

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Daniel Teupser

**Identifizierung Atherosklerose-relevanter Genloci  
am Modell LDL-Rezeptor defizienter Mäuse**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Doris Simon, geb. Ludwig

aus  
Wolfen

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Daniel Teupser  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Andreas Schober  
Prof. Dr. Anne-Laure Boulesleix  
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR  
Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	KONZEPTE DER ATHEROGENESE	1
1.2	LIPIDE UND ATHEROSKLEROSE	3
1.3	PHYTOSTEROLE UND ATHEROSKLEROSE	5
1.3.1	<i>Genetische Regulation der Sterolabsorption und der Plasma-Phytosterol-Spiegel</i>	7
1.4	GENETIK DER ATHEROSKLEROSE BEIM MENSCHEN	8
1.5	MAUSMODELLE DER ATHEROSKLEROSE	9
1.5.1	<i>Kandidatengen-Ansätze im Mausmodell</i>	10
1.5.1	<i>Hypothesenfreie Genkartierung mit Hilfe von Kopplungs-untersuchungen</i>	11
1.6	LOKALISATION DER ATHEROSKLEROTISCHEN LÄSION	12
1.7	ZIELSTELLUNG DER ARBEIT	13
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
2.1	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	14
2.1.1	<i>Herstellung von LDL Rezeptor defizienten Balb/cByJ Mäusen</i>	14
2.1.2	<i>Organ- und Blutentnahme</i>	17
2.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	19
2.2.1	<i>DNA Extraktion aus Mausschwanzspitzen</i>	19
2.2.2	<i>DNA Extraktion aus Leberbiopsien</i>	20
2.2.3	<i>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i>	20
2.2.4	<i>Agarosegel-Elektrophorese</i>	29
2.2.5	<i>Polyacrylamidgel-Elektrophorese</i>	29
2.3	PHÄNOTYPISIERUNG	30
2.3.1	<i>Histologische Aufbereitung der Brachiocephalarterie</i>	30
2.3.2	<i>Histologische Färbung der BCA</i>	31
2.3.3	<i>Quantifizierung der atherosklerotischen Plaques an der BCA</i>	32
2.3.4	<i>Klinische Chemie</i>	32
2.3.5	<i>Fraktionierung der Lipoproteine</i>	32
2.3.6	<i>Lipidanalytik</i>	33
2.3.7	<i>Messung der Phytosterole</i>	34
2.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	36
2.4.1	<i>Statistische Analyse und Bioinformatik</i>	36
2.4.2	<i>Kopplungsanalyse</i>	37
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
3.1	PHÄNOTYPISIERUNG DER PARENTALSTÄMME B6.LDLR <sup>-/-</sup> UND BALB.LDLR <sup>-/-</sup>	38
3.2	ATHEROSKLEROTISCHE LÄSIONSGRÖßEN AN DER BRACHIOCEPHALARTERIE	38

---

3.3	IDENTIFIZIERUNG EINES NEUEN QTL DER ATHEROSKLEROSE AN DER BCA AUF CHROMOSOM 6 .....	42
3.4	LIPID- UND LIPOPROTEINPROFILE DER F0, F1 UND F2 GENERATION.....	44
3.5	KOSEGREGATION VON ATHEROSKLEROSE UND LIPID-PHÄNOTYPEN AUF CHROMOSOM 6 .....	47
3.6	KORRELATION VON PLASMALIPIDEN/LIPOPROTEINEN UND ATHEROSKLEROSE IN DER F2 GENERATION 49	
3.7	QTL MAPPING FÜR GENETISCHE DETERMINANTEN WEITERER METABOLISCHER PHÄNOTYPEN.....	52
3.8	IDENTIFIZIERUNG EINES NEUEN STEROL QTL AUF CHROMOSOM 8 .....	55
3.9	QTL FÜR HDL-CHOLESTEROL UND PHYTOSTEROLE AUF CHROMOSOM 1 .....	57
3.10	QTL FÜR CHOLESTEROL UND PHYTOSTEROLE AUF CHROMOSOM 2 .....	61
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>64</b>
4.1	NEUER GENLOCUS FÜR ATHEROSKLEROSE .....	64
4.2	NEUE GENLOCI FÜR RISIKOFAKTOREN DER ATHEROGENESE .....	67
4.3	WEITERE GENLOCI FÜR PLASMALIPID- UND LIPOPROTEIN-METABOLISMUS .....	68
4.4	ORTSSPEZIFITÄT ATHEROSKLEROTISCHER LÄSIONEN .....	71
4.5	GENLOCUS FÜR FELLFARBE .....	74
4.6	AUSBLICK .....	74
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>77</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>97</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>98</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Konzepte der Atherogenese

Kaum eine Krankheit steht seit mehreren Jahrzehnten so im Blickfeld der medizinischen Forschung wie die Atherosklerose. Sie kann sich klinisch als koronare Herzerkrankung (KHK) mit Angina pectoris, Ischämie und Myokardinfarkt, als Karotisstenose und Schlaganfall, als periphere arterielle Verschlusskrankheit und als Aneurysma der großen Gefäße manifestieren. In den westlichen Industrienationen stellen die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen die häufigste Todesursache dar. Dies belegt die Todesursachenstatistik des statistischen Bundesamtes, wonach im Jahr 2012 bei nahezu jedem zweiten Verstorbenen der Tod durch eine Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems ausgelöst wurde (349.217 Sterbefälle, 40,2%). Allein an einem Myokardinfarkt starben 55.425 Personen (Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Pressemitteilung vom 12. Dezember 2013). Die Atherogenese bezieht sich auf die Entwicklung von atheromatösen Plaques in der Intima von Arterien. Basierend auf Tierexperimenten und Beobachtungen beim Menschen geht man heute davon aus, dass die Entstehung atherosklerotischer Läsionen initial durch eine qualitative Veränderung der Endothelzellen (Endotheldysfunktion) getriggert wird (Ross et al, 1977, Ross, 1986). Die Endothelzellen, die normalerweise der Anhaftung von vorbeifließenden Leukozyten entgegenwirken, bilden dabei Adhäsionsmoleküle aus, die Leukozyten an ihrer Oberfläche binden, wenn sie störenden Stimuli wie Dyslipidämie, Hypertension oder pro-inflammatorischen Mediatoren ausgesetzt sind. Parallel ablaufende Veränderungen der endothelialen Permeabilität und der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix unter dem Endothel fördern den Eintritt und die Retention von cholesterinreichen Low Density Lipoproteinen (LDL) in der Gefäßwand (Williams und Tabas, 1995 und 1998; Tabas et al, 2007). Biochemisch modifizierte Bestandteile dieser LDL-Cholesterol-Partikel können die Leukozytenadhäsion weiter induzieren. Intakte, jedoch modifizierte Partikel unterliegen der Endozytose von Makrophagen (Woollard und Geissmann, 2010). Dies führt zu intrazellulärer Cholesterolakkumulation. Die atherogene Rekrutierung von Leukozyten, d.h. die Aufeinanderfolge von Rollen, fester Adhäsion, lateraler Migration und transendothelialer Diapedese der Leukozyten wird durch Chemokine gesteuert (Weber und Noels, 2011). Diese sind chemotaktische Zytokine, die anhand ihrer enthaltenen Cysteine und den damit korrespondierenden G-Protein-

---

gekoppelten Rezeptoren klassifiziert werden. Die unterschiedlichen Leukozyten, die während der Inflammationskaskade rekrutiert werden, umfassen Neutrophile, Monozyten, T-Zellen, B-Zellen, dendritische Zellen sowie Mastzellen (Weber et al, 2008). Der Gebrauch der Chemokine und ihrer Rezeptoren ist abhängig von der Zellart sowie vom Zeitpunkt der Läsionsbildung und vom Läsionsgrad (Zernecke und Weber, 2010) und zeigt die Robustheit und Spezifität des Chemokin-Systems (Koenen und Weber, 2010).

Die trotz eines systemischen Anstiegs von Risikofaktoren, wie erhöhte LDL Spiegel oder ein erhöhter Blutdruck, lokalisierte Verteilung der atheromatösen Plaques im arteriellen Gefäßbaum reflektiert wahrscheinlich eine unterschiedliche Hämodynamik in verschiedenen Segmenten des arteriellen Gefäßsystems. Ebenfalls könnte es auf Unterschiede in der regionalen Entwicklung der Arterien (Majesky, 2007), sowie auf die Fähigkeit des normalen laminaren Scherstress im Endothel ein atheroprotektives Programm der Genexpression hervorzurufen, hinweisen (Gimbrone et al, 2000). Änderungen der hämodynamischen Kräfte im Gefäßsystem führen zu einer modifizierten Expression von microRNA (miR), die eine wichtige Rolle bei der Genregulation spielen. Es wurden mehrere miRs identifiziert, die durch einen hohen Scherstress induziert werden und eine atheroprotektive Funktion vermitteln. Niedriger Scherstress kann die Expression von miRs induzieren, die zu einem pathologischen Phänotyp der Endothelzellen führen. Veränderungen des Scherstress führen zu unterschiedlicher Expression zahlreicher miRs und steuern somit das Gleichgewicht zwischen Empfindlichkeit und Resistenz gegenüber Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Neth et al, 2013).

Sobald Monozyten, die am häufigsten im Plaque auftretenden weißen Blutkörperchen, in der Arterienwand ansässig sind, differenzieren sie zu Gewebsmakrophagen. Im entstehenden Atherom nehmen diese mononukleären Phagozyten cholesterinreiche Lipoproteinpartikel auf und bilden die sog. Schaumzellen (Gerrity, 1981). Andere Leukozyten, wie Lymphozyten und Mastzellen können ebenfalls im Atherom akkumulieren, allerdings in geringerem Maße als die Phagozyten. T-Zellen treten in der Läsion in geringerer Anzahl auf, haben wahrscheinlich dennoch eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Atherombildung (Libby et al, 2011). Hierbei erfolgt außerdem die Rekrutierung von glatten Muskelzellen der Tunica media, der mittleren Schicht der Gefäßwand, in die Tunica intima. Beim Menschen sind in der Tunica intima der Arterien ortsständige glatte Muskelzellen zu finden. Während des Atherogenese-Prozesses migrieren weitere

---

glatte Muskelzellen aus der Media in die Intima, proliferieren als Reaktion auf Mediatoren, wie Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Gerthoffer, 2007) und produzieren in der Intima extrazelluläre Matrixmoleküle, darunter auch interstitielles Kollagen und Elastin. Diese bilden eine fibröse Kappe, die den Plaque bedeckt (Orr et al, 2010), und unter der sich typischerweise eine Anhäufung von Schaumzellen befindet. Einige von ihnen gehen in Apoptose und entleeren Lipide, die extrazellulär akkumulieren. Die ineffiziente Beseitigung der abgestorbenen Zellen kann die Akkumulation dieser Rückstände und der extrazellulären Lipide begünstigen und somit den lipidreichen nekrotischen Kern von Plaques bilden (Tabas, 2010). Plaques sind durch Bildung flusslimitierender Stenosen, die wiederum zur Ischämie der Gewebe oder Ruptur und Entstehung von Thromben führen, hauptsächlich für die klinischen Manifestationen verantwortlich. Die Thromben entstehen häufig nicht an den Gefäßengstellen, sondern auf dem Boden einer Plaqueruptur, meist ein Bruch in der fibrösen Kappe, der prokoagulatorisches Material des Plaque-Kerns den Gerinnungsfaktoren im Blut aussetzt und dadurch die Thrombose triggert. Die Plaques, die typischerweise rupturieren, haben eine dünne, kollagenarme fibröse Kappe mit wenigen glatten Muskelzellen und reichlich Makrophagen. Die inflammatorischen Zellen können die Ruptur durch Veränderung der kollagenolytischen Enzyme und durch Hervorrufen von Mediatoren, die den Abbau von glatten Muskelzellen verursachen, beschleunigen (Libby, 2009). Risikofaktoren agieren an verschiedenen Punkten der Pathogenese der Atherosklerose. Hypertension kann die Spannung der Gefäßwand erhöhen. Dies kann zu gestörten Reparaturmechanismen und Aneurysmabildung führen. Angiotensin II, ein wichtiges Blutdruck-Hormon, kann die endotheliale Funktion verändern und dadurch die leukozytäre Adhäsion begünstigen (Libby et al, 2011). Zigarettenrauchen und Diabetes mellitus beeinflussen ebenfalls die Gefäßbiologie, die Mechanismen sind bisher weniger gut verstanden. Die Rolle des Cholesterols wurde sehr ausführlich untersucht, was einen großen Erfolg für die kardiovaskulären Präventionsstrategien brachte (Weber und Noels 2011).

## **1.2 Lipide und Atherosklerose**

Lipide spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Plaques. Die zu Grunde liegenden Mechanismen, die zwischen Lipiden und Atherogenese ablaufen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Beobachtungsdaten bekräftigen die Assoziation zwischen Plasma-Lipidspiegeln und dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (Steinberg,

---

---

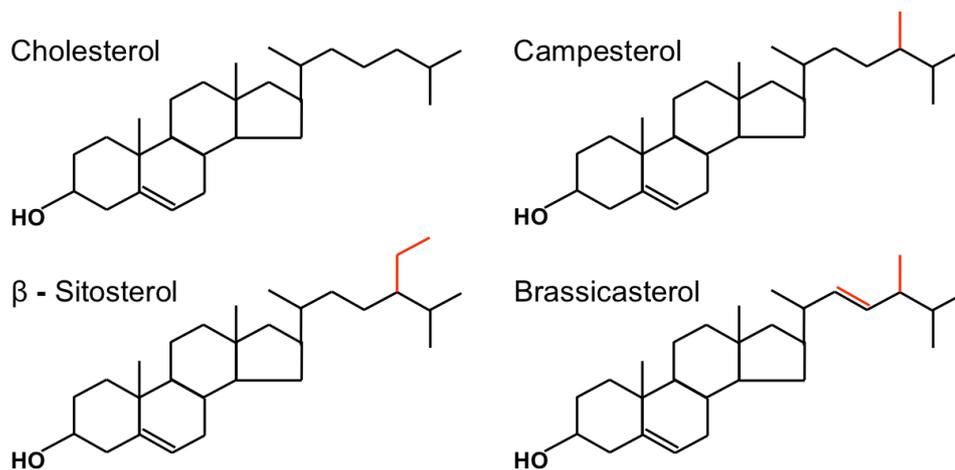
2007). Besonders die LDL-Cholesterol (LDL-C) Spiegel korrelieren mit kardiovaskulären Ereignissen beim Menschen und verstärken die Anfälligkeit für Atherosklerose und deren Komplikationen. Monogenetische Erkrankungen, die zu einem Anstieg des Plasma-LDL-C führen, gehen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einher (Milewicz und Seidmann, 2000). Verschiedene Interventionen, die durch voneinander unabhängige Mechanismen zu einer Erniedrigung der LDL-C Konzentrationen führen, vermindern die Wahrscheinlichkeit für atherosklerotische Ereignisse. Die Entdeckung der LDL-Rezeptor vermittelten Aufnahme und die pharmakologische Hemmung der Hydroxy-Methyl-Glutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase mit Statinen, die diesen Pathway regulieren, waren große Erfolge der kardiovaskulären Medizin und Wissenschaft (Brown und Goldstein, 1986 und 1996). Dennoch bleibt auch bei Patienten, die mit Statinen behandelt werden, ein beträchtliches kardiovaskuläres Restrisiko vorhanden (Libby, 2005). Mehrfach konnte eine inverse Korrelation der High-Density-Lipoprotein-Cholesterol (HDL-C)-Spiegel mit dem kardiovaskulären Risiko gezeigt werden (Castelli et al, 1986; Di Angelantonio et al, 2009; Gordon et al, 1977). Aufgrund der Heterogenität im HDL-Partikel, der komplizierten HDL vermittelten Pathways des Cholesterolfusses, sowie der Assoziation von HDL mit vielen Proteinen, die die Atherosklerose modifizieren können, reflektieren die steady-state-Spiegel von HDL-C im Blut die HDL-Funktion nur unzureichend (Besler et al, 2012; Libby et al, 2011). HDL kann den reversen Cholesteroltransport beeinflussen und Cholesterol aus den peripheren Geweben zur Ausscheidung in die Leber transferieren. Dabei wird das Cholesterol von den lipidbeladenen Makrophagen im Atherom mittels membranständigen ATP-Binding-Cassette-Transporters abgeladen. Das „reife“ HDL interagiert dabei mit einem ATP-Binding-Cassette-Transporter (ABCG1) und naszierendes HDL mit einem anderen (ABCA1) (Tall et al, 2008; Rye et al, 2009). Apolipoprotein A1 (ApoA1), das den Hauptanteil der Proteine im HDL bildet, erhielt große Aufmerksamkeit als möglicher therapeutischer Angriffspunkt für die Atherosklerose (Nissen et al, 2003; Navab et al 2003). Außerdem wurde der Einfluss der Triglyceride auf die Atherogenese untersucht. Es gibt Hinweise darauf, dass erhöhte Triglyceridspiegel im Plasma einen unabhängigen Risikofaktor darstellen (Hokanson und Austin, 1996; Sawar et al, 2007). Dabei sind die Triglyceride nicht direkt atherogen, sondern stellen aufgrund ihrer Assoziation mit atherogenen Remnant-Partikeln und Apolipoprotein C III, einem proinflammatorischen und proatherogenen Protein, welches auf allen Plasmalipoproteinen gefunden wurde,

---

einen wichtigen Biomarker für das kardiovaskuläre Risiko dar (Talayero und Sacks, 2011). Triglyceridreiche Lipoproteine, wie VLDL, VLDL-Remnants und Chylomikronen-Remnants, scheinen die Atherogenese unabhängig von LDL zu fördern (Brewer, 1999; Do et al, 2013). Eine Änderung der Lebensgewohnheiten, wie Gewichtsreduktion, sportliche Aktivität und Ernährungsumstellung, können die Konzentration der im Blut zirkulierenden Triglyceride reduzieren. Der klinische Nutzen dieser Lebensstil-Modifikation resultiert wahrscheinlich aus einer Kombination von Mechanismen, sodass die Triglyceride allein nicht zu einem kausalen Risikofaktor der Atherosklerose erklärt werden können. Die strenge Kontrolle eines Diabetes kann ebenfalls eine Hypertriglyceridämie mildern, allerdings kann die enge glykämische Kontrolle klinische Komplikationen der Atherosklerose bei Patienten mit Typ II Diabetes eher verstärken als ihnen vorzubeugen (Gerstein et al, 2008, Duckworth et al, 2009). Fibrate senken effektiv die Triglycerid-Spiegel. Studien dieser Medikamente waren in Bezug auf die Reduktion klinischer Ereignisraten eher enttäuschend und konnten auch die Mortalitätsrate nicht senken (Jun et al, 2010).

### 1.3 Phytosterole und Atherosklerose

Phytosterole sind natürlich vorkommende Bestandteile von Pflanzen, die eine dem Cholesterol ähnliche chemische Struktur aufweisen (Abbildung 1).



**Abbildung 1 – Strukturformeln der Sterole**

Sie unterscheiden sich vom Cholesterol lediglich durch die Anwesenheit einer zusätzlichen Methyl- bzw. Ethylgruppe oder einer Doppelbindung in der Seitenkette (Thieme Chemistry, 2007).

Säugetiere können diese nicht essentiellen Substanzen selbst nicht synthetisieren, nehmen sie aber über die Nahrung auf. Besonders reichlich sind Phytosterole in Ölen, Nüssen, Samen, Getreide, Früchten und Gemüse vorhanden (John et al, 2007). Die westeuropäische Ernährung beinhaltet durchschnittlich 200-400mg Phytosterole, von denen ca. 2-5% absorbiert werden. Die Ausscheidung der Pflanzensterole erfolgt überwiegend über die Galle (John et al, 2007). Die Absorptionsfähigkeit für Pflanzensterole beim Menschen liegt somit deutlich niedriger als die des Cholesterols. Die Konzentrationen von Phytosterolen im Plasma liegen dementsprechend weit unter denen des Cholesterols und schwanken bei normaler Ernährungsweise zwischen 0,3 und 1,7 mg/l (Watzl, Rechkemmer, 2001). Aufgrund ihres Potentials Cholesterol durch Inhibierung der intestinalen Absorption zu senken, finden Phytosterole weite Verbreitung in der Nahrungsergänzungsmittel-Industrie. Entsprechend einer in einer Meta-Analyse entwickelten Dosis-Wirkungs-Kurve reduziert die empfohlene Tagesdosis von 2 g Pflanzensterolen beim Menschen die LDL-C Konzentration im Mittel um 9% (Demonty et al, 2008). Nahrungsergänzungen können jedoch zugleich die Serum-Konzentration dieser Sterole erhöhen. So führt eine zusätzliche Zufuhr von 1,1 g Phytosterolen pro Tag zu einer Verdopplung der zum Cholesterol normalisierten Campesterol-Konzentration im Serum (Fransen et al, 2007).

Phytosterole besitzen aufgrund ihrer starken Ähnlichkeit zum Cholesterol vermutlich selbst atherogenes Potential. Ab welcher Konzentration dies zum Tragen kommt ist derzeit umstritten (Weingärtner et al, 2009; Weingärtner et al, 2011). Trotz ihres LDL-C senkenden Effekts bestehen zunehmend Bedenken, dass erhöhte Serum-Konzentrationen der Phytosterole ungewollt zu einem ansteigenden kardiovaskulären Risiko führen könnten (John et al, 2007). Eine jüngere Studie führte zu der Erkenntnis, dass durch Nahrungsergänzung zugeführte Phytosterole nicht nur zu einem Anstieg der entsprechenden Sterole führen, sondern außerdem die Atherogenese bei Mäusen beeinflussen und beim Menschen zu einer vermehrten Anreicherung von Sterolen im Gewebe sklerotisch veränderter Aortenklappen führt (Weingärtner et al, 2008). Die seltene, autosomal vererbte Erkrankung der Sitosterolämie, die durch massiv erhöhte Serum-und Gewebekonzentrationen von Phytosterolen charakterisiert ist, führt zu schwerer frühzeitiger Atherosklerose und liefert somit einen wichtigen Beleg für die proatherogene Wirkung von Phytosterolen (Berge et al, 2000). Darüber hinaus konnten einige, jedoch nicht alle, epidemiologische Studien eine Assoziation von erhöhten Phytosterol-Konzentrationen

im Serum mit koronarer Herzkrankheit aufzeigen (Teupser et al, 2010; Thiery et al, 2006; Strandberg et al, 2006; Assmann et al, 2006). Die Serum-Phytosterol-Konzentrationen stehen unter strenger genetischer Kontrolle mit einer geschätzten Erblichkeit von ca. 80% (Berge et al, 2002). Zu den bislang bekannten, für die Kontrolle der Phytosterol-Serum-Konzentrationen verantwortlichen Proteinen zählen u.a. Niemann-Pick-C1-Like 1 und ATP-Binding-Cassette-Hemitransporter G5 und G8 (ABCG5 und ABCG8). Niemann-Pick-C1-Like 1, ein Arzneimitteltarget von Ezetimib, spielt eine Rolle beim Einschleusen von Sterolen in den Enterozyten (Altmann et al, 2004). Dagegen werden ABCG5 und ABCG8 den für die familiäre Sitosterolämie und die Sterol-Ausscheidung verantwortlichen Genen zugeordnet (Berge et al, 2000). Zudem konnte eine starke Assoziation zwischen den häufig vorkommenden Varianten von ABCG5 und auch des ABO Gens in der Normalbevölkerung und den Plasma-Phytosterolspiegeln gezeigt werden. Es zeigten sich konkordante Assoziationen zur koronaren Herzerkrankung (Teupser et al, 2010).

### **1.3.1 Genetische Regulation der Sterolabsorption und der Plasma-Phytosterol-Spiegel**

Die Absorption von Cholesterol im Darm spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Plasma-Cholesterol-Spiegel. Die Plasmakonzentrationen der Phytosterole korrelieren gut mit der intestinalen Cholesterol-Absorptionsrate (Miettinen et al, 1990). Beim Menschen zeigten Studien, die unter strengen metabolischen Bedingungen durchgeführt wurden, sehr große individuelle Unterschiede in der intestinalen Cholesterol-Absorptionsrate, wobei einige Probanden nur 20-30% ihrer täglichen Cholesterol-Zufuhr absorbierten und andere über 70% (Sehayek et al, 1998). Es ist wahrscheinlich, dass genetische Faktoren zu dieser Variabilität beitragen. Mittels Inzucht-Mausstämmen, die verschiedene Phytosterol-Konzentrationen aufweisen (C57BL/6J und CASA/Rk), konnten Genorte (Loci) auf Chromosom 14 (LOD 9,9) und Chromosom 2 (LOD 4,1 und 3,65) identifiziert werden (Sehayek et al, 2002). Eine darauffolgende Studie bestätigte den Effekt des Chromosom 14 Locus auf die Plasma-Phytosterol-Konzentration. Es zeigte sich, dass dieser Locus überwiegend die Sterol-Absorption im Darm beeinflusst und mindestens 2 Gene beinhaltet (Sehayek et al, 2006). Aus weiteren Maus-Studien konnten Loci für die Cholesterolabsorption auf den Chromosomen 1, 2, 5, 6, 10 und 19 gefunden werden (Schwarz et al, 2001) (Tabelle 1).

**Tabelle 1 - Loci für die Regulierung der Cholesterolabsorption und Plasma-Phytosterol-Konzentration bei der Maus; *Chab*, cholesterol absorption; cM, centimorgan; LOD, logarithm of odds; *Plast*, plasma plant sterol**

Stämme und Kreuzungen	Locus	Chromosom (cM)	LOD	Referenz
AKR/J × DBA/2J backcross	<i>Chab</i> 1	2 (64)	3.5	Schwarz et al, 2001 (28)
	<i>Chab</i> 2	10 (24)	1.9	
AKR/J × DBA rekombinante Inzucht-Stämme	<i>Chab</i> 3	6 (51)	2	Schwarz et al, 2001 (28)
	<i>Chab</i> 4	15 (58)	2	
	<i>Chab</i> 5	19 (16)	1.6	
129P3/J × SJL/J backcross	<i>Chab</i> 6	1 (57)	2.1	Schwarz et al, 2001 (28)
	<i>Chab</i> 7	5 (57)	3.3	
C57BL/6J × CASA/Rk intercross	<i>Plast</i> 14	14 (17)	9.9	Schayek et al, 2002 (33)
	<i>Plast</i> 2a	2 (18)	4.1	
	<i>Plast</i> 2b	2 (65)	3.7	

#### 1.4 Genetik der Atherosklerose beim Menschen

Die geschätzte Erblichkeit für das Ausmaß der Atherosklerose variiert, basierend auf Zwillingsstudien und Studien der familiären Häufung, zwischen 30 und 60% (Lusis, 2000; Lusis et al, 2004; Marenberg et al, 1994). Seit 2007 haben sich Genomweite Assoziationstudien (GWAS) als die erfolgreichsten Ansätze zur Analyse der erblich bedingten Grundlagen von Erkrankungen beim Menschen erwiesen. Das Human Genome Project, das HapMap Project sowie darauffolgende genomische Studien führten zu der Identifizierung vieler Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs) in der Weltbevölkerung (Lander, 2011). Mit der Entwicklung von Array-Technologien, die gleichzeitig mehrere hunderttausend SNPs genotypisieren können, wurde es möglich GWAS für häufige, komplexe Merkmale, wie die KHK und deren Risikofaktoren durchzuführen (Musunuru und Kathiresan, 2010; Schunkert et al, 2011). Nach vielen Jahren der Hypothesen-gesteuerten Studien mittels Kandidatengen-Studien und Kopplungsanalysen (Cambien und Tiret, 2007) hat der GWAS Ansatz etliche genomische Regionen identifiziert, die vermeintlich Gene der KHK- und Myokardinfarkt-Anfälligkeit beherbergen (Schunkert et al, 2010; Patel und Ye, 2011). Seit der Entdeckung des 9p21.3 Locus auf Chromosom 9 (Mc Pherson et al, 2007; Samani et al, 2007; Helgadottier et al, 2007), der bisher das am häufigsten reproduzierte genetische Signal für die KHK weltweit lieferte (Assimes et al, 2008;

Cheng et al, 2011; Holdt und Teupser 2012) wurden viele andere Loci identifiziert. Die größte GWAS für die KHK, die CARDIoGRAM- Studie schloss über 100 000 Personen europäischen Ursprungs ein (Schunkert et al, 2011), ebenso wurde von kleineren KHK Studien der asiatischen Population berichtet (Peden et al, 2011; Wang et al, 2011). Zusammen wurden bisher 58 statistisch signifikante Loci für die Phänotypen KHK und Myokardinfarkt entdeckt, von denen 23 mit den GWAS Loci der klassischen Risikofaktoren wie Lipide, Blutdruck und Diabetes mellitus überlappen. Dies lässt eine kausale Verbindung vermuten (Holdt und Teupser, 2013). Einige Loci beinhalteten bereits gut bekannte Gene, die u.a. den LDL-Rezeptor kodieren, wodurch die Wichtigkeit von LDL für die Atherosklerose bekräftigt wird. Einige der KHK-Loci sind mit den LDL-Spiegeln assoziiert, dreiviertel dieser Loci sind allerdings neu und wurden bisher nicht mit Atherosklerose oder Myokardinfarkt in Verbindung gebracht. Für die Mehrheit der Loci konnte kein signifikanter Zusammenhang zu anderen KHK Risikofaktoren, wie Diabetes mellitus, Hypertension oder Body-Mass-Index (BMI) gezeigt werden (Stylianou et al, 2012). Im Gegensatz dazu konnten viele Lipid- und Inflammationsgene sowie Gene, die bislang einen Einfluss auf die KHK-Risikofaktoren zeigen konnten, noch nicht in den Hypothesen-freien GWAS beim Menschen bestätigt werden (Keating et al, 2008). Die am häufigsten replizierten Loci in voneinander unabhängigen GWAS sind der Chr9p21.3, Chr6p24.1 und der Chr1p13.3 Locus (Holdt und Teupser, 2013). Neueste Arbeiten suggerieren, dass Chr9p21.3 seinen Effekt über eine epigenetische Regulation der Zielgene ausübt (Holdt und Teupser, 2012), während die Mechanismen von Chr6p24.1 unklar bleiben (Holdt und Teupser, 2013) und Chr1p13.3 das Plasma-LDL-Cholesterol beeinflusst (Linsel-Nitschke et al, 2010).

## **1.5 Mausmodelle der Atherosklerose**

Für die erfolgreiche Aufdeckung der genetischen Faktoren sind sich gegenseitig ergänzende Ansätze mittels Tiermodellen, groß angelegten menschlichen genetischen Studien und funktionellen Experimenten notwendig. Das am häufigsten verwendete in vivo Modell der experimentellen Atheroskleroseforschung ist die Maus. Wildtyp-Mäuse entwickeln bei normaler Ernährung jedoch keine Atherosklerose. Zur Induktion der Atherosklerose wurden daher diätbasierte und genetische Mausmodelle verwendet. Zum einen wurde die heute aufgrund beachtlicher Nebeneffekte obsolete sog. Paigen-Diät (15% Fett, 1,25% Cholesterol, 0,5% Cholsäure) genutzt, um eine Atherosklerose-Entwicklung bei der Wildtyp-Maus zu induzieren. Die Kombination von

Cholesterol und Cholat fördert die Cholesterol- und Fettabsorption, hemmt die Umwandlung von Cholesterol in Gallensäure, reduziert somit die Cholesterol-Clearance und resultiert in einer erhöhten Cholesterolkonzentration im Plasma (Ando et al, 2005). Cholat übt außerdem einen Effekt auf die Genexpression von Lipid-, Lipoprotein- und inflammatorischen Genen aus und führt somit zu vermehrter Atheroskleroseentwicklung (Xu et al, 2002). Die atherosklerotische Läsionsgröße blieb jedoch bei ausschließlicher Fütterung der Paigen-Diät relativ gering (Nishina et al, 1990), weshalb die beiden anderen Modelle häufiger Verwendung fanden. Ein anderes Modell stellt die Low-Density-Lipoprotein (LDL) Rezeptor knockout (KO) Maus (*Ldlr*<sup>-/-</sup>) dar. Ihr fehlt der primäre Rezeptor für die LDL-Cholesterol-Aufnahme. Dies führt zu einem mäßigen Anstieg der Plasma-LDL-Spiegel (Getz und Reardon, 2006), weshalb zunächst eine zusätzliche Fütterung einer Western-Type-Diät (WTD) (Ishibashi et al, 1993) oder die Kreuzung mit einem anderen Modell, z.B. einer Apobec1 knockout Maus, notwendig war, um die Atherogenese ausreichend zu induzieren. Jedoch konnte gezeigt werden, dass *Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse auch unter einer normalkalorischen semisynthetischen Diät eine Hypercholesterolämie und Atherosklerose entwickeln können, ohne den toxischen Effekten einer Cholesterol- und Cholsäure-reichen Diät zu unterliegen (Teupser et al, 2003). Ein weiteres häufig verwendetes Tiermodell, die Apolipoprotein E (ApoE) knockout Maus (*ApoE*<sup>-/-</sup>), zeichnet sich durch das Fehlen des für die Aufnahme von Lipoproteinen über die hepatischen Rezeptoren notwendigen Ligandens aus und führt somit zu einem Plasma-Cholesterol-Anstieg. Folglich kann bei *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen unter normaler Ernährung eine Atherosklerosebildung beobachtet werden, die bei Fütterung der WTD noch verstärkt werden kann (Getz und Reardon, 2006; Plump et al, 1992; Plump und Breslow, 1995).

Um die molekularen Mechanismen der Atherogenese besser zu verstehen sind Kandidatengen-basierte und hypothesenfreie Strategien verwendet worden.

### **1.5.1 Kandidatengen-Ansätze im Mausmodell**

Bei einem Kandidatengen-Funktionsverlust-Ansatz wird ein knockout Mausmodell für ein bestimmtes Gen aus den vorher beschriebenen Mausmodellen generiert. Üblicherweise werden Doppel-Knockout-Mäuse durch Kreuzung des Kandidaten Knockout mit entweder *Ldlr*<sup>-/-</sup> oder *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäusen hergestellt. Mithilfe dieses Ansatzes konnten annähernd 100 Gene identifiziert werden, die einen signifikanten Effekt auf die Atherosklerose ausüben (Stylianou et al, 2012). Die Deletion von 65

dieser 100 Gene führte zu einer Verminderung, die Deletion von 35 Genen bewirkte eine Zunahme der Atherosklerose. 33 dieser Gene zeigten ihre Effekte auf die Atherosklerose durch Beeinflussung der Plasmalipide. Die restlichen Gene, die die Plasmalipide nicht wesentlich verändern, beeinflussen die Atherogenese vermutlich über andere Wege (Stylianou et al, 2012). Bei dem Kandidatengen-Funktionszugewinn-Ansatz werden transgene Überexpressions-Mäuse auf *ApoE*<sup>-/-</sup> und *Ldlr*<sup>-/-</sup> Hintergrund verwendet. Sie erlauben die Untersuchung von Genen, die beim Knockout im Embryonalstadium letal wären sowie die Erforschung von Menschen-spezifischen Genen, wie Cholesterylester-Transfer-Protein, für das es kein orthologes Gen bei der Maus gibt (Jiang et al, 1992). Zu den weiteren Methoden zur Erforschung spezifischer Gene der Atherosklerose bei der Maus zählt die Knochenmarkstransplantation, die den Einfluss von Genen, die in hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, auf die Atherogenese darstellen kann. Dazu zählt u.a. *Abcg1*, das nach Transplantation von *Abcg1*<sup>-/-</sup> Knochenmark in hyperlipidämische *Ldlr*<sup>-/-</sup> und *ApoE*<sup>-/-</sup> Mäuse zu einer verminderten Atheroskleroseentwicklung führte (Baldan et al, 2006),

Einige Gene zeigen nur in Abhängigkeit des genetischen Hintergrunds einen Einfluss auf die Atherosklerose, so z.B. bei den *ICAM1*<sup>-/-</sup> Maus-Studien, bei denen ein Effekt auf die Atherosklerose nur bei einem *ApoE*<sup>-/-</sup> Hintergrund (Collins et al, 2000), nicht jedoch bei dem *Ldlr*<sup>-/-</sup> Hintergrund (Cybulsky et al, 2001) zu beobachten war.

### **1.5.1 Hypothesenfreie Genkartierung mit Hilfe von Kopplungsuntersuchungen**

Das Mausmodell kann neben der Untersuchung spezifischer Gene auf ihren Einfluss auf die Atherosklerose auch zur hypothesenfreien Identifizierung von Atherosklerose-Genen, insbesondere mit Hilfe der Kopplungsanalyse (Quantitative Trait Locus (QTL)-Analyse) verwendet werden. Die Kopplungsanalyse ist eine statistische Methode, die Daten der Phäno-und Genotypen miteinander korreliert und stellt einen Ansatz dar, die genetischen Grundlagen der Variabilität komplexer Merkmale zu identifizieren (Falconer und Mackay, 1996; Kearsley, 1998; Lynch und Walsh, 1998). Sie erlaubt es bestimmte komplexe Phänotypen einer spezifischen Region auf dem Chromosom zuzuordnen. Dazu benötigt man zwei oder mehr Mausstämme, die sich natürlicherweise genetisch in dem zu untersuchenden Merkmal, wie zum Beispiel der Empfindlichkeit für Atherosklerose unterscheiden. Zusätzlich werden genetische Marker benötigt, die zwischen den Parentalstämmen einen Unterschied aufweisen.

---

Verschiedene Marker finden Verwendung, so zum Beispiel die Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs), Simple Sequence Repeats (SSRs oder Mikrosatelliten) und Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) (Vignal et al, 2002; Gupta und Rustgi, 2004). Die Parentalstämme werden miteinander gekreuzt, die daraus resultierende heterozygote F1 wird auf verschiedene Weise untereinander verpaart (Darvasi, 1998). Schließlich werden die Phänotypen und die Genotypen der Marker, die sich zwischen den beiden Parentalstämmen unterscheiden, in dieser sekundären Population (F2), die jeweils verschiedene Fragmente des Genoms der beiden Parentalstämme beinhalten, erfasst. Statistische Methoden, die die Güte der Korrelation eines Genotyps mit dem zu untersuchenden Phänotyp untersuchen, evaluieren die Wahrscheinlichkeit, dass ein Marker oder ein Intervall zwischen zwei Markern mit einem QTL, der das zu untersuchende Merkmal beeinflusst, assoziiert ist. Gleichzeitig werden die Effekte anderer Marker auf dieses Merkmal geprüft (Mackay, 2001). Bisher konnten auf diese Weise 43 signifikante Atherosklerose QTLs identifiziert werden (Wang et al, 2005). Kopplungsanalysen erfordern proatherogene Modelle, um Atherosklerose Loci kartieren zu können. Üblicherweise wird die F2-Generation zweier Parentalstämme einbezogen. 19 der 43 Loci nutzten Parentalstämme mit dem *Apoe*<sup>-/-</sup> Hintergrund, 12 wurden mithilfe von *Ldlr*<sup>-/-</sup> kartiert und weitere 12 Loci konnten durch ausschließliche Fütterung der F2 Generation mit der Paigen-Diät entdeckt werden. Durch Kopplungsanalyse entdeckte Loci beinhalten typischerweise hunderte von Genen und Dutzende von möglichen Kandidatengenen, auch nach der Anwendung von weiterführenden Mapping Strategien und Bioinformatik (DiPetrillo et al, 2005; Stylianou et al, 2008; Su et al, 2009; Flint et al, 2005). Als Beispiel kann Artles1, ein Atherosklerose-QTL, dem das Gen Arachinodate-5-Lipoxygenase (*Alox5*) zugeordnet werden konnte, genannt werden. Dieser QTL blockiert die Entwicklung der Atherosklerose trotz ausgeprägter Hyperlipidämie (Mehrabian et al, 2001). Der atherosklerotische Phänotyp konnte bei *Alox5*<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt werden (Mehrabian et al, 2002). Somit stellt die Kopplungsanalyse weiterhin einen erfolgversprechenden Weg zur Identifizierung der Atherosklerose zugrundeliegender Gene dar.

## 1.6 Lokalisation der atherosklerotischen Läsion

Für atherosklerotische Läsionen im menschlichen Gefäßsystem sind Prädilektionsstellen an Biegungen, Bifurkationen und Gefäßabgängen bekannt (Asakura und Karino, 1990). Atherosklerose tritt ausschließlich an systemischen

Arterien, nicht jedoch an Venen oder Pulmonalarterien auf. Dies suggeriert, dass lokale hämodynamische Faktoren, Wandbeschaffenheit und Druck eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Läsionen spielen. Mäuse entwickeln Läsionen auf dieselbe Art und Weise, was darauf schließen lässt, dass die arterielle Wand in ähnlicher Weise betroffen ist, trotz eines 20fachen Unterschiedes des tatsächlichen Wand-Scherstresses zwischen den beiden Spezies (Suo et al, 2007; Weinberg und Ross, 2007).

Die atherosklerotischen Läsionen bei der Maus sind an Orten mit niedrigem oder oszillierendem Scherstress lokalisiert (Huo et al, 2008), so insbesondere an der Aortenwurzel, der Brachiocephalarterie, der kleinen Krümmung des Aortenbogens, der Abzweigung der linken Arteria carotis communis und der linken Arteria subclavia sowie in geringerem Ausmaß an der absteigenden thorakalen Aorta. Neuere Studien deuteten darauf hin, dass die Geometrie des Aortenbogens einen Einfluss auf die Lokalisation der Läsionen bei der Maus hat (Zhu et al, 2009; Tomita et al, 2010). Diese Unterschiede in der Geometrie des Aortenbogens existieren ebenso beim Menschen (Fogel et al, 2006). Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen Maus und Mensch eignet sich das Mausmodell besonders gut für Atherosklerose-Studien. In der vorliegenden Arbeit wurde die Atheroskleroseentwicklung an der Brachiocephalarterie (BCA) untersucht.

## **1.7 Zielstellung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Genorte zu identifizieren, die mit der Atheroskleroseempfindlichkeit und modifizierenden Faktoren der Atherogenese assoziiert sind. Hierfür wurden 376 Tiere einer F2 Generation atheroskleroseresistenter Balb/cByJ mit atheroskleroseempfindlichen C57BL/6 Mäusen auf dem LDL-Rezeptor defizienten Hintergrund hergestellt, sowie geno- und phänotypisiert. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Phänotypen der Lipoproteine und der Phytosterole und deren Einfluss auf die Atheroskleroseentwicklung an der Brachiocephalarterie gerichtet. Die Identifizierung neuer Genorte erfolgte mit Hilfe der Kopplungsanalyse.

---

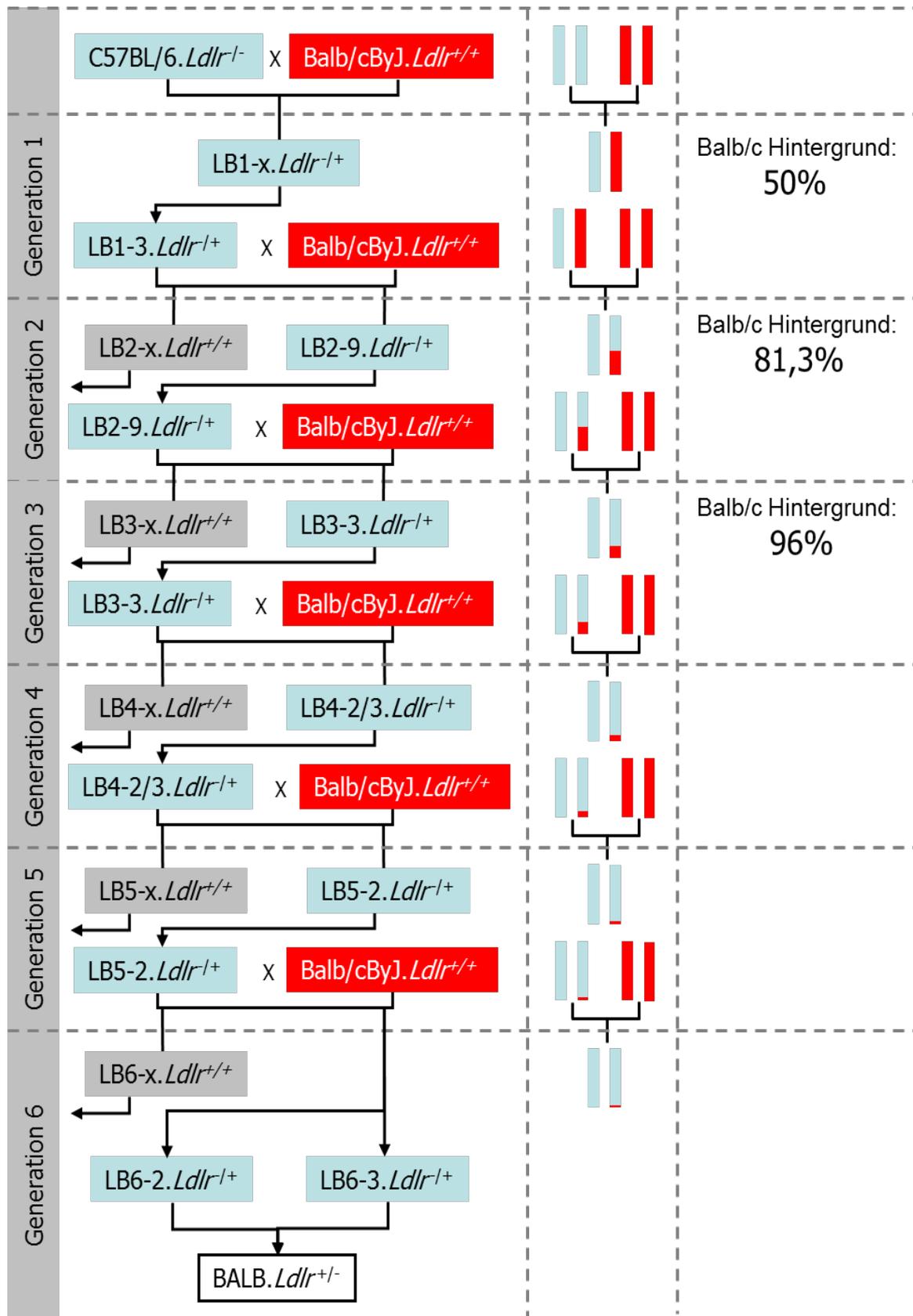
## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tierexperimentelle Methoden

#### 2.1.1 Herstellung von LDL Rezeptor defizienten Balb/cByJ Mäusen

LDL-Rezeptor defiziente C57BL/6-Mäuse, im Weiteren B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup> genannt, und Balb/cByJ Mäuse wurden beim Jackson Laboratorium, Bar Harbour (USA) erworben. LDL-Rezeptor-defiziente Mäuse auf dem Balb/cByJ Hintergrund (BALB.*Ldlr*<sup>+/-</sup>) wurden durch Marker-assistierte Rückkreuzung (Markel, Shu et al, 1997) des *Ldlr*<sup>-/-</sup> Merkmals von B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup> auf Balb/cByJ hergestellt. Insgesamt 119 Mikrosatellitenmarker in einem durchschnittlichen Abstand von circa 10cM über das gesamte Genom verteilt, wurden zur Genotypisierung verwendet. Die Nachkommen, die bereits am weitesten rückgekreuzt waren, wurden zur weiteren Verpaarung mit Balb/cByJ verwendet und die bisher nicht rückgekreuzten Regionen wurden mittels Mikrosatelliten PCR und Polyacrylamidgellelektrophorese (Abbildung 2) untersucht. Mit Hilfe dieser Methode konnte die Zeit bis zur vollständigen Rückkreuzung von zehn auf sechs Generationen reduziert werden.

---



**Abbildung 2 – Generierung LDL Rezeptor defizienter Balb/cByJ Mäuse. Diese sind heterozygot für den LDL Rezeptor knockout (BALB.Ldlr<sup>+/-</sup>)**

### 2.1.1.1 Herstellung der F1 und F2 Generation

Die F1 Generation wurde durch Verpaarung von BALB.*Ldlr*<sup>+/-</sup> mit B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup> erzeugt. Die Nachkommen (BQ 1 genannt) wurden mittels PCR auf den LDL-Rezeptor knockout getestet und die Männchen und Weibchen mit *Ldlr*<sup>-/-</sup> wurden untereinander verpaart, um die F2 Generation (BQ 2) zu bilden (Abbildung 3). Um gegebenenfalls einen Einfluss des Ursprungs der Geschlechtschromosomen und der Mitochondrien auf den Phänotyp identifizieren zu können, wurden die F1 und F2 Generationen auf zwei Wegen erzeugt. Im „cross mBALB x wB6“ (im Weiteren Cross A genannt) wurden BALB.*Ldlr*<sup>+/-</sup> Männchen mit B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup> Weibchen verpaart und die dadurch entstandene F1 Generation untereinander verpaart, um 95 Weibchen (im Weiteren F2a\_wbl genannt) und 95 Männchen (F2a\_ml genannt) der F2 zu generieren. Im „cross mB6 x wBALB“ (im Weiteren Cross B genannt) wurden männliche B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup> mit weiblichen BALB.*Ldlr*<sup>+/-</sup> verpaart. Die daraus resultierende F1 Generation wurde ebenfalls untereinander verpaart, um 92 Weibchen (F2b\_wbl) und 94 Männchen (F2b\_ml) der F2 zu erzeugen (Abbildung 4).

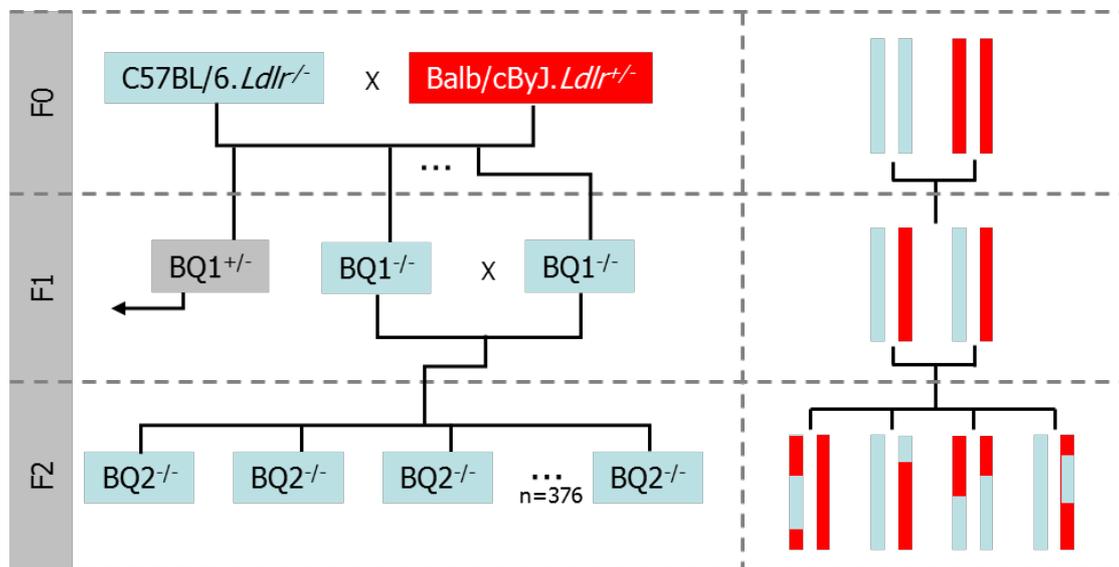
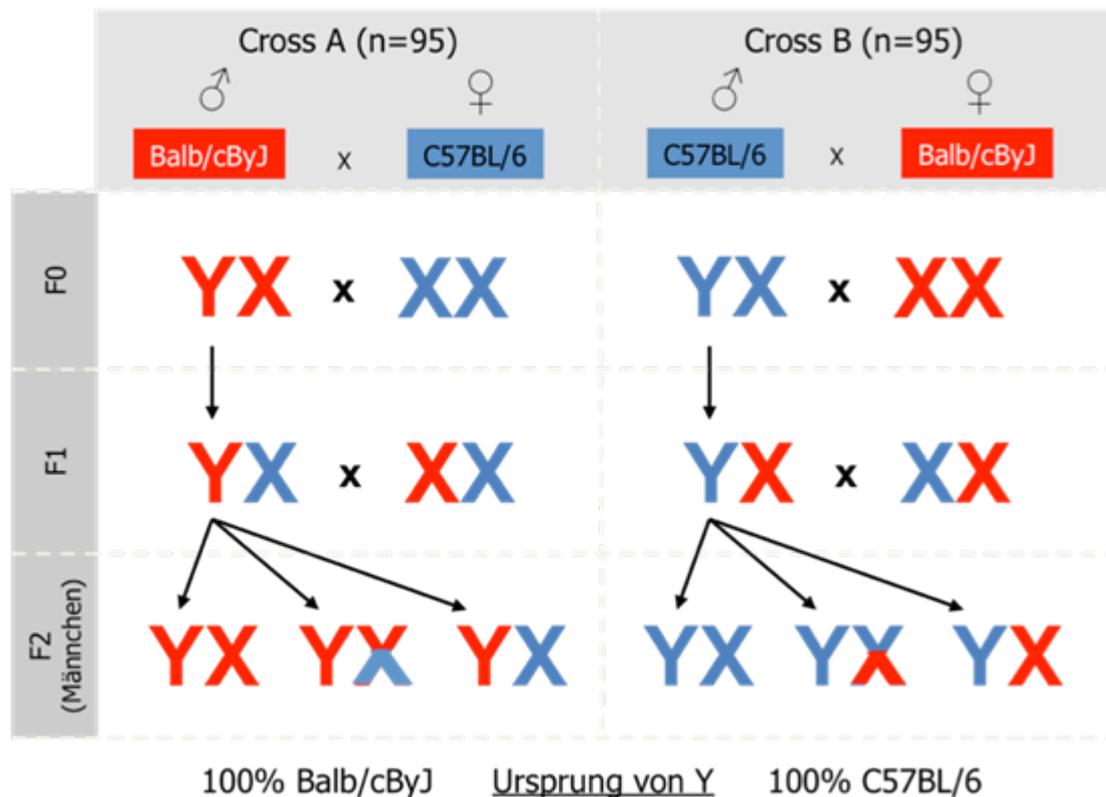


Abbildung 3 – Generierung der F1 und F2 Generation



**Abbildung 4 – Ursprung der Geschlechtschromosomen der männlichen Tiere im Cross A und Cross B**

Die Züchtung und Haltung der Tiere erfolgte am Medizinisch Experimentellen Zentrum der Universität Leipzig. Die Mäuse, die zur Phänotypisierung herangezogen wurden, wurden im Alter von 28 Tagen abgesetzt und unter Haltungsdiät (semisynthetische, modifizierte AIN76 Diät mit 0,02% Cholesterol) und Wasserzufuhr ad libitum in Gemeinschaftskäfigen (2-5 Tiere pro Käfig) 16 Wochen unter kontrollierten klimatischen und pathogenarmen Bedingungen mit einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden gehalten (Teupser et al, 2003). Die Tiertötung und Organentnahme wurden vom Regierungspräsidium Leipzig mit Aktenzeichen N5/05 genehmigt.

### 2.1.2 Organ- und Blutentnahme

Im Alter von 20 Wochen wurden die Mäuse seziiert. Am Tag der Sektion wurde das Futter entfernt unter Beibehaltung der Wasserzufuhr. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion einer gewichtsadaptierten Dosis (ca. 50 µl) eines Rompun 2% (BayerVital, Leverkusen)/Ketaminhydrochlorid 10% (WDT, Garbsen) Gemisches

(1:3) anästhesiert. Danach wurde die Körperlänge vermessen und das Körpergewicht bestimmt. In ausreichend tiefer Narkose erfolgten die Thorax-Eröffnung und die intrakardiale Blutentnahme. Dabei wurde der linke Ventrikel mit einer mit EDTA-Lösung gespülten 1 ml Spritze punktiert und bis zu 1 ml Blut gewonnen. Das antikoagulierte Vollblut wurde in einem Eppendorfgefäß, nach Entnahme von 10 µl Vollblut für die Bestimmung von HbA1c sofort bei 8000 U/min für 8 min zentrifugiert (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg). Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert und wie folgt aufgeteilt: 70 µl Plasma wurden für die Bestimmung der Lipoproteinfraktionen mittels Ultrazentrifugation aliquotiert. Jeweils 60 µl wurden für Multiplex-Zytokinbestimmung (Luminex) und Adipozytokinmessung bei -80 °C aufbewahrt. Weitere 50 µl Plasma wurden in einem Verhältnis von 1:4 mit isotonischer Kochsalzlösung vermischt und zur Bestimmung der klinisch-chemischen Laborparameter genutzt. Außerdem wurden 10 µl Plasma für die Konzentrationsmessung verschiedener Phytosterole tiefgefroren. Das Restplasma wurde bei -80 °C gelagert. Nach der Blutentnahme wurde das Gefäßsystem mit 10 ml heparinisiertem PBS (5.000 I.E. Heparin/ 1 Liter PBS) über eine Kanüle im linken Ventrikel gespült. Aus der Gallenblase wurde die Gallenflüssigkeit mit Hilfe einer kleinen Insulininjektionsspritze aufgezogen, dann Lebergewebe entnommen und beides in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Präparation der für die Atherosklerosequantifizierung benötigten Gefäßabschnitte erfolgte durch Freilegung der Aortenwurzel, des Aortenbogens sowie der Brachiocephalarterie bis über die Bifurkation in Arteria subclavia und Arteria carotis communis dextra. Nachdem die Arteria brachiocephalica am Abzweig aus dem Aortenbogen und die Arteria subclavia und Arteria carotis communis dextra ca. 1 mm distal der Bifurkation durchtrennt wurden, erfolgte die Entnahme des Präparates und das sofortige Spülen mit PBS. Die Entnahme des Herzens erfolgte nach Durchtrennung der Aorta ascendens oberhalb der Aortenwurzel. Das Herz wurde unterhalb der Klappenebene transversal gespalten. Die entnommene Brachiocephalarterie und die obere Hälfte des Herzens wurden in Tissue-Tek O.C.T. eingebettet und bei -80 °C eingefroren. Der Aortenbogen wurde abgetrennt und in flüssigen Stickstoff gebracht. Nach Eröffnung des Abdomens wurde der gesamte Gastrointestinaltrakt oberhalb des Magens und am distalen Ende des Kolons abgetrennt und das omentale Fettgewebe entfernt und gewogen. Jeweils 5 cm Jejunum und Ileum wurden entnommen, mit PBS gespült, der Länge nach aufgeschnitten und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dann wurden beide

---

Nieren und die Milz entnommen. Die Nieren wurden vom perirenal und retroperitonealen Fettgewebe freipräpariert und separat gewogen. Das parametrale/ependymale Fettgewebe wurde ebenfalls entfernt und gewogen. Zum Schluss wurden die beiden Oberschenkelknochen zur Gewinnung von Knochenmark entnommen. Die entnommenen und bei -80 °C gelagerten Gewebe wurden für spätere RNA- bzw. Proteinbestimmungen aufbewahrt.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 DNA Extraktion aus Mausschwanzspitzen

Die Gewinnung der DNA erfolgte aus Schwanzspitzenbiopsien von 21 bis 28 Tage alten Mäusen. Das Gewebe wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl 1 x Tail tip Lyse Puffer (Zusammensetzung Tabelle 2) und 50 µl Proteinase K-Lösung versetzt und bei 55 °C in einem Thermocycler über Nacht geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation für 5 min bei maximaler Drehzahl wurden 450 µl des Überstandes mit 1 ml 100 %igem Ethanol versetzt und vorsichtig geschwenkt bis die DNA in Form eines Fadens präzipitierte. Der DNA-Faden wurde mit einer verschmolzenen Glaskapillare aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in sterilem 1 x TE-Puffer (Zusammensetzung Tabelle 3) aufgelöst. Die DNA-Lösung wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

**Tabelle 2 - Zusammensetzung von 1x Tail Tip Lyse Puffer**

1 x Tail Tip Lysis Buffer		
	Endkonzentration	Endmasse/ Endvolumen
Harnstoff (Urea Powder)	8 M	480 g
Tris HCl (1M, pH 8,0)	0,2 M	200 ml
NaCl (5M)	0,4 M	80 ml
EDTA (0,5M, pH 8,0)	20 mM	40 ml
30% Sarcosyl *	1 %	33 ml (200ml bei 5%)
* 30% Sarcosyl = 10 g N-Laurylsarcosine (Sigma Best. Nr. L 9150) in 33 ml H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub> lösen		
auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub> auffüllen		

**Tabelle 3 - Zusammensetzung von 1x TE**

1 x TE (steril)	
	Endvolumen
Tris (1 M ; pH 8,0)	5 ml
EDTA ( 0,5 M; pH 8,0)	1 ml
auf 500 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub> auffüllen	

### 2.2.2 DNA Extraktion aus Leberbiopsien

Bei unzureichender DNA Gewinnung aus der Schwanzspitze wurde zusätzlich aus Leberbiopsien DNA mithilfe des Qiagen DNeasy Tissue Kit nach Angaben des Herstellers gewonnen.

#### 2.2.2.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde die Absorption bei 260 nm an einem Spectralphotometer (NanoDrop) bestimmt. Dieses System berechnet die Konzentrationen wie folgt:

Ein E<sub>260</sub> Wert von 1,0 entspricht dabei ca. 50 µg/ml doppelsträngige DNA

Die Reinheit der DNA Präparation wurde mit Hilfe des Quotienten

$$\frac{E_{260}}{E_{280}}$$

bestimmt. Hierbei entspricht E<sub>260</sub> dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren und E<sub>280</sub> dem von Proteinen. Der Quotient sollte in 1 x TE-Puffer für DNA möglichst  $\geq 1,8$  betragen (Sambrook 1989).

### 2.2.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

#### 2.2.3.1 LDL Rezeptor knockout PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten (Mullis, Faloona et al, 1986). Dies geschieht durch die zyklische Wiederholung von Aufspaltungs-/Denaturierungs-, Anlagerungs- und Verlängerungsreaktionen. In der Aufspaltungsreaktion wird der DNA-Doppelstrang komplett getrennt. Anschließend

werden Primer angelagert und von ihnen ausgehend die komplementären Stränge durch eine thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert. Die verwendeten Primer wurden von MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Standardbedingungen für die LDL knockout PCR-Amplifikation verwendet:

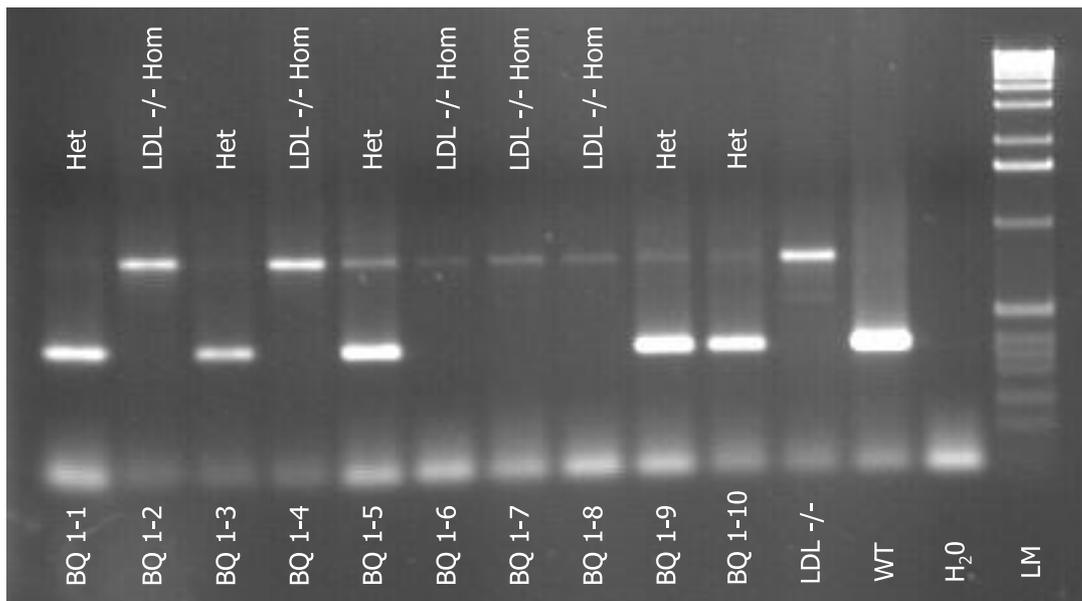
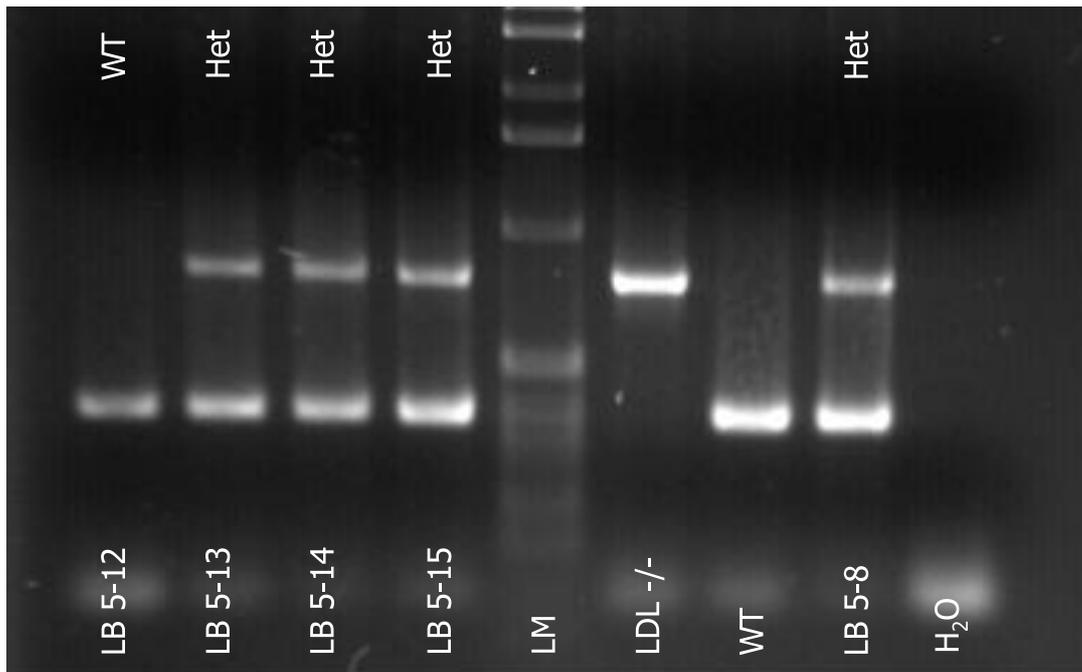
- 5 µl DNA (0,1-1 µg/µl)
- 2,5 µl 10xPCR-Puffer + MgCl<sub>2</sub> (Roche)
- 2,5 µl dNTP (TP, CTP, TTP und GTP)
- 0,625 µl IMR0046 (LDLR-ex4)
- 0,125 µl IMR0059 (LDLR-ko)
- 0,375 µl IMR0014 (LDLR-neo)
- 1,25 µl 5% DMSO
- 12,375 µl H<sub>2</sub>O
- 0,25 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl, Roche)
- Σ25 µl

Die PCRs wurden in einem GeneAmp PCR System (Applied Biosystems) Thermocycler durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen lauteten:

- 95 °C 3 min,
- 40 Zyklen: 95 °C 20 s, 57 °C 30 s, 72 °C 50 s,
- 72°C 5 min

Bei den verwendeten Primern beträgt die Annealingtemperatur, die direkt von der Länge und Zusammensetzung der Primer abhängig ist, 57 °C. Die Elongationszeiten bei 72 °C sind dagegen von der Länge des erwarteten Produktes abhängig. Pro 1kbp Produktlänge sollte bei Verwendung der Taq-Polymerase mit 30 s bis 1 min während der Wiederholung gerechnet werden (Mülhardt 2002; Mülhardt 2003). Je nach Fragmentlänge sollte der abschließende Elongationsschritt zwischen 5 und 10 min liegen, bei der LDL knockout PCR beträgt diese Zeit 5min.

LDL Rezeptor knockout heterozygote bzw. homozygote Mäuse wurden mittels dieser PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese der PCR Produkte identifiziert (Abschnitt 2.2.4). Der Identifizierung der Produktlängen dient der DNA Molecular Weight Marker X (= Lanemarker). Dieser besteht aus 23 DNA Fragmenten mit verschiedener Anzahl von Basenpaaren (bp). Nach Elektrophorese werden 19 Banden sichtbar (Abbildung 5).



**Abbildung 5 – Agarose Gelelektrophorese von LDL Rezeptor knockout PCR Produkten.** Die obere Bande entspricht einer DNA Fragmentlänge von ca. 800 bp bei LDL-Rezeptor knockout, die untere Bande stellt eine Fragmentlänge von ca. 350 bp dar, wie sie bei der Wildtyp-Maus-DNA entsteht. Sind beide Banden zu sehen sind die Proben heterozygot für den LDL-Rezeptor knockout. LB 5-8, 5-13 bis 5-15 sind in dieser Abbildung heterozygot, 5-12 zeigt den Wildtyp-Hintergrund. Von den Nachkommen in der F1 Generation (im Bild BQ 1-1 bis BQ 1-10) sind BQ 1-2, 1-4, 1-6, 1-7 und 1-8 homozygot. Die Kontrollen LM=Lanemarker, WT=Wildtyp, *Ldlr*<sup>-/-</sup>=homozygot für LDL Rezeptor knockout, H<sub>2</sub>O=Wasser sind ebenfalls aufgetragen wurden.

### 2.2.3.2 Mikrosatellitenmarker background screen PCR

Mikrosatelliten (syn. SSR - Simple Sequence Repeats oder auch SSLP - Simple sequence length polymorphism) sind kurze, nicht kodierende DNA-Sequenzen, die im Genom eines Organismus oft wiederholt werden. Die wiederholte Sequenz in einem Mikrosatelliten ist sehr einfach. Sie besteht aus zwei bis vier Nukleotiden und kann 10- bis 100-mal wiederholt auftreten. Sequenziert man am Locus eines Mikrosatelliten, so erhält man Sequenzen wie "TAGTAGTAGTAGTAGTAG...". Mikrosatelliten sind die häufigste Form repetitiver DNA. Am häufigsten sind die Dinukleotidwiederholungen vom Typ (CA)<sub>n</sub>. Diese machen etwa 0,5% des Genoms aus. In der vorliegenden Studie wurden solche Mikrosatelliten-Marker herausgesucht, die polymorph zwischen den beiden Mausstämmen C57Bl/6 und BALB/cByJ sind, um festzustellen, ob die Maus an einem bestimmten Genort das Balb/c oder C57Bl/6 Allel trägt (Abbildung 6). In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Standardbedingungen für den Mikrosatelliten Background screen mittels PCR-Amplifikation verwendet:

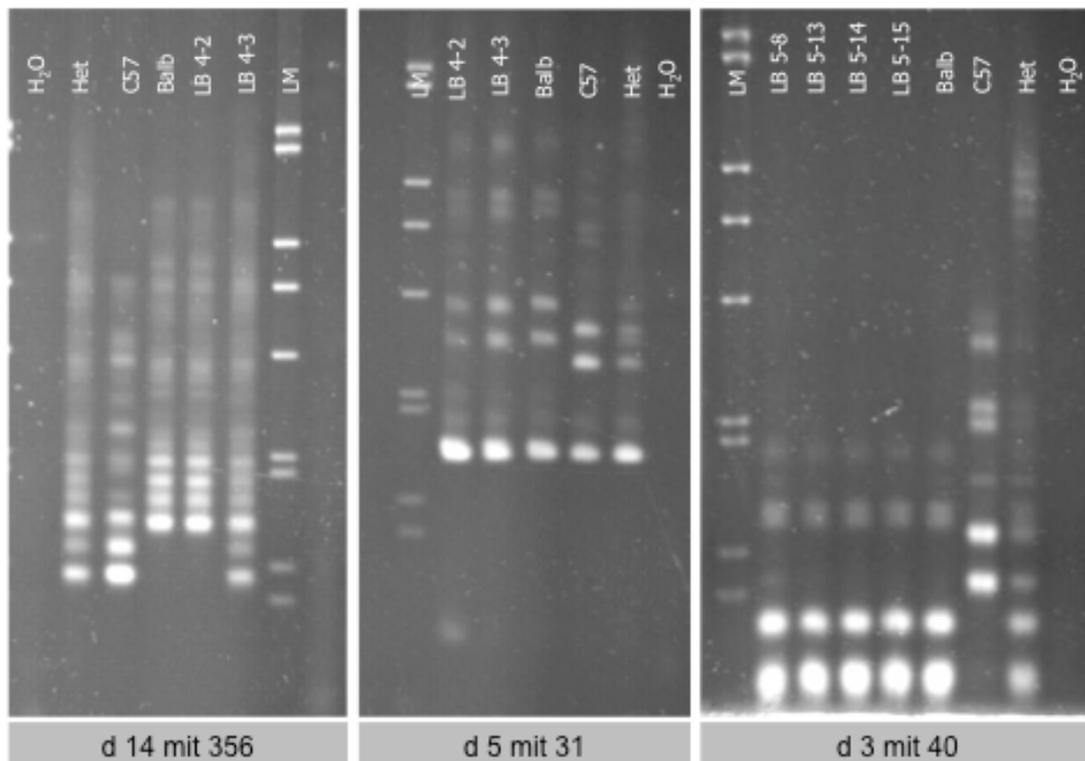
- 4 µl DNA (0,1-1 µg/µl)
- 2,5 µl PCR-Puffer
- 2,5 µl dNTP (TP, CTP, TTP und GTP)
- 0,25 µl Taq Polymerase (Roche)
- 1 µl forward Primer
- 1 µl reverse Primer
- 13,75 µl H<sub>2</sub>O

Die PCRs wurden ebenfalls in einem GeneAmp PCR System (Applied Biosystems) Thermocycler durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen lauteten:

- 95 °C 4 min,
- 40 Zyklen: 95 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s,
- 72 °C 5 min

Die Reaktionsprodukte wurden anschließend mittels Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Abschnitt 2.2.5)

---



**Abbildung 6 – Beispiel für Marker assisted backcross:** Polyacrylamidgelelektrophorese von PCR Produkten auf Chromosom 14, an der Stelle des Markers d14mit356 (links), Chromosom 5 bei d5mit31 (Mitte) und Chromosom 3 bei d3mit40 (rechts). Es sind jeweils die Kontrollen Wasser, C57/Bl6, Balb/c, Heterozygote und Lanemarker neben den zu untersuchenden Mausproben aufgetragen. Im linken Bild ist zu erkennen, dass LB 4-2 an dieser Stelle im Genom homozygot für das Balb/c Allel ist, während LB 4-3 heterozygot an dieser Position ist. Die mittlere Abbildung zeigt die Übereinstimmung von LB 4-2 und 4-3 mit Balb/c. Das rechte Bild zeigt, dass die Mäuse der 5. Generation (LB 5-8, 5-13-15) an dieser Stelle alle homozygot für das Balb/c Allel sind.

### 2.2.3.2.1 Genom Scan der F2 Generation mit Mikrosatellitenmarkern

Eine genomweite Kartierung der F2 Generation wurde am Genomics Resource Center der Rockefeller University in New York City mittels Mikrosatelliten-PCR durchgeführt. Die dafür notwendige DNA wurde aus Mausschwanzspitzen oder Lebergewebe gewonnen (Abschnitte 2.2.1 und 2.2.2) und in 384 well Platten gekühlt nach New York verschickt. Die Mikrosatelliten-Marker, welche alle 19 Chromosomen und das X-Chromosom in einem durchschnittlichen Abstand von 13 centiMorgan (cM) abdecken, wurden zuvor auf das Vorhandensein eines Polymorphismus zwischen B6 und Balb untersucht. Die Forward Primer wurden fluoreszierend mit den Farbstoffen 6-

carboxyfluorescein (FAM), 4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-Carboxyfluorescein (HEX) und 2,7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein (NED) markiert. Die Reverse Primer waren nicht markiert, jedoch wurde eine GCTTCT Sequenz an das 5`-Ende angehängt, um „stutter bands“ zu reduzieren (Brownstein et al, 1996). Die Marker wurden auf 13 Platten von jeweils 8 bis 10 Markern gruppiert. Der initiale Genomscan wurde mit 107 Markern in einem Abstand von ca. 13 cM durchgeführt. Die Namen der Marker sowie ihre Fluoreszenz-Markierung sind in der Tabelle 4 aufgezeigt. Die PCR Reaktionen wurden in 384 well Platten mit 10-50 ng getrockneter DNA durchgeführt. Der PCR Mastermix beinhaltete den PCR Puffer (5 mM KCl, 1 mM Tris pH 9.0, 250 µM MgCl<sub>2</sub>), 200 µM jedes dNTP, 0,02 U/µl Taq Polymerase (Fisher Scientific) und 0,3 µl eines 8 µM Primer Mix von jedem forward und reverse Primer in einem Gesamtvolumen von 5 µl. Die PCR Produkte wurden den Panels nach geordnet und mittels Kapillarelektrophorese eines 3700 DNA-Sequenzers getrennt und mit der GENOTYPER software (Applied Biosystems) analysiert.

**Tabelle 4 - Zur Genotypisierung verwendete Mikrosatellitenmarker**

Marker	Label	Panel	C57 Allel (bp)	BALB Allel (bp)
D17MIT87	FAM	1	89.5	93.6
D6MIT86	FAM	1	133.7	121.9
D14MIT203	FAM	1	157.7	174.1
D7MIT253	HEX	1	89.1	87.1
D8MIT121	HEX	1	256.5	228.9
D11MIT350	NED	1	102.8	98.6
D3MIT63	NED	1	120.5	124.7
D9MIT239	NED	1	202.2	198.1
D13MIT76	FAM	2	108.7	100.6
D17MIT164	FAM	2	132.4	122.8
D2MIT74	FAM	2	159	161.2
D13MIT236	HEX	2	98.5	88.8
D2MIT518	HEX	2	111.8	125.3
D18MIT69	HEX	2	154	158.1
D14MIT7	NED	2	110.3	100.2

D16MIT86	NED	2	130.2	124.1
D8MIT348	NED	2	208.4	200.2
D18MIT185	FAM	3	100.9	96.7
D2MIT1	FAM	3	130	125.7
D4MIT178	FAM	3	154.1	178.7
D7MIT101	HEX	3	118.3	95.2
D17MIT123	HEX	3	136.3	142.1
D15MIT154	HEX	3	157.2	159.3
D11MIT360	NED	3	126.7	102.3
D4MIT181	NED	3	139.8	150
D16MIT189	NED	3	209.3	203.3
D1MIT136	FAM	4	103.4	109.5
DXMIT216	FAM	4	126.4	132.7
D12MIT164	FAM	4	148.2	152.7
D12MIT82	FAM	4	169.5	167.6
D8MIT124	HEX	4	132	137.9
D3MIT74	HEX	4	155.5	151.4
D10MIT233	NED	4	132.9	106
D5MIT31	NED	4	225	239.2
D2MIT409	FAM	5	105.7	99.2

D10MIT106	FAM	5	126.1	124.1
D13MIT88	FAM	5	172.3	184.1
D7MIT223	HEX	5	107.7	103.7
D7MIT152	HEX	5	130.4	126.5
D6MIT216	HEX	5	154.2	152.2
D4MIT68	NED	5	106.3	110.4
D13MIT139	NED	5	140.8	146.6
D2MIT66	NED	5	262.1	279.4
D6MIT274	FAM	6	117.6	96
D7MIT62	FAM	6	150.5	134.7
D12MIT34	FAM	6	175.5	190.3
D4MIT195	HEX	6	109.3	113.6
D19MIT71	HEX	6	136.89	150.63
D1MIT178	HEX	6	184.4	165.8
D10MIT271	FAM	7	119.1	99
D4MIT256	FAM	7	139.9	137.9
D15MIT176	FAM	7	156	158
D3MIT107	FAM	7	198.5	212
D16MIT103	HEX	7	114.4	110.4
D18MIT208	HEX	7	128.3	126.2
D10MIT80	HEX	7	157.1	142.6
D18MIT24	HEX	7	179.4	205.4
D7MIT248	NED	7	110.9	108
D16MIT139	NED	7	152.6	178.6
D9MIT151	FAM	8	121.5	110.5
D11MIT1	FAM	8	161	165
D5MIT201	HEX	8	115.3	111
D12MIT60	HEX	8	149.8	143.7
D7MIT267	HEX	8	200.6	185.9
DXMIT223	NED	8	108.7	112.7
D9MIT78	NED	8	131.4	127.1
D8MIT178	NED	8	154.8	165.2
D3MIT320	FAM	9	122.2	114.0
D1MIT296	FAM	9	146.6	138.9
D3MIT60	FAM	9	172.5	162.3
D1MIT155	FAM	9	255.8	219.3
D11MIT270	HEX	9	126.3	114.3

D5MIT249	HEX	9	144	145.8
D3MIT19	HEX	9	160	165.9
D15MIT67	HEX	9	194.3	192.3
D6MIT67	NED	9	156.1	160
D17MIT115	FAM	10	123.1	113.5
D10MIT20	FAM	10	236.8	224
D8MIT166	HEX	10	122.3	118.2
D2MIT7	HEX	10	148.3	146.3
D2MIT504	HEX	10	202.4	198.5
D9MIT259	NED	10	114.1	118.1
D12MIT134	NED	10	186.2	188
D5MIT73	FAM	11	117.2	119.2
D11MIT151	FAM	11	142.7	154.5
DXMIT124	FAM	11	180.9	177
D3MIT51	FAM	11	243.5	257.8
D14MIT267	HEX	11	116.8	118.9
D15MIT35	HEX	11	148	152.4
D12MIT4	HEX	11	209.2	198.7
D14MIT60	NED	11	137.8	114.1
D15MIT252	FAM	12	124.1	117.6
D14MIT244	FAM	12	148.8	144.1
D18MIT144	FAM	12	183	178.8
D6MIT159	HEX	12	119.2	144.1
D11MIT39	HEX	12	172.9	158.7
D6MIT15	HEX	12	257.7	200.1
D1MIT359	NED	12	123.7	116.6
D19MIT42	NED	12	179.7	185.6
D1MIT320	FAM	13	90	92
DXMIT68	FAM	13	128.8	120.9
D5MIT233	FAM	13	149.9	171.9
D13MIT191	HEX	13	122.9	127
DXMIT114	HEX	13	153.2	159.5
D13MIT78	HEX	13	231.7	212.1
D19MIT23	NED	13	200.3	189.6
D8MIT65	NED	13	242.9	290.6

### 2.2.3.2.2 Finemapping mittels Single Nucleotid Polymorphisms (SNPs)

Die für das Finemapping verwendeten SNPs wurden Datenbanken (<http://www.informatics.jax.org/>) entnommen und experimentell mit Hilfe von DNA Sequenzierung verifiziert. Diese 12 SNPs wurden anhand von Schmelzkurven-Analyse, basierend auf einer Methode mit fluoreszenzmarkierten DNA Sonden (Teupser et al, 2008), ausgewertet. Das Finemapping diente der Eingrenzung eines neu entdeckten QTLs auf einem Chromosomenabschnitt der Chromosomen 2, 3, 6 und 8. Dies erfolgte durch eine engere Abdeckung der auf dem Chromosom verteilten SNPs. So wurden auf Chromosom 2 drei zusätzliche Marker bei 30 (rs27193625), 35 (rs27192030) und 65 (rs13476554) Mb, für Chromosom 3 zwei Marker bei 40 (rs13477072) und 60 (rs13477139) Mb, für Chromosom 6 drei SNP Marker bei 65 (rs13478802), 85 (rs13478865) und 125 (rs4226262) Mb und für das Chromosom 8 4 zusätzliche Marker bei 20 (rs13479643), 40 (rs13479723), 60 (rs13479792) und 120 (rs13480021) Mb zur Genotypisierung verwendet (Tabelle 5). Da das Chromosom 19 von Mikrosatellitenmarkern nicht in ausreichend kleinen Abständen abgedeckt war, wurden ebenfalls zusätzlich SNPs bei 15, 35, 40, 45 und 60 Mb zur Genotypisierung herangezogen.

**Tabelle 5 – Zusätzliche SNP Marker zum Finemapping**

SNP	Chromosom	Position (Mb)
rs13476554	2	65
rs13477072	3	40
rs13477139	3	60
rs13478802	6	65
rs13478865	6	85
rs13479643	8	20
rs13479723	8	40
rs13479792	8	60
rs13480021	8	120
rs27192030	2	35
rs27193625	2	30
rs4226262	6	125

Folgende PCR Bedingungen wurden zur Genotypisierung für das Finemapping auf Chromosom 2 verwendet:

- 1  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM)
- 0,63  $\mu\text{l}$  10 x Puffer
- 0,63  $\mu\text{l}$  dNTP Mix (2,5 mM)
- 0,06  $\mu\text{l}$  Est Taq Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )
- 0,13  $\mu\text{l}$  Primer-Sonden-Mix
- 0,31  $\mu\text{l}$  BSA NEB (10 mg/ml)
- 2,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- $\Sigma$  5,25  $\mu\text{l}$

Hinzu kam jeweils 1  $\mu\text{l}$  der Proben DNA.

Die PCRs wurden ebenfalls in einem GeneAmp PCR System (Applied Biosystems)

Thermocycler durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen lauteten:

- 95 °C 3 min
- 45 Zyklen: 95 °C 20 s, 62,5 °C 30 s, 72 °C 1 min,
- 72 °C 7 min
- 95 °C 3 min
- 30 °C 2,5 min
- 90 °C 15 s

Für Chromosom 3, 6, 8 und 19 herrschten folgende Bedingungen:

- 1  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM)
- 0,63  $\mu\text{l}$  10xPuffer
- 0,63  $\mu\text{l}$  dNTP Mix (2,5 mM)
- 0,06  $\mu\text{l}$  Est Taq Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ )
- 0,37  $\mu\text{l}$  Primer-Sonden-Mix
- 0,31  $\mu\text{l}$  BSA NEB (10 mg/ml)
- 2,25  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- $\Sigma$  5,25  $\mu\text{l}$

Hinzugefügt wurde jeweils 1  $\mu\text{l}$  der Proben auf ein Gesamtvolumen von 6,25  $\mu\text{l}$ .

Die Thermocycler-Reaktionsbedingungen lauteten:

- 95 °C 3 min
  - 45 Zyklen: 95 °C 20 s, 61 °C (bzw. 62,5 °C für Chr 19) 30 s, 72 °C 1 min,
  - 72 °C 7 min
  - 95 °C 3 min
  - 30 °C 2,5 min
  - 90 °C 15 s
-

### 2.2.4 Agarosegel-Elektrophorese

Aufgrund ihrer negativen Ladung sind Nukleinsäuregemische durch Gel-Elektrophorese trennbar. Dabei haben die Länge der Nukleinsäure und ihre Sekundärstruktur einen Einfluss auf die Mobilität. Diese verhält sich umgekehrt proportional zur molaren Masse. DNA wurde elektrophoretisch auf TAE Agarosegelen analysiert. Die Massenkonzentration des Gels wurde entsprechend der erwarteten Größe der Fragmente gewählt (0,8-2,5% Agarose). Der Molecular Weight Marker X (Roche Diagnostics) wurde als Längenstandard mitgeführt. Der TAE Kammerpuffer bestand aus 2 M Tris-acetate und 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA (pH 8,0). Nach einer Laufzeit von 30-90 Minuten bei 80 Volt wurde das Gel für 5 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml in 1x TAE) gefärbt. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um einen roten Phenathridin-Farbstoff, ein aromatisches Kation, welches zwischen den Basen der DNA interkaliert und im UV-Bereich bei 302 nm zur Fluoreszenz gebracht werden kann. Die Fluoreszenz wird durch die Interaktion mit den DNA-Basen noch intensiviert, sodass sehr kleine DNA-Mengen detektiert werden können ( $\geq 50$  ng) (Voet 2002). Nach Beendigung der Färbung wurde das Gel durch Elektrophorese für 5 min entfärbt und anschließend mit UV-Licht einer Wellenlänge von 256 nm dokumentiert.

### 2.2.5 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zunächst erfolgt die Herstellung eines 8%igen Polyacrylamidgels nach folgendem Prinzip:

- H<sub>2</sub>O 29,1 ml
- 10xTBE Puffer 2 ml
- Glycerol (99%) 500 µl
- 40% 1:29 Acrylamid 8 ml
- 10% Ammoniumperoxidsulfat 400 µl
- TEMED 30 µl

Das nach dieser Methode hergestellte Gel wurde zwischen 2 Glasplatten pipettiert, war nach 2 Stunden auspolymerisiert und konnte in die Elektrophoresekammer überführt werden. Der Kammerpuffer bestand aus 0,25 x TBE Puffer. Dieser wurde aus 50 ml 10xTBE und 2 Liter DEPC Wasser hergestellt. 10xTBE Puffer setzte sich wiederum aus 107,8 g Tris, 55 g Borsäure und 7,44 g EDTA auf 1000ml Aqua mit einem pH von 8,3 zusammen. Auf 14 µl DNA wurden 1,5 µl Loading buffer (Ladepuffer= Farbstoff) pipettiert und die Platte für 1 min bei 800 g zentrifugiert. Es wurden jeweils 1 Liter Kammerpuffer oben und unten in eine Vertikalkammer und

das Gel bei 60 Volt über 18 Stunden bei 4 °C laufen gelassen. Daraufhin wurde das Gel für 45 Minuten in einer 1 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Anschließend wurde das Gel unter UV Licht mit einer Wellenlänge von 256 nm dokumentiert.

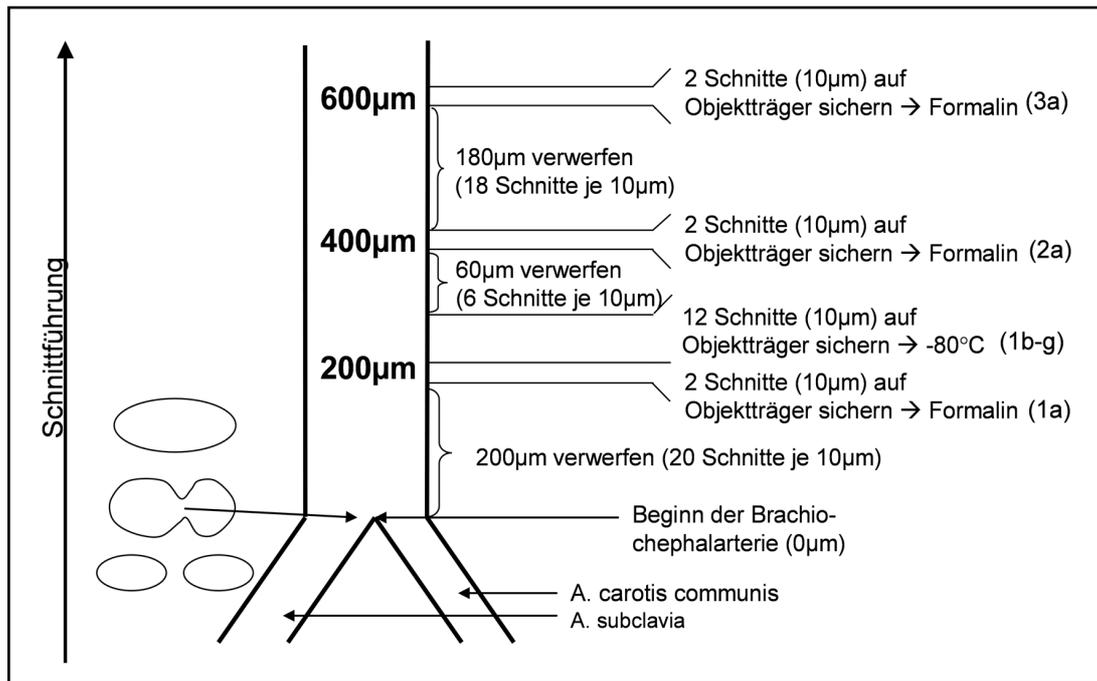
## **2.3 Phänotypisierung**

### **2.3.1 Histologische Aufbereitung der Brachiocephalarterie**

Die Aufarbeitung der für die Atherosklosequantifizierung wichtigen Gefäßabschnitte der Brachiocephalarterie, beginnend 200 µm cranial der Bifurkation von A. carotis communis und A.subclavia (Abbildung 7) erfolgte nach der Methode von Teupser et al. (Teupser, Persky et al, 2003). Zur Quantifizierung der Atherosklose erfolgte die Anfertigung von 10 µm dicken Schnitten der Brachiocephalarterien. Die Schnitttemperatur betrug -30 °C und je 2 Schnitte wurden auf einem Objektträger (Superfrost plus, Menzel) aufbewahrt.

Die in Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. Compound) bei -80 °C aufbewahrten Gefäße wurden so im Mikrotom eingespannt, dass die A. subclavia dextra und A. carotis communis dextra zuerst geschnitten wurden. Die Bifurkation wurde als Startpunkt für die Schnittverwahrung definiert. Die ersten 20 Schnitte wurden verworfen. Die folgenden beiden Schnitte (200 µm vom Startpunkt) wurden auf einem Objektträger asserviert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Die nächsten 12 Schnitte wurden auf 6 Objektträger aufgebracht und bis zur immunhistochemischen Färbung ebenfalls bei -80 °C aufbewahrt. Bei 400 µm und 600 µm vom Startpunkt wurden jeweils 2 Schnitte für die Quantifizierung der Atherosklose asserviert und tiefgefroren (Abbildung 7).

---



**Abbildung 7 – Aufbereitung der Brachiocephalarterie**

### 2.3.2 Histologische Färbung der BCA

Zur quantitativen Analyse der Atherosklerose wurden die Schnitte 1a, 2a und 3a der Brachiocephalarterien einer histologischen Färbung mit Ölrot O, Lichtgrün und Haematoxylin unterzogen. Dabei färbt Ölrot O intra- und extrazelluläre Lipide rot, Lichtgrün färbt elastische Fasern grün und Zellkerne werden durch Haematoxylin dunkelblau gefärbt. Die Objektträger wurden bis zur Färbung in formalindampfgesättigten Kammern bei -80 °C aufbewahrt und fixiert. Die Ölrot-O-Färbung erfolgte mechanisiert mit Hilfe des Varistain Gemini (Shandon, Frankfurt/Main) nach folgendem Protokoll: Die Objektträger wurden für 2 Minuten in Behältnissen mit Wasser gewaschen (nach 1 Minute wurde das Behältnis gewechselt), danach 30 Sekunden in 60% Isopropanol. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit 0,24% Ölrot (Aldrich, St. Louis). Nach 18 Minuten wurden die Objektträger mit 60%igem Isopropanol (30 s) und Wasser (2 x 1 min) gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger nochmals 2 Minuten lang in 2,4% Haematoxylin gegengefärbt, bevor sie 1 Minute in die Blueing-Lösung gegeben wurden. Nochmals wurden die Objektträger 1 Minute mit Wasser gewaschen. Nach der zweiten Waschung wurden die Objektträger 30 Sekunden lang mit Lichtgrün inkubiert und anschließend ein drittes Mal gewaschen. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit der zuvor auf 55 °C angewärmten Glycerol-Gelatine und Deckgläschen luftblasenfrei abgedeckt.

### **2.3.3 Quantifizierung der atherosklerotischen Plaques an der BCA**

Zur quantitativen Analyse der atherosklerotischen Läsionen wurden die mit Ölrot O gefärbten Schnitte verwendet. Mit Hilfe eines Zeiss-Mikroskop (Axioskop) wurden Bilder der Brachiocephalararterien (Vergrößerung 5-fach) angefertigt und digital gespeichert (AxioVision/SCD950). Die Auswertung erfolgte mit der Zeiss-Image-Software KS300 Version 3.0 (Zeiss, Jena). Die rot gefärbten und somit lipidhaltigen Areale der Intima wurden manuell mit Hilfe der Software umrandet und somit die Größe der Fläche bestimmt. Der Mittelwert der Fläche der Läsionen der Schnitte 1a, 2a und 3a ergab die intimale Läsionsgröße der Brachiocephalarterie (Teupser, Pavlides et al, 2004)

### **2.3.4 Klinische Chemie**

Die klinisch-chemischen Analysen erfolgten nach den Richtlinien der Bundesärztekammer (RiliBÄK) unter Standardbedingungen mit Qualitätskontrollen. Die bei der Sektion der Tiere gewonnenen 50 µl Plasma wurden in einem 1:4 Verhältnis mit isotonischer Kochsalzlösung gemischt und die Bestimmung der Laborparameter ALAT, ASAT, Cholinesterase, LDH, GLDH, Glucose, Triglyzeride, Cholesterol, Harnstoff und Protein mittels automatisierter Messgeräte (Modular PPE, Roche) unseres Institutes durchgeführt.

### **2.3.5 Fraktionierung der Lipoproteine**

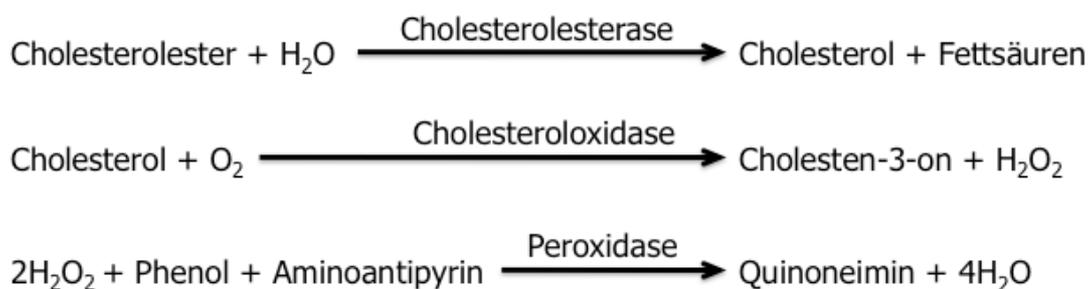
Mittels Ultrazentrifugation erfolgte eine quantitative Bestimmung der Lipoproteine (Ultrazentrifuge Optima L-90K, Rotor Typ 42.2 Ti; Thickwall Cellulose Propionate Zentrifugenröhrchen 7 x 20 mm; Beckman, Irvine, CA, USA). In ein Zentrifugenröhrchen wurden 60 µl Mausplasma gegeben, mit 60 µl PBS überschichtet und anschließend zentrifugiert (4 °C, 40000 U/min, 3 h). Mit Hilfe einer 100 µl Hamilton Spritze (HPLC Mikroliterspritze, Roth) wurden nun 60 µl des Unterstandes in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Zwischen den einzelnen Proben wurde die Hamilton-Spritze mit destilliertem Wasser gespült. Mit einer Pipette erfolgte die Überführung der verbliebenen 60 µl ebenfalls in ein neues Zentrifugenröhrchen. Nun erfolgte die Zugabe von 60 µl KBr-Lösung (Dichte = 1,12 g/ml) zum Unterstand und es erfolgte eine erneute Zentrifugation (4 °C, 40000 U/min, 18h). Der daraus entstandene Unterstand ergibt das HDL, der Überstand besteht aus LDL. HDL wurde mittels einer Hamilton Spritze, LDL mit einer Pipette in jeweils ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Der Überstand der ersten Zentrifugation wurde mit 60 µl

PBS überschichtet und ebenfalls zentrifugiert (4 °C, 40000 U/min, 18 h). Der so entstandene Unterstand ergibt das LDL und wurde mittels einer Hamilton Spritze in das LDL Eppendorfgefäß gegeben. Der Überstand, welcher das VLDL ergibt wurde mit einer Pipette in ein weiteres Eppendorfgefäß transferiert. In allen Fraktionen erfolgte die unverdünnte Messung von Cholesterolem und Triglyceriden. Die LDL-Werte mussten mit Faktor 2 multipliziert werden, um die Vorverdünnung auszugleichen. Die Dichte der Plasmalipoproteinfraktionen betrug für

- **VLDL:** < 1,006 g/ml
- **IDL, LDL:** 1,006 - 1,063 g/ml
- **HDL:** > 1,063 g/ml

### 2.3.6 Lipidanalytik

Zur Bestimmung von Gesamtcholesterolem und -triglyceriden im Mausplasma wurde das durch kardiale Punktion gewonnene Plasma 1:5 verdünnt und anschließend die entsprechende Konzentration gemessen. Bei Bestimmung von Gesamtcholesterolem und -triglyceriden in den zuvor gewonnenen Lipoproteinfraktionen wurden die Proben unverdünnt eingesetzt. Die Cholesterolembestimmungen wurden manuell in einer Mikrotiterplatte im 96-Loch Format durchgeführt. Dabei wurden 10 µl der Probe mit 200 µl Cholesterolem-Reagenz (Roche, Mannheim) vermischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Während der Inkubation fand eine konzentrationsabhängige Farbreaktion statt. Das Testprinzip (CHOD-PAP->Cholesterolem Oxidase Phenol 4-Aminoantipyrine Peroxidase) beruht auf einer enzymatischen Reaktion. Cholesterolem wird nach enzymatischer Hydrolyse und Oxidation bestimmt. Der Indikator Quinoneimin wird von Wasserstoffperoxid und 4-Aminoantipyrin in Anwesenheit von Phenol und Peroxidase gebildet (Abbildung 8).



**Abbildung 8 – Prinzip der Cholesterolem-Messmethode CHOD-PAP**

Die anschließende Messung erfolgte mit Hilfe des Extinktionsmessgerätes „SPECTRA Flour“ (Tecan, Crailsheim, Lichtstrahlverfahren) bei 500 nm. Kalibratorverdünnungen

mit 50, 100, 200 und 400 mg/dl Cholesterol (Sigma, Taufkirchen) dienten als Standard.

Die Triglyzeridbestimmung erfolgte analog der Cholesterolbestimmung mit entsprechendem Triglyzerid-Reagenz (Roche, Mannheim). Hier beruht das Prinzip (GPO-PAP->glycerol phosphate oxidase-p-aminophenazone) ebenfalls auf einer enzymatischen Reaktion. Der Hydrolyse von Triglyceriden zu Glycerol folgt die Oxidation zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid. Letzteres reagiert mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorophenol unter der katalytischen Wirkung der Peroxidase zu dem roten Indikatorfarbstoff.

### **2.3.7 Messung der Phytosterole**

Die Phytosterolkonzentrationen wurden mittels Tandem Massenspektrometrie (APPI-LC-MS/MS (API 3000) ermittelt. Diese Methode basiert auf einer Kopplung der Flüssigkeitschromatographie (LC) mit der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) unter Nutzung von Photoionisation unter atmosphärischem Druck (APPI). Dies erlaubte eine simultane Quantifizierung von freiem und verestertem Betasitosterol, Brassicasterol, Campesterol und Stigmasterol (Lembke et al, 2005). Ebenfalls wurde Lanosterol, ein Zwischenprodukt bei der Biosynthese von Cholesterol, gemessen. Als Untersuchungsmaterial dienten 10 µl Serum, welches stabil bei -80 °C gelagert wurde. Die benötigten Reagenzien für den Ansatz waren:

- Interner Standard d<sub>5</sub>-Phytosterole
  - Interner Standard d<sub>7</sub>-Cholesterol
  - Isopropanol (HPLC, gradient grade)
  - Methanol (HPLC, gradient grade)
  - Acetonitril (HPLC, gradient grade)
  - Stigmasterol (ST)
  - Campesterol (CA)
  - Brassicasterol (BR)
  - Lanosterol (LA)
  - β-Sitosterol (SI)
  - Cholesterol (CH)
-

Die Herstellung der benötigten Lösungen und Kalibratoren sowie der Ansatz der Proben erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

- Herstellung Interner Standard (IS)-Stammlösung:
  - 1 g/l Interner Standard d<sub>5</sub>-Phytosterole in Isopropanol lösen (= IS, d<sub>5</sub>-PS-Mix; davon 10ml herstellen), Lagerung bei –80 °C
  - 100 mg/l Interner Standard d<sub>7</sub>-Cholesterol in Isopropanol lösen (= IS, d<sub>7</sub>-Chol; davon 10ml herstellen), Lagerung bei –80 °C
- Herstellung IS-Gebrauchslösung:
  - 100 µl IS, d<sub>5</sub>-PS-Mix und
  - 100 µl IS, d<sub>7</sub>-Cholin 100 ml Methanol/ Acetonitril 1+1 lösen, Lagerung bei –40 °C, Haltbarkeit 1 Woche

#### **Kalibratoren:**

- Herstellung Stammlösungen:
  - je 1 g/l für alle Phytosterole (ST, CA, BR, LA und SI) in Isopropanol Lagerung bei –80 °C
  - 10 g/l Cholesterol (CH) in Isopropanol, Lagerung bei –80 °C
- Herstellung Eichkurven:
  - Phytosterolkalibratoren
    - C5 je 50 mg/l aus den Stammlösungen in Isopropanol
    - C4 10 mg/l
    - C3 2 mg/l
    - C2 0,5 mg/l
    - C1 0,1 mg/l, Lagerung bei –80 °C
  - Cholesterolkalibratoren
    - CC3 2000 mg/l aus Stammlösung in Isopropanol
    - CC2 500 mg/l
    - CC1 100 mg/l
    - CC001 10 mg/l, Lagerung bei –80 °C
    - Blank Isopropanol

#### **Kontrollen:**

- KS Serumkontrolle
  - KH Serumkontrolle + Steroladdition
  - KM Phytosterolkontrolle in Isopropanol, Lagerung bei –80 °C
-

Zunächst wurden die Kalibratoren mengenmäßig für 2 Bestimmungen, jeweils am Anfang und am Ende einer Messung, sowie die KM Kontrolle (siehe oben) ebenfalls für Anfang und Ende des Laufes, sowie nach jeder 20sten Probe, in ein Eppendorf-Safelock-Tube überführt. Die Kalibratoren, Kontrollen, IS-Standardlösung und die Proben wurden auf Raumtemperatur erwärmt. 490 µl der IS-Gebrauchslösung wurden in ein Eppendorf-Gefäß vorgelegt, dazu wurden 10 µl der zu untersuchenden Proben pipettiert und anschließend für 5 Sekunden gevortext. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 1300 U/min zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde in Autosampler-Vials pipettiert und bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt, bzw. bei einem Zeitraum >1 Tag bei -40 °C eingefroren.

## **2.4 Statistische Auswertung**

### **2.4.1 Statistische Analyse und Bioinformatik**

Alle Daten wurden, wenn nicht anders angegeben, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Beurteilung der Normalverteilung wurde mit der PRISM Statistik Software (GraphPad, San Diego) anhand des Kolmogorov-Smirnov Test durchgeführt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurden der Kruskal-Wallis Test mit anschließendem Dunn's Test verwendet. Der Vergleich zweier Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney Test durchgeführt. Für die Kopplungsanalysen wurden die Daten der atherosklerotischen Läsionsgröße der Brachiocephalarterie in eine semiquantitative Verteilung transformiert, um eine Normalverteilung zu erzielen. Alle anderen Phänotypen, die signifikant von einer Normalverteilung abwichen, wurden entweder logarithmiert oder in die Quadratwurzel umgewandelt, um sie in eine Normalverteilung zu überführen. Kopplungsanalysen für einzelne QTL's wurden mit MapManager QTX Version b20, frei erhältlich unter [www.mapmanager.org](http://www.mapmanager.org) (Manly et al, 2001), ausgeführt. Die Signifikanzniveaus für die LOD (logarithm of the odds) scores wurden empirisch durch Permutationstests (n=1000) bestimmt. Informationen über syntene Regionen zwischen Maus und Mensch wurden der Ensembl Datenbank ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) und Haplotyp-Informationen dem Mouse Haplotype Block viewer (erhältlich unter <http://mouse.perlegen.com/mouse/mousehap.html>) entnommen. Informationen über Gene, die auf durch QTL Mapping identifizierten Chromosomenabschnitten lokalisiert sind, wurden mit Hilfe von JAX Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/>) gewonnen.

---

### 2.4.2 Kopplungsanalyse

Zur Lokalisation der QTL's wurde die Map Manager QTXb20 software (<http://mapmgr.roswellpark.org/>) (Manly et al, 2001) verwendet. Da sich die Ausprägung atherosklerotischer Läsionen, sowie weitere phänotypische Merkmale bei männlichen und weiblichen Mäusen, signifikant unterscheidet, wurden alle Analysen nach Geschlechtern getrennt durchgeführt. Eine likelihood ratio statistic (LRS) wurde generiert, um die Signifikanz der Korrelation eines genetischen Markers mit dem Merkmal zu bestimmen. Die „Log of the odds ratio“ (LOD) scores wurden durch Division der LRS mit 4,6 berechnet. Der LOD score vergleicht die Wahrscheinlichkeit, die Ergebnisse zu erhalten, wenn die Loci miteinander verlinkt sind, mit der Wahrscheinlichkeit dieselben Werte durch puren Zufall zu erhalten. Eintausend Permutationen der Merkmalswerte wurden zur Bestimmung der empirischen Signifikanzgrenzen „suggestiv“, „signifikant“ und „hoch signifikant“ der LOD scores verwendet. Loci, die die 95. Perzentile der Permutationsverteilung überschritten, wurden als signifikant ( $P < 0,05$ ), Loci, die die 37. Perzentile übertreffen als suggestiv ( $P < 0,63$ ) definiert. Ein p-Wert  $< 0,001$  wurde als hoch signifikant angesehen. Der p-Wert ist ein Maß dafür, wie häufig die Daten rein zufällig beobachtet werden könnten. So gilt beispielsweise ein p-Wert von 0,05 für gewöhnlich als signifikant, da dieser Wert eine nur 5%-ige Wahrscheinlichkeit für eine rein zufällige Beobachtung dieser Daten angibt. Das „support intervall“ (SI) für jeden QTL wird durch einen Abfall des QTL Peaks um 1-LOD bestimmt. Der Allel-Einfluss eines jeden QTL wurde mit Hilfe der Mittelwerte der Phänotypen für jeden der drei möglichen Genotypen ermittelt. Mittels ANOVA (Analysis of Variance) wurde bestimmt, ob sich die Mittelwerte der Phänotypen der Nachkommen mit verschiedenen Genotypen an einem bestimmten Marker signifikant unterscheiden. Demnach wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen, wodurch ermittelt werden kann, ob sich die Gruppen signifikant unterscheiden. Die Unterschiede gelten als statistisch signifikant, wenn  $P < 0,05$  ist. Voraussetzung für die Varianzanalyse ist eine Normalverteilung der Daten. Ist dies nicht der Fall wurden nicht-parametrische, verteilungsfreie Tests, wie der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Phänotypisierung der Parentalstämme *B6.Ldlr<sup>-/-</sup>* und *BALB.Ldlr<sup>-/-</sup>*

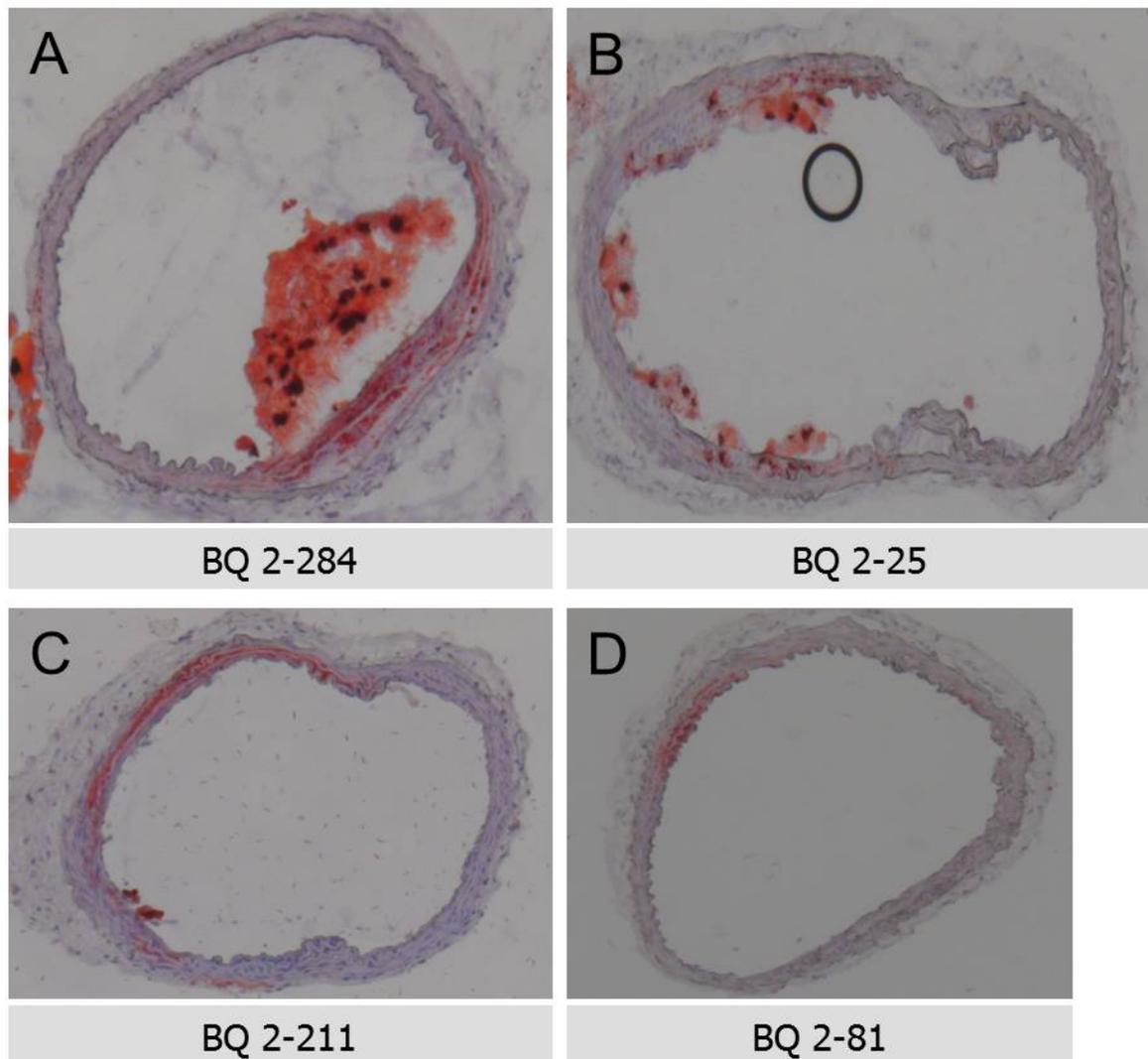
LDL Rezeptor defiziente Mäuse auf dem genetischen BALB/cByJ Hintergrund (*BALB.Ldlr<sup>-/-</sup>*) wurden mittels Marker assistierter Rückkreuzung des *Ldlr<sup>-/-</sup>* Merkmals von B6 auf BALB hergestellt. *B6.Ldlr<sup>-/-</sup>* und *BALB.Ldlr<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden nach 16 wöchiger standardisierter semisynthetischer Diät seziiert und umfangreich phänotypisiert. Neben der Größe der atherosklerotischen Plaques an der Brachiocephalarterie wurden 41 weitere phänotypische Merkmale bestimmt. Diese beinhalteten sowohl anthropometrische Parameter als auch eine umfangreiche Liste von metabolischen Parametern, einschließlich Plasmakonzentrationen von Lipiden, Lipoproteinen und Sterol-Metaboliten (Tabelle 6). *BALB.Ldlr<sup>-/-</sup>* Mäuse zeigten eine ausgeprägte Atherosklerose-Resistenz und entwickelten signifikant kleinere Läsionen als *B6.Ldlr<sup>-/-</sup>* (Abbildung 10). Beide Parentalstämme zeigten deutliche Unterschiede im Lipidprofil (Tabelle 6). Aufgrund der beobachteten signifikanten Geschlechtsunterschiede für mehrere Merkmale, einschließlich der atherosklerotischen Läsionsgröße, wurden die Männchen und Weibchen nachfolgend getrennt voneinander analysiert.

### 3.2 Atherosklerotische Läsionsgrößen an der Brachiocephalarterie

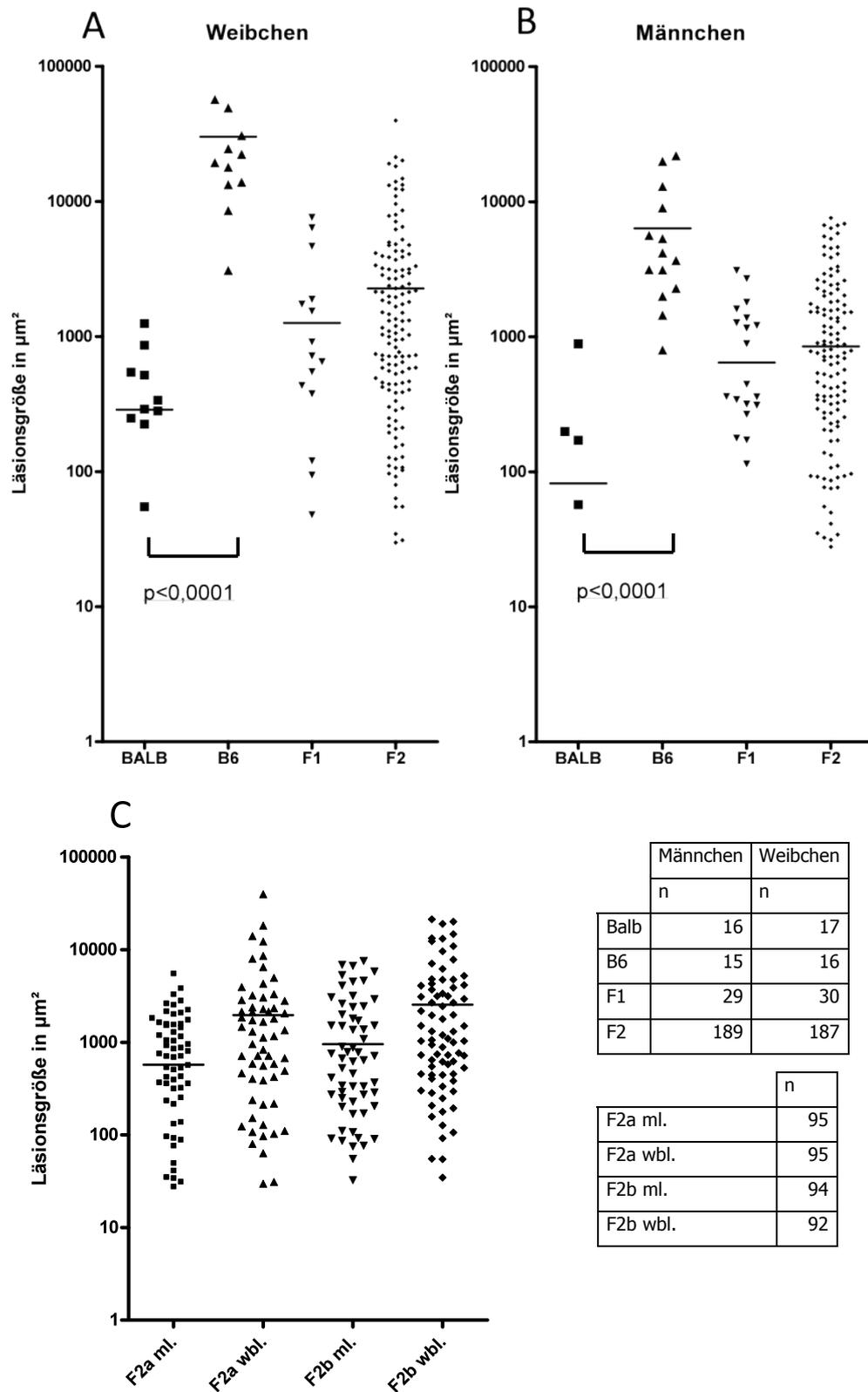
Die Quantifizierung der atherosklerotischen Läsion an der Brachiocephalarterie brachte Schnitte mit unterschiedlicher Ausprägung der Atherosklerose hervor (Abbildung 9 A-D). Die Quantifizierung der Atherosklerose der Parentalstämme (F0 Generation) zeigte bei *BALB.Ldlr<sup>-/-</sup>* Mäusen eine ausgeprägte Atherosklerose-Resistenz und die Entwicklung signifikant kleinerer Läsionen als bei den *B6.Ldlr<sup>-/-</sup>* Mäusen (Abbildung 10 A und B). Die Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionsgröße der F1 Generation ergab eine mäßige, der F2 Generation eine große Streuung (Abbildung 10 A und B). Die Subgruppenanalyse der männlichen und weiblichen Tiere der F2 Generation (jeweils aus Cross A und Cross B) ergab keine signifikanten Unterschiede der mittleren Läsionsgröße (Abbildung 10 C).

**Tabelle 6** – Erhobene Phänotypen bei B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup> und BALB.*Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen (Parentalstämme) und Darstellung signifikanter Unterschiede; *BCA* atherosklerotische Läsionsgröße an der Brachiocephalarterie; *epend/param* ependymales/parametrales Fettgewebe.

	Männliche Tiere			Weibliche Tiere		
	B6. <i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup>	BALB. <i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup>	P	B6. <i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup>	BALB. <i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup>	P
N	15	16		16	17	
BCA (µm <sup>2</sup> )	6361 ±6780	82,11 ±223,77	<0,001	30205 ±27703	287,81 ±358,22	<0,001
Körpergröße (cm)	9,19 ±0,30	9,19 ±0,26	NS	8,65 ±0,24	8,90 ±0,30	<0,05
Gewicht (g)	28,45 ±3,21	28,09 ±2,94	NS	21,33 ±0,91	21,89 ±1,85	NS
Omentales Fettgewebe (g)	0,63 ±0,18	0,62 ±0,10	NS	0,43 ±0,04	0,43 ±0,08	NS
Perirenales Fettgewebe (g)	0,37 ±0,20	0,34 ±0,08	NS	0,27 ±0,04	0,29 ±0,09	NS
Epend./param. Fettgewebe. (g)	0,81 ±0,42	0,65 ±0,20	NS	0,30 ±0,06	0,33 ±0,12	NS
Fettgewebe gesamt (g)	1,82 ±0,77	1,61 ±0,36	NS	1,00 ±0,11	1,08 ±0,27	NS
Gewicht Niere links (g)	0,17 ±0,03	0,20 ±0,04	<0,05	0,14 ±0,02	0,16 ±0,02	<0,01
Gewicht Niere rechts (g)	0,17 ±0,02	0,20 ±0,03	<0,01	0,13 ±0,02	0,17 ±0,03	<0,001
Cholesterol (mg/dL)	572,65 ±201,98	354,73 ±87,98	<0,01	809,08 ±96,82	322,54 ±66,67	<0,001
VLDL-Cholesterol (mg/dL)	65,96 ±36,15	30,14 ±16,52	<0,001	189,91 ±61,86	21,93 ±8,38	<0,001
LDL-Cholesterol (mg/dL)	434,83 ±156,72	213,31 ±74,57	<0,001	584,91 ±79,36	235,59 ±56,86	<0,001
HDL-Cholesterol (mg/dL)	71,85 ±20,84	111,27 ±16,90	<0,001	35,11 ±10,60	65,02 ±9,72	<0,001
Triglyceride (mg/dL)	158,07 ±67,57	198,40 ±75,46	<0,05	175,81 ±68,75	142,46 ±62,65	<0,05
VLDL-Triglyceride (mg/dL)	77,61 ±45,93	99,61 ±42,86	NS	95,85 ±45,55	56,40 ±25,33	<0,05
LDL-Triglyceride (mg/dL)	60,71 ±17,41	71,58 ±26,37	NS	60,77 ±21,08	60,94 ±28,40	NS
HDL-Triglyceride (mg/dL)	19,74 ±7,07	27,21 ±9,63	<0,05	19,19 ±8,73	25,13 ±9,84	NS
Freies Brassicasterol (mg/L)	0,31 ±0,13	0,21 ±0,06	<0,05	0,67 ±0,15	0,26 ±0,07	<0,001
Verestertes Brassicasterol (mg/L)	1,09 ±0,37	0,62 ±0,18	<0,001	3,20 ±0,98	0,99 ±0,24	<0,001
Gesamt Brassicasterol (mg/L)	1,40 ±0,49	0,83 ±0,22	<0,001	3,88 ±1,11	1,25 ±0,30	<0,001
Brassicasterol/Cholesterol	2,3x10 <sup>-4</sup> ±3,4x10 <sup>-5</sup>	2,0x10 <sup>-4</sup> ±6,8x10 <sup>-5</sup>	<0,001	5,0x10 <sup>-4</sup> ±1,0x10 <sup>-4</sup>	3,1x10 <sup>-4</sup> ±5,8x10 <sup>-5</sup>	NS
Freies Sitosterol (mg/L)	2,49 ±1,13	0,95 ±0,33	<0,001	4,53 ±1,60	1,11 ±0,44	<0,001
Verestertes Sitosterol (mg/L)	4,75 ±1,93	3,02 ±1,50	<0,05	6,88 ±1,48	2,82 ±0,92	<0,001
Gesamt Sitosterol (mg/L)	7,24 ±3,00	3,97 ±1,80	<0,001	11,41 ±3,03	3,93 ±1,33	<0,001
Sitosterol/Cholesterol	1,2x10 <sup>-3</sup> ±2,9x10 <sup>-4</sup>	1,0x10 <sup>-3</sup> ±5,8x10 <sup>-4</sup>	<0,01	1,5 x10 <sup>-3</sup> ±2,8x10 <sup>-4</sup>	9,9x10 <sup>-4</sup> ±2,9x10 <sup>-4</sup>	NS
Freies Campesterol (mg/L)	7,00 ±3,03	3,22 ±1,18	<0,001	12,29 ±1,59	4,26 ±1,38	<0,001
Verestertes Campesterol (mg/L)	21,96 ±8,74	12,51 ±4,82	<0,001	42,70 ±6,27	17,18 ±4,75	<0,001
Gesamt Campesterol (mg/L)	28,96 ±11,73	15,73 ±5,97	<0,001	54,99 ±7,71	21,44 ±6,12	<0,001
Campesterol/Cholesterol	4,6x10 <sup>-3</sup> ±8,3x10 <sup>-4</sup>	3,9x10 <sup>-3</sup> ±1,8x10 <sup>-3</sup>	<0,01	7,2x10 <sup>-3</sup> ±1,0x10 <sup>-3</sup>	5,3x10 <sup>-3</sup> ±1,2x10 <sup>-3</sup>	<0,01
Freies Cholesterol (mg/L)	1186,87 ±397,54	762,63 ±216,69	<0,01	1566,73 ±314,92	669,31 ±134,59	<0,01
Verestertes Cholesterol (mg/L)	4922,00 ±1568,98	3458,75 ±777,15	<0,001	6197,33 ±907,67	3313,13 ±506,99	<0,001
Gesamt Cholesterol (mg/L)	6108,87 ±1963,64	4221,38 ±992,11	<0,001	7764,07 ±1210,55	3982,44 ±639,81	<0,001
Verest. Cholesterol/Cholesterol	0,81 ±7,3x10 <sup>-3</sup>	0,82 ±0,01	<0,001	0,80 ±0,01	0,83 ±8,6x10 <sup>-3</sup>	<0,001
Lanosterol (mg/L)	0,24 ±0,15	0,11 ±0,03	<0,001	0,82 ±0,76	0,11 ±0,05	<0,001
Lanosterol/Cholesterol	4,0x10 <sup>-5</sup> ±2,0x10 <sup>-5</sup>	2,7x10 <sup>-5</sup> ±1,1x10 <sup>-5</sup>	<0,05	1,0x10 <sup>-4</sup> ±8,7x10 <sup>-5</sup>	2,8x10 <sup>-5</sup> ±1,4x10 <sup>-5</sup>	<0,001
Glukose (mg/dL)	250,60 ±63,37	165,70 ±42,76	<0,001	253,40 ±38,81	212,00 ±66,80	<0,001
Gesamt- Protein (g/L)	47,15 ±3,90	49,23 ±2,21	<0,05	47,02 ±2,34	46,83 ±6,58	NS
GLDH (µkat/L)	0,38 ±0,69	0,34 ±0,46	NS	0,15 ±0,04	0,15 ±0,06	NS
ALAT (µkat/L)	0,92 ±1,06	0,51 ±0,12	NS	0,40 ±0,08	0,45 ±0,21	NS
ASAT(µkat/L)	2,28 ±2,02	1,72 ±0,60	NS	1,94 ±0,43	1,93 ±0,52	NS
Cholinesterase (µkat/L)	65,09 ±13,17	61,85 ±10,15	NS	92,15 ±6,09	86,53 ±10,30	NS
Fellfarbe	Schwarz	Weiß		Schwarz	Weiß	



**Abbildung 9 – Repräsentative Schnitte (Ölrot 0 Färbung) von Brachiocephalararterien der F2 Generation mit ausgeprägter (A), mäßiger (B), geringer (C) und keiner (D) atherosklerotischen Läsion**



**Abbildung 10 – Atherosklerotische Läsionsgröße an der Brachiocephalarterie der Parentalstämme, der F1 und F2 Generation:** (A) Läsionsgröße bei den weiblichen Tieren; (B) Läsionsgröße bei den männlichen Tieren; (C): Läsionsgröße der F2 Männchen

und Weibchen der verschiedenen Subgruppen: F2a Tiere wurden durch Kreuzung männlicher B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse mit weiblichen BALB.*Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen und Kreuzung der daraus entstandenen F1 Generation untereinander, generiert. F2b Tiere wurden durch Kreuzung männlicher BALB.*Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse mit weiblichen B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäusen und Kreuzung der daraus resultierenden F1 Generation erzeugt.

### 3.3 Identifizierung eines neuen QTL der Atherosklerose an der BCA auf Chromosom 6

Zur Identifizierung von Genloci, die für die unterschiedliche Atheroskleroseanfälligkeit verantwortlich sind, wurden zunächst 376 F2 Mäuse in einer reziproken Kreuzung zwischen B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup> und BALB.*Ldlr*<sup>-/-</sup> erzeugt und eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Die atherosklerotische Läsionsgröße an der Brachiocephalararterie der F2 Mäuse zeigte eine breite Streuung (Abbildung 10). Erstmals konnte in dieser Arbeit ein neuer signifikanter QTL für die atherosklerotische Läsionsgröße auf dem distalen Teil des Chromosoms 6 gefunden werden. Dieser Locus war nur bei den Männchen präsent (LOD 6,09;  $p < 0,001$ ) und nicht bei den Weibchen (LOD 0,32). Wie in Abbildung 11 gezeigt, lag der höchste LOD score in der Nähe des Markers d6mit216 (67 cM, 121,1 Mb).

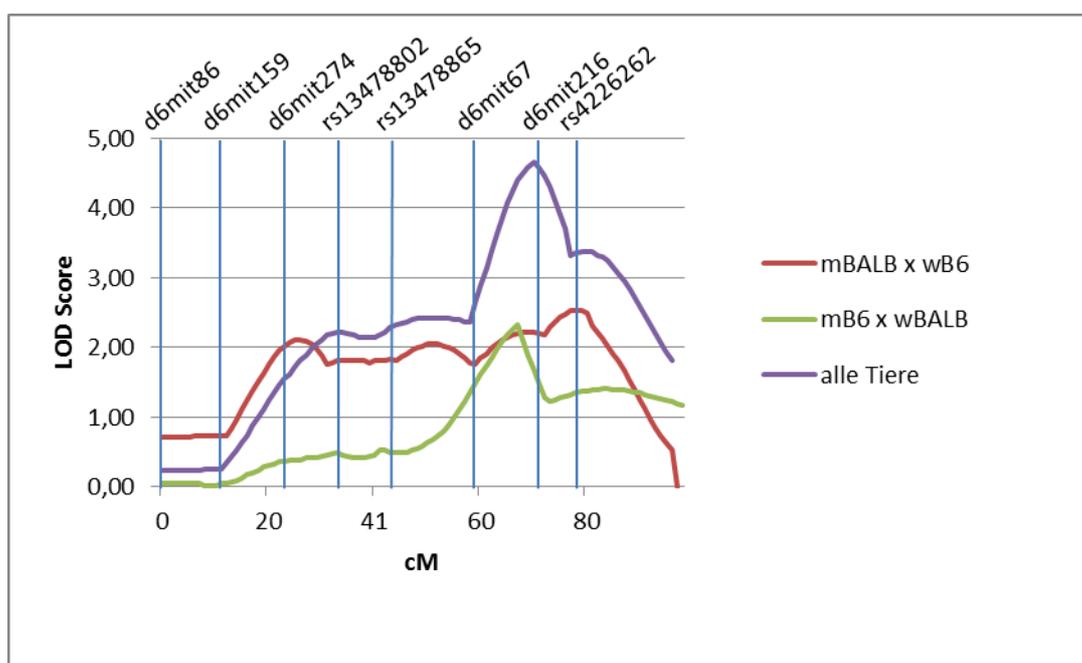
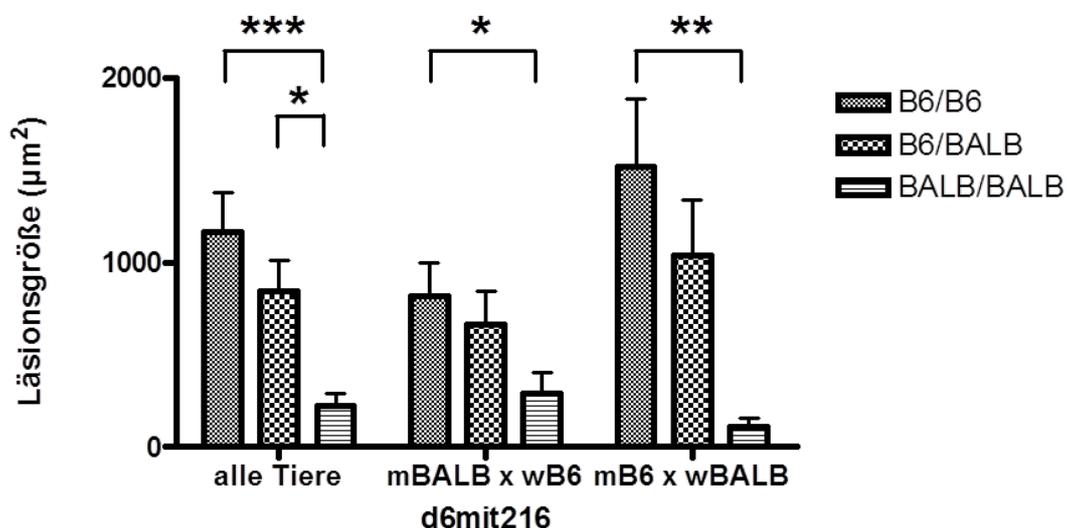


Abbildung 11 – LOD Score Darstellung für die atherosklerotische Läsionsgröße der Brachiocephalararterie auf Chromosom 6 der männlichen Tiere

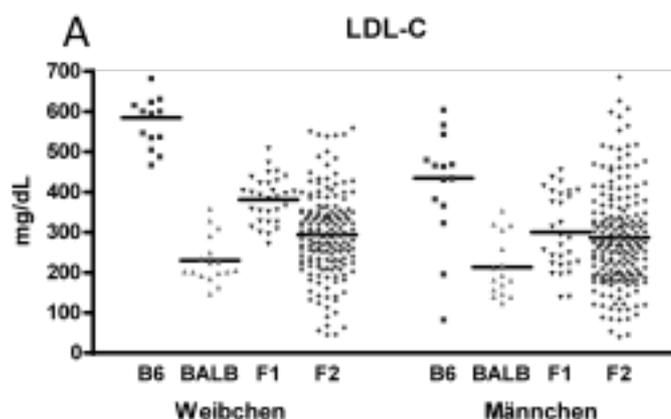
Im Folgenden wurde die Allel-Verteilung an diesem Locus analysiert. Diese zeigte, dass das B6 Allel das Risiko-Allel für die Atheroskleroseempfindlichkeit darstellte (Abbildung 12). Um, wie in vorherigen Arbeiten gezeigt (Teupser et al, 2006), die Auswirkungen von Geschlecht und der Abstammung auf die Atheroskleroseempfindlichkeit nachweisen zu können, entsprach auch das Studiendesign der vorliegenden Arbeit dem einer reziproken Kreuzung. Zu diesem Zweck wurden 189 F2 Mäuse durch Kreuzung männlicher B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup> und weiblicher BALB.*Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse und Kreuzung der daraus resultierenden F1 Generation (cross mB6 x wBALB) erzeugt, sowie 187 F2 Mäuse durch Kreuzung männlicher BALB.*Ldlr*<sup>-/-</sup> und weiblicher B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup> Mäuse und der sich daraus ergebenden F1 Tiere untereinander (cross mBALB x wB6) (Abschnitt 2.1.1.1). In der einzelnen Subkreuzungen ließen sich jedoch keine Auswirkungen der Abstammungslinie auf die Atheroskleroseempfindlichkeit nachweisen. Der QTL auf Chromosom 6 war in beiden männlichen Untergruppen (Abbildung 11) mit ähnlichen Auswirkungen des Genotyps (Abbildung 12) zu finden. Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied bei der Läsionsgröße zwischen den beiden F2 Subgruppen gezeigt werden (Abbildung 10C).



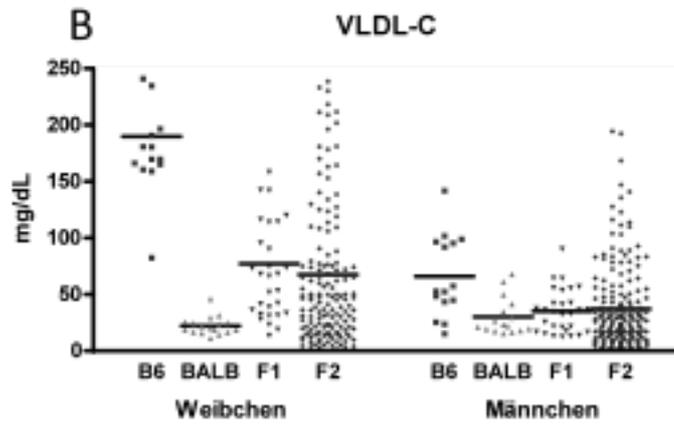
**Abbildung 12 – Allelverteilung für die atherosklerotische Läsionsgröße auf Chromosom 6 am Marker d6mit216**

### 3.4 Lipid- und Lipoproteinprofile der F0, F1 und F2 Generation

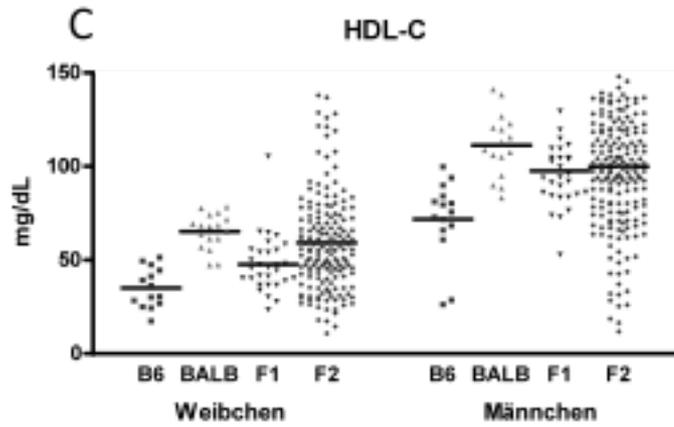
Um im Folgenden den Einfluss der Lipide und Lipoproteine auf die Atheroskleroseentwicklung untersuchen zu können wurden diese im Einzelnen miteinander verglichen. Die Parentalstämme unterschieden sich, wie in 3.1 bereits erläutert, deutlich voneinander. Dabei waren die Plasmakonzentrationen des VLDL- und LDL-Cholesterols (im Weiteren VLDL-C und LDL-C genannt), sowie der Phytosterole Brassicasterol, Sitosterol, Campesterol und des Lanosterols bei *B6.Ldlr<sup>-/-</sup>* signifikant höher als bei *BALB.Ldlr<sup>-/-</sup>* (Abbildung 13A, B, D-G). Die Konzentration des HDL-Cholesterols, im Weiteren HDL-C genannt, im Plasma war dagegen bei *BALB.Ldlr<sup>-/-</sup>* deutlich erhöht (Abbildung 13C). Zur Darstellung der in 3.1 beschriebenen Geschlechtsunterschiede wurden Männchen und Weibchen ebenfalls getrennt betrachtet und es ergaben sich signifikante Unterschiede. VLDL-C, LDL-C und die Phytosterole waren jeweils bei den Weibchen in höherer Konzentration, HDL-C in niedrigerer Konzentration vorhanden (Abbildung 13). In der F2 Generation waren signifikante Unterschiede zwischen den Männchen und Weibchen für die Konzentration des VLDL- und HDL-Cholesterols sowie der Phytosterole zu verzeichnen, wobei VLDL-C und die Phytosterolkonzentrationen ebenfalls bei den weiblichen und HDL-C bei den männlichen Tieren erhöht waren. Für LDL-C ließ sich kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren zeigen.



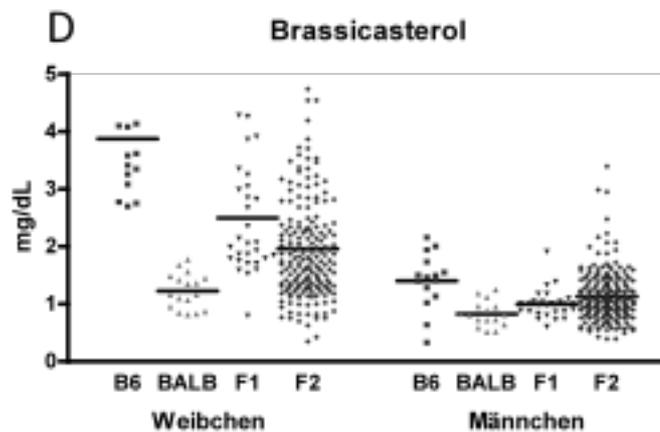
	P	Signifikanz
B6 wbl. / BALB wbl.	<0,0001	***
B6 ml. / BALB ml.	0,0002	***
BALB wbl. / BALB ml.	0,2276	ns
B6 wbl. / B6 ml.	0,0024	**
F2 wbl. / F2 ml.	0,1500	ns



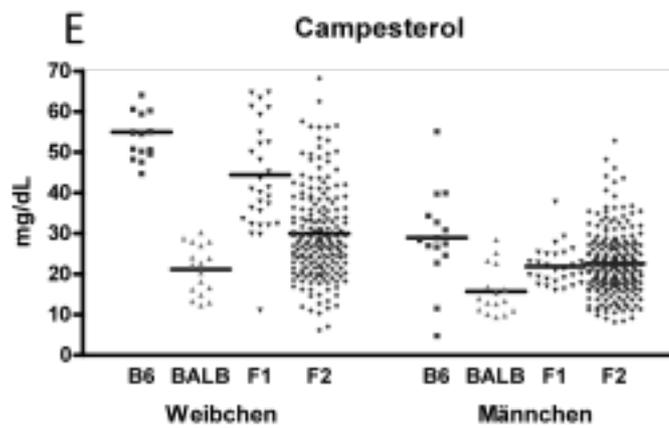
	P	Signifikanz
B6 wbl. / BALB wbl.	<0,0001	***
B6 ml. / BALB ml.	0,0032	**
BALB wbl. / BALB ml.	0,1886	ns
B6 wbl. / B6 ml.	<0,0001	***
F2 wbl. / F2 ml.	0,0007	***



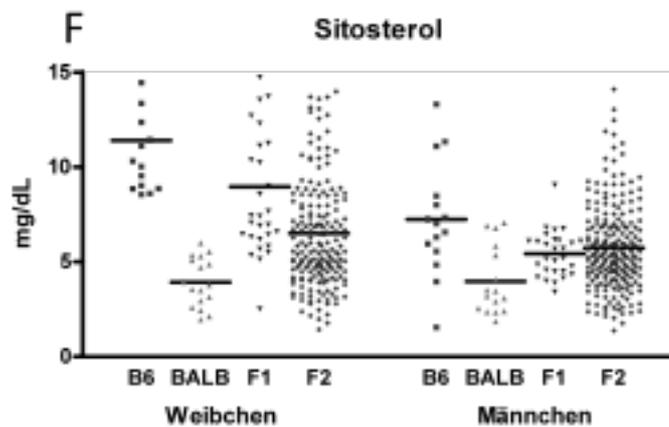
	P	Signifikanz
B6 wbl. / BALB wbl.	<0,0001	***
B6 ml. / BALB ml.	<0,0001	***
BALB wbl. / BALB ml.	<0,0001	***
B6 wbl. / B6 ml.	0,0002	***
F2 wbl. / F2 ml.	<0,0001	***



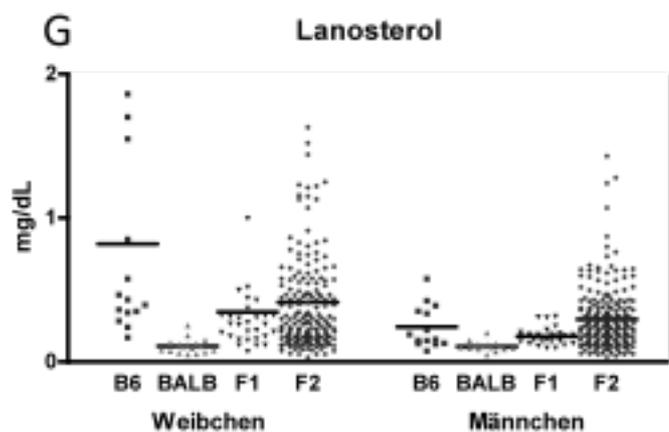
	P	Signifikanz
B6 wbl. / BALB wbl.	<0,0001	***
B6 ml. / BALB ml.	0,0007	***
BALB wbl. / BALB ml.	0,0007	***
B6 wbl. / B6 ml.	<0,0001	***
F2 wbl. / F2 ml.	<0,0001	***



	P	Signifikanz
B6 wbl. / BALB wbl.	< 0,0001	***
B6 ml. / BALB ml.	0,0010	***
BALB wbl. / BALB ml.	0,0151	*
B6 wbl. / B6 ml.	< 0,0001	***
F2 wbl. / F2 ml.	< 0,0001	***



	P	Signifikanz
B6 wbl. / BALB wbl.	< 0,0001	***
B6 ml. / BALB ml.	0,0019	**
BALB wbl. / BALB ml.	0,8009	ns
B6 wbl. / B6 ml.	0,0005	***
F2 wbl. / F2 ml.	0,0461	*



	P	Signifikanz
B6 wbl. / BALB wbl.	< 0,0001	***
B6 ml. / BALB ml.	0,0004	***
BALB wbl. / BALB ml.	0,8149	ns
B6 wbl. / B6 ml.	0,0016	**
F2 wbl. / F2 ml.	0,0177	*

**Abbildung 13** – Unterschiede im Lipoproteinprofil der Parentalstämme (B6 und BALB), der F1 und F2 Generation getrennt nach Männchen und Weibchen (links) sowie deren Signifikanzwerte (rechts). Im Speziellen wurden die Plasmakonzentrationen von LDL- (A),

---

VLDL- (B), HDL-Cholesterol (C) und die Plasmakonzentrationen der Phytosterole Brassicasterol (D), Campesterol (E) und Sitosterol (F) sowie des Zwischenproduktes der Cholesterolbiosynthese Lanosterol (G) verglichen.

### **3.5 Kosegregation von Atherosklerose und Lipid-Phänotypen auf Chromosom 6**

Um einen genetischen Zusammenhang der Atheroskleroseentwicklung mit dem Vorhandensein eines genetisch bedingten Lipidprofils zu erkennen, wurde für die Lipide und Lipoproteine der F2 Generation ebenfalls ein QTL Mapping durchgeführt. Es konnte eine Kosegregation für Merkmale des Lipid- und Sterolmetabolismus mit dem Atherosklerose-Locus auf Chromosom 6 gefunden werden (Abbildung 14). Dieses Muster wurde nur bei den männlichen Tieren gefunden, wobei ein hoch signifikanter QTL für Campesterol (LOD 4,81;  $p < 0,001$ ) sowie signifikante und suggestive QTLs für die Phytosterole Sitosterol (LOD 3,05;  $p = 0,012$ ) und Brassicasterol (LOD 2,75;  $p = 0,034$ ) und für das LDL-Cholesterol (LDL-C) (LOD 2,64;  $p = 0,016$ ) und Gesamt-Cholesterol (verestert) (LOD 3,21;  $p = 0,01$ ) gezeigt werden konnten, die jeweils ihr Maximum in der Nähe des Markers d6mit216 (121,1 Mb) aufwiesen (Abbildung 14). Die Analyse der Allel-Verteilung ergab, dass das B6 Allel, zusätzlich zur gesteigerten Läsionsgröße (Abbildung 15A), zu einem ungünstigeren Lipidprofil führte. Das B6 Allel führte zu signifikant erhöhten Plasmakonzentrationen von LDL-Cholesterol (Abbildung 15B), Brassicasterol (Abbildung 15C), Sitosterol (Abbildung 15D), Campesterol (Abbildung 15E) und Gesamtcholesterol (Abbildung 15F).

---

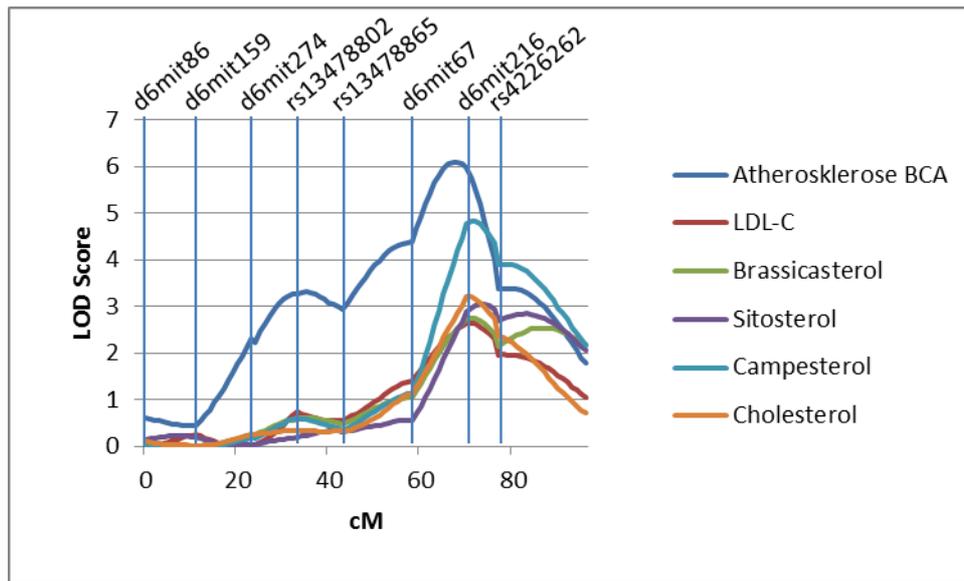
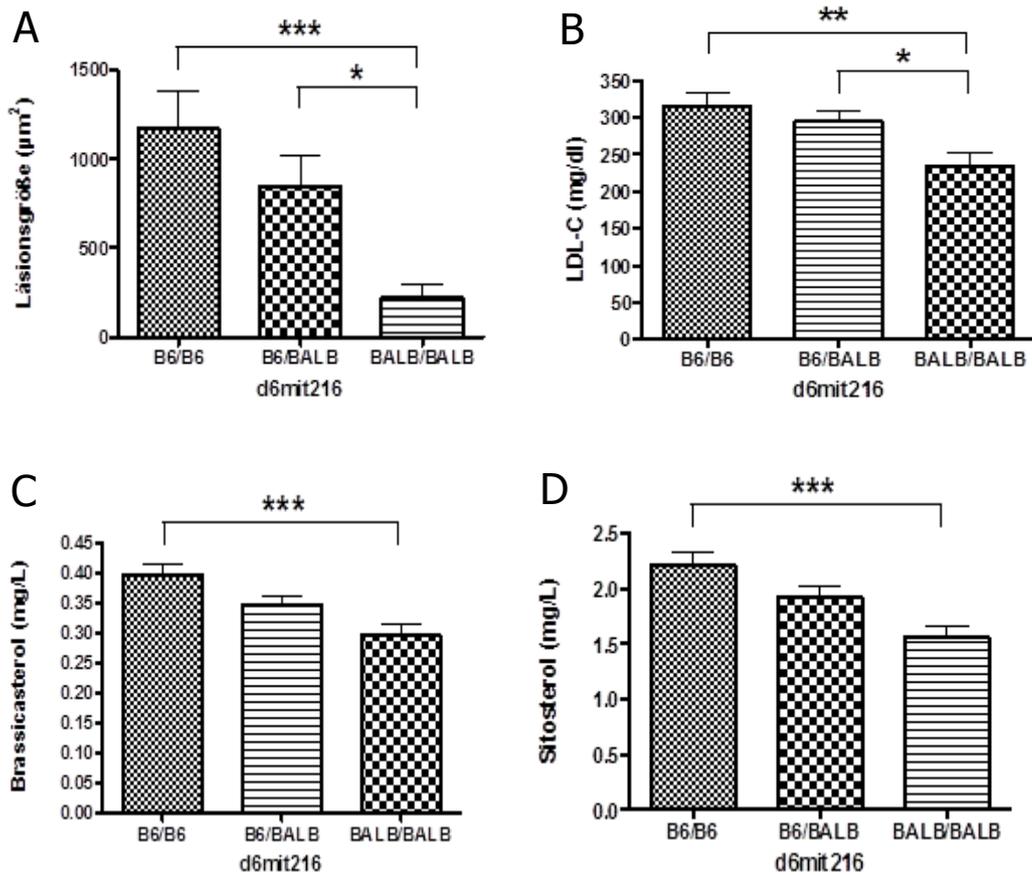
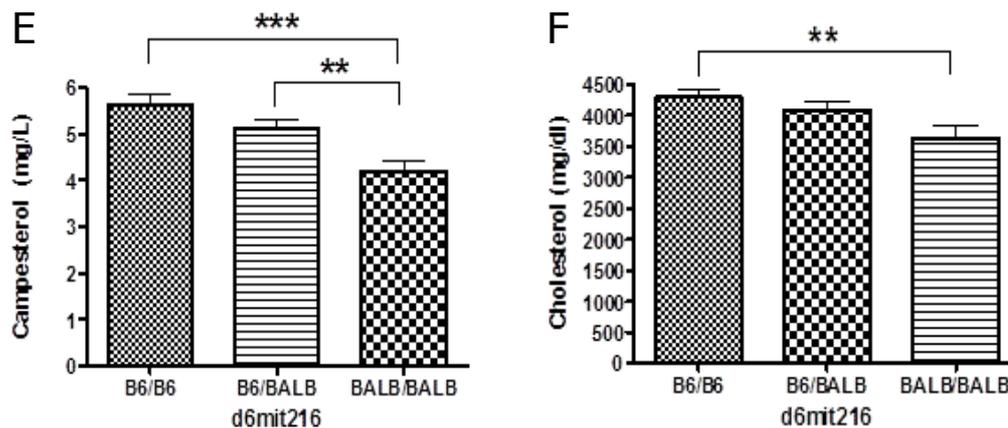


Abbildung 14 – LOD score Darstellung von Chromosom 6 der männlichen F2

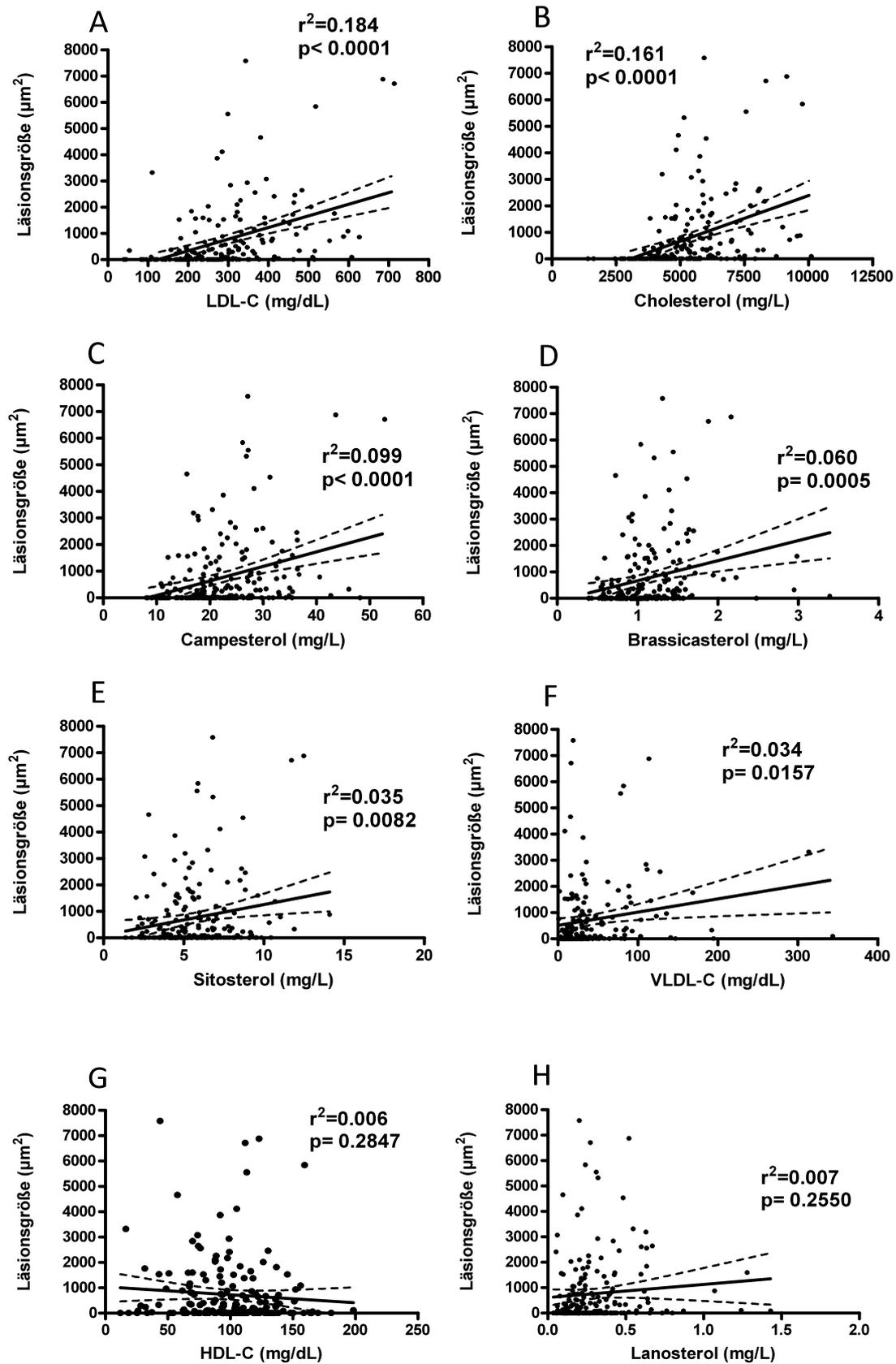




**Abbildung 15 – Darstellung der Allelverteilung auf Chromosom 6 am Marker d6mit216**

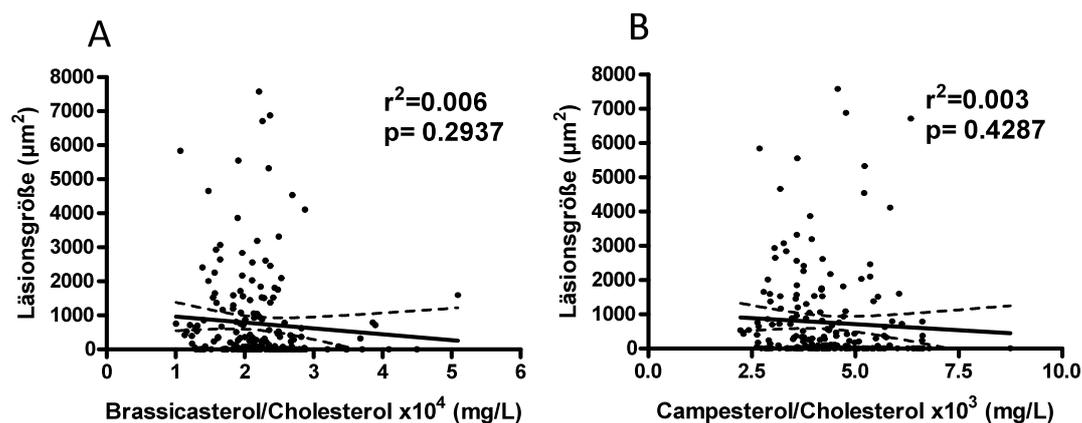
### **3.6 Korrelation von Plasmalipiden/Lipoproteinen und Atherosklerose in der F2 Generation**

Auf Chromosom 6 stellte das B6 Allel das Risiko-Allel dar. Insbesondere bei den Männchen scheinen genetische Faktoren, die in dieser Kreuzung zur Entwicklung der Läsion beitragen, pathophysiologisch über eine Beeinflussung der Plasmalipide wirken zu können. Aus diesem Grund wurden Korrelationen für die atherosklerotische Läsionsgröße mit den Plasmalipid-Phänotypen berechnet. Die höchste Korrelation wurde für das LDL-Cholesterol (LDL-C) ( $r^2=0,18$ ; Abbildung 16A) beobachtet, gefolgt von Gesamtcholesterol ( $r^2= 0,16$ ; Abbildung 16B), Campesterol ( $r^2=0,1$ ; Abbildung 16C), Brassicasterol ( $r^2=0,06$ ; Abbildung 16D), Sitosterol ( $r^2 =0,035$ ; Abbildung 16E) und VLDL-Cholesterol (VLDL-C) ( $r^2= 0,034$ ; Abbildung 16F). Keine signifikante Korrelation konnte für das HDL-Cholesterol und Lanosterol, einem Zwischenprodukt der Cholesterolsynthese, gezeigt werden (Abbildung 16G und H).

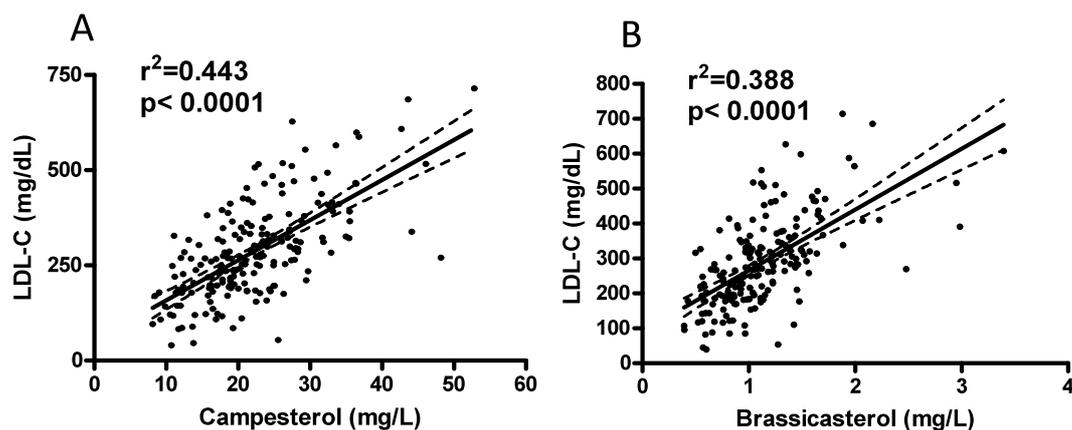


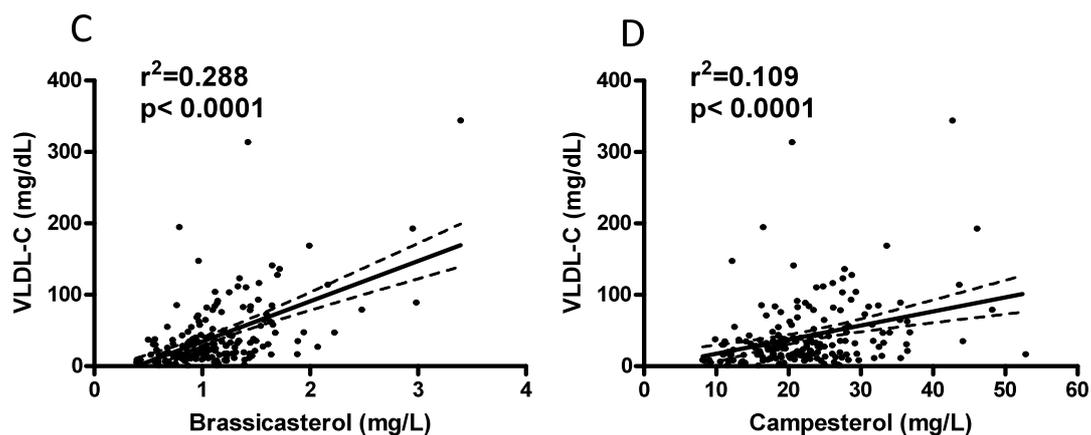
**Abbildung 16 – Korrelationen der atherosklerotischen Läsionsgröße mit den Plasmalipiden und Lipoproteinen**

Die Normalisierung der Plasma Campesterol- bzw. Brassicasterol-Konzentration auf die Plasma Cholesterol-Konzentration hob die Korrelation zur Läsionsgröße auf (Abbildung 17). Es zeigte sich außerdem eine hoch signifikante Korrelation von LDL-C mit Campesterol ( $r^2=0,44$ ; Abbildung 18A) und Brassicasterol ( $r^2=0,39$ ; Abbildung 18B) und VLDL-C mit Campesterol ( $r^2=0,11$ ; Abbildung 18C) und Brassicasterol ( $r^2=0,29$ ; Abbildung 18D).



**Abbildung 17 – Korrelation der atherosklerotischen Läsionsgröße mit Brassicasterol (A) und Campesterol (B) nach Normalisierung auf Cholesterol**

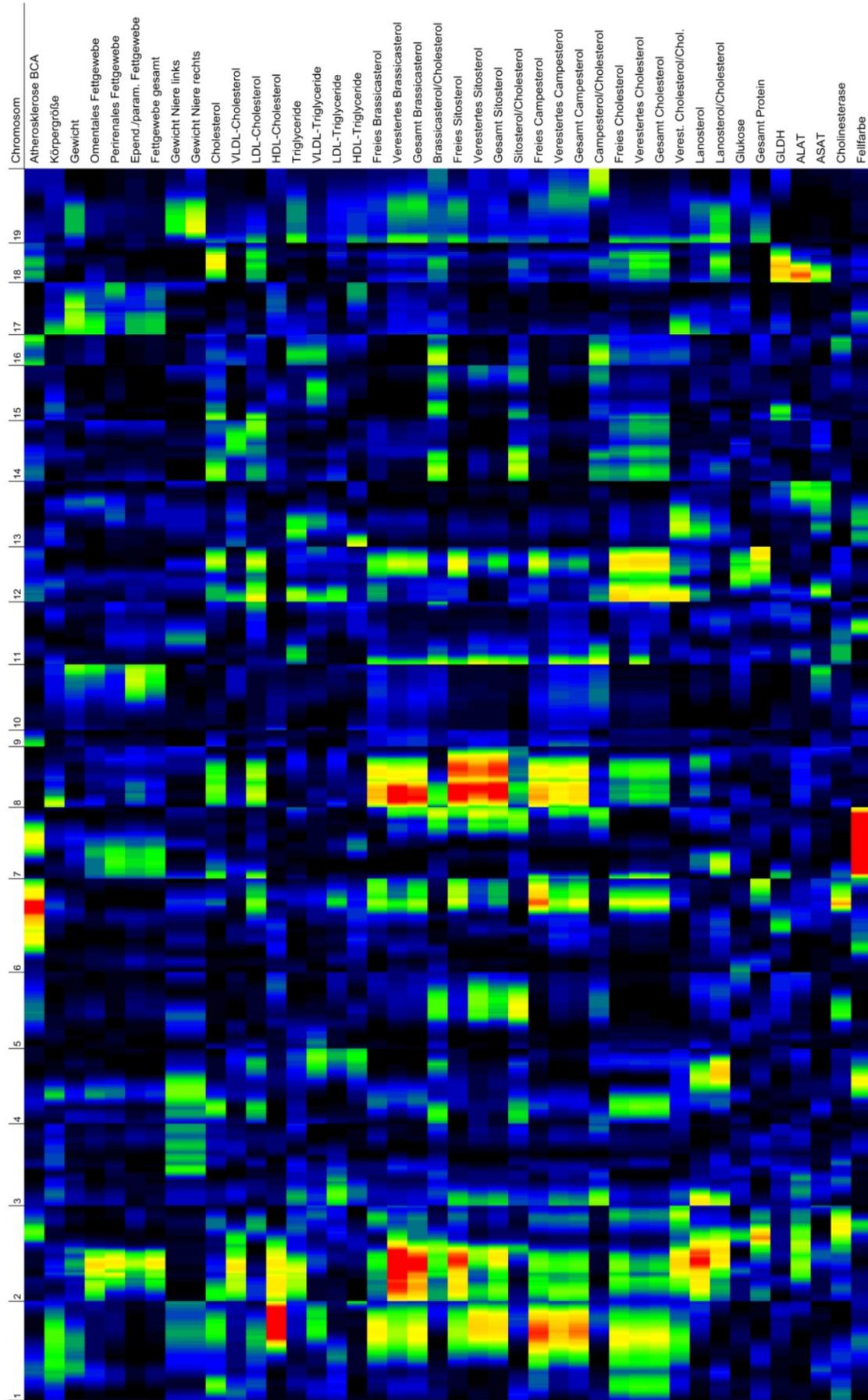


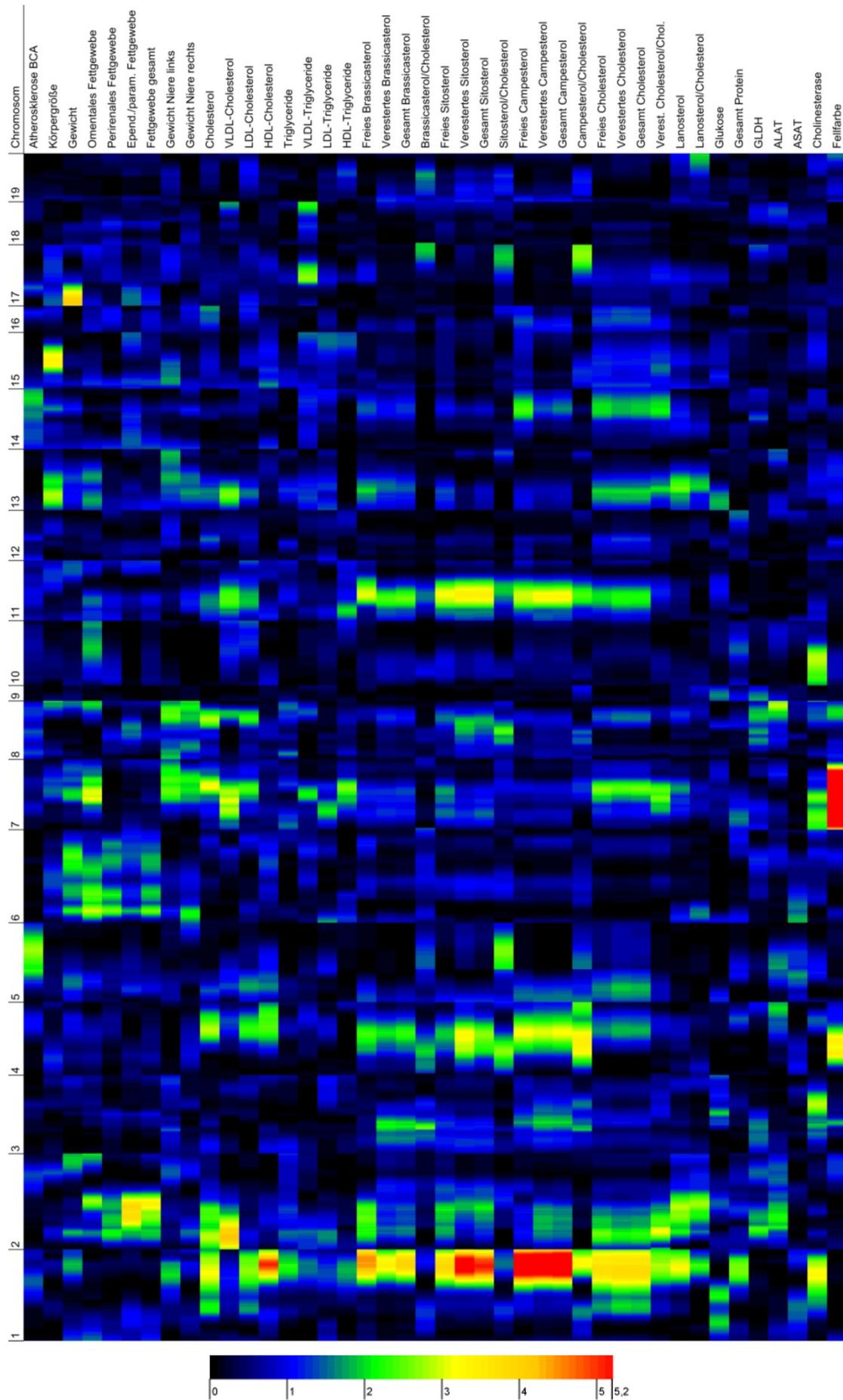


**Abbildung 18 – Korrelationen von LDL-Cholesterol und VLDL-Cholesterol mit den Phytosterolen Campesterol (A,D) und Brassicasterol (B,C)**

### **3.7 QTL Mapping für genetische Determinanten weiterer metabolischer Phänotypen**

Zusätzlich wurde die Kopplungsanalyse für alle anderen in Tabelle 6 aufgeführten Phänotypen durchgeführt. Dies diente der Identifizierung weiterer Genloci, die zu dem jeweiligen Phänotyp beitragen. Zur übersichtlichen Darstellung wurde eine sogenannte „heat map“ erstellt, welche anhand einer Farbkodierung die LOD scores über das ganze Genom erkennen lässt (Abbildung 19). QTL Kollokationen für verschiedene Phänotypen können hinweisend sein, dass hier das gleiche kausale Gen zugrunde lag. Dies könnte eine Identifizierung des Gens an diesem Locus erleichtern. Deutliche Signifikanzen ließen sich in der Heatmap der männlichen Tiere für den bereits in 3.3 beschriebenen neu entdeckten Atherosklerose-Locus auf Chromosom 6, sowie für einen bisher unbekanntem Locus auf Chromosom 8 für die Phytosterole und einem Locus auf Chromosom 2, ebenfalls für die Phytosterole, darstellen. Auch der bisher am häufigsten publizierte Locus für HDL auf Chromosom 1 konnte in dieser Studie sowohl bei den männlichen als auch den weiblichen Tieren repliziert werden. Die in der Heatmap als signifikant dargestellten QTL Cluster werden in den folgenden Abschnitten (siehe unten) genauer dargelegt. Als Verifizierung der korrekten Zuordnung von Genotypen und Phänotypen in der vorliegenden Kreuzung diente der bekannte Genlocus auf Chromosom 7 für die Fellfarbe, der sich auch in dieser Arbeit replizieren ließ (Abbildung 19).

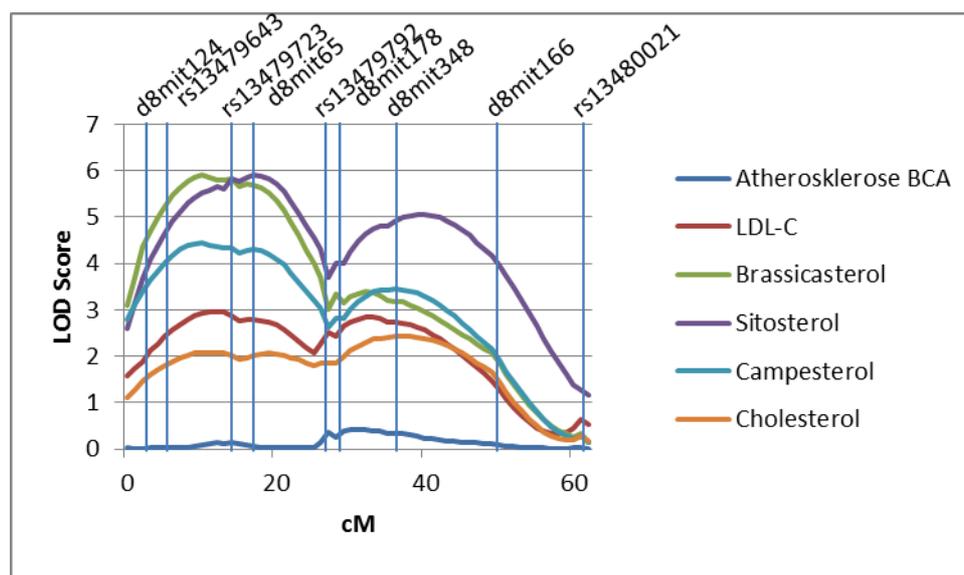




**Abbildung 19** – Heat map der genomweiten Kopplungsanalyse für 42 Merkmale der männlichen (Seite 53) und weiblichen (Seite 54) F2 Generation. Die Nummerierung der Chromosomen 1-19 befindet sich am linken Bildrand. Die LOD scores wurden für jeden Phänotyp anhand einer farblichen Kodierung dargestellt (siehe Farbskala am unteren Rand).

### 3.8 Identifizierung eines neuen Sterol QTL auf Chromosom 8

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein neuer QTL Cluster für die Plasma-Pflanzensterole auf Chromosom 8 identifiziert. Dieser QTL war geschlechtsabhängig und nur bei den männlichen Tieren präsent (Abbildung 20). Der Chromosom 8 QTL für die Plasmakonzentration der Phytosterole Brassicasterol (LOD 5,9;  $p < 0,001$ ), Sitosterol (LOD 5,9;  $p < 0,01$ ) und Campesterol (LOD 4,44;  $p < 0,001$ ) zeigte sein Maximum in der Nähe des Markers rs13479723 (42,16 Mb), an dem sich ebenfalls ein suggestiver Locus für das LDL-Cholesterol (LDL-C) (LOD 2,95,  $p = 0,16$ ) befand. Es konnte jedoch keine Kopplung für die atherosklerotische Läsionsgröße auf diesem Chromosom gezeigt werden (Abbildung 20).



**Abbildung 20 – LOD score Darstellung von Chromosom 8 der männlichen F2 Generation**

Das B6 Allel hatte einen additiven Effekt auf die Höhe der Plasmaspiegel des LDL Cholesterols (LDL-C) (Abbildung 21A), des Gesamtcholesterols (Abbildung 21B) und der Phytosterole Brassicasterol (Abbildung 21C), Sitosterol (Abbildung 21D) sowie Campesterol (Abbildung 21E). Da eine Normalisierung der Phytosterol-Merkmale auf die Plasmacholesterol-Spiegel die Effekte signifikant verringerte (Brassicasterol/Cholesterol: LOD 2,41;  $p < 0,05$ ) (Abbildung 22A) bzw den QTL aufhob

(Sitosterol/Cholesterol: LOD 2,08;  $p > 0,05$  (Abbildung 21B) und (Campesterol/Cholesterol: LOD 1,11;  $p > 0,05$ ) (Abbildung 21C)) könnte man erneut annehmen, dass der parallele Anstieg auf die Bindung der Phytosterole an die Lipoproteine zurückzuführen ist.

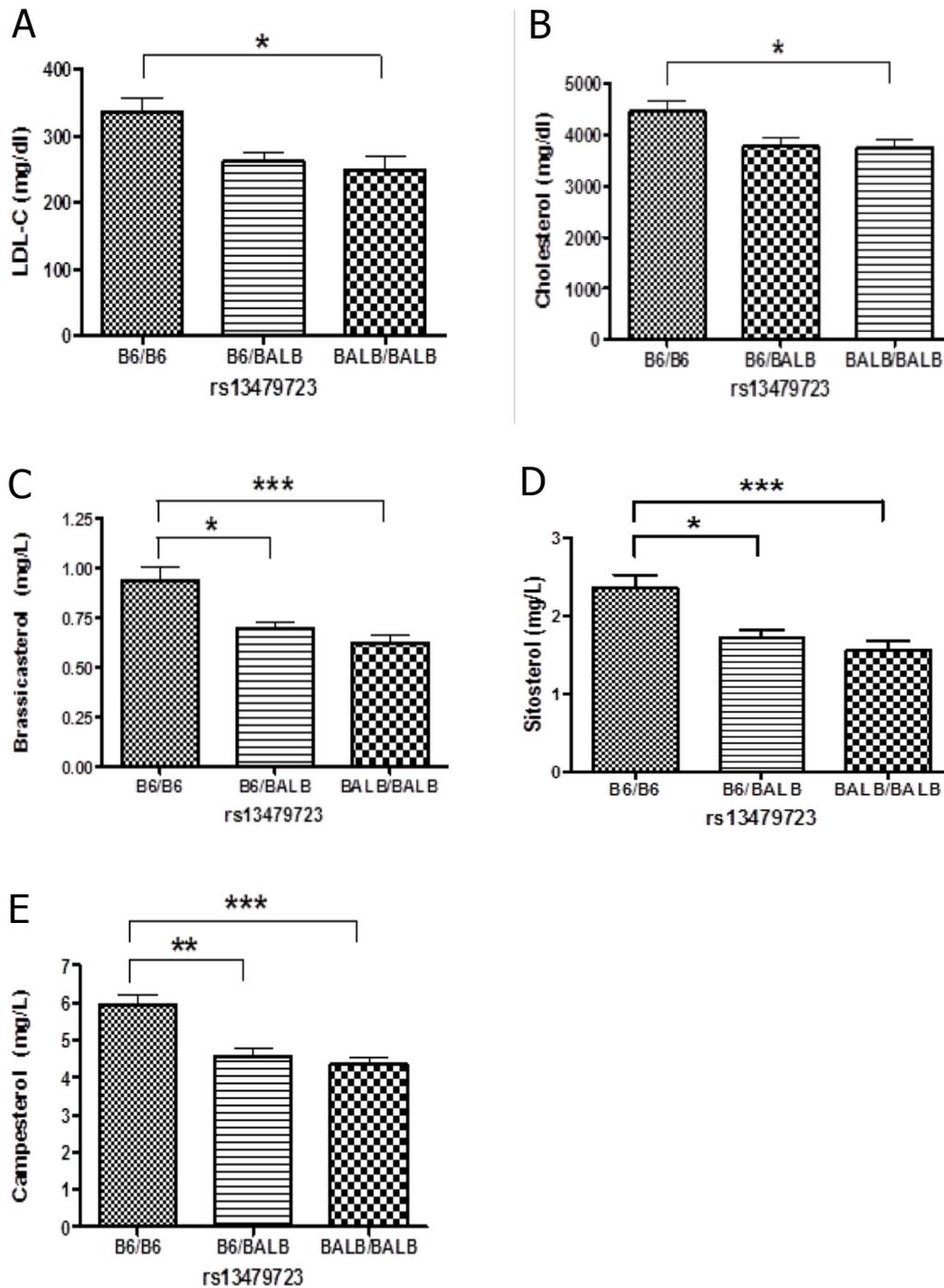
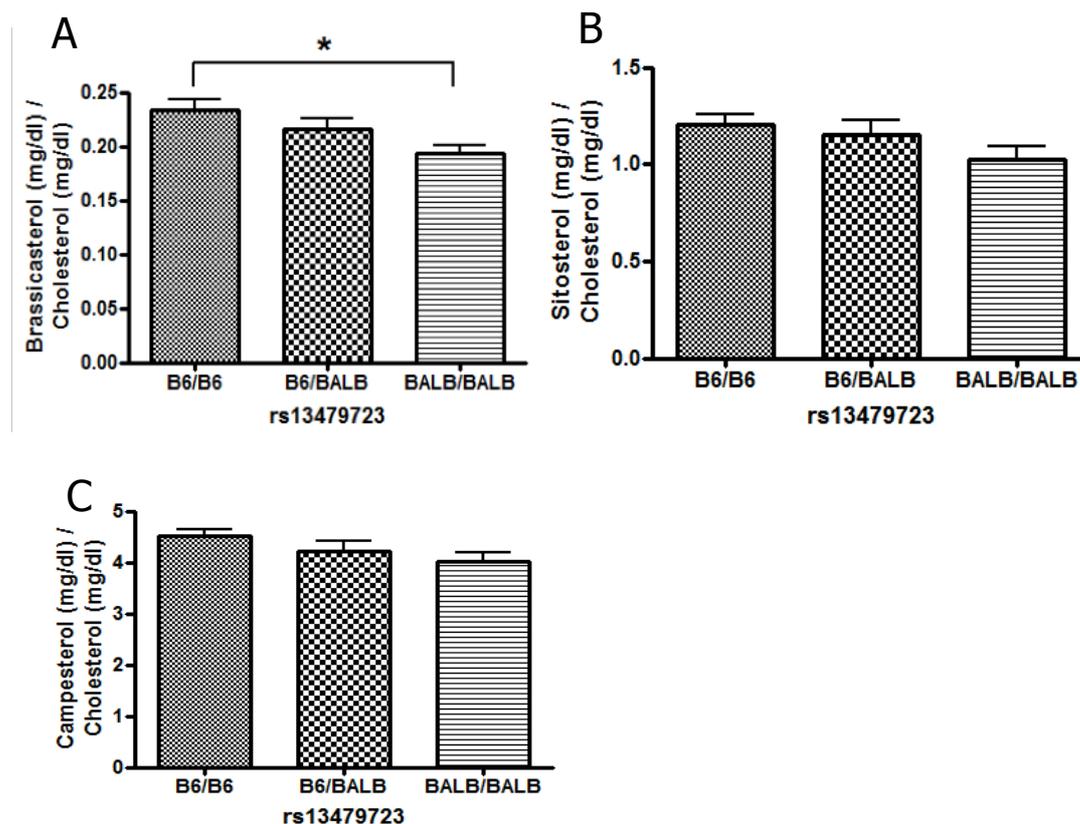


Abbildung 21 - Allelverteilung auf Chromosom 8 am Marker rs13479723



**Abbildung 22 – Allelverteilung auf Chromosom 8 am Marker rs13479723 nach Normalisierung der Phytosterole Brassicasterol (A), Sitosterol (B) und Campesterol (C) auf das Plasma-Gesamtcholesterol**

### 3.9 QTL für HDL-Cholesterol und Phytosterole auf Chromosom 1

Auf dem distalen Chromosom 1 konnte sowohl für die männlichen als auch für die weiblichen Tiere ein Locus für HDL-C und Phytosterole gefunden werden. Dieser Locus zeigte sein Maximum bei den Weibchen für die Phytosterole Campesterol (LOD 6,59;  $p < 0,001$ ), Sitosterol (LOD 5,72;  $p < 0,001$ ) und Brassicasterol (LOD 4,03;  $p < 0,001$ ) sowie für HDL (LOD 5,16;  $p < 0,001$ ) und Gesamtcholesterol (LOD 3,83;  $p < 0,001$ ) am Marker d1mit359 (179Mb). Es konnte jedoch keine Kopplung für die atherosklerotische Läsionsgröße auf diesem Chromosom gezeigt werden (siehe Abbildung 23). Das BALB Allel zeigte einen additiven Effekt zur Erhöhung der Plasmaspiegel des HDL Cholesterols (Abbildung 24A), Gesamtcholesterols (Abbildung 24B), Campesterols (Abbildung 24E), Sitosterols (Abbildung 24D) und Brassicasterols (Abbildung 24C). Da die Normalisierung der Phytosterol-Merkmale auf die Plasmacholesterol-Spiegel die Effekte signifikant verringerte (Abbildung 19 unten),

könnte man wiederum annehmen, dass der parallele Anstieg auf die Bindung der Phytosterole an die Lipoproteine zurückzuführen war.

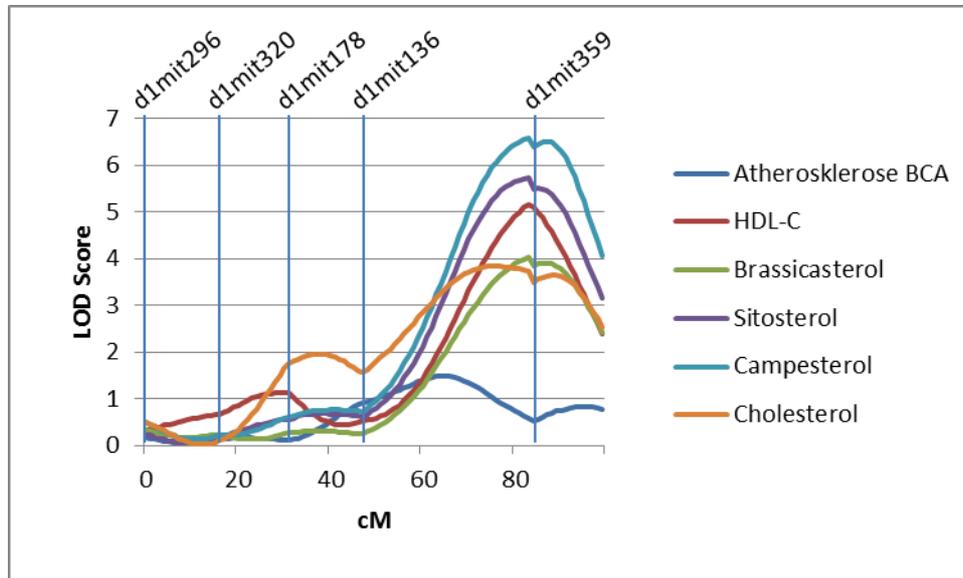
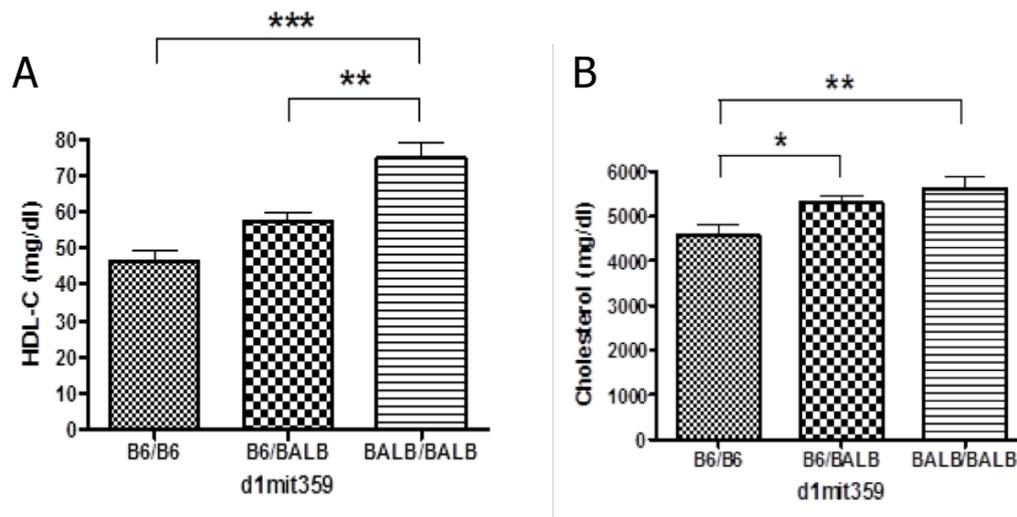
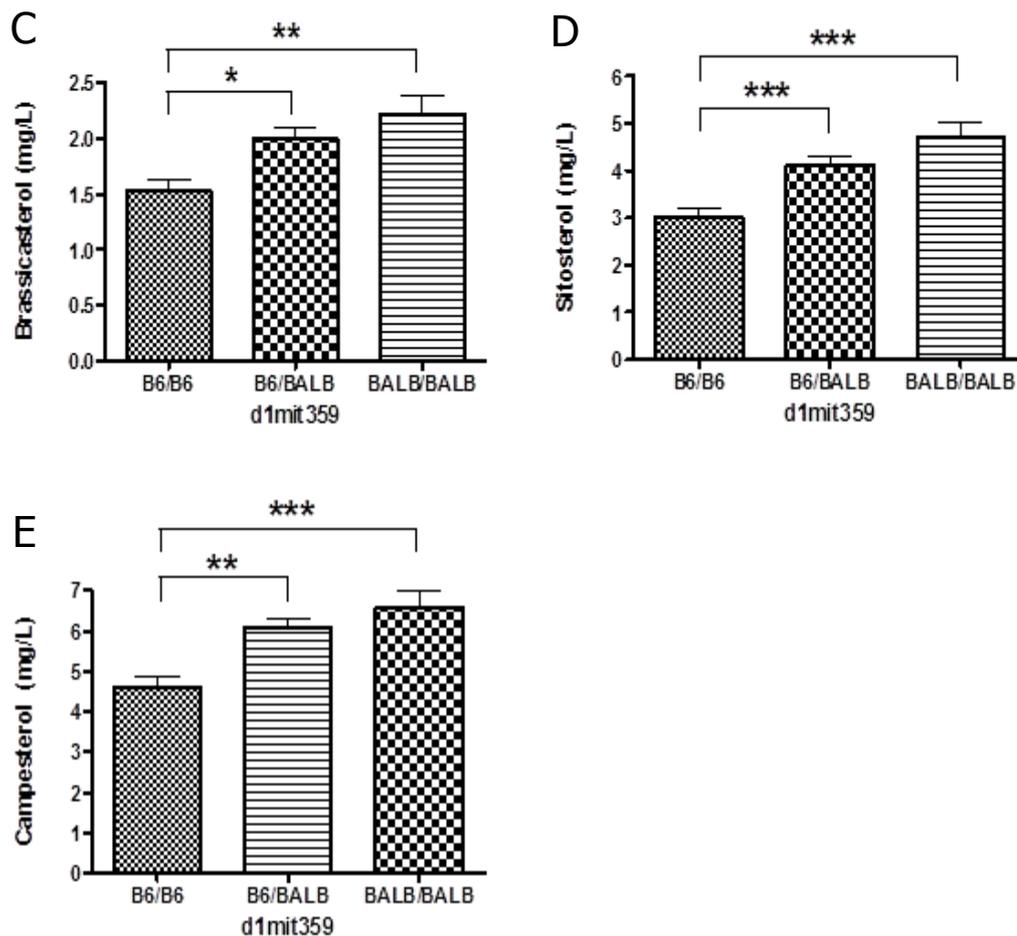


Abbildung 23 – LOD score Darstellung von Chromosom 1 der weiblichen F2





**Abbildung 24 – Allelverteilung auf Chromosom 1 am Marker d1mit359 der weiblichen F2 Generation**

Bei den Männchen stellte sich ebenfalls ein hoch signifikanter Locus für das HDL-Cholesterol (LOD 8,93;  $p < 0,001$ ) dar, der sein Maximum, wie bei den weiblichen Tieren, nahe des Markers d1mit359 (179 Mb) zeigte (Abbildung 25). Ebenfalls in dieser Region ließen sich signifikante Loci für Cholesterol (LOD 3,34;  $p = 0,005$ ) und die Pflanzensterole Campesterol (LOD 5,05;  $p < 0,001$ ), Sitosterol (LOD 4,01;  $p < 0,001$ ) und Brassicasterol (LOD 3,25;  $p = 0,003$ ) darstellen. Wieder ließ sich keine Kopplung zur Läsionsgröße der Atherosklerose zeigen. Ähnlich wie bei den Weibchen schien das BALB-Allel für die erhöhten Plasmaspiegel der Sterole verantwortlich zu sein (Abbildung 26A-E). Erneut ließ die signifikante Verringerung dieser Effekte nach Normalisierung der Phytosterole auf das Cholesterol einen, durch eine Bindung der Phytosterole an die Lipoproteine bedingten, parallelen Anstieg annehmen.

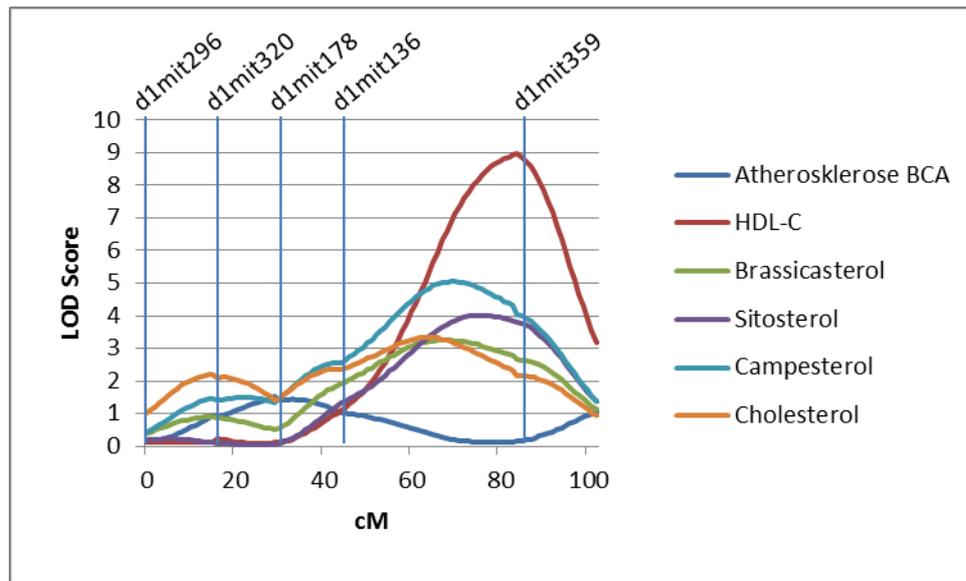
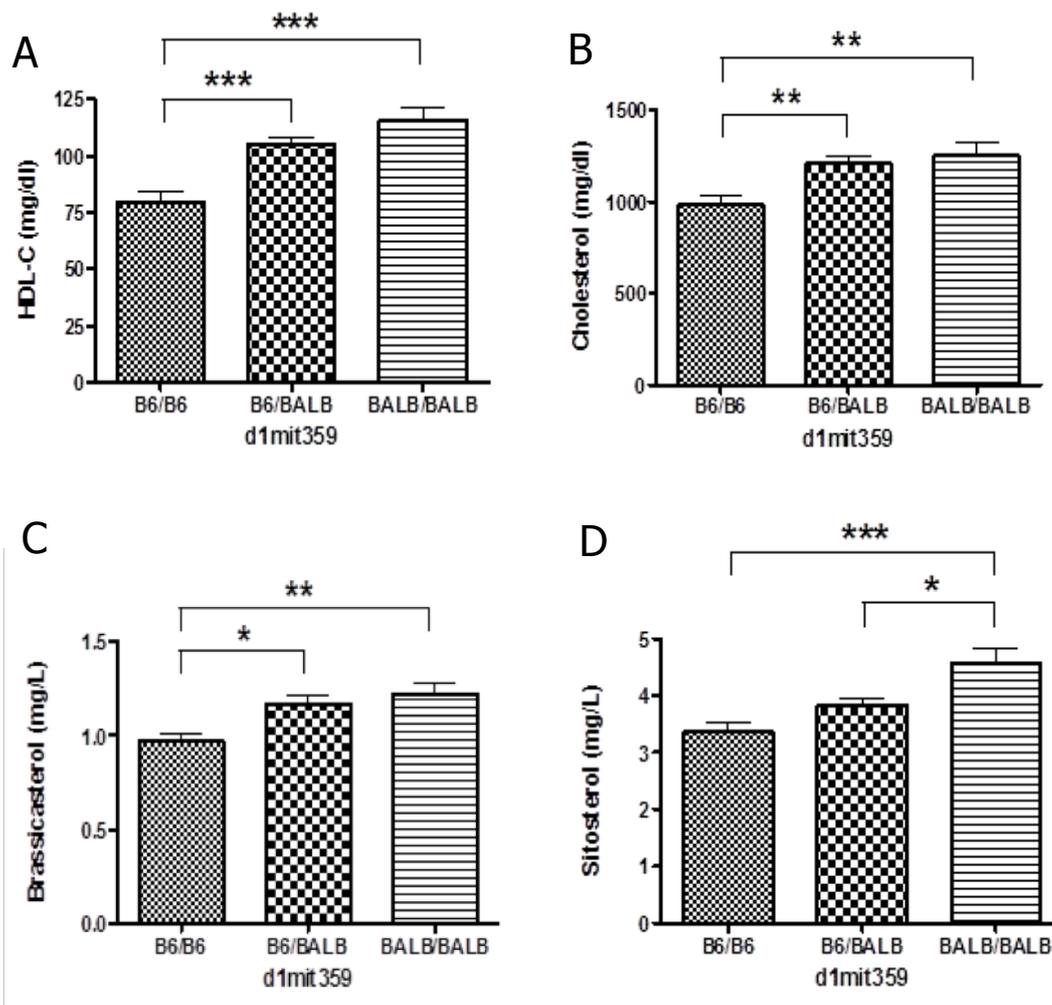
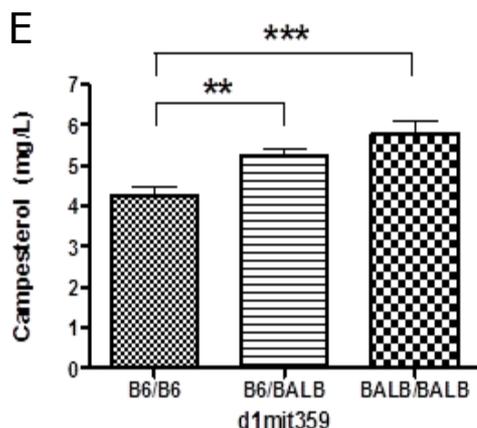


Abbildung 25 – LOD score Darstellung von Chromosom 1 der männlichen F2





**Abbildung 26 – Allelverteilung auf Chromosom 1 am Marker d1mit359 der männlichen F2 Generation**

### 3.10 QTL für Cholesterol und Phytosterole auf Chromosom 2

Auf Chromosom 2 konnten QTLs für Merkmale des Lipid- und Sterolmetabolismus identifiziert werden. Dies war deutlicher bei den Männchen ausgeprägt (Abbildung 19 oben), wobei hoch signifikante QTLs für die Phytosterole Brassicasterol (LOD 7,11;  $p < 0,001$ ) und Sitosterol (LOD 5,14;  $p < 0,001$ ) sowie für Lanosterol (LOD 5,29;  $p < 0,001$ ) einem Zwischenprodukt in der Cholesterolsynthese, beobachtet werden konnten, welche ihr Maximum zwischen d2mit7 (38,1 Mb) und rs13476554 (67,1 Mb) zeigten (Abbildung 27). Diese Position des Genoms beherbergte ebenfalls signifikante QTLs für das Plasma VLDL-Cholesterol (VLDL-C) (LOD 3,64;  $p = 0,002$ ) und das HDL-Cholesterol (HDL-C) (LOD 3,55;  $p = 0,002$ ) (Abbildung 27). Die Analyse der Allel-Verteilung ließ erkennen, dass das B6 Allel zu einem ungünstigeren Lipidprofil führte. Während das B6-Allel die Plasmakonzentrationen von Brassicasterol (Abbildung 28A), Sitosterol (Abbildung 28B), Lanosterol (Abbildung 28C) und VLDL-C (Abbildung 28D) erhöhte, senkte es den Plasmaspiegel von HDL-C (Abbildung 28E) und zeigte keinen signifikanten Effekt auf das LDL-Cholesterol (LDL-C) (Abbildung 28F) und die atherosklerotische Läsionsgröße (Abbildung 28G).

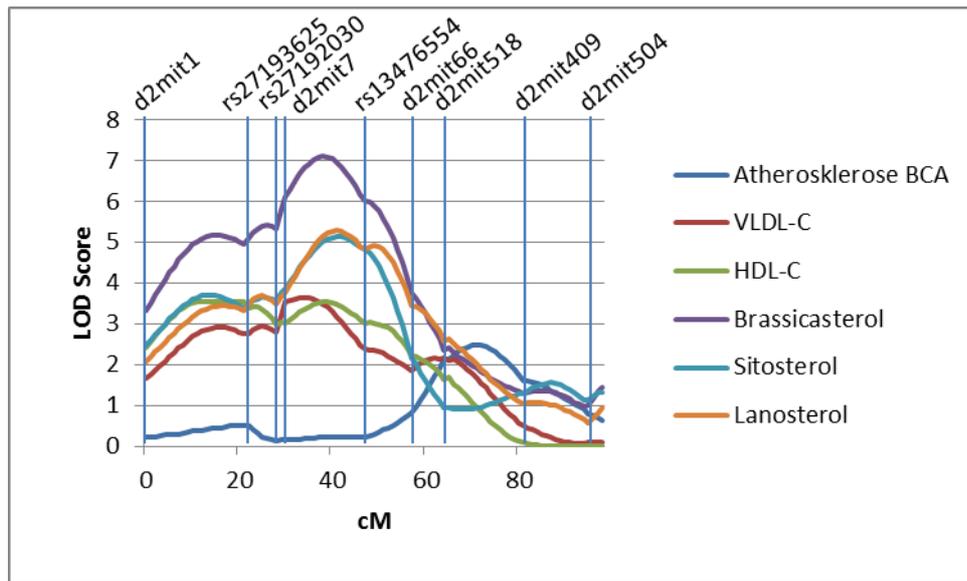
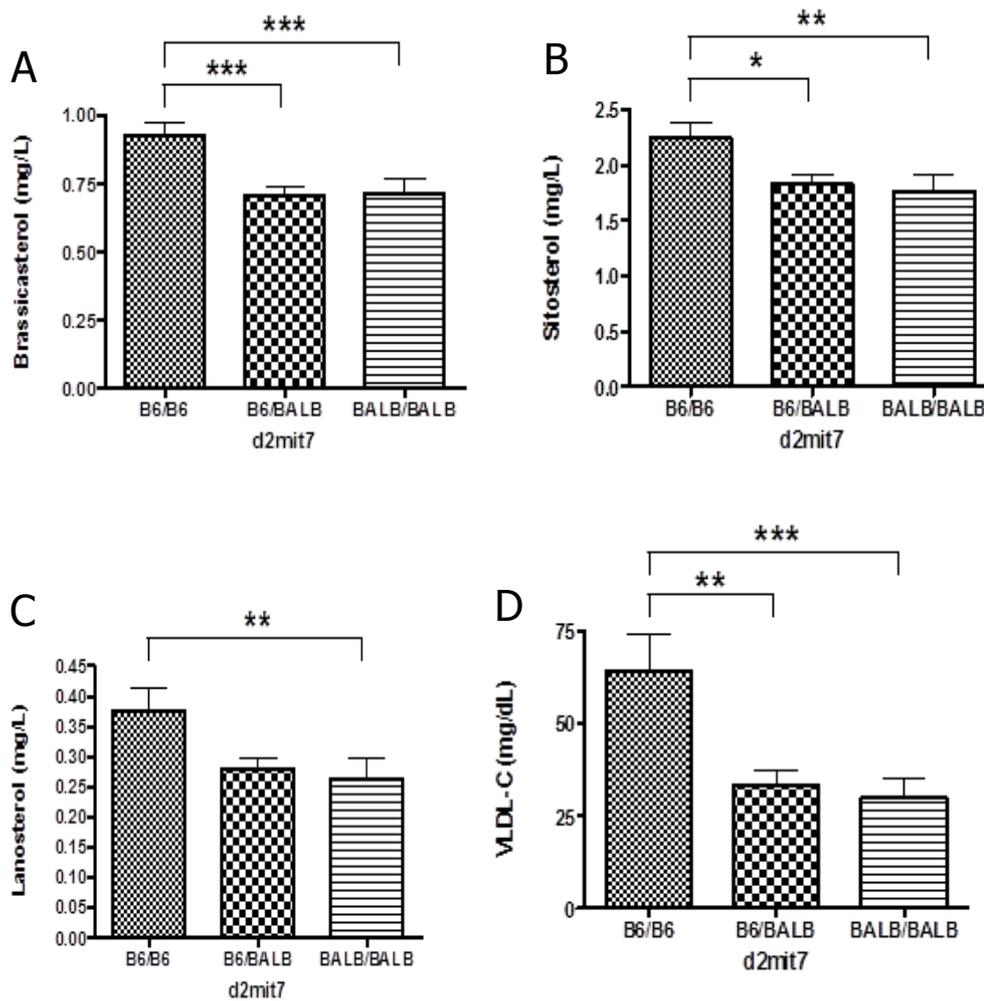
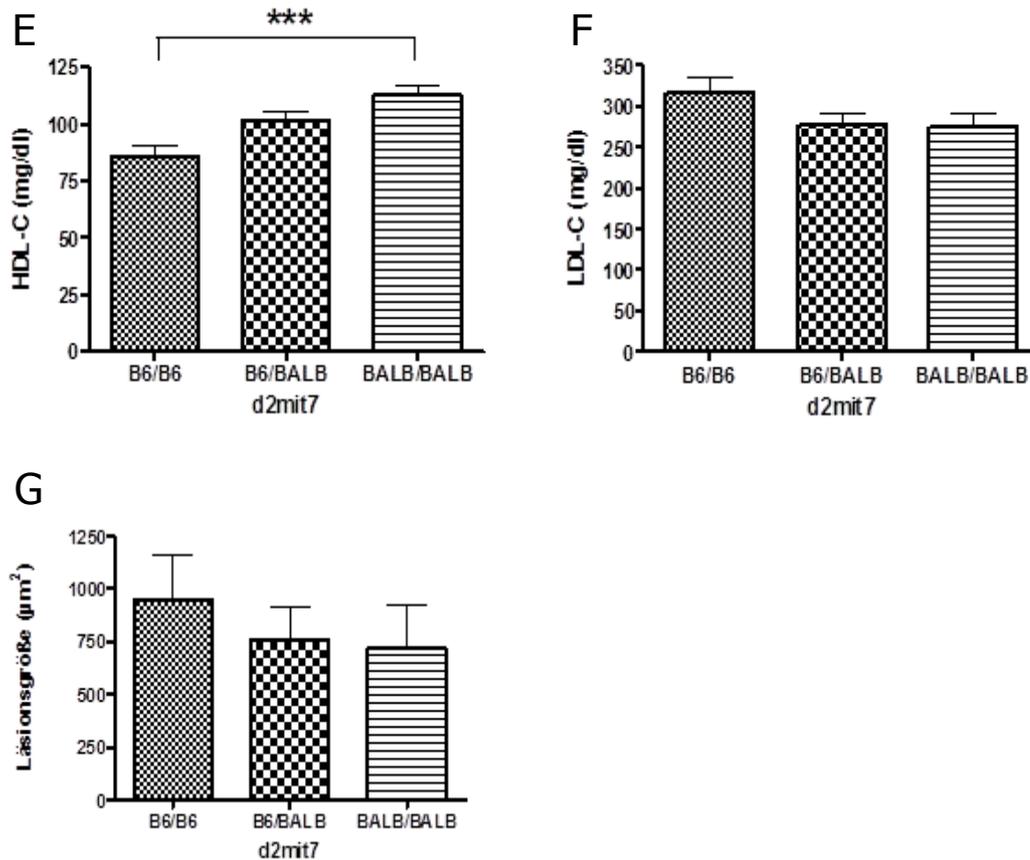


Abbildung 27 – LOD score Darstellung von Chromosom 2 der männlichen F2





**Abbildung 28 – Allelverteilung auf Chromosom 2 am Marker d2mit7 der männlichen F2 Generation**

Zusammenfassend wurde in dieser Studie ein neuer Locus für die atherosklerotische Läsionsgröße auf dem distalen Teil des Chromosoms 6 gefunden, wobei eine Kosegregation mit Merkmalen des Lipid- und Sterolmetabolismus gezeigt werden konnte. Desweiteren konnte erstmals ein Locus für die Sterole auf dem proximalen Abschnitt des Chromosoms 8 gefunden werden. Dieser war nur bei den männlichen Tieren vorhanden. Ebenfalls signifikante QTLs für die Sterole wurden auf dem proximalen Teil des Chromosom 2 detektiert und bereits bekannte QTLs für Cholesterol auf Chromosom 1 konnten auch in dieser Arbeit repliziert werden.

## 4 Diskussion

In dieser Studie konnte ein neuer geschlechtsspezifischer Genort für die Atherosklerose auf Chromosom 6 sowie neue, ebenfalls geschlechtsspezifische Loci für Atherosklerose modifizierende Faktoren wie Phytosterole auf den Chromosomen 2 und 8 entdeckt werden. Erstmals wurde zur Identifizierung dieser Genorte anhand der Kopplungsanalyse eine Kreuzung der atherosklerose-resistenten Balb/cByJ- und der atherosklerose-empfindlichen C57BL/6-Maus auf dem LDL- Rezeptor defizienten Hintergrund vorgenommen. Die Untersuchung der Phänotypen zeigte eine ausgeprägte Atherosklerose-Resistenz der BALB.*Ldlr*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Sie entwickelten signifikant kleinere Läsionen als B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup>. Dies entspricht den Ergebnissen diätinduzierter Atherosklerose-Studien bei C57BL/6 und Balb/cByJ Stämmen (Paigen et al, 1987).

Plasmalipid- und Lipoproteinkonzentrationen korrelierten signifikant mit der Läsionsgröße. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass die genetischen Faktoren, die zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen in dieser Kreuzung führten ihre Wirkung über die Plasmalipide und Lipoproteine entfalten.

### 4.1 Neuer Genlocus für Atherosklerose

In der vorliegenden Studie konnte ein neuer Locus für die atherosklerotische Läsionsgröße an der Brachiocephalarterie auf dem distalen Teil des Chromosoms 6 gefunden werden. Dies wurde speziell bei den männlichen Tieren beobachtet. Zur Untersuchung der genetischen Grundlagen potentieller systemischer Risikofaktoren für die Atherosklerose wurden zusätzlich Merkmale des metabolischen Systems bestimmt und eine Kopplungsanalyse für diese Parameter durchgeführt. Auf dem distalen Chromosom 6 kolokalisierte die atherosklerotische Läsionsgröße mit Loci der Plasmakonzentrationen für die Phytosterole Campesterol, Sitosterol und Brassicasterol sowie für LDL-C und Gesamtcholesterol. Dies könnte auf einen Zusammenhang dieser Plasmalipide und Lipoproteine mit der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen hinweisen. Auf Chromosom 6 stellte das C57BL/6 Allel das Risiko-Allel dar. Insbesondere bei den Männchen scheinen genetische Faktoren, die in dieser Kreuzung zur Entwicklung der Läsion beitragen pathophysiologisch über eine Beeinflussung der Plasmalipide wirken zu können.

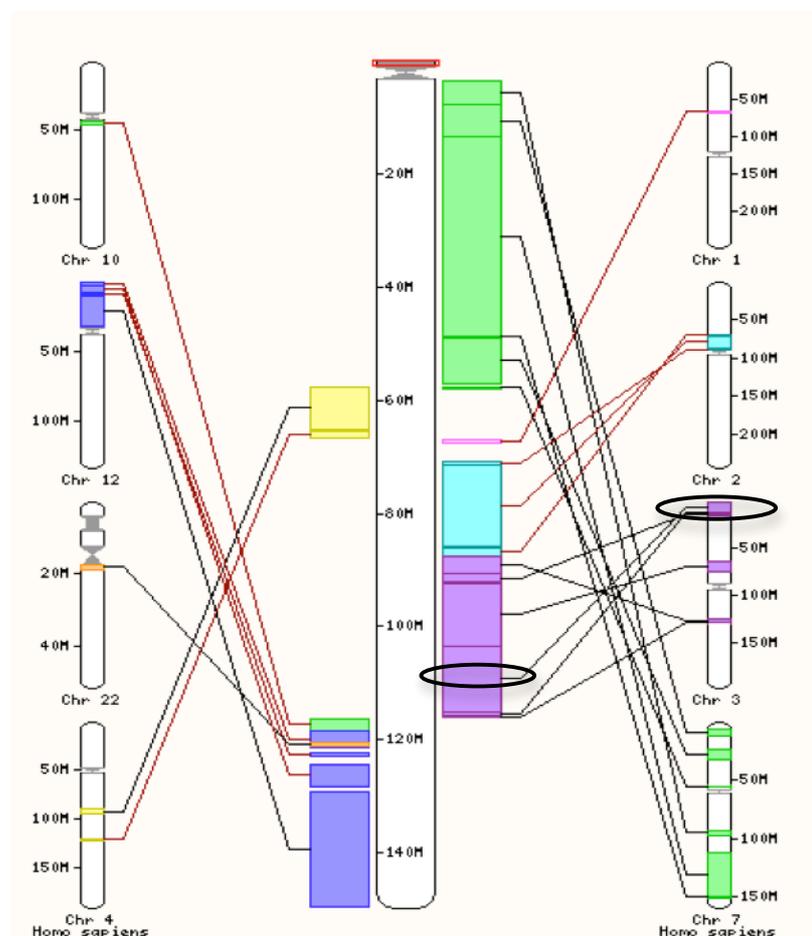
In früheren Studien konnte durch Kreuzung von CAST/Ei mit C57BL/6 Mäusen ein Locus für die atherosklerotische Läsionsgröße, in diesem Fall an der Aorta, auf

Chromosom 6 gefunden und ein zugrunde liegendes Gen identifiziert werden. Dieser Locus, Artles genannt, befindet sich nahe dem Marker d6mit256 (61cM, 126,2 Mb) und beinhaltet das Kandidaten-Gen Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR<sub>γ</sub>) (Mehrabian et al, 2001), das sich an Position 115 Mb des Mausgenoms befindet. In der vorliegenden Studie konnte spezifisch für die männlichen Tiere in der Nähe von Artles auf Chromosom 6, nahe des Markers d6mit216 (67 cM, 121 Mb), ebenfalls ein signifikanter Locus (LOD 6,09) für die atherosklerotische Läsionsgröße, in diesem Fall an der Brachiocephalarterie, gefunden werden. Möglicherweise handelt es sich um dasselbe zugrunde liegende Gen. Beim Menschen befindet sich die syntene Region und das Peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR<sub>γ</sub>)-Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (Chr3p25; 12,4 Mb) (Abbildung 29, Abbildung 30). PPAR<sub>γ</sub> wird ubiquitär exprimiert. Die Aktivierung von PPAR<sub>γ</sub> führt zu einer Verbesserung des Glukosestoffwechsels sowie der Insulinsensitivität und somit zu einer Verzögerung der Progression zum Typ 2 Diabetes mellitus (Sharma und Staels, 2007). Aktivierung des PPAR<sub>γ</sub>-Rezeptors steigert die Aufnahme freier Fettsäuren, wirkt auf die Differenzierung von Adipozyten und Makrophagen und besitzt darüber hinaus auch antiinflammatorische Effekte. Es konnte eine Assoziation zwischen der Aktivierung des PPAR<sub>γ</sub>-Rezeptors und einer Reduktion des Atheroskleroserisikos gezeigt werden (Balakumar et al, 2007; Tenenbaum et al, 2005). PPAR<sub>γ</sub> aktiviert das PON1 Gen, welches die Paraoxonase 1- Ausschüttung aus der Leber erhöht und dadurch die Atherosklerose reduziert (Khateeb et al, 2010). Therapeutisch wird PPAR<sub>γ</sub> beim Menschen im Rahmen der Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 genutzt. Die sogenannten Glitazone aus der Gruppe der oralen Antidiabetika aktivieren PPAR<sub>γ</sub> im Zellkern und steigern dadurch die Genexpression von Genen des Glukose- und Lipidstoffwechsels, die Glukoseaufnahme in die Zelle wird erhöht, die Insulinresistenz wird vermindert. Allerdings gibt es auch unerwünschte Nebenwirkungen wie Gewichtszunahme, Herzinsuffizienz, pathologische Frakturen und möglicherweise Urothelkarzinome, weshalb neuere und sicherere PPAR<sub>γ</sub>-Modulatoren erforscht werden sollen (Chmielewska-Kassassir et al, 2013; Cariou et al, 2012). Interessanterweise wurde dieses Gen bei den genomweiten Assoziationsstudien nicht mit KHK und Myokardinfarkt, sowie deren Risikofaktoren in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Studie würde man einen QTL auch für Glukose erwarten, der sich allerdings nicht beobachten ließ (Abbildung 19). Dies lässt vermuten, dass neben PPAR<sub>γ</sub> zusätzlich andere Gene relevant sein könnten. Stattdessen kolokalisierte die

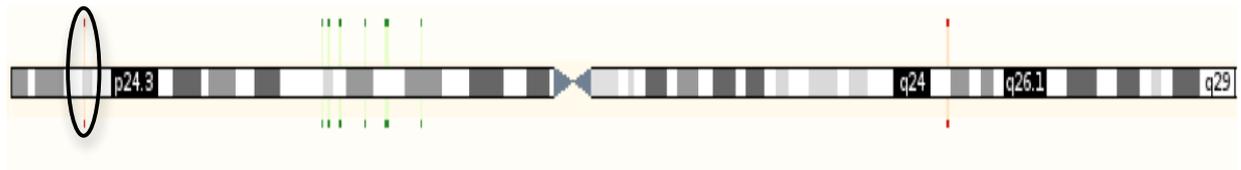
Atherosklerose mit Phytosterolen sowie LDL-C und dem Gesamtcholesterol. Spezielle Interaktionen von PPAR<sub>γ</sub> mit Phytosterolen und Lipoproteinen sind bisher nicht beschrieben. Es könnte ebenfalls ein Hinweis darauf sein, dass andere Gene an diesem Locus involviert sind.

In einer weiteren Studie, die eine Kreuzung von (MOLF/Ei × B6.129S7-*Ldl*<sup>tm1Her</sup>) × C57BL/6J-*Ldl*<sup>tm1Her</sup> verwendete, wurde ebenfalls für die atherosklerotische Läsionsgröße an der Aorta auf dem distalen Teil von Chromosom 6 ein signifikanter Locus (LOD 6,7) nahe des Markers d6mit110 (64,6 cM, 134 Mb) entdeckt. Dieser wurde *athsq2* genannt (Welch et al, 2001). Ein zugrunde liegendes Gen wurde nicht identifiziert.

Aufgrund der Geschlechtsspezifität des Atherosklerose Locus in der vorliegenden Studie kann man spekulieren, dass bei den männlichen Tieren gegebenenfalls Ko-faktoren vorhanden sind, die zur Ausprägung der Atherosklerose führen.



**Abbildung 29 – Syntenie zwischen Maus Chromosom 6 (Mitte) und Mensch (rechts und links):** markiert sind die Regionen auf denen sich das Kandidatengen PPAR<sub>γ</sub> befindet ([http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Location/Synten?otherspecies=Homo\\_sapiens&r=6%3A1-1000](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/Synten?otherspecies=Homo_sapiens&r=6%3A1-1000); 14.01.2014)

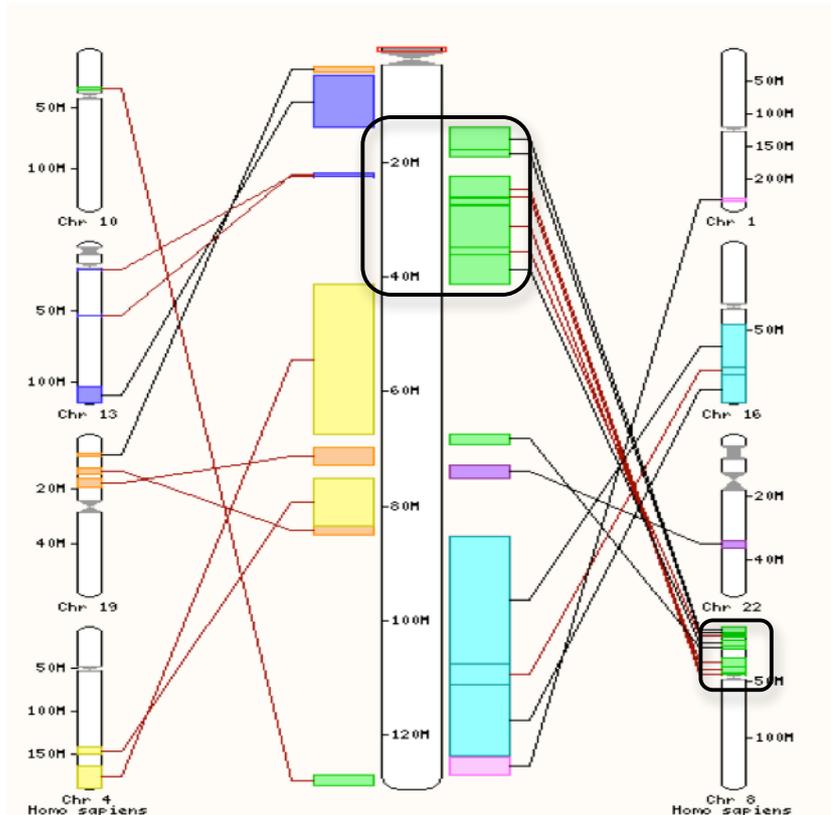


**Abbildung 30 – Lokalisation von PPAR<sub>γ</sub> auf Chromosom 3 beim Menschen**

([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000132170;r=3:12328867-12475855](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG00000132170;r=3:12328867-12475855); 14.01.2014)

## 4.2 Neue Genloci für Risikofaktoren der Atherogenese

Ebenfalls bei den männlichen Tieren konnte ein neuer QTL Cluster für Plasma-Phytosterole sowie für LDL-C und Gesamtcholesterol auf Chromosom 8 identifiziert werden. Es zeigte sich eine Korrelation der Phytosterol- und Cholesterolkonzentrationen mit der Läsionsgröße. Dies führt ebenfalls zur Annahme, dass in dieser Kreuzung die wesentlichen, zur Anfälligkeit für Atherosklerose führenden genetischen Faktoren über Plasmalipide und Lipoproteine wirken. Das zugehörige Intervall beinhaltet 629 Gene, von denen 221 Gene nur vorhergesagte Gene sind. Die syntene Region für den Chromosom 8 Locus der Maus befindet sich beim Menschen ebenfalls auf Chromosom 8 (Abbildung 31). Interessanterweise wurde in einer genomweiten Assoziationsstudie beim Menschen in der syntenen Region des identifizierten Chromosom 8 QTLs der Maus eine Assoziation zu Gesamtcholesterol, LDL-C, Triglyceriden und Risiko für Myokardinfarkt beobachtet (Teslovich et al, 2010). Das verursachende Gen, sowie dessen Verbindung zum Lipidmetabolismus und Myokardinfarkt bleiben bisher unbekannt.



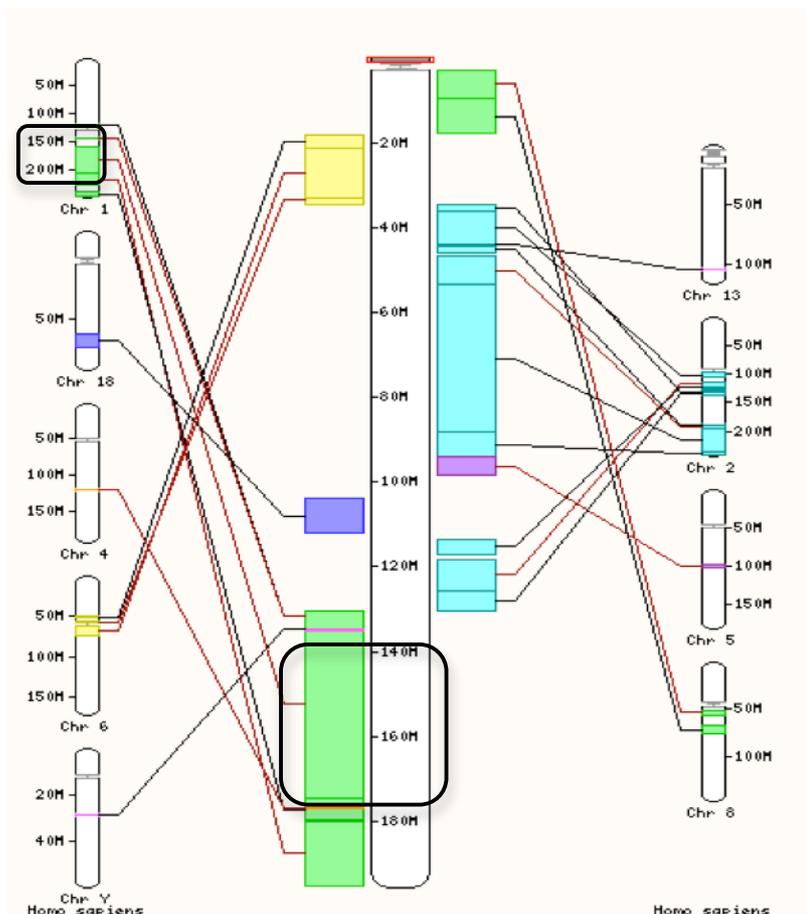
**Abbildung 31 – Syntenie zwischen Maus Chromosom 8 (Mitte) und Mensch (rechts und links):** markiert ist das Intervall des Phytosterol-, LDL-C- und Gesamtcholesterol- Locus und dessen syntene Region auf dem menschlichen Genom ([http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Location/Synten?otherspecies=Homo\\_sapiens&r=8%3A1-1000](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/Synten?otherspecies=Homo_sapiens&r=8%3A1-1000), 15.01.2014)

### 4.3 Weitere Genloci für Plasmalipid- und Lipoprotein-Metabolismus

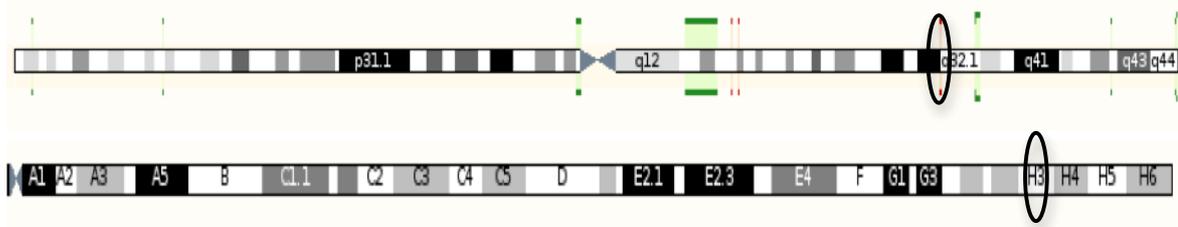
Der in der vorliegenden Arbeit identifizierte QTL für HDL und Phytosterole auf Chromosom 1 liegt in einer Region, für die schon mehrmals in anderen Studien Loci für Plasmalipide und Sterole beschrieben wurden (Wang und Paigen, 2005; Su et al, 2006; Su et al, 2009). Mehrmals wurde über einen HDL QTL auf dem distalen Chromosom 1 berichtet (Ishimori et al, 2003; Wang und Paigen, 2005), der auch in der vorliegenden Studie bestätigt werden konnte. Es wurden bereits 2 separate QTLs (Hdlq14 und Hdlq15) auf diesem distalen Abschnitt in einem Abstand von 10 cM identifiziert (Wang et al, 2003). Ein Kandidatengen für Hdlq15 ist ApoA2, welches ApoA-II, eine Hauptkomponente des Lipoproteins im HDL, codiert. Eine homozygote Nullmutation des ApoA2 Gens führt zu einer Reduktion des Gesamtcholesterols, HDL-C, freier Fettsäuren sowie der Insulin- und Glucosespiegel (<http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:88050>). Durch Kombination von

Plasma-Proteomscreening mittels Massenspektrometrie und Genomscreening konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Variation von ApoA2 für die Unterschiede des HDL Cholesterols auf Chromosom 1 verantwortlich ist (Holdt et al, 2013).

Bei der Maus befindet sich apoA2 bei 171 Mb, beim Menschen bei 161 Mb, jeweils auf dem distalen Chromosom 1 (Abbildung 33). Die Kandidatengene, die in den humanen genomweiten Assoziationsstudien mit KHK, Myokardinfarkt und deren Risikofaktoren auf Chromosom 1 entdeckt wurden, befinden sich hauptsächlich auf dem kurzen Arm des Chromosoms während sich die syntene Region des Maus- QTLs auf dem langen Arm befindet.



**Abbildung 32 – Syntenie zwischen Maus Chromosom 1 (Mitte) und Mensch (rechts und links):** markiert ist der in der vorliegenden Studie identifizierte Maus QTL für HDL und Phytosterole sowie dessen syntene Region auf dem menschlichen Genom ([http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Location/Syteny?otherspecies=Homo\\_sapiens&r=1%3A1-1000](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/Syteny?otherspecies=Homo_sapiens&r=1%3A1-1000), 15.01.2014)



**Abbildung 33 – Lokalisation des ApoA2 Gens auf Chromosom 1:** oben humanes Genom (161 Mb); unten Maus-Genom (171 Mb)

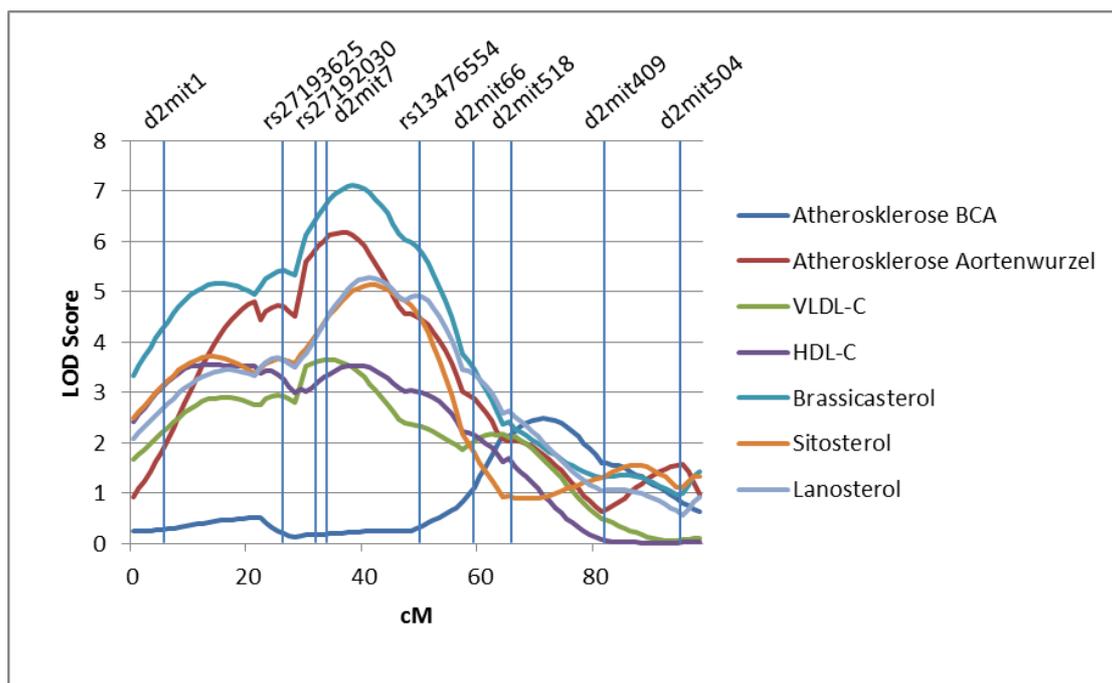
([http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Location/View?db=core;g=ENSMUSG00000005681;r=1:171225054-171226379](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/View?db=core;g=ENSMUSG00000005681;r=1:171225054-171226379); 15.01.2014)

Ein QTL für Plasma-VLDL-C, HDL-C, dem Cholesterolsynthesemarker Lanosterol, Brassicasterol und Sitosterol konnte in der vorliegenden Arbeit auf Chromosom 2 gefunden werden. Frühere Studien entdeckten am proximalen Chromosom 2 bereits QTLs für Merkmale des Metabolismus und der Plasmasterole. Dabei handelt es sich zum einen um HDL1, einen Locus für das Plasma HDL-C in der Nähe des Markers d2mit9 (65,2 Mb), welcher erstmals in einer Kreuzung von CAST/Ei und C57BL/6J (Mehrabian et al, 2000) gezeigt werden konnte und später in einer weiteren Kreuzung von CAST und DBA Mäusen bestätigt wurde (Lyons et al, 2003). Desweiteren wurde Mob7, ein Locus für subkutanes und retroperitoneales Fettgewebe, ebenfalls nahe des Markers d2mit9, unter der Verwendung von CAST/Ei und B6 Mausstämmen (Mehrabian et al, 1998) identifiziert. Später wurden mit Mob7 überlappende Loci für Körpergewicht, Fettgewebe und Adipozytengröße in einem unabhängigen Modell identifiziert (Mizutani et al, 2006). In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls eine suggestive Kopplung für Fettgewebe beobachtet werden (Abbildung 19). Hinsichtlich der Phytosterol-Konzentrationen im Plasma wurde anhand einer Kreuzung von Casa und C57BL/6J Mäusen Plast2a nahe des Markers d2mit296 (31,18 Mb) beschrieben (Sehayek et al, 2002), wobei, ähnlich zur vorliegenden Studie, das C57BL/6J Allel zum Anstieg der Pflanzensterolspiegel im Plasma beiträgt. Erhöhte Plasmakonzentrationen von Phytosterolen wurden als potentieller Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit bei Maus und Mensch diskutiert (Silbernagel et al, 2010). Diese Ansicht wurde anhand einer Mendelian Randomization Studie beim Menschen, welche Loci für Phytosterole mittels genomweiter Assoziation identifizierte und konkordante Assoziationen zur koronaren Herzkrankheit zeigte, unterstützt (Teupser et al, 2010). Ein Anstieg der Phytosterolkonzentrationen führte in der vorliegenden Studie zu einem Anstieg der Läsionsgröße. Dies bekräftigt die Meinung, Phytosterole als potentiellen Risikofaktor

für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen anzusehen. Eine Normalisierung der Phytosterolspiegel hob das Kopplungs-Signal auf. Daher lässt sich vermuten, dass die Phytosterole vielmehr einen Indikator für erhöhte VLDL-C-Spiegel darstellen könnten und eine höhere Konzentration von Phytosterolen, die auf dem VLDL-C mitwandern, widerspiegeln. Man könnte ebenso spekulieren, dass ein gemeinsamer genetischer Modulator durch Beeinflussung der Sterolabsorption in intestinalen Zellen oder der hepatischen Exkretion der Sterole in die Galle beide Merkmalsausprägungen beeinflusst.

#### 4.4 Ortsspezifität atherosklerotischer Läsionen

In einem Parallelarm dieser Studie wurde die atherosklerotische Läsionsgröße an der Aortenwurzel derselben Tiere bestimmt, wobei zum ersten mal ein Locus für die Atherosklerose auf Chromosom 2 identifiziert werden konnte, welcher Ath39 genannt wurde (Burkhardt et al, 2011) (Abbildung 34).



**Abbildung 34- LOD score Darstellung von Chromosom 2 der männlichen F2 Generation:** Für die Atherosklerose der Brachiocephalarterie (BCA) lässt sich kein signifikanter Locus identifizieren. Hingegen kolokalisiert ein für die Atherosklerose der Aortenwurzel signifikanter Locus mit dem Locus für die Lipoproteine VLDL-C und HDL-C sowie die Phytosterole Brassicasterol, Sitosterol und dem Cholesterolsynthesemarker Lanosterol.

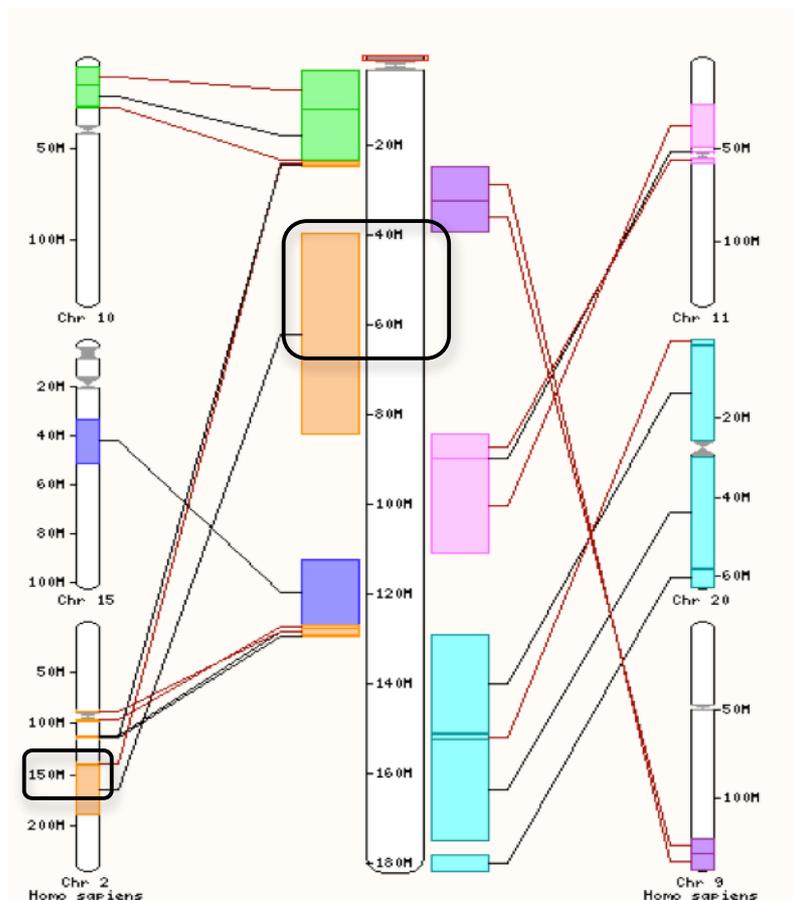
---

Mittels Haplotypanalyse und vergleichender Genomanalyse zwischen Mensch und Maus konnten 2 Kandidatengene herausgefiltert werden, die sich allerdings, u.a. anhand von Expressionsanalysen (eQTL), nicht als kausale Gene für die Atheroskleroseentwicklung erweisen konnten. Ursächlich für den fehlenden QTL für die Atherosklerose an der Brachiocephalarterie könnte die Ortsspezifität der Atherogenese sein. Die Schwankungen in der Entwicklung der Läsionen an verschiedenen Orten sind suszeptibel für etliche Parameter. Dazu zählen zum Beispiel der genetische Hintergrund, der Immunstatus, das Geschlecht und oxidativer Stress, die jeweils die Atherosklerose an den verschiedenen Orten unterschiedlich beeinflussen (VanderLaan et al, 2004). Die atherosklerotischen Läsionen bei der Maus sind an Orten mit niedrigem oder oszillierendem Scherstress lokalisiert (Huo et al, 2008; Neth et al, 2013), so insbesondere an der Aortenwurzel, der Brachiocephalarterie, der kleinen Krümmung des Aortenbogens, der Abzweigung der linken Arteria carotis communis und der linken Arteria subclavia sowie in geringerem Ausmaß an der absteigenden thorakalen Aorta. Neuere Studien deuten darauf hin, dass die Geometrie des Aortenbogens einen Einfluss auf die Lokalisation der Läsionen bei der Maus hat (Zhu et al, 2009; Tomita et al, 2010). Diese Unterschiede in der Geometrie des Aortenbogens existieren ebenso beim Menschen (Fogel et al, 2006). Eine Reduktion des Scherstresses unter eine bestimmte Schwelle, so z.B. bei oszillierendem Fluss, erhöht den Umsatz von Endothelzellen aufgrund verstärkter Apoptose und Proliferation und induziert einen proinflammatorischen Phänotyp durch erhöhtes Haftvermögen der Leukozyten (Ando und Yamamoto, 2011, Riha et al, 2005). Zusätzlich zum Scherstress dehnt der transmurale Druck, der durch den Blutdruck im Gefäßlumen induziert wird, mechanisch die Gefäßwand. Die mechanische Dehnung moduliert funktionelle Merkmale der glatten Muskelzellen wie die Proliferation, Apoptose und Migration, die eng mit dem vaskulären Remodelling in Zusammenhang stehen (Haga et al, 2007). Zusätzlich zum verminderten Scherstress ist die mechanische Dehnung an den Prädilektionsstellen der Atherosklerose erhöht, wobei eine Senkung der zirkumferentiellen Wandspannung die Atherosklerose einschränken kann. Dies weist darauf hin, dass beide hämodynamischen Faktoren eine Rolle bei der Atherogenese spielen (Thubrikar und Robicsek, 1995). Sie haben Einfluss auf die Differenzierung der Endothel- und glatten Muskelzellen und somit auf den Phänotyp der vaskulären Zellen. MicroRNAs sind kleine, nicht-kodierende, Einzelstrang-RNAs, die die Genexpression durch posttranskriptionelle Hemmung regulieren und so die Differenzierung modulieren und über das Schicksal der Zelle

---

bestimmen. Hoher Scherstress induziert die Bildung von MicroRNAs, die eine atheroprotektive Rolle vermitteln, während niedriger Scherstress zur Expression von MicroRNAs führt, die zu einem pathologischen Phänotyp der Endothelzellen führen (Neth et al, 2013). Diese Sachverhalte könnten die unterschiedliche Ausprägung der atherosklerotischen Läsionen zwischen der vorliegenden Studie und deren Parallelarm bedingen.

Trotz verschiedener Belege, dass das proximale Chromosom 2 einen Locus trägt, welcher den Lipidmetabolismus, die Körperfettregulation und auch die Atherosklerose involviert, konnten bisher die zugrunde liegenden Gene nicht identifiziert werden. Zu den Bioinformatik-basierten Strategien, die das QTL Intervall eingrenzen und somit die Suche nach dem ursächlichen Gen erleichtern können, zählen u.a. die Haplotype-Analyse. Hierfür kann der Mouse Haplotype Block Viewer verwendet werden, um die Abschnitte identifizieren zu können, die keine durch Abstammung erworbene Gleichheit (non-identical-by-descent; non-IBD) zwischen 2 Mausstämmen aufweisen.



**Abbildung 35 - Syntenie zwischen Maus Chromosom 2 (Mitte) und Mensch (rechts und links):** markiert ist der in der vorliegenden Studie identifizierte Maus QTL für Cholesterolverstoffung und Phytosterole sowie dessen syntenische Region auf dem menschlichen Genom

([http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Location/Synteny?otherspecies=Homo\\_sapiens&r=2%3A1-1000](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/Synteny?otherspecies=Homo_sapiens&r=2%3A1-1000), 15.01.2014)

In Regionen, in denen die Allele beider Mausstämme vom gleichen Vorfahren stammen, ist es sehr unwahrscheinlich das zugrunde liegende Gen eines QTLs zu identifizieren (DiPetrillo et al, 2005). Eine weitere Möglichkeit zur Eingrenzung des Intervalls stellt die vergleichende Genomik dar, welche annimmt, dass die gleichen Gene den QTLs in syntenen Regionen verschiedener Spezies zugrunde liegen (Burgess-Herbert et al, 2008). Die syntenen Regionen beim Menschen für Teile des Maus QTLs auf Chromosom 2 befinden sich zwischen Chr2q22.1 und 2q32.1 (Abbildung 35), einer Region, in der verschiedene Kopplungsanalysen beim Menschen QTLs für die koronare Herzkrankheit und HLD-C entdeckten (Nsengimana et al, 2007; Samani et al, 2005).

#### **4.5 Genlocus für Fellfarbe**

Zur Qualitätskontrolle der Studie wurde für die Fellfarbe ebenfalls eine Kopplungsanalyse durchgeführt und es zeigte sich ein hochsignifikanter Genlocus auf Chromosom 7 jeweils bei den männlichen und weiblichen Tieren (Abbildung 19). Dieser ist bekannt als Albino-Locus, auch Tyr Locus genannt. Er war einer der ersten Loci, die man verwendete, um die Mendelschen Regeln bei Säugetieren zu Beginn des letzten Jahrhunderts zu veranschaulichen. Das Tyr Gen kodiert die Tyrosinase, ein Enzym, das an der Synthese von Melanin beteiligt ist (Beermann et al, 2004). Ein zweiter Locus, der die Fellfarbe bestimmt ist der Agouti Locus auf Chromosom 2 (Siracusa et al, 1987), welcher in dieser Studie allerdings nicht zu beobachten war.

#### **4.6 Ausblick**

Zur Identifizierung der den jeweiligen untersuchten Phänotypen zugrunde liegenden Gene, die sich in dem Intervall der verschiedenen Loci befinden, bedarf es einiger weiterer Schritte, um zunächst die Größe des Intervalls bei fehlenden zusätzlichen Markern, einzugrenzen. Dazu zählt zum einen die Haplotyp-Analyse, z.B. mit Hilfe des Mouse Haplotype Block Viewer (siehe oben), welche Regionen mit Allelen gleicher Vorfahren beider Mausstämme eliminieren kann. Zum anderen dient ein Genomvergleich verschiedener Spezies unter der Annahme, dass die gleichen Gene den QTLs in den syntenen Regionen zugrunde liegen, der Eingrenzung des Intervalls (Burgess-Herbert et al, 2008). Überlappungen der syntenen Regionen können zum Beispiel mit Hilfe des Mouse Map Converters identifiziert und somit das Intervall

---

weiter reduziert werden. Bei komplexen genetischen Merkmalen besteht kein 1:1 Verhältnis zwischen Geno- und Phänotyp. Dies erschwert die Suche nach dem ursächlichen Gen (Darvasi, 1998). Eine einzelne Genmutation führt daher nicht zwangsläufig zu einem veränderten Phänotyp. Dieser kann erst nach Untersuchung entsprechend großer Fallzahlen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führt bei monogenetischen Erkrankungen die Mutation eines einzelnen Genes zur Änderung des Phänotyps, was eine erfolgreiche Suche erleichtert. Heutzutage erweisen sich Expressionsanalysen (eQTL) als gute Methode Kandidatengene der Genloci näher zu untersuchen. Hierzu wird die Expression eines Einzelgens oder eines kompletten Transkriptoms mit Hilfe von Genexpressionsarrays quantitativ bestimmt. mRNA Transkript-Kopien dienen als quantitatives Merkmal und werden als Expressions-QTL (eQTL) kartiert. Zeigt sich eine Co-Segregation mit chromosomalen Regionen, die komplexe Merkmale, so zum Beispiel die Atherosklerose, kontrollieren, so lässt dies Rückschlüsse auf das ursächliche Gen zu und erleichtert die Genidentifikation. Auf diese Weise wurden bereits einige kausale Gene identifiziert (Schadt et al, 2003; Schadt et al, 2005). Weitere Methoden zur Untersuchung der Kandidatengene und ihrer Einflüsse auf den Genotyp stellen Knockout- und Genüberexpressions-Mausmodelle sowie Zellkultur-Studien dar. Desweiteren konnte der Nutzen von Plasma-Proteom-Kopplungsanalysen (pQTLs) für jede genetische Untersuchung gezeigt werden. Die Eignung für eine Hochdurchsatz-Analyse könnte diesen neuen Ansatz interessant für groß angelegte genomweite Assoziationsstudien machen (Holdt et al, 2013). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie gilt es die Intervalle für die Genloci auf Chromosom 1, 2, 6 und 8 einzugrenzen, um den verantwortlichen Genen auf die Spur zu kommen. Wie sieht nun die Zukunft von Kopplungsanalysen am Maus-Modell aus? Genomweite Assoziationsstudien zeichnen sich als leistungsstarkes Hilfsmittel ab, neue Gene und molekulare Wege, die für die Empfindlichkeit für humane komplexe Erkrankungen verantwortlich sind, zu definieren. Trotz dieser Erfolge hat diese Methode auch ihre Limitationen, bemerkenswert zum Beispiel die inkonsistente Penetranz der Phänotypen als Folge von verschiedenartigsten Umwelteinflüssen. Mausmodelle können jedoch einige dieser Nachteile umgehen, indem sie ein viel höheres Maß an Kontrolle über die genetische Variation und die Umwelteinflüsse erlauben. Obwohl ihre Anwendung und Übertragung auf die menschliche komplexe Genetik nicht immer eindeutig ist, dienen sie trotzdem hervorragend und überzeugend als Mittel Beobachtungen bei humanen Populationen zu ergänzen. Die Kopplungsanalyse am Mausmodell hat sich als eine

---

sehr erfolgreiche aber auch technisch aufwändige Methode erwiesen die Empfindlichkeit für verschiedene Merkmale zu bestimmen. Kopplungsanalysen für die Atherosklerose am Mausmodell haben unter anderem genetische Regionen, die den Ausprägungsgrad der Läsionen modifizieren, definiert. Die Identifizierung der verantwortlichen Gene kann sowohl zu neuen Erkenntnissen der Pathogenese der Atherosklerose als auch zu Kandidaten für die humanen genetischen Assoziationsstudien führen.

---

## 5 Zusammenfassung

Die Atherosklerose stellt zusammen mit ihren Folgeerkrankungen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar und steht seit Jahrzehnten im Blickfeld medizinischer Forschung. Die vorliegende Arbeit diente der Identifizierung neuer Genloci für die Atheroskleroseempfindlichkeit sowie Atherosklerose-modifizierender Faktoren. Da Lipide eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Plaques spielen wurde besonderes Augenmerk auf die Lipoproteine HDL, LDL, VLDL sowie auf das Gesamtcholesterol gelegt. Über das atherogene Potential der Phytosterole herrscht noch Uneinigkeit, weshalb diese ebenfalls auf eventuell zugrunde liegende genetische Faktoren untersucht wurden.

Zum ersten Mal wurde eine Kreuzung atheroskleroseresistenter Balb/cByJ mit atheroskleroseempfindlichen C57BL/6 Mäusen auf dem LDL-Rezeptor defizienten Hintergrund unter einer semisynthetischen Hal tungsd iät mit 0,02% Cholesterol vorgenommen. Anhand des Kreuzungsschemas ließ sich ein gegebenenfalls vorhandener Einfluss des Ursprungs der Geschlechtschromosomen und der Mitochondrien auf den Phänotyp nachweisen. Geno- und phänotypisiert wurde sowohl die Parental- als auch die F1 und F2 Generation. Die Genotypisierung erfolgte mit 119 Mikrosatellitenmarkern, die über das gesamte Genom verteilt waren. Zum Finemapping an neu entdeckten Genloci wurden zusätzlich 12 SNP Marker verwendet. Die Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen erfolgte an der Brachiocephalarterie. Weitere 41 phänotypische Merkmale, die anthropometrische und metabolische Parameter wie Lipide, Lipoproteine und Sterol-Metabolite beinhalten, wurden bestimmt. Zur Kopplungsanalyse wurden 376 Mäuse der F2 Generation verwendet.

Die Parentalstämme (BALB.*Ldlr*<sup>-/-</sup> und B6.*Ldlr*<sup>-/-</sup>) zeigten signifikante Unterschiede im Lipidprofil und der Ausprägung der atherosklerotischen Läsionen. Aufgrund der beobachteten signifikanten Geschlechtsunterschiede für mehrere Phänotypen, einschließlich der atherosklerotischen Läsionsgröße, wurden die männlichen und weiblichen Tiere getrennt voneinander analysiert. Die Kopplungsanalyse führte zur Entdeckung eines neuen Atherosklerose QTL für die Brachiocephalarterie auf Chromosom 6. Dieser war geschlechtsspezifisch und nur bei den Männchen zu beobachten. Es zeigte sich eine Kosegregation mit Phytosterolen sowie LDL-C und Gesamtcholesterol. Dies weist auf einen kausalen Zusammenhang dieser Lipide und

Lipoproteine mit der Entwicklung von Atherosklerose hin. Als mögliches zugrunde liegendes Kandidatengen wurde PPAR<sub>γ</sub> identifiziert, dessen Aktivierung unter anderem antiinflammatorische Effekte hervorruft und die Atherosklerose reduzieren kann. Weitere Gene und Kofaktoren sind vermutlich für die Geschlechtsspezifität sowie die Verbindung der Phytosterole, LDL-C und Gesamtcholesterol mit der Ausprägung atherosklerotischer Läsionen verantwortlich. Ein weiterer neuer Genlocus konnte für die Phytosterole, LDL-C und Gesamtcholesterol auf Chromosom 8 identifiziert werden. Bei genomweiten Assoziationsstudien für Myokardinfarkt und dessen Risikofaktoren wurde ebenfalls in der syntenen Region auf Chromosom 8 des Menschen ein Locus entdeckt. Zugrunde liegende Gene wurden bisher nicht identifiziert.

Desweiteren konnte in dieser Studie ein bereits mehrfach entdeckter Locus für HDL auf Chromosom 1, dessen zugrunde liegendes Gen ApoA2 ist, bestätigt werden. Ein QTL für VLDL-C, HDL-C, dem Cholesterolsynthesemarker Lanosterol, Brassicasterol und Sitosterol konnte in der vorliegenden Arbeit auf Chromosom 2 gefunden werden. Frühere Studien konnten ebenfalls für dieses Chromosom QTLs für Merkmale des Metabolismus und der Plasmasterole nachweisen. Hinsichtlich der Phytosterolkonzentrationen im Plasma wurde bereits der Locus Plast2a beschrieben. Ähnlich zur vorliegenden Studie trug das C57BL/6 Allel zum Anstieg der Pflanzensterolspiegel im Plasma bei. Ursächliche Gene konnten bisher ebenfalls noch nicht eindeutig identifiziert werden. Erhöhte Plasmakonzentrationen von Phytosterolen wurden als potentieller Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit bei Maus und Mensch diskutiert. Ein Anstieg der Phytosterolkonzentrationen führte in der vorliegenden Studie zu einem Anstieg der Läsionsgröße. Dies bekräftigt die Meinung, Phytosterole als potentiellen Risikofaktor für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen anzusehen.

Die Kopplungsanalyse am Mausmodell hat sich als eine sehr erfolgreiche Methode erwiesen die Empfindlichkeit für verschiedene Merkmale zu bestimmen. Kopplungsanalysen am Mausmodell haben unter anderem genetische Regionen definiert, die den Ausprägungsgrad der Läsionen modifizieren. Die Identifizierung der verantwortlichen Gene kann sowohl zu neuen Erkenntnissen der Pathogenese der Atherosklerose als auch zu Kandidaten für die humanen genetischen Assoziationsstudien führen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ando H, Tsuruoka S, Yamamoto, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A (2005): Regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase mRNA expression in C57BL/6 mice fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis*. 178:265-269.
- Ando J, Yamamoto K. (2011): Effects of shear stress and stretch on endothelial function. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Sep 1;15(5):1389-403. PubMed-ID: 20854012
- Altmann, SW, HR Davis, Jr, et al. (2004): Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. 303: 1201-4.
- Asakura T, Karino T (1990): Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ Res*. 66:1045-1066. PubMed-ID: 2317887
- Assimes TL, Knowles JW, Basu A, Iribarren C, Southwick A, Tang H, Absher D, Li J, Fair JM, Rubin GD, Sidney S, Fortmann SP, Go AS, Hlatky MA, Myers RM, Risch N, Quertermous T (2008): Susceptibility locus for clinical and subclinical coronary artery disease at chromosome 9p21 in the multi-ethnic ADVANCE study. *Hum Mol Genet*. 17:2320-2328. PubMed-ID: 18443000
- Assmann G, Cullen P, Erbey J, Ramey DR, Kannenberg F, Schulte H (2006): Plasma sitosterol elevations are associated with an increased incidence of coronary events in men: results of a nested case-control analysis of the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006; 16: 13–21. PubMed-ID:16399487
- Balakumar P, Rose M, Ganti SS, Krishan P, Singh M (2007): PPAR dual agonists: are they opening Pandora's Box? *Pharmacol Res*. 2007 Aug;56(2):91-8. PubMed-ID: 17428674
- Baldan A, Pei L, Lee R, Tarr P, Tangirala RK, Weinstein MM, Frank J, Li AC, Tontonoz P, Edwards PA (2006): Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldl $^{-/-}$  and Apoe $^{-/-}$  mice transplanted with Abcg1 $^{-/-}$  bone marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26: 2310-2307
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, Kwiterovich P, Shan B, Barnes R, Hobbs HH. (2000): Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*. 290(5497):1771-5. PubMed-ID: 11099417
- Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, Cohen JC (2002): Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res*. 2002; 43: 486–494. PubMed-ID: 11893785
- Besler C, Lüscher TF, Landmesser U (2012): Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med*. 2012 Apr;4(4):251-68. PMID:22431312
-

- Brewer HB Jr (1999): Review Hypertriglyceridemia: changes in the plasma lipoproteins associated with an increased risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 1999 May 13; 83(9B):3F-12F.
- Brown MS, Goldstein JL (1986): A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232: 34–47.
- Brown MS, Goldstein JL (1996): Heart attacks: gone with the century? *Science* 272, 629. PubMed-ID: 1684809
- Brownstein MJ, Carpten JD, Smith JR. Modulation of non-templated nucleotide addition by taq DNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques.* 1996;20:1004-1006, 1008-1010
- Burgess-Herbert SL, Cox A, Tsaih SW, Paigen B (2008): Practical applications of the bioinformatics toolbox for narrowing quantitative trait loci. *Genetics.* 2008 Dec;180(4):2227-35. PubMed-ID: 18845850
- Burkhardt R, Sündermann S, Ludwig D, Ceglarek U, Holdt LM, Thiery J, Teupser D (2011): Cosegregation of aortic root atherosclerosis and intermediate lipid phenotypes on chromosomes 2 and 8 in an intercross of C57BL/6 and BALBc/ByJ low-density lipoprotein receptor<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Apr;31(4):775-84. Epub 2011 Jan 20. PubMed-ID:21252064
- Calpe-Berdiel L, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F (2008): New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis.* 2008 Jul 6. [Epub ahead of print] PubMed-ID: 18692849
- Cambien F, Tiret L (2007): Genetics of cardiovascular diseases: from single mutations to the whole genome. *Circulation.* 116: 1714-1724. PubMed-ID: 17923582
- Cariello, N. F., P. Keohavong, et al. (1988). "DNA damage produced by ethidium bromide staining and exposure to ultraviolet light." *Nucleic Acids Res* 16(9): 4157
- Cariou B, Charbonnel B, Staels B (2012): Thiazolidinediones and PPAR $\gamma$  agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol Metab.* 2012 May;23(5):205-15. PubMed-ID: 22513163
- Castellani LW, Navab M, Van Lenten BJ, Hedrick CC, Hama SY, Goto AM, Fogelman AM, Lusis AJ (1997): Overexpression of apolipoprotein AII in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *J Clin Invest.* 100:464-474. PubMed-ID: 9218525
- Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB (1986): Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA.* 1986 Nov 28; 256(20):2835-8.
- Chai YC, Howe PH, DiCorleto PE, Chisolm GM.(1996): Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem* 1996;271:17791-17797.
-

- Chen Y, Rollins J, Paigen B, Wang X. (2007): Genetic and genomic insights into the molecular basis of atherosclerosis. *Cell Metab.* 2007 Sep;6(3):164-79. PubMed-ID: 17767904
- Cheng X, Shi L, Nie S, Wang F, Li X, Xu C, Wang P, Yang B, Li Q, Pan Z, Li Y, Xia H, Zheng C, Ke Y, Wu Y, Tang T, Yan X, Yang Y, Xia N, Yao R, Wang B, Ma X, Zeng Q, Tu X, Liao Y, Wang QK (2011): The same chromosome 9p21.3 locus is associated with type 2 diabetes and coronary artery disease in a Chinese Han population. *Diabetes.* 60:680-684. PubMed-ID: 21270277
- Chmielewska-Kassassir M, Woźniak LA, Ogrodniczek P, Wójcik M (2013): The role of peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in obesity and insulin resistance. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2013 Dec 11;67(0):1283-99. PubMed-ID: 24379269
- Collins, R. G., R. Velji, et al. (2000): P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 2000 Jan 3;191(1):189-94. PubMed-ID: 10620617
- Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS (2001): A major role for VCAM-1, but not ICAM-1 in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001; 107:1255-1262
- Cybulsky MI, Won D, Haidari M (2004): Leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions. *Can J Cardiol.* 2004;20(Suppl B):24B-8B.
- Darvasi, A (1998): Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nature Genetics* 18, 19-24 (1998)
- Demonty I, Ras RT, van der Knaap HC, Duchateau GS, Meijer L, Zock PL, Geleijnse JM, Trautwein EA (2008/2009): Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J Nutr.* 2009 Feb;139(2):271-84. doi: 10.3945/jn.108.095125. Epub 2008 Dec 17. Review. PubMed-ID:19091798
- DiPetrillo K, Wang X, Stylianou IM, Paigen B.(2005): Bioinformatics toolbox for narrowing rodent quantitative trait loci. *Trends Genet.* 2005;21:683-692.
- Do R et al. (2013): Common variants associated with plasma triglycerides and risk for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013 Nov;45(11):1345-52. doi: 10.1038/ng.2795. PubMed-ID: 24097064
- Duckworth W, Abaira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, McCarren M, Vitek ME, Henderson WG, Huang GD; VADT Investigators (2009): Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 360: 1024-2015. PubMed-ID: 19092145
- Ehret et al. (2011): Genetic variants in novel pathways influence blood pressure and cardiovascular disease risk. *Nature.* 478:103-109. PubMed-ID: 21909115
-

- Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, Wood AM, Lewington S, Sattar N, Packard CJ, Collins R, Thompson SG, Danesh J (2009): Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA*. 2009 Nov 11; 302(18):1993-2000.
- Falconer, DS, Mackay, TFC. *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th ed. (London, Prentice Hall, 1996)
- Flint J, Valdar W, Shifman S, Mott R (2005): Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet* 2005; 6:271-286. PubMed-ID:15803197
- Fogel MA, Weinberg PM, Haselgrove J (2006): The impact of aortic arch geometry on flow dynamics using a simplified approach with magnetic resonance velocity mapping. *Congenit Heart Dis*. 1:300-308. PubMed-ID: 18377498
- Fransen HP, de Jong N, Wolfs M, Verhagen H, Verschuren WM, Lütjohann D, von Bergmann, Plat J, Mensink RP (2007): Customary use of plant sterol and plant stanolenriched margarine is associated with changes in serum plant sterol and stanol concentrations in humans. *J Nutr*. 2007; 137:1301-1307. PubMed-ID: 17449596
- Gerrity RG (1981): The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1981;103:191-200.
- Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC Jr, Bigger JT, Buse JB, Cushman WC, Genuth S, Ismail-Beigi F, Grimm RH Jr, Probstfield JL, Simons-Morton DG, Friedewald WT (2008): Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 358:2545-2559. PubMed-ID: 18539917
- Getz CS, Reardon CA (2006): Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006; 26: 242-249
- Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Carcia-Gardena G (2000): Endothelial dysfunction, hemodynamic forces and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 902:230-239. PubMed-ID:10865843
- Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR (1977): High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med*. 1977 May; 62(5):707-14.
- Gupta, PK, Rustgi, S (2004): Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Functional and Integrative Genomics* 4, 139-162 (2004)
- Haga JH, Li YS, Chien S (2007): Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *J Biomech*. 2007;40(5):947-60. PubMed-ID: 16867303
- Hegele, RA (2009): Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. 10:109-121. PubMed-ID: 19139765
-

- Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, Gretarsdottir S, Blondal T, Jonasdottir A, Jonasdottir A, Sigurdsson A, Baker A, Palsson A, Masson G, Gudbjartsson DF, Magnusson KP, Andersen K, Levey AI, Backman VM, Matthiasdottir S, Jonsdottir T, Palsson S, Einarsdottir H, Gunnarsdottir S, Gylfason A, Vaccarino V, Hooper WC, Reilly MP, Granger CB, Austin H, Rader DJ, Shah SH, Quyyumi AA, Gulcher JR, Thorgeirsson G, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K: A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science*. 316: 1491-1493. PubMed-ID: 17478679
- Hokanson JE, Austin MA (1996): Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: A meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk*. 1996;3(2):213-9.
- Holdt LM, Teupser D (2013): From genotype to phenotype in human atherosclerosis-recent findings. *Curr Opin Lipidol*. 2013 Oct;24(5):410-8. PubMed-ID: 24005217
- Holdt LM, Teupser D (2012): Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Feb;32(2):196-206. PubMed-ID: 22258902
- Holdt LM, von Delft A, Nicolaou A, Baumann S, Kostrzewa M, Thiery J, Teupser D (2013): Quantitative trait loci mapping of the mouse plasma proteome (pQTL). *Genetics*. 2013 Feb;193(2):601-8. PubMed-ID: 23172855
- Huo Y, Guo X, Kassab GS (2008): The flow field along the entire length of mouse aorta and primary branches. *Ann Biomed Eng*. 36: 685-699. PubMed-ID:18299987
- Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J (1993): Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 1993; 92:883-893
- Ishimori, N, R Li, PM Kelmenson, R Korstanje, KA Walsh, GA Churchill, K Forsman-Semb, and B Paigen (2004): Quantitative trait loci analysis for plasma HDL-cholesterol concentrations and atherosclerosis susceptibility between inbred mouse strains C57BL/6J and 129S1/SvImJ. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 24: 161-166. PubMed-ID: 14592847
- Jiang XC, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall A (1992): Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. *J Clin Invest*. 1992; 90: 1290-1295.
- John S, Sorokin AV, Thompson PD (2007): Phytosterols and vascular disease. *Curr Opin Lipidol*.2007; 18:35-40
- Jun M, Foote C, Lv J, Neal B, Patel A, Nicholls SJ, Grobbee DE, Cass A, Chalmers J, Perkovic V (2010): Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 375:1875-1884. PubMed-ID: 20462635
-

- Keating et al. (2008): Concept, design and implementation of a cardiovascular gene-centric 50 k SNP array for large-scale genomic association studies. *PLoS One*. 3: e3583. PubMed-ID: 18974833
- Kearsey, M. J (1998): The principles of QTL analysis (a minimal mathematics approach). *Journal of Experimental Botany* 49, 1619–1623 (1998)
- Khateeb J, Gantman A, Kreitenberg AJ, Aviram M, Fuhrman B (2010): Paraoxonase 1 (PON1) expression in hepatocytes is upregulated by pomegranate polyphenols: a role for PPAR-gamma pathway. *Atherosclerosis* 208 (1): 119–25. PubMed-ID 19783251
- Lander ES (2001): Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*. 407:187-197. PubMed-ID: 21307931
- Lembcke J, Ceglarek U, Fiedler GM, Baumann S, Leichtle A, Thiery J.(2005): Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using ap-lic-ms/ms. *J Lipid Res*. 2005;46:21-26
- Libby P (2009): Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complication of atherosclerosis. *J Lipid Res*. 50:S352-357. PubMed-ID: 19096046
- Libby P (2005): The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J Am Coll Cardiol*. 46:1225-1228, PubMed-ID: 16198835
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2011): Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011; 473:317-325. PubMed-ID: 21593864
- Linsel-Nitschke P, Heeren J, Aherrahrou Z, Bruse P, Gieger C, Illig T, Prokisch H, Heim K, Doering A, Peters A, Meitinger T, Wichmann HE, Hinney A, Reinehr T, Roth C, Ortlepp JR, Soufi M, Sattler AM, Schaefer J, Stark K, Hengstenberg C, Schaefer A, Schreiber S, Kronenberg F, Samani NJ, Schunkert H, Erdmann J. (2010): Genetic variation at chromosome 1p13.3 affects sortilin mRNA expression, cellular LDL-uptake and serum LDL levels which translates to the risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2010 Jan;208(1):183-9. PubMed-ID: 19660754
- Lusis, AJ (2000): Atherosclerosis. *Nature*, 407, 233-41. PubMed-ID: 11001066
- Lusis, AJ, Mar, R, Pajukanta, P (2004): Genetics of atherosclerosis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2004;5:189–218. PMID: 15485348
- Lynch, M, Walsh, B: *Genetics and Analysis of Quantitative Traits* (Sunderland, MA, Sinauer, 1998)
- Lyons MA, Wittenburg H, Li R, Walsh KA, Churchill GA, Carey MC, Paigen B (2003): Quantitative trait loci that determine lipoprotein cholesterol levels in DBA/2J and CAST/Ei inbred mice. *J Lipid Res*. 2003;44:953-967.
- Mackay, TFC (2001): Quantitative trait loci in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics* 2, 11–20 (2001)
-

- Majesky MW (2007): Developmental basis of vascular smooth muscle cells diversity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:1248-1258. PubMed-ID: 17379839
- Manly KF, Cudmore RH, Jr., Meer JM.(2001): Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm Genome.* 2001;12:930-932.
- Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U (1994): Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med.* 1994 Apr 14; 330 (15): 1041-1046. PubMed-ID:8127331
- Markel P, Shu P, Ebeling C, Carlson GA, Nagle DL, Smutko JS, Moore KJ (1997): Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nat Genet.* 1997 Nov;17(3):280-4. PubMed-ID: 9354790
- McPherson R, Pertsemlidis A, Kavaslar N, Stewart A, Roberts R, Cox DR, Hinds DA, Pennacchio LA, Tybjaerg-Hansen A, Folsom AR, Boerwinkle E, Hobbs HH, Cohen JC (2007): A common allele on chromosome 9 associated with coronary artery disease. *Science.* 316:1488-1491. PubMed-ID: 17478681
- Mehrabian M, Castellani LW, Wen PZ, Wong J, Rithaporn T, Hama SY, Hough GP, Johnson D, Albers JJ, Mottino GA, Frank JS, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ (2000): Genetic control of HDL levels and composition in an interspecific mouse cross (CAST/Ei x C57BL/6J). *J Lipid Res.* 2000;41:1936-1946.
- Mehrabian M, Wen PZ, Fisler J, Davis RC, Lusis AJ (1998): Genetic loci controlling body fat, lipoprotein metabolism, and insulin levels in a multifactorial mouse model. *J Clin Invest.* 1998;101:2485-2496.
- Mehrabian M, Wong J, Wang X, Jiang Z, Shi W, Fogelman AM, Lusis AJ (2001): Genetic locus in mice that blocks development of atherosclerosis despite extreme hyperlipidemia. *Circ Res.* 2001;89:125–130.
- Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang XP, Shaposhnik Z, Funk CD, Lusis AJ (2002): Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res.* 2002; 91:120-126
- Miettinen TA, Tilvis RS, Kesaniemi YA (1990): Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am. J. Epidemiol.* 131: 20–31. PubMed-ID: 2293749
- Milewicz DM, Seidman CE (2000): Genetics of cardiovascular disease. *Circulation.* 2000; 102: IV-103–IV-111.
- Mizutani S, Gomi H, Hirayama I, Izumi T (2006): Chromosome 2 locus Nidd5 has a potent effect on adiposity in the TSOD mouse. *Mamm Genome.* 2006;17:375-384.
- Mülhardt, C (2002): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.* Spektrum Akademischer Verlag.
- Mülhardt, C (2003): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics.* Spektrum Akademischer Verlag 4. Auflage.
-

- Mullis, K, F Faloona, et al. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
- Musunuru K, Kathiresan S (2010): Genetics of coronary artery disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 11: 91-108. PubMed-ID: 20590428
- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Hough G, Wagner A, Nakamura K, Garber DW, Datta G, Segrest JP, Hama S, Fogelman AM (2003): Human apolipoprotein A1 mimetic peptides for the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs.* 4:1100-1104. PubMed-ID: 14582455
- Neth P, Nazari-Jahantigh M, Schober A, Weber C (2013): MicroRNAs in flow-dependent vascular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2013 Jul 15;99(2):294-303. PubMed-ID: 23612583
- Nishina PM, Verstuyft J, Paigen B (1990): Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res.* 1990;31:859-869
- Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM, Lauer MA, Sheldon WS, Grines CL, Halpern S, Crowe T, Blankenship JC, Kerensky R (2003): The effect of recombinant ApoA-1 Milano on coronary atherosclerosis in patient with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA.* 290:2292-2300
- Nsengimana J, Samani NJ, Hall AS, Balmforth AJ, Mangino M, Yuldasheva N, Maqbool A, Braund P, Burton P, Bishop DT, Ball SG, Barrett JH; British Heart Foundation Family Heart Study Research Group (2007): Enhanced linkage of a locus on chromosome 2 to premature coronary artery disease in the absence of hypercholesterolemia. *Eur J Hum Genet.* 2007 Mar;15(3):313-9. PubMed-ID:17149386
- Orr AW, Hastings NE, Blackman BR, Wamhoff BR (2010): Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis. *J Vasc Res.* 2010;47(2):168-80. PMID:19851078
- Paigen B, Mitchell D, Reue K, Morrow A, Lusis AJ, LeBoeuf RC (1987c): Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:3763-3767.
- Patel RS, Ye S (2011): Genetic determinants of coronary heart disease: new discoveries and insights from genome-wide association studies. *Heart.* 97:1463-1473. PubMed-ID: 21791514
- Peden et al. (2011): A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 43:339-344. PubMed-ID: 21378988
- Plump AS, Breslow JL (1995): Apolipoprotein E and the apolipoprotein E-deficient mouse. *Annu Rev Nutr.*1995; 15: 495-518
-

- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992): Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992; 71:343-353.
- Proctor SD, Vine DF, and Mamo JC (2002): Arterial retention of apolipoprotein B<sub>48</sub>- and B<sub>100</sub>-containing lipoproteins in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 13: 461-470
- Riha GM, Lin PH, Lumsden AB, Yao Q, Chen C (2005): Roles of hemodynamic forces in vascular cell differentiation. *Ann Biomed Eng*. 2005 Jun;33(6):772-9. Review. PubMed-ID: 16078617
- Ross, R (1986): The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med*, 314, 488- 500. PubMed-ID: 3511384
- Ross, R (1999): Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340, 115-26. PubMed-ID: 9887164
- Ross, R, Glomset JA, Harker L (1977) : Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*.86(3):675-84. PubMed-ID: 842616
- Rye KA, Bursill CA, Lambert G, Tabet F, Barte PJ (2009): The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J Lipid Res*. 50:S195-200. PubMed-ID: 19033213
- Samani NJ, Burton P, Mangino M, Ball SG, Balmforth AJ, Barrett J, Bishop T, Hall A; BHF Family Heart Study Research Group (2005): A genomewide linkage study of 1,933 families affected by premature coronary artery disease: The British Heart Foundation (BHF) Family Heart Study. *Am J Hum Genet*. 2005 Dec;77(6):1011-20. PubMed-ID: 16380912
- Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann HE, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet DA, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM, Braenne I, Gieger C, Deloukas P, Tobin MD, Ziegler A, Thompson JR, Schunkert H; WTCCC and the Cardiogenics Consortium (2007): Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med*. 357: 443-453. PubMed-ID: 17634449
- Sambrook, JF, EF, Maniatis, T (1989): *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, et al. (2007): Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*. 2007;115:450-8.
- Schadt EE, Lamb J, Yang X, Zhu J, Edwards S, Guhathakurta D, Sieberts SK, Monks S, Reitman M, Zhang C, Lum PY, Leonardson A, Thieringer R, Metzger JM, Yang L, Castle J, Zhu H, Kash SF, Drake TA, Sachs A, Lusis AJ (2005): An integrative genomics approach to infer causal associations between gene
-

- expression and disease. *Nat Genet.* 2005 Jul;37(7):710-7. PubMed-ID: 15965475
- Schadt EE, Monks SA, Drake TA, Lusis AJ, Che N, Colinayo V, Ruff TG, Milligan SB, Lamb JR, Cavet G, Linsley PS, Mao M, Stoughton RB, Friend SH (2003): Genetics of gene expression surveyed in maize, mouse and man. *Nature.* 2003 Mar 20;422(6929):297-302. PubMed-ID: 12646919
- Schunkert H, Erdmann J, Samani NJ (2010): Genetics of myocardial infarction: a progress report. *Eur Heart J.* 31:918-925. PubMed-ID: 20219748
- Schunkert H et al. (2011): Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 43:333-338. PubMed-ID:21378990
- Schwarz M, Davis DL, Vick BR, Russell DW (2001): Genetic analysis of intestinal cholesterol absorption in inbred mice. *J. Lipid Res.* 42: 1801–1811.
- Sehayek, E, EM Duncan, D Lutjohann, K Von Bergmann, JG Ono, AK Batta, G Salen, and JL Breslow (2002): Loci on chromosomes 14 and 2, distinct from ABCG5/ABCG8, regulate plasma plant sterol levels in a C57BL/6J x CASA/Rk intercross. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 16215–16219. PubMed-ID: 12446833
- Sehayek, E, C Nath, T Heinemann, M McGee, CE Seidman, P Samuel, and JL Breslow (1998): U-shape relationship between change in dietary cholesterol absorption and plasma lipoprotein responsiveness and evidence for extreme interindividual variation in dietary cholesterol absorption in humans. *J. Lipid Res.* 39: 2415– 2422
- Sehayek E, Fung YY, Yu HJ, Lembcke J, Ceglarek U, Teupser D, Thiery J, Lutjohann D, von Bergmann K, Breslow JL (2006): A complex plasma plant sterol locus on mouse chromosome 14 has at least two genes regulating intestinal sterol absorption. *J Lipid Res.* 2006 Oct;47(10):2291-6 PMID: 16840795
- Sharma AM, Staels B (2007): Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Feb;92(2):386-95. PubMed-ID: 17148564
- Silbernagel G, Fauler G, Hoffmann MM, Lutjohann D, Winkelmann BR, Boehm BO, Marz W. (2010): The associations of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with all-cause- and cardiovascular mortality. *J Lipid Res.* 2010.
- Siracusa LD, Russell LB, Eicher EM, Corrow DJ, Copeland NG, Jenkins NA (1987): Genetic organization of the agouti region of the mouse. *Genetics.* 1987 Sep;117(1):93-100. PubMed-ID: 3666442
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull WJ, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, and Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on
-

- Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: 1512–1531, 1995.
- Steinberg D (2007): *The Cholesterol Wars: The skeptics vs. the preponderance of evidence*; 1<sup>st</sup> edn (Elsevir)
- Strandberg TE, Tilvis RS, Pitkala KH, Miettinen TA (2006): Cholesterol and glucose metabolism and recurrent cardiovascular events among the elderly: a prospective study. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48: 708–714. PubMed-ID:16904538
- Stylianou IM, Affourtit JP, Shockley KR, Wilpan RY, Abdi FA, Bhardwaj S, Rollins J, Churchill GA, Paigen B (2008): Applying gene expression, proteomics and single-nucleotide-polymorphism analysis for complex trait gene identification. *Genetics*. 2008; 178:1795-1805.
- Stylianou IM, Bauer RC, Reilly MP, Rader DJ (2012): Genetic basis of atherosclerosis: insights from mice and humans. *Circ Res*. 2012 Jan 20; 110 (2): 337-55. PubMed-ID:22267839
- Su Z, Cox A, Shen Y, Stylianou IM, Paigen B (2009): Farp2 and Stk25 are candidate genes for the HDL cholesterol locus on mouse chromosome 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jan;29(1):107-13. PubMed-ID: 18988887
- Su Z, Li Y, James JC, McDuffie M, Matsumoto AH, Helm GA, Weber JL, Lusis AJ, Shi W.(2006): Quantitative trait locus analysis of atherosclerosis in an intercross between C57BL/6 and C3H mice carrying the mutant apolipoprotein E gene. *Genetics*. 2006;172:1799–1807.
- Suo J, Ferrara DE, Sorescu D, Guldberg RE, Taylor WR, Giddens DP (2007): Hemodynamic shear stresses in mouse aortas: implications for atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 27:346–351. PubMed-ID: 17122449
- Tabas I (2010): Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*. 10(1):36-46. PubMed-ID:19960040
- Tabas I, Williams KJ, Boren J (2007): Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*. 116:1832-1844. PubMed-ID:17938300
- Talayero BG, Sacks FM (2011): The role of triglycerides in atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep*. 2011 Dec;13(6):544-52. PMID:21968696
- Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N (2008): HDL, ABC Transporters and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab*. 7:365-375. PubMed-ID: 18460328
- Tenenbaum A, Motro M, Fisman EZ (2005): Dual and pan-peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) co-agonism: the bezafibrate lessons. *Cardiovasc Diabetol*. 2005 Sep 16;4:14. Review. PubMed-ID: 16168052
-

- Teslovich et al. (2010): Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature*. 466:707-713. PubMed-ID: 20686565
- Teupser D, Baber R, Ceglarek U, Scholz M, Illig T, Gieger C, Holdt LM, Leichtle A, Greiser KH, Huster D, Linsel-Nitschke P, Schäfer A, Braund PS, Tired L, Stark K, Raaz-Schrauder D, Fiedler GM, Wilfert W, Beutner F, Gielen S, Grosshennig A, König IR, Lichtner P, Heid IM, Kluttig A, El Mokhtari NE, Rubin D, Ekici AB, Reis A, Garlichs CD, Hall AS, Matthes G, Wittekind C, Hengstenberg C, Cambien F, Schreiber S, Werdan K, Meitinger T, Loeffler M, Samani NJ, Erdmann J, Wichmann HE, Schunkert H, Thiery J. (2010): Genetic regulations of serum phytosterol levels and risk of coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3:331-339. PubMed-ID: 20529992
- Teupser D, Mueller MA, Koglin J, Wilfert W, Ernst J, von Scheidt W, Steinbeck G, Seidel D, Thiery J (2008): Cd36 mrna expression is increased in cd14+ monocytes of patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35:552-556
- Teupser, D, Persky, AD and Breslow, JL (2003): Induction of Atherosclerosis by Low-Fat, Semisynthetic Diets in LDL-Receptor-Deficient C57BL/6J and FVB/NJ Mice. Comparison of Lesions of the Aortic Root, Brachiocephalic Artery, and Whole Aorta (En Face Measurement). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. PubMed-ID: 12907460
- Teupser, D, S Pavlides, et al. (2004): Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(51): 17795-800.
- Teupser D, Tan M, Persky AD, Breslow JL. (2006): Atherosclerosis quantitative trait loci are sex- and lineage-dependent in an intercross of C57BL/6 and FVB/N low-density lipoprotein receptor-/- mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:123-128.
- Thieme Chemistry (Hrsg.): Römpp Online. Version 3.1. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2007
- Thiery J, Ceglarek U, Fiedler GM, Leichtle A, Baumann S, Teupser D, Lang O, Baumert J, Meisinger C, Loewel H, Doering A (2006): Elevated campesterol serum levels—a significant predictor of incident myocardial infarction: Results of the population-based MONICA/KORA follow-up study 1994 to 2005. *Circulation*. 2006; 114: II-884.
- Thubrikar MJ, Robicsek F (1995): Pressure-induced arterial wall stress and atherosclerosis. *Ann Thorac Surg*. 1995 Jun;59(6):1594-603. Review. PubMed-ID: 7771858
- Tomita H, Zhilicheva S, Kim S, Maeda N (2010): Aortic arch curvature and atherosclerosis have overlapping quantitative trait loci in a cross between 129S6/SvEvTac and C57BL/6J apolipoprotein E-null mice. *Circulation Research*. 106: 1052-1060. PubMed-ID: 20133902
- Vignal, A et al. (2002): A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34, 275-305
-

- VanderLaan PA, Reardon CA, Getz GS (2004): Site specificity of atherosclerosis: site-selective responses to atherosclerotic modulators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Jan;24(1):12-22. PubMed-ID: 14604830
- Voet D, Voet JG (1992): *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH: Weinheim
- Voet, D, Voet JG (2002): *Lehrbuch der Biochemie*, John Wiley VCH.
- Wang F et al. (2011): Genome-wide association identifies a susceptibility locus for coronary artery disease in the Chinese Han population. *Nat Genet.* 43:345-349. PubMed-ID: 21378986
- Wang X, Ishimori N, Korstanje R, Rollins J, Paigen B (2005): Identifying novel genes for atherosclerosis through mouse-human comparative genetics. *Am J Hum Genet.* ;77:1–15
- Wang X, Le Roy I, Nicodeme E, Li R, Wagner R, Petros C, Churchill GA, Harris S, Darvasi A, Kirilovsky J, Roubertoux PL, Paigen B (2003): Using advanced intercross lines for high-resolution mapping of HDL cholesterol quantitative trait loci. *Genome Res.* 2003; 13: 1654–1664. PubMed-ID: 12805272
- Wang X, Paigen B. Genetics of variation in HDL cholesterol in humans and mice. *Circ Res.* 2005;96:27-42.
- Watzl B, Rechkemmer G (2001): Phytosterine. Charakteristik, Vorkommen, Aufnahme, Stoffwechsel, Wirkung. (PDF) *Ernährungs-Umschau* 2001 (48), S.161-164
- Weber C, Noels H (2011): Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.* 2011;17:1410–22.
- Weinberg PD, Ross Ethier C (2007): Twenty-fold difference in hemodynamic wall shear stress between murine and human aortas. *J Biomech* 40:1594–1598. PubMed-ID: 17046000
- Weingärtner O, Böhm M, Laufs U (2009): Controversial role of plant sterol esters in the management of hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 2009 Feb; 30(4):404-9. PubMed-ID: 19158117
- Weingärtner O, Lütjohann D, Ji S, et al. (2008): Vascular effects of diet supplementation with plant sterols. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51: 1553-1561. PubMed-ID:18420097
- Weingärtner O, Ulrich C et al (2011): Differential effects on inhibition of cholesterol absorption by plant stanol and plant sterol esters in apoE<sup>-/-</sup> mice. *Cardiovasc Res.* 2011 Jun 1; 90(3):484-92. PubMed-ID: 21257611
- Welch CL, Bretschger S, Latib N, Bezouevski M, Guo Y, Pleskac N, Liang CP, Barlow C, Dansky H, Breslow JL, Tall AR.(2001): Localization of atherosclerosis susceptibility loci to chromosomes 4 and 6 using the Ldlr knockout mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:7946–7951.
-

- 
- Williams KJ, Tabas I (1995): The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 May;15(5):551-61. Review. PubMed-ID: 7749869
- Williams KJ, Tabas I (1998): The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol*, 9, 471-4. PubMed-ID: 9812202
- Woollard KJ, Geissmann F (2010): Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7:77–86.
- Xu G, Zhao L, Fuchs M (2002): Differences between hepatic and biliary lipid metabolism and secretion in genetically gallstone –susceptible and gallstone-resistant mice. *Chin Med J (Engl)*. 115: 1292-1295.
- Zernecke A, Weber C. (2010): Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2010 May 1;86(2):192-201. PubMed-ID:20007309
- Zhu H, Zhang J, Shih J, Lopez-Bertoni F, Hagaman JR, Maeda N, Friedman MH (2009): Differences in aortic arch geometry, hemodynamics, and plaque patterns between C57BL/6 and 129/SvEv mice. *J Biomech Eng.* 131:121005
-

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Strukturformeln der Sterole.....	5
Abbildung 2 – Generierung LDL Rezeptor defizienter Balb/cByJ Mäuse. Diese sind heterozygot für den LDL Rezeptor knockout (BALB. <i>Ldlr</i> <sup>+/-</sup> ).....	15
Abbildung 3 – Generierung der F1 und F2 Generation .....	16
Abbildung 4 – Ursprung der Geschlechtschromosomen der männlichen Tiere im Cross A und Cross B .....	17
Abbildung 5 – Agarose Gelelektrophorese von LDL Rezeptor knockout PCR Produkten. Die obere Bande entspricht einer DNA Fragmentlänge von ca. 800 bp bei LDL-Rezeptor knockout, die untere Bande stellt eine Fragmentlänge von ca. 350 bp dar, wie sie bei der Wildtyp-Maus-DNA entsteht. Sind beide Banden zu sehen sind die Proben heterozygot für den LDL-Rezeptor knockout. LB 5-8, 5-13 bis 5-15 sind in dieser Abbildung heterozygot, 5-12 zeigt den Wildtyp-Hintergrund. Von den Nachkommen in der F1 Generation (im Bild BQ 1-1 bis BQ 1-10) sind BQ 1-2, 1-4, 1-6, 1-7 und 1-8 homozygot. Die Kontrollen LM=Lanemarker, WT=Wildtyp, <i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup> =homozygot für LDL Rezeptor knockout, H <sub>2</sub> O=Wasser sind ebenfalls aufgetragen wurden. ....	22
Abbildung 6 – Beispiel für Marker assisted backcross: Polyacrylamidgelelektrophorese von PCR Produkten auf Chromosom 14, an der Stelle des Markers d14mit356 (links), Chromosom 5 bei d5mit31 (Mitte) und Chromosom 3 bei d3mit 40 (rechts). Es sind jeweils die Kontrollen Wasser, C57/Bl6, Balb/c, Heterozygote und Lanemarker neben den zu untersuchenden Mausproben aufgetragen. Im linken Bild ist zu erkennen, dass LB 4-2 an dieser Stelle im Genom homozygot für das Balb/c Allel ist, während LB 4-3 heterozygot an dieser Position ist. Die mittlere Abbildung zeigt die Übereinstimmung von LB 4-2 und 4-3 mit Balb/c. Das rechte Bild zeigt, dass die Mäuse der 5. Generation (LB 5-8, 5-13-15) an dieser Stelle alle homozygot für das Balb/c Allel sind.....	24
Abbildung 7 – Aufbereitung der Brachiocephalarterie .....	31
Abbildung 8 – Prinzip der Cholesterol-Messmethode CHOD-PAP .....	33
Abbildung 9 – Repräsentative Schnitte (Ölrot O Färbung) von Brachiocephalarterien der F2 Generation mit ausgeprägter (A), mäßiger (B), geringer (C) und keiner (D) atherosklerotischen Läsion .....	40
Abbildung 10 – Atherosklerotische Läsionsgröße an der Brachiocephalarterie der Parentalstämme, der F1 und F2 Generation: (A) Läsionsgröße bei den	

---

weiblichen Tieren; (B) Läsionsgröße bei den männlichen Tieren; (C): Läsionsgröße der F2 Männchen und Weibchen der verschiedenen Subgruppen: F2a Tiere wurden durch Kreuzung männlicher .....	41
Abbildung 12 – LOD Score Darstellung für die atherosklerotische Läsionsgröße der Brachiocephalarterie auf Chromosom 6 der männlichen Tiere .....	42
Abbildung 13 – Allelverteilung für die atherosklerotische Läsionsgröße auf Chromosom 6 am Marker d6mit216 .....	43
Abbildung 15 – Unterschiede im Lipoproteinprofil der Parentalstämme (B6 und BALB), der F1 und F2 Generation getrennt nach Männchen und Weibchen (links) sowie deren Signifikanzwerte (rechts). Im Speziellen wurden die Plasmakonzentrationen von LDL- (A), .....	46
Abbildung 16 – LOD score Darstellung von Chromosom 6 der männlichen F2.....	48
Abbildung 17 – Darstellung der Allelverteilung auf Chromosom 6 am Marker d6mit216.....	49
Abbildung 18 – Korrelationen der atherosklerotischen Läsionsgröße mit den Plasmalipiden und Lipoproteinen .....	50
Abbildung 19 – Korrelation der atherosklerotischen Läsionsgröße mit Brassicasterol (A) und Campesterol (B) nach Normalisierung auf Cholesterol .....	51
Abbildung 20 – Korrelationen von LDL-Cholesterol und VLDL-Cholesterol mit den Phytosterolen Campesterol (A,D) und Brassicasterol (B,C).....	52
Abbildung 21 – Heat map der genomweiten Kopplungsananlyse für 42 Merkmale der männlichen (Seite 53) und weiblichen (Seite 54) F2 Generation. Die Nummerierung der Chromosomen 1-19 befindet sich am linken Bildrand. Die LOD scores wurden für jeden Phänotyp anhand einer farblichen Kodierung dargestellt (siehe Farbskala am unteren Rand). .....	55
Abbildung 22 – LOD score Darstellung von Chromosom 8 der männlichen F2 Generation.....	55
Abbildung 23 - Allelverteilung auf Chromosom 8 am Marker rs13479723 .....	56
Abbildung 24 – Allelverteilung auf Chromosom 8 am Marker rs13479723 nach Normalisierung der Phytosterole Brassicasterol (A), Sitosterol (B) und Campesterol (C) auf das Plasma-Gesamtcholesterol .....	57
Abbildung 25 – LOD score Darstellung von Chromosom 1 der weiblichen F2 .....	58
Abbildung 26 – Allelverteilung auf Chromosom 1 am Marker d1mit359 der weiblichen F2 Generation .....	59
Abbildung 27 – LOD score Darstellung von Chromosom 1 der männlichen F2.....	60

---

- Abbildung 28 – Allelverteilung auf Chromosom 1 am Marker d1mit359 der männlichen F2 Generation ..... 61
- Abbildung 29 – LOD score Darstellung von Chromosom 2 der männlichen F2..... 62
- Abbildung 30 – Allelverteilung auf Chromosom 2 am Marker d2mit7 der männlichen F2 Generation ..... 63
- Abbildung 31 – Syntenie zwischen Maus Chromosom 6 (Mitte) und Mensch (rechts und links): markiert sind die Regionen auf denen sich das Kandidatengen  $PPAR_{\gamma}$  befindet ([http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Location/Syteny?otherspecies=Homo\\_sapiens&r=6%3A1-1000](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/Syteny?otherspecies=Homo_sapiens&r=6%3A1-1000); 14.01.2014) ..... 66
- Abbildung 32 – Lokalisation von  $PPAR_{\gamma}$  auf Chromosom 3 beim Menschen ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG0000132170;r=3:12328867-12475855](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=ENSG0000132170;r=3:12328867-12475855); 14.01.2014) ..... 67
- Abbildung 34 – Syntenie zwischen Maus Chromosom 8 (Mitte) und Mensch (rechts und links): markiert ist das Intervall des Phytosterol-, LDL-C- und Gesamtcholesterol- Locus und dessen syntene Region auf dem menschlichen Genom ([http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Location/Syteny?otherspecies=Homo\\_sapiens&r=8%3A1-1000](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/Syteny?otherspecies=Homo_sapiens&r=8%3A1-1000), 15.01.2014) ..... 68
- Abbildung 32 – Syntenie zwischen Maus Chromosom 1 (Mitte) und Mensch (rechts und links): markiert ist der in der vorliegenden Studie identifizierte Maus QTL für HDL und Phytosterole sowie dessen syntene Region auf dem menschlichen Genom ([http://www.ensembl.org/Mus\\_musculus/Location/Syteny?otherspecies=Homo\\_sapiens&r=1%3A1-1000](http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Location/Syteny?otherspecies=Homo_sapiens&r=1%3A1-1000), 15.01.2014) ..... 69
- Abbildung 36 – Lokalisation des ApoA2 Gens auf Chromosom 1: oben humanes Genom (161 Mb); unten Maus-Genom (171 Mb)..... 70
- Abbildung 34- LOD score Darstellung von Chromosom 2 der männlichen F2 Generation: Für die Atherosklerose der Brachiocephalarterie (BCA) lässt sich kein signifikanter Locus identifizieren. Hingegen kolokalisiert ein für die Atherosklerose der Aortenwurzel signifikanter Locus mit dem Locus für die Lipoproteine VLDL-C und HDL-C sowie die Phytosterole Brassicasterol, Sitosterol und dem Cholesterolsynthesemarker Lanosterol. .... 71
- Abbildung 35 - Syntenie zwischen Maus Chromosom 2 (Mitte) und Mensch (rechts und links): markiert ist der in der vorliegenden Studie identifizierte Maus QTL
-

---

für Cholesterol und Phytosterole sowie dessen syntene Region auf dem menschlichen Genom.....	73
--	----

---

---

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Loci für die Regulierung der Cholesterolabsorption und Plasma-Phytosterol-Konzentration bei der Maus; <i>Chab</i> , cholesterol absorption; cM, centimorgan; LOD, logarithm of odds; <i>Plast</i> , plasma plant sterol.....	8
Tabelle 2 - Zusammensetzung von 1x Tail Tip Lyse Puffer .....	19
Tabelle 3 - Zusammensetzung von 1x TE .....	20
Tabelle 4 - Zur Genotypisierung verwendete Mikrosatellitenmarker.....	25
Tabelle 5 – Zusätzliche SNP Marker zum Finemapping .....	27
Tabelle 6 – Erhobene Phänotypen bei B6. <i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup> und BALB. <i>Ldlr</i> <sup>-/-</sup> Mäusen (Parentalstämme) und Darstellung signifikanter Unterschiede; <i>BCA</i> atherosklerotische Läsionsgröße an der Brachiocephalarterie; <i>epend/param</i> ependymales/parametrales Fettgewebe. ....	39

---

## 9 Danksagung

Mit der Fertigstellung der Dissertation möchte ich denjenigen danken, die mich begleitet und unterstützt haben. Mein ganz herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Daniel Teupser für die Möglichkeit der Mitarbeit an seinem Institut und die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas. Er hat äußerst engagiert die wissenschaftliche Betreuung meiner Dissertation übernommen, sowie durch regelmäßige kritische und sehr hilfreiche Fachdiskussionen zum Denken angeregt und somit wesentlich zum Fortgang der Arbeit beigetragen. Mein Dank gilt dabei auch Herrn Professor Dr. Joachim Thiery (Institut für Laboratoriumsmedizin, klinische Chemie und molekulare Diagnostik des Universitätsklinikum Leipzig) für die Möglichkeit der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit an seinem Institut. Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Ralph Burkhardt bedanken, der mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand und durch eine Vielzahl hilfreicher Anregungen ganz wesentlich am Gelingen dieser Arbeit beteiligt war, sowie bei Simon Sündermann für die nette Zusammenarbeit und Unterstützung. Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Wolfgang Wilfert für die hervorragende Betreuung und uneingeschränkte Hilfe der experimentellen Tätigkeiten bedanken. Ebenfalls für die Mithilfe der experimentellen Arbeiten im Labor möchte ich Franziska Jeromin und Claudia Weise danken. Sie alle trugen zu der ausgesprochen angenehmen und kollegialen Atmosphäre während der gesamten Zeit bei. Für ihre wohlwollende Unterstützung meines akademischen Werdegangs und den liebevollen Beistand sowie für die unentwegte, gleichermaßen moralische und tatkräftige Unterstützung möchte ich meiner Familie und allen voran meinem lieben Mann, Dipl.inf. Tobias Simon danken. Ihnen sei die vorliegende Arbeit von ganzem Herzen gewidmet.

---

# Eidesstattliche Versicherung

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Identifizierung Atherosklerose-relevanter Genloci  
am Modell LDL-Rezeptor defizienter Mäuse**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand