskulären Risikofaktoren je Patient .....	52
<b>Abbildung 23:</b> Verteilung und Streuung CD8-positiver T-Lymphozyten in Abhängigkeit der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in Prozent .....	53
<b>Abbildung 24:</b> Verteilung und Streuung der LMP7-Expression in Abhängigkeit der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in Prozent.....	57
<b>Abbildung 25:</b> Vereinfachte schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems im Verlauf der Atherosklerose .....	73

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Materialien, Reagenzien und ihre Bezugsquellen zur Herstellung der Schnittpräparate.....	21
<b>Tabelle 2:</b> Materialien, Reagenzien und ihre Bezugsquellen für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	22
<b>Tabelle 3:</b> Einteilung der Präparate in anfängliche und fortgeschrittene Läsionen nach morphologischen Kriterien (modifiziert nach [96]) .....	24
<b>Tabelle 4:</b> Materialien, Reagenzien und ihre Bezugsquellen für die CD8- und LMP7-Immunfärbungen .....	27
<b>Tabelle 5:</b> Bezugsquellen und Konzentrationen der verwendeten Primärantikörper .....	28
<b>Tabelle 6:</b> Signifikanztest nach Mann Whitney bezüglich Übereinstimmung der Anzahl CD8-positiver T-Lymphozyten in den anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen .....	41
<b>Tabelle 7:</b> Signifikanztest nach Spearman bezüglich Übereinstimmung der Anzahl CD8-positiver T-Lymphozyten in den anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen .....	42
<b>Tabelle 8:</b> Signifikanztest nach Mann Whitney bezüglich Übereinstimmung der LMP7-Expression in den anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen.....	47
<b>Tabelle 9:</b> Signifikanztest nach Spearman bezüglich Übereinstimmung der LMP7-Expression in den anfänglichen und fortgeschrittenen Läsionen.....	48
<b>Tabelle 10:</b> Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Anzahl CD8-positiver T-Lymphozyten und des Anteils der LMP7-Expression in anfänglichen Läsionen .....	50
<b>Tabelle 11:</b> Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Anzahl CD8-positiver T-Lymphozyten und des Anteils der LMP7-Expression in fortgeschrittenen Läsionen .....	51
<b>Tabelle 12:</b> Absolute und relative Häufigkeiten kardiovaskulärer Risikofaktoren.....	52
<b>Tabelle 13:</b> Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Anzahl CD8-positiver T-Lymphozyten und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in anfänglichen Läsionen.....	55



**Tabelle 14:** Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Anzahl CD8-positiver T-Lymphozyten und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in fortgeschrittenen Läsionen..... 56

**Tabelle 15:** Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der LMP7-Expression und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in anfänglichen Läsionen ..... 59

**Tabelle 16:** Signifikanztest bezüglich des Zusammenhangs zwischen der LMP7-Expression und der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren in fortgeschrittenen Läsionen ..... 60

## 10 Abkürzungsverzeichnis

<b>ADA</b>	<i>American Diabetes Association</i>
agLDL	aggregiertes <i>low density lipoprotein</i> (Lipoprotein niedriger Dichte)
AP	alkalische Phosphatase
ApoE	Apolipoprotein E
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
<b>BMI</b>	<i>Body mass index</i> (Körpermasseindex)
bzw.	beziehungsweise
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i> (zelluläre Differenzierungsantigene)
d.h.	das heißt
Code No.	<i>code number</i> (Kennnummer)
CRP	C-reaktives Protein
°C	Grad Celsius
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DRIPs	<i>defective ribosomal products</i> (defekte ribosomale Produkte)
<b>E1/E2/E3</b>	Enzym 1/Enzym 2/Enzym 3
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
ETDA	Ethylendiamintetraacetat
ESH	<i>Europäische Hypertonie Gesellschaft</i>
FCS	<i>fetal cow serum</i> (fetales Kälberserum)
<b>g</b>	Gramm
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor)
<b>HbA1c</b>	glykosyliertes Hämoglobin 1c
HD	<i>Huntington's disease</i> ( <i>Chorea Huntington</i> )

HDL	<i>high density lipoprotein</i> (Lipoprotein hoher Dichte)
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> (humanes Leukozytenantigen)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSP	Hitzeschockprotein(e)
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> (Endothelzellen aus der Nabelschnurvene)
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i> (zwischenzelluläres Anhaftungsmolekül 1)
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
I $\kappa$ B	Inhibitor <i>kappa</i> B
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
kDA	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzerkrankung
l	Liter
lacZ	$\beta$ -Galaktosidase-Gen
LDL	<i>low density lipoprotein</i> (Lipoprotein niedriger Dichte)
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i> (LDL-Rezeptor)
LMP	<i>low molecular weight protein</i> (niedermolekulares Protein)
LSAB	<i>labelled streptavidin-biotin</i> (gekennzeichnetes Streptavidin-Biotin)
m	Meter
M	molare Masse
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i> (Makrophagen-koloniestimulierender Faktor)
MECL1	<i>multicatalytic endopeptidase complex-like 1</i> (multikatalytische komplexartige Endopeptidase 1)
mg	Milligramm
mg/dl	Milligramm pro Deziliter
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i> (Makrophagen-Migrationsinhibitor Faktor)
mm	Millimeter

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP(s)	Matrixmetalloproteinase(n)
mol	Teilchenzahl pro Stoffmenge $6,02 \cdot 10^{23}$
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NFκB	nukleärer Faktor <i>kappa</i> B
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes <i>low density lipoprotein</i> (Lipoprotein niedriger Dichte)
p50/53/105	Protein 50/53/105
PA28/700	Proteasomaktivator 28/700
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDAPP	<i>platelet-derived</i> (vom Blutplättchen abstammend) <i>amyloid β precursor protein</i> (Amyloid-β-Vorläuferprotein)
PD1-L1/2	<i>programmed death–ligand</i> 1/2 (programmierter Zelltod-Ligand 1/2)
pH	<i>pondus Hydrogenii</i> (Kraft des Wassers)
®	eingetragenes Warenzeichen
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i> (mit Antigenprozessierung assoziierter Transporter)
TIA	transitorische ischämische Attacke
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
T-Zelle	<i>thymus-derived cell</i> (vom Thymus abstammende Zelle)
u.a.	unter anderem
UV-Licht	Ultraviolett-Licht
VCAM-1	<i>vascular cell-adhesion molecule 1</i> (Gefäßzellenanhaftungsmolekül 1)
vs.	<i>versus</i> (gegenüber)
w/v %	<i>weight/volume in per cent</i> (Gewicht pro Volumen in Prozent)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel

## 11 Anhang

### 11.1 Danksagung

Für die Inspiration dieser experimentellen Arbeit möchte ich mich bei *Prof. Dr. med. Verena Stangl* und *Prof. Dr. med. Karl Stangl* bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei *Prof. Dr. Gerd Baumann* für die Möglichkeit im kardiologischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Kardiologie, Pulmologie und Angiologie der Medizinischen Fakultät der Charité arbeiten zu können.

Bei *PD Dr. rer. nat. Silke Meiners* möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und hervorragende Betreuung während meiner Laborzeit bedanken. Ein herzlicher Dank richtet sich auch an meinen zweiten Betreuer *Dr. med. Nicola Wilck*, der mich vor allem mit wertvollen wissenschaftlichen Anregungen unterstützte.

Für die freundliche Kooperation möchte ich mich bei *Prof. Dr. med. Lutz Harms* bedanken sowie bei *Dr. med. Hagen Kunte*. Vielen Dank für die kollegiale Unterstützung bei der Auswertung. Ebenfalls gilt ein großer Dank *PD Dr. med. Lars Morawietz* und *Gabriele Fernahl* für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und Einarbeitung in die Welt der Immunhistochemie.

Des Weiteren möchte ich mich beim ganzem Team des kardiologischen Forschungslabors bedanken und speziell bei *Kornelia Buttke* für ihre immer freundliche und hilfsbereite Unterstützung nicht nur bei den immunhistochemischen Färbungen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie und meine Freunde, die immer an meiner Seite standen und mich zu motivieren wussten.

Zuletzt möchte ich meinem Mann vom ganzen Herzen danken, der in all der Zeit für die Verwirklichung dieser Arbeit Großartiges für mich getan hat.

## **11.2 Lebenslauf**

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

### **11.3 Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Andreana Danielle Coppi, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Immunhistochemische Analyse der Expression des Immunoproteasoms in atherosklerotischen Plaqueläsionen*, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift