

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

Direktor: Prof. Dr. med. Daniel Teupser

**Genetische Atherosklerosedisposition
an der Arteria brachiocephalica der Maus**

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

vorgelegt von
Peter Harmel

aus Waren (Müritz)

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Daniel Teupser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Weber
Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2017

Inhaltsverzeichnis

1. Bibliographische Beschreibung	6
1.1 Referat.....	6
2. Verzeichnisse	7
2.1 Abbildungsverzeichnis	7
2.2 Tabellenverzeichnis	7
2.3 Abkürzungsverzeichnis	8
3. Einleitung.....	11
3.1 Atherosklerose	11
3.1.1 Epidemiologie der Atherosklerose.....	11
3.1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose	12
3.1.3 Risikofaktoren der Atherosklerose.....	14
3.2 Genetische Faktoren der Atherosklerose beim Menschen und im Mausmodell	15
3.2.1 Identifizierung genetischer Faktoren der Atherosklerose beim Menschen	17
3.2.2 Mausmodelle der Atherosklerose	17
3.2.3 Das Mausgenom.....	18
3.2.4 Identifizierung genetischer Faktoren der Atherosklerose im Mausmodell.....	19
3.2.4.1 Hypothesenbasierte Ansätze	19
3.2.4.2 Hypothesenfreie Ansätze	20
3.3 Vorarbeiten mit unmittelbarem Bezug zur vorliegenden Arbeit	20
4. Fragestellung.....	22
5. Materialien und Methoden	23
5.1 Versuchstiere	23
5.1.1 Haltung, Züchtung und Verpaarung	23
5.1.2 Narkotisierung, Sektion und Präparation.....	23
5.2 Laborchemische Aufarbeitung	25
5.2.1 Präparation des Vollblutes.....	25
5.2.2 Sequentielle Dichtegradientenultrazentrifugation von Mausplasma	26
5.2.3 Kolorimetrische Messung von Cholesterin und Triglyceriden	26
5.3 Histologische Methoden.....	27
5.3.1 Herstellung histologischer Präparate.....	27
5.3.2 Kombinierte Oelrot O-/Hämatoxylin-/Lichtgrün-Färbung	27
5.3.3 Quantifizierung atherosklerotischer Plaques	28
5.3.4 Immunhistochemie.....	28
5.4 Arbeiten mit RNA	29
5.4.1 RNA-Isolation.....	29
5.4.2 RNA-Qualitätsbestimmung	30
5.4.3 RNA-Aufreinigung.....	30
5.4.4 Reverse Transkription.....	31
5.5 Arbeiten mit DNA	31
5.5.1 Primer- und Sonden-Design	31

5.5.2 DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen	31
5.5.3 SNP-Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse	32
5.5.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	34
5.5.5 Standardkurvenerstellung für qRT-PCR	35
5.5.6 DNA-Gel-Extraktion und -Fällung	35
5.6 Genomweite Expressionsanalysen	36
5.7 Sequenzierungen	36
5.7.1 Sequenzierung von Plasmiden	36
5.7.2 Sequenzierung der Promotorregionen	37
5.8 Gentechnische Arbeiten	37
5.8.1 Klonierung von PCR-Produkten	37
5.8.2 Plasmidpräparation	39
5.8.3 Restriktionsverdau	40
5.8.4 Vektor-T4-Ligierung mit vorbereitender Dephosphorylierung	40
5.9 Zellkultur	41
5.9.1 Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen	41
5.9.2 <i>in vitro</i> -DNA-Transfektion und Reporterassay	41
5.9.3 Funktionsassays	42
5.9.4 Proliferations- und Metabolisierungsassay	43
5.9.5 Apoptoseassay	43
5.9.6 Hypoxieassays	44
5.10 <i>in silico</i> -Analysen	44
5.10.1 Datenbankanalysen	44
5.10.2 Netzwerkanalysen von Expressionsdaten	44
5.11 Statistische Auswertung	45
5.11.1 LOD-Score-Plotting	45
5.11.2 Genetische Kopplungsanalysen	45
6. Ergebnisse	47
6.1 Identifizierung eines Locus der Atherosklerosedisposition an der BCA und Fine Mapping	47
6.2 Chromosom 6-kongene Mäusen	49
6.3 Genomweite Expressionsanalysen	50
6.4 Kandidatengene der Atherosklerose an der BCA	54
6.5 Charakterisierung von Enolase 2 (<i>Eno2</i>)	56
6.5.1 Expressionsuntersuchung von <i>Eno2</i> in Aorta und Leber	56
6.5.2 Expressionsprofil von <i>Eno2</i> im Organismus	57
6.5.3 Genotypische Effekte	59
6.5.4 cDNA- und Promotorsequenzen	60
6.5.5 Transkriptionsfaktorbindungsanalyse	64
6.5.6 Netzwerkanalyse differentiell exprimierter Gene	64
6.5.7 Funktionelle Charakterisierung von <i>Eno2</i>	67
6.5.7.1 Proliferations- und Metabolisierungsassay	67

6.5.7.2 Hypoxieassay	68
6.5.7.3 Apoptoseassay	69
6.5.7.4 Adhäsionsassay	70
6.5.7.5 Reporterassay	70
6.5.8 Immunhistochemischer Nachweis von <i>Eno2</i>	71
7. Diskussion	74
7.1 Atherosklerose an der BCA der Maus	74
7.2 Chromosom 6-Locus.....	75
7.3 Verminderte <i>Eno2</i> -Expression durch das B6-Allel.....	76
7.4 <i>Eno2</i> -Knockdown in vitro und dessen funktionelle Relevanz	77
7.5 Übertragung auf die Situation im Menschen.....	78
8. Literaturverzeichnis	80
9. Eidesstattliche Versicherung	88
10. Curriculum vitae.....	89
11. Publikationsverzeichnis	91
12. Danksagung	92

1. Bibliographische Beschreibung

Peter Harmel

Genetische Atherosklerosedisposition an der Arteria brachiocephalica der Maus

92 Seiten, 135 Literaturangaben, 26 Abbildungen, 6 Tabellen

1.1 Referat

Atherosklerotische Gefäßerkrankungen zählen heute weltweit zu den führenden Todesursachen. Aus Hereditätsuntersuchungen ist bekannt, dass die individuelle Atherosklerosedisposition zu einem erheblichen Teil (etwa 50 %) genetisch bedingt ist. Neben genomweiten Assoziationsstudien beim Menschen können auch Tiermodelle dazu beitragen, neue Modifikatoren der Atherosklerose zu identifizieren und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen aufzudecken. In Vorarbeiten wurde mit Hilfe einer Kopplungsanalyse bei atheroskleroseempfindlichen C57BL/6J-Mäusen und atheroskleroseresistenten FVB/N- sowie BALB/cByJ-Mäusen (alle jeweils auf dem *Low-Density Lipoprotein*-Rezeptor-defizienten Hintergrund) ein neuer Genort der Atherosklerosedisposition an der Arteria brachiocephalica auf dem distalen Chromosom 6 nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Genort durch Chromosom 6-kongene Mäuse bestätigt. Durch genomweite Expressionsanalysen in Aorten- und Lebergewebe dieser Mäuse wurde *Eno2* (Enolase 2) als Kandidatengen des Chromosom 6-Genortes eingegrenzt. Die Rolle von *Eno2* in maßgeblichen Funktionen der Atherogenese und die molekularen Mechanismen der differentiellen Expression wurden mit Hilfe zellbiologischer und molekulargenetischer Methoden weiter charakterisiert. Zusammenfassend tragen diese Untersuchungen zu einem besseren Verständnis der Atherogenese bei.

2. Verzeichnisse

2.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1 Modell der Atherogenese	13
Abb.2 Cholesterinmetabolismus.....	16
Abb.3 Syntenie zwischen Mensch- und Mausgenom	19
Abb.4 Übersicht über Mausstämme.....	21
Abb.5 Zuchtschema zur Herstellung Chromosom 6-kongener Mäuse (L6F).....	24
Abb.6 <i>in situ</i> -Darstellung der großen Gefäße.....	25
Abb.7 Schmelzkurvenanalyse für die Genotypisierung von rs13478948.....	33
Abb.8 Vektorkarten.....	38
Abb.9 LOD-Score-Plots der Atherosklerose an der BCA.....	48
Abb.10 Effekte des Genotyps der F2-Tiere auf die Atherosklerose an der BCA.....	49
Abb.11 Phänotypischer Vergleich zwischen Chromosom 6-kongenem und FVB-Mäusen	51
Abb.12 Chromosom 6-Konfidenzintervall.....	53
Abb.13 Ebenen der Kandidatengvalidierung.....	54
Abb.14 Validierungsdaten <i>Eno2</i>	58
Abb.15 <i>Eno2</i> -Organexpression	59
Abb.16 Genotypische Effekte	60
Abb.17 Alignment des <i>Eno2</i> -Promotors	63
Abb.18 Analyse von Transkriptionsfaktorenbindungsstellen.....	65
Abb.19 Datenbankenanalysen	66
Abb.20 <i>Eno2</i> -Knockdown, Proliferations- und Metabolisierungsassay.....	68
Abb.21 Hypoxieassays	69
Abb.22 Apoptose-, Adhäsions- und Reporterassay	71
Abb.23 Immunhistochemische Färbungen in BCA	72
Abb.24 Weitere immunhistochemische <i>Eno2</i> -Färbungen.....	73
Abb.25 Geschlechts- und Abstammungsabhängigkeit des Chromosom 6-Atheroskleroselocus.....	76
Abb.26 Syntenie zwischen Mauschromosom 6 und Mensch.....	79

2.2 Tabellenverzeichnis

Tab.1 <i>Eno2</i> -cDNA- und Promotor-Primer	32
Tab.2 SNP-Genotypisierungen in B6xFVB und B6xBALB.....	34
Tab.3 Charakteristika der Studienmäuse	50
Tab.4 Transkriptomanalyse	52
Tab.5 Chromosom 6-Kandidatengene	55
Tab.6 SNPs der <i>Eno2</i> -mRNA und des <i>Eno2</i> -Promotorbereiches.....	63

2.3 Abkürzungsverzeichnis

ALAT	Alanin-Aminotransferase
<i>ApoE/ ApoE^{-/-}</i>	Apolipoprotein E-Gen/ Apolipoprotein E-Defizienz
APS	Ammoniumpersulfat
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
b	Base(n)
B6	C57BL/6J
BALB	BALB/cByJ
BCA	Brachiocephalarterie
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHE	Cholinesterase
CoCl ₂	Kobaltchlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethyldicarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EcoRI	Restriktionsenzym aus <i>E. coli</i> mit EcoRI-Gen von <i>E. coli</i> RY13
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eno2	Enolase 2
EtBr	Ethidiumbromid
F1	erste Filialgeneration, Tochtergeneration
F2	zweite Filialgeneration
FAM	6-Carboxyfluorescein
FKS	fetales Kälberserum
FVB	FVB/N
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i> , engl. Lipoprotein hoher Dichte

HindIII	Restriktionsenzym aus <i>E. coli</i> mit HindIII-Gen von <i>Haemophilus influenzae</i>
IDL	<i>Intermediate-Density Lipoprotein</i> , engl. Lipoprotein mittlerer Dichte
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KBr	Kaliumbromid
L6F	Chromosom 6-kongene Mäuse
LB	<i>Lysogeny Broth</i> , engl. Lysogenie-Brühe
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i> , engl. Lipoprotein geringer Dichte
<i>Ldlr/ Ldlr^{-/-}</i>	LDL-Rezeptor-Gen/ LDL-Rezeptor-Defizienz
LMP	<i>Low-Melting Point</i> , engl. niedriger Schmelzpunkt
LOD	<i>Logarithm of Odds</i> , engl. Logarithmus der Wahrscheinlichkeit
MCH	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> , engl. Polylinker
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase 9
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
n.s.	nicht signifikant
N _A	Avogadro-Konstante
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NcoI	Restriktionsenzym aus <i>E. coli</i> mit NcoI-Gen von <i>Nocardia corallina</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> , engl. Thrombozytenwachstumsfaktor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i> , engl. Region eines quantitativen Merkmals
R ²	Bestimmtheitsmaß der linearen Regressionsanalyse
RAW-Zellen	Abelson-Leukämie-Virus-induzierte Tumorzellen
RFU	<i>Relative Fluorescence Unit</i> , engl. relative Fluoreszenzeinheit
RIN	<i>RNA Integrity Number</i> , engl. RNA-Unversehrtheitskennzahl
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
r _s	Spermans Rangkorrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
r <i>Tth</i>	rekombinante <i>Thermus thermophilus</i>
SCR	<i>scrambled</i> , engl. chiffriert
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
siRNA	<i>Small Interfering Ribonucleic Acid</i> , engl. kurze interferierende Ribonukleinsäure

SpeI	Restriktionsenzym aus <i>E. coli</i> mit SpeI-Gen von <i>Sphaerotilus species</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TE	TRIS + EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i> , engl. umwandelnder Wachstumsfaktor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	<i>Unit(s)</i> , Enzymeinheit
UCSC	University of California, Santa Cruz
UTR	untranslatierte Region
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i> , engl. Endothelzelladhäsionsmolekül 1
VLDL	<i>Very Low-Density Lipoprotein</i> , engl. Lipoprotein sehr geringer Dichte
XbaI	Restriktionsenzym aus <i>E. coli</i> mit XbaI-Gen von <i>Xanthomonas badrii</i>
XhoI	Restriktionsenzym aus <i>E. coli</i> mit XhoI-Gen von <i>Xanthomonas holcicola</i>

3. Einleitung

3.1 Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine chronische Erkrankung der Arterien, die sich beim Menschen langsam, meist über mehrere Jahre oder Jahrzehnte, entwickelt [1]. Damit stellt sie im Allgemeinen eine Erkrankung des mittleren bis hohen Alters dar. Ihre Genese ist multifaktoriell, das heißt, dass ihre Entstehung zum einen durch genetische und zum anderen durch sozioökonomische und Umweltfaktoren moduliert wird [2]. In den folgenden einführenden Kapiteln werden die epidemiologischen und pathophysiologischen Grundlagen der Atherosklerose sowie die thematischen Forschungsgrundlagen der vorliegenden Arbeit dargelegt.

3.1.1 Epidemiologie der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung, die beim Menschen schon seit Jahrtausenden vorkommt. Dies legen über 3500 Jahre alte Mumienfunde aus ägyptischen Gräbern nahe [3]. In der Neuzeit beschrieb Harvey 1628 erstmals eine Fortleitungsbehinderung von Pulswellen in verdickten und starren Arterien. Morgagni zeigte dann 1761, dass es sich bei Arterienverhärtungen nicht um Knochenbildung, sondern vielmehr um Ablagerungen anorganischer Substanzen handelte. Im Jahre 1804 postulierte Scarpa, dass die herdförmigen Läsionen der Gefäßintima angehören. Der Begriff der Arteriosklerose wurde erstmals von Lobstein 1833 verwendet und konnte sich während der nächsten Jahrzehnte behaupten. Die in der täglichen Praxis synonym verwendete Bezeichnung „Atherosklerose“ wurde erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch Felix Marchand geprägt [4]. Während beim Begriff der Arteriosklerose die Alterung und hämodynamisch bedingte Veränderungen der Arterienwand im Vordergrund stehen, bezieht sich der Begriff der Atherosklerose ganz wesentlich auf die in der Pathogenese der Erkrankung wichtige Intimaverfettung. Atherosklerotische Veränderungen koronarer (koronare Herzkrankheit), cerebraler (Schlaganfall), peripherer (periphere arterielle Verschlusskrankheit), aber auch zentraler Arterien wie der Aorta (Aortenaneurysma) und von ihr abgehender Hauptäste (Arteria subclavia-Stenose, Nierenarterienstenose) stellen heute ein wesentliches gesundheitliches, aber auch gesellschaftspolitisches Problem dar. Die Atherosklerose ist in den alternden Gesellschaften weltweit nicht nur eine der führenden Todesursachen [5], sondern auch die Hauptursache für den Verlust von produktiven Lebensjahren [6]. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die unterschiedlichen Entitäten, die populärwissenschaftlich unter dem Begriff der „Gefäßverkalkung“ subsummiert werden, zusammen auftreten: Untersuchte Patienten, die einen Schlaganfall erlitten, hatten zu 53 % auch eine koronare Herzerkrankung und zu 33 % eine periphere arterielle Verschlusskrankheit [7]. Außerdem legen Autopsiestudien aus den 1990er Jahren nahe, dass fast jeder von über 2800 *post mortem* untersuchten 15- bis 34-Jährigen sogenannte *Fatty Streaks* (mit Cholesterin beladene Makrophagen, Schaumzellen) in der thorakalen oder abdominalen Aorta und auch 56 bis 83 % der Obduzierten in der rechten Koronararterien ausgebildet haben [8]. Bei

obduzierten Kindern wurden bereits regelhaft (99 % der 2- bis 15-Jährigen) sogenannte *Type I Lesions* in allen Aortenabschnitten identifiziert, die sich durch intimaständige Makrophagen und erste Schaumzellen auszeichnen [9]. Diese sind zwar – wie auch *Fatty Streaks* – reversibel, stellen aber die frühesten Stufen der Pathogenese der atherosklerotischen Läsionen dar, die sich später zu klinisch manifesten Formen weiterentwickeln können.

3.1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose

Die heutige Auffassung von der Entstehung atherosklerotischer Läsionen in der Gefäßwand wurde in der *Response-to-Injury Hypothesis* formuliert [10]. Der Ausgangspunkt der Atherogenese liegt demnach in einer initialen Verletzung der Endothelzellschicht, sei sie mechanisch, durch endogene Noxen, immunologisch oder toxisch vermittelt, die den Eintritt von Lipoproteinen und proatherogenen Leukozyten in die Gefäßintima begünstigt. Die weitere Kaskade beinhaltet unterschiedlichste Zell-Zell-Interaktionen und zytokingetriggerte, autoinflammatorische Effekte, die zur Akkumulation lipidreichen Materials und glatter Muskelzellen in den Primärläsionen führen [5,11,12]. Der vorgeschädigte Intimaabschnitt entwickelt eine Eigendynamik, die durch wesentliche Prozesse wie Adhäsion, Inflammation und Apoptose gekennzeichnet ist und letztlich zur Ausbildung einer Plaquestruktur führt [6,13–15]. Dieser Pathomechanismus wird im Folgenden ausführlich dargestellt:

Endothelzellen verhindern unter physiologischen Umständen, dass Leukozyten (u.a. Monozyten) in den Extravasalraum migrieren. Proinflammatorische Stimuli triggern die endotheliale Expression von Zelladhäsionsmolekülen (wie z.B. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)*, P-Selektin), welche die Bindung zirkulierender Mono- und Lymphozyten vermitteln. Transmigrierte Monozyten bilden um ein Vielfaches erhöhte Konzentrationen von Enzymen, wie der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) [16], die die extrazelluläre Matrix auflockern und eine zunehmende Durchwanderung der (sub)endothelialen Barriere ermöglichen, und reifen zu gewebständigen Makrophagen heran. Diese exprimieren sogenannte Scavengerrezeptoren, die zur Akkumulation cholesterinreicher modifizierter Lipoproteine und in der Folge zur Umwandlung von Makrophagen in Schaumzellen beitragen (Abb.1 A). Gleichzeitig sezernieren sie zahlreiche Zytokine, wie beispielsweise IL-1 β (Interleukin-1 β), TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) und Chemokine. Letztere locken u.a. CXCL10-vermittelt CD4-positive T-Lymphozyten in den Intimabereich [17] und differenzieren unter dem Einfluss des entstandenen Zytokinmilieus zu atherogenen T-Helferzellen (TH1-Zellen) und T-Effektorzellen. Diese T-Zellen tragen maßgeblich über die Sekretion von IFN- γ (Interferon- γ) und CD154 zur proinflammatorischen Zellantwort bei. Während sich Makrophagen und T-Zellen im zentralen Bereich der Läsion befinden, wandern glatte Muskelzellen als Reaktion auf PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) aus der Media von lateral in die Intima ein. Dieser Vorgang wird ebenfalls durch lokale Proteinasewirkung erleichtert [18]. PDGF vermag Serien molekularer Ereignisse in Gang zu setzen, die von wenigen Sekunden (Tyrosinphosphorylierungen) über Minuten (Prostaglandinsynthese) bis zu Stunden (DNA-Synthese und Zellteilung) dauern [19]. Unter dem Einfluss von TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) produzieren die glatten Muskelzellen extrazelluläre Matrixproteine, darunter Kollagen. Dadurch wandelt sich die ehemals lipidreiche Grundtextur zu einer fibrotischen und fakultativ kalzifizierenden

Textur um, welche letzten Endes zur Stenosierung des Gefäßlumens führen kann. In der Folge kommt es zusätzlich zur Sekretion von IL-18 (Interleukin-18), das die Freisetzung vieler bereits genannter Zytokine und Effektorproteine (IFN- γ , VCAM-1, MMP-9) stimuliert und mitverantwortlich für eine Plaquestabilisierung ist [20]. *De novo* gebildete und aus den Vasa vasorum in die Basis der Läsion einspritzende Gefäße stellen nicht nur einen weiteren Zugangsweg für Leukozyten dar, sondern können aufgrund ihrer Fragilität auch den Ausgangspunkt für Mikrohämmorrhagien bilden. Konsekutiv entstandenes Thrombin fördert den Zytokinsturm (PDGF aus Thrombozyten, RANTES [*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*] und CD154 aus Endothel- und T-Zellen) und damit einen weiteren proatherogenen Synergismus [21] (Abb.1 B).

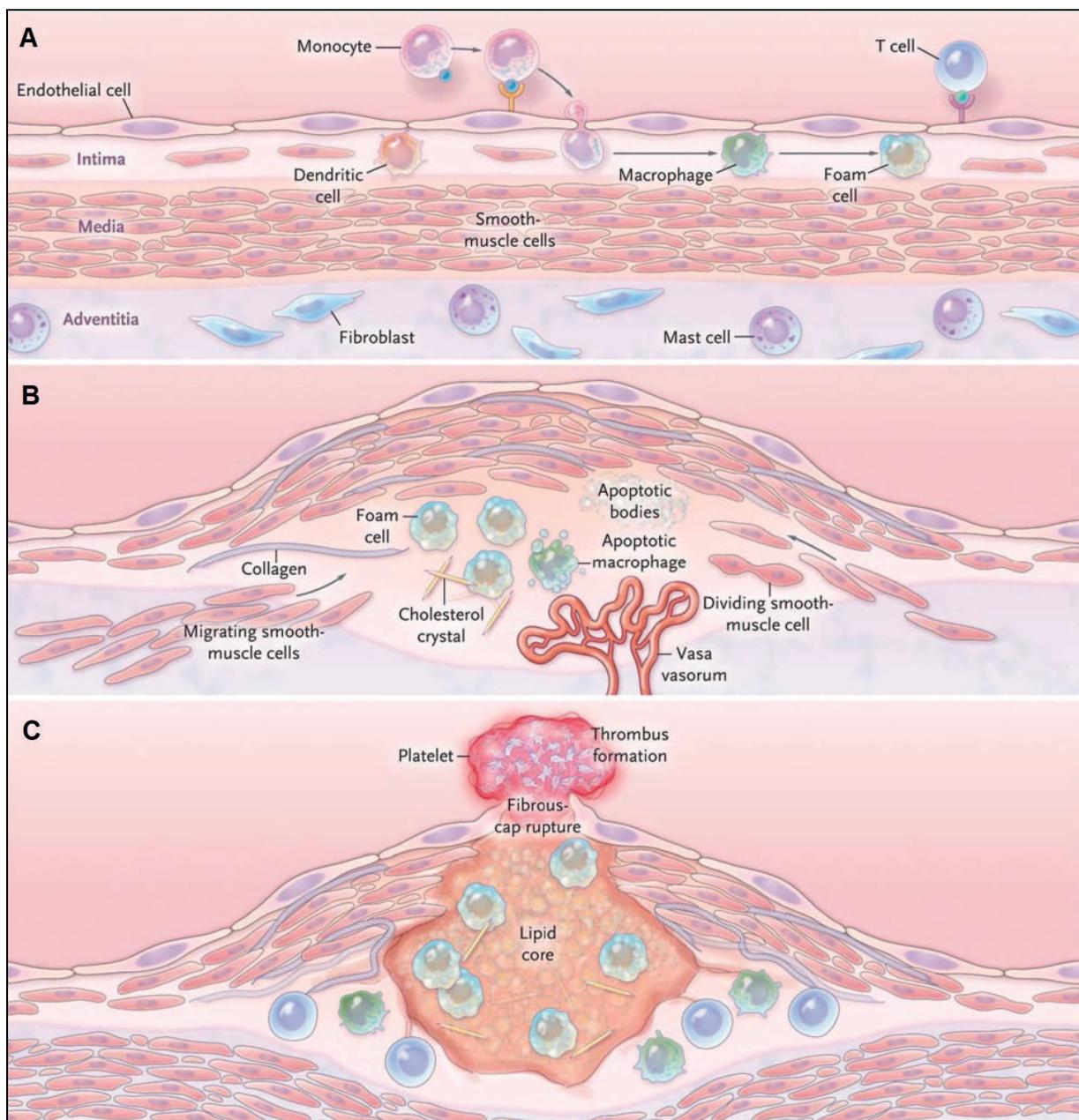


Abb.1 Modell der Atherogenese [22]. **A** Initiation und Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion. **B** Fortentwicklung zur komplexen atherosklerotischen Läsion. **C** Plaqueruptur.

Weit fortgeschrittene Läsionen zeichnen sich durch eine Ansammlung vieler Makrophagen und nur noch wenige glatte Muskelzellen, deren Kollagensynthese durch T-Zell-vermittelte Produktion von IFN- γ inhibiert wird [23], aus. Die vermehrte Expression von MMPs destabilisiert die Grundsubstanz des Atheroms zusätzlich. Erhöhter Blutdruck, eine Entzündung oder physikalische Reizung dieser fragilen Intimaläsion genügen, um die fibröse Kappe einreißen zu lassen. Dadurch kommt es zum Kontakt des Blutes mit dem höchst thrombogenen Lipidkern sowie der subendothelialen Matrix und folglich zur Thrombusbildung (Abb.1 C). Der Thrombus kann – je nach vorliegendem Gleichgewicht anti- und prokoagulatorischer Komponenten – nur transient bestehen, nicht-obstruktiv sein oder die Obstruktion eines distal gelegenen Gefäßabschnitts verursachen.

3.1.3 Risikofaktoren der Atherosklerose

Es existieren zahlreiche Risikofaktoren für die Entwicklung atherosklerotischer Erkrankungen. Dazu zählen in erster Linie Nikotinabusus, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und körperliche Inaktivität [24]. Die Arbeitsgruppe von Scott Grundy konnte zeigen, dass die Auftretenswahrscheinlichkeit der koronaren Herzerkrankung signifikant mit der Höhe des Plasmacholesterinspiegels ansteigt. Entsprechend wurden Richtlinien formuliert, die darauf abzielten, die Plasmakonzentration des besonders atherogenen LDL-Cholesterins von Patienten mit mäßig hohem, hohem bzw. sehr hohem Risiko mittels Lebensstiländerungen oder einer Statintherapie auf <130, <100 bzw. <70 mg/dL zu senken [25]. Die aktuellen Präventions- und Behandlungsrichtlinien der *European Society of Cardiology* basieren auf einem ähnlichen Konzept [26]. Für die einzelnen Gefäßregionen, die von atherosklerotischen Veränderungen betroffen sein können, wurden in einem 16-Jahres-Follow-up der Framingham-Studie unterschiedlich stark gewichtete Risikofaktoren identifiziert: Sowohl das Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit als auch eines ischämischen Schlaganfalls sind demnach in absteigender Reihenfolge bei erhöhtem systolischem Blutdruck, erhöhtem Serumcholesterin, Nikotinabusus und einer erhöhten Nüchtern glukose vermehrt, wobei erhöhte Cholesterinspiegel vor allem die junge und mittlere Altersgruppe belasten. Derselben Studie zufolge ist das Zigarettenrauchen, vor allem bei Männern, für einen hohen Anteil der Claudicatiophänomene der unteren Extremitäten verantwortlich [27]. Dabei haben Nikotin und die weiteren schädlichen Inhaltsstoffe von Zigaretten auch Effekte auf labormedizinische Kenngrößen, die ihrerseits Risikofaktoren der Atherosklerose darstellen. Kurzfristig werden die Serumspiegel gesättigter Fettsäuren, der Glukose und der Thrombozyten erhöht [28], zusätzlich ist das atheroprotektive HDL-Cholesterin bei Langzeitrauchern erniedrigt [29].

Von Bedeutung für das kardiovaskuläre Risiko sind auch sozioökonomische Faktoren. So wurde in einem 2009 veröffentlichten Bericht der *American Heart Association* beschrieben, dass das Auftreten mehrerer Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen mit niedrigem Einkommen und afroamerikanischer Abstammung assoziiert ist [30].

Als atheroprotektiv gilt nicht nur die Vermeidung einer hochkalorischen Ernährungsweise, sondern vor allem die regelmäßige Beachtung einer mediterranen Diät, deren Schwerpunkt auf Salat, Gemüse, Obst, Fisch, wenig Fleisch und der Verwendung von Olivenöl liegt. In einer randomisierten

Kontrollstudie konnte jüngst gezeigt werden, dass die Einhaltung dieser Diät über 5 Jahre die Ereignisrate an paVK signifikant reduzieren konnte [31]. Auch wiesen Probanden, die sich an diese Ernährungsform hielten, eine reduzierte Dicke der Karotisintima (engl. *Carotid Intima-Media Thickness*, CIMT) auf [32], deren Zunahme als Risikofaktor für vaskulär bedingte Schlaganfälle gilt.

Zudem konnte man nachweisen, dass das Geschlecht ein wesentlicher Einflussfaktor ist. Es scheint eine protektive Wirkung von Östrogenen auf die Gefäßwand auszugehen. So konnte nachgewiesen werden, dass beidseits ovariectomierte Frauen eine altersabhängig bis zu 2,5-fach vermehrte Koronarsklerose aufwiesen als nicht-ovariectomierte Frauen, jedoch immer noch weniger als in der männlichen Kontrollgruppe [33]. Tierexperimentell konnte hinsichtlich einer Sexualhormonabhängigkeit der Atherosklerose gezeigt werden, dass bei bereits manifester koronarer Läsion diese unter Östrogengabe trotz weiterer Cholesterinfütterung reduzierbar ist [34].

Anhand der Beobachtung, dass frühzeitig (vor dem 50. Lebensjahr) eintretende kardiovaskuläre Erkrankungen einer familiären Häufung unterlagen, wurde bereits in der Mitte des vergangenen Jahrhunderts den Begriff der familiären Hypercholesterinämie geprägt [35]. Mittlerweile ist die Ursache der sowohl schwerwiegend verlaufenden homozygoten als auch heterozygoten Form milderer Ausprägung identifiziert: Mutationen der Gene für den LDL-Rezeptor (*Ldlr*), Apolipoprotein B (*Apob*), *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (Pcsk9)* und *Low-Density Lipoprotein Receptor Adapter Protein 1 (Ldlrap1)* sind kausal für hohe Serumcholesterinspiegel und konsekutive vaskuläre Cholesterinablagerung [36].

3.2 Genetische Faktoren der Atherosklerose beim Menschen und im Mausmodell

Atherosklerotische Erkrankungen haben zwei ätiologische Säulen: Umweltfaktoren und genetische Faktoren. Die Heritabilität umfasst eine Vielzahl genetischer Risikokomponenten, die sowohl beim Menschen als auch in der Maus identifiziert werden konnten. Eine übliche Untersuchungsmethode stellen Zwillingsstudien dar, in denen eineiige mit zweieiigen Zwillingen verglichen werden. So wurde beispielsweise anhand einer 20966 Zwillinge umfassenden Kohortenstudie gezeigt, dass die Heritabilität des tödlich verlaufenden Myokardinfarktes 57 % bei männlichen und 38 % bei weiblichen Zwillingen beträgt [37]. In einer vorangegangenen Analyse dieser Kohorte zeigte sich, dass die Wahrscheinlichkeit für den zweiten Zwilling, ebenfalls am Myokardinfarkt zu versterben, umso höher war, je jünger der erste Zwilling zum Zeitpunkt der Erkrankung war [38]. Dies deutet darauf hin, dass genetische Faktoren der koronaren Herzerkrankung insbesondere bei jüngeren Menschen von großer Bedeutung sind. Aus einer Untersuchung von 1630 Zwillingspaaren der Framingham-Nachwuchskohorte wurde geschlussfolgert, dass 38 % der gemessenen Intima-media-Schichtdicken an der Arteria carotis communis hereditären Faktoren unterworfen sind [39]. Besonders die als kausal identifizierten Genmutationen aus dem Bereich des Fettstoffwechsels (siehe 3.2.1), die dem Mendel'schen Vererbungsprinzip unterliegen, haben tiefe Einblicke in die Pathogenese atherosklerotischer Erkrankungen ermöglicht. So haben beispielsweise Studien der familiären Hypercholesterinämie erst für ein umfassendes Verständnis des Plasmacholesterinmetabolismus als wesentlichem Kausalfaktor der Atherosklerose gesorgt (Abb.2).

Genomweite Assoziationsstudien und Kopplungsanalysen spielten in den letzten Jahren dank der Verfügbarkeit der humanen DNA-Sequenz eine wichtige Rolle in der Identifizierung genetischer Faktoren der Atherosklerose. Diese Verfahren ermöglichen, dass neuartige Hypothesen generiert werden können, indem neue Gene in Stoffwechsel- und Signalwegen mit maßgeblicher Auswirkung auf die Atherogenese identifiziert werden.

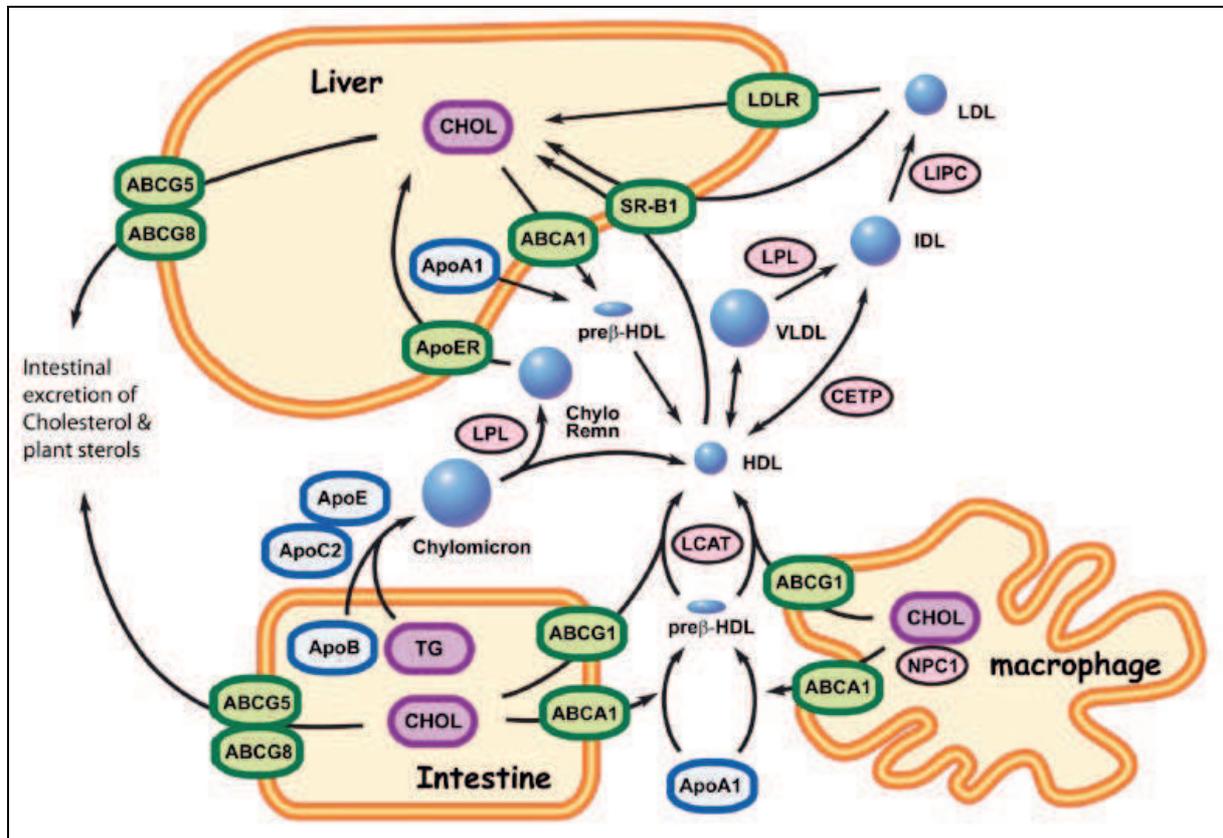


Abb.2 Cholesterinmetabolismus [40]. Hydrophobe Lipidmoleküle werden in wässrigem Milieu des Blut- und Lymphsystems mittels Lipoproteinen transportiert. Diese sind durch komplementäre Apolipoproteine und den Gehalt an Cholesterin, Triglyceriden und Phospholipiden definiert und werden aufgrund der resultierenden Dichte in fünf Hauptklassen unterteilt: *High-Density Lipoprotein* (HDL), *Intermediate-Density Lipoprotein* (IDL), *Low-Density Lipoprotein* (LDL), *Very Low-Density Lipoprotein* (VLDL) und Chylomikronen. Die ABC-Transporter (*ATP Binding Cassette Transporter*) ABCA1 bzw. ABCG1 ermöglichen eine Beladung der unreifen bzw. reifen HDL-Partikel und damit den Cholesterinefflux aus der Peripherie. Hepatozytäre Scavengerrezeptoren (SR-B1) vermitteln die Aufnahme der Partikel und anschließende Hydrolyse von Cholesterin, das anschließend über Gallensäuren dem enterohepatischen Kreislauf (via ABCG5 und ABCG8) zugeführt wird. Über den Dünndarm aufgenommene Fettsäuren werden zu Triglyceriden verstoffwechselt. Diese gelangen zusammen mit Apolipoprotein ApoB48, ApoE und ApoC2 als Chylomikronen über das Lymphsystem die Blutbahn. Triglyceride werden durch die Lipoproteinlipase (LPL) in freie Fettsäuren hydrolysiert und die verbleibenden Chylomikronenreste (*Remnants*) werden über ApoE-Rezeptoren in die Leber aufgenommen. Durch Triglyceridhydrolyse (hepatische Lipase, LIPC) entstehen LDL-Partikel, die sowohl über die Leber als auch periphere Gewebe, wie der Gefäßintima, endozytotisch über den LDL-Rezeptor (LDLR) aufgenommen werden.

3.2.1 Identifizierung genetischer Faktoren der Atherosklerose beim Menschen

Erhöhte LDL-Cholesterinspiegel im Rahmen einer familiären Hypercholesterinämie werden schon lange als kausal für ein vermehrtes Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse beschrieben [35]. Mittlerweile ist bekannt, dass Mutationen in den Genen *Ldlr*, *Apob*, *Pcsk9* und *Ldlrap1* dafür ursächlich sind [36,41]. Als weitere genetische Ursache gilt eine Mutation des Gens, das für Apolipoprotein E (*ApoE*) kodiert. ApoE ist ein Schlüsselprotein in der Metabolisierung proatherogener ApoB-Lipoproteine und kommt typischerweise in sechs Isoformen im Plasma vor (E 2/2, 2/3, 3/3, 3/4, 2/4 und 4/4), jeweils kodiert durch das Allel $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ oder $\epsilon 4$ [42]. Das Vorkommen des homozygoten Allels $\epsilon 4/\epsilon 4$ ist hochgradig mit der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung assoziiert. Die relative Allelfrequenz dieser Variante beträgt in der kaukasischen Bevölkerung etwa 15 % [43] und erklärt somit 2 bis 3 % des populationsbezogenen Risikos einer Koronarischemie [41].

Auch Mutationen des Gens für den ABC-Transporter (*ATP Binding Cassette Transporter*) ABCA1, initial als homozygote oder *compound*-heterozygote Variante bei Patienten mit der Tangier-Krankheit identifiziert, sind verantwortlich für einen gestörten Cholesterinefflux. Dieser basiert auf verringerten HDL-Plasmaspiegeln und einem reduzierten, reversen Cholesterintransport hin zur Leber [44,45]. Heterozygote Allelträger zeichnen sich durch einen milderen Phänotyp aus, das Gesamtbild in diesem Fall wird als familiäre HDL-Defizienz bezeichnet.

Innerhalb der letzten Jahre haben sich genomweite Assoziationsstudien (GWAS) als Standard für die Identifizierung genetischer Faktoren der Atherosklerose durchgesetzt. Seit 2007 wurden in GWAS mehr als 50 Loci bestimmt, die mit der KHK assoziiert sind [46]. Die heutige Aufgabe liegt darin, die zugrundeliegenden kausalen Gene zu identifizieren und in das bisherige Verständnis der Atherosklerose zu integrieren, denn nur etwa 40 % der Loci korrespondieren mit oben genannten „klassischen“ Faktoren. Unter den Genorten sticht der Chr9p21.3-Locus hervor, der die stärkste Assoziation mit der KHK aufweist [47]. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass nicht die lokalen Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* für diesen Effekt verantwortlich sind, sondern dieser vermutlich auf epigenetischer Regulation durch die lange nichtkodierende RNA *ANRIL* (*antisense non-coding RNA in the INK4 locus*) beruht [48]. Weitere hochsignifikant assoziierte Loci befinden sich auf den Chromosomen 1 (Chr1p13.3) und 6 (Chr6p24.1) und konnten ebenfalls durch mehrere Konsortien unabhängig voneinander repliziert werden [49–51].

3.2.2 Mausmodelle der Atherosklerose

Die Maus ist ein heute häufig verwendeter Modellorganismus, anhand dessen sich Pathomechanismen von Erkrankungen sehr effizient entschlüsseln lassen. Die Maus trägt 19 Autosomenpaare und ein Paar Geschlechtschromosomen. Als Besonderheit sind zahlreiche genetisch klar definierte Inzuchtstämme verfügbar. Weiterhin ist die gezielte Modifikation von Genen durch Knockout und Überexpression heute standardmäßig möglich. Außerdem eignen sich Mäuse aufgrund einer kurzen Tragezeit von nur etwa zwanzig Tagen und vielen Nachkommen pro Wurf. In

Zusammenschau all dieser Eigenschaften lässt sich eine hohe Reproduzierbarkeit von funktionellen, genetischen Untersuchungen und Experimenten realisieren.

Mäuse sind eine grundsätzlich relativ atheroskleroseresistente Spezies [52]. Durch verschiedene Maßnahmen, die zu einer Erhöhung des Plasmacholesterins beitragen, ist es jedoch gelungen, bei Mäusen ausgeprägte atherosklerotische Läsionen zu induzieren. Den Durchbruch in der Verwendung von Mausmodellen in der experimentellen Atheroskleroserecherche brachte die Einführung Apolipoprotein E-defizienter (*ApoE*^{-/-}) Mäuse [53]. Sie entwickeln bereits unter Fütterung einer üblichen Haltungsdiät, eine ausgeprägte Hypercholesterinämie um 13 mmol/L und daraus resultierend komplexe, vaskuläre Läsionen. Eine akzelerierte Atherosklerose infolge von Plasmacholesterinspiegeln von mehr als 25 mmol/L kommt erst bei der Fütterung einer sogenannten *Western Type Diet* mit einem erhöhten Anteil an Fett und Cholesterin zustande. Ein alternatives Mausmodell wurde nur kurze Zeit später beschrieben. Dafür wurde auf die oben beschriebene Weise des Ersatzes einer veränderten Zielsequenz (*Replacement Type*) ein Knockout des LDL-Rezeptors (*Ldlr*^{-/-}) generiert [54]. Es kommt unter verschiedenen Diäten ebenfalls zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques, wobei häufig Komorbiditäten wie Adipositas, Insulinresistenz und eine allgemeine unerwünschte Inflamationsreaktion die Studienqualität negativ beeinflussen [55]. Die Verwendung semisynthetischer Diäten mit 0,02 % Cholesterinanteil konnte eine Hypercholesterinämie induzieren, die ohne metabolische Entgleisungen, jedoch mit quantifizierbaren Läsionen einhergingen [56,57]. In der Folge wurden Studien über die Identifikation genetischer Faktoren der Atherogenese [58,59], pathomechanistischer Vorgänge in der Frühausbildung atherosklerotischer Plaques [60] und Einsichten in die Plaqueprogression [61] bis hin zur Identifikation in der Therapie anderer Erkrankungen anerkannter Targets [62] initiiert.

3.2.3 Das Mausgenom

Mit der Identifizierung des genetischen Codes und der Sequenzierung des menschlichen und murinen Genoms wurde deutlich, dass die beiden Spezies zu etwa 80 % genetisch identisch sind und genetische Gemeinsamkeiten einen gewissen Teil phänotypischer Merkmale erklären (vergleichende Genomik). Dieser Forschungsansatz basiert maßgeblich auf der Hypothese, dass biologisch und biochemisch essentielle Sequenzabschnitte aufgrund ihrer elementaren Funktion zwischen verschiedenen Arten konserviert sind und mit einer geringeren Geschwindigkeit evolvieren als funktionslose und funktionsarme Bereiche des Genoms [63]. Bereits vor mehr als 20 Jahren konnte mittels vergleichender Codonanalysen zahlreicher Gene gezeigt werden, dass *Mus musculus* und Primaten den letzten gemeinsamen Vorfahren vor etwa 100 Mio. Jahren hatten [64]. Mit der erstmaligen Komplettssequenzierung des murinen Genoms durch das *Mouse Genome Sequencing Consortium* [65] wurden genomische Vergleichsanalysen zwischen der Maus und dem Menschen möglich. Es konnte gezeigt werden, dass es viele korrespondierende Genomabschnitte zwischen beiden Arten gibt. Diese synthenen Bereiche geben Gemeinsamkeiten in der Abfolge von Genen oder Teilen von Genen an (Abb.3). Diese sogenannten Haplotypenblöcke sind außerdem durch Einzelbasenpolymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) definiert, die über das

gesamte Genom verteilt sind und in bestimmten Allelen vorkommen [66]. Die Allelansammlungen gleicher Herkunft werden dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit gemeinsam, das heißt miteinander gekoppelt, vererbt. Mit der Identifizierung ihrer inneren Struktur und folgender Abstrahierung von Mustern genetischer Variation wurde es letzten Endes auch möglich, unter ihnen diejenigen, welche unter dem Verdacht stehen krankheitsassoziiert zu sein, zu bestimmen ohne eine genomweite Sequenzierung betreiben zu müssen [67].

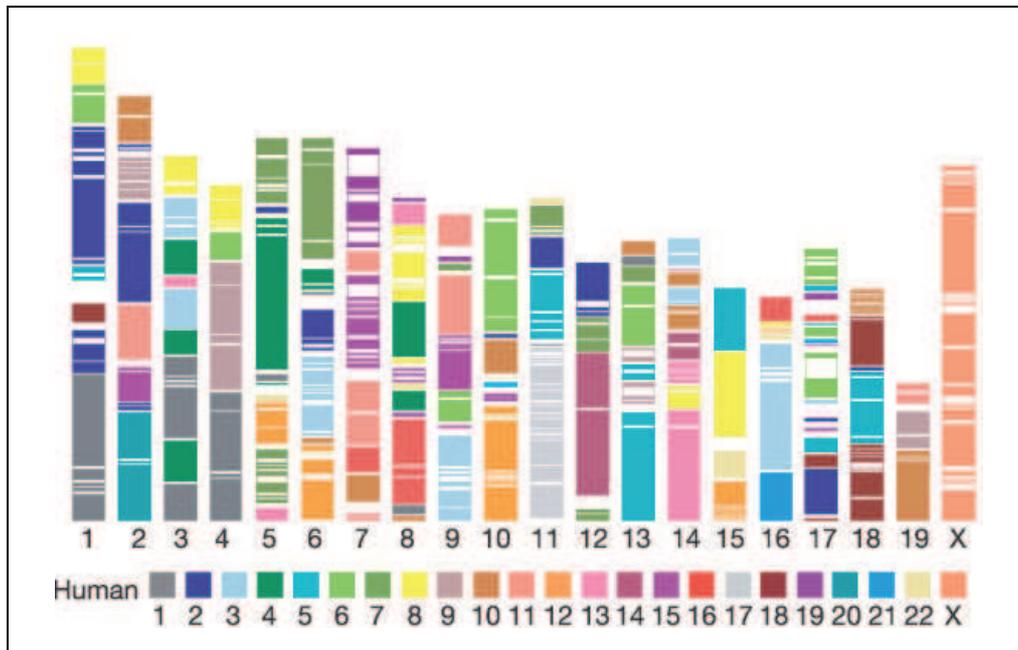


Abb.3 Syntenie zwischen Mensch- und Mausgenom [65]. Haplotypenblöcke >300 kb mit Syntenie im menschlichen Genom sind in das Mausgenom (mit drei Autosomenpaaren weniger) eingeblendet. Jede Farbe entspricht einem bestimmten menschlichen Chromosom.

3.2.4 Identifizierung genetischer Faktoren der Atherosklerose im Mausmodell

Bei den geläufigsten Atherosklerosemodellen werden entweder das Gen für Apolipoprotein E (*ApoE*^{-/-}) [68] oder das Gen des LDL-Rezeptors (*Ldlr*^{-/-}) [54] gezielt ausgeschaltet. Beide Modelle sind dafür geeignet, um atherosklerotische Plaquebildung und genetische Effekte zu untersuchen [69].

3.4.2.1 Hypothesenbasierte Ansätze

Unter Verwendung der oben erwähnten Knockout-Mauslinien wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die gezielt den Einfluss definierter Gene auf die Atherogenese untersuchten und pro- sowie antiatherogene Faktoren zeigten: sowohl kombinierte P- und E-Selektin-Knockouts [70] als auch ein isolierter ICAM-1-Knockout [71] sowie Cathepsin S-Knockouts [72] in *Ldlr*^{-/-}-Mäusen führten zu signifikant geringeren atherosklerotischen Plaques und betonten die Wichtigkeit von Genvarianten, die in Adhäsions- und Migrationsgenen vorkommen. Auch konnte gezeigt werden, dass ein Cx3cl1-

Knockout sowohl in *Ldlr*^{-/-}- als auch *ApoE*^{-/-}-Mäusen eine signifikant reduzierte Atherogenität von bis zu 50 % bewirken [57]. Zahlreiche weitere Knockoutmodelle für Inflammations-, Immunmodulations- und Metabolismusgene bestätigten genetische Faktoren der Atherogenese [73] und trugen zu einem besseren Verständnis dieser häufigen Erkrankung bei.

3.2.4.2 Hypothesenfreie Ansätze

Neben der in 3.2.4.1 beschriebenen gezielten Untersuchung der Wirkung definierter Gene auf die Atherogenese kann der Mausorganismus auch zur Identifizierung neuer genetischer Faktoren verwendet werden. Als Grundlage dienen die zwischen den verschiedenen verfügbaren Inzucht-Mauslinien bekannten Unterschiede der Atheroskleroseempfindlichkeit [74]. Auf dieser Basis können Genorte der Atherosklerosedisposition durch (1) die Züchtung rekombinanter Inzuchtmäuse und (2) Kopplungsanalysen identifiziert werden.

Rekombinante Inzuchtmäuse zeichnen sich durch alternierende homozygote Haplotypenblöcke aus, weil dessen jeweilige Eltern Bruder-Schwester-verpaart wurden. Mit ihrer Hilfe wurden Ende der 1980er Jahre mehrere Atherosklerose-Loci identifiziert (*Ath-1*, *Ath-2* etc.), die mit einer erhöhten Atheroskleroseempfindlichkeit bei fettreicher Diät gekoppelt sind [75,76]. *Quantitative Trait Loci* (QTL) sind Abschnitte eines Chromosoms, die einen Einfluss auf die Ausprägung eines bestimmten phänotypischen Merkmals haben, beispielsweise der Atherosklerose. Man benutzt dafür molekulare Marker (SNPs, Mikrosatellitenmarker, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen), die eine genotypische Differenzierung zwischen zwei verschiedenen parentalen Stämmen gewährleisten, welche sich in einem bestimmten Merkmal wesentlich unterscheiden. Die genotypische Analyse der zufällig rekombinierten F2-Generation erlaubt die Zuordnung genetischer Marker, die mit einem QTL verknüpft sind, der ein zu untersuchendes Merkmal beeinflusst [77]. Ein QTL kann ein Kandidatengen beherbergen, welches seine eigene Expression (*cis*-Effekt, d.h. die genetische Variation an diesem Locus ist für die Änderung der Expression des an diesem Ort ansässiges Gens verantwortlich) oder die Expression anderer Gene (*trans*-Effekt auf ein außerhalb des QTL gelegenes Gen) reguliert. F2-Kreuzungen atheroskleroseempfindlicher B6- und atheroskleroseresistenter FVB-Tiere auf dem *ApoE*^{-/-}-Hintergrund zeigten einen signifikanten sowie zwei suggestive Atherosklerose-Loci auf den Chromosomen 10 bzw. 14 und 19 [78]. Auf dem auch in dieser Arbeit verwendeten *Ldlr*^{-/-}-Hintergrund wurden mittels Verpaarung von B6-Mäusen mit atheroskleroseresistenten Inzuchtmausstämmen weitere signifikante Loci auf den Chromosomen 4 und 6 identifiziert [58,79].

3.3 Vorarbeiten mit unmittelbarem Bezug zur vorliegenden Arbeit

Zwei Studien zu unabhängigen F2-Verpaarungen stellen die Grundlage der vorliegenden Arbeit dar. Mittels Kreuzung von C57BL/6J.*Ldlr*^{-/-} mit FVB/NJ.*Ldlr*^{-/-}-Mäusen (B6xFVB; Abb.4) konnten signifikante Loci für eine erhöhte Atheroskleroseempfindlichkeit an der Aortenwurzel identifiziert werden, welche auf den Chromosomen 3, 10 und 12 liegen [59]. Die jeweiligen Effekte waren sowohl

geschlechts- als auch abstammungsabhängig. In einer weiteren F2-Kreuzung konnten zwischen C57BL/6J.*Ldlr*^{-/-} und BALB/cByJ.*Ldlr*^{-/-}-Mäusen (B6xBALB; Abb.4) Genorte der Atherosklerose auf den Chromosomen 2 und 8 nachgewiesen werden, die ebenfalls geschlechtsabhängig waren [80].

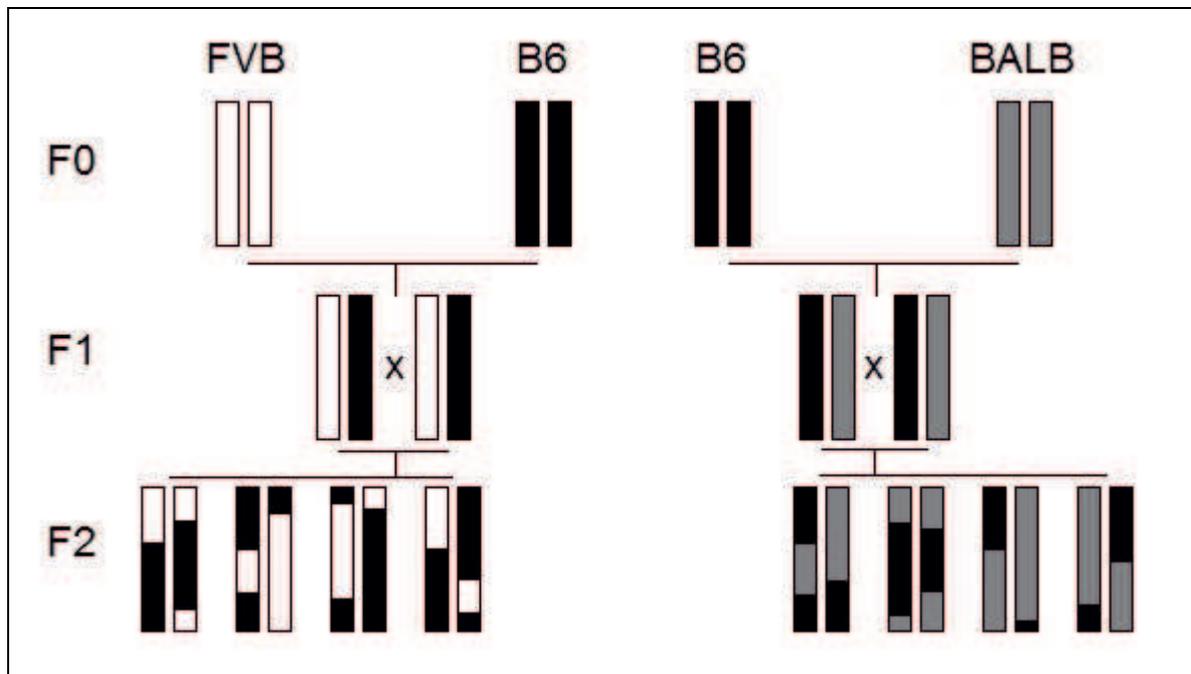


Abb.4 Übersicht über Mausstämme. C57BL/6J.*Ldlr*^{-/-} (B6), Mäuse auf dem C57BL/6J-Hintergrund, *Ldlr*-defizient; FVB/NJ.*Ldlr*^{-/-} (FVB), Mäuse auf dem FVB/NJ-Hintergrund, *Ldlr*-defizient [56]; BALB/cByJ.*Ldlr*^{-/-} (BALB), Mäuse auf dem BALB/cByJ-Hintergrund, *Ldlr*-defizient [80]. Aus der jeweiligen Bruder-Schwester-Verpaarung der F1-Tiere resultieren zufällig rekombinierte F2-Individuen. Das Genotypmuster der Tiere ist schematisch für die beiden Allele eines Chromosoms dargestellt.

In der beschriebenen Kreuzung von Mausstämmen wurde die Atherosklerose nicht nur an der Aortenwurzel, sondern auch an der Brachiocephalarterie (BCA) bestimmt. Die hier vorliegende Arbeit identifiziert und charakterisiert einen gemeinsamen Genort der Atherosklerose an der BCA, welcher sich auf dem distalen Chromosom 6 sowohl des B6xFVB- als auch des B6xBALB-Intercrosses befindet und unabhängig von der Atherosklerose an der Aortenwurzel ist (Abb.9). Auch die Arbeitsgruppe von Aldons J. Lusis konnte einen Atherosklerose-Genort für die BCA nachweisen, der jedoch keine Assoziation zu erhöhten Läsionsgrößen an der Aortenwurzel aufwies [81]. Dieser Genort war unabhängig von dem hier untersuchten Genort und befand sich auf dem Chromosom 2. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen auf eindruckliche Weise, dass unterschiedliche genomische Regionen für die Phänotypen verschiedener Abschnitte des arteriellen Gefäßsystems verantwortlich sind. Die in der hier vorliegenden Arbeit vorgenommenen Untersuchungen umfassen QTL-Mapping, Charakterisierung des Locus (unter anderem mit Hilfe der Züchtung Chromosom 6-kongener Mäuse) und Kandidatengenidentifizierung sowie die funktionelle Charakterisierung des Kandidatengens. Damit stellen die Ergebnisse eine wichtige Grundlage zum Verständnis der Theorie von Atherosklerosemanifestationen an unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen in Abhängigkeit verschiedener genetischer Loci dar.

4. Fragestellung

Die vorliegende Promotionsarbeit hatte zum Ziel, einen Beitrag zum besseren Verständnis genetischer Ursachen der Atherosklerose und des zugrundeliegenden Pathomechanismus zu leisten. Es sollten folgende Einzelziele verfolgt werden:

- eine umfassende Charakterisierung und Feinkartierung eines murinen Chromosom 6-Locus, der eine erhöhte Atherosklerosedisposition an der BCA beherbergt
- die Untersuchung phäno- und genotypischer Effekte des Chromosom 6-Locus durch Analyse von Chromosom 6-kongeneten Mäuse und F2-Mäusen sowie die genomweite Identifizierung dem Genort zugrundeliegender Kandidatengene
- die funktionelle Charakterisierung des identifizierten Kandidatengens in Zellkulturstudien.

5. Materialien und Methoden

5.1 Versuchstiere

5.1.1 Haltung, Züchtung und Verpaarung

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in dem Medizinisch-Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig gehalten, gepflegt und zum Teil gezüchtet. Die tierexperimentellen Arbeiten wurden von der zuständigen Behörde des Freistaats Sachsen (Aktenzeichen N4/11) genehmigt. Die Versuchstiere wurden in separat belüfteten und pathogenfreien Käfigen mit einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

Es wurden Mäuse der Inzuchtstämme C57BL/6J, FVB/N und BALB/cByJ verwendet. Alle Individuen waren *Ldlr*-defizient und trugen somit die Bezeichnungen C57BL/6J.*Ldlr*^{-/-} (B6), FVB/NJ.*Ldlr*^{-/-} (FVB) und BALB/cByJ.*Ldlr*^{-/-} (BALB). Zur Validierung des Chromosom 6-Genortes wurden Chromosom 6-kongene Mäuse gezüchtet [82,83]. Dafür wurde das B6-Allel über zehn bis zwölf Generationen auf homozygote FVB-Mäuse rückgekreuzt, sodass Chromosom 6-Intervall spezifische kongene Mäuse (FVB.Chr6^{B6/B6}, L6F) entstanden, die von 45 bis 145 Megabasen (Mb) homozygot für das B6-Allel und auf dem restlichen genetischen Hintergrund homozygot für das FVB-Allel sind (Abb.5).

Für Atheroskleroseuntersuchungen wurden die Tiere am 28. Lebenstag abgesetzt und erhielten dann bis zur 20. Lebenswoche eine standardisierte semisynthetische Diät auf Basis AIN 76A [56] (Bestellnummer E15710-04, Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland).

5.1.2 Narkotisierung, Sektion und Präparation

Bei Erreichen der 20. Lebenswoche wurden die Mäuse durch i.p.-Injektion von Ketamin und Xylazin (Mischungsverhältnis 4:1) anästhesiert. Nach der Längen- und Gewichtsbestimmung wurde die Maus auf einer Sektionsunterlage fixiert. Es folgte eine mediane Laparotomie, ein subkostaler Querschnitt und die laterale Durchtrennung der Rippen bis zu den Schlüsselbeinen sowie eine quere Durchtrennung des Zwerchfells. Das so dargestellte Herz wurde linksventrikulär punktiert und das Blut (500 bis 700 µL) für laborchemische Untersuchungen in einer EDTA-Spritze gesammelt. Das rechte Herzohr wurde eröffnet und das Gefäß- und Organsystem über den linken Ventrikel mit 10 mL Heparin-PBS (Mischungsverhältnis 1:1000) gespült. Im Anschluss wurden der Reihe nach der Thymus, die Lunge, Leber, Milz, Nieren, das perirenale, subkutane sowie gonadale Fettgewebe, Muskelgewebe aus dem Musculus quadriceps femoris, der Dünndarm, das omentale sowie braune Fettgewebe und das Gehirn präpariert, jeweils mit Heparin-PBS abgespült und in flüssigem Stickstoff zur späteren RNA- und DNA-Gewinnung eingefroren. Außerdem erfolgte die Knochenmarksgewinnung aus den beidseitigen Ober- und Unterschenkelknochen. Als nächstes erfolgte die Freilegung des Mediastinums mittels Durchtrennung der Schlüsselbeine und Resektion des paraaortalen und paracordalen Fettgewebes, damit die BCA zur Darstellung kommt (Abb.6).

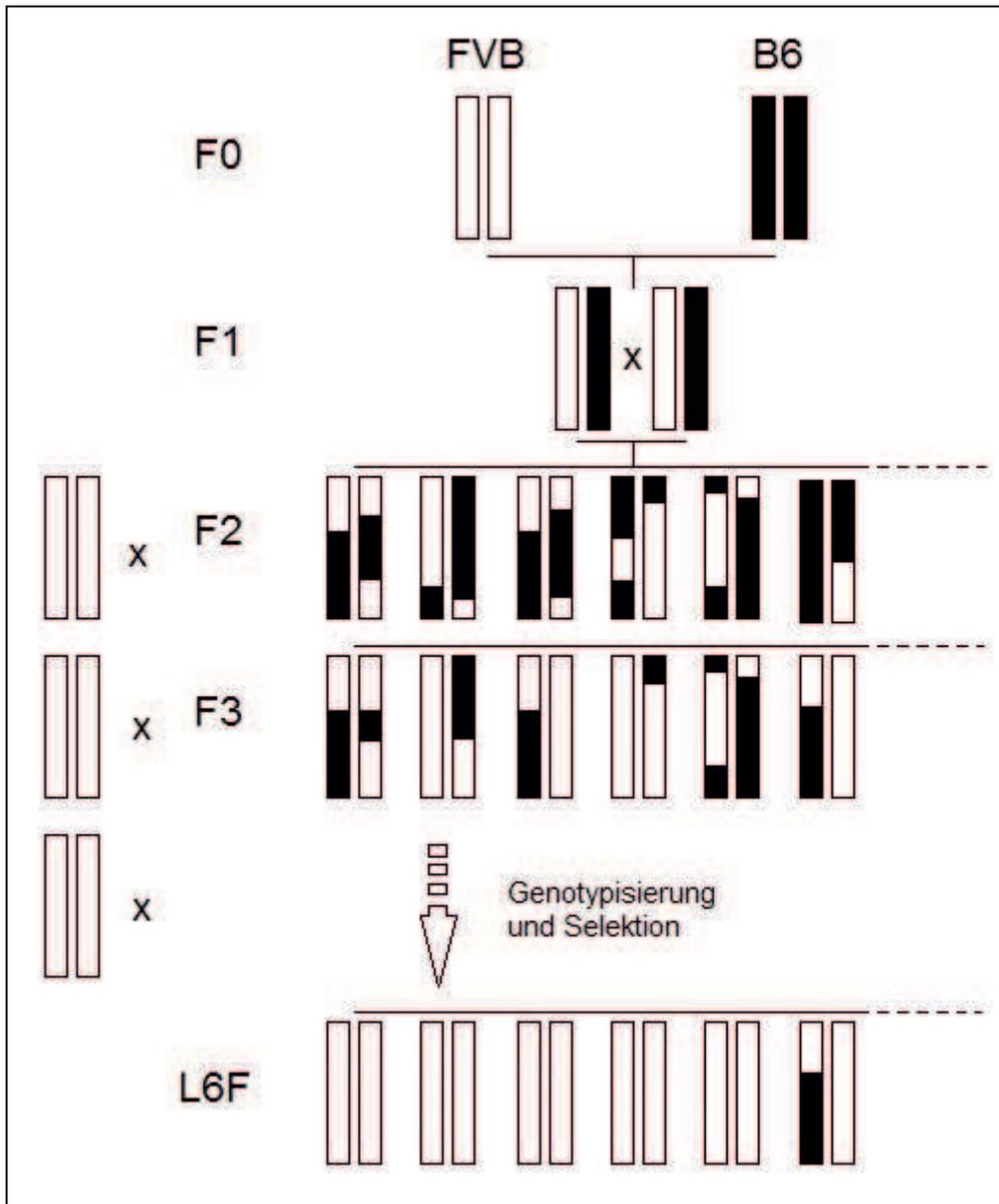


Abb.5 Zuchtschema zur Herstellung Chromosom 6-kongener Mäuse (L6F): Zunächst erfolgte die Verpaarung von B6- und FVB-Tieren der F0-Generation. Anschließend wurden diese entstandenen F1-Tiere untereinander verpaart. Ab der F2-Generation wurden die Mäuse mit Hilfe genetischer Marker auf dem distalen Chromosom 6 genotypisiert. Für die weitere Rückkreuzung wurden ausschließlich Tiere verwendet, die den B6-Genotyp auf dem interessierenden Locus auf dem distalen Chromosom 6 trugen. Diese wurden bis zum Erhalt kongener Mäuse (distales Chromosom 6 heterozygot bei homozygotem FVB-Hintergrund) über 12 Generationen mit FVB-Tieren verpaart.

Die beiden Hauptäste der BCA, Arteria carotis communis und Arteria subclavia, wurden distal und die BCA an dem aortennahen Abgang abgetrennt. Das Herz wurde mit einem Skalpell in einer Ebene zwischen den beiden Herzohren und damit parallel verlaufend zur Klappenebene des Herzens geschnitten. Das auf diese Weise entstandene Aortenwurzelpräparat umfasst den linksventrikulären Ausflusstrakt, die Aortenklappe und die Aorta ascendens bis zum Abgang der BCA. Die resezierte BCA ebenso wie die Aortenwurzel wurden mit Heparin-PBS gespült, in O.C.T. Tissue-Tek (Sakura

Finetek, Staufen, Deutschland) eingebettet und bei -80°C eingefroren. Das Aortenpräparat (inklusive Arcus aortae und Aorta thoracica) wurde für die RNA-Gewinnung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

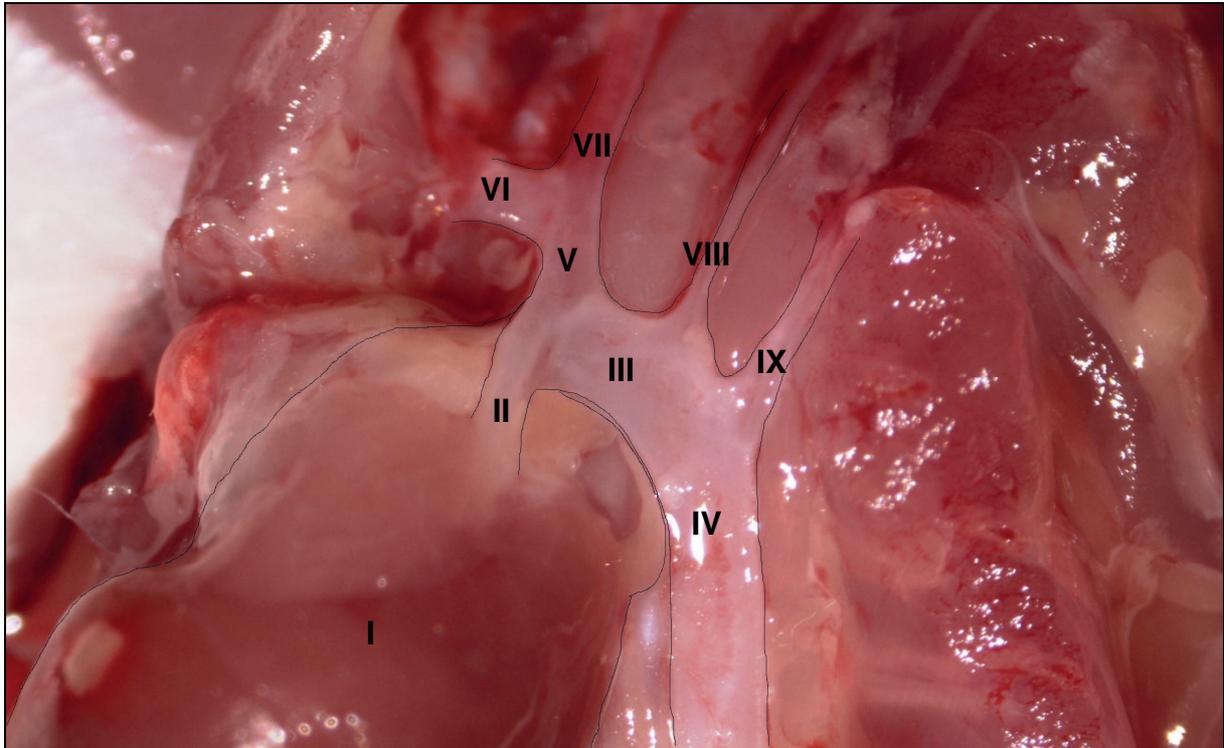


Abb.6 *in situ*-Darstellung der großen Gefäße. Das Herz (I), die Aorta ascendens (II), der Aortenbogen (III), die Aorta descendens (IV), Arteria brachiocephalica (V) mit ihren Hauptästen der Arteria subclavia dextra (VI) und der Arteria carotis communis dextra (VII) sowie die Arteria carotis communis sinistra (VIII) und die Arteria subclavia sinistra (IX) sind zur besseren Übersichtlichkeit konturiert.

5.2 Laborchemische Aufarbeitung

5.2.1 Präparation des Vollblutes

Es erfolgte eine Aliquotierung des durch ventrikuläre Punktion erhaltenen Blutes. 50 µL Vollblut wurden sofort bei -80°C eingefroren. 25 µL Vollblut wurden auf eine Filterkarte zur massenspektrometrischen Messung von Metaboliten gegeben. Weiteren 40 µL Vollblut wurden 160 µL PBS-BSA-EDTA (5 % BSA) zugesetzt und bei 4°C für etwa 6 h zwischengelagert. Die darauffolgende Bestimmung des Differentialblubildes erfolgte im für die Patientenversorgung zur Verfügung stehenden Differentialblutbildautomaten (Sysmex, Norderstedt, Deutschland). Sie umfasste die quantitative Messung der Leukozyten, Erythrozyten, des Hämoglobins, Hämatokrits, des mittleren korpuskulären Volumens (MCV), mittleren korpuskulären Hämoglobingehalts (MCH) sowie der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration (MCHC) und der Thrombozyten. Das verbleibende Vollblut wurde für 10 min bei 8000 U/min zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und der Zellüberstand verworfen. 50 µL des Plasmas dienen der Messung klinisch-chemischer Kenngrößen: Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Cholinesterase (CHE),

Glutamatdehydrogenase (GLDH), Glucose, Harnstoff, Gesamtprotein, Triglyceride und Gesamtcholesterin (Tab.3). Die Auftrennung und Bestimmung der Lipoproteinfraktionen erfolgte aus 60 μ L Plasma wie unter 5.2.2 beschrieben.

5.2.2 Sequentielle Dichtegradientenultrazentrifugation von Mausplasma

Die verschiedenen Lipoproteinfraktionen konnten aus dem gewonnen Plasma ihrer Dichte (d) nach aufgetrennt werden (Chylomikronen und VLDL: $d < 1,006$ g/mL, IDL und LDL: $d = 1,006-1,063$ g/mL, HDL: $d > 1,063$ g/mL). IDL wurden aufgrund ihres geringen Dichtespektrums und ihrer geringen Konzentration im Blut nicht separat aufgetrennt, sondern waren in der LDL-Fraktion enthalten. Für die Auftrennung wurde eine Ultrazentrifuge in Kombination mit dem Rotor Type 42.2 Ti (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) verwendet. 60 μ L Plasma wurden in ein Ultrazentrifugationsröhrchen (Thickwall Cellulose Propionate 0,2 mL, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) pipettiert, mit 60 μ L PBS überschichtet und für 3 h bei 40000 U/min und 4°C zentrifugiert. Die anschließend mit einer Hamilton-Spritze abpipettierten 60 μ L Unterstand wurden mit 60 μ L einer Kaliumbromid-Lösung (KBr, $d = 1,12$ g/mL) mehrmals gemischt und die 60 μ L Überstand wurden wiederum mit 60 μ L PBS überschichtet. Nach Zentrifugation beider Plasmalösungen für 18 h bei 40000 U/min bei 4°C setzte sich in der KBr-Plasmalösung die HDL-Fraktion als Unterstand ab; dieser wurde abpipettiert. Der Überstand stellte einen Teil der LDL-Fraktion dar, deren anderer Teil als Unterstand in dem zweiten Zentrifugationsröhrchen erschien und abpipettiert wurde. Der verbleibende Überstand des mit PBS überschichteten Röhrchens enthielt die VLDL-Fraktion, die ebenfalls abpipettiert wurde.

5.2.3 Kolorimetrische Messung von Cholesterin und Triglyceriden

Die nach der Auftrennung erfolgte kolorimetrische Messung von Cholesterin und Triglyceriden erfolgte in transparenten 96-Loch-Mikroplatten, die durch den Microplate Reader Infinite M1000 Pro (Tecan Systems Inc., San Jose, USA) ausgelesen wurden. Dafür wurden 10 μ L jeder Plasmafraktion und eines Standards in Verdünnungsreihe (0, 20, 60, 100, 200, 400 mg/dL) in Doppelwerten in jeweils einer Kavität vorgelegt und 200 μ L Farbreagenz hinzugegeben. Die Platte wurde anschließend für 1 min bei Raumtemperatur (RT) sanft geschüttelt und weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Die Auswertung der gemessenen Rohdaten erfolgte mittels einer linearen Standardkurve.

5.3 Histologische Methoden

5.3.1 Herstellung histologischer Präparate

Zur Quantifizierung der Größe atherosklerotischer Läsionen wurden histologische Schnitte sowohl von der (1) Aortenwurzel als auch von der (2) BCA angefertigt. Nach Herauslösen des Gewebeblockes aus der Fixiervorrichtung wurden 10 µm dicke Schnitte bei -20°C in einem Kryomikrotom wie folgt angefertigt:

(1) Das eingebettete Präparat der Aortenwurzel umfasst den anatomischen Abschnitt beginnend beim linksventrikulären Ausflusstrakt bis zur Aorta ascendens und dem Abgang der BCA. Von proximal nach distal beginnend wurden sequentielle Schnitte ab dem Erscheinen von mindestens zwei vollständigen Taschenklappenzirkumferenzen in der Aortenklappenebene bis zum Verschwinden derer Ansätze auf Objektträger aufgenommen.

(2) Die Y-förmige BCA wurde von distal, beginnend bei der Bifurkation der Abgänge der Arteria subclavia bzw. Arteria carotis communis, nach proximal geschnitten. Anschließend wurden 20 Schnitte à 10 µm verworfen und sequentielle Schnitte auf diese Weise in 200, 400 und 600 µm Entfernung von der Bifurkation entfernt auf Objektträger aufgenommen [56].

Zwischen den äquidistanten histologischen Präparaten, die Oelrot O-gefärbt wurden, wurden zusätzlich sequentielle Schnitte für immunhistochemische Färbungen asserviert. Die Zwischenlagerung aller Präparate erfolgte bis zu deren Färbung bei -80°C.

5.3.2 Kombinierte Oelrot O-/Hämatoxylin-/Lichtgrün-Färbung

Vor der Färbung der Schnitte mit Oelrot O wurden die Präparate mit Formalin fixiert, indem die Objektträger bei 4°C mindestens 12 h zuvor in einer dicht verschlossenen Glasküvette mit Formalindampf inkubiert wurden. Anschließend wurden die fixierten Präparate für zweimal 1 min gewässert, für 30 sek mit 60 % Isopropanol inkubiert und für 18 min mit zuvor gefilterter Oelrot O-Lösung (0,24 % in 62,5 % Isopropanol) inkubiert. Oelrot O ist ein wasserlöslicher Azofarbstoff, der Lipide rot anfärbt. Es folgten ein weiterer Spülschritt mit Isopropanol für 30 sek und zwei einminütige unter laufendem Wasser. Die Färbung mit Hämatoxylin (2 min) und anschließende Bläungsreaktion mit Bluing Solution (Ammoniumhydroxid und Wasser im Mischungsverhältnis 1:200, 1 min) erfolgte zur Darstellung von Zellkernen. Nach einem weiteren einminütigen Waschschrift schlossen sich eine Lichtgrün-Färbung, die der Darstellung von Kollagenfasern dient, und ein Wassertauchbad an. Die Objektträger wurden solange im Wasser belassen, bis die Deckgläser aufgelegt und mit Glycerolgelatine fixiert wurden. Überschüssiges Glycerol wurde abgewaschen.

5.3.3 Quantifizierung atherosklerotischer Plaques

Um ein größtmögliches Maß an Objektivität und untersucherverblindete Messungen zu erreichen, wurden die histologischen Präparate vor der Quantifizierung kodiert. Für die Vermessungen wurde ein mit einem Mikroskop und der Software Image-Pro (Media Cybernetics Inc., Rockville, USA) ausgestatteter Computer verwendet. Es wurden folgende Kriterien festgelegt, die eine atherosklerotische Läsion zur Quantifizierung zu erfüllen hatte: die Läsion sollte sich anhand der Oelrot O-Färbung oder einem azellulären Nekroseareal oder einer luminal gelegenen Plaquestruktur mit fibröser Kappe zuordnen lassen und musste sich in jedem Falle adluminal der Intima befinden. Dieses Kriterium galt ebenfalls als erfüllt, wenn die Lamina elastica interna als abluminale Grenzstruktur gewählt wurde. Läsionen, die die Koronararterien betrafen oder innerhalb der Taschenklappenansätze lagen, wurden nicht gewertet. Auf diese Weise wurden jeweils 3 Präparate der BCA und 5 Präparate der Aortenwurzel von Chromosom 6-kongen und FVB-Kontrollmäusen (n = 16/ 18) quantifiziert und Mittelwerte dieser sequentiellen Schnitte errechnet.

5.3.4 Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen wurden für die BCA-, Aortenwurzel- und Leberpräparate angefertigt. In Vorbereitung auf die Färbungen wurde darauf geachtet, dass stets Negativ- und gegebenenfalls Positivkontrollen mitgeführt und die Pufferlösungen frisch hergestellt wurden. Die Arbeitsschritte fanden bei RT statt, soweit es nicht anderweitig vermerkt ist. Die bei -80°C gelagerten Kryoschnitte wurden für 10 min bei 50°C getrocknet und mittels einer Methanol-Aceton-Lösung (Mischungsverhältnis 1:1) fixiert. Anschließend wurden die in einer Glasküvette befindlichen Objektträger für 10 min bei 4°C inkubiert und für 5 min getrocknet. Unter leichtem Schütteln fanden daraufhin 3 Waschschrte mit PBS für jeweils 5 min statt. Im Anschluss wurden die Präparate mit einer 3 %igen H₂O₂-Lösung (30 % H₂O₂, Methanol, PBS im Mischungsverhältnis 1:1:8) für 3 min inkubiert, gefolgt von 3 Waschrten mit PBS. Die einzelnen Schnittpräparate wurden mit einem Dako-Pen (Dako, Hamburg, Deutschland) umzeichnet, dessen wasserabweisender Kreis nicht von Antikörperlösungen übertreten werden kann. Es folgte das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen für mindestens 30 min mit 2,5 %igem Normal Horse Serum (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) in einer feuchten Kammer. Der primäre Antikörper wurde anschließend in abnehmender Verdünnung aufgebracht und bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert, bei Negativkontrollen wurde nur der Antikörperpuffer aufgebracht. Der zweite Arbeitstag wurde mit zweimaligem Waschen mit einer 0,125 %igen Tween-PBS-Lösung und zweimaligem Waschen in PBS jeweils für 3 min auf einem Taumler begonnen, gefolgt vom Aufbringen des sekundären, Meerrettichperoxidase-markierten Antikörpers (Vector ImmPRESS Goat/ Rabbit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) für 30 min in einer feuchten Kammer. Danach erfolgten 4 Waschschrte mit Tween-PBS-Lösung sowie PBS, bevor das Chromogen NovaRED unter dem Mikroskop auf die Objektträger transferiert und die enzymatische Aktivierung beobachtet wurde. Bei einer zu intensiv

einsetzenden Farbreaktion wurde das Chromogen gegebenenfalls mit PBS verdünnt, in jedem Fall jedoch wurde die Färbung nach spätestens 10 min durch eintauchen in PBS gestoppt. Die anschließende Gegenfärbung mit Hämatoxylin zur Zellkerndarstellung fand für maximal 2 min statt. Die immunhistochemischen Präparate wurden 10 min unter laufendem Leitungswasser gespült, in einer Alkoholreihe (jeweils 2 min in 70 %, 80 %, 95 %, 3x 100 % Ethanol) sowie Xylol (3x 4 min) dehydriert und mittels Eindeckmedium (VectaMount, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) und Deckgläschen eingedeckt.

5.4 Arbeiten mit RNA

5.4.1 RNA-Isolation

Gewebeproben wurden in einem, mit kleinen Keramikkügelchen bestückten 2 mL-Schraubgefäß bei -80°C zwischengelagert und nach Zugabe von 900 µL TRIzol-Reagenz in einem Precelleys 24 Homogenisator (Peqlab, VWR International, Erlangen, Deutschland) für 2x 20 sek und einer eingeschobenen Pause von 30 sek bei 5000 Impulsen/min zermahlen. Dann erfolgte die Kühlung der Proben auf Eis und es wurden weitere 600 µL TRIzol zu dem Homogenat hinzugegeben, für 5 min bei RT inkubiert und Debris für 10 min bei 12000 g und 4°C abzentrifugiert. Der RNA enthaltende Überstand wurde überführt und mit 300 µL Chloroform unter kräftigem Schütteln für 15 sek und darauffolgender 3-minütiger Inkubation bei RT gewaschen. Daraufhin erfolgte eine weitere Zentrifugation für 20 min bei 12000 g und 4°C. Die wässrige Oberphase wurde abpipettiert, überführt und mit 750 µL Isopropanol für 10 min bei RT gefällt. Das nach 10-minütiger Zentrifugation (12000 g, 4°C) gefällte RNA-Pellet wurde zweimal in 1 mL 75 % Ethanol gewaschen, vorsichtig gevortext und für 5 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der Ethanolüberstand wurde verworfen, das RNA-Pellet für etwa 10 min bei RT getrocknet und im Anschluss in DEPC-Wasser so verdünnt, dass die RNA-Endkonzentration zwischen 1000 und 1500 ng/µL betrug. Diese Messung erfolgte unter Verwendung von jeweils 1 µL Probe mit dem Spektrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Die Reinheit der RNA wurde mittels Wellenlängenmessungen bei 230, 260 und 280 nm, den Absorptionsmaxima für Alkohole/ Phenole, Nukleinsäuren und Proteine, sichergestellt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 55°C auf dem Schüttler inkubiert und bei -80°C gelagert.

Das Protokoll für die RNA-Isolation aus Knochenmarksmakrophagen und RAW-Zellen begann mit dem Verwerfen des Zellkulturmediums, der Resuspension der Makrophagen in 5 mL TRIzol und dessen Aliquotierung in 1 mL Eppendorfröhrchen. Weiterhin wurde so wie oben geschildert verfahren. Die Durchführung der RNA-Isolation aus der Aorta erfolgte mit dem kommerziellen RNAqueous-Micro Kit (Ambion, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Dafür wurde das Aortengewebe nach Zugabe von 150 µL Lysepuffer (4°C) mit dem Precelleys 24 Homogenisator (Peqlab, VWR International, Erlangen, Deutschland) wie oben beschrieben zermörsert. Anschließend wurden 75 µL 100 % Ethanol hinzugegeben, die Lösung gevortext und 1 min bei 15000 g und RT in einer Swing Out-Zentrifuge gefällt. 150 µL der Fällungslösung wurden auf die zu dem Isolationskit gehörige

Filtersäule pipettiert und für 1 min bei 15000 g und RT zentrifugiert. Drei Säuberungsschritte mit jeweils 180 µL Wash Solution 1 bzw. 2/3 bei 15000 g und RT folgten, ehe das Eluat verworfen und die Filtersäule auf ein neues Elutionsgefäß gesetzt wurde. Anschließend wurde die RNA aus dem Filter gelöst. Dafür wurden in zwei Schritten jeweils 11 µL Elutionspuffer (auf 75°C erwärmt) hinzugegeben, bei RT für 2 min inkubiert und für 1 min bei 15000 g und RT zentrifugiert. Zum Entfernen möglicher kontaminierender DNA-Reste wurden 2 µL DNase I Buffer und 1 µL DNase I (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben, die Lösung gründlich gevortext und für 20 min im Thermocycler bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 µL DNase Inactivation Reagent ergänzt und 2 min bei RT inkubiert. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 15000 g wurde die gelöste RNA vom DNA-Pellet abpipettiert und es erfolgte eine spektralphotometrische Endkonzentrationsbestimmung mit Hilfe des NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland).

5.4.2 RNA-Qualitätsbestimmung

Die Integrität und Qualität von RNA wurden mittels Gelelektrophorese sichergestellt. Dafür wurde 1 µg der RNA in 10 µL DEPC-Wasser gelöst, anschließend mit 2 µL Loading Buffer (30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, Wasser) versetzt und gevortext. Für die Herstellung des Laufgels wurde 1 g Agarose (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) auf 100 mL TAE-Puffer (40 mM TRIS, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) verdünnt, mittels Mikrowellen erhitzt und mehrfach geschüttelt, bis eine einheitliche Masse flüssigen, 1%igen Agarosegels auf einen Gelelektrophorese-Schlitten ausgegossen wurden. Nach Aushärtung des Gels wurden 12 µL RNA-Probe und 5 µL eines molekularen Größenmarkers (DNA Molecular Weight Marker X 0.07-12.2 kbp, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in jeweils eine Kavität pipettiert und bei 85 V für etwa 45 min elektrophoretisch getrennt. Nach Färbung des Gels in einer Ethidiumbromidlösung (50 µL EtBr, 150 mL TAE-Puffer) zeigten sich unter UV-Licht 28S- und 18S-Banden sowie flauere Banden im Kilobasen-Bereich, die den 5S-rRNAs bzw. tRNAs entsprachen.

Für die Qualitätskontrolle der RNA-Proben zur Verwendung für genomweite Expressionsanalysen wurde eine Gelelektrophorese im Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) gewählt. Dafür wurde das Herstellerprotokoll (Agilent RNA 6000 Nano Assay Protocol, Edition April 2007) unter Verwendung von 50 ng Probeneinsatz ausgeführt. Von 5 bzw. 6 Leber-RNA-Proben aus Chromosom 6-kongeneten und Kontroll-FVB-Mäusen wurden jeweils 4 mit RIN-Werten (RIN = RNA Integrity Number) > 9 für die Hybridisierung auf Genexpressionchips ausgewählt.

5.4.3 RNA-Aufreinigung

Die hohen Qualitätsanforderungen an RNA-Proben, die auf Genexpressionchips hybridisiert werden, machte es notwendig, aus Lebergewebe isolierte RNA nochmals aufzureinigen. Dafür wurde das Aufreinigungskit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

5.4.4 Reverse Transkription

Zur PCR-basierten Quantifizierung spezifischer RNA-Transkripte war es zunächst notwendig, die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben. Für einen Reaktionsansatz wurde eine Menge von 2 µg RNA benötigt, die ad 10 µL Gesamtansatzvolumen verdünnt wurde. Anschließend wurde 1 µL Random Hexamer Primer (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt und der Ansatz 10 min bei 68°C im Thermocycler inkubiert. Es erfolgten die Zugabe von 9 µL Mastermix bestehend aus 1 µL Ribonucleaseinhibitor (RNAsin, Promega, Mannheim, Deutschland), 1 µL dNTP, 2 µL DTT, 4 µL 1st Strand Buffer (Life Technologies) und 1 µL SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies) zum Reaktionsansatz und die Inkubation für 1 h bei 42°C im Thermocycler. Der cDNA-Gesamtansatz wurde 1:30 mit 1x TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA) verdünnt und bei -80°C gelagert.

5.5 Arbeiten mit DNA

5.5.1 Primer- und Sonden-Design

Das Design von Primern (Tab.1, Tab.2) entsprach bestimmten Vorgaben, die den Erfolg einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verbessern sollten. Ein Primer bestand demnach aus 17 bis 28 Nukleotiden, wobei der GC-Gehalt von 40 bis 60 % zu beachten war. Bei der Dimerisierungssimulation mittels Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) wurde darauf geachtet, dass längerstreckige Komplementärsequenzen möglichst nicht auftreten und dabei vor allem das jeweilige 3'-Ende eines Primers frei blieb. Der Unterschied zwischen den Schmelztemperaturen zweier Primer ein und desselben Reaktionsansatzes lag unter 3°C. Für 5'-FAM-3'-TAMRA-markierte Sonden galt, dass weder das erste noch zweite Nukleotid des 5'-Endes ein Guanin war, die im Allgemeinen eine Unterdrückung des FAM-Signals verursachen.

5.5.2 DNA-Isolierung aus Mausschwanzspitzen

Die Genotypisierung von Mäusen mit Hilfe von SNPs erfolgte zu folgenden Zwecken: Zum einen wurde überprüft, ob bei der Züchtung Chromosom 6-kongener Mäuse die korrekte Allelsequenz auf die homozygoten FVB-Mäuse rückgekreuzt wurde, zum anderen wurden die bereits bestehenden LOD-Score-Plots der zufällig rekombinierten F2-Generationen B6xFVB und B6xBALB feinkartiert (*finemapping*) und auf diese Weise genetische Effekte in den F2-Individuen gemessen (*genetic linkage analyses*).

	Primertyp	Sequenz	Produktlänge
cDNA	5'-PCR-Primer	5'-GATCCCAGCCACCATGTCTATAGA-3'	1328 bp
	3'-PCR-Primer	5'-GGGAAGGTCATCACAGCACACT-3'	
	Sequenzierprimer	5'-GTGGTGGAGCAGGAGAACTGGAC-3'	351 bp
	Sequenzierprimer	5'-GGCAAGGATGCCACTAACGTGG-3'	332 bp
	Sequenzierprimer	5'-CGGCATCCAGATAGTGGGCG-3'	483 bp
Promotor	5'-PCR-Primer	5'-GAGCATCCGTAAGCTTAAGGGTTG-3'	1417 bp
	3'-PCR-Primer	5'-CTTCTCTATAGCCATGGTGGCTGGG-3'	
	Sequenzierprimer	5'-GAGTCTGCAGTCCTCGAGGTGAGG-3'	389 bp
	Sequenzierprimer	5'-GCGAAGATACCCTCTCACCTTCC-3'	371 bp
	Sequenzierprimer	5'-CAGTCTGGCAGCCATCCCG-3'	495 bp

Tab.1 *Eno2*-cDNA- und Promotor-Primer.

Die Mausschwanzspitzen wurden von Mitarbeitern des Medizinisch-Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät Leipzig abgenommen. Dabei wurde die als Unterlage verwendete Glasplatte vor jeder Schwanzspitzenresektion mit tridestilliertem Wasser gereinigt, um Kontaminationen mit Fremd-DNA zu vermeiden. Es wurden höchstens 5 mm mit einem Skalpell abgeschnitten. Zu den frisch abgenommenen Mausschwanzspitzen wurden 500 µL 1x Tail Tip Lyse Puffer (8 M Harnstoff, 0,2 M TRIS-HCl pH 8,0, 0,4 M NaCl, 20 nM EDTA, 1 % Sarcosyl 30 %, tridestilliertes Wasser) und 50 µL Proteinase K-Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) hinzugegeben und für mindestens 12 h bei 55°C im Thermoschüttler inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation der Proben für 5 min bei 17000 U/min. Aus dem gewonnenen Überstand wurden 450 µL in ein Eppendorfröhrchen mit 1 mL 100 % Ethanol gegeben, nach mehrmaligem Schwenken wurde die DNA als feinfaseriges Präzipitat sichtbar. Der „DNA-Faden“ wurde mit Hilfe einer Glaskapillare, die zuvor über einer Bunsenbrennerflamme angeschmolzen wurde, aus dem Röhrchen herausgenommen, in ein neues Eppendorfröhrchen mit 200 bis 500 µL 0,1x TE-Puffer überführt und für mindestens 12 h bei RT gelöst. Anschließend wurden alle DNA-Proben bei 4°C gelagert.

5.5.3 SNP-Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse

Um den in der vorliegenden Arbeit identifizierten genomischen Bereich auf dem Chromosom 6 der Maus, der kausal für die Atherosklerose der BCA von B6- und FVB- bzw. B6- und BALB-Mäusen ist, näher zu charakterisieren, wurden weitere polymorphe Marker gesucht. Dafür wurden Datenbankenanalysen durchgeführt. Vor allem die *Mouse Phenome Database* (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) und *dbSNP-Short Genetic Variations* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>, *National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, USA) waren für diesen Zweck informativ. Es wurden insgesamt 20 SNPs genotypisiert, die als polymorph annotiert waren. Davon konnten jedoch lediglich 4 SNPs experimentell bestätigt werden (Tab.2): Während rs13478948 (104798169 Mb) und rs13478995 (117420898 Mb) zwischen beiden

F2-Kreuzungen diskriminieren, befinden sich die rs4226262 (126826017 Mb) bzw. rs30466555 (112222904 Mb) ortsnahe zu solchen Mikrosatellitenmarkern (*short tandem repeats*), die zuvor zwischen B6xFVB bzw. B6xBALB identifiziert wurden. Die Genotypisierung wurde entsprechend der Methode von El Housni et al. durchgeführt [84]. Dabei wurde ein PCR-Assay verwendet, der auf einer zweifach markierten Sonde basierte und im 384-Loch-Format ausgeführt wurde. Die Sonde hybridisierte an denjenigen Sequenzabschnitt, der den SNP trug, und ist entsprechend der Allelkonfiguration (Homozygotie für jeweils ein Nukleotid oder Heterozygotie) und der damit verbundenen Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bereits bei einer geringen Schmelztemperatur (*mismatch*) oder erst bei einer hohen Schmelztemperatur (*perfect match*) von dem DNA-Strang dissoziiert (Abb.7). Für das Design der Sonde wurde das Programm MeltCalc verwendet, eine Tabellenkalkulation für die thermodynamische Simulation von Sondenhybridisierungen [85]. Die Primer wurden unter Zuhilfenahme von Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) in unmittelbarer Nachbarschaft des SNPs konstruiert, sodass sie ein Amplikon von etwa 200 bp generierten. In der Etablierungsphase eines Genotypisierungsassays wurde das Entstehen eines PCR-Produktes durch eine Gelelektrophorese auf einem 3 % Agarose-Gel überprüft. Jede PCR wurde in einem 12,5 µL Gesamtansatz angefertigt, der sich wie folgt zusammensetzte: 2,5 µL DNA aus B6, FVB und BALB, 1,25 µL 10x Reaction Buffer B (Solis BioDyne, Tartu, Estland), 4 mM MgCl₂, 250 µM dNTP-Mix, 0,5 mg/mL BSA (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland), 0,05 U/µL FIREPol DNA-Polymerase (Solis BioDyne, Tartu, Estland), 100 nM 5'-FAM-3'-TAMRA-markierte Sonde zusammen mit 100 nM oder 900 nM *forward*- oder *reverse*-Primer in allelischer Abhängigkeit der Sonde. Die initiale Denaturierung der Doppelstränge erfolgte für 3 min bei 95°C, gefolgt von 45 Polymerisierungsdurchgängen mit jeweils 95°C für 20 s, 62°C für 30 s, 72°C für 1 min. Zuletzt erfolgt die Erstellung der Schmelzkurven bei 95°C für 3 min und die Sondenhybridisierung bei 30°C für 2,5 min und einem 7 % aufsteigenden Temperaturgradienten bis 90°C, während das Fluoreszenzsignal kontinuierlich von dem LightCycler 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) aufgenommen wurde.

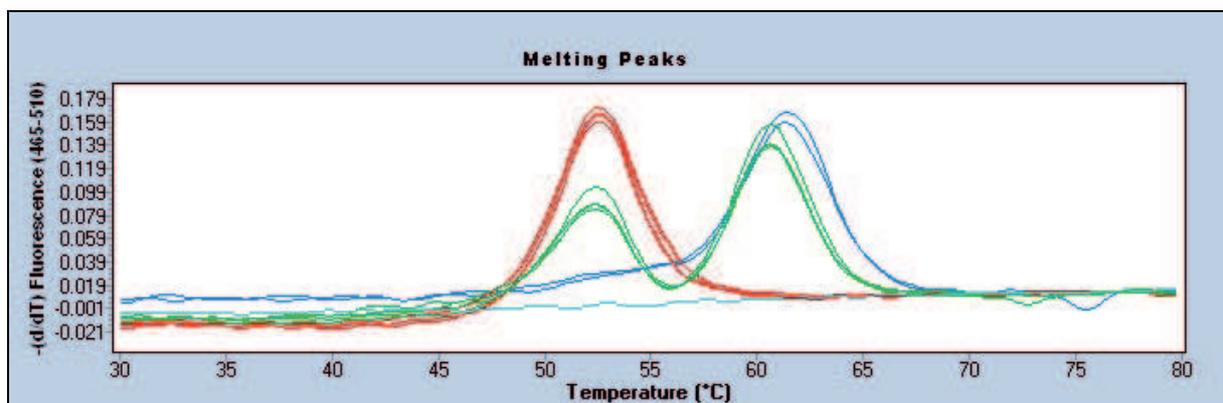


Abb.7 Schmelzkurvenanalyse für die Genotypisierung von rs13478948. Die Sonde lag auf dem *forward*-Strang und hybridisierte optimal an die Wildtyp-Frequenz (*perfect match*, blau) sowie als sogenannter *mismatch* an die mutierte Frequenz (rot); bei Heterozygotie entstand ein zweigipfliger Schmelzkurvenverlauf (grün).

SNP	FWD-/ REV-Primer/ Sonde	Amplikon (bp)	Annotation/ Sequenzierung		
			B6	FVB	BALB
rs13478948	5'-CCTCTGTGAGAGCCTATAACACTGCAG-3' 5'-AAGAATGAATGGCCACGGAGCATAAG-3' 5*-ATTAAGTGGCAGACTTGAGG-#3'	163	T	C	C
rs30466555	5'-GGCCAGTCCGATCTCACCG-3' 5'-CTGGTCATCAGGCTTGGCAGC-3' 5*-TCTCCTCGTCTTCTCAGTTG-#3'	177	T	C	C
rs13478995	5'-CATTAAGGGCTGTGCCAGGAGG-3' 5'-CAAATCTAAGGCGCAGTCCGTTGTAG-3' 5*-AGACTACGCCAGCCTGT-#3'	255	C	G	G
rs4226262	5'-CAGTGGTGTGTGTTGTGCTGAATGC-3' 5'-CACAGAAGGTCTGAAGCCGTATTCC-3' 5*-GTCAATCTATGCCAATCAGGAT-#3'	185	C	T	T

Tab.2 SNP-Genotypisierungen in B6xFVB und B6xBALB. Vier Genotypisierungsassays (inklusive der dazugehörigen Primer und der jeweiligen Sonde) erlaubten ein *finemapping* der LOD-Score-Plots. Die jeweils durchgeführte Sequenzierung deckte sich mit der Annotation und bestätigte die Polymorphismen zwischen B6 und FVB bzw. BALB. * 6-FAM, # TAMRA

5.5.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Durch genomweite Expressionsanalysen (5.6) wurden Kandidatengene der Atherosklerose an der BCA identifiziert, die in weiteren Validierungsschritten bestätigt werden mussten. Der erste Schritt bestand darin, einen Assay für eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) zu etablieren. Für die Konstruktion eines PCR-Produktes wurden folgende Aspekte beachtet: die Gesamtlänge des Amplikons sollte zwischen 75 und 90 bp betragen und musste mindestens eine Exon-Exon-Grenze überspannen oder in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) liegen. Damit wurde sichergestellt, dass die gemessene Expression *de facto* nur von der cDNA stammen und nicht auf Konzentrationsunterschiede von DNA zurückzuführen sein konnte. Zur Überprüfung dieser Bedingungen wurde eine Darstellung des Amplikons im UCSC Genome Browser unter Nutzung der BLAT-Funktion (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) angefertigt. Zusätzlich wurde in der Etablierungsphase eine Gelelektrophorese auf 2 % LMP-Agarose-Gel durchgeführt. Der Mastermix setzte sich aus 2,5 µL cDNA, 5 mM Magnesiumchlorid, 1,25 mL 10x GeneAmp PCR Buffer II, 200 µM

jeden dNTPs, 300 nM des *forward*- sowie *reverse*-Primers und 0,3125 U AmpliTaq Gold (jeweils Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) zusammen. Die qRT-PCR wurde in einem ViiA 7 PCR-Gerät mit simultaner Fluoreszenzdetektion (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: 95°C für 3 min, anschließend 40 Amplifizierungsschritte à 95°C für 20 s und 60°C für 1 min, sowie eine finale Elongation für 7 min bei 72°C, die sowohl für eine polyadenylierende Stabilisierung des PCR-Produktes sorgt als auch für eine spätere Klonierung in pCR II-TOPO von Bedeutung ist.

5.5.5 Standardkurvenerstellung für qRT-PCR

Für jede qRT-PCR wurde eine logarithmische Standardkurve angefertigt um die korrekten Kopienzahlen eines Durchlaufs messen zu können. Nach Herstellung des PCR-Produkts, konnte es in den Vektor pCR II-TOPO ligiert werden. Dann wurde ein HindIII-Verdau des Vektors vorgenommen. Damit wurde eine Linearisierung des pCR II-TOPO erreicht, da es nur eine intrinsische HindIII-Erkennungssequenz gibt (Abb.8 A). Es wurde ausgeschlossen, dass das Insert eine HindIII-Erkennungssequenz trägt. Nun wurde spektralphotometrisch bei 260 nm die Konzentration der dsDNA (Doppelstrang-DNA) bestimmt. Die molare Masse pro Nukleotidbase ließ sich durch die molaren Massen jeder einzelnen Nukleotidbase ($M(A) = 313,21 \text{ g/mol}$, $M(C) = 289,18 \text{ g/mol}$, $M(G) = 329,21 \text{ g/mol}$, $M(T) = 304,19 \text{ g/mol}$) extrapolieren und betrug im Mittel für dsDNA $M(N) = 617,895 \text{ g/mol}$. Diese wurde mit der Anzahl der Basen, die sich aus der Addition der Vektor- und Insertlänge ergab, multipliziert. Durch Division der molaren Masse des Plasmids durch die Avogadro-Konstante ($N_A \approx 6,02214129 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) ergab sich das Gewicht eines Moleküls. Nach der anschließenden Verdünnung in 1x TE-Puffer wurde bestimmt, in wieviel Volumen der Stocklösung 10^{10} (Standardkurven für β -Actin) bzw. 10^9 (Standardkurven für Kandidatengene) Moleküle enthalten waren. 5 μL dieser Stocklösung wurden mit 245 μL 1x TE-FKS-Puffer verdünnt, um 10^8 bzw. 10^9 Kopien zu erhalten usw., bis die Verdünnungsreihe von $10^{10}/10^9$ bis 10^2 Kopien erstellt war und in die oberste Reihe einer 384-Loch-Platte in Dreifachbestimmung pipettiert wurde.

5.5.6 DNA-Gel-Extraktion und -Fällung

Um im Anschluss an einen Restriktionsverdau gelektrophoretisch aufgetrennte DNA weiterverwenden zu können, wurde diese mit Hilfe des DNA Gel Extraction Kit (Millipore, Merck Chemicals, Schwalbach, Deutschland) aufgereinigt. Zuerst wurden die interessierenden Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Das ausgeschnittene Stück wurde anschließend in einen sogenannten „Gelnebulisator“ gegeben und für 10 min bei 5000 g zentrifugiert. Dabei wurde das Gel zerstäubt, die in TAE-Puffer gelöste DNA passierte den darunter montierten Mikroporenfilter und sammelte sich im Eppendorfröhrchen. Nach Verdünnung des Eluats mit tridestilliertem Wasser auf 200 μL Gesamtvolumen folgte unter Vortexen eine Fällungsreaktion mit 20 μL 3 M Natriumacetat (10 %). Nach Zugabe von 600 μL Ethanol wurde der Reaktionsansatz für 2 h in flüssigem Stickstoff

gelagert und schließlich 30 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das DNA-Pellet mit 500 µL 70 % Ethanol gewaschen und wiederum für 30 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet bei 65°C im Thermocycler getrocknet, überschüssige Ethanolreste wurden mit einem sterilen Wattestäbchen entfernt. Schließlich erfolgte die Lösung der Vektor-DNA in 18 µL und des Inserts in 11 µL tridestilliertem Wasser und die anschließende Konzentrationsbestimmung mittels Spektralphotometer.

5.6 Genomweite Expressionsanalysen

Für die arraybasierten Genexpressionsuntersuchungen wurde RNA aus Aorten und Lebern von jeweils vier männlichen Chromosom 6-kongen und Kontroll-FVB-Mäusen nach den jeweiligen Protokollen isoliert und auf deren Qualität mittels RNA-Gelelektrophorese auf einem Agarosegel bzw. Gelelektrophorese im Agilent 2100 Bioanalyzer geprüft. Die Quantifizierung von 25697 Transkripten erfolgte mit Hilfe des MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip (Illumina Inc., San Diego, USA) und wurde durch Herrn PD Dr. Knut Krohn und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) Leipzig, Core Unit DNA-Technologien durchgeführt. Die Expressionsniveaus der Transkripte basierten auf einem biotinabhängigen Fluoreszenzsignal, das bei spezifischer Transkriptbindung ausgesendet wurde. Die Signalintensitäten wurden vor der weiteren Auswertung vom Assay-bedingten Rauschen bereinigt und quantilnormalisiert.

5.7 Sequenzierungen

5.7.1 Sequenzierung von Plasmiden

Der Sequenzierung von Plasmiden ging eine zweistufige Probenvorbereitung mit einer Vervielfältigung des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes und einer anschließenden Fällungsreaktion voran. Für die PCR wurden 6 µL tridestilliertes Wasser vorgelegt. Nach Zugabe von 1 µL Primer (5 pM) und 1 µL DNA-Fragment (1 µg in 0,1x TE gelöst) wurde der Mastermix mit 2 µL BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Dieses Reagenz enthielt BigDye Terminator v3.0 (dATP, dCTP, dGTP, dUTP), AmpliTaq DNA-Polymerase, *rTth* DNA-Polymerase, Magnesiumchlorid und Puffer. Der verwendete Thermocycler ABI GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) wurde auf folgende Parameter eingestellt: initiale Denaturierung für 2 min bei 98°C und anschließend 30 Amplifikationszyklen (Denaturierung für 20 s bei 98°C, Primerhybridisierung für 15 s bei 50°C, Elongation für 4 min bei 58°C). Für die daraufhin stattfindende Sequenzfällung wurden 10 µL tridestilliertes Wasser, 2 µL 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 55 µL 100 % Ethanol zur Reaktionslösung hinzugefügt, gevortext und 20 min in einer Festwinkelzentrifuge bei maximaler Drehzahl gefällt. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und nach Zugabe von 180 µL 70 % Ethanol und

anschließendem Vortexen für weitere 10 min zentrifugiert. Die alkoholische Oberphase wurde wiederum verworfen und das Pellet erst 15 min über Kopf und anschließend für 10 min bei 68°C im Thermocycler getrocknet. Die sich anschließende Kapillarelektrophorese wurde von Herrn PD Dr. Knut Krohn und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IZKF Leipzig nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt.

5.7.2 Sequenzierung der Promotorregionen

Es wurden Sequenzierungen der *Eno2*-Promotorregion durchgeführt, um die Basenabfolge des in Gendatenbanken annotierten Abschnittes zu verifizieren. Dafür wurde die PCR in einem 25 µL Gesamtansatz ausgeführt. Dieser beinhaltete 2,5 µL genomischer DNA (100 ng DNA), 2,5 µL 10x PCR-Puffer (100 mM TRIS-HCl, 15 nM Magnesiumchlorid, 500 mM Kaliumchlorid, pH 8,3) (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland), 250 µM dNTP-Mix, 0,25 U/µL Taq-DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und jeweils 400 nM des *forward*- und *reverse*-Primers. Einigen PCR-Ansätzen wurden 1,25 µL DMSO hinzugefügt, um die Ausbeute zu erhöhen. Die PCR wurde in einem ABI GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) mit folgenden Reaktionsbedingungen ausgeführt: Zuerst erfolgte eine Denaturierung für 5 min bei 95°C, dann 30 Amplifikationszyklen mit jeweils 95°C für 30 s, die Primerhybridisierung für 30 s und die Elongation bei 72°C für 2 min, und zuletzt eine Polyadenylierung der PCR-Produkte bei 72°C für 7 min. Die Annäherungstemperaturen für die Primerhybridisierung wurden an den jeweiligen PCR-Assay und die konzipierten Primer angepasst und lagen zwischen 58 und 60°C. Die Sequenz-PCR wurde mit 1 µg dieses Reaktionsproduktes, 2 µL 5x BigDye Sequencing Buffer, 1 µL Primer (5 pM), 1 µL BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) angesetzt und mit Millipore-Wasser zu 10 µL Gesamtvolumen aufgefüllt. Die PCR-Parameter wurden auf 1 min bei 96°C gefolgt von 25 Zyklen bei 96°C für 10 s, 50°C für 5 s und 60°C für 4 min eingestellt. Diese Reaktion wurde ebenfalls in ABI GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) ausgeführt.

Die durchgeführten Sequenzierungen waren erforderlich, um bereits annotierte Sequenzen zu validieren und daraus resultierende Analysen zu sichern. Aus diesem Grunde wurde im Rahmen der Arbeit die Promotorbereiche mit der Methode nach Sanger sequenziert und ein *alignment* mit Hilfe von Mafft (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) durchgeführt. Die graphische Aufarbeitung der Sequenzvergleichdaten sowie Darstellung erfolgte mit ClustalX V2.0 [86].

5.8 Gentechnische Arbeiten

5.8.1 Klonierung von PCR-Produkten

Zur weiteren Vervielfältigung des amplifizierten PCR-Produktes wurde dieses in einen pCR II-TOPO-Vektor (Abb.8 A) ligiert, der wiederum zu einem späteren Zeitpunkt chemisch in kompetente *E. coli*

Das Wachstum der Klone wurde gestoppt, indem die bebrütete Agarplatte mit Parafilm umwickelt und bei 8°C zwischengelagert wurde. X-gal ist ein chromogenes Substrat der β -Galactosidase. Dieses Enzym befindet sich an den multiple cloning sites des pCR II-TOPO-Vektors. In dem Fall, dass der Vektor das PCR-Produkt enthält, ist die β -Galactosidase nicht transkribierbar und der Klon erscheint weiß; bei einem transformierten Leervektor erscheint der Klon blau. Mittels Blau-Weiß-Selektion wurden 6 bis 8 Klone mit sterilen Pipettenspitzen von der Agarplatte gepickt und in 2 mL LB-Medium zur 14-stündigen Inkubation bei 37°C im Thermoschüttler gegeben.

5.8.2 Plasmidpräparation

Je nach der benötigten Plasmidmenge wurde entweder die Mini-Prep oder Maxi-Prep durchgeführt. Für die Mini-Prep wurde das FastPlasmid Mini Kit (5 Prime, Hilden, Deutschland) verwendet. Zu Beginn des Protokolls wurden 2 mL Bakterienkultur, die über 14 h gewachsen sind, in ein 2 mL-Eppendorfröhrchen überführt und für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in 400 μ L eiskalten Zellysepuffers (Complete Lysis Solution, 5 Prime, Hilden, Deutschland) durch gründliches Vortexen für 30 s gelöst. Während der 3-minütigen Inkubation bei RT wurden die Bakterienwände und -membranen lysiert und die plasmidische DNA freigesetzt. Das Lysat wurde auf eine Filtersäule gegeben und 1 min bei 17000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden 400 μ L Diluted Wash Buffer (5 Prime, Hilden, Deutschland) auf die Säule gegeben und wiederum 1 min bei 17000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Filtrates wurde die Säule zum Trocknen zentrifugiert und auf ein Sammeleppendorfröhrchen platziert. Nun wurden 50 μ L Elution Buffer (5 Prime, Hilden, Deutschland) in die Mitte der Säule pipettiert und die Plasmid-DNA durch eine weitere Zentrifugation (1 min, 17000 U/min) im Sammelröhrchen gelöst. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch in 1 μ L der Mini-Prep mittels NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gemessen.

Die Vorbereitung der Maxi-Prep wurde mit der Auswahl eines erfolgreich klonierten *E. coli*-Stammes begonnen, der mit einer Impföse abgenommen und mittels Z-Ausstrich auf eine LB-Agarplatte geimpft wurde. Nach 14 h wurde mittels steriler Pipettenspitze ein Klon von der Platte gepickt, in 5 mL LB-Medium gegeben und bei 37°C unter Schütteln im Brutschrank inkubiert. Nach 6 h wurden 2,5 mL der Zellsuspension in einen Erlenmeyerkolben mit 100 mL LB-Medium gegeben und wiederum bei 37°C über Nacht geschüttelt. Der Kulturansatz wurde in ein Becherglas überführt und anschließend für 20 min bei -20°C und 4000 U/min zentrifugiert. Zur Maxi-Präparation von Plasmiden wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Der zentrifugierte Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet mit 5 mL gekühltem Reagenz P1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 μ g/mL RNaseA) gründlich resuspendiert und in ein 50 mL-Falcon pipettiert. 5 mL Reagenz P2 (200 mM Natriumhydroxid, 1 % SDS) wurden hinzugegeben, gefolgt von einer 5-minütigen Inkubation bei RT. Anschließend wurden 5 mL gekühltes Reagenz P3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5) hinzupipettiert, die Maxi-Prep gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nun erfolgte eine Zentrifugation für 45 min bei 4500 U/min und 4°C. Währenddessen wurden die Filtersäulen Qiagentip 500 mit 10 mL QBT-Puffer (750 mM Natriumchlorid, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol,

0,15 % Triton X-100) äquilibriert. Auf diese Säule wurde dann der Überstand gegeben und mit 2x 30 mL QC-Puffer (1 M Natriumchlorid, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Isopropanol) gewaschen. Die DNA wurde daraufhin mit 15 mL QF-Puffer (1,25 M Natriumchlorid, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 15 % Isopropanol) in ein 50 mL-Falcon eluiert und nach Zugabe 10,5 mL Isopropanol bei einer 30-minütigen Zentrifugation (4500 U/min, 4°C) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 5 mL 70 % Ethanol gewaschen; der Alkohol wurde abgegossen und das Pellet für etwa 5 bis 10 min luftgetrocknet. Entsprechend dessen Größe wurde es in 200 bis 500 µL TE-Puffer über Nacht gelöst und die Konzentration spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) gemessen.

5.8.3 Restriktionsverdau

Um mit einem Insert, das in einen Vektor ligiert wurde, weiterzuarbeiten, wurden geeignete Restriktionsendonukleasen verwendet, die nahe der *multiple cloning site* gelegene Sequenzen erkennen und charakteristisch schneiden. Die Anwendungen der Restriktionsverdau waren zahlreich: ein einfacher Verdau zur Linearisierung für die Konzentrationsbestimmung mittels Spektrophotometer oder für eine Gelelektrophorese, ein doppelter Verdau zum Herauslösen des Inserts aus dem Vektor mit dem Ziel der Sequenzierung oder Religierung in einen anderen Vektor. Der Vektorkarte (Abb.8 A) sind die meisten Restriktionsstellen zu entnehmen, allerdings wurden weitere gebraucht, unter anderem EcoRI, HindIII, NcoI, SpeI, XbaI und XhoI (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland). Um unerwünschte enzymatische Spaltungen zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass die Inserts keine Erkennungssequenz für eine der angewendeten Endonukleasen enthielten. Der Restriktionsverdau wurde in folgenden Mengen oder einem Vielfachen dessen angesetzt: 8 µL DNA, 1 µL Endonuklease (d.h. bei Zweifachverdau 2x 0,5 µL) und 1 µL Endonukleasepuffer (mit 1 % BSA außer für EcoRI). Für den Verdau von plasmidischer DNA aus einer Maxi-Prep wurden zu 8 µL DNA aufgrund der hohen DNA-Konzentration 2x 3 µL Endonuklease und 2 µL Puffer addiert. Die Ansätze wurden für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend die Enzyme bei 65°C für 20 min hitzeinaktiviert. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese auf einem 0,8 % bzw. 1 % Agarosegel.

5.8.4 Vektor-T4-Ligierung mit vorbereitender Dephosphorylierung

Um die *Eno2*-Promotorsequenz aus B6, FVB und BALB in den jeweiligen pGL4.11-Vektor (Promega, Mannheim, Deutschland; Abb.8 B, C) zu ligieren, wurde das Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) angewendet. Dabei wurde der Dephosphorylierungsansatz mit 17 µL Vektor-DNA, 2 µL Phosphatase-Puffer und 1 µL Phosphatase (1 U/µL) vorsichtig gevortext und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms für 2 min bei 75°C. Unmittelbar danach wurde der Ligationsansatz hergestellt, bei dem zu beachten war, dass Vektor (4370 bp/mol) und Insert (1417 bp/mol) im stöchiometrischen Verhältnis von 1:4 vorliegen. Der

Ligationsansatz setzte sich aus 50 ng pGL4.11, 66,67 ng Insert des jeweiligen *Eno2*-Promotors, 1,5 µL T4-DNA-Dilutionspuffer, 2 µL T4-DNA-Ligase (5 U/µL) und tridestilliertem Wasser zu 15 µL Gesamtvolumen zusammen und wurde auf einem Kühlblock pipettiert. Nach Inkubation des Reaktionsansatzes für 5 min bei 45°C fand die eigentliche Ligierung für 48 h bei 16°C im Thermocycler statt.

5.9 Zellkultur

5.9.1 Kultivierung von Knochenmarksmakrophagen

Bei der Sektion der Versuchstiere wurde zur späteren Generierung von Makrophagen Knochenmark entnommen. Dafür wurden die Femures und Tibiae der Maus mit sterilem PBS gespült, mehrfach in der Pipette resuspendiert und über ein steriles Zellsieb in 50 mL-Falcons gegeben. Diese wurden für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1,5 mL Einfriermedium (bestehend aus DMEM, Glucose 4,5 g/L, GlutaMAX, Pyruvat, 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin) resuspendiert und auf 3 Kryogefäße verteilt. Zu diesem Zeitpunkt wurden auf jedes einzelne Aliquot 400 µL FKS und 100 µL DMSO zugegeben und alle Proben für 24 h bei -80°C gelagert; die Langzeitlagerung fand in flüssigem Stickstoff statt. Das Eppendorfröhrchen mit 1 mL Zellsuspension wurde im 37°C warmen Wasserbad maximal 1 min angetaut und auf 10 mL Auftaumedium (10 % FKS, 1 % Penicillin/ Streptomycin, DMEM) gegeben. Dieses Probengefäß wurde 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde danach auf 25 mL KM-Medium (Knochenmarksmedium bestehend aus 10 % FKS, 20 % L-Cell Conditioned Medium, 1 % Penicillin/ Streptomycin, 1 % Patricin, DMEM) resuspendiert und in einer T-75-Flasche bei standardisierten 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Alle 48 h fanden Mediumwechsel statt, bis nach einer Woche die Knochenmarksmakrophagen in 30 mL KM-Medium auf T-175-Flaschen passagiert wurden. Nach einer weiteren Woche wurden 3 Aliquots à 1,5 mL zellfreien Mediums abgenommen und die RNA der gereiften Makrophagen isoliert.

5.9.2 *in vitro*-DNA-Transfektion und Reporterassay

Zur Durchführung von Reporterassays wurden *Eno2*-Promotoren in den pGL4.11-Vektor ligiert. Der Vektor exprimiert eine synthetische *Photinus pyralis*-Luciferase (*firefly*-Luciferase), deren Expression vom regulatorischen Einfluss des jeweils vorgeschalteten Promotors, also dem *Eno2*-Promotor aus den Mausstämmen B6, FVB oder BALB, abhängt. Der für die Co-Transfektion verwendete Vektor pGL4.74 (Promega, Mannheim, Deutschland; Abb.8 C), dessen synthetische *Renilla reniformis*-Luciferase konstant hoch exprimiert wurde, wurde zu Kontroll- und Normalisierungszwecken verwendet (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega, Mannheim, Deutschland). Die Co-Transfektion wurde mit dem Reagenz TurboFect (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) im 96-Loch-Format durchgeführt. Am ersten Tag wurden 15000 RAW-Zellen in 100 µL DMEM (mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin) je Kavität

ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Stützung der These der Hypoxie-induzierten Promotoraktivität wurden alle Experimente auch mit 100 µM Kobaltchlorid (CoCl₂) als Mediumzusatz durchgeführt. Ein Transfektionsmastermix wurde am zweiten Tag hergestellt. Je Kavität wurden dafür 20 µL Opti-MEM (Gibco by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), 0,2 µg Insert-tragenden pGL4.11- und 0,06 µg pGL4.74-Vektor sowie 0,4 µL TurboFect in ein Falcon gegeben, gevortext und kurz anzentrifugiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei RT wurden weitere 80 µL DMEM (mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin) je Kavität zum Transfektionsansatz hinzugefügt. 100 µL dieses Transfektionsgemisches wurden zu jeder Zellkultur pipettiert. 24 h später wurde das Medium der Platte verworfen und die RAW-Zellen mit 100 µL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 20 µL 5x Passive Lysis Buffer (Promega, Mannheim, Deutschland) unter 15-minütigem Schütteln aufgebrochen. Währenddessen wurde das Luciferase Assay Reagent II durch Resuspension des lyophilisierten Luciferase Assay Substrats in Luciferase Assay Buffer II (jeweils Promega, Mannheim, Deutschland) hergestellt und am Ende der Lysezeit wurden 50 µL mit der 8-Kanal-Pipette hinzugegeben. Die *Photinus pyralis*-Lumineszenz wurde bei 560 nm in einem SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, Biberach, Deutschland) gemessen. Das Stop & Glo Reagent (Promega, Mannheim, Deutschland) supprimierte die *Photinus pyralis*-Lumineszenz mindestens um den Faktor 10⁵ und enthielt das *Renilla reniformis*-Luciferase-Substrat. Die erzeugte Lumineszenz wurde bei 490 nm gemessen. Jedes Experiment wurde in Vierfachwerten durchgeführt und es wurden außerdem Medium- und Leervektorkontrollen mitgeführt.

5.9.3 Funktionsassays

Im Rahmen der funktionellen Untersuchung von *Eno2* wurden zahlreiche Zellkulturexperimente etabliert und durchgeführt. Grundlage für die Testung der funktionellen Relevanz war die Suppression der *Eno2*-Expression in RAW-Zellen durch Transfektion mit jeweils spezifischer siRNA. Dieser Mechanismus beruht auf posttranskriptionalem Gen-Silencing [87]. Die Transfektionen wurden entweder mit Hilfe von Lipofectamine 2000 (Life Technologies) oder TurboFect (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) realisiert; die Maus-spezifische *Eno2*-siRNA (siRNA ID# s65515) wurde von Life Technologies bezogen. Im Kontrollarm eines Versuches kam als Transfektant eine *scrambled* siRNA (SCR-siRNA, chiffrierte siRNA ohne Interferenzpotential) zum Einsatz. So wurde sichergestellt, dass nicht die Methode der Transfektion selbst, sondern die posttranskriptional stattfindenden, interferierenden Effekte die Ursache für die phänotypischen Effekte sind. Knochenmarksmakrophagen aus B6-, FVB-, BALB- sowie L6F-Mäusen wurden zudem für Funktionsassays genutzt. Um quantitativ einheitliche Mengen an Zellen in beiden Armen eines Versuchs zu verwenden, wurden diese mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

5.9.4 Proliferations- und Metabolisierungsassay

Die in T-25-Flaschen durchgeführten Proliferationsexperimente lieferten genügend Mediumüberstände für Metabolisierungsanalysen. Jeweils 1 Mio. RAW-Zellen wurden in T-25-Flaschen und 2,5 mL Opti-MEM (Gibco by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) ausgesät und einer reversen Transfektion unterzogen. Dafür wurden 5 µL Lipofectamine 2000 (Life Technologies) in 495 µL Opti-MEM und 70 µL einer 5 µM siRNA-Stocklösung in 430 µL Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) vereinigt und 20 min bei RT inkubiert, bevor das Transfektionsgemisch zu den Zellen pipettiert wurde. Damit betrug die siRNA-Endkonzentration im Zellkulturansatz 100 nM. Nach einer 4-stündigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das Transfektionsmedium entfernt und 6 mL DMEM (mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin) auf die Zellen gegeben. Alle 24 h wurden die Zellen zweier T-25-Flaschen gezählt und 1 mL des Überstandes abgenommen, zentrifugiert und die zellfreie Oberphase des Überstandes für die Glucose- und Lactatbestimmung genutzt. Außerdem wurden alle 24 h die RAW-Zellen jeweils einer T-25-Flasche für RNA- und Proteinisolation verwendet.

5.9.5 Apoptoseassay

Zellkulturexperimente, die die Apoptose unter dem Einfluss der *Eno2*-Expression untersuchten, wurden im 96-Loch-Format angefertigt. Dafür wurden 1,3 Mio. RAW-Zellen je Transfektionsansatz in 2,5 mL Opti-MEM (Gibco by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) in T-25-Flaschen ausgesät und mit 30 nM siRNA mittels Lipofectamine 2000 (Life Technologies) revers transfiziert. Die Transfektion fand 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ statt, bevor sie durch Zugabe von 3,5 mL DMEM (mit 20 % FKS und 2 % Penicillin/ Streptomycin) gestoppt wurde. Nach 48 h wurden die Zellen abgenommen, gezählt und jeweils 10000 Zellen/ 25 µL Medium ausgesät. Außerdem wurde ein Aliquot für eine RNA-Isolation entnommen, die der Verifizierung des jeweiligen Genknockdowns diente. Als Apoptose-induzierende Substanz wurde Cycloheximid (100 mg/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in den Endkonzentrationen 10 µg/mL und 50 µg/mL verwendet, auf 50 µL Gesamtvolumen hinzugegeben und für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Auswertung der induzierten Apoptose wurde das luminogene Detektionsreagenz Caspase-Glo 3/7 (Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Dazu wurden sowohl die Zellkulturplatte als auch die Reagenzien auf RT temperiert. Dann wurden 50 µL eines 1:1-Gemisches aus Caspase Glo 3/7-Puffer und -Substrat hinzugegeben, die Platte zum Schutz vor Kontamination mit einer Folie versiegelt, 30 s auf einem Plattenschüttler bei 500 U/min geschüttelt und 1 h lichtgeschützt bei RT inkubiert. Die anschließende Lumineszenzmessung bei 560 nm [88] nach einer Integrationszeit von 140 ms erfolgte in einem SpectraMax Paradigm (Molecular Devices, Biberach, Deutschland).

Dasselbe Protokoll wurde für Apoptoseassays mit Knochenmarksmakrophagen aus Chromosom 6-kongenem und Kontroll-FVB-Mäusen durchgeführt, wobei folgende Abweichungen galten: das Kulturmedium, in welchem jeweils 10000 Zellen für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ wuchsen, setzte sich

aus DMEM, 20 % LC-Medium, 10 % FKS, 1 % Patricin und 1 % Penicillin/ Streptomycin anstelle eines Opti-MEM-basierten Transfektionsmediums zusammen.

5.9.6 Hypoxieassays

Promotorsequenzierungen und Datenbanken-basierte Transkriptionsfaktorbindungsanalysen haben HIF1 α (Hypoxie-induzierter Faktor) als putativ regulatorisches Element der *Eno2*-Expression in FVB- und BALB-Mäusen identifiziert. Um diesen regulatorischen Zusammenhang nachzuvollziehen und zu zeigen, dass die *Eno2*-Expression vom verringerten Sauerstoffgehalt des Zellkulturmediums abhängt, wurden Assays etabliert, in denen CoCl₂ diesen hypoxischen Effekt nachahmt. Dazu wurde es in einer Dosierung von 100 μ M zu DMEM mit 10 % FKS, 20 % LC-Medium, 1 % Patricin und 1 % Penicillin/ Streptomycin und anschließend auf Knochenmarksmakrophagen aus L6F-, B6-, FVB- und BALB-Mäusen gegeben. Das Kontrollmedium enthielt kein CoCl₂. Die Wachstumszeit betrug 4 h. Beide Inkubationsansätze wurden in doppelter Ausführung (für RNA- und Proteinisolierung) im 6-Loch-Format durchgeführt.

5.10 *in silico*-Analysen

5.10.1 Datenbankanalysen

Genomische Datenbanken, wie der UCSC Genome Browser (5.5.4) oder BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA), wurden für Sequenzanalysen, SNP-Identifizierungen und Sequenzalignierungen verwendet. Um passende SNPs für die Genotypisierungen zu finden, wurden Datenbankanalysen mit der Mouse Phenome Database und dbSNP Short Genetic Variations (5.5.3) durchgeführt. Außerdem fand die MAFFT-Software für sequenzvergleichende Darstellungen Verwendung (5.7.3). Die Datenbank PROMO 3.0.2 (<http://algen.lsi.upc.es/>, ALGGEN) [89] als auch JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) wurde verwendet, um Transkriptionsfaktorbindungsstellen zu analysieren [90].

5.10.2 Netzwerkanalysen von Expressionsdaten

Die Datensätze der genomweiten Expressionsuntersuchung wurde unter Verwendung der Ingenuity Pathway Analysis IPA (Ingenuity Systems, Qiagen, Redwood City, USA) ausgewertet [91]. Es wurden sämtliche Daten einbezogen, die einen Expressionsunterschied von mindestens 20 % – dies entspricht einem *fold change* von größer 1,2 oder kleiner 0,8 – aufwiesen. Ein 95 %-Signifikanzniveau war kein Einschlusskriterium, da die genomweite Hoch- und Runterregulation von Genen und Genclustern entscheidend war. Zusätzlich wurde dadurch die Leistungsfähigkeit der Analyse

(*statistical power*) erhöht. Die Datensätze wurden den annotierten Netzwerken der Ingenuity-Datenbank zugeteilt und einem internen Punktwert zugeordnet, der die Wahrscheinlichkeit angab, dass sie nicht zufällig in eines dieser Netzwerke perturbierten [92]. Ein Punktwert von 3 bedeutete eine 1:1000-Wahrscheinlichkeit, dass ein Effekt auf dem Zufall basierte. Ein Punktwert von ≥ 3 an, dass ein Perturbationseffekt zu 99,9 % auf der genetischen Variation des distalen Chromosom 6 beruhen musste, da es sich bei den analysierten Daten um Aorten- und Leberexpressionsdaten von Chromosom 6-kongenem Mäusen handelte.

5.11 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben, sofern es nicht anders angegeben wurde. Die Überprüfung der Datensätze auf Gauß'sche Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorow-Smirnow-Test (unterstützt von Prism 4, GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Der Vergleich zweier Gruppen von Daten wurde mit Hilfe des *t*-Tests (bei vorliegender Normalverteilung) oder des Mann-Whitney-U-Tests (bei nichtnormalverteilten Daten) durchgeführt. Die Phänotypen, die bei der Bestimmung von LOD-Scores gegen das Chromosom 6 aufgetragen wurden, waren binomialverteilt [93].

5.11.1 LOD-Score-Plotting

Wie unter 3.3 beschrieben, wurde der Chromosom 6-Locus in unabhängigen Kreuzungen der Mausstämme B6xFVB und B6xBALB identifiziert. Außerdem wurden über 40 Phänotypen charakterisiert und genetischen Kopplungsanalysen unterzogen. Deren Ergebnisse sind statistische Abschätzungen der Nähe und damit der gemeinsamen Vererbbarkeit zweier Genorte (Kopplung) und wurden als sogenannte LOD-Scores (*logarithm of odds*) [93,94] gegen eine genomische Kartierung aufgetragen. In der Mehrzahl der erhobenen Phänotypendaten wurden diese logarithmiert, um eine annähernde Normalverteilung zu erhalten, die bei hinreichend großer Fallzahl die geforderte Binomialverteilung approximieren kann [93], so auch bei der Atherosklerose an der BCA. Ein signifikanter LOD-Score – und somit ein genomweites Signifikanzlevel von 5 % – ist bei 3,3 erreicht worden [95]. Die Kopplung selbst wurde nicht an jedem genetischen Ort berechnet, sondern an gleichmäßig über das Genom verteilten Mikrosatellitenmarkern (in den Voranalysen) und SNPs (in der vorliegenden Arbeit). Die dazwischenliegenden Bereiche wurden mit Hilfe eines Algorithmus der Software Map Manager QTX (<http://www.mapmanager.org/>, Programmversion 0.30) [96] extrapoliert.

5.11.2 Genetische Kopplungsanalysen

In dieser Arbeit fanden zwei verschiedene Arten genetischer Kopplungsanalysen Verwendung: zum einen QTL- und eQTL-Analysen (*expression QTL*) mit Hilfe der Software Map Manager QTX und zum

anderen die Quantifizierung genotypischer Effekte. Bei zuletzt genannten wurden die Mittelwerte der BCA-Läsionsgrößen in Abhängigkeit von der Allelkonfiguration (Homozygotie für B6 oder FVB bzw. BALB und Heterozygotie) am lokalen Maximum des Chromosom 6-Locus (Peakmarker) aufgetragen. Die nacheinander geschalteten Analysen umfassten (1) die Bestimmung des Peakmarker des Atherosklerose-Chromosom 6-Locus, (2) die Bestimmung der genotypischen Effekte für die Atherosklerose an diesem Peakmarker und (3) die Bestimmung der genotypischen Effekte für die *Eno2*-Expression an dem Atherosklerose-Peakmarker nach Erstellung des eQTL für das Chromosom 6.

6. Ergebnisse

Als Grundlage der vorliegenden Arbeit dienten zwei publizierte F2-Kreuzungen von B6xFVB- und B6xBALB-Mäusen [59,80]. Weiterhin waren Ergebnisse der genomweiten Kartierung sowie der Größe atherosklerotischer Läsionen an der BCA verfügbar. Auf Grundlage dieser Daten wurde eine Kopplungsanalyse durchgeführt und ein Genort der Atherosklerose identifiziert, der in beiden unabhängigen Kreuzungen jeweils auf dem distalen Abschnitt des Chromosom 6 lag (Abb.9).

6.1 Identifizierung eines Locus der Atherosklerosedisposition an der BCA und Fine Mapping

In LOD-Score-Plots von B6xFVB- sowie B6xBALB-Mäusen ergaben sich signifikante Wahrscheinlichkeiten dafür, dass der distale Abschnitt des Chromosom 6 für den BCA-Atherosklerosephänotyp verantwortlich ist. Während in den B6xFVB-Tieren ein maximaler LOD-Score von 4,7 erreicht wurde (d6mit10; Abb.9 A), erreichte der LOD-Score-Verlauf der B6xBALB-F2-Generation einen Wert von 5,9 (d6mit216; Abb.9 C). Das dem jeweiligen Atherosklerose-Phänotyp zugeordnete 95 %-Konfidenzintervall betrug für B6xFVB [3,1; 1,3] bei 40 cM (d6mit67) bzw. 73 cM (d6mit15) und in der B6xBALB-Kreuzung [4,4; 3,3] bei 57 cM (d6mit67) bzw. 77 cM (rs4226262). Beide LOD-Score-Plots wiesen eine starke Analogie auf (Vgl. Abb.9 A, C). Dies kann als Hinweis auf gleiche genetische Ursachen für die Regulation der Atherosklerosedisposition an der BCA bei den beiden Kreuzungen gedeutet werden.

Zur weiteren Schärfung des Konfidenzintervalls beider LOD-Score-Plots wurde ein Fine Mapping mittels Genotypisierung weiterer SNPs in dieser Region durchgeführt. Die SNPs mussten die Eigenschaft aufweisen, polymorph zwischen sowohl B6 als auch FVB und BALB zu sein. Die in SNP-Datenbanken gespeicherten Sequenzen waren zwar eine Grundlage für den Ansatz, jedoch zeigte sich auch, dass zahlreiche Annotationen nicht reproduzierbar waren. Schließlich wurden rs13478948 (104798169 Mb) und rs13478995 (117420898 Mb) in beiden F2-Generationen als polymorph identifiziert und genotypisiert. Außerdem wurden rs4226262 (126826017 Mb) in B6xFVB und von rs30466555 (112222904 Mb) in B6xBALB zur Genotypisierung verwendet.

Auf diese Weise wurde eine Reduktion des Konfidenzintervalls um 54,75 % (B6xFVB) (Abb.9 A, B) bzw. 24,37 % (B6xBALB) erzielt (Abb.9 C, D). Die neuen Intervallgrenzen (Abb.9 B, D) wurden durch rs13478948 (45 cM in B6xFVB; 61 cM in B6xBALB) und rs4226262 (57 cM in B6xFVB; 79 cM in B6xBALB) bestimmt. Somit beschränkte sich der genomische Bereich, in dem das Phänotypenerklärende Kandidatengen zu suchen war, auf 22 Mb. Die maximalen LOD-Scores an den kartierten Peakmarker d6mit10 (B6xFVB) bzw. d6mit216 (B6xBALB) betragen 4,7 bzw. 5,8 und waren geringfügig niedriger als vor dem Fine Mapping.

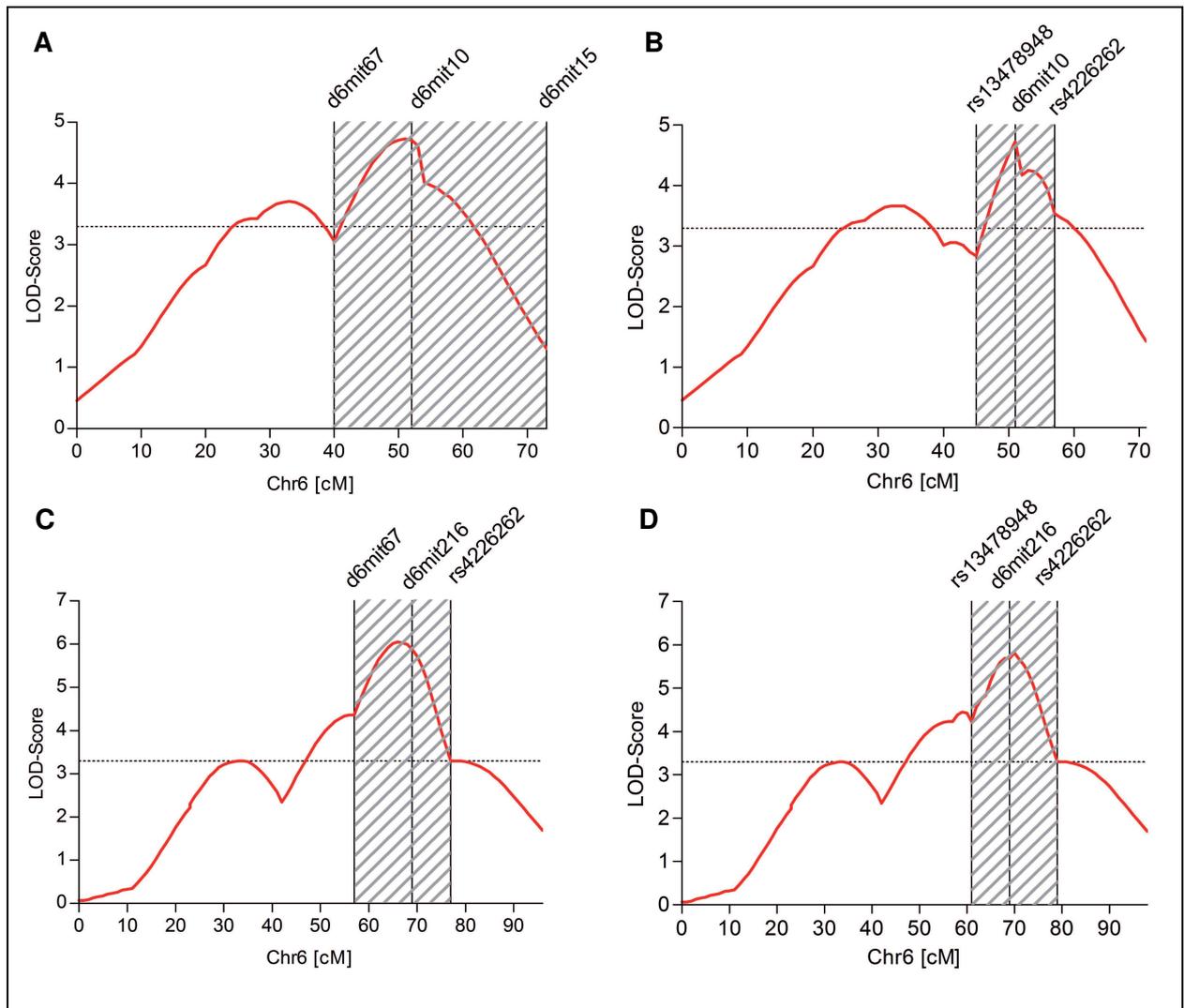


Abb.9 LOD-Score-Plots der Atherosklerose an der BCA. Jede erste Vertikale gibt die linke und jede dritte Vertikale eines Plots die rechte Grenze des Konfidenzintervalls (grau schraffiert) an [X1; X2], während die zweite Vertikale denjenigen Peakmarker angibt, dessen Mapping den höchsten chromosomalen LOD-Score bestimmt. **A** B6xFVB [d6mit67; d6mit15], Peakmarker d6mit10. **B** B6xFVB (nach Fine Mapping) [rs13478948; rs4226262], Peakmarker d6mit10. **C** B6xBALB [d6mit67; rs4226262], Peakmarker d6mit216. **D** B6xBALB (nach Fine Mapping) [rs13478948; rs4226262], Peakmarker d6mit216.

In einem nächsten Schritt wurden die Effekte der Genotypen auf die Atherosklerose an der BCA ermittelt. Dabei zeigte sich, dass Homozygotie für das B6-Allel in jeder der beiden F2-Kreuzungen mit signifikant größeren atherosklerotischen Läsionen an der BCA assoziiert war (Abb.10). Die Plaques hatten im Mittel eine 3,19-/ 5,75-fach größere Fläche (B6/B6 vs. FVB/FVB bzw. BALB/BALB, $P < 0,001$). Heterozygote Tiere wiesen intermediäre Läsionen auf. So war beispielweise Heterozygotie mit höheren Läsionsgrößen verglichen mit dem jeweils atheroskleroseresistenten Genotyp (Ratio B6/FVB vs. FVB/FVB 2,04, $P < 0,01$; Ratio B6/BALB vs. BALB/BALB 3,78, $P < 0,05$) assoziiert.

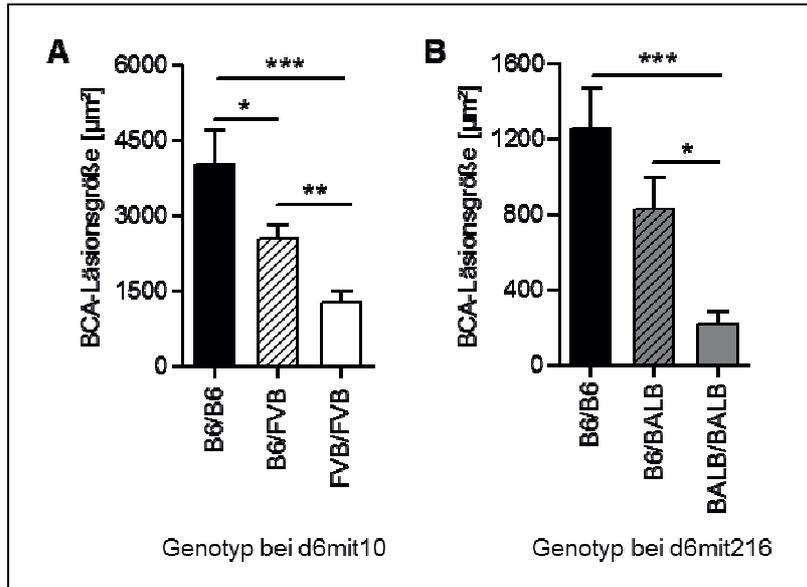


Abb.10 Effekte des Genotyps der F2-Tiere auf die Atherosklerose an der BCA. **A**, B6x FVB-Intercross, Genotyp-assoziierte BCA-Läsionsgröße am Atherosklerose-Peakmarker d6mit10 (n = 55/ 91/ 51). **B**, B6xBALB-Intercross, Genotyp-assoziierte BCA-Läsionsgröße am Atherosklerose-Peakmarker d6mit216 (n = 51/ 83/ 42). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6.2 Chromosom 6-kongene Mäuse

Um den Atheroskleroselocus der BCA auf Chromosom 6 zu bestätigen, wurden kongene Tiere gezüchtet. Dies erfolgte durch Rückkreuzung der Region des Atheroskleroselocus (45 - 145 Mb) von B6 auf den FVB-Stamm (Abb.5).

Chromosom 6-kongene (n = 16) und FVB-Mäuse (n = 18) wurden zum Zeitpunkt der 20. Lebenswoche umfassend phänotypisiert und insbesondere auch laborchemisch charakterisiert (Tab.3).

Die Quantifizierung Oelrot O-gefärbter BCA-Schnittpräparate (Abb.11) zeigte 2,35-fach größere Läsionen männlicher L6F-Mäuse verglichen mit FVB-Kontrollmäusen (1747,18 vs. 743,98 µm², $P < 0,05$). Die Mediane lagen bei 1369,07 bzw. 490,38 µm². Diese Messwerte sind eine Bestätigung der vorausgegangenen Beobachtungen, dass das B6-Allel auf dem distalen Chromosom 6 mit signifikant mehr Atherosklerose an der BCA einhergeht.

Interessanterweise zeigten die atheroskleroseempfindlichen L6F-Mäuse sogar signifikant niedrigere Cholesterinspiegel als die FVB-Kontrollmäuse (413 vs. 572 mg/dL, $P < 0,001$). Dieser Effekt war wesentlich durch eine signifikante Erniedrigung des LDL-Cholesterins (251 vs. 388 mg/dL, $P < 0,001$) bedingt.

	L6F	FVB	P-Wert
Anzahl	16	18	
Länge [cm]	8,51 ± 0,28	9,19 ± 0,31	< 0,001
Gewicht [g]	29,27 ± 1,79	34,12 ± 4,13	< 0,001
Leukozyten [$10^9/L$]	1,83 ± 0,73	1,43 ± 1,16	0,25
Erythrozyten [$10^{12}/L$]	8,59 ± 3,25	9,64 ± 1,03	< 0,001
Hämoglobin [mmol/L]	8,32 ± 2,28	9,03 ± 0,79	0,002
Hämatokrit [L/L]	0,44 ± 0,1	0,48 ± 0,04	0,018
Thrombozyten [$10^9/L$]	1507 ± 279	1465 ± 114	0,58
Gesamtcholesterin [mg/dL]	413 ± 79	572 ± 133	< 0,001
HDL-Cholesterin [mg/dL]	114 ± 22	141 ± 31	0,008
LDL-Cholesterin [mg/dL]	251 ± 75	388 ± 111	< 0,001
VLDL-Cholesterin [mg/dL]	47 ± 45	42 ± 19	0,64
Gesamtriglyceride [mg/dL]	271 ± 147	313 ± 115	0,36
ASAT [$\mu\text{kat}/L$]	1,08 ± 0,23	1,48 ± 0,53	0,008
ALAT [$\mu\text{kat}/L$]	0,36 ± 0,08	0,54 ± 0,18	< 0,001
GLDH [$\mu\text{kat}/L$]	0,22 ± 0,13	0,36 ± 0,75	0,49
CHE [$\mu\text{kat}/L$]	42,4 ± 12,4	37,5 ± 10,9	0,23
Glucose [mmol/L]	12,5 ± 2,8	16,2 ± 4,0	0,004
Harnstoff [mmol/L]	16,1 ± 12,1	10,3 ± 5,4	0,07
Gesamtprotein [g/L]	42,4 ± 3,9	46,5 ± 3,4	0,002
BCA-Atherosklerose [μm^2]	1747 ± 1759	744 ± 869	0,04

Tab.3 Charakteristika der Studienmäuse. 16 Chromosom 6-kongene Mäuse (L6F) und 18 FVB-Kontrollmäuse (FVB) wurden umfangreich phänotypisiert. Diese Untersuchungen umfassten körperliche und laborchemische Messungen sowie histologische Quantifizierungen unterschiedlicher Abschnitte des Gefäßsystems. Daten als Mittelwert ± Standardabweichung. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mittels t-Test berechnet.

6.3 Genomweite Expressionsanalysen

Genomweite Expressionsanalysen ermöglichen die Identifizierung von Kandidatengenen. Diese Methode ist hypothesenfrei, wenn man davon ausgeht, jedes Gen innerhalb des Konfidenzintervalls als mögliches, diesen Chromosom 6-Locus begründendes Gen anzuerkennen.

Die genomweite Expressionsanalyse von Aorten- und Leber-RNA aus L6F- und FVB-Mäusen ($n = 4/4$) mit dem MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip (Illumina Inc., San Diego, USA) ergab Datensätze für 25697 Transkripte. Diese enthielten neben der Illumina-Sondennummer eine Fluoreszenzsignalstärke direkt proportional zu der Kopienzahl einer mRNA. Das Spektrum der Signale (nach Bereinigung des Rauschens und der Quantilnormalisierung) reichte von 83 RFU (*relative fluorescence units*) bis 41584 RFU. Die Mittelwerte aus den jeweilig zu einem Studienarm gehörenden Expressionswerten

wurde ermittelt und der L6F-FVB-Quotient (*fold change*, FC) ergänzt. Auf diese Weise ergaben sich für die Aortendaten FC-Werte zwischen 0,16 (*Anxa4*) und 66,14 (*Sspn*) und für die Leberdaten zwischen 0,11 (*Acot1*) und 53,82 (*Mgst1*). Außerdem wurden die Signifikanzniveaus der FC-Werte berechnet. Basiend auf den FC-Werten von größer 1,2 oder kleiner als 0,8 konnte gezeigt werden, dass allein der distale Abschnitt des Chromosom 6 (von 45 bis 145 Mb) für zahlreiche in *trans*-stattfindende Genexpressionsunterschiede auf nahezu allen anderen Chromosomen verantwortlich ist (Tab.4). Dabei ist augenfällig, dass die größte Anzahl von Genen mit veränderter Expression auf dem Chromosom 6 selbst liegen, also vermutlich zum Großteil *cis*-reguliert sind (Tab.4). Zur Selektion potenziell biologisch relevanter Gene sollte neben dem Kriterium des um 20 % veränderten FC-Wertes auch ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$ erfüllt sein. Basierend auf dieser Voraussetzung wurde das Konfidenzintervall des Chromosom 6-Atheroskleroselocus analysiert. Die relativen Expressionsunterschiede zwischen L6F- und FVB-Tieren sind in Abb.12 in Bezug auf die physikalischen Positionen der Gene dargestellt. Zum einen fiel auf, dass der genomische Abschnitt zwischen der proximalen Grenze des Konfidenzintervalls (rs13478948, 104798169 Bp) und 120 Mb relativ geringe Unterschiede aufweist. Zum anderen wurde offenbar, dass sich in den Bereichen um 113 Mb und 125 Mb eine besonders große Anzahl differentiell exprimierter Gene befand.

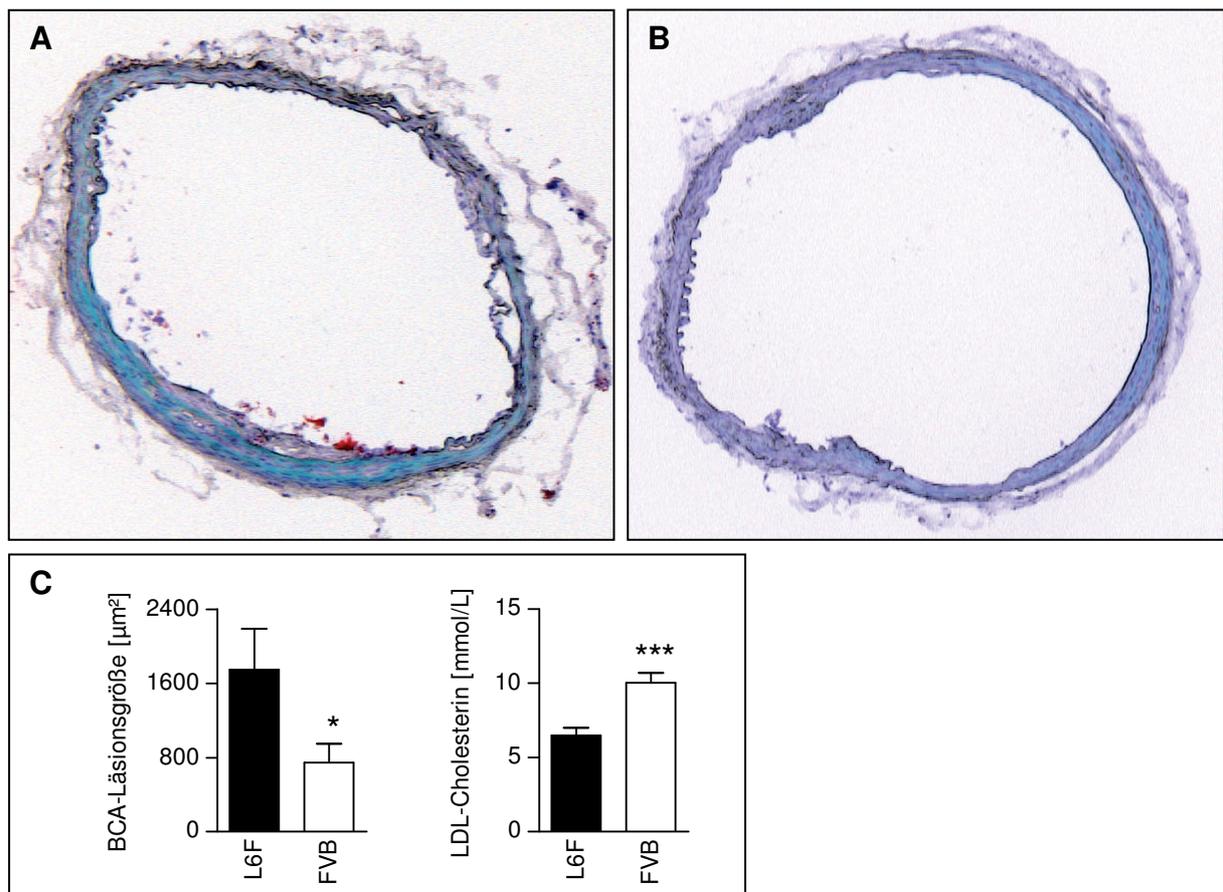


Abb.11 Phänotypischer Vergleich zwischen Chromosom 6-kongenigen und FVB-Mäusen. Atherosklerotische Läsionen in der Oelrot O-gefärbten BCA einer Chromosom 6-kongenigen Maus (A), nicht ausgebildet in der FVB-Kontrolle (B). Der Effekt ist signifikant (C, $P < 0,05$) und invers zu LDL-Cholesterinspiegeln ($P < 0,001$).

Chromosom	Aorta				Leber			
	MW FC>1,2	n	MW FC<0,83	n	MW FC>1,2	n	MW FC<0,83	N
1	1,3156	13	0,7452	35	1,4052	38	0,7278	49
2	1,2882	37	0,7560	35	2,3016	46	0,7501	62
3	1,4093	29	0,7642	24	1,8193	46	0,7058	35
4	1,2910	18	0,7755	27	1,4359	33	0,7270	51
5	1,4269	32	0,7622	25	1,4366	41	0,7403	34
6	2,7171	65	0,7130	53	2,9768	68	0,6710	57
7	1,6404	25	0,7354	25	1,6496	51	0,6894	52
8	1,3779	25	0,7633	26	1,4902	35	0,7063	39
9	1,3305	13	0,7635	20	1,7781	42	0,7072	32
10	1,4143	12	0,7450	31	1,6339	36	0,7236	30
11	1,3105	39	0,7756	38	1,3538	60	0,7163	59
12	1,3879	10	0,7377	19	1,3857	24	0,6896	37
13	1,2582	7	0,7798	14	1,4092	17	0,7384	20
14	1,3150	15	0,7278	15	1,4307	29	0,7130	15
15	1,3517	15	0,7774	19	1,4417	40	0,7469	36
16	1,4308	16	0,7783	12	1,4590	28	0,7753	22
17	1,3660	17	0,7589	24	1,3734	36	0,7519	18
18	1,2916	7	0,7431	15	1,4052	12	0,6935	21
19	1,3140	7	0,7873	27	2,1824	17	0,7197	38
X	1,2748	7	0,7724	15	1,4195	20	0,7951	9
Y	U	0	U	0	U	0	U	0

Tab.4 Transkriptomanalyse. Für jedes Chromosom ist die Anzahl dort exprimierter Transkripte verzeichnet, die vergleichend zwischen Chromosom 6-kongeneten und Kontroll-FVB-Tieren mindestens 20 % hoch- oder runterreguliert sind. Um zu verdeutlichen, wie stark die Einflussnahme des Chromosom 6-Locus auf die genomweite Expression ist, wurden zusätzlich die jeweiligen Mittelwerte (MW) der *fold changes* (FC) der jeweils hoch- bzw. herunterregulierten Transkripte errechnet.

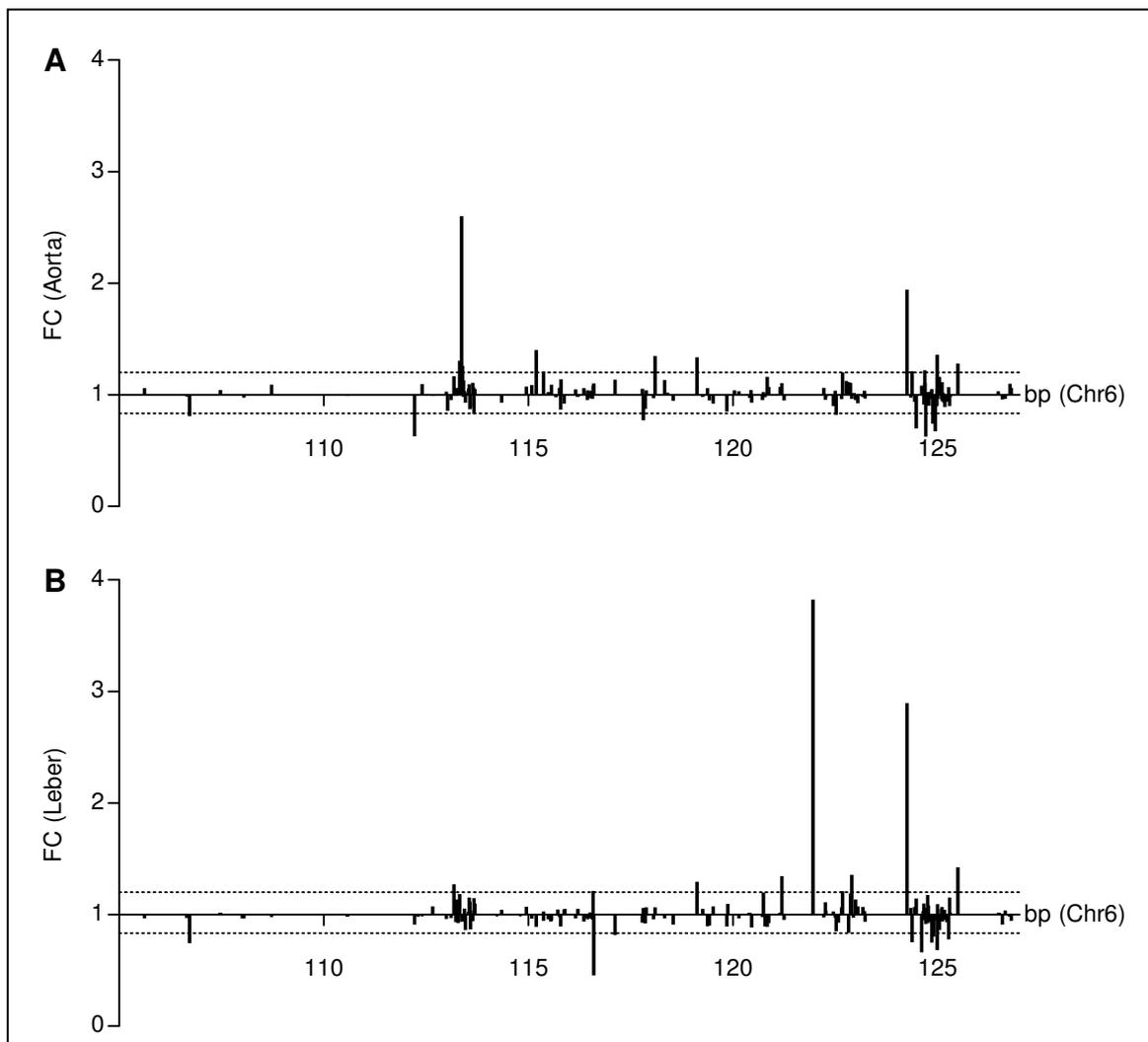


Abb.12 Chromosom 6-Konfidenzintervall. In Abhängigkeit der physikalischen Position auf dem Chromosom 6 sind die FC-Werte jedes einzelnen Gens vermerkt, das ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$ erfüllt. Nur wenige Gene dieser Auswertung erreichen dabei einen FC-Wert von $> 1,2$ oder $< 0,83$ (gestrichelte Linie). Diese Darstellung erfolgte für den Expressionsdatensatz des Aortengewebes (**A**) als auch des Lebergewebes (**B**).

Aufgrund der genannten Kriterien resultierten aus den genomweiten Expressionsanalysen insgesamt neun potenziell relevante Gene für die Atherosklerose an der BCA. Diese erfüllten die folgenden Voraussetzungen:

- Das Gen musste sich innerhalb der Grenzen des 95 %-Konfidenzintervalls des Chromosom 6-Atheroskleroselocus befinden.
- Die Genexpression musste um 20 % erhöht oder verringert sein.
- Dieser quantitative Unterschied musste einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$ genügen.

In Tab.5 sind alle vorläufigen Kandidatengene und deren weitere Validierung dargestellt.

6.4 Kandidatengene der Atherosklerose an der BCA

Genomweite Expressionsanalysen lieferten lediglich Hinweise auf potenzielle Kandidatengene. Deshalb war es notwendig, diese Gene mit weiteren Methoden zu validieren. Dafür wurde die qRT-PCR in verschiedenen Mausgenerationen durchgeführt. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden die Kandidatengene einer Reihe von Validierungsebenen unterzogen (Abb.13).

Für jedes der neun initial identifizierten Kandidatengene wurden qRT-PCR in weiteren unabhängigen Chromosom 6-kongen und FVB-Mäusen (n = 6/ 6) durchgeführt. Die Analyse zeigte zwei Gene (*Eno2* und *C530028O21Rik*), mit denen eQTL-Assays in der F2-Generation der B6xFVB-Verpaarung durchgeführt wurden. Die Gene *Ing4* und *Cxcl12* zeigten sich in Bezug auf die Regulierungsrichtung nicht konsistent, das bedeutet, dass ein im Microarray signifikant *herunterreguliertes*, aber mittels qRT-PCR signifikant *hochreguliertes* Gen aussortiert wurde. In den eQTL-Analysen der B6xBALB-Verpaarung bestätigten sich letztlich *Eno2* und *C530028O21Rik* als plausible Kandidatengene (Tab.5). Die Expressionsbestimmung in den F2-Generationen gewährleistete aufgrund des zufällig rekombinierten genetischen Hintergrundes jedes einzelnen Tochtertieres ein hohes Maß an Zuverlässigkeit, dass der Chromosom 6-Locus für die differentielle Regulation von *Eno2* und *C530028O21Rik* verantwortlich war. Zusammenfassend weisen die bisherigen Ergebnisse auf diese beiden Gene als mögliche relevante Gene des Chromosom 6-Locus der Atherosklerose an der BCA hin.

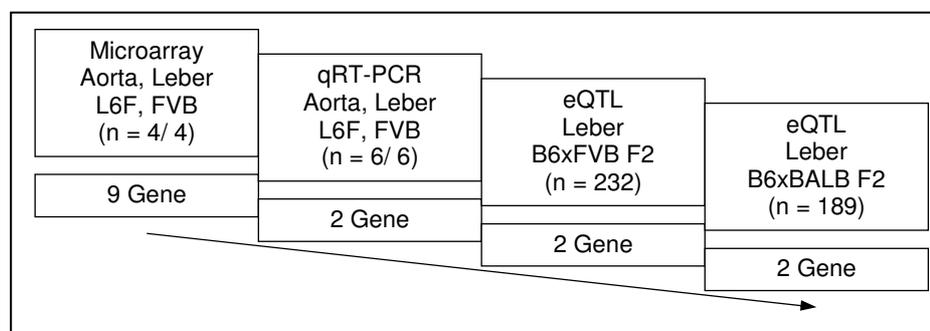


Abb.13 Ebenen der Kandidatengenvvalidierung. Dem hypothesenfreien Ausgangspunkt durch genomweite Expressionsanalysen in Aorten- und Lebergewebe von Chromosom 6-kongen Mäusen folgte eine spezifischere qRT-PCR. Anschließend wurde eQTL-Analysen in Lebern von B6xFVB- und B6xBALB-Mäusen durchgeführt (siehe auch Tab.5).

Genname	Chr6-Position [Mb]	Gewebe	Microarray		qRT-PCR		eQTL	
			L6F/ FVB		L6F/ FVB		B6xFVB	B6xBALB
			FC	P	FC	P	LOD	LOD
<i>Mtmr14</i>	113,1	Aorta	1,17	<0,001	0,90	n.s.		
		Leber	1,27	0,001	0,82	n.s.		
<i>Jagn1</i>	113,3	Aorta	1,26	0,047	1,12	n.s.		
		Leber	0,98	n.s.	0,94	n.s.		
<i>Cxcl12</i>	117,1	Aorta	1,11	n.s.	1,64	0,005		
		Leber	0,77	0,003	1,08	n.s.		
<i>Dcp1b</i>	119,1	Aorta	1,34	0,003	0,42	n.s.		
		Leber	1,29	0,009	0,95	n.s.		
<i>Mug2</i>	121,9	Aorta	0,97	n.s.	0,73	n.s.		
		Leber	6,89	<0,001	0,89	n.s.		
<i>Clec4a3</i>	122,9	Aorta	0,96	n.s.	0,83	n.s.		
		Leber	1,36	0,007	1,15	n.s.		
<i>Eno2</i>	124,7	Aorta	0,62	0,003	0,50	<0,001		
		Leber	0,91	n.s.	0,31	<0,001	4,38	3,93
<i>Ing4</i>	124,9	Aorta	1,36	0,002	0,91	n.s.		
		Leber	1,05	n.s.	0,64	0,002		
<i>C530028O21Rik</i>	124,9	Aorta	0,67	0,002	0,07	<0,001		
		Leber	0,94	n.s.	0,13	<0,001	68,76	37,66

Tab.5 Chromosom 6-Kandidatengene. Genomweite Expressionsanalysen von 25697 Transkripten mittels MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip Kit (Illumina) offenbarten 9 differentiell exprimierte Gene in Aorten und Lebern von jeweils 4 L6F- und FVB-Mäusen. Diese Gene waren signifikant ($P < 0,05$) hoch- oder runterreguliert mit einem FC-Wert $> \pm 20\%$ und lagen innerhalb der Grenzen des Konfidenzintervalls. Von diesen 9 Genen konnten 2 mittels qRT-PCR in Aorten und Lebern von jeweils 6 L6F- und FVB-Mäusen bestätigt werden, ebenso wie in eQTL-Analysen in B6xFVB- und B6xBALB-Individuen ($n = 232/ 189$). Letztlich wiesen sowohl *Eno2* als auch *C530028O21Rik* signifikante LOD-Scores auf (LOD $> 3,3$).

6.5 Charakterisierung von Enolase 2 (*Eno2*)

Die folgenden funktionellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sollen sich auf *Eno2* beschränken. Demgegenüber soll *C530028O21Rik* an dieser Stelle ausgespart bleiben, was nicht bedeutet, dass es eine geringere Relevanz als Kandidatengen hat.

Eno2, auch bekannt unter der Bezeichnung γ -Enolase, ist eine von drei Enolase-Isoformen. Während die α -Isoform als gewebsunspezifisch und die β -Isoform als muskelspezifisch gelten, kommt *Eno2* vor allem in Neuronen vor, weshalb sie auch unter dem Namen Neuronen-spezifische Enolase bekannt ist. Ihre primär enzymatische Aufgabe beinhaltet die katalytische Umwandlung von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat unter Abspaltung von Wasser und stellt damit den vorausgehenden Schritt der zweiten ATP-bildenden Reaktion der Glycolyse dar. Dass die *Eno2* ein multifunktionelles Protein, ein *moonlighting protein*, sein könnte, erschloss sich über die zunehmende Forschung: zu Beginn der 1990er Jahre konnte gezeigt werden, dass die *Eno2* mit Mikrotubuli des Zentrosoms interagiert und somit Einfluss auf den Aufbau des mitotischen Spindelapparates nehmen kann [97]. Außerdem wurde propagiert, dass sie Teil eines Oxidoreduktase-Komplexes sei und ihr somit bei der zelleigenen Antwort auf oxidativen Stress ein zentraler Stellenwert zukommen könnte [98]. Letztere Hypothese wurde im Kontext der Pathogenese von Amyloidosen bestätigt und der *Eno2* wurde eine wichtige Funktion als transmembranöser Signalgeber neuronaler Zellen für radikale Sauerstoffspezies zugeschrieben [99]. Darüber hinaus liegen zahlreiche Daten über den quantitativen Zusammenhang der *Eno2* mit Ausmaß und Therapieansprechen bei kleinzelligem Lungenkarzinom [100,101], mit der Diagnostik und Prognose von Neuroblastomen [102] sowie testikulären in-situ-Karzinomen [103] vor. Außerdem verweisen neuere Publikationen darauf, dass *Eno2*-Plasmalevel mit dem Outcome bei ischämischem Schlaganfall korrelieren [104–106].

6.5.1 Expressionsuntersuchung von *Eno2* in Aorta und Leber

Eno2 war in den untersuchten Geweben von Chromosom 6-kongenem Mäusen, die das B6-Intervall auf dem Chromosom 6 trugen, konsistent geringer exprimiert als in FVB-Kontrolltieren. Die Microarraydaten (Abb.14 A) verzeichneten eine um 38 % verringerte Expression von *Eno2* in Aortengewebe ($P < 0,01$). Die quantitativen, auf β -Actin korrigierten TaqMan-Daten verdeutlichten diesen Effekt in der Aorta (Expressionverminderung um 49,7 %, $P < 0,001$) und die höhere Assayspezifität offenbarte zusätzlich eine mehr als 3-fach verminderte Leberexpression ($P < 0,001$). Bei Betrachtung der Daten in der Abb.14 B ist auffällig, dass *Eno2* im Mittel sehr viel niedriger in der Leber als in der Aorta exprimiert war (24,04 % der Expression in L6F und nur 16,32 % in FVB).

Die Bestätigung des Expressionsunterschiedes erfolgte auch in der F0-Generation (Abb.14 C). Dieser Befund ließ sich sowohl in Aorten-RNA von homozygoten B6-Tieren (1,4-fach bzw. 2,8-fach verringerte Expression gegenüber FVB/ BALB, $P < 0,001 / < 0,05$) als auch Leber-RNA ($P < 0,01$) nachweisen (Abb.14 C). Die Bestimmung der *Eno2*-Expression in vielen anderen Geweben von Chromosom 6-kongenem Mäusen erlaubte eine genauere Einordnung der Expressionsverteilung dieses Gens (Abb.15). Die eQTL-Daten bestätigten mit LOD-Scores von 4,84 bzw. 5,9 am jeweiligen

Atherosklerose-Peakmarker (B6xFVB: d6mit10, B6xBALB: d6mit216) die Signifikanz von *Eno2* (Abb.14 D, E). Beide LOD-Score-Verläufe stellten sich homomorph zum jeweilig zugeordneten Atherosklerose-Graph dar und erreichten ihr lokales Maximum innerhalb der Grenzen des Konfidenzintervalls. Damit wurde die *cis*-Regulation von *Eno2* bestätigt, was bedeutete, dass die genetische Variation an diesem Locus (Atherosklerose-QTL) für die Änderung der *Eno2*-Expression (als an diesem Ort ansässiges Gen) verantwortlich war, und nicht etwa einen *trans*-Effekt auf ein außerhalb des Atherosklerose-QTL gelegenes Gen ausübte.

6.5.2 Expressionsprofil von *Eno2* im Organismus

Neben der Frage nach den Expressionsunterschieden von *Eno2* in Aorta und Leber, war es Gegenstand dieser Arbeit, dessen Expression in zahlreichen anderen Geweben zu untersuchen (Abb.15). Es bestätigte sich die dem Namen Neuronen-spezifische Enolase entsprechende, hohe Kopienzahl in Gehirnen von sowohl B6- als auch FVB-Mäusen (921000 ± 49550 vs. 904600 ± 102900 Kopien *Eno2*/ 10^6 BA, *P* n.s., *n* = 3/ 3). Signifikante Expressionen in einem Kopienzahlbereich, der zwei bis drei Zehnerpotenzen unterhalb der des Gehirns liegt, zeigten sich unter anderem in Thymusgewebe (2026 ± 203 vs. 4722 ± 241 , *P* < 0,01), in der Milz (818 ± 42 vs. 1343 ± 81 , *P* < 0,01) und in verschiedenen Arten von Fettgewebe. Ebenso war *Eno2* in Skelettmuskel hoch exprimiert (3799 ± 482 vs. 7967 ± 623 Kopien *Eno2*/ 10^6 BA, *P* < 0,01). Auch im Herzmuskelgewebe war *Eno2* hoch exprimiert (2086 ± 110 vs. 6656 ± 984 Kopien *Eno2*/ 10^6 BA, *P* < 0,01). Auffällig ist weiterhin, dass die Expression in der Leber relativ niedrig ist, denn die Kopienzahl von *Eno2* (453 ± 62 vs. 1129 ± 61 , *P* < 0,01) steht am Ende der Skala. Die Tatsache, dass sich das Expressionsverhältnis von 1:2 ähnlich darstellt, zeigt jedoch, dass die in den F2-Generationen gemessene Leberexpression valide ist. Besonders hervorzuheben ist der massive Unterschied von fast 90 % in der *Eno2*-Expression von aus Knochenmark beider Mausstämmen gewonnener und gereifter Makrophagen (814 ± 13 vs. 7687 ± 691 Kopien *Eno2*/ 10^6 BA, *P* < 0,001).

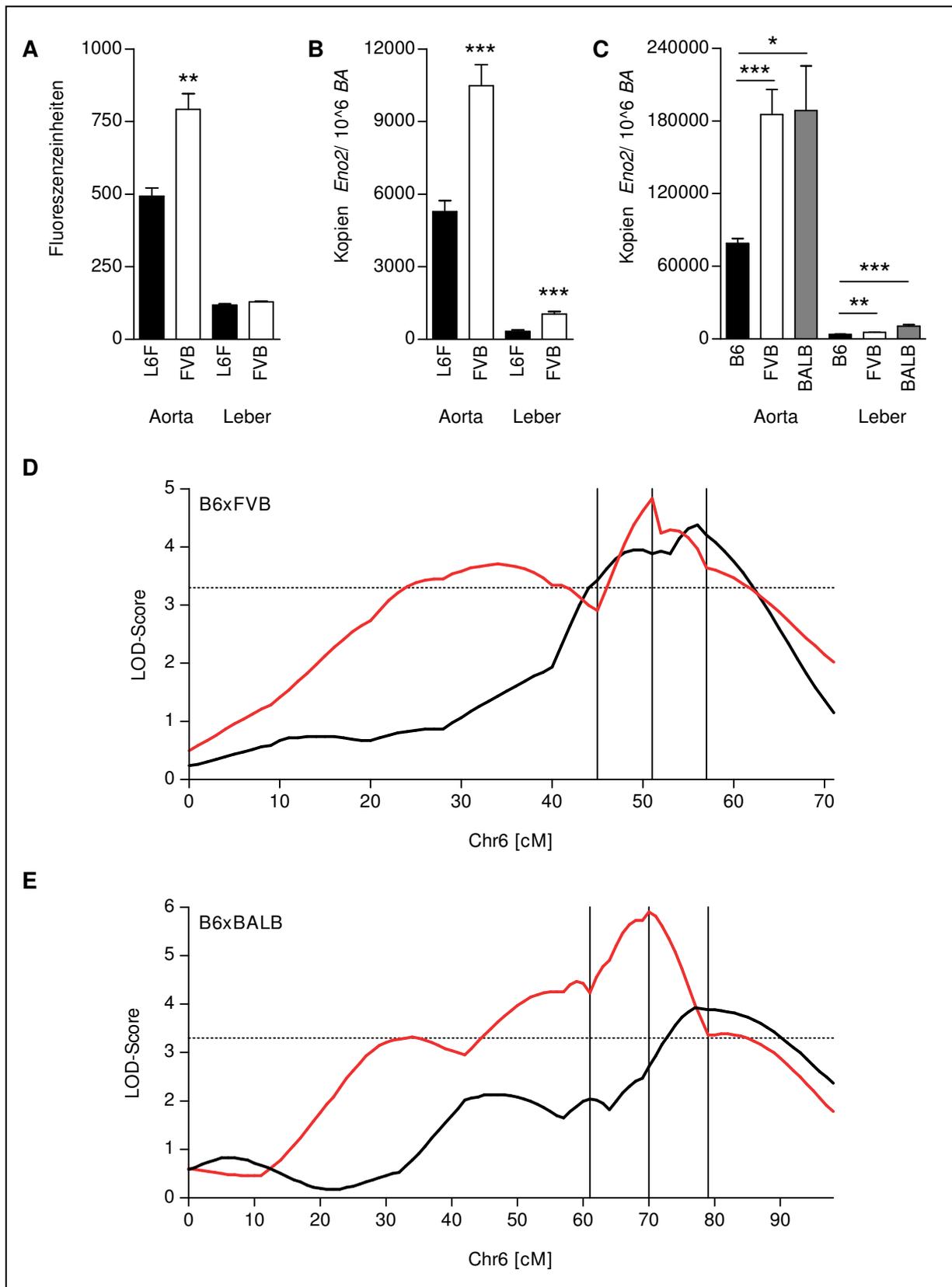


Abb.14 Validierungsdaten *Eno2*. **A**, Microarray. **B**, qRT-PCR L6F vs. FVB. **C**, qRT-PCR B6 vs. FVB vs. BALB. **D**, LOD-Score-Plot F2 B6xFVB (rot, eQTL Atherosklerose an der BCA; schwarz, eQTL *Eno2*). **E**, LOD-Score-Plot F2 B6xBALB (rot, eQTL Atherosklerose an der BCA; schwarz, eQTL *Eno2*). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

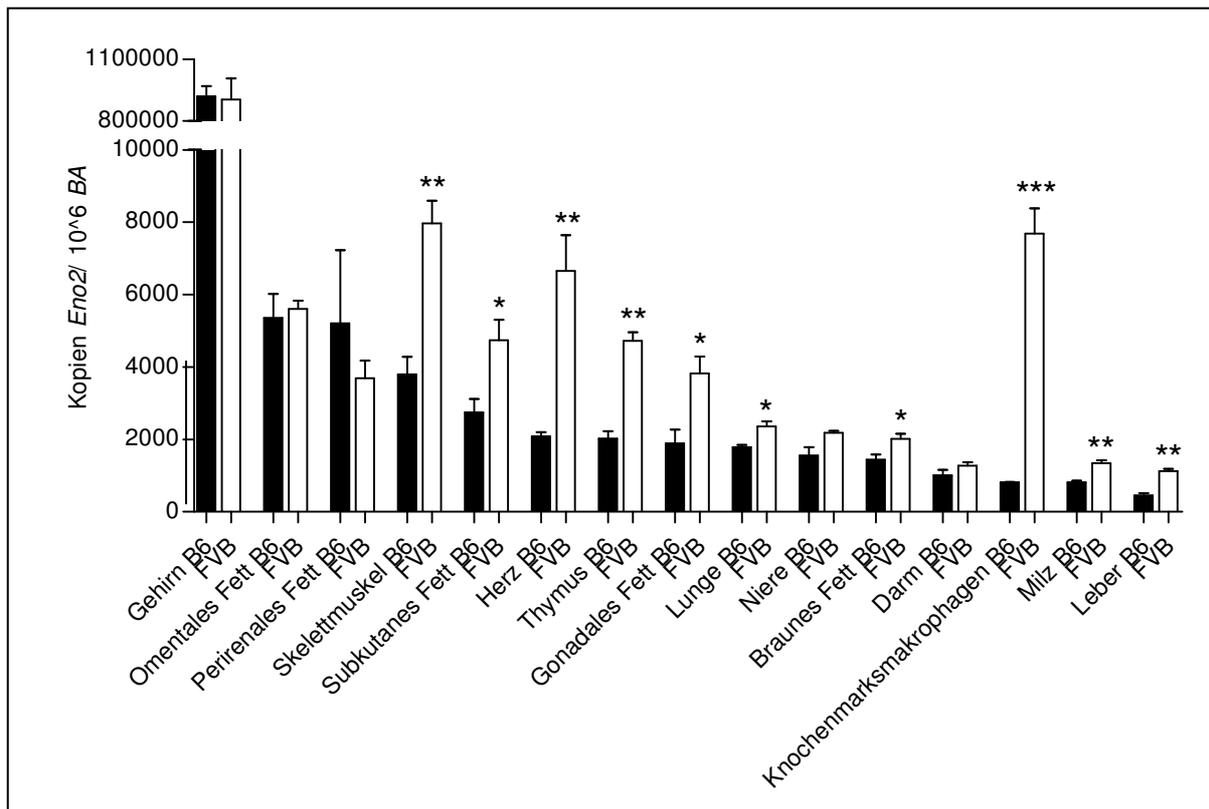


Abb.15 Eno2-Organexpression. qRT-PCR-basierte Expressionsmessungen in unterschiedlichen Geweben von B6- und FVB-Mäusen. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6.5.3 Genotypische Effekte

Die berechneten genotypischen Effekte entsprachen dem Phänotyp-Genotyp-Readout am Peakmarker des LOD-Score-Plots, während der Schwerpunkt zuvor auf der *cis*-Regulation von *Eno2* lag. Es konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass Homozygotie für das B6-Allel mit drei phänotypischen Besonderheiten assoziiert war: (1) die atherosklerotischen Läsionen an der BCA waren signifikant größer (Abb.10; Abb.16 A, C) und (2) die *Eno2*-Expressionen signifikant geringer (Abb.16 B, D), wenn man den Vergleich zum homozygoten FVB- bzw. BALB-Allel anstellte. Die Plaques hatten im Mittel eine 3,19-/ 5,75-fach größere Querschnittsoberfläche (B6/B6 vs. FVB/FVB bei d6mit10 bzw. B6/B6 vs. BALB/BALB bei d6mit216, $P < 0,001$). Die entsprechenden, auf β -Actin normierten *Eno2*-Kopienzahlen hingegen waren um 30 % (B6/B6 vs. FVB/FVB, $P < 0,001$) bzw. 26 % (B6/B6 vs. BALB/BALB, $P < 0,01$) reduziert.

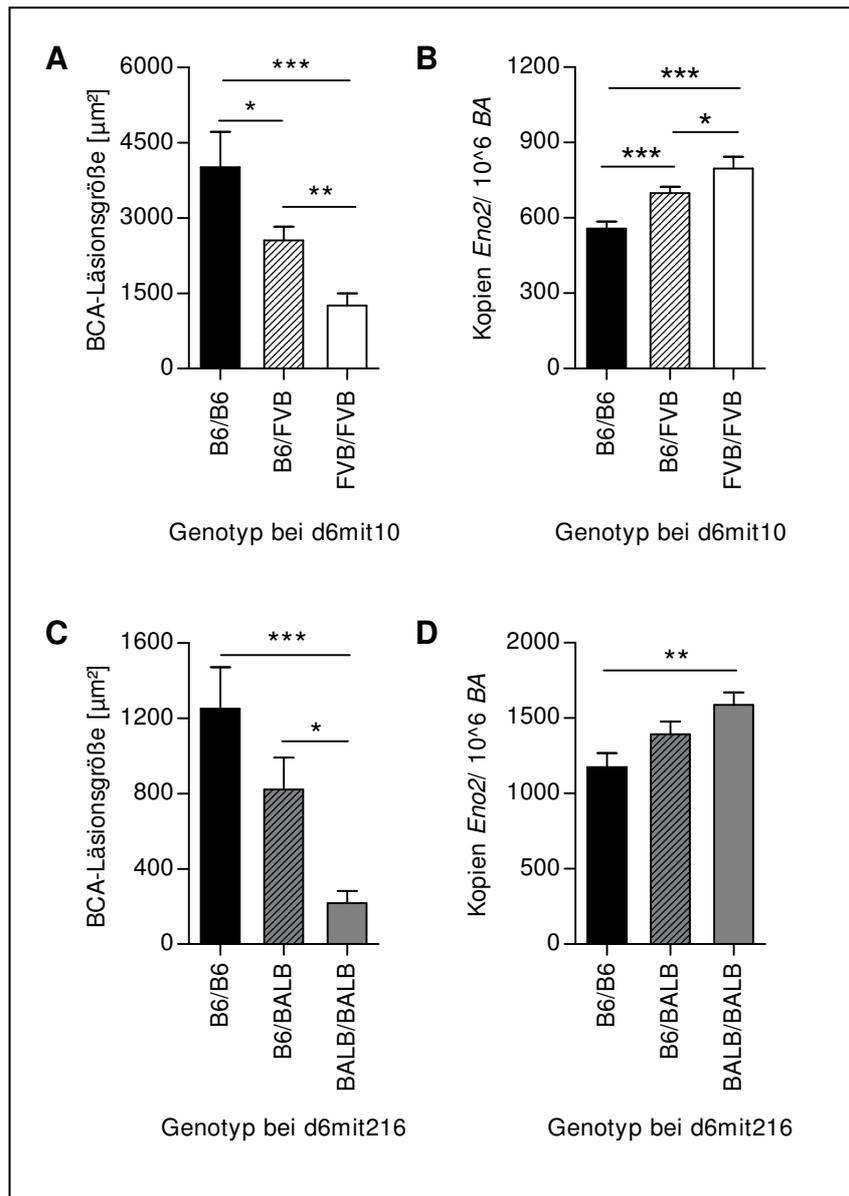


Abb.16 Genotypische Effekte. A-C, B6x FVB-Intercross, Genotyp-assoziierte BCA-Läsionsgröße und Genexpressionen am Atherosklerose-Peakmarker d6mit10 (n = 55/ 91/ 51). D-F, B6xBALB-Intercross, Genotyp-assoziierte BCA-Läsionsgröße und Genexpressionen am Atherosklerose-Peakmarker d6mit216 (n = 51/ 83/ 42). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6.5.4 cDNA- und Promotorsequenzen

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es genetische Varianten zwischen den Ausgangsmausstämmen gibt, die im Bereich der mRNA oder des Promotors des Gens liegen. Die Sequenz der *Eno2*-cDNA wurde so analysiert, wie sie auf dem UCSC Genome Browser in der Version NCBI37/mm9 (Juli 2007) hinterlegt war. Sie umfasst 2631 Basenpaare des Chromosom 6 (124710073 bis 124719527 bp) und hat einen GC-Anteil von 53,67 %. Es waren fünf SNPs beschrieben (rs50154781, rs45707309, rs50328840, rs47997580, rs45644302). Da sich der codogene Strang auf

dem Minusstrang der DNA-Doppelhelix befindet, wurde er zur besseren Übersicht in revers-komplementärer Umschrift dargestellt (rot = 5'- und 3'-untranslatierte Region; blau = codierende Region; hellblau und orange = Exon-Exon-Übergänge; grün hinterlegt = annotierte, nicht-polymorphe SNPs):

GCCGCCGCCGTCACCACCGCCACTGCCACCGCCACCGCCGCCAACGCCACCGACTGAGTCTGCAGTCCTC
GAGGAGATCCCAGCCATCATGTCTATAGAGAAGATTTGGGCCGAGAGATCTTGGACTCCCCTGGGAATCC
CACCGTGGAGGTGGATCTCTATACTGCCAAAGTCTTTTCCGGGCTGCAGTCCCAGTGGAGCCTCCACCG
GCATCTATGAGGCCCTGGAACAAAGGATGGGGACAAACAGCGTACTTAGGCAAAGGTGTCTGAAGGCA
GTGGACCACATCAACAGCAGGATTGCACCAGCCCTCATCAGCTCAGGTATCTCCGTGTGGAGCAGGAGAA
ACTGGACAACCTGATGTTGGAACCTGGATGGGACTGAGAATAAATCCAAGTTTGGGGCCAATGCCATCCTGGG
TGTGTCCCTGGCCGTGTGTAAGGCTGGGGCAGCTGAGAGGGACTTGCCCCTCTATCGCCACATTGCTCAGC
TAGCTGGGAACTCCGACCTCATCCTGCCTGTGCCGGCCTTAATGTGATCAATGGTGGCTCTCATGCTGGGA
ACAAGTTGGCCATGCAGGAGTTCATGATCCTCCAGTGGGTGCTGAGAGCTTTCGGGATGCCATGCGACTT
GGGGCAGAGGTGTACCACACCCTCAAGGGGGTCAAGGACAAGTATGGCAAGGATGCCACTAACGTGG
GGGATGAAGGCGGCTTTGCCCCCAATATCCTGGAGAACAGCGAAGCCTTGGAGCTGGTGAAGGAAGCCATC
GACAAGGCTGGCTACACGAAAAGATGGTATCGGTATGGATGTGGCTGCCTCTGAGTTTTACCGGATGG
CAAATACGACTTGGATTTCAAGTCTCCCGCTGATCCTTCCCGATACATCACTGGGGACCAGCTGGGGGCACT
CTACCAGGACTTTGTCCGGAACATCCTTGGTCTCCATTGAAGACCCATTTGACCAGGACGACTGGGCAGC
TTGGTCCAAGTTCACAGCCAACGTCGGCATCCAGATAGTGGGCGATGACCTGACGGTGACCAACCCCAAGC
GCATCGAGCGGGCAGTGGAGGAGAAGGCCTGCAACTGTTTGGTCTCAAGGTCAATCAGATCGGCTCGGTG
ACAGAAGCCATCCAAGCTGCAAGCTGGCCCAGGAGAATGGCTGGGGGGTTATGGTGAAGCCATCGCTCTG
GAGAAACGGAGGACACGTTCAATTGCTGATCTGTGTCGTCGGACTGTGTACAGGCCAGATCAAGACTGGCGCC
CCATGCAGATCTGAACGCTGTGGCGAAGTACAACCAGCTCATGAAATTGAGGAAGAGCTGGGGGACGAAGC
TCGCTTCGCGGGACATAATTTCCGAAATCCCAGTGTGCTGTGATCCCTTCCCCAACCCCGCTTGCCTGAA
CGCGGGAACATCTCATTCTCCTGGAGCCTTTTCTTGGCTGCCCTGACCTGCCATAGTCACTCTGATACCCTG
AGCCCCAAGTACCCAGAACACCTCGACTCACCGCTCCTGCTGTTCTTGGCTTCCACAACCCCCCTTGCTCT
CTCTGCTCTTCTCCTCTCTGGGCCCCATTTTTGGGGGATTGAGTCTTCCACTTTCCCTTCTATTCTCTCTT
CTCTTTAAAAAAAATTATGAAGATTAGAAGGGGTCCACAGAAGAATCCTCAGTGTCTGACAGGAGCTTCAG
GATTGGTGTGTTGGGGTGTAAAGTGGGGTACGGGCATGAGTGTTCAGTGTACCATGGTGTGTATAA
GCCTTGAACATGCATAGAAGTGGAGTTTGGGGAGTGTGGATGTGTGGTATGCTTGGTTGAGGCTTTAGT
GTATGTGTTTACATACACAAGCACAGTTTGTGTTGCTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTTATTT
ATTTATTTCTCAGCTGGTCAGTCAGCCATCTCCTGTAACCTCCAGTCTGAAAGTGACCTAAGTACAGGAC
TAGGCACCCCTATTCCATGTGGCTTCATTCCAAGATGACCCAGGATGGGGATTTTGGTGTAGCATGGGAAGGG
AACAGAAAAGGGCCTTAGCAATTGCTTCATTGCGTGCCTAACCAGGCTCGGAACCTTACAGAATGGGGCT
GTGGACCTGGGGAGGCTTTTCTCCTCTAACCCCTCTCCCCAGCCCTAGGCTCCTCCGTCTTTCTCCGGCTGCA
CCAGAGCGCTGCCTCACTCCCCTGCGCCATGTCCACAGTTGCCACCATCTCCGTGGCTTTGAAATGACCAC
CACCATTAAAGTCTGAATCACAGCGCACCACCCTTGTCTGAGGACTCTTACTCTCTGCTCCATGTGAGAGG
ACGAAGAGAAACGACTGGATATTGGCGATCCTAGGTAGCAGATCAGGGGAGGGCTCAAAAAGCGGCAAGCC
ACTGAACTCATGACCAAGTTTGCAGCATTGCTGGTGTGATGTGGGATCCGTGGGGTTTTTGTTCCTCAAGACAG
GGTTTCTACGTGTAGCCCTGGCTGTCTGGAACCTCACTCTGTAGACCAGGCTGGCTCCAAGTTTACAGAGAT
CCGCCTGCTTCTGCCTCCCGAGTGTGGGATTAAGCTTGTACCACCA

Zur Untersuchung, ob die beschriebenen SNPs Variationen zwischen B6-, FVB- und BALB-Mäusen aufwiesen, wurden mit Hilfe der *Mouse Phenome Database* (The Jackson Laboratory, Bar Harbor,

USA) die Allelsequenzen der jeweiligen Einzelbasenaustausche bestimmt und verglichen (Tab.6). Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, dass Punktmutationen in der cDNA-Sequenz maßgeblichen Einfluss darauf nehmen konnten, dass das translatierte Eno2 aufgrund eines Aminosäureaustausches (*missense mutation*) oder eines vorzeitigen Stoppcodons trunziert und somit funktionslos hätte werden können (*nonsense mutation* und anschließender *nonsense-mediated mRNA decay*).

Der Promotorbereich von *Eno2* wurde ebenfalls mit Hilfe des UCSC Genome Browser analysiert und revers-komplementär dargestellt (schwarz = nicht-codierende und intronische DNA; rot = 5'-untranslatierte Region; blau = codierende Region; grün hinterlegt = annotierte, nicht-polymorphe SNPs; gelb hinterlegt = annotierte, polymorphe SNPs; Rahmen = Primer):

```
GAGCATCCGTGTGCTTAAGGGTTGCCAGCCTGGTCTGGATCGCCCAGCCCTCCCCACCGTTCGGT
TCCCCACCACCACCGCGCTCGTACAATGCGTCTCCGCTGCAGCTCTTGACTCATCGGGGCCCGGGTCA
CATGCGCCCTCCCGGCTCTATAGGCGCCGCCCTGCCACCCCCCGCCGCGCTGGGAGCCGCAGCCAC
CGCCACTCCTGCTCTCTGCGCCGCCGCGTCAACCACCGCCACTGCCACCGCCACCGCCGCCAACGCCA
CCGACTGAGTCTGCAGTCTCGAGGTGAGGCCGTATCGGGCCGCATCCCCTTACTCGCTCCTTGCCGCT
CCTACTCCCCGTTGTCCTGGGCTTAGCGACCCGGGCGGGTGACGCTGCATACCTGACTGTCACCTGCCTTCC
CTGGCACCTCCATCTCTGGCCTTCCGGACAGCTCCCGGCTTTCTGGCTGTCACCTCCTCCTGGTTTAGGT
ACCAGCTTTCTGCATCCGCTTCTCTAACTGCACGGTCCACCCTCGCCTGCCCTCTCCCCGCGCCGGTATT
CGTCTAGGGTCTGCCGATTTGTTTCCTAAGTTCGATGTCTCCACAGGAGATGGTTGTATCCTGGCACGTC
CTTTTTTCTTTTTCGTTTTCGAAGATACCCTCTCACCTTCTTACTGCCTCAGACTTGCTCTAGACTCGTC
CTTTGGTCCCTCCTTCTTCCCTCTCTGACATTTTCTCCGATGTTTGGGGGAGGGATAGGAGGA
GTGGGAATTTGTCGGGGGTAGAAAAGCGATGGGTCTACCTCATCATTCCCCACCGTAGCCTCTAGGGAC
TGGAGGCCTGGTCCCAGGACGCTGTCCCAGACTCCTCTTCAAATGAGGAACTCGTGTGGGAGAGAGGT
GACGACCCCGGAGTGTCTTAGACCTTGTATATGGGCTGTCAAAGTTGGGGATCCACCTGCCAGACAAC
CCCTCTTTCTTGTTCGAAGATCCAAGGGAAAAAATGCCAGTCTGGCAGCCATCCCGCCTGGGGAAGTCTA
GGGAACCCACTGGTCCGTGAAGCTGCTGAGGGGCGAAGAAATCGCTGCTTGCCCTCCCTCATCACTG
CGGTGTTCTCCATCTTGTGATGAGATGACTCCGCCCTACTGCAGTGACCTCCCCTTCTCACTGCATTGA
CCTTCTCCTCTCTCCACGGGAAGGGAACCCCTTCTACAGTGCCTGATTGCAGCCCGCTCCTCCCCACC
CCCTACCCACTGCAGTAACCTCTTGGCAGCCCTCCAGCCTCTGGCCCTCCCACTGGCCTCAGGCTCCA
CCCTTCTAAGCCTTATCTTTCTCCTTCTCCACTTCCACCAAGGAGATCCAGCCATCATGTCTATAGAG
AAG
```

Auch in dessen Sequenz befanden sich annotierte SNPs, deren Datenbankenabgleich ergab, dass lediglich rs30273746 polymorph zwischen B6 und FVB sowie BALB war (Tab.6). Darauf gründete sich die Hypothese, dass dieser Basenaustausch die differentielle *Eno2*-Expression erklären könnte. Um die Richtigkeit dieser Annotation zu sichern, wurde die vollständige, genregulatorische Region sequenziert. Die endständigen Primer wurden mit Restriktionsschnittstellen versehen (Tab.2), um den gesamten Promotorbereich im weiteren Verlauf mittels Restriktionsendonukleasen spezifisch schneiden und klonieren zu können.

Um die annotierten Sequenzdaten zu validieren, wurden Alignment-Analysen durchgeführt (Abb.17). Der Sequenzausschnitt ist exemplarisch und zeigt den proximalen Abschnitt des Promotorbereiches. Es wurde der gesamte genregulatorische Bereich sequenziert und verglichen. Diese Untersuchung

zeigte zunächst die Restriktionsschnittstellen des *forward*- und *reverse*-Primers (originale Sequenz 5'-CCTGTGGGTGTGCTTTTCCACCCG-3' abgeändert zum *forward*-Primer 5'-CCTGTGGGTAAGCTTTTCCACCCG-3' mit Generierung der *HindIII*-Erkennungssequenz AAGCTT; originale Sequenz 5'-CTTCTCTATAGTCATGTTGGCTGGG-3' abgeändert zum *reverse*-Primer 5'-CTTCTCTATAGCCATGGTGGCTGGG-3' mit Generierung der *NcoI*-Erkennungssequenz CCATGG). Außerdem konnte der in der Annotationssequenz mit „X“ markierte, vorbeschriebene Polymorphismus von rs30273746 validiert werden.

	SNP	Chromosom 6-Position	mögliche Allele	B6	FVB	BALB
mRNA	rs50154781	124718323	T/C	T	T	T
mRNA	rs45707309	124717108	G/A	G	G	G
mRNA	rs50328840	124716145	C/A	C	C	C
mRNA	rs47997580	124713851	T/C	C	C	C
mRNA	rs45644302	124712695	T/C	T	T	T
Promotor	rs30273746	124719664	G/A	A	G	G
Promotor	rs52270065	124719609	T/G	T	T	T
Promotor	rs3156097	124719310	G/C	C	C	C
Promotor	rs48515478	124718730	G/A	G	G	G

Tab.6 SNPs der *Eno2*-mRNA und des *Eno2*-Promotorbereiches.

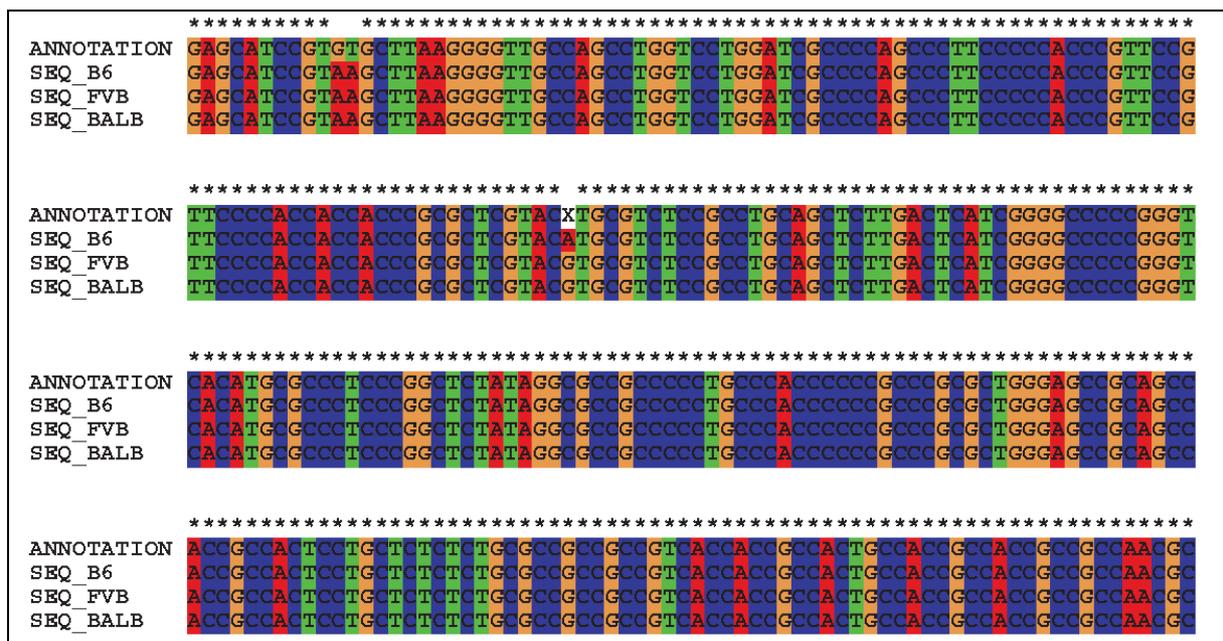


Abb.17 Alignment des *Eno2*-Promotors. Die sequenzierten Promotoren wurden gegen die auf dem Genomserver hinterlegte Sequenz (Annotation, Referenzgen) aligniert. Neben den weit proximal liegenden, mutierten Basen (Basenposition 11 und 12) fällt der Polymorphismus rs30273746 auf (X-Markierung).

6.5.5 Transkriptionsfaktorbindungsanalyse

Es konnte bis hierhin gezeigt werden, dass die B6-Variante des *Eno2*-Promotors an der Position 124719664 ein Adenin (A) und in der FVB- sowie BALB-Variante ein Guanin (G) aufwies. Ob sich daraus unterschiedliche Bindungsmuster für putative Transkriptionsfaktoren ergeben sollten, wurde mittels einer Transkriptionsfaktorbindungsanalyse aufgeklärt. Dafür wurden die entsprechenden Sequenzen durch den Suchalgorithmus ALGGEN (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3) [107] analysiert. Die Bedingungen waren eine maximale Sequenzabweichung von 10 % und eine Spezifizierung der Transkriptionsfaktoren und deren Erkennungssequenz für Eutheria. Die Analyse gab einen Hinweis auf mögliche Transkriptionsfaktorbindungsstellen, allerdings wurde diese Auswahl auf Konsensussequenzen hin untersucht (<http://motifmap.ics.uci.edu/>). Sowohl für WT1 (Wilms-Tumor-Protein), C/EBP- β (*CCAAT/ enhancer-binding protein beta*) als auch GR (Glucocorticoid-Rezeptor) konnte gezeigt werden, dass jeweils verschiedene Basenfolgen für eine Bindung und damit einhergehende genregulatorische Wirkung notwendig gewesen sind. Im Gegensatz dazu konnte die Konsensussequenz von HIF1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha) bestätigt werden (Abb.18). Die Zusammenschau aus Sequenzierung und Transkriptionsfaktorbindungsstellenanalyse ergab somit einen Hinweis darauf, dass die unterschiedliche Expression von *Eno2* durch eine Variante an einer HIF1 α -Bindungsstelle bedingt sein kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit Reporterassays mit den klonierten Promotoren aus B6, FVB und BALB durchgeführt.

6.5.6 Netzwerkanalyse differentiell exprimierter Gene

Mittels genomweiter Expressionsanalysen wurden über 1000 Gene in der Aorten- und Lebergewebe als differentiell reguliert zwischen Chromosom 6-kongenem und homozygoten FVB-Mäusen identifiziert. Durch Implementierung der jeweiligen Datensätze in die Ingenuity Pathway Analysis wurde ein komplexes Interaktionsnetzwerk erstellt. Dieses gab Aufschluss über Moleküle, Micro-RNAs, Gene und deren (1) direkte Interaktionen mit *Eno2* und (2) Zugehörigkeit zu atherogenetischen Pathomechanismen (Abb.19 A). Moleküle, die eine zentrale Rolle in der Atherogenese spielen, sind demnach STAT4 (*signal transducer and activator of transcription protein 4*), IL-6 (Interleukin 6), SIGIRR (*single immunoglobulin IL-1-related receptor*), PD98059 (MAP-Kinase-Kinase-Inhibitor), BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) und Ras (*rat sarcoma*). Der zweite Teil der Netzwerkanalysen des Datensatzes aus Aorten- und Lebergewebe (n = 1080/ 1637) war die Identifizierung der für die Atherosklerose relevanten Funktionen. Das bedeutet, dass über einen Algorithmus Gene Genclustern und Gencluster Funktionen zugeordnet und die Wahrscheinlichkeiten für eine nicht-zufällige Anreicherung in jenen Funktionen angegeben wurden (Abb.19 B). Diese Wahrscheinlichkeit liegt gemäß gängiger Auswertungen bei 1:1000, was einem negativ-dekadischen Logarithmus von 3 entspricht. Hieraus ergab sich die Basis für das Design von Funktionsassays, mit deren Hilfe die funktionelle Relevanz

von Eno2 charakterisiert und die ihm neu zuzuschreibenden Aufgaben als multifunktionelles Molekül abgeleitet werden sollten.

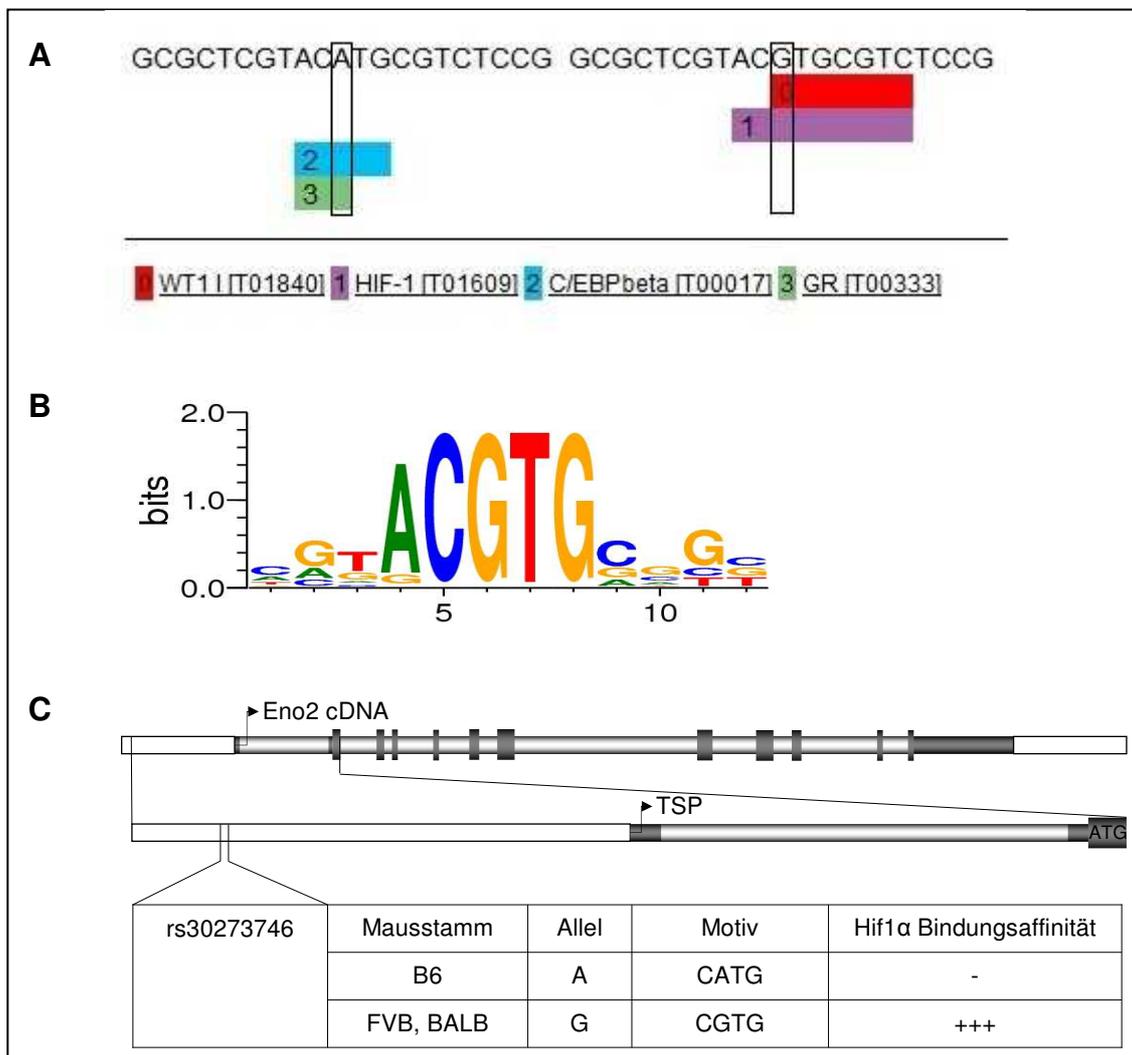


Abb.18 Analyse von Transkriptionsfaktorenbindungsstellen. **A**, Darstellung der Datenbank PROMO 3.0.2, das HIF1 α -Bindungsmotiv überspannt 9 Basen (lilafarbener Kasten), allerdings nur in der FVB- und BALB-Sequenz (rechte Sequenz). **B**, Hybridisierungsanalyse von HIF1 α mittels JASPAR-Datenbank, die das Motiv CGTG als wesentlich für die HIF1 α -Bindung herausstellt. **C**, Lagebeziehung der Promotorregion und des Transkriptionsstartpunktes (TSP) zur gesamten *Eno2*-cDNA.

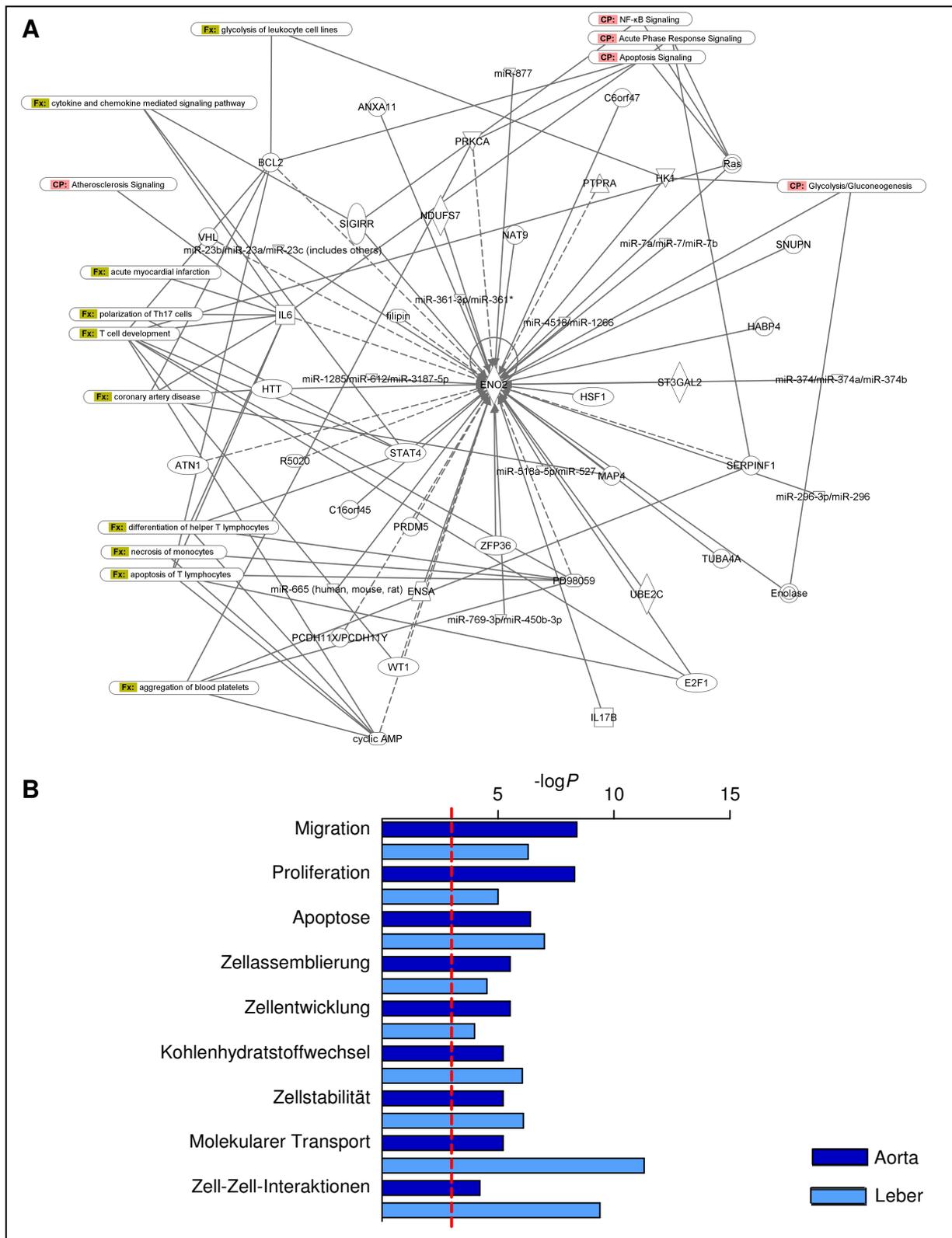


Abb.19 Datenbankenanalysen. Durch Anreicherung der Expressionsdaten konnten funktionelle Beziehungen zu *Eno2* (zentral) innerhalb von bestehenden Netzwerken herausgearbeitet werden (**A**) (Pfeile zeigen vom Regulator auf Enzyme (Raute), Komplexe (Kreisring), Transkriptionsregulatoren (Ellipse), Zytokine (Quadrat), Kinasen (Dreieck) oder andere Zielmoleküle). Eine Vielzahl der differentiell exprimierten Gene perturbiert in verschiedene Funktionsnetzwerke (**B**).

6.5.7 Funktionelle Charakterisierung von *Eno2*

Zahlreiche Mechanismen beeinflussen und prägen die Atherogenese maßgeblich. Diese Vorgänge sind bis zu einem gewissen Maß physiologisch und tragen zur Homöostase eines Gewebes bei. Geraten jedoch die Vorgänge oder sich gegenseitig beeinflussende Abläufe in Ungleichgewicht, entstehen Pathomechanismen. Am Beispiel der Apoptose lässt sich dieser schmale Grat des physiologischen Gleichgewichts gut skizzieren: während lokal stattfindende Zelluntergänge von Makrophagen und glatten Muskelzellen im Bereich einer Intimaläsion proatherogen sein können, wird diskutiert, ob in einer späteren Phase die Apoptose von Scavenger-Zellen die Plaquestabilität gewährleisten oder zumindest erhöhen können [108]. Die in Abb.19 B dargestellten, mittels Netzwerkanalysen offenbarten Funktionen wurden in Abhängigkeit der *Eno2*-Expression untersucht. Die quantitative Bestimmung der Apoptose, Proliferation und Adhäsion erfolgte sowohl in adulten Knochenmarksmakrophagen aus Chromosom 6-kongen und FVB-Mäusen als auch in mit *Eno2*-siRNA transfizierten RAW-Zellen. Außerdem wurden Hypoxie- und Reporterassays durchgeführt, um einen möglichen genregulatorischen Einfluss der *Eno2*-Promotorregion nachzuweisen. Makrophagen bildeten während ihrer normalen Reifung und ihres zu erwartenden Wachstums lange Zellfortsätze, mit denen sie am Boden der Kavität oder Flasche adhärten. Anderenfalls wiesen sie weniger stark ausgeprägte Zellausläufer auf oder kugelten sich ab.

6.5.7.1 Proliferations- und Metabolisierungsassay

Eno2 nimmt als vorletzter Schritt der Glycolyse einen wesentlichen Stellenwert in der zellulären Homöostase ein. Dieser kann sich im Ertrag an ATP und der damit verbundenen Proliferationsrate in für die Atherogenese wichtigen Zellpopulationen wie Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen niederschlagen.

In den durchgeführten Zellkulturexperimenten zeigte sich ein antiproliferativer Effekt in RAW-Makrophagen, die mit *Eno2*-siRNA transfiziert wurden (Abb.20 B), und manifestierte sich bereits nach 24-stündiger Inkubation unter Standardzellkulturbedingungen (23,83 % geringere Proliferationsrate, 706500 ± 26440 vs. 927500 ± 53440 Zellen, $P < 0,05$, $n = 4/4$). Die Zellzahl verglichen mit der Zahl ausgesäter Zellen am Zeitpunkt 0 hat sich um knapp 30 % bzw. 7,3 % reduziert. Nach 48 h zeigten die Zellen mit *Eno2*-Knockdown 37,32 % weniger (2315000 \pm 163000 vs. 3693000 \pm 202600 Zellen, $P < 0,01$) und nach 72 h 22,62 % weniger Proliferation (9750000 \pm 304300 vs. 12600000 \pm 439700 Zellen, $P < 0,01$). Untersuchungen des zu jedem Zeitpunkt (0, 24, 48, 72 h) abgenommenen Zellkulturmediums zeigten, dass sich der geringeren Vermehrung der Makrophagen mit verminderter *Eno2*-Expression entsprechend verminderte Spiegel an Lactat (nach 48 h -16,7 %, $P < 0,01$; nach 72 h -35,37 %, $P < 0,05$) sowie erhöhte Spiegel an Glucose (nach 48 h +3,93 %, P n.s.; nach 72 h +42,28 %, $P < 0,01$) im Überstand befanden (Abb.20 C, D).

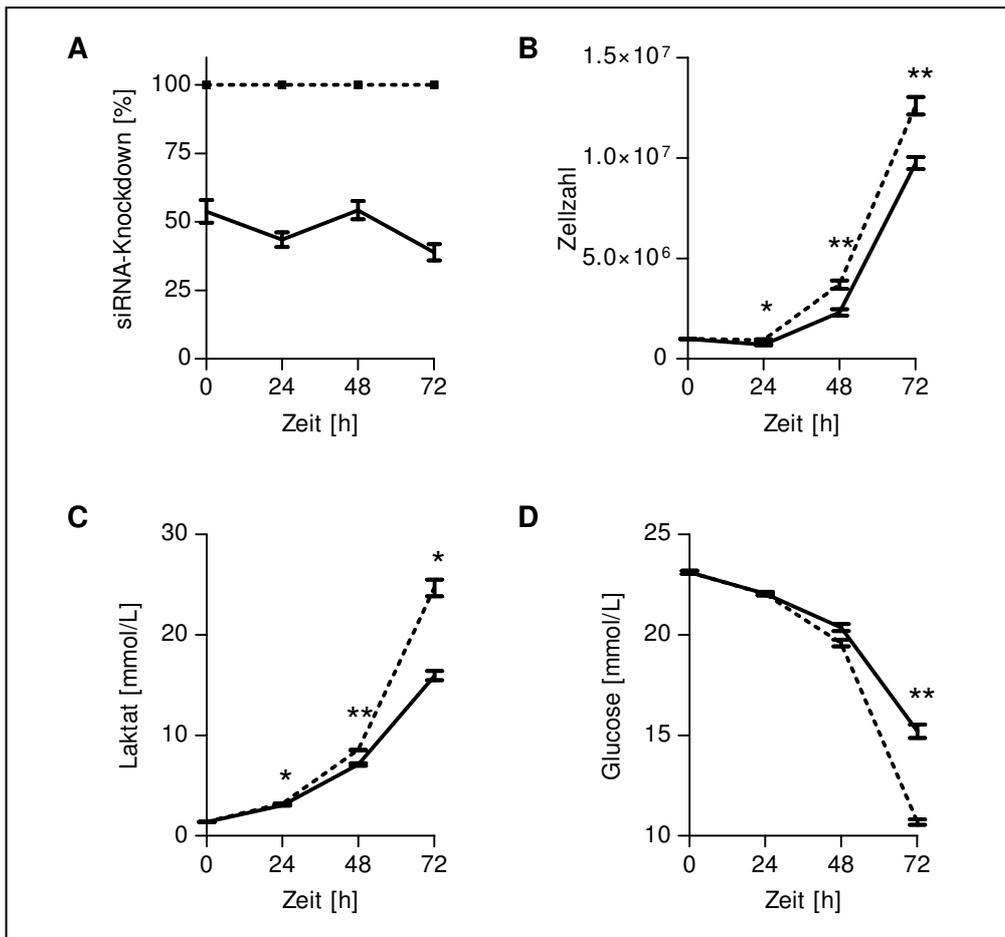


Abb.20 *Eno2*-Knockdown, Proliferations- und Metabolisierungssassay. Die Bestätigung der siRNA-vermittelten *Eno2*-Expressionsminderung erfolgte zum Zeitpunkt 0 und nach 24, 48 und 72 h (A). Zu den gleichen Zeitpunkten erfolgten außerdem eine Zellzählung (B) sowie eine Bestimmung des Laktats (C) und der Glucose (D) aus dem Zellkulturüberstand der *Eno2*-siRNA-behandelten RAW-Zellen (schwarze Linie) und Kontrollzellen (gestrichelte Linie). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

6.5.7.2 Hypoxieassay

Basierend auf der Promotorsequenzierung und Transkriptionsfaktorbindungsanalyse konnte gezeigt werden, dass ein Polymorphismus im *Eno2*-Promotor von FVB- und BALB-Mäusen eine HIF1 α -Bindungsstelle generiert. Die namensgebende Eigenschaft dieses Transkriptionsfaktors, die Hochregulierung unter hypoxischen Bedingungen, wurde anschließend untersucht. Zuerst konnte gezeigt werden, dass durch eine 24-stündige Inkubation von RAW-Makrophagen mit CoCl₂, welches imstande ist, Hypoxiebedingungen zu simulieren, tatsächlich die HIF1 α -Expression um das 3,7-fache anwächst (verglichen mit CoCl₂-freiem Zellkulturmedium, $P < 0,001$, $n = 4/4$). Einhergehend nahm die *Eno2*-Expression in RAW-Zellen, die aus einem BALB-Stamm isoliert wurden und somit ebenfalls die HIF1 α -Bindungsstelle besitzen, um das 2-fache zu ($P < 0,05$, Abb.21 A, B).

Diese Untersuchung wurde mit primären Knochenmarksmakrophagen aus Chromosom 6-kongenem und homozygoten FVB-Kontrollmäusen wiederholt, die einer 4-stündigen Inkubation mit CoCl₂

unterzogen worden (Abb.21 C, D). Dabei zeigte sich, dass die HIF1 α -Expression in beiden Zelllinien vergleichbar anstieg (1,5-facher vs. 1,3-facher Expressionsanstieg, P n.s., $n = 4/4$), hingegen der regulatorische Effekt auf den nicht-polymorphen *Eno2*-Promotor von L6F-Makrophagen ausblieb. In diesen Zellen zeigte sich eine Expressionsabnahme um 12 %, wohingegen in Kontrollzellen (FVB mit rs30273746 A->G) ein 3,6-facher *Eno2*-Expressionsanstieg gemessen wurde.

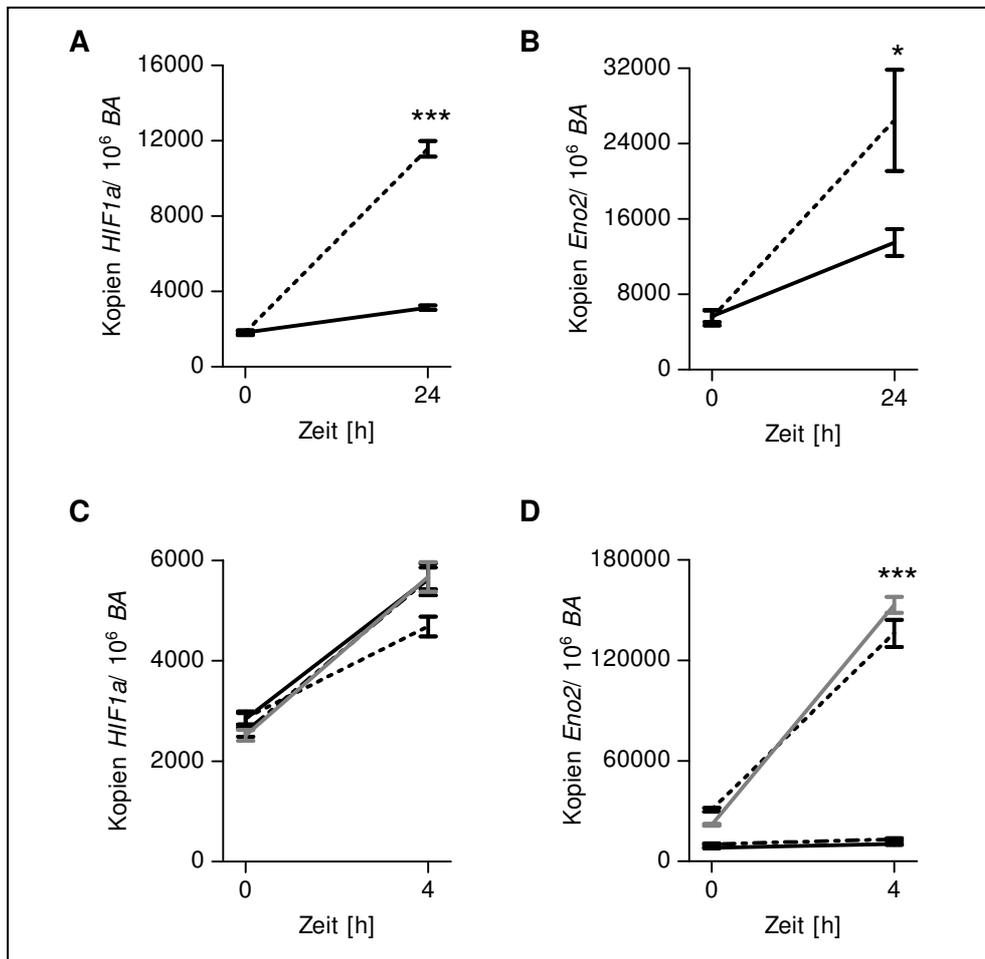


Abb.21 Hypoxieassays. Mit CoCl₂-inkubierte RAW-Zellen (gestrichelte Linie) und ohne CoCl₂-inkubierte RAW-Zellen (schwarze Linie) (A, B). Außerdem wurden Knochenmarksmakrophagen aus B6- (schwarze Linie), L6F- (Punkt-Strich-Linie), FVB- (gestrichelte Linie) und BALB-Mäusen (graue Linie) mit CoCl₂ inkubiert (C, D). * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$.

6.5.7.3 Apoptoseassay

Um standardisierte Bedingungen für vergleichende Studien zu schaffen, wurde als Apoptose-induzierendes Agens Cycloheximid verwendet und damit der programmierte Zelltod unabhängig von der Proliferationsrate als potenzielle Kovariate ausgelöst. Es wurde nachgewiesen, dass in Knochenmarksmakrophagen, die aus Chromosom 6-kongenigen Mäusen gewonnen wurden, um 17 % weniger Apoptose induziert werden konnte (Abb.22 B) als in Kontrollmakrophagen (426 ± 31 vs. 513 ± 39 , $P < 0,001$, $n = 6/6$). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in mit *Eno2*-siRNA inkubierten

RAW-Zellen (Abb.22 A). Bei ihnen war die Apoptoseinduzierbarkeit sogar um 20 % vermindert (404 ± 18 vs. 506 ± 40 , $P < 0,001$, $n = 4/4$).

6.5.7.4 Adhäsionsassay

Monozytäre Zellen nehmen im Rahmen der Atherogenese eine immunmodulatorische Rolle ein [109]. Zirkulierende Leukozyten durchlaufen die Phasen der Chemoattraktion, Adhäsion und Transmigration. Zentraler Mechanismus ist dabei die über den Zwischenschritt des sogenannten *rolling* (das Rollen über das Endothel mittels temporärer Selektinbindung) vermittelte Adhäsion [110,111]. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass RAW-Zellen, deren *Eno2*-Expression siRNA-vermittelt reduziert wurde, eine um 19 % verminderte Adhäsionsfähigkeit (6341 ± 348 vs. 7828 ± 235 Zellen, $P < 0,05$, $n = 4/4$) auf mit Kollagen überzogenen Oberflächen von Zellkulturschälchen aufweisen als die Kontroll-siRNA-transfizierten RAW-Zellen (Abb.22 C). Dieser Effekt betrug unter Benutzung unbeschichteter Oberflächen 21 % (P n.s.). Das zur Oberflächenbehandlung häufig verwendete Matrigel verringerte die Adhäsivität aller verwendeter Zellen um ein Vielfaches, sodass diese Daten nicht reproduziert und weitergehend ausgewertet wurden.

6.5.7.5 Reporterassay

Für eine Quantifizierung des Promotoreffektes auf die *Eno2*-Expression wurde ein Reporterassay unter Verwendung eines Co-Transfektionsansatzes etabliert. Die der Quantifizierung zugrunde gelegten Quotienten ergaben sich aus relativen Lumineszenzeinheiten der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase. Die Untersuchung zeigte, dass unter Hypoxie die Reporteraktivität der mit FVB- oder BALB-Promotoren transfizierten RAW-Zellen im Vergleich zur Luciferaseaktivität, die durch den B6-Promotor reguliert wurde, jeweils 1,5-fach erhöht war ($P < 0,001$). Auch die Tatsache, dass Effekte bei FVB und BALB vergleichbar waren, wies darauf hin, dass der Polymorphismus rs30273746 A->G für die Expressionsunterschiede verantwortlich sein könnte (Abb.22 D). Die Relevanz des zuvor vermuteten HIF1 α -abhängigen Regulationsmechanismus konnte auf diese Weise bestätigt werden.

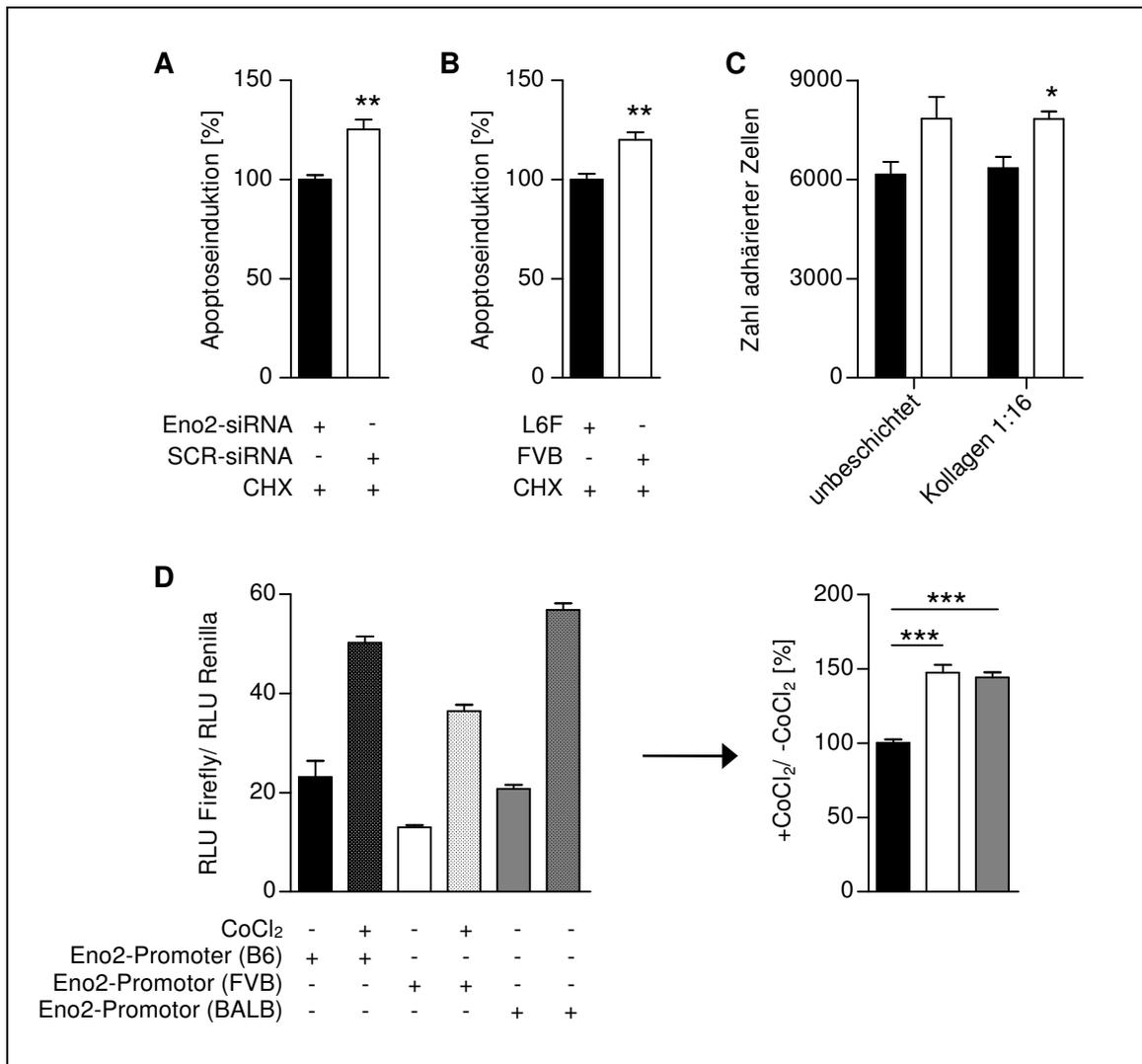


Abb.22 Apoptose-, Adhäsions- und Reporterassay. Apoptose wurde in RAW-Zellen (**A**, schwarz = *Eno2*-siRNA, weiß = SCR-siRNA) und Knochenmarksmakrophagen (**B**, schwarz = L6F, weiß = FVB) mit Cycloheximid (CHX) induziert. Die Adhäsion wurde in *Eno2*-siRNA-inkubierten RAW-Zellen (schwarz) vs. Kontrollzellen (weiß) getestet (**C**). Für den Reporterassay wurden *Eno2*-Promotoren der verschiedenen Mausstämme (schwarz = B6, weiß = FVB, grau = BALB) in RAW-Zellen transfiziert und mit CoCl₂ inkubiert, aufgetragen ist das Verhältnis der Lumineszenzen (RLU, *relative luminescence units*) von Mess- und Kontrollvektor (**D**). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

6.5.8 Immunhistochemischer Nachweis von *Eno2*

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen sollte im Folgenden die Verteilung von *Eno2* in der Gefäßwand und in mehreren Organen untersucht werden. Bei Färbungen von Aorten und BCA zeigte sich, dass die *Eno2*-exprimierenden Areale vor allem luminal gelegen waren. Diese Signalanreicherungen ließen zweierlei Beobachtungen und damit verbundene Interpretationen zu: (1) die immunhistochemischen BCA-Färbungen erlaubten eine verlässliche Zuordnung erhöhter *Eno2*-Exprimierung zum endothelialen Bereich der atherosklerotischen Läsion bzw. zu Endothelzellen (Abb.23 A, B);

(2) Eno2 wird vermehrt in makrophagenreichen Bereichen der Gefäßwand gefunden (Abb.24 A, B). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl in immunhistochemischen Eno2-Färbungen von Skelettmuskulatur (Abb.24 C) als auch Lebergewebe (Abb.24 D) Endothelzellen eine ebenso starke Anfärbung aufwiesen ähnlich dem BCA-Färbungsmuster, was die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen (Abb.15) bestätigt.

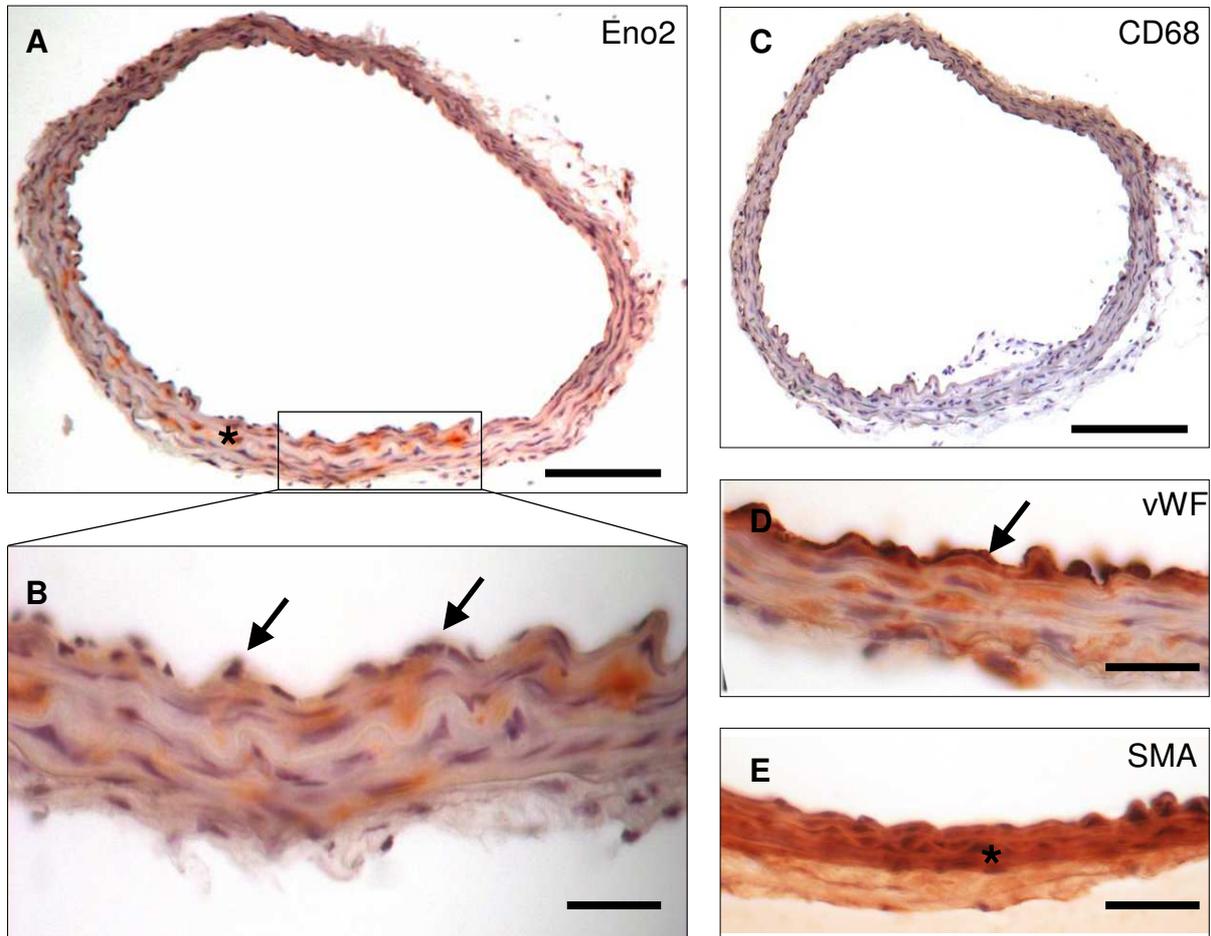


Abb.23 Immunhistochemische Färbungen in BCA in 5-facher (A, C; Balken 200 µm) und 40-facher Vergrößerung (B, D, E; Balken 20 µm). Eno2 ist rot gefärbt (A, B), weiterhin als Kontrollfärbungen CD68 (C), von Willebrand-Faktor (vWF, D) und glatte Muskelzellen (SMA, E). Glatte Muskelzellen (*), Endothelzellen (Pfeil).

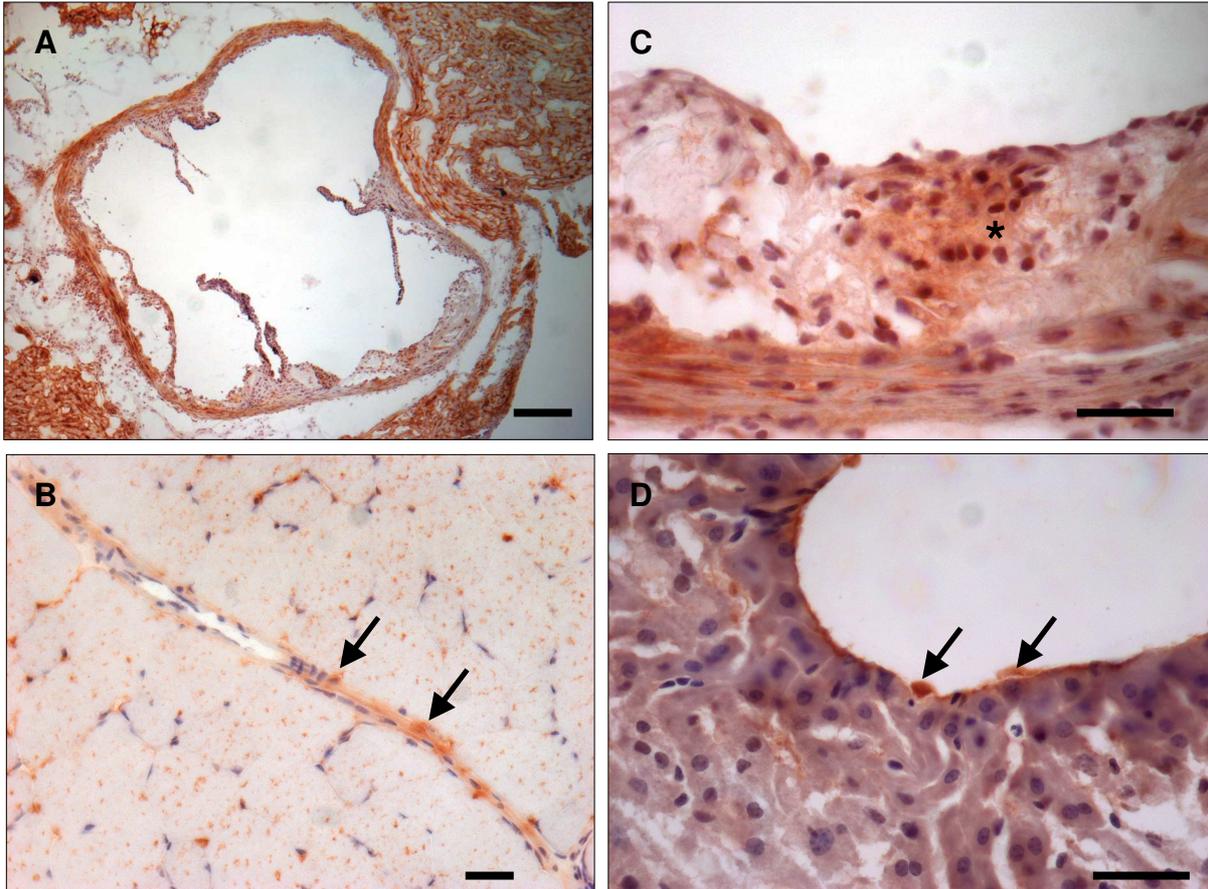


Abb.24 Weitere immunhistochemische Eno2-Färbungen in Aorten (**A, C**), Skelettmuskel (**B**) und Lebergewebe (**D**) in den Vergrößerungen 2,5-fach (**A**; Balken 200 μm), 20-fach (**B**; Balken 20 μm) und 40-fach (**C, D**; Balken 20 μm). Glatte Muskelzellen (*), Endothelzellen (Pfeil).

7. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Kopplungsanalysen atheroskleroseempfindlicher und atheroskleroseresistenter Mäuse ein Genort der Atherosklerose an der BCA auf Chromosom 6 identifiziert und *Eno2* als Kandidatengen dieses Locus funktionell aufgearbeitet. Als Besonderheit wurde der Locus in zwei unabhängig durchgeführten Kopplungsanalysen von unabhängigen Verpaarungen atheroskleroseempfindlicher C57BL/6J.*Ldlr*^{-/-} Mäuse mit atheroskleroseresistenten FVB/N.*Ldlr*^{-/-} und BALB/cByJ.*Ldlr*^{-/-} Mäusen repliziert, was die Validität dieses Befundes unterstreicht. Zur Identifizierung kausaler Gene auf dem Chromosom 6-Genort wurden mit Hilfe eines systematischen experimentellen Vorgehens zwei potentiell für die Atherosklerosedisposition relevante Gene, *C530028O21Rik* und *Eno2*, identifiziert, von denen weitergehend nur *Eno2* untersucht wurde. Die Wahl für *Eno2* ergab sich aus dem für dieses Gen bekannten Kontext seiner Funktion mit potentieller Relevanz für die Atherosklerose, während für *C530028O21Rik* bisher keine Daten vorlagen. Weitere Untersuchungen von *C530028O21Rik* sind zweifellos sinnvoll, waren aber nicht Teil der vorliegenden Arbeit. Ergebnis der vorgelegten Arbeit ist, dass eine erhöhte Expression von *Eno2* in FVB/N.*Ldlr*^{-/-} und BALB/cByJ.*Ldlr*^{-/-} Mäusen mit reduzierter Atherosklerose an der BCA im Vergleich zu C57BL/6J.*Ldlr*^{-/-} Mäusen assoziiert war. *Eno2* war ubiquitär exprimiert und in atherosklerotischen Läsionen stark in Endothelzellen und Makrophagen exprimiert. Die Expressionsunterschiede zwischen den atheroskleroseresistenten und -empfindlichen Mausstämmen waren durch einen Polymorphismus einer HIF1 α -Bindungsstelle in der Promotorregion von *Eno2* bedingt. Funktionell führte der knockdown von *Eno2* mittels siRNA jeweils zu verminderter Zellproliferation und verminderter Apoptose von Makrophagen, sowie zu einer verminderten Adhäsion dieser Zellen. Diese Effekte sind pathophysiologisch nicht mit dem erwarteten proatherogenen Effekt von *Eno2* zu vereinbaren, sodass perspektivisch weitere Experimente erforderlich sind, um dessen Rolle in der Atherogenese abschließend zu verstehen.

7.1 Atherosklerose an der BCA der Maus

Zahlreiche andere Studien im Mausmodell haben bei der Identifizierung von Mechanismen der Atherogenese ihren Fokus auf Läsionen an der Aortenwurzel gelegt. Ursachen hierfür sind zum einen, dass die murine Aortenwurzel eine Prädilektionsstelle für die Ausbildung atherosklerotischer Plaques darstellt und leicht zu sezieren ist [112]. Mechanische Stimuli nehmen Einfluss auf die Bioarchitektur und das funktionelle Zusammenspiel von Endothelzellen [113] und glatten Muskelzellen [114]. Zum anderen müssen die zu untersuchenden Gefäßabschnitte histologisch verwertbar sein, sonst besteht die Gefahr, dass eine zuverlässige Quantifizierung der Läsionsgrößen nicht möglich ist. Die Besonderheit der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass die Untersuchung der Atherosklerose an der BCA im Mittelpunkt stand.

Die Arbeitsgruppe um Rosenfeld zeigte, dass auch die BCA eine Prädilektionstelle atherosklerotischer Prozesse darstellt. Obwohl es in der Maus nicht zur Ausbildung einer fibrösen Kappe kommt, lassen

sich die Stadien eines nekrotischen Kerns, der Verlegung des Lumens und einer intraläsionalen Hämorrhagie beobachten [115]. Vermehrte Plaquerupturen und deren Komplikationen, beispielsweise distal gelegene Embolien, wurden ebenfalls an BCA von *Apoe*-defizienten Mäusen, die mit sehr fettreichen Diäten gefüttert worden sind, beobachtet [116].

Die in der vorliegenden Arbeit gleichzeitig durchgeführte Untersuchung der Atherosklerose an der BCA und der Aortenwurzel kann daher als Modell für die Atheroskleroseentwicklung in unterschiedlichen Gefäßstromgebieten dienen. Aus Untersuchungen beim Menschen sowie aus der klinischen Erfahrung gibt es Hinweise, dass die Ausprägung der Atherosklerose an unterschiedlichen anatomischen Orten der Arterien zwar eine gewisse Korrelation zeigt, sich im Einzelnen aber erheblich unterscheidet [117]. Interessant ist vor diesem Hintergrund, dass der identifizierte Chromosom 6-Locus eine besondere Relevanz für die Atherosklerose an der BCA hatte und für die Atherosklerose an der Aortenwurzel von untergeordneter Bedeutung war (auf dem Chromosom 6 betrug die maximalen LOD-Scores für die Atherosklerose an der Aortenwurzel LOD = 0,9 [B6xFVB] bzw. LOD = 1,3 [B6xBALB] und waren somit nicht suggestiv). Die Arbeitsgruppe von Lusis identifizierte ebenfalls einen Atheroskleroselocus für die BCA, allerdings befand sich dieser auf dem Chromosom 2 einer F2-Kreuzung aus C57BL/6.J.*Apoe*^{-/-} und C3H/HeJ.*Apoe*^{-/-} Mäusen [81,118].

7.2 Chromosom 6-Locus

Es ist bekannt, dass QTLs für Atherosklerose sowohl abstammungs- als auch geschlechtsabhängig sein können [59]. Die vorliegende Arbeit bestätigt diese Feststellungen. Bemerkenswert ist, dass der identifizierte Atheroskleroselocus nur in männlichen Mäusen nachgewiesen werden konnte (Abb.25). Zusätzlich stellte sich nach genotypischen Vergleichen von B6xFVB- und B6xBALB-F2-Verpaarungen heraus, dass männliche Mäuse beider *intercrosses* diesen QTL beherbergten (B6xFVB: 51 cM, LOD 4,72; B6xBALB: 69 cM, LOD 5,81), der durch einen signifikanten LOD-Score > 3,3 sichergestellt wurde. Weibliche F2-Tiere erreichten lediglich in der Verpaarung B6xFVB einen suggestiven LOD-Score > 2,9 [119].

Es wurden bereits durch mehrere Studien Chromosom 6-Loci im Kontext der Atherosklerose identifiziert. Welch et al. zeigten einen auf dem distalen Chromosom 6 gelegenen QTL für Atherosklerose-modifizierendes HDL-Cholesterin (74 cM; LOD 5,0), der sich in weiblichen F2-Tieren der Verpaarung aus B6.C-*H25*^c und BALB/cJ nachweisen ließen [120]. In einer 2003 veröffentlichten Studie konnten in einem DBA/2JxCAST/Ei-*intercross* zwei männliche Loci für HDL-Cholesterin auf dem mittleren (46 cM; LOD 4,2) bzw. distalen Chromosom 6 (71,2 cM; LOD 4,9) nachgewiesen werden [121]. Außerdem zeigte sich in einer Verpaarung *Apoe*-defizienter C57BL/6J und C3H/HeJ ein weiterer Locus für LDL-/VLDL-Cholesterin (30,4 cM; LOD 2,2) [122]. Die zuletztgenannte Studie ergab auch einen suggestiven QTL für die Atherosklerose an der Arteria carotis communis (38,5 cM; LOD 3,1). Dieser Locus wurde in weiblichen F2-Tieren eines *intercrosses* aus C57BL/6J.*Apoe*^{-/-} und BALB/cJ.*Apoe*^{-/-} repliziert (35,5 cM; LOD 2,6) [123]. Letzten Endes wären in den aufgezählten Mausverpaarungen weitere genomische Feinkartierungen erforderlich, um zu überprüfen, ob dem in dieser Arbeit vorgestellten und den in den publizierten Studien identifizierten Loci

Expressionsunterschiede derselben oder physikalisch eng gekoppelter Gene zugrunde liegen. Allerdings zeigte sich in den untersuchten F2-Kreuzungen kein suggestives oder signifikantes Signal in den Serumcholesterinen, sodass das kausale Gen und der atherogene Mechanismus unterschiedlich zu den publizierten Daten sein müssen.

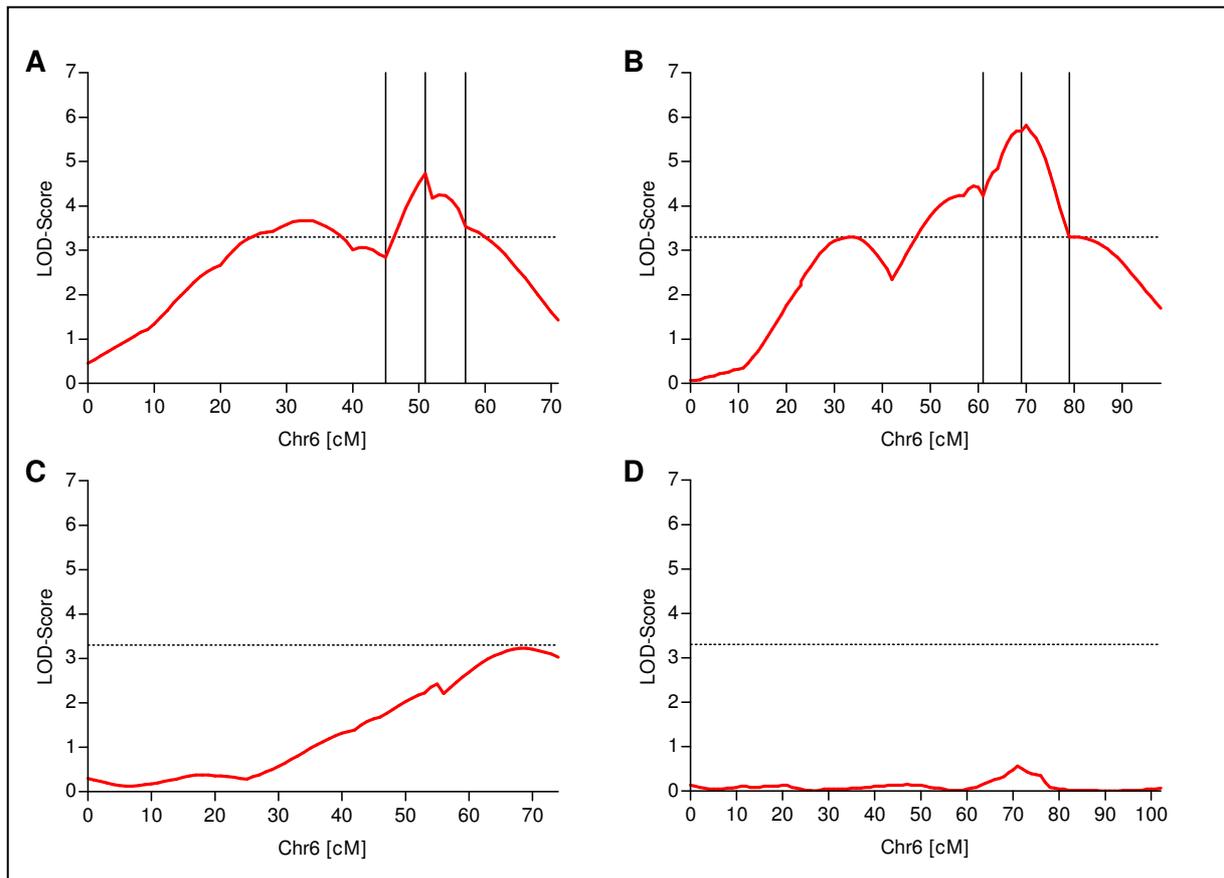


Abb.25 Geschlechts- und Abstammungsabhängigkeit des Chromosom 6-Atheroskleroselocus. Ein signifikanter LOD-Score > 3,3 (A: männliche B6xFVB, B: männliche B6xBALB) ist das notwendige Kriterium für die Bestimmung des QTL. Der LOD-Score-Plot weiblicher B6xFVB erreicht einen suggestiven LOD-Score > 2,9 (C), der weiblicher B6xBALB nicht (D).

7.3 Verminderte *Eno2*-Expression durch das B6-Allel

Es wurde mittels genomweiter Expressionsanalysen und quantitativer PCR-Analysen nachgewiesen, dass *Eno2* in B6-Allel tragenden Mäusen, seien es B6-Homozygote oder Chromosom 6-kongene Mäuse bei homozygotem FVB-Hintergrund, generell vermindert exprimiert war (Abb.14 A-C, Abb.15, Abb.16 B, D). Durch Reporteragenassays wurde weiterhin gezeigt, dass dieser verminderten Expression ein Allel-abhängiger Genregulierungsmechanismus zugrunde liegt: B6-Tiere tragen im *Eno2*-Promotorbereich eine SNP-Variante (rs30273746, Adenin), die die Bindung des Transkriptionsfaktors HIF1 α verhindert. Die Promotoren atheroskleroseresistenter Mausstämme (FVB, BALB) besitzen hingegen ein Guanin bei rs30273746 und damit ein HIF1 α -Bindungsmotif, welches eine erhöhte *Eno2*-Expression nach sich zieht (Abb.18). Dieser Mechanismus konnte in

verschiedenen *in vitro*-Studien (RAW-Zellen, primäre Knochenmarksmakrophagen) mittels CoCl₂-Inkubation, die Hypoxiebedingungen simuliert, nachgewiesen werden. Die Validität dieses Befundes wird dadurch unterstrichen, dass durch die lückenlose Sequenzierung der kompletten *Eno2*-cDNA gezeigt werden konnte, dass keine genetischen Varianten – also weder Polymorphismen noch Genmutationen – in Abhängigkeit der verschiedenen Allele existieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch in der Tumorigenese die *Eno2*-Expression von weiteren Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF1 β , HIF2 α) abhängt [124]. Eine Herunterregulierung von *Eno2* hat demnach keinen Einfluss auf das Tumorwachstum.

7.4 *Eno2*-Knockdown *in vitro* und dessen funktionelle Relevanz

Durch genomweite Expressions- und daran anschließende Netzwerkanalysen wurden Funktionsnetzwerke identifiziert, die essentielle Stellenwerte in der Atherogenese einnehmen. So konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ein *Eno2*-Knockdown zu verminderter Apoptose von Makrophagen führt. Da verminderte *Eno2*-Expressionslevel mit vermehrter Atherosklerose an der BCA assoziiert sind, ist es plausibel, dass Makrophagen nach Attraktion und Migration evolvieren und nicht in den programmierten Zelltod geschickt werden. Nach dem bekannten Modell von Inflammation und Atherogenese [12] können diese Zellen eine Vielzahl von Zytokinen ausschütten und mannigfaltige Reaktionen auslösen, wie die Stimulation weiterer Mono- und Lymphozyten durch Freisetzung proinflammatorischer Moleküle, Scavengerrezeptor-vermittelte Lipoproteinaufnahme und Produktion von Matrix-Metalloproteinasen. Sie gehen nicht in die Apoptose, sodass die proatherogene Kaskade anhält. Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass Makrophagen langsamer proliferieren, wenn die *Eno2*-Expression reduziert ist. Diese Aussage erscheint widersinnig, wenn Makrophagen uneingeschränkt proatherogen sein sollen. Allerdings geben Studien zu bedenken, dass es Subpopulationen dieses Zelltyps gibt, die gegenteilig agieren. Sie zeigen vor allem eine verminderte Expression von CD16, CX3CR1 und SR-BI [15,125–127] und könnten bei verringerter Proliferation ihren maßgeblichen Einfluss auf das Gleichgewicht der primären Läsion nicht wahrnehmen. Gleichsinnig dazu stellt sich das *in vitro*-Ergebnis dar, dass ein *Eno2*-Knockdown zu verminderter Adhäsion führt: die antiatherogenen Makrophagen erreichen ihren Zielort nicht, um die initiierte und fortschreitende Atherogenese zu beeinflussen und zu stoppen.

Publizierte Arbeiten geben Hinweise darauf, dass *Eno2* einen entscheidenden Effekt auf die Atherosklerose an der BCA ausüben kann. Es ist an der sensorischen Erkennung von Sauerstoffradikalen im Zusammenwirken mit einem Oxidoreduktasekomplex beteiligt [99]. In diesem Sinne würde sich das lokale Milieu an der Gefäßintima in Richtung Inflammation und Störung der endothelialen Homöostase mit dem Resultat einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber proatherogener Faktoren verschieben. Eine verstärkte Relevanz erhält die HIF1 α -abhängige Regulierung der *Eno2*-Expression durch die Tatsache, dass atherosklerotische Plaques Orte verminderten Sauerstoffangebots sind [128,129]. Kommt es folglich zur Hochregulierung von HIF1 α , bliebe die *Eno2*-Expression in B6-Mäusen niedrig. Reaktive Sauerstoffspezies fallen im Bereich der Läsion vermehrt an [130,131] und deren Wahrnehmung durch den Oxidoreduktasekomplex wäre bei

niedrigen *Eno2*-Leveln eingeschränkt. Letztlich bedarf dieser Pathomechanismus weiterer Erforschung, beispielsweise mit Hilfe einer *Eno2*-defizienten Maus.

7.5 Übertragung auf die Situation im Menschen

Der identifizierte QTL für Atherosklerose an der BCA befindet sich bei der Maus auf dem distalen Chromosom 6, beim Menschen ist der syntene Genomabschnitt auf die Chromosomen 3, 10 und 22 verteilt (Abb.26). In humanen GWAS konnten signifikante Loci für Atherosklerose auf entsprechenden Chromosomenabschnitten identifiziert werden. Ein Locus auf dem Chromosomenabschnitt 3q22.3 wurde in 24828 Probanden mit und ohne KHK beschrieben [132], weiterhin wurde ein KHK-Locus auf dem langen Arm des Chromosom 10 (10q11.21) mit signifikanter Assoziation zu erhöhter Intima-media-Dicke der Karotiden identifiziert [133]. Das humane Chromosom 10 ist besonders relevant für die Atheroskleroseforschung, weil kurze Zeit später auch eine Assoziation von 10q11 zur KHK nachgewiesen wurde [134]. Dieser Locus befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur humanen Variante von *Cxcl12*, einem Gen, welches in der vorliegenden Arbeit mittels genomweiter Expressionsstudien als murines Kandidatengen der Atherosklerose an der BCA in die engere Valdiation aufgenommen wurde, jedoch nicht bestätigt werden konnte.

Im Rahmen des Forschungsprojektes LIFE (Leipziger Forschungszentrum für Zivilisationserkrankungen) wurde eine Studie initiiert, bei der Patienten (n = 2274) eingeschlossen wurden, die sich mit dem Verdacht auf eine KHK einer Koronarangiographie unterzogen [135]. Als weitere Manifestation der Atherosklerose wurde bei allen Patienten ebenso die Intima-media-Dicke der Karotiden sonographisch bestimmt. In der GWAS zeigte sich, dass die *Eno2*-Expression negativ mit der durchschnittlichen Intima-media-Dicke assoziiert war ($R = -0,0638$; $P < 0,001$, Daten nicht veröffentlicht). Dieser Zusammenhang entspricht auch den in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Befunden: eine Zunahme an Atherosklerose an der BCA (welche als unmittelbares Analog zur Arteria carotis communis dextra zu sehen ist) ist mit geringerer *Eno2*-Expression assoziiert. In analoger Weise zur Aortenklappe der Maus konnte in der humanen Kohorte eine Assoziation zur KHK nicht nachgewiesen werden ($R = 0,1142$; $P = 0,66$). Diese Befunde bieten die erste Evidenz für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die humane Situation. *Eno2* könnte somit künftig ein diagnostischer Marker zur Differenzierung zwischen Atherosklerose an den Karotiden oder Koronargefäßen sein.

Zusammenfassend stellt die hier vorliegende Arbeit *Eno2* als ein vielversprechendes, *cis*-reguliertes Kandidatengen der Atherosklerose an der murinen BCA vor. Weitere Untersuchungen, beispielsweise in Knockout- oder transgenen Mäusen, werden erforderlich sein, um eine Rolle von *Eno2* in der Atherosklerose zu bestätigen.

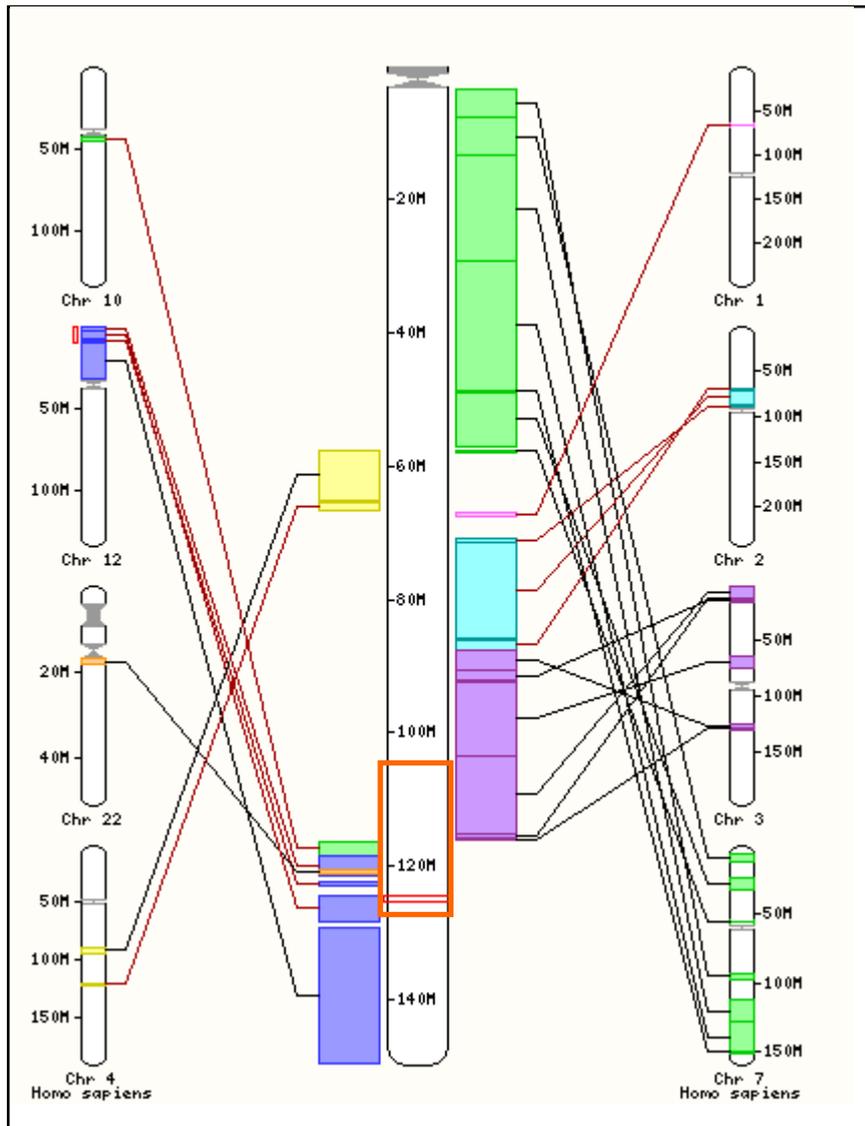


Abb.26 Syntenie zwischen Mauschromosom 6 und Mensch. Der in dieser Arbeit identifizierte Maus-QTL für die Atherosklerose an der BCA ist ebenso markiert (orangefarbener Rahmen) wie die Position von *Eno2* (schmaler roter Rahmen).

8. Literaturverzeichnis

- [1] P. Libby, Changing concepts of atherogenesis, *J. Intern. Med.* 247 (2000) 349–58.
- [2] A. Lusis, Genetics of atherosclerosis, *Trends Genet.* 28 (2012) 267–275.
- [3] C.E. Finch, Atherosclerosis is an old disease: Summary of the Ruffer Centenary Symposium, The Paleocardiology of Ancient Egypt, a meeting report of the Horus Study team, *Exp. Gerontol.* 46 (2011) 843–6.
- [4] N. Mehta, I. Khan, Cardiology's 10 greatest discoveries of the 20th century, *Texas Hear. Inst. J.* 29 (2002).
- [5] A.J. Lusis, Atherosclerosis, *Nature.* 407 (2000) 233–241.
- [6] P. Libby, P.M. Ridker, G.K. Hansson, Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis., *Nature.* 473 (2011) 317–25.
- [7] W. Aronow, C. Ahn, Prevalence of coexistence of coronary artery disease, peripheral arterial disease, and atherothrombotic brain infarction in men and women ≥ 62 years of age, *Am. J. Cardiol.* 74 (1994) 64–65.
- [8] J.P. Strong, G.T. Malcom, C.A. McMahan, R.E. Tracy, W.P. Newman III, E.E. Herderick, J.F. Cornhill, Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults, *JAMA.* 281 (1999) 727–35.
- [9] H.C. Stary, A.B. Chandler, S. Glagov, J.R. Guyton, W. Insull, M.E. Rosenfeld, S.A. Schaffer, C.J. Schwartz, W.D. Wagner, R.W. Wissler, A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association, *Circulation.* 89 (1994) 2462–78.
- [10] R. Ross, J. Glomset, Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell, *Science* (80-). 180 (1973) 1332–9.
- [11] M.J. Davies, N. Woolf, P.M. Rowles, J. Pepper, Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries, *Br. Heart J.* 60 (1988) 459–64.
- [12] P. Libby, Inflammation and Atherosclerosis, *Circulation.* 105 (2002) 1135–43.
- [13] G.K. Hansson, Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* 352 (2005) 1685–95.
- [14] E.A. Van Vre, H. Ait-Oufella, A. Tedgui, Z. Mallat, Apoptotic Cell Death and Efferocytosis in Atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 887–93.
- [15] T. Gui, A. Shimokado, Y. Sun, T. Akasaka, Y. Muragaki, Diverse Roles of Macrophages in Atherosclerosis: From Inflammatory Biology to Biomarker Discovery, *Mediators Inflamm.* (2012) 1–14.
- [16] G.P. Amorino, R.L. Hoover, Interactions of monocytic cells with human endothelial cells stimulate monocytic metalloproteinase production, *Am. J. Pathol.* 152 (1998) 199–207.
- [17] P. van den Borne, P.H.A. Quax, I.E. Hofer, G. Pasterkamp, The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease, *Biomed Res. Int.* (2014) 1–11.
- [18] D.P. Mason, R.D. Kenagy, D. Hasenstab, D.F. Bowen-Pope, R.A. Seifert, S. Coats, S.M. Hawkins, A.W. Clowes, Matrix Metalloproteinase-9 Overexpression Enhances Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Alters Remodeling in the Injured Rat Carotid Artery, *Circ. Res.* 85 (1999) 1179–85.
- [19] R. Ross, The Pathogenesis of Atherosclerosis - An Update, *N. Engl. J. Med.* 314 (1986) 488–500.
- [20] S.K. Sedimbi, T. Hägglöf, M.C.I. Karlsson, IL-18 in inflammatory and autoimmune disease, *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (2013) 4795–808.

- [21] K. Croce, P. Libby, Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis, *Curr. Opin. Hematol.* 14 (2007) 55–61.
- [22] E. Nabel, E. Braunwald, A tale of coronary artery disease and myocardial infarction, *N. Engl. J. Med.* (2012) 54–63.
- [23] E.P. Amento, N. Ehsani, H. Palmer, P. Libby, Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 11 (1991) 1223–30.
- [24] D.M. Lloyd-Jones, Y. Hong, D. Labarthe, D. Mozaffarian, L.J. Appel, L. Van Horn, K. Greenlund, S. Daniels, G. Nichol, G.F. Tomaselli, D.K. Arnett, G.C. Fonarow, P.M. Ho, M.S. Lauer, F.A. Masoudi, R.M. Robertson, V. Roger, L.H. Schwamm, P. Sorlie, et al., Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond, *Circulation.* 121 (2010) 586–613.
- [25] S.M. Grundy, J.I. Cleeman, C.N.B. Merz, H.B. Brewer, L.T. Clark, D.B. Hunninghake, R.C. Pasternak, S.C. Smith, N.J. Stone, Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines, *Circulation.* 110 (2004) 227–39.
- [26] G. Montalescot, U. Sechtem, S. Achenbach, F. Andreotti, C. Arden, A. Budaj, R. Bugiardini, F. Crea, T. Cuisset, C. Di Mario, J.R. Ferreira, B.J. Gersh, A.K. Gitt, J.-S. Hulot, N. Marx, L.H. Opie, M. Pfisterer, E. Prescott, F. Ruschitzka, et al., 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology, *Eur. Heart J.* 34 (2013) 2949–3003.
- [27] T. Gordon, W.B. Kannel, Predisposition to Atherosclerosis in the Head, Heart, and Legs, *JAMA.* 221 (1972) 661–6.
- [28] L. Murchison, T. Fyfe, Effects of cigarette smoking on serum-lipids, blood-glucose, and platelet adhesiveness, *Lancet.* (1966) 182–184.
- [29] M. Criqui, Epidemiology of atherosclerosis: an updated overview, *Am. J. Cardiol.* 57 (1986) 18C–23C.
- [30] D. Lloyd-Jones, R. Adams, M. Carnethon, G. De Simone, T.B. Ferguson, K. Flegal, E. Ford, K. Furie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, S. Hailpern, M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lackland, L. Lisabeth, A. Marelli, et al., Heart disease and stroke statistics - 2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, *Circulation.* 119 (2009) e21–e181.
- [31] M. Ruiz-Canela, R. Estruch, D. Corella, J. Salas-Salvadó, M.A. Martínez-González, Association of Mediterranean diet with peripheral artery disease: the PREDIMED randomized trial, *JAMA.* 311 (2014) 415–7.
- [32] H. Gardener, C.B. Wright, D. Cabral, N. Scarmeas, Y. Gu, K. Cheung, M.S. Elkind, R.L. Sacco, T. Rundek, Mediterranean diet and carotid atherosclerosis in the Northern Manhattan Study, *Atherosclerosis.* 234 (2014) 303–310.
- [33] J.H. Wuest, T.J. Dry, J.E. Edwards, The Degree of Coronary Atherosclerosis in Bilaterally Oophorectomized Women, *Circulation.* 7 (1953) 801–809.
- [34] R. Pick, J. Stamler, S. Rodbard, L.N. Katz, Effects of Testosterone and Castration on Cholesteremia and Atherogenesis in Chicks on High Fat, High Cholesterol Diets, *Circ. Res.* 7 (1959) 202–204.
- [35] C. Wilkinson, Essential familial hypercholesterolemia: cutaneous, metabolic and hereditary aspects, *Bull. N. Y. Acad. Med.* 26 (1950) 670–85.
- [36] M. Cuchel, E. Bruckert, H.N. Ginsberg, F.J. Raal, R.D. Santos, R.A. Hegele, J.A. Kuivenhoven, B.G. Nordestgaard, O.S. Descamps, E. Steinhagen-Thiessen, A. Tybjaerg-Hansen, G.F. Watts, M. Averna, C. Boileau, J. Borén, A.L. Catapano, J.C. Defesche, G.K. Hovingh, S.E. Humphries,

- et al., Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society, *Eur. Heart J.* 35 (2014) 2146–57.
- [37] S. Zdravkovic, A. Wienke, N.L. Pedersen, M.E. Marenberg, I. Yashin, U. De Faire, Heritability of death from coronary heart disease: a 36-year follow-up of 20966 Swedish twins, *J. Intern. Med.* 252 (2002) 247–54.
- [38] M. Marenberg, N. Risch, L. Berkman, B. Floderus, U. de Faire, Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins, *N. Engl. J. Med.* 330 (1994) 1041–6.
- [39] C.S. Fox, J.F. Polak, I. Chazaro, A. Cupples, P.A. Wolf, R.A. D’Agostino, C.J. O’Donnell, Genetic and Environmental Contributions to Atherosclerosis Phenotypes in Men and Women: Heritability of Carotid Intima-Media Thickness in the Framingham Heart Study, *Stroke.* 34 (2003) 397–401.
- [40] M. Fitzgerald, Z. Mujawar, N. Tamehiro, ABC transporters, atherosclerosis and inflammation, *Atherosclerosis.* 211 (2010) 361–370.
- [41] M.A. Austin, C.M. Hutter, R.L. Zimmern, S.E. Humphries, Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review, *Am. J. Epidemiol.* 160 (2004) 421–9.
- [42] P.W.F. Wilson, E.J. Schaefer, M.G. Larson, J.M. Ordovas, Apolipoprotein E Alleles and Risk of Coronary Disease: A Meta-analysis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16 (1996) 1250–5.
- [43] J. Davignon, R.E. Gregg, C.F. Sing, Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 8 (1988) 1–21.
- [44] J. Wang, J.R. Burnett, S. Near, K. Young, B. Zinman, a. J.G. Hanley, P.W. Connelly, S.B. Harris, R.A. Hegele, Common and Rare ABCA1 Variants Affecting Plasma HDL Cholesterol, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 1983–9.
- [45] S. Mott, L. Yu, M. Marcil, B. Boucher, C. Rondeau, J. Genest, Decreased cellular cholesterol efflux is a common cause of familial hypoalphalipoproteinemia: role of the ABCA1 gene mutations, *Atherosclerosis.* 152 (2000) 457–68.
- [46] L.M. Holdt, D. Teupser, From genotype to phenotype in human atherosclerosis - recent findings, *Curr. Opin. Lipidol.* 24 (2013) 410–8.
- [47] The Wellcome Trust Case Control Consortium, Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls., *Nature.* 447 (2007) 661–78.
- [48] L.M. Holdt, S. Hoffmann, K. Sass, D. Langenberger, M. Scholz, K. Krohn, K. Finstermeier, A. Stahringer, W. Wilfert, F. Beutner, S. Gielen, G. Schuler, G. Gäbel, H. Bergert, I. Bechmann, P.F. Stadler, J. Thiery, D. Teupser, Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks, *PLoS Genet.* 9 (2013) e1003588.
- [49] The Coronary Artery Disease (C4D) Genetics Consortium, A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease, *Nat. Genet.* 43 (2011) 339–44.
- [50] H. Schunkert, I.R. König, S. Kathiresan, M.P. Reilly, T.L. Assimes, H. Holm, M. Preuss, A.F.R. Stewart, M. Barbalic, C. Gieger, D. Absher, Z. Aherrahrou, H. Allayee, D. Altshuler, S.S. Anand, K. Andersen, J.L. Anderson, D. Ardissino, S.G. Ball, et al., Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease, *Nat. Genet.* 43 (2011) 333–8.
- [51] The CARDIoGRAMplusC4D Consortium, Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease, *Nat. Genet.* 45 (2013) 25–33.
- [52] J.W. Knowles, N. Maeda, Genetic Modifiers of Atherosclerosis in Mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 2336–2345.

- [53] A.S. Plump, J.D. Smith, T. Hayek, K. Aalto-Setälä, A. Walsh, J.G. Verstuyft, E.M. Rubin, J.L. Breslow, Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells, *Cell*. 71 (1992) 343–53.
- [54] S. Ishibashi, M.S. Brown, J.L. Goldstein, R.D. Gerard, R.E. Hammer, J. Herz, Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery, *J. Clin. Invest.* 92 (1993) 883–93.
- [55] W. Palinski, R.K. Tangirala, E. Miller, S.G. Young, J.L. Witztum, Increased Autoantibody Titers Against Epitopes of Oxidized LDL in LDL Receptor-Deficient Mice With Increased Atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15 (1995) 1569–1576.
- [56] D. Teupser, A.D. Persky, J.L. Breslow, 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.* 23 (2003) 1907–13.
- [57] D. Teupser, S. Pavlides, M. Tan, J.-C. Gutierrez-Ramos, R. Kolbeck, J.L. Breslow, 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 (2004) 17795–800.
- [58] C.L. Welch, S. Bretschger, N. Latib, M. Bezouevski, Y. Guo, N. Pleskac, C.P. Liang, C. Barlow, H. Dansky, J.L. Breslow, A.R. Tall, Localization of atherosclerosis susceptibility loci to chromosomes 4 and 6 using the Ldlr knockout mouse model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 7946–51.
- [59] D. Teupser, M. Tan, A.D. Persky, J.L. Breslow, 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.* 103 (2006) 123–8.
- [60] S. Wolfrum, J.M. Rodríguez, M. Tan, K.Y. Chen, D. Teupser, J.L. Breslow, The mouse atherosclerosis locus at chromosome 10 (Ath11) acts early in lesion formation with subcongenic strains delineating 2 narrowed regions, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 1583–90.
- [61] E. Thorp, G. Li, T.A. Seimon, G. Kuriakose, D. Ron, I. Tabas, Reduced Apoptosis and Plaque Necrosis in Advanced Atherosclerotic Lesions of Apoe-/- and Ldlr-/- Mice Lacking CHOP, *Cell Metab.* 9 (2009) 474–81.
- [62] M. Mehrabian, J. Wong, X. Wang, Z. Jiang, W. Shi, A.M. Fogelman, a. J. Lusis, Genetic Locus in Mice That Blocks Development of Atherosclerosis Despite Extreme Hyperlipidemia, *Circ. Res.* 89 (2001) 125–30.
- [63] K.A. Frazer, L. Elnitski, D.M. Church, I. Dubchak, R.C. Hardison, Cross-species sequence comparisons: a review of methods and available resources, *Genome Res.* 13 (2003) 1–12.
- [64] W.H. Li, M. Gouy, P.M. Sharp, C. O’Hugin, Y.W. Yang, Molecular phylogeny of Rodentia, Lagomorpha, Primates, Artiodactyla, and Carnivora and molecular clocks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 6703–7.
- [65] R.H. Waterston, K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J.F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S.E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, et al., Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature*. 420 (2002) 520–62.
- [66] L. Kruglyak, D.A. Nickerson, Variation is the spice of life, *Nat. Genet.* 27 (2001) 234–6.
- [67] N. Patil, A.J. Berno, D.A. Hinds, W.A. Barrett, J.M. Doshi, C.R. Hacker, C.R. Kautzer, D.H. Lee, C. Marjoribanks, D.P. McDonough, B.T. Nguyen, M.C. Norris, J.B. Sheehan, N. Shen, D. Stern, R.P. Stokowski, D.J. Thomas, M.O. Trulson, K.R. Vyas, et al., Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21, *Science*. 294 (2001) 1719–23.

- [68] J. Piedrahita, S.H. Zhang, J.R. Hagaman, P.M. Oliver, N. Maeda, Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 4471–5.
- [69] K. Wouters, R. Shiri-Sverdlov, P.J. van Gorp, M. van Bilsen, M.H. Hofker, Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice, *Clin. Chem. Lab. Med.* 43 (2005) 470–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899668> (accessed February 19, 2016).
- [70] Z. Dong, S. Chapman, A. Brown, P. Frenette, R. Hynes, D. Wagner, The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 145–52.
- [71] R.G. Collins, R. Velji, N. V Guevara, M.J. Hicks, L. Chan, A.L. Beaudet, P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 189–94.
- [72] G.K. Sukhova, Y. Zhang, J. Pan, Y. Wada, T. Yamamoto, M. Naito, T. Kodama, S. Tsimikas, J.L. Witztum, M.L. Lu, Y. Sakara, M.T. Chin, P. Libby, G. Shi, Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 897–906.
- [73] R. Ohashi, H. Mu, Q. Yao, C. Chen, Cellular and Molecular Mechanisms of Atherosclerosis with Mouse Models, *Trends Cardiovasc. Med.* 14 (2004) 187–190.
- [74] B. Paigen, A. Morrow, C. Brandon, P. Holmes, D. Mitchell, Variation in Susceptibility to Atherosclerosis Among Inbred Strains of Mice, *Atherosclerosis.* 57 (1985) 65–73.
- [75] B. Paigen, D. Mitchell, K. Reue, A. Morrow, A.J. Lusis, R.C. LeBoeuf, Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 3763–7.
- [76] B. Paigen, M. Nesbitt, D. Mitchell, Ath-2, a second gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice, *Genetics.* 122 (1989) 163–168.
- [77] T. Mackay, Quantitative trait loci in *Drosophila*, *Nat. Rev. Genet.* 2 (2001) 11–20.
- [78] H.M. Dansky, P. Shu, M. Donavan, J. Montagno, D.L. Nagle, J.S. Smutko, N. Roy, S. Whiteing, J. Barrios, T.J. McBride, J.D. Smith, G. Duyk, J.L. Breslow, K.J. Moore, A phenotype-sensitizing Apoe-deficient genetic background reveals novel atherosclerosis predisposition loci in the mouse, *Genetics.* 160 (2002) 1599–608.
- [79] S.B. Seidemann, C. De Luca, R.L. Leibel, J.L. Breslow, A.R. Tall, C.L. Welch, Quantitative trait locus mapping of genetic modifiers of metabolic syndrome and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice: identification of a locus for metabolic syndrome and increased atherosclerosis on chromosome 4, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 204–10.
- [80] R. Burkhardt, S. Sündermann, D. Ludwig, U. Ceglarek, L.M. Holdt, J. Thiery, D. Teupser, 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-/- mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 775–84.
- [81] B.J. Bennett, S.S. Wang, X. Wang, X. Wu, A.J. Lusis, Genetic regulation of atherosclerotic plaque size and morphology in the innominate artery of hyperlipidemic mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 348–55.
- [82] E. Wakeland, L. Morel, K. Achey, M. Yui, J. Longmate, Speed congenics: a classic technique in the fast lane (relatively speaking), *Immunol. Today.* 18 (1997) 472–7.
- [83] P. Markel, P. Shu, C. Ebeling, G. Carlson, Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains, *Nat. Genet.* 17 (1997) 280–4.
- [84] H. El Housni, P. Heimann, J. Parma, G. Vassart, Single-nucleotide polymorphism genotyping by melting analysis of dual-labeled probes: examples using factor V Leiden and prothrombin 20210A mutations., *Clin. Chem.* 49 (2003) 1669–72.

- [85] E. Schütz, N. von Ahsen, Influencing factors of dsDNA dye (high-resolution) melting curves and improved genotype call based on thermodynamic considerations, *Anal. Biochem.* 385 (2009) 143–52.
- [86] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, Clustal W and Clustal X version 2.0., *Bioinformatics.* 23 (2007) 2947–8.
- [87] R.H.A. Plasterk, RNA silencing: the genome's immune system, *Science.* 296 (2002) 1263–5.
- [88] N. Cosby, M. Scurria, W. Daily, T. Ugo, Custom Enzyme Substrates for Luciferase-based Assays, *Cell Notes.* (2007) 9–11.
- [89] X. Messeguer, R. Escudero, D. Farré, O. Núñez, J. Martínez, M.M. Albà, PROMO: detection of unknown transcription regulatory elements using species-tailored searches, *Bioinformatics.* 18 (2002) 333–334.
- [90] A. Sandelin, W. Alkema, P. Engström, W.W. Wasserman, B. Lenhard, JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) D91–4.
- [91] S. Thomas, D. Bonchev, A survey of current software for network analysis in molecular biology, *Hum. Genomics.* 4 (2010) 353–60.
- [92] M. Raponi, R.T. Belly, J.E. Karp, J.E. Lancet, D. Atkins, Y. Wang, Microarray analysis reveals genetic pathways modulated by tipifarnib in acute myeloid leukemia., *BMC Cancer.* 4 (2004) 56.
- [93] N.E. Morton, Sequential tests for the detection of linkage, *Am. J. Hum. Genet.* 7 (1955) 277–318.
- [94] N.E. Morton, LODs past and present, *Genetics.* 140 (1995) 7–12.
- [95] E.S. Lander, N.J. Schork, Genetic dissection of complex traits, *Science.* 265 (1994) 2037–48.
- [96] K.F. Manly, R.H. Cudmore, J.M. Meer, Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping, *Mamm. Genome.* 12 (2014) 930–2.
- [97] S.A. Johnstone, D.M. Waisman, J.B. Rattner, Enolase is present at the centrosome of HeLa cells, *Exp. Cell Res.* 202 (1992) 458–63.
- [98] C. Bulliard, R. Zurbriggen, J. Tornare, M. Faty, Z. Dastoor, J. Dreyer, Purification of a dichlorophenol-indophenol oxidoreductase from rat and bovine synaptic membranes: tight complex association of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform, TOAD64, enolase-gamma and aldolase C, *Biochem. J.* 324 (1997) 555–63.
- [99] Y. Yamamoto, K. Takase, J. Kishino, M. Fujita, N. Okamura, T. Sakaeda, M. Fujimoto, T. Yagami, Proteomic identification of protein targets for 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 in neuronal plasma membrane, *PLoS One.* 6 (2011) e17552.
- [100] D. Carney, D. Ihde, M. Cohen, Serum neuron-specific enolase: a marker for disease extent and response to therapy of small-cell lung cancer, *Lancet.* (1982) 583–5.
- [101] L.G. Jørgensen, K. Osterlind, H.H. Hansen, E.H. Cooper, Serum neuron-specific enolase (S-NSE) in progressive small-cell lung cancer (SCLC), *Br. J. Cancer.* 70 (1994) 759–61.
- [102] A. Di Cataldo, D. Dau, M. Conte, S. Parodi, B. De Bernardi, M. Giuliano, A. Pession, E. Viscardi, R. Luksch, A. Castellano, G. Bertuna, R. Haupt, Diagnostic and prognostic markers in infants with disseminated neuroblastoma: A retrospective analysis from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma, *Med. Sci. Monit.* 15 (2009) MT11–8.
- [103] J.-L. Kang, E. Rajpert-de Meyts, N.E. Skakkebaek, Immunoreactive Neuron-specific Enolase (NSE) is Expressed in Testicular Carcinoma-in-situ, *J. Pathol.* 178 (1996) 161–5.
- [104] D. Brea, T. Sobrino, M. Blanco, I. Cristobo, R. Rodríguez-González, M. Rodríguez-Yañez, O. Moldes, J. Agulla, R. Leira, J. Castillo, Temporal profile and clinical significance of serum

- neuron-specific enolase and S100 in ischemic and hemorrhagic stroke, *Clin. Chem. Lab. Med.* 47 (2009) 1513–8.
- [105] S. González-García, A. González-Quevedo, O. Fernández-Concepción, M. Peña-Sánchez, C. Menéndez-Saínez, Z. Hernández-Díaz, M. Arteché-Prior, A. Pando-Cabrera, C. Fernández-Navales, Short-term prognostic value of serum neuron specific enolase and S100B in acute stroke patients, *Clin. Biochem.* 45 (2012) 1302–7.
- [106] M. Gelderblom, T. Daehn, B. Schattling, P. Ludewig, C. Bernreuther, P. Arunachalam, J. Matschke, M. Glatzel, C. Gerloff, M.A. Friese, T. Magnus, Plasma levels of neuron specific enolase quantify the extent of neuronal injury in murine models of ischemic stroke and multiple sclerosis, *Neurobiol. Dis.* 59 (2013) 177–82.
- [107] D. Farré, R. Roset, M. Huerta, J.E. Adsuara, L. Roselló, M.M. Albá, X. Messeguer, Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3651–3.
- [108] M.M. Kockx, A.G. Herman, Apoptosis in atherosclerosis: Beneficial or detrimental?, *Cardiovasc. Res.* 45 (2000) 736–46.
- [109] I. Joris, T. Zand, J.J. Nunnari, F.J. Krolkowski, G. Majno, Studies on the Pathogenesis of Atherosclerosis - I. Adhesion and Emigration of Mononuclear Cells in the Aorta of Hypercholesterolemic Rats, *Am. J. Pathol.* (1983) 341–58.
- [110] D.J. Lefer, D.N. Granger, Monocyte Rolling in Early Atherogenesis: Vital Role in Lesion Development, *Circ. Res.* 84 (1999) 1353–5.
- [111] Y. Huo, A. Hafezi-Moghadam, K. Ley, Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Fibronectin Connecting Segment-1 in Monocyte Rolling and Adhesion on Early Atherosclerotic Lesions, *Circ. Res.* 87 (2000) 153–159.
- [112] J. Chiu, S. Chien, Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives, *Physiol. Rev.* 91 (2011) 327–87.
- [113] G. Riha, P. Lin, A. Lumsden, Q. Yao, C. Chen, Roles of Hemodynamic Forces in Vascular Cell Differentiation, *Ann. Biomed. Eng.* 33 (2005) 772–9.
- [114] J.H. Haga, Y.-S.J. Li, S. Chien, Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells, *J. Biomech.* 40 (2007) 947–60.
- [115] M.E. Rosenfeld, P. Polinsky, R. Virmani, K. Kauser, G. Rubanyi, S.M. Schwartz, Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20 (2000) 2587–92.
- [116] M.E. Rosenfeld, K.G.S. Carson, J.L. Johnson, H. Williams, C.L. Jackson, S.M. Schwartz, Animal models of spontaneous plaque rupture: the holy grail of experimental atherosclerosis research, *Curr. Atheroscler. Rep.* 4 (2002) 238–42.
- [117] S. Dalager, W.P. Paaske, I.B. Kristensen, J.M. Laurberg, E. Falk, Artery-Related Differences in Atherosclerosis Expression Implications for Atherogenesis and Dynamics in Intima-Media Thickness, *Stroke.* 38 (2007) 2698–706.
- [118] J. Albright, P.M. Quizon, A.J. Lusic, B.J. Bennett, Genetic network identifies novel pathways contributing to atherosclerosis susceptibility in the innominate artery, *BMC Med. Genomics.* 7 (2014) 1–15.
- [119] E.S. Lander, L. Kruglyak, Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results, *Nat. Genet.* 11 (1995) 241–7.
- [120] C.L. Welch, S. Bretschger, P.-Z. Wen, M. Mehrabian, N. Latib, J. Fruchart-Najib, J.C. Fruchart, C. Myrick, A.J. Lusic, Novel QTLs for HDL levels identified in mice by controlling for *Apoa2* allelic effects: confirmation of a chromosome 6 locus in a congenic strain, *Physiol. Genomics.* 17 (2004) 48–59.

- [121] M.A. Lyons, H. Wittenburg, R. Li, K.A. Walsh, G.A. Churchill, M.C. Carey, B. Paigen, Quantitative trait loci that determine lipoprotein cholesterol levels in DBA/2J and CAST/Ei inbred mice, *J. Lipid Res.* 44 (2003) 953–67.
- [122] Q. Li, Y. Li, Z. Zhang, T.R. Gilbert, A.H. Matsumoto, S.E. Dobrin, W. Shi, Quantitative Trait Locus Analysis of Carotid Atherosclerosis in an Intercross Between C57BL/6 and C3H Apolipoprotein E-Deficient Mice, *Stroke.* 39 (2007) 166–73.
- [123] J.S. Rowlan, Z. Zhang, Q. Wang, Y. Fang, W. Shi, New quantitative trait loci for carotid atherosclerosis identified in an intercross derived from apolipoprotein E-deficient mouse strains, *Physiol. Genomics.* 45 (2013) 332–42.
- [124] T. Zhang, X. Niu, L. Liao, E.-A. Cho, H. Yang, The contributions of HIF-target genes to tumor growth in RCC, *PLoS One.* 8 (2013) e80544.
- [125] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, M. Locati, The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends Immunol.* 25 (2004) 677–86.
- [126] E.L. Gautier, C. Jakubzick, G.J. Randolph, Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29 (2009) 1412–8.
- [127] M. Chelombitko, V. Shishkina, A cytofluorometric study of membrane rafts in human monocyte subsets in atherosclerosis, *Acta Naturae.* 6 (2014) 80–8.
- [128] T. Bjornheden, M. Levin, M. Evaldsson, O. Wiklund, Evidence of Hypoxic Areas Within the Arterial Wall In Vivo, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19 (1999) 870–6.
- [129] S. Parathath, S.L. Mick, J.E. Feig, V. Joaquin, L. Grauer, D.M. Habiels, M. Gassmann, L.B. Gardner, E.A. Fisher, Hypoxia is present in murine atherosclerotic plaques and has multiple adverse effects on macrophage lipid metabolism, *Circ. Res.* 109 (2011) 1141–52.
- [130] S. Rajagopalan, X. Meng, S. Ramasamy, D. Harrison, Z. Galis, Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability, *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 2572–9.
- [131] M. Terashima, N. Inoue, Y. Ohashi, M. Yokoyama, Relationship between coronary plaque formation and NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species - comparison of intravascular ultrasound finding of atherosclerotic lesions with histochemical characteristics, *Kobe J. Med. Sci.* 53 (2007) 107–17.
- [132] J. Erdmann, A. Grosshennig, P.S. Braund, I.R. König, C. Hengstenberg, A.S. Hall, P. Linsel-Nitschke, S. Kathiresan, B. Wright, D.-A. Trégouët, F. Cambien, P. Bruse, Z. Aherrahrou, A.K. Wagner, K. Stark, S.M. Schwartz, V. Salomaa, R. Elosua, O. Melander, et al., New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3, *Nat. Genet.* 41 (2009) 280–2.
- [133] S. Kiechl, R.C. Laxton, Q. Xiao, J.A. Hernesniemi, O.T. Raitakari, M. Kähönen, B.M. Mayosi, A. Jula, L. Moilanen, J. Willeit, H. Watkins, N.J. Samani, T.J. Lehtimäki, B. Keavney, Q. Xu, S. Ye, Coronary artery disease-related genetic variant on chromosome 10q11 is associated with carotid intima-media thickness and atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (2010) 2678–83.
- [134] N.N. Mehta, M. Li, D. William, A. V Khera, S. DerOhannessian, L. Qu, J.F. Ferguson, C. McLaughlin, L.H. Shaikh, R. Shah, P.N. Patel, J.P. Bradfield, J. He, I.M. Stylianou, H. Hakonarson, D.J. Rader, M.P. Reilly, The novel atherosclerosis locus at 10q11 regulates plasma CXCL12 levels, *Eur. Heart J.* 32 (2011) 963–71.
- [135] F. Beutner, D. Teupser, S. Gielen, L.M. Holdt, M. Scholz, E. Boudriot, G. Schuler, J. Thiery, Rationale and design of the Leipzig (LIFE) Heart Study: phenotyping and cardiovascular characteristics of patients with coronary artery disease, *PLoS One.* 6 (2011) e29070.

9. Eidesstattliche Versicherung

Peter Harmel

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Genetische Atherosklerosedisposition an der Arteria brachiocephalica der Maus“

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.

11. Publikationsverzeichnis

Ebinger M, Harmel P, Nolte CH, Grittner U, Siegerink B, Audebert HJ. Berlin Prehospital or Usual Delivery of Acute Stroke Care (B_PROUD) – Study Protocol, International Journal of Stroke, accepted

Harmel P, Holdt LM, Sass K, Baber R, Thiery J, Teupser D. *Pianp* and *Eno2* - two new candidate genes of atherosclerosis susceptibility at the brachiocephalic artery, 10. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, 22.-25.09.2013, Dresden

Harmel P, Holdt LM, Teupser D. *Eno2* as novel candidate gene of atherosclerosis at the brachiocephalic artery in mice, 9. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, 26.-29.09.2012, Mannheim

Harmel P, Holdt LM, Baber R, Teupser D. Identification of *Eno2* and *Mug2* as novel candidate genes of atherosclerosis at the brachiocephalic artery, 10th Leipzig Research Festival for Life Sciences, 16.12.2011, Leipzig

Harmel P, Holdt LM, Baber R, Breslow JL, Thiery J, Teupser D. Identification of novel candidate genes of atherosclerosis at the brachiocephalic artery, XVII. Lipid Meeting Leipzig, 08.-10.12.2011, Leipzig

12. Danksagung

Ich möchte Univ.-Prof. Dr. Daniel Teupser ganz besonders für die Vergabe des Promotionsthemas, die Bereitstellung aller notwendigen Mittel und die wissenschaftliche Betreuung und Ermunterung danken. Einen großen Dank möchte ich Prof. Dr. Dr. Lesca Holdt für ihre fortwährende kritische Diskussion aussprechen, ebenso für die Anregungen, welche das Gelingen der Experimente und der Arbeit maßgeblich förderten.

Auch möchte ich Wolfgang Wilfert danken, dessen freundschaftliches Heranführen an das experimentelle Arbeiten mich sehr bestärkt hat und von dessen stetiger Hilfsbereitschaft ich sehr profitiert habe.

Anika Stahringer war stets die gute Seele der Zellkultur und für ihre freundliche Anleitung und Mitarbeit danke ich ihr sehr. Ich danke weiterhin Dr. Kristina Sass für ihre experimentelle Anleitung bei immunhistochemischen Färbungen, Marlis Oehlert für Oelrot O-Färbungen sowie Dr. Ronny Baber und Franziska Jeromin für alle Belange rund um die Mauszüchtung, -haltung und -sektion. Bernd Northoff und Alexis Nicolaou möchte ich dafür danken, dass sie mir bei bioinformatischen und biochemischen Problemen mit wertvollem Rat zur Seite standen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau Eva-Maria, für die immerwährende Ermunterung, Begleitung und Motivation danken.