



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

## **Bedeutung des “Interferon Stimulated Gene 12” (ISG12) in der Entstehung von atherosklerotischen Plaques in LDL Rezeptor-defizienten Mäusen**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Julia Mayerhofer
Matrikel-Nummer:	0060924
Studienrichtung:	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Univ. Prof. Dr. Ibrahim Elmadfa

Ausgeführt am Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien und  
am Institut für Gefäßbiologie und Thromboseforschung  
der Medizinischen Universität Wien

Wien, im Mai 2009



Herzlichen Dank

an Prof. Bernd R. Binder für die umfassende und großartige Betreuung während der experimentellen Durchführung und an Prof. Ibrahim Elmadfa für die Leitung durch das Studium.

Herzlichen Dank auch

an Gernot Schabbauer, Christoph Binder und Laura Göderle für ihre Tipps, Anregungen und Hilfe.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Mann Matthias für seine Geduld und Hilfe. Ihm sei meine Diplomarbeit gewidmet.



## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>I. Liste der Abbildungen und Tabellen</b>	7
<b>II. Liste der verwendeten Abkürzungen</b>	9
<b>III. Zusammenfassung</b>	11
<b>Summary</b>	13
<b>1. Einleitung</b>	
1.1. Atherosklerose	15
1.1.1. Inzidenz	15
1.1.2. Risikofaktoren	17
1.1.3. Komplikationen der Atherosklerose	20
1.1.4. Prävention der Atherosklerose	20
1.2. Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen: Histopathologie	25
1.3. Pathogenese der Atherosklerose (Atherogenese)	26
1.3.1. Überblick	26
1.3.2. Rolle der Makrophagen in der Atherogenese; Atherosklerose als chronisches Entzündungsgeschehen	27
1.3.3. Rolle von Interferon $\gamma$ in der Atherogenese	33
1.3.4. ISG12 Expression, zelluläre Lokalisation, Regulation und Funktion, potentielle Bedeutung in der Atherogenese	35
1.3.5. Bedeutung von nukleären Rezeptoren in der Atherogenese	37
1.3.6. Beschreibung der ISG12 <sup>-/-</sup> Maus	39
1.3.7. Mausmodelle zur Untersuchung der Atherogenese	40
<b>2. Methodik</b>	
2.1. Tierhaltung	42
2.2. Rückkreuzung von ISG12 <sup>-/-</sup> Mäusen in den C57Bl/6 genetischen Hintergrund	43
2.3. Genotypisierung	43
2.3.1. Kennzeichnung der Mäuse und Lyse des Ohrgewebes	43
2.3.2. DNA Isolierung aus Blut	44
2.3.3. Sequenzierung und Primerdesign	44

2.3.4.	PCR	47
2.3.5.	Gelelektrophorese	49
2.4	Untersuchung der in vitro Schaumzellbildung	49
2.5.	Knochenmarkstransplantation	50
2.6.	Fettdiät	51
2.7.	Messung von Triglyzeriden und Cholesterol im Serum	51
2.8.	En face Präparation der Aorta und des Herzens	51
2.9.	Färbung der atherosklerotischen Plaques	52
2.10.	Quantifizierung der atherosklerotischen Plaques an der Aorta	53
2.11.	Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen an Querschnitten durch den Aortenursprung (Herzbasis)	54
2.12.	Statistik	57
<b>3.</b>	<b>Resultate</b>	
3.1.	Rückkreuzung der ISG12 <sup>-/-</sup> Mäuse in den C57Bl/6 genetischen Hintergrund	57
3.2.	Effekt der ISG12-Defizienz auf die in vitro Schaumzellbildung	58
3.3.	Serumtriglyzeridspiegel, Serumcholesterolspiegel und Körpergewichtsentwicklung in ISG12 <sup>-/-</sup> -transplantierten LDLR <sup>-/-</sup> Mäusen	59
3.4.	Effekt der ISG12-Defizienz auf die Entstehung atherosklerotischer Läsionen	61
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	63
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	67
<b>6.</b>	<b>Lebenslauf</b>	83

## I. Liste der Abbildungen und Tabellen

Abbildung Nr.:

1	Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen nach Alter und Geschlecht in Österreich im Jahr 2007	15
2	Geographische Lage der europäischen WHO MONICA Zentren	16
3	Veränderung der Mortalitätsraten für KHK während der MONICA Studie	16
4	Mortalität aufgrund Koronarer Herzkrankheit (KHK) in Europa (Männer, Alter: 35-74 Jahre).	17
5	Risikofaktoren für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen: Entwicklung von 1971-2000	18
6	Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsionen in verschiedenen Patientengruppen	26
7	Organisation der humanen und murinen ISG12 Genloci	35
8	Schema der Ohrmarken zur Identifizierung der Mäuse	43
9	Organisation der drei murinen ISG12 Gene	44
10A	Alignment (Identität = 72%) von ISG12(b2) gegen ISG12(b1)	45
10B	Alignment (Identität = 67%) von ISG12(b2) gegen ISG12(a)	45
11	Genomische Sequenz der ISG12-defizienten Maus mit Integration des Targeting Vektors	46
12	Nukleotidsequenz des sequenzierten PCR Produktes	47
13	Genotypisierung von ISG12 <sup>+/+</sup> bzw. ISG12 <sup>-/-</sup> Mäusen: Vergleich zwischen GoTaq und GoldTaq Polymerase	48
14	Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen der Aorta mit Hilfe von Adobe Photoshop und Image J	54
15	Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen an der Herzbasis mittels Adobe Photoshop und Image J	56
16	In vitro Schaumzellbildung aus ISG12 <sup>-/-</sup> bzw. ISG12 <sup>+/+</sup> Makrophagen	59
17	Serumlipidprofile von ISG12 <sup>-/-</sup> - bzw. ISG12 <sup>+/+</sup> -transplantierten Mäusen	60
18	Gewichtsentwicklung von ISG12 <sup>-/-</sup> - bzw. ISG12 <sup>+/+</sup> -transplantierten Mäusen	61

	von jeweils 9 Tieren	
19	Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen in der Aorta	62
20	Statistische Auswertung der Quantifizierung der aortalen Läsionen in ISG12 <sup>-/-</sup> - bzw. ISG12 <sup>+/+</sup> -transplantierten LDLR-defizienten Mäusen	62
21	Statistische Auswertung der Quantifizierung der Läsionen an der Herzbasis in ISG12 <sup>-/-</sup> - bzw. ISG12 <sup>+/+</sup> -transplantierten LDLR-defizienten Mäusen	63

Tabelle Nr.

1	Tägliche Zufuhr (Mittelwert) und D-A-CH-Referenzwerte an Energie, Makro- und Mikronährstoffen bei österreichischen Erwachsenen.	23
2	Vergleich unterschiedlicher Diätformen	24
3	Plasma Cholesterol- und Triglyzeridspiegel in ApoE-defizienten C57Bl/6 Mäusen	41
4	Lysis Buffer für den Gewebsverdau	44
5	Überblick über die Zucht der ISG12 <sup>-/-</sup> Mäuse	58



## II. Liste der verwendeten Abkürzungen

12/15-LO	12/15-Lipoxygenase
ABC	ATP-binding cassette
ACAT	Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase
AHA	American Heart Association
AMI	Acute myocard infarct (akuter Myokardinfarkt)
Apo	Apolipoprotein
azLDL	Azetyliertes LDL
BMI	Body Mass Index
CD	Cluster of Differentiation
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
CVD	Cardiovascular Disease
DASH	Dietary Approach to Stop Hypertension
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GRO $\alpha$	Growth Regulated Oncogene $\alpha$
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HDL	High Density Lipoprotein
ICAM-1	Inter-cellular Adhesion Molecule-1
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	inductible Nitric Oxide Synthase
IP-10	Interferon inducible Protein-10
ISG12	Interferon Stimulated Gene 12
I-TAC	Interferon inducible T cell $\alpha$ chemoattractant
KC	Keratinocyte-derived Chemokine
KHK	Koronare Herzkrankheit
LCD	Low-carbohydrate diet
LDL	Low densitiy lipoprotein
LDLR	Low densitiy lipoprotein receptor
LRP	LDL receptor related protein
LXR	Liver X receptor
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure

MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIG	Macrophage induced gene
MIP-1	Macrophage inflammatory protein 1
NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1
oxLDL	Oxidiertes LDL
PBS	Phosphate buffered saline
PECAM-1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR
SCD	Sudden cardiac death (plötzlicher Herztod)
SEM	Standard Error of the Mean
SERMs	Selective estrogen receptor modulators
SR	Scavenger Rezeptoren
SREBP	Sterol regulatory element-binding protein
TNF	Tumornekrosefaktor
UAP	Unstable angina pectoris (instabile Angina pectoris)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLDL	Very low density lipoprotein
VLFD	Very low-fat diet
VSMCs	Vascular smooth muscle cells

### III. Zusammenfassung

Atherosklerose-bedingte kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache in Österreich. Eine wichtige Ursache für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen liegt in einer zu fettreichen Ernährung und der daraus resultierenden Hypercholesterinämie.

Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle in der Entstehung atherosklerotischer Plaques. Sie nehmen cholesterol-hältige Lipoproteine auf, wandeln sich in Schaumzellen um und tragen durch die Interaktion mit Zellen des Immunsystems zur Entstehung eines lokalen, chronisch entzündlichen Prozesses bei. Für die Entstehung und Propagation dieser inflammatorischen Reaktion spielen Zytokine, die zur Attraktion und Aktivierung von Entzündungszellen führen, eine wichtige Rolle. Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) ist ein Zytokin, das von T-Zellen sezerniert wird und die Funktion von Makrophagen moduliert. Es nimmt auf die Genexpression in den Makrophagen Einfluß und trägt so zum pro-inflammatorischen Phänotyp der Makrophagen bei. Bisher ist jedoch nur wenig über die Rolle von IFN $\gamma$ -abhängigen Molekülen in Makrophagen und ihre Bedeutung für die Atherogenese bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von „interferon-stimulated gene 12“ (ISG12), einem kleinen IFN $\gamma$ -induzierbaren Molekül, in der Atherogenese untersucht. ISG12 ist an der Zellkernmembran lokalisiert und fördert den nukleären Export von anti-inflammatorischen („protektiven“) Transkriptionsfaktoren wie PPAR $\gamma$  und NR4A1. Dadurch könnte ISG12 zur Förderung der lokalen Entzündungsreaktion durch IFN $\gamma$  und in der Folge zur Entstehung von atherosklerotischen Plaques beitragen.

Um die Rolle von ISG12 in Makrophagen zu untersuchen, wurde ein Mausmodell verwendet, in dem LDL-Rezeptor<sup>-/-</sup> Mäuse mit Knochenmark von ISG12-defizienten Mäusen transplantiert wurden. Nach einer dreimonatigen Fettdiät wurde die Aorta der Tiere mikrochirurgisch präpariert, longitudinal aufgeschnitten und die atherosklerotischen Plaques durch eine Sudan IV Färbung sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Plaquefläche zeigte, dass die LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen, welche mit ISG12-defizientem Knochenmark transplantiert worden waren, signifikant weniger atherosklerotische Plaques entwickelten als die Tiere der Kontrollgruppe. In einem zweiten Schritt wurde das Volumen der atherosklerotischen Läsionen an der Herzbasis anhand von Serienschnitten quantifiziert. Auch mit dieser Technik zeigte sich, dass die ISG12-Defizienz in den Makrophagen die Entwicklung der atherosklerotischen Plaques hemmt.

Die Resultate dieser Studie zeigen, dass das in Makrophagen exprimierte ISG12 Protein zur Atherogenese beiträgt und legen nahe, dass ISG12 ein wichtiges pro-inflammatorisches Molekül in den Makrophagen sein könnte.



## Summary

Atherosclerotic cardiovascular disease is the main cause of death in Austria. One important risk factor for developing atherosclerotic lesions is a diet which is high in fat and results in hypercholesterolemia. Macrophages play a decisive role in the development of atherosclerotic lesions. They take up cholesterol-rich lipoproteins, transform into foam cells and interact with cells of the immune system to establish a local chronic inflammatory process. An important factor for the onset and propagation of this inflammatory reaction is the generation of cytokines which attract and activate cells of the immune system. Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) is a T cell cytokine which modulates the function of macrophages. Binding of IFN $\gamma$  to its receptor leads to an alteration of gene expression patterns in macrophages and thus contributes to the pro-inflammatory phenotype of these cells observed in atherosclerotic plaques. However, so far, little is known about the relevance of IFN $\gamma$ -dependent molecules for atherogenesis and their specific role in macrophages.

In this study, we investigated the role of “interferon-stimulated gene 12”, a small IFN $\gamma$ -inducible molecule, in atherogenesis. ISG12 is located at the nuclear envelope and promotes the nuclear export of anti-inflammatory (“protective”) transcription factors such as PPAR $\gamma$  and NR4A1. Upregulation of ISG12 in macrophages could therefore contribute to IFN $\gamma$ -mediated inflammation and formation of atherosclerotic plaques.

To investigate the role of ISG12 in macrophages, we transplanted LDL-receptor<sup>-/-</sup> mice with bone marrow from ISG12-deficient mice. After transplantation, mice received a high fat diet for three months. Then, the aorta was microdissected, opened longitudinally and atherosclerotic plaques were made visible by Sudan IV staining. Quantification of the plaque size showed that LDL-receptor<sup>-/-</sup> mice transplanted with ISG12-deficient bone marrow developed significantly less atherosclerotic plaques than animals in the control group. In a second step, the volume of atherosclerotic lesions at the aortic origin was quantified on serial cross-sections. Again, we found that ISG12-deficiency in macrophages exerts a protective effect and inhibits the development of atherosclerotic plaques.

The results of our study show that ISG12 expressed in macrophages contributes to atherogenesis. Moreover, our data suggest that ISG12 could represent an important IFN $\gamma$ -dependent pro-inflammatory molecule in macrophages.



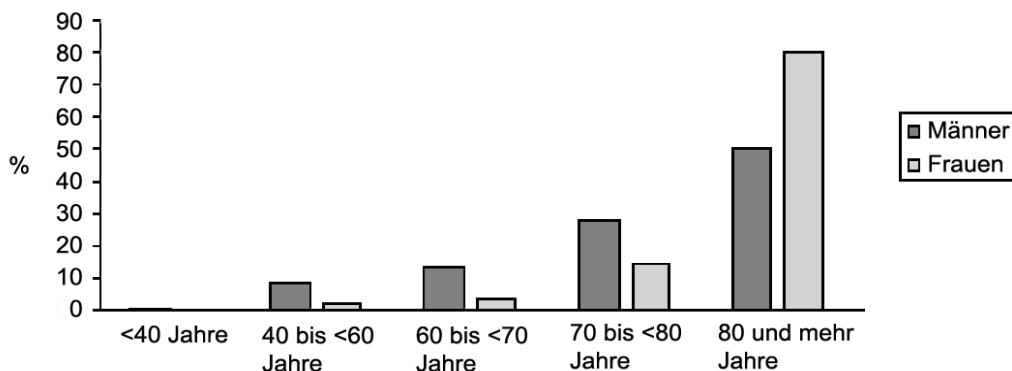
# Einleitung

## 1.1. Atherosklerose

### 1.1.1. Inzidenz

Die Atherosklerose als Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen ist der wichtigste Grund für Morbidität und Mortalität in der westlichen Zivilisation [Elmadfa et al., 2008, Rosamond et al., 2007]. Im Jahr 2007 waren 44% aller Todesfälle in Österreich auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen [Elmadfa et al., 2008]. 80% der Todesfälle verursacht durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen traten bei Frauen im Alter ab 80 Jahren auf. Bei den Männern lagen 50% der Todesfälle im Alter ab 80 Jahren und bereits 22% im Alter zwischen 40 und 70 Jahren [Elmadfa et al., 2008].

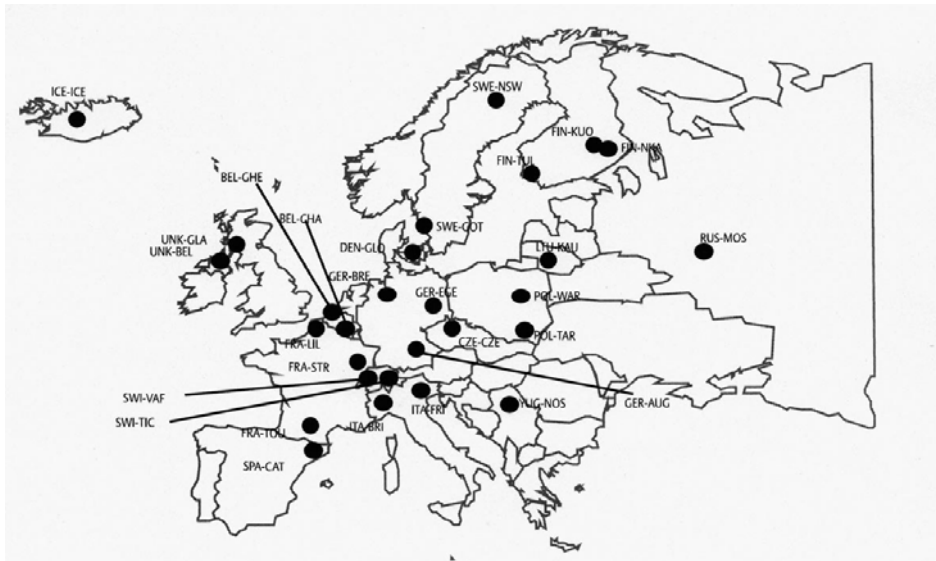
**Abbildung 1. Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen nach Alter und Geschlecht in Österreich im Jahr 2007.**



Quelle: modifiziert nach Elmadfa et al., 2008 und Statistik Austria 2008

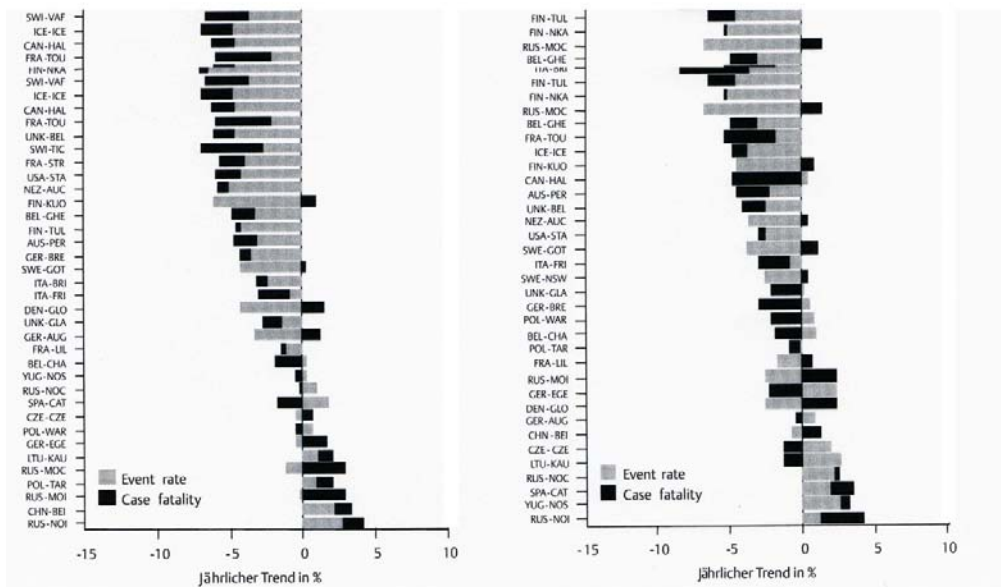
Das WHO MONICA Projekt („to MONItor trends and determinants of Cardiovascular disease“) wurde als weltweites Monitoring-Projekt von Mitte der 80er- bis Mitte der 90er Jahre in 21 Ländern durchgeführt um die Entwicklung der Mortalität und Morbidität kardiovaskulärer Erkrankungen zu untersuchen [WHO MONICA Project Principal Investigators, 1988]. Abbildung 2 zeigt die europäischen WHO-MONICA Zentren, Abbildung 3 zeigt wie sich die Mortalitätsraten kardiovaskulärer Erkrankungen bei Männern und Frauen in den verschiedenen geographischen Regionen während der 10jährigen Studie veränderten.

Abbildung 2. Geographische Lage der europäischen WHO MONICA Zentren



Quelle: Tunstall-Pedoe, H (ed.) MONICA monograph and multimedia sourcebook. 2003, p159 und Keil, U. Gesundheitswesen. 67 Sonderheft 1:S38-S45, 2005.

Abbildung 3. Veränderung der Mortalitätsraten für KHK während der MONICA Studie.



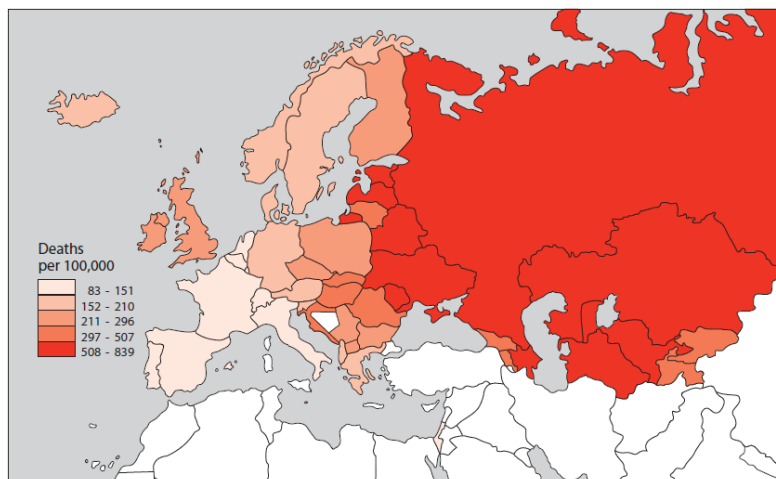
Quelle: Tunstall-Pedoe, H (ed.) MONICA monograph and multimedia sourcebook. 2003, p159 und Keil, U. Gesundheitswesen. 67 Sonderheft 1:S38-S45, 2005.

Im Beobachtungszeitraum der MONICA Studie ging die Mortalität aufgrund von Myokardinfarkten in den westlichen Ländern um 2-3% zurück, d.h. innerhalb der 10 Studienjahre um 20-30%. Davon konnten zwei Drittel auf eine Verminderung der Inzidenz und ein Drittel auf eine verminderte Letalität (verbesserte Behandlungsmethoden)



zurückgeführt werden. Bei den Männern konnte die verminderte Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen mit vermindertem Rauchen assoziiert werden, während bei den Frauen dafür eher eine Verminderung des Risikofaktors Hypertonie (bessere Behandlung der Hypertonie) verantwortlich war [Kuulasmaa et al., 2000]. Insgesamt war jedoch die Beziehung zwischen dem Rückgang der Herzinfarktinzidenz und der Veränderung der Risikofaktoren nicht so stark wie man hätte erwarten können [Magnus und Beaglehole, 2001]. Ein interessanter Aspekt der MONICA Studie war auch, dass sich die Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen innerhalb Europas teilweise deutlich unterschied. So zeigte sich, dass die Mortalitätsraten in südlichen, mediterranen Ländern deutlich geringer waren als in nördlichen Regionen Europas [Tunstall-Pedoe et al., 1999, Petersen et al., 2005]. Auch Frankreich wies eine niedrige Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen auf, ein Phänomen welches als „French Paradoxon“ bekannt geworden ist [Ferrieres, 2004].

**Abbildung 4. Mortalität aufgrund koronarer Herzkrankheit (KHK) in Europa (Männer, Alter: 35-74 Jahre).**



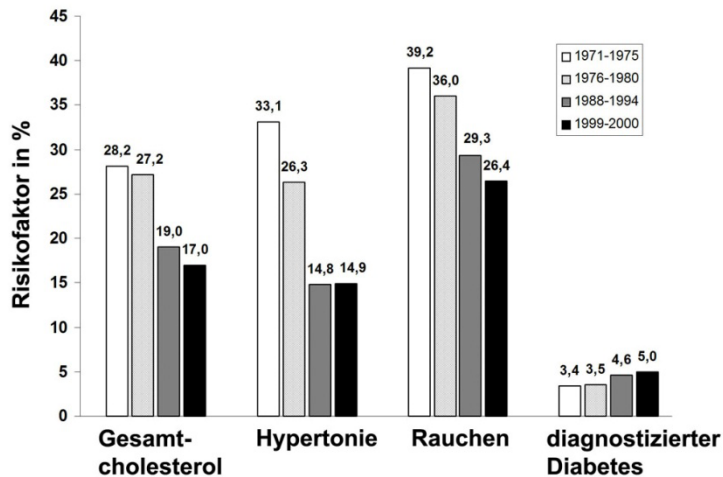
Quelle: Petersen et al., 2005

### 1.1.2. Risikofaktoren

Die Entwicklung der Atherosklerose (Atherogenese) ist ein komplexer Prozess zu dem verschiedenste Faktoren beitragen. Um einen Faktor als „Risikofaktor“ bezeichnen zu können, sollte belegt sein, dass dieser Faktor ein unabhängiger Faktor ist. Der Risikofaktor „Übergewicht“ beispielsweise ist zwar mit Atherosklerose assoziiert, allerdings bedingt Übergewicht auch Störungen im Kohlehydratstoffwechsel (Diabetes), im Lipoproteinstoffwechsel (Hypercholesterinämie) sowie Hypertonie – Faktoren, die alle selbst

ein Risiko für die Entstehung von Atherosklerose darstellen. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Entwicklung der wichtigsten Risikofaktoren während der letzten Jahrzehnte.

**Abbildung 5. Risikofaktoren für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen: Entwicklung von 1971-2000.**



Quelle: Heart Disease and Stroke Statistics, American Heart Association, 2007 Update At-a-Glance

### 1.1.2.1. Zigarettenrauchen

Der Zusammenhang zwischen Rauchen und kardiovaskulären Erkrankungen ist bereits seit den 40er und 50er Jahren bekannt [English et al., 1940, Hammond und Horn, 1984]. Neuere Studien belegen, dass Rauchen die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen um mehr als 50% fördert und die Inzidenz der koronaren Herzkrankheit verdoppelt [World Health Organization, 2002, Doll et al., 2004]. Dieses Risiko vermindert sich sehr rasch, wenn das Rauchen eingestellt wird. Das Risiko eines Ex-Rauchers einen Myokardinfarkt zu erleiden ist fast gleich hoch bzw. niedrig wie das eines Nichtraucher [Gaziano, 1996].

### 1.1.2.2. Hypertonie

Hypertonie ist definiert als systolischer Blutdruck über 140 mm Hg oder als diastolischer Blutdruck über 90 mm Hg [Joint National Committee on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Pressure, 1993]. Rezente Forschungsergebnisse der WHO legen nahe, dass Hypertonie eine grössere Bedeutung als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen hat als bisher angenommen. Der World Health Report 2002 schätzt, dass mehr als 50% aller kardiovaskulären Erkrankungen und fast 75% aller Schlaganfälle durch Hypertonie verursacht werden [World Health Organization, 2002]. Die INTERHEART Studie zeigte, dass 25% aller

Patienten mit Myokardinfarkte in Mitteleuropa eine Hypertonie aufweisen [Yusaf et al., 2004]. Die einzigen verlässlichen Daten zur Prävalenz der Hypertonie in Europa stammen vom MONICA Projekt [Tunstall-Pedoe et al., 1999]. Die Daten des MONICA Projektes zeigen vor allem, dass die Prävalenz der Hypertonie in verschiedenen Regionen Europas stark schwankt: von 2% in Toulouse (Frankreich) bis 21% in Nord-Karelien (Finnland) bei Männern sowie von 2% in Katalonien (Spanien) bis 17% in Westdeutschland bei Frauen.

### **1.1.2.3. Diabetes mellitus**

Atherosklerose-assoziierte Gefäßerkrankungen sind die wichtigste Komplikation des Diabetes mellitus. Patienten mit Diabetes haben ein 3-5fach erhöhtes Risiko für KHK trotz Minimierung anderer Risikofaktoren wie beispielsweise Rauchen [Bierman, 1992, Pyorala et al., 1987]. Allerdings sind Risikofaktoren wie Hypertonie und Fettstoffwechselstörungen bei Diabetikern im Vergleich zur Normalpopulation häufiger anzutreffen [Bierman, 1992]. Bisher konnte nicht schlüssig gezeigt werden, dass eine gute Einstellung des Blutglukosespiegels bei Diabetes das KHK-Risiko vermindert.

### **1.1.2.4. Hypercholesterinämie**

Hypercholesterinämie ist zweifellos der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung atherosklerotischer Plaques. Dies wird eindrucksvoll durch die autosomal-dominant vererbte Erkrankung der „familiären Hypercholesterinämie“ belegt. Bei diesen Patienten ist aufgrund eines LDL-Rezeptor Defektes die Clearance der LDL aus dem Plasma beeinträchtigt. Heterozygote weisen 2-3fach erhöhte Plasma-Cholesterol Spiegel auf, bei Homozygoten ist der Cholesterolspiegel sogar 4-6fach erhöht. Aufgrund der erhöhten Cholesterolspiegel entwickeln diese Patienten vorzeitig schwere atherosklerotische Läsionen. 85% der Heterozygoten erleiden vor ihrem 60. Lebensjahr einen Myokardinfarkt, homozygote Patienten leiden bereits im jugendlichen Alter an den Komplikationen der Atherosklerose. Der World Health Report 2002 zeigte, dass mehr als 60% aller kardiovaskulären Erkrankungen und etwa 40% der zerebralen Insulte in Europa durch Hyperlipidämien verursacht werden (World Health Organization, 2002]. Eine Erhöhung des Cholesterolspiegels scheint linear mit dem KHK Risiko assoziiert zu sein: eine 1%ige Erhöhung des Cholesterolspiegels geht mit einer 2%igen Erhöhung des KHK Risikos einher [Rosamond et al., 2007]. Es zeigte sich jedoch, dass neben der Erhöhung des Cholesterolspiegels auch Marker für Entzündungsgeschehen (CRP) eine deutliche Korrelation mit dem relativen Risiko für Atherosklerose zeigen.

#### **1.1.2.5. Andere Risikofaktoren**

Andere Risikofaktoren für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen sind zunehmendes Alter, männliches Geschlecht, genetische Disposition, Adipositas mit einem BMI >30 (ohne dem Vorliegen von anderen Stoffwechselstörungen), Hyperfibrinogenämie sowie Hyperhomocysteinämie [Rosamond et al., 2007].

#### **1.1.3. Komplikationen der Atherosklerose**

Das Wachstum der atherosklerotischen Läsionen im Laufe der Jahre (siehe auch 1.2) führt primär dazu, dass die Arterienwand ihre Elastizität verliert und der Blutfluss bei muskulärer Belastung nicht mehr angepasst werden kann [Keaney, Jr., 2000]. Dies führt zu den typischen Symptomen der Angina pectoris und der Claudicatio intermittens in Belastungssituationen. Später kann es dann dazu kommen, dass das Gefäßlumen so stark einengen ist, dass der Muskel auch im Ruhezustand unterversorgt wird – dies äussert sich dann in Ruheschmerzen. Die schlimmste Komplikation der Atherosklerose ist die Plaqueruptur [Keaney, Jr., 2000]. Durch die Ruptur wird die Endotheloberfläche zerstört und es kommt zur Thrombosierung des Gefässes. Klinisch äussert sich dies in einem akuten Myokardinfarkt oder einem zerebralen Insult (Schlaganfall).

#### **1.1.4. Prävention der Atherosklerose**

Die Prävention der Atherosklerose ergibt sich aus der Vermeidung bzw. Behandlung der beschriebenen Risikofaktoren. Primäre Prävention versucht die Entstehung atherosklerotischer Läsionen von vornherein zu verhindern, während sekundäre Prävention bei bereits erkrankten Personen ansetzt und daher eigentlich zu spät kommt. Trotzdem konnte die Wirksamkeit der sekundären Prävention eindeutig belegt werden [Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), 1994, Shepherd et al., 1995]. Neben der Vermeidung von Zigarettenrauchen und dem Achten auf einen gesunden Lebensstil (körperliche Aktivität) sowie der Behandlung von Hypertonie und Diabetes spielt die Ernährung in der Prävention der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Viele gut kontrollierte Studien haben den Zusammenhang zwischen der Ernährung und der Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen belegt. Die Autoren der „Seven Countries Study“ [Keys et al., 1986] konnten als erste eine Korrelation zwischen der Aufnahme von einfach ungesättigten Fettsäuren und

der KHK Mortalität herstellen – eine Beobachtung die danach durch weitere epidemiologische Studien bestätigt wurde [Hu et al., 1997, Kushi et al., 1985, Yano et al., 1988]. Tabelle 1 zeigt die Zusammensetzung der Ernährung in Österreich im Jahr 2007. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden in der Folge interventionelle Studien mit verschiedenen Diäten durchgeführt um herauszufinden welche Ernährungsform am wirksamsten zur Prävention der Atherosklerose beiträgt. Die wichtigsten Ernährungsformen werden im Folgenden kurz beschrieben und sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

#### **Very low-fat diet (VLFD):**

Diese Ernährungsform sieht vor, dass <15% der Energieaufnahme aus Fett gedeckt wird (gleichmässige Aufteilung der Fettsäuren zwischen gesättigten, einfach ungesättigten und mehrfach ungesättigten), 70% aus Kohlehydraten und 15% von Proteinen. Diese Ernährung wurde im „Life-Style Heart Trial“ evaluiert [Ornish et al., 1998]. Die Ergebnisse der Studie waren beeindruckend: Abfall des LDL-Cholesterols um 40% im ersten Jahr, signifikante Gewichtsabnahme der Probanden, 2.5fach weniger Herzinfarkte in den ersten 5 Jahren [Ornish et al., 1998]. Trotzdem hat die AHA diese Ernährung für die normale Bevölkerung nicht empfohlen – eine derartige Reduktion des Fettgehalts ist langfristig schwer durchzuhalten und für verschiedene Bevölkerungsgruppen (Schwangere, Kinder und ältere Personen) nicht geeignet. Ausserdem kann es (zumindest initial) bei Diabetikern zu einer Erhöhung der Serum-Triglyzeride bei gleichzeitigem Abfall des HDL-Cholesterols kommen. Diese Ernährungsform ist aber sehr wirksam in der sekundären Prävention und wird für Patienten mit dokumentierter KHK, mit erhöhtem LDL-Cholesterol sowie für Patienten mit genetisch bedingter Adipositas und Lipidstoffwechselstörungen empfohlen [Koertge et al., 2003].

#### **High-protein, high-fat, low-carbohydrate diet (LCD):**

Ernährungsformen dieser Kategorie sind in den letzten Jahren sehr modern geworden. Die Befürworter der LCD argumentieren, dass kohlehydratreiche Ernährungsformen aufgrund einer Hyperinsulinämie zu vermehrter Triglyzeridsynthese führen und dass umgekehrt durch die Kohlehydratrestriktion im Falle der LCD die Fettreserven des Körpers angegriffen und eine Gewichtsreduktion erzielt werden könnte. Verschiedene Diäten wie beispielsweise die Atkins Diät [Atkins, 2002], die South Beach Diät [Agatson, 2003] sowie die Zone Diät und die Sugar Busters Diät gehören zur Klasse der LCDs.

Studien haben gezeigt, dass diese Ernährungsformen tatsächlich zu einer Gewichtsabnahme führen können [Aude et al., 2004, Foster et al., 2003, Samaha et al., 2003]. Allerdings kommt es durch die Kohlehydratrestriktion zu keiner Veränderung des Total- oder LDL Serum-Cholesterols und keine einzige dieser Studien konnte eine Reduktion kardiovaskulärer Erkrankungen zeigen [Aude et al., 2004, Foster et al., 2003, Samaha et al., 2003]. Die Ergebnisse von insgesamt 107 Studien welche auf LCDs aufbauen wurden vor kurzem zusammengefasst [Bravata et al., 2003]. Insgesamt scheinen LCDs zumindest keinen negativen Effekt auf Blutzuckerspiegel, Insulinspiegel, Serumlipide und Blutdruck zu haben. LCDs haben jedoch keinen Effekt in der Prävention der Atherosklerose. Die LCD wurde zudem von der AHA kritisiert, da es durch diese Ernährungsform zu Mangelerscheinungen, Nierenerkrankungen und Osteoporose kommen kann.

#### **Dietary Approach to Stop Hypertension (DASH):**

Die DASH Empfehlungen wurden aufgrund der Beobachtung, dass eine obst- und gemüserreiche Ernährung den Blutdruck senken kann, ausgesprochen. Die DASH Ernährung enthält viel Obst, Gemüse, Nüsse und generell Nahrungsmittel mit niedrigem Fettgehalt, speziell mit niedrigem Gehalt an gesättigten Fettsäuren [Sacks et al., 1999]. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die DASH Diät tatsächlich zu einer Erniedrigung des Blutdrucks führt – speziell in Kombination mit einer Reduktion der täglichen Salzaufnahme [Appel et al., 1997, Sacks et al., 2001]. Der Mechanismus, welcher der präventiven Wirkung der DASH Diät zugrundeliegt, ist nicht vollkommen aufgeklärt. Es könnte sein, dass der hohe Anteil an Nüssen (hoher Gehalt an Vitamin E, hoher Gehalt an L-Arginin = Vorläufer von vasodilatatorischem NO) vorteilhaft ist [Albert et al., 2002]. Aber auch der hohe Verzehr von Obst und Gemüse spielt eine wichtige präventive Rolle [Joshi et al., 2001]. Zusätzlich wird durch diese Ernährungsform auch überdurchschnittlich viel Folsäure, Kalium und Ballaststoffe zugeführt.

#### **Ernährungsempfehlungen der American Heart Association (AHA):**

Die Ernährungsempfehlungen der AHA für die Normalbevölkerung zielen auf ein gesundes, ausgewogenes Essverhalten ab, das über eine Normalisierung des Körpergewichts einen präventiven Effekt in der Atheroskleroseentstehung hat [Krauss et al., 2000]. Generell wird empfohlen, dass Fette <30% bzw. gesättigte Fettsäuren <10% der Gesamtenergiemenge ausmachen. Ausserdem wird empfohlen, nicht mehr als 300 mg Cholesterin pro Tag aufzunehmen. Für Hochrisikopatienten bzw. in der sekundären Prävention werden niedrigere

Grenzen empfohlen (gesättigte Fettsäuren <10%, Cholesterol <200 mg/Tag). Weiters werden mindestens 2 Fischmahlzeiten/Woche empfohlen (protektiver Effekt von n-3 Fettsäuren) [Krauss et al., 2000]. Schließlich empfiehlt die AHA eine Diät im Sinne der DASH Diät mit zusätzlicher Begrenzung der täglichen Salzaufnahme auf unter 6 g sowie eine Begrenzung der täglichen Alkoholaufnahme (maximal 2 drinks/Tag für Männer, maximal 1 drink/Tag für Frauen).

### **Public Health Nutrition in Europa und Österreich**

Public Health befasst sich mit der Förderung und Erhaltung der Gesundheit der Bevölkerung. Da der Ernährung eine besondere Bedeutung bei der Prävention von Übergewicht, kardiovaskulären Erkrankungen, Hypertonie und Diabetes zukommt, hat sich in den letzten Jahren „Public Health Nutrition“ als eigene Disziplin etabliert [Elmadfa et al. 2008]. Ein wichtiges Ziel von Public Health Nutrition ist es, die Ernährung der Bevölkerung zu verbessern bzw. zu optimieren, u.a. durch die Abgabe von Ernährungsempfehlungen und durch die Zusammenarbeit mit öffentlichen Einrichtungen zur Durchführung von Interventionsmaßnahmen und –kampagnen. Public Health Nutrition wird in der EU durch verschiedene Aktionsprogramme gefördert, zuletzt wurde 2007 ein Aktionsprogramm im Bereich der Gesundheit für die Jahre 2008-2013 durch das Europäische Parlament verabschiedet (Beschluss Nr. 1350/2007/EG). Zu diesen Programmen gehörte auch die Schaffung eines europäischen Netzwerkes „Health Monitoring and Documentation of Health and Nutrition Status“ in den Ländern der EU und in der Folge die Erstellung des „Europäischen Ernährungs- und Gesundheitsberichtes 2004“ [Elmadfa et al., 2004].

**Tabelle 1. Tägliche Zufuhr (Mittelwert) und D-A-CH-Referenzwerte an Energie, Makro- und Mikronährstoffen bei österreichischen Erwachsenen, getrennt nach Geschlecht.**

	Männer	D-A-CH	Frauen	D-A-CH
Energie (MJ)	8,9	10,5-12,5	7,6	8,5-10
Eiweiß (E%)	17	10-15	15	10-15
KH (E%)	43	> 50	46	> 50
Zucker (E%)	9	0	11	0
Ballaststoffe (g)	19	> 30	21	> 30
Fett (E%)	38	max. 30	37	max. 30
GFS (E%)	14	max. 10	15	max. 10
MFS (E%)	13	10-13	12	10-13
PFS (E%)	8	7-10	8	7-10
Cholesterin (mg)	355	max. 300	285	max. 300
Calcium (mg)	776	1000	784	1000
Natrium (g)	9	5	8	5

Quelle: modifiziert nach Elmadfa et al., 2008

**Tabelle 2. Vergleich unterschiedlicher Diätformen.**

Diät	Zusammensetzung			Präventive Wirksamkeit	Gew. abnahme				Compliance	Nicht geeignet für	Unerwünschte Effekte		
	KH	Prot	Fett		TG	Chol	HDL	LDL				kurzfr	langfr
<b>VLFD</b>	+++++	++	+	++++	↑↑/ ±	↓↓	↓/±	↓↓	++	+	+	DM, Schwangere, hohes Alter, Metabol. Syndrom	DM, Metabol. Syndrom
<b>LCH</b>	±	+++++	++++	-	↓	↓	↑	↓	+++	±	+	Gicht, Nierenerkr., Schwangerschaft, hohes Alter	Gicht, Nierenerkr., Haarausfall, Verstopfung
<b>DASH</b>	++++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	keine bekannt
<b>AHA</b>	++++	++	++	+++	↓	↓	↑	↓	+	+	++	-	keine bekannt

adaptiert von Chahoud et al., The American Journal of Cardiology, 94:1260.

Abkürzungen:

VLFD, Very Low Fat Diet; LCH, Low Carbohydrate Diet; DASH, Dietary Approach to Stop Hypertension; AHA, American Heart Association; DM, Diabetes mellitus.



## 1.2. Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen: Histopathologie

Die Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen in den Koronararterien wurde von der American Heart Association in sechs Stadien unterteilt [Stary et al., 1995].

**Stadium I:** Vermehrung von Makrophagen in der minimal verdickten Intima.

**Stadium II:** Transformation von Makrophagen und glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMCs) in Schaumzellen.

**Stadium III:** wie Stadium I und II, zusätzlich finden sich isolierte Inseln mit extrazellulären Lipiden.

**Stadium IV:** Extrazelluläre Lipide und nekrotischer Zelldebris bilden den Kern der Läsion, die Intima darüber ist fibrös verdickt.

**Stadium V:** Verdickung der Läsion durch Kollagen-Neubildung und Akkumulation extrazellulärer Lipide.

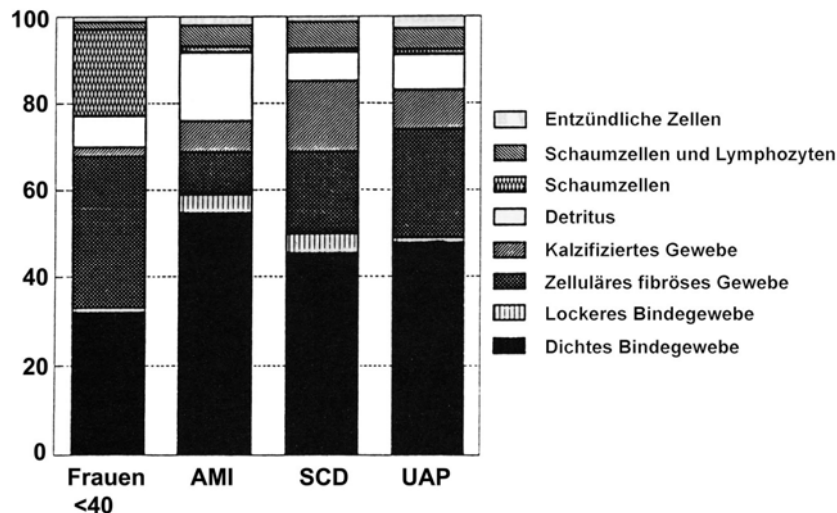
**Stadium VI:** Endstadium der Plaque, es werden drei unterschiedliche Typen unterschieden:

- Thrombusbildung, Plaqueruptur und Einblutungen in die Plaque.
- Kalzifikation.
- Fibrose.

Die initiale atherosklerotische Läsion betrifft die arterielle Intima und tritt bereits in der Kindheit in Form von Fettstreifen („fatty streaks“) auf [McGill, Jr. et al., 2000, Tuzcu et al., 2001]. Dies wurde durch eine Autopsiestudie belegt, in welcher sich bei 2876 jungen Männern und Frauen (im Alter von 15-34 Jahren) Fettstreifen in der Aorta fanden [Strong et al., 1999]. Histologisch präsentiert sich diese frühe atherosklerotische Läsion als fokale Verdickung der Intima mit einer Vermehrung von Makrophagen und Schaumzellen in der Intima [Davies et al., 1988]. In der Folge kommt es zur Einwanderung von glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMCs) in den subendothelialen Bereich der Intima. Die VSMCs produzieren vermehrt extrazelluläre Matrix, unter anderem Biglykan, ein spezielles Proteoglykan, welches Lipoproteine (Apolipoprotein E, VLDL remnants, LDL und HDL) bindet und so zur Bildung der Fettstreifen beiträgt [O'Brien et al., 1998]. Neben Makrophagen und VSMCs finden sich auch Lymphozyten in den Fettstreifen. In der Folge werden die Läsionen grösser und immer mehr glatte Muskelzellen wandern in die Intima ein. In den tieferen Schichten der Fettstreifen gehen die glatten Muskelzellen apoptotisch zugrunde – dies fördert die Kalzifizierung der Läsion [Kockx et al., 1998]. Die Läsion wird in

diesem Stadium als fibröse Plaque („fibrous plaque“) bezeichnet. Die fibröse Plaque ist kuppelförmig und wird von einer fibromuskulären Schicht, bekannt als „fibrous cap“, bedeckt. Je grösser die Läsion wird, desto stärker wird das Lumen des Gefässes eingengt. Dies führt zu den Symptomen einer Angina pectoris, speziell bei körperlicher Belastung. Je grösser die Läsion wird, desto höher ist aber auch die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer Ruptur der Plaque kommt. Die Plaqueruptur führt zur Thrombosierung des Gefässes und zu den akuten klinischen Symptomen eines Myokardinfarktes oder zerebralen Insultes. Die Zusammensetzung der Plaques wurde in Patienten mit unterschiedlicher klinischer Symptomatik analysiert [Dollar et al., 1991]. Dabei zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientengruppen (Patienten mit akutem Myokardinfarkt, Patienten mit plötzlichem Herztod ohne Myokardinfarkt und Patienten mit instabiler Angina pectoris mit Ruheschmerzen): den Hauptanteil der Plaques machte in jedem Fall neu gebildetes Bindegewebe aus (Abbildung 6).

**Abbildung 6. Zusammensetzung der atherosklerotischen Läsionen in verschiedenen Patientengruppen.**



AMI, Akuter Myokardinfarkt; SCD, Plötzlicher Herztod; UAP, Instabile Angina pectoris.  
Quelle: modifiziert nach Dollar et al. American Journal of Cardiology. 67:1223, 1991.

### 1.3. Pathogenese der Atherosklerose (Atherogenese)

#### 1.3.1. Überblick

In der Pathogenese der Atherosklerose spielen zahlreiche Faktoren eine Rolle. Unter den Risikofaktoren für die Entstehung atherosklerotischer Plaques dürfte die Hyper-

cholesterinämie der bedeutendste sein und auch schon alleine ausreichen um zur Entstehung atherosklerotischer Läsionen zu führen. Die Atherogenese wird heute als eine Form der chronischen Entzündung aufgefasst, die durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen Lipoproteinen, Makrophagen, T-Zellen und der Gefäßwand (Endothel, Subendothel, VSMCs) zustandekommt. Die zentrale Rolle der Makrophagen in dieser Entzündungsreaktion wird im folgenden näher beschrieben.

### **1.3.2. Rolle der Makrophagen in der Atherogenese; Atherosklerose als chronisches Entzündungsgeschehen**

#### **1.3.2.1. Einwanderung von Monozyten in die atherosklerotischen Läsionen**

Monozyten entstehen aus Vorläuferzellen, den Monoblasten und Promonozyten, im Knochenmark. Die reifen Monozyten werden aus dem Knochenmark ins periphere Blut abgegeben und zirkulieren dort einige Tage. Werden sie durch Botenstoffe (Zytokine) angelockt („Chemotaxis“) und aktiviert, so wandern sie in Entzündungsherde wie beispielsweise die atherosklerotischen Läsionen ein und differenzieren dort zu Makrophagen. Der Prozess der Monozyteneinwanderung in die atherosklerotische Plaque wird in verschiedene Schritte unterteilt [Glass und Witztum, 2001].

Zunächst verlassen Monozyten als Antwort auf chemotaktische Stimuli den zentralen Blutstrom und gelangen in den peripheren, marginalen Blutstrom. Sie werden durch Zytokine (siehe unten), welche in der atherosklerotischen Plaque produziert werden, aktiviert, exprimieren dadurch Rezeptoren für Oberflächenmoleküle der Endothelzellen und beginnen über die Oberfläche der (geschädigten bzw. ebenfalls aktivierten) Endothelzellen zu taumeln („rolling“). Die Endothelzellen exprimieren aufgrund des entzündlichen Milieus eine Reihe von Oberflächenmolekülen, die von aktivierten Monozyten erkannt werden und ihre Adhäsion an den Endothelzellen sowie ihre Einwanderung ermöglichen. Zu diesen Molekülen gehören ICAM-1 (CD54), PECAM-1 (CD31), VCAM-1 (CD106) und P-Selectin (CD62P) [Bogen et al., 1994, Cybulsky und Gimbrone, Jr., 1991, Johnson-Tidey et al., 1994, Poston et al., 1992, Zibara et al., 2000]. Während die Selektine das initiale Anhaften der Monozyten („rolling“) möglich machen, scheinen Integrine und ICAM-1 für die Adhäsion und Durchwanderung (Transmigration) verantwortlich zu sein [Takahashi et al., 2002]. In atherosklerotischen Läsionen werden zahlreiche Zytokine produziert welche aktivierend auf Makrophagen und Endothelzellen wirken. Dazu gehören Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [Linton und Fazio, 2003, Takahashi et al., 2002].

Eine zentrale Rolle in der Anlockung von Makrophagen und deren Anhaftung (Adhäsion) an Endothelzellen spielt oxidiertes LDL (oxLDL). Die Mechanismen, die zur Oxidation von LDL führen, werden in Kapitel 1.3.2.3. erörtert. oxLDL wirkt einerseits direkt chemotaktisch auf Monozyten, andererseits kann es auch die Expression anderer chemotaktischer Moleküle wie z.B. MCP-1 (s.u.) induzieren [Navab et al., 1996, Steinberg et al., 1989]. Es induziert auch die Bildung von M-CSF und fördert so die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen (s. 1.3.2.2.) [Liao et al., 1991].

Die Familie der Chemokine („chemoattractant cytokines“) enthält eine Anzahl weiterer Botenstoffe, welche in atherosklerotischen Plaques produziert wird und stark chemotaktisch auf Monozyten wirkt. Die Chemokine werden in zwei Gruppen unterteilt: die CXC-Chemokine (zwei aminoternale Cysteinreste (C) werden durch eine andere Aminosäure (X) getrennt) und die CC-Chemokine (keine trennende Aminosäure zwischen den beiden Cysteinen). Beide Untergruppen der Chemokine besitzen eigene Rezeptoren: die CXC-Gruppe bindet an sechs verschiedene CXC-Rezeptoren (CXC-R1-6), während es für die CC-Gruppe neun verschiedene CC-Rezeptoren (CC-R1-9) gibt.

MCP-1 („monocyte chemoattractant protein-1“) gehört zur Gruppe der CC-Chemokine und bindet an den CC-Rezeptor-2 der aktivierten Monozyten. MCP-1 scheint besonders wichtig für die Einwanderung von Monozyten in atherosklerotische Läsionen zu sein; in vivo Versuche, in denen CC-R2-defiziente Mäuse mit ApoE-defizienten Mäusen gekreuzt wurden (Doppeldefizienz für CC-R2 und ApoE), ergaben, dass diese Mäuse bedeutend weniger atherosklerotische Läsionen entwickeln als Mäuse welche nur für ApoE defizient waren [Boring et al., 1998].

Ein für die Atherogenese bedeutendes Chemokin der CXC-Gruppe ist GRO- $\alpha$  (das homologe murine Chemokin heisst KC). GRO- $\alpha$ /KC bindet an CXC-R2 und scheint das initiale „rolling“ der Monozyten am Endothel zu vermitteln [Huo et al., 2001]. MCP-1 hingegen dürfte eher für die Durchwanderung (Transmigration) des Endothels durch die Monozyten wichtig sein [Linton und Fazio, 2003].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Einwanderung von Monozyten in die atherosklerotische Läsion durch ein komplexes Netzwerk von Botenstoffen gesteuert wird. Diese Botenstoffe verändern sowohl die Monozyten als auch die Endothelzellen funktionell („Aktivierung“) und führen zur Expression von zahlreichen Rezeptoren und Counter-Rezeptoren. Der genaue zeitliche Ablauf der Expression sowie die genaue funktionelle Relevanz dieser Moleküle ist noch nicht abschließend geklärt.

### **1.3.2.2. Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen in den Läsionen**

Nach der Einwanderung der Monozyten in die atherosklerotische Läsion differenzieren die Monozyten zu Makrophagen aus. Das wichtigste Zytokin für die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen ist M-CSF („macrophage colony-stimulating factor“). Verschiedene Zellen in der Gefäßwand können M-CSF produzieren, die wichtigste M-CSF Quelle in der atherosklerotischen Plaque sind aber wahrscheinlich die Makrophagen selbst [Clinton et al., 1992, Rosenfeld et al., 1992]. Osteopetrosis Mäuse (op/op) sind M-CSF-defizient und dadurch auch weitgehend Atherosklerose-resistent [Naito et al., 1991]. Dieses Mausmodell zeigt, dass die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen in der atherosklerotischen Plaque ein essentieller Schritt der Atherogenese ist [Naito et al., 1991].

### **1.3.2.3. Oxidation von LDL in den atherosklerotischen Plaques**

oxLDL spielt eine bedeutende Rolle in der Entstehung der atherosklerotischen Plaque. Zunächst wirkt oxLDL direkt und indirekt chemotaktisch auf Monozyten (s.o.) und trägt so zur Einwanderung von Monozyten bei [Navab et al., 1996, Steinberg et al., 1989]. In der Folge wird das oxLDL von den Makrophagen über Scavenger Rezeptoren aufgenommen und führt zur Bildung von Schaumzellen. oxLDL kann auf verschiedene Art und Weise entstehen. Ein möglicher Weg ist die Oxidation aus nativem LDL durch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygens spesies = ROS). Ein Schlüsselenzym für die Generierung von ROS aus molekularem Sauerstoff ist die NADPH Oxidase [White et al., 1994]. Dieses membranständige Enzym besitzen v.a. Makrophagen, aber auch neutrophile Granulozyten. NADPH Oxidase katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid. Aus Superoxid entstehen dann Wasserstoffperoxid und andere ROS, die alle potentiell zur Oxidation von LDL beitragen können. Die tatsächliche Bedeutung der NADPH Oxidase in der Atherogenese ist jedoch noch nicht geklärt [Kirk et al., 2000].

Ein anderes Enzym, welches für die Entstehung von oxLDL eine Rolle spielt, ist die 12/15-Lipoxygenase (12/15-LO) [Yla-Herttuala et al., 1990]. Die Bedeutung der 12/15-LO in der Atherogenese konnte kürzlich durch eine Studie mit 12/15-LO-defizienten Mäusen gezeigt werden. Werden 12/15-LO-defiziente Mäuse mit ApoE-defizienten Mäusen gekreuzt, so wird die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen in den 12/15-LO/ApoE-doppeldefizienten Mäusen im Vergleich zu ApoE-defizienten Mäusen stark gehemmt. Dies dürfte auf eine Verminderung der LDL-Oxidation zurückzuführen sein [Cyrus et al., 1999].

Schließlich wird auch die Rolle der induzierbaren NO Synthase (iNOS) in der Generierung von oxLDL diskutiert [Buttery et al., 1996]. Allerdings lieferten in vivo Studien bisher

widersprüchliche Ergebnisse über die Rolle von iNOS in der Entstehung von oxLDL [Detmers et al., 2000, Niu et al., 2001].

#### **1.3.2.4. Bedeutung von Scavenger Rezeptoren sowie der endozytose-medierten Aufnahme von oxLDL in der Atherogenese**

Scavenger Rezeptoren (SR) sind Oberflächenrezeptoren auf Makrophagen. Sie werden erst während der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen (unter dem Einfluss von M-CSF) auf der Zelloberfläche exprimiert, sind aber nicht auf Monozyten zu finden. SR vermitteln die Aufnahme von verschiedenen negativ geladenen Makromolekülen in die Makrophagen. Am wichtigsten im Rahmen der Atherogenese ist die SR-abhängige Aufnahme von oxLDL und azetyliertem LDL (azLDL). Die SR werden in die Klassen A bis F eingeteilt [Glass und Witztum, 2001, Takahashi et al., 2002].

##### Klasse A-SR:

Die Klasse A der SR wird weiter unterteilt in Typ I, II, III und MARCO (macrophage receptor with collagenous structure). Die Typen I – III sind Produkte des gleichen Gens, sie entstehen durch alternatives Spleissen. Der Typ III Rezeptor wird nicht an der Zelloberfläche exprimiert, sondern liegt nur im Zellinneren in zytoplasmatischen Vesikeln vor und ist daher nicht an der Aufnahme von oxLDL in die Makrophagen beteiligt.

Die Typen I und II der Klasse A-SR erscheinen auf der Oberfläche von Makrophagen im Frühstadium der atherosklerotischen Plaque (diffuse intimal thickening) und sind im Stadium der „fatty streak lesions“ am höchsten exprimiert. Danach – in den fortgeschrittenen histopathologischen Stadien der atherosklerotischen Plaque – sinkt die Expression wieder ab. Die zentrale Bedeutung dieser Rezeptoren in der Entstehung von Schaumzellen wird durch in vivo Studien belegt, in denen SR-A Typ I und II-defiziente Mäuse nach Kreuzung mit ApoE-defizienten Mäusen signifikant weniger Plaques entwickelten als ApoE-defiziente Mäuse allein [Sakaguchi et al., 1998, Suzuki et al., 1997]. Allerdings konnte die Entwicklung von atherosklerotischen Plaques in diesen doppel-defizienten Mäusen nicht vollständig gehemmt werden – dies legt nahe, dass auch andere SR (z.B. MARCO oder Klasse B-SR) für die Aufnahme von oxLDL wichtig sind [Takahashi et al., 2002].

##### Klasse B-SR:

Zur Klasse B der SR zählen CD36 und der SR B-I. CD36 ist auch ein Rezeptor für Thrombospondin und Kollagen und wird in Schaumzellen deutlich höher exprimiert als in

Makrophagen. So wie für die Klasse A (Typ I und II) SR, konnte auch für CD36 in einem in vivo Modell eine wichtige Funktion in der Schaumzellenbildung belegt werden: CD36-defiziente/ApoE-defiziente Mäuse entwickeln um 75% weniger atherosklerotische Plaques als ApoE-defiziente Mäuse alleine [Febbraio et al., 2000]. SR B-I schließlich ist ein dem CD36 verwandter Rezeptor und wird v.a. als HDL-Rezeptor betrachtet.

#### Andere SR:

Zu erwähnen sind noch der Drosophila SR (dSR-C-I), der zur Klasse C gehört, sowie CD68/Makrosialin, ein Klasse D Rezeptor. Ausserdem wurde ein neuer SR beschrieben, welcher keinerlei Verwandtschaft zu den bisher bekannten SR zeigt: PSOX, er erkennt Phosphatidylserin (PS) und oxLDL und wird auf Schaumzellen exprimiert.

#### **1.3.2.5. Aufnahme von VLDL und LDL durch Makrophagen**

VLDL sind im Plasma von Patienten mit Typ III Hyperlipoproteinämie stark erhöht. Auch Versuchstiere, die eine cholesterolreiche Diät erhalten, weisen erhöhte VLDL Spiegel auf. VLDL werden über verschiedene Rezeptoren durch Makrophagen und speziell durch Schaumzellen aufgenommen und spielen daher wahrscheinlich eine Rolle in der Atherogenese. Der VLDL-R erkennt VLDL spezifisch über ApoE. Allerdings scheint auch der LDL-R zur Aufnahme von VLDL in Makrophagen beizutragen. Schließlich ist das sgn. „LDL-R-related protein“ (LRP) an der Internalisierung von VLDL in Makrophagen beteiligt [Glass und Witztum, 2001, Takahashi et al., 2002].

Der LDL-R spielt eine kritische Rolle in der Clearance von atherogenem LDL. Allerdings ist die Expression des LDL-R auf Makrophagen generell niedrig und wird speziell in atherosklerotischen Plaques hinunterreguliert. Generell ist die Expression des LDL-R umso niedriger, je mehr intrazelluläres Cholesterol bereits vorliegt. Verschiedene Studien legen auch eine Rolle des LDL-R in der Aufnahme von VLDL und in der Folge in der Schaumzellbildung nahe [Glass und Witztum, 2001, Takahashi et al., 2002].

#### **1.3.2.6. Umwandlung von Makrophagen in Schaumzellen**

Die Entwicklung von Schaumzellen beginnt mit der Aufnahme von oxLDL über SR (v.a. Klasse A, Typ I + II sowie Klasse B, CD36). Die aufgenommenen Cholesterolester werden im sauren Milieu der Lysosomen hydrolisiert – es entsteht freies Cholesterol. Freies intrazelluläres Cholesterol ist toxisch und wird im Zytoplasma durch die ACAT (Acyl-CoA-

cholesterol Acyltransferase) re-verestert. Die entstehenden Cholesterolester werden im Zytosol in Fetttropfen gespeichert und führen zur Bildung von Schaumzellen.

Die zytosolischen Cholesterolester können im weiteren durch die Hormon-sensitive Lipase hydrolysiert und in zelluläre Membranen eingebaut werden. Ein erhöhter Cholesterolgehalt der zellulären Membranen führt zu einer Hemmung der Cholesterolsynthese sowie zu einer Hinunterregulierung des LDL-R. Es gibt allerdings keine Regulationsmechanismen im Sinne einer negativen Rückkopplung, welche die weitere Aufnahme von oxLDL in den Makrophagen verhindern könnte. Aus diesem Grund ist der Cholesterolexport aus dem Makrophagen wichtig, um die Schaumzellbildung zu verhindern. Ein Cholesterolexport ist allerdings nur möglich, wenn das Cholesterol extrazellulär gebunden werden kann.

Der wichtigste extrazelluläre Akzeptor für freies Cholesterol ist HDL bzw. das Apolipoprotein A1 des HDL [Tall et al., 2000]. Ist genug extrazelluläres HDL vorhanden, so kann freies Cholesterol aus dem Makrophagen bzw. aus der Schaumzelle über ABC A1, einem Mitglied der „ATP Binding Cassette“ Transporterfamilie, exportiert werden [Tall et al., 2000]. Patienten mit einem Defekt des ABC A1 Transportes leiden an der Tangier Krankheit – sie entwickeln sehr früh atherosklerotische Läsionen und versterben jung an den Komplikationen der Atherosklerose [Bodzioch et al., 1999, Brooks-Wilson et al., 1999, Lawn et al., 1999, Rust et al., 1999]. Makrophagen können intrazelluläres Cholesterol auch durch die Synthese von ApoE, einem weiteren Akzeptor im reversen Cholesterolexport, abgeben. Dies könnte ein zweiter Mechanismus sein, der die Entstehung der atherosklerotischen Plaques verzögert [Linton et al., 1995]. Schließlich kann Cholesterol in den Makrophagen auch durch die Cholesterol Hydroxylase, ein P<sub>450</sub>-Enzym, an der Position 27 hydroxyliert werden und in dieser Form zur Leber transportiert werden [Bjorkhem, 1992].

### **1.3.2.7. Interaktion von Makrophagen mit anderen Zellen in atherosklerotischen Plaques**

#### **a. Endothelzellen**

Wie in 1.3.2.1. bereits beschrieben, sind Endothelzellen, welche das Gefäßlumen über atherosklerotischen Läsionen auskleiden, durch die entzündlichen Veränderungen in einem aktivierten Zustand und produzieren verschiedenste Zytokine welche wiederum aktivierend und chemotaktisch auf Monozyten wirken. Ausserdem exprimieren sie eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, die die Adhäsion und Transmigration der Monozyten in die atherosklerotische Läsion ermöglichen [Glass und Witztum, 2001, Takahashi et al., 2002].



b. Lymphozyten

T-Zellen (in erster Linie  $CD4^+$   $T_H$ -Zellen) wandern schon früh im zeitlichen Verlauf der Atherogenese in die Läsion ein.  $T_H$ -Zellen sezernieren proinflammatorische Zytokine ( $IFN\gamma$ , IL-2,  $TNF\alpha$  und  $-\beta$ ), welche eine wichtige Rolle in der Aktivierung der Makrophagen spielen. Makrophagen agieren wiederum als antigen-präsentierende Zellen und aktivieren B-Zellen (welche allerdings nur eine Minorität in den Plaques darstellen) zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen [Jonasson et al., 1986]. Ein wichtiges Molekül, das kritisch für die Interaktionen und die gegenseitige Aktivierung der Immunzellen in der atherosklerotischen Läsion zu sein scheint, ist CD40 und sein Ligand (CD40L) [Mach et al., 1997].

c. Vaskuläre glatte Muskelzellen

Vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMCs) entstehen aus hämatopoietischen Stammzellen, die im Knochenmark gebildet werden und im Blut zirkulieren [Sata et al., 2002]. VSMCs verändern sich phänotypisch in atherosklerotischen Läsionen unter dem Einfluss der proinflammatorischen Zytokine und werden morphologisch und funktionell zu Makrophagen-ähnlichen Zellen. VSMCs exprimieren verschiedene SR und können zu Schaumzellen werden. Die Rolle der VSMCs in der Atherogenese ist jedoch noch nicht abschließend geklärt [Raines und Ross, 1993].

### **1.3.3. Rolle von Interferon $\gamma$ ( $IFN\gamma$ ) in der Atherogenese**

Die atherosklerotische Plaque ist eine chronisch entzündliche Läsion, in der Makrophagen, T-Zellen, VSMCs und andere Zellen einerseits durch direkten Kontakt (CD40 und CD40L), v.a. jedoch über Zytokine interagieren und sich gegenseitig aktivieren. Proinflammatorische Zytokine werden dabei in grosser Menge gebildet – sie bestimmen die Entwicklung der Läsion indem sie die Funktion der Zellen sowie deren Proliferation und Überleben beeinflussen.  $IFN\gamma$  ist das klassische Makrophagen-aktivierende Zytokin – es wird in der atherosklerotischen Plaque in erster Linie von  $T_H$ -Zellen gebildet. Daneben können aber auch aktivierte Makrophagen selbst, NK-Zellen und VSMCs  $IFN\gamma$  sezernieren [Frostegard et al., 1999, Leon und Zuckerman, 2005].

Die Bedeutung von  $IFN\gamma$  in der Atherogenese wurde durch verschiedene in vivo Modelle belegt. Werden ApoE-defiziente Mäuse mit Mäusen, welche für den  $IFN\gamma$ -Rezeptor defizient sind, gekreuzt, so entwickeln diese doppel-defizienten Mäuse bedeutend weniger

atherosklerotische Läsionen im direkten Vergleich zu ApoE-defizienten Mäusen [Gupta et al., 1997]. Eine geringere Entwicklung atherosklerotischer Läsionen konnte auch in einem Mausmodell, in dem LDLR-defiziente Mäuse mit IFN $\gamma$ -defizienten Mäusen gekreuzt wurden, gezeigt werden [Buono et al., 2003]. Eine andere Studie ergab, dass IFN $\gamma$ -Injektionen die Entwicklung von atherosklerotischen Plaques in ApoE-defizienten Mäusen negativ (im Sinne einer Erhöhung) beeinflusst [Whitman et al., 2000]. Die molekularen Grundlagen für die im Tiermodell eindeutig pro-atherogenen Effekte von IFN $\gamma$  sind jedoch komplex und beruhen wahrscheinlich auf der Summierung zahlreicher Einzeleffekte.

#### **1.3.3.1. IFN $\gamma$ fördert die Einwanderung von Immunzellen in die atherosklerotische Läsion und die chronische Entzündungsreaktion**

IFN $\gamma$  induziert die Sekretion einer Reihe von Chemokinen (s. 1.3.2.1.), u.a. von MCP-1 [Rollins et al., 1990]. MCP-1 wirkt chemotaktisch auf Monozyten und T-Zellen und fördert die Adhäsion dieser Zellen an die Endothelzellen. IFN $\gamma$  führt ausserdem auch zur Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen (u.a. ICAM-1) auf Endothelzellen [Braun et al., 1995, Couffinhal et al., 1994].

Weitere Chemokine, die durch IFN $\gamma$  induziert werden sind MIP-1 („macrophage inflammatory protein“), MIG („monokine induced by IFN $\gamma$ “), IP-10 („IFN-inducible protein of 10 kDa“) und I-TAC („IFN-inducible T cell alpha chemoattractant“) [Mach et al., 1999]. MIG, IP-10 und I-TAC binden an den CXCR-3 auf T-Zellen und fördern damit die Aktivierung von T<sub>H</sub>-Zellen. Die Interaktion der Immunzellen und die Entstehung bzw. dauerhafte Erhaltung der chronischen Entzündungsreaktion wird auch durch die Induktion von CD40 und CD40-Ligand durch IFN $\gamma$  auf Endothelzellen, Makrophagen und VSMCs gefördert [Mach et al., 1997, Wagner et al., 2002]. Nicht zuletzt fördert IFN $\gamma$  die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen und bewirkt, dass sich diese in einem aktivierten Zustand befinden.

#### **1.3.3.2. Effekte von IFN $\gamma$ auf die Cholesterol- und Lipidaufnahme in Makrophagen**

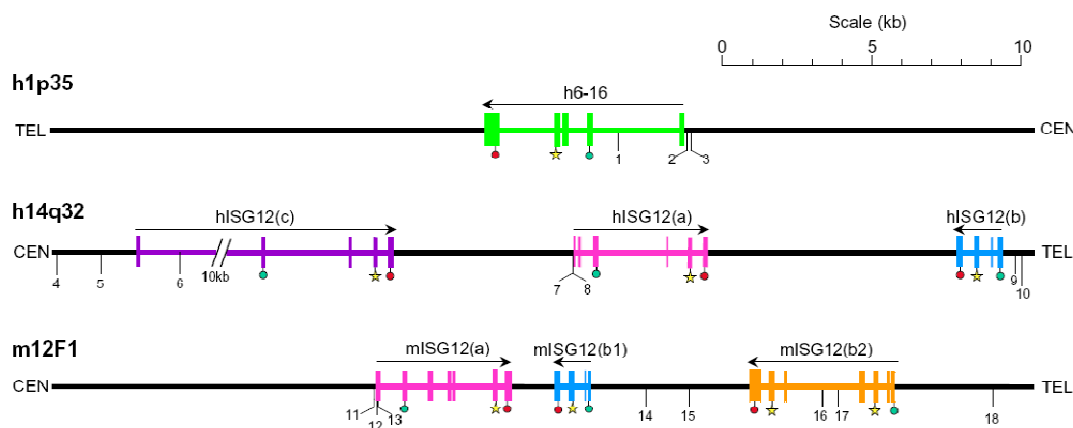
IFN $\gamma$  beeinflusst die Expression von SR auf komplexe Weise. Die Expression von SR der Klasse A sowie auch von CD36 auf Makrophagen wird durch IFN $\gamma$  vermindert [Geng und Hansson, 1992, Nakagawa et al., 1998]. Dagegen scheint die Expression von SR der Klasse A auf VSMCs erhöht zu werden [Li et al., 1995]. Zusätzlich wird die Expression von PSOX durch IFN $\gamma$  gefördert [Wagsater et al., 2004]. Diese Effekte von IFN $\gamma$  auf die Expression von

SR sind Ergebnisse von in vitro Studien, der Gesamteffekt von IFN $\gamma$  auf die Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen und VSMCs in vivo ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. IFN $\gamma$  greift in den reversen Cholesterolexport aus Makrophagen und Schaumzellen auf verschiedenen Ebenen ein. Einerseits führt IFN $\gamma$  zu einer verminderten Expression des ABC A1 Transporters [Panousis und Zuckerman, 2000a, Reiss et al., 2004]. Andererseits wird auch die Synthese von ApoE gehemmt bzw. der intrazelluläre Abbau von ApoE gefördert [Garner et al., 1997, Zuckerman et al., 1992]. Schließlich hemmt IFN $\gamma$  auch die Expression der Cholesterol Hydroxylase [Reiss et al., 2001, Reiss et al., 2004]. Parallel dazu wird die Expression der ACAT und somit die Veresterung und intrazelluläre Speicherung von Cholesterol durch IFN $\gamma$  gefördert [Panousis und Zuckerman, 2000b, Yang et al., 2001]. Insgesamt hat IFN $\gamma$  daher einen eindeutig hemmenden Effekt auf den reversen Cholesterolexport aus Makrophagen und Schaumzellen.

#### 1.3.4. „Interferon stimulated gene 12“ (ISG12): Expression, zelluläre Lokalisation, Regulation und Funktion, potentielle Bedeutung in der Atherogenese

Die ISG12 („interferon stimulated gene 12“) Proteinfamilie umfasst im Menschen 4 Gene: das 6-16 Gen auf Chromosom 1p35, sowie den Cluster der ISG12(a), ISG12(b) und ISG12(c) Gene auf Chromosom 14q32. In der Maus existieren nur 3 ISG12 Familienmitglieder, nämlich ISG12(a), ISG12(b1) und ISG12(b2), welche auf Chromosom 12F1 geclustert sind. Das murine Chromosom 12F1 entspricht dem humanen 14q32. Ein murines 6-16 Gen scheint nicht zu existieren [Parker und Porter, 2004]. Abbildung 7 zeigt die Organisation der humanen und murinen Genloci.

Abbildung 7. Organisation der humanen und murinen ISG12 Genloci. Modifiziert nach Parker et al., BMC Genomics 5:8, 2004.



Expression: ISG12 wird in verschiedenen normalen Geweben exprimiert, speziell in Kolon, Magen und Lunge [Rasmussen et al., 1993]. Ausserdem wird ISG12 in einer Reihe von Zelllinien exprimiert (DAUDI, B-lymphoid; HeLa, epithelial; HT1080, fibroblastisch; MCF-7, Mamma-Karzinom, epithelial) [Gjermansen et al., 2000]. Allerdings ist bisher wenig über die Expression in primären Tumorzellen bekannt.

Zelluläre Lokalisation:

Martensen et al. konnten mittels Western Blot zeigen, dass ISG12 in der nukleären Fraktion der Zellen vorliegt. Immunfluoreszenzmikroskopisch zeigte sich, dass ISG12 an der nukleären Membran lokalisiert ist [Martensen et al., 2001].

Regulation und Funktion:

ISG12 wurde ursprünglich als „Östrogen-induzierbares“ Gen aus der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 kloniert [Rasmussen et al., 1993]. Allerdings konnte die Expression von ISG12 nicht mit der Anwesenheit des Östrogenrezeptors korreliert werden [Rasmussen et al., 1993]. Später erkannte man, dass alle drei murinen und zwei der humanen ISG12 Gene (6-16 und (a)) durch Typ I Interferone (IFN $\alpha/\beta$ ) und teilweise auch durch Typ II Interferon (IFN $\gamma$ ) induziert werden [Gjermansen et al., 2000, Kelly et al., 1986]. Allerdings ist die Funktion dieser Gene bisher weitgehend ungeklärt geblieben. Eine Studie fand, dass ISG12 in zugrundegehendem Herzgewebe in einem Hamstermodell für Kardiomyopathie hochreguliert ist – die Autoren vermuteten daher, dass ISG12 eine Rolle als Entzündungs-assoziiertes Gen spielt [ovan-Wright et al., 2000]. Eine andere Studie zeigte, dass ISG12 im Endometrium im Implantations-Stadium exprimiert wird [Li et al., 2001]. Zuletzt konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass ISG12 eine Rolle in der Pathogenese der viralen Enzephalitis spielt [Labrada et al., 2002].

Potentielle Bedeutung in der Atherogenese:

Daten aus unserem Labor zeigen, dass ISG12 in atherosklerotischen Läsionen stark exprimiert wird. In *in vitro* Experimenten fand sich, dass die Expression von ISG12 sowohl durch IFN $\alpha$  als auch durch IFN $\gamma$  induziert wird. Funktionelle Experimente zeigten, dass die Überexpression von ISG12 zum nukleären Export von bestimmten Transkriptionsfaktoren (NR4A1, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ ) führt. Diese Transkriptionsfaktoren spielen eine protektive Rolle in der Entwicklung der atherosklerotischen Läsion – ihr nukleärer Export bzw. die Abnahme ihrer transkriptionellen Aktivität sollte daher zu einer Progression der atherosklerotischen

Läsionen führen. Um eine potentielle pro-atherogene Funktion von ISG12 *in vivo* zu untersuchen, wurden in der Folge ISG12-defiziente Mäuse an unserem Institut generiert. In einem „carotid artery ligation model“ (Ligation der A. carotis um eine standardisierte Gefäßverletzung zu erzeugen) fand sich, dass ISG12-defiziente Mäuse tatsächlich weniger Gefäßstenosen entwickelten als die Kontrollmäuse [Papac-Milicevic et al., 2007].

### 1.3.5. Bedeutung von nukleären Rezeptoren in der Atherogenese

Die Familie der „Nukleären Rezeptoren“ besteht aus Transkriptionsfaktoren, deren Liganden lipophile Hormone sind. Durch die Bindung des Liganden kommt es zu einer Konformationsänderung des Transkriptionsfaktors, sodass dieser mittels seiner DNA-Bindungsdomäne an spezifische Erkennungssequenzen in den Promotoren der Zielgene binden und diese transaktivieren kann. In den letzten Jahren wurde erkannt, dass Medikamente, welche den Fett- und Kohlehydratstoffwechsel (und somit auch die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen) beeinflussen, spezifisch an Transkriptionsfaktoren aus der Familie der nukleären Rezeptoren binden und diese aktivieren.

Der Östrogenrezeptor ist ein wichtiges pharmakologisches Ziel in der Brustkrebstherapie sowie in der (postmenopausalen) Hormonersatztherapie. SERMs (selective estrogen receptor modulators) [Vogelvang et al., 2006], z.B. Tamoxifen, üben in bestimmten Organen pro-östrogene, in anderen Organen jedoch anti-östrogene Wirkungen aus. Interessanterweise fand man, dass postmenopausale Frauen, welche Tamoxifen als Begleittherapie nach einer Brustkrebsoperation bekamen, viel weniger Myokardinfarkte erlitten als gleichaltrige Frauen in einer Kontrollgruppe [McDonald und Stewart, 1991, Rutqvist und Mattsson, 1993]. Weiters konnte gezeigt werden, dass Tamoxifen den Serum-Cholesterolspiegel erniedrigt und die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen in ApoE-defizienten Mäusen drastisch hemmt [Reckless et al., 1997]. Die unterschiedlichen Wirkungen der SERMs in unterschiedlichen Organen kommen wahrscheinlich dadurch zustande, dass – abhängig vom Gewebe – unterschiedliche Transkriptionsfaktoren mit dem Östrogenrezeptor zusammenwirken bzw. von den SERMs moduliert werden um die Expression der Zielgene zu beeinflussen.

Die Familie der „peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPARs) gehört ebenfalls zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Diese Transkriptionsfaktoren wurden ursprünglich nach ihrer Fähigkeit, in der Leber (als Antwort auf Xenobiotika) peroxisomale Proliferation

auszulösen, benannt. Später erkannte man, dass PPARs eine wichtige Rolle im Fett- und Kohlehydratstoffwechsel spielen.

PPAR $\alpha$  greift in die Regulation des Fettstoffwechsels ein und beeinflusst u.a. die  $\beta$ -Oxidation sowie die zelluläre Aufnahme von triglyzeridreichen Lipoproteinen. Interessanterweise stimuliert PPAR $\alpha$  die Expression von ApoA1 und führt zu einer Erhöhung des HDL-Spiegels. Die triglyzeridsenkenden Medikamente aus der Klasse der Fibrate wirken über Bindung und Aktivierung von PPAR $\alpha$ . Der endogene Ligand von PPAR $\alpha$  ist noch nicht endgültig identifiziert. Es wird diskutiert, dass (von der Fettsäuresynthese) de novo synthetisierten Fettsäuren (z.B. Palmitinsäure) [Glass und Witztum, 2001, Lefebvre et al., 2006] als Liganden von PPAR $\alpha$  fungieren.

PPAR $\gamma$  spielt eine wichtige Rolle in der Fettzellentwicklung sowie im Glukosestoffwechsel [Semple et al., 2006]. Insulin-Sensitizer aus der Klasse der Thiazolidine binden und aktivieren PPAR $\gamma$ . In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass verschiedene ungesättigte Fettsäuren, oxidierte Lipide, Eicosanide und Prostaglandine (in allerdings sehr hoher (pharmakologischen) Konzentration) an PPAR $\gamma$  binden. Ein spezifischer endogener Ligand konnte bisher nicht identifiziert werden. Es könnte daher sein, dass PPAR $\gamma$  als endogener „Sensor“ für freie Fettsäuren und ähnliche Moleküle dient [Semple et al., 2006].

PPAR $\gamma$  wird in Schaumzellen stark exprimiert und führt zu erhöhter Expression des SR CD36 [Moore et al., 2001]. Dieser prinzipiell pro-atherogenen Wirkung stehen allerdings zahlreiche anti-atherogene Wirkungen gegenüber. So wird die Expression von TNF $\alpha$  und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen durch PPAR $\gamma$  gehemmt [Jiang et al., 1998]. Ausserdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass PPAR $\gamma$  die Expression von ABC A1 und damit den Cholesterol Efflux aus den Makrophagen und Schaumzellen verbessert [Chawla et al., 2001]. In LDLR-defizienten Mäusen hemmen PPAR $\gamma$ -Agonisten die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen [Li et al., 2000]. Werden LDLR-defiziente Mäuse mit Knochenmark von PPAR $\gamma$ -defizienten Mäusen transplantiert, so entwickeln diese Mäuse vermehrt Atherosklerose [Chawla et al., 2001]. Insgesamt hat PPAR $\gamma$  einen eindeutig protektiven Effekt in der Atherogenese [Glass und Witztum, 2001, Semple et al., 2006].

Die Liver X Rezeptor (LXR) Familie der nukleären Rezeptoren reguliert (gemeinsam mit den SREBP Transkriptionsfaktoren) die Cholesterolhomöostase [Repa et al., 2000a]. Erhöhte Cholesterolspiegel hemmen die Transkription von SREBP Zielgenen und stimulieren die Transkription von LXR Zielgenen. LXRs regulieren beispielsweise die 7 $\alpha$ -Hydroxylase (das Schlüsselenzym der Gallensäuresynthese – und somit der Cholesterolausscheidung) sowie das ABC A1 Gen [Costet et al., 2000, Repa et al., 2000b]. Mäuse, welche für LXR $\alpha$  defizient sind

entwickeln unter einer cholesterolreichen Kost eine massive Hepatomegalie aufgrund vermehrter Cholesterolaufnahme und verminderter Cholesterolausscheidung [Peet et al., 1998].

Die NR4A Familie der nukleären Rezeptoren wurde ursprünglich als „early response genes“ von Wachstumsfaktoren beschrieben [Martinez-Gonzalez und Badimon, 2005, Pols et al., 2007]. Zu dieser Gruppe der nukleären Rezeptoren gehören Nur77 (=NR4A1), Nurr1 (NR4A2) und Nor1 (NR4A3). Die NR4A Transkriptionsfaktoren spielen eine Rolle in der Differenzierung von dopaminergen Neuronen sowie in der Auslösung von Apoptose in Lymphozyten. Sie scheinen keinen Liganden zu besitzen (daher auch die Bezeichnung „orphan receptors“), sondern werden offensichtlich durch die Höhe ihrer Expression reguliert. Neuere Studien konnten zeigen, dass die Mitglieder der NR4A Familie in Makrophagen durch pro-inflammatorische Stimuli induziert werden und daher wahrscheinlich auch eine Rolle in der Atherogenese spielen [Pei et al., 2005]. In vivo Studien sprechen dafür, dass Hemmung von NR4A1 in VSMCs einen negativen Effekt auf die Intima nach Gefäßschädigungen hat, während Überexpression von NR4A1 die neointimale Proliferation nach Gefäßverletzungen hemmt [Arkenbout et al., 2002].

Daten aus unserem Labor zeigen, dass ISG12 die subzelluläre Lokalisation von NR4A1 beeinflusst (Überexpression von ISG12 führt zum nukleären Export von NR4A1, s. auch 1.2.4.) [Papac-Milicevic et al., 2007]. Der Effekt von ISG12 auf NR4A1 (und andere nukleäre Rezeptoren) könnte daher den zentralen Mechanismus darstellen, über den ISG12 die Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen beeinflusst.

### **1.3.6. Beschreibung der ISG12<sup>-/-</sup> Maus**

Mäuse, welche defizient für das ISG12(b2) Gen sind, wurden in unserem Labor entsprechend publizierter Techniken generiert [Papac-Milicevic et al., 2007]. Das ISG12(b2) Gen besteht aus vier Exons, welche durch drei relativ kleine Introns getrennt sind. Alle 4 Exons des ISG12(b2) Gens wurden durch die Integration des Targeting Vektors, der ein Neomycin Gen enthält, zerstört. Die korrekte Integration des Targeting Vektors wurde mittels Southern Blot nachgewiesen. Die fehlende Expression von ISG12 konnte mittels RT-PCR gezeigt werden [Papac-Milicevic et al., 2007].

Die ISG12-defizienten Mäuse hatten keine offensichtlichen phänotypischen Abnormalitäten, sie zeigten normales Wachstum, normales Überleben und normale Fertilität [Papac-Milicevic et al., 2007].

### **1.3.7. Mausmodelle zur Untersuchung der Atherogenese**

Mäuse sind äusserst resistent gegen die Entwicklung atherosklerotischer Plaques [Jawien et al., 2004]. Die einzige Ausnahme ist der C57Bl/6 Stamm: wenn C57Bl/6-Mäusen mit einer sehr cholesterolreichen und gallensäurehaltigen Diät gefüttert werden, entwickeln sie atherosklerotische Läsionen. Das erste Atherosklerose-Mausmodell wurde in den 1960er Jahren von Wissler et al. eingeführt. Die „Wissler Diät“ enthielt 30% Fett, 5% Cholesterol und 2% Gallensäuren und war äusserst toxisch für die Mäuse (Gewichtsverlust, tödliche respiratorische Infektionen).

Paigen et al. modifizierten diese Diät; die „Paigen Diät“ enthielt nur noch 15% Fett, 1.25 % Cholesterol und 0.5% Gallensäuren. Obwohl C57Bl/6 Mäuse und die Paigen Diät als Atherosklerose Modell verwendet wurden, hatte dieses Modell einige gravierende Nachteile. Die atherosklerotischen Läsion blieben sehr klein, waren auf den Aortenbogen begrenzt und entwickelten sich nicht über das Schaumzellstadium hinaus. Ausserdem war die Paigen Diät nach wie vor sehr unphysiologisch – es wurde in der Folge gezeigt dass diese Diät für sich allein schon pro-inflammatorisch wirkt. Aus diesen Gründen wurden die meisten Studien bis zum Jahr 1992, dem Jahr in dem die ApoE-defiziente Maus als Atherosklerosemodell eingeführt wurde, in Kaninchen und in geringerer Anzahl auch in Schweinen und Affen durchgeführt. Kaninchen entwickeln zwar nicht spontan atherosklerotische Läsionen, unter einer cholesterolhaltigen Diät entstehen jedoch sehr rasch Plaques. Allerdings werden die Plasma-Cholesterolspiegel bei Hasen extrem hoch und ihre Läsionen sind viel entzündlicher (mehr Makrophagen und Schaumzellen) als beim Menschen. Affen sind prinzipiell ein gutes Modell, werden aufgrund der Grösse der Tiere, der Kosten und nicht zuletzt auch aus Arterhaltungsgründen jedoch kaum noch verwendet. Auch Schweine stellen sehr gute Atherosklerosemodelle dar – das Lipoproteinprofil im Plasma sowie die Läsionen sind denen des Menschen sehr ähnlich. Allerdings sind auch Schweine für grössere Studien zu teuer, es ist schwierig entsprechend grosse Kolonien aufzubauen, und die Handhabung der grossen Tiere ist nicht leicht [Jawien et al., 2004].



### 1.3.7.1 ApoE-defiziente Mäuse

ApoE ist ein Glykoprotein von etwa 34 kDa, das (sowohl beim Menschen als auch in der Maus) von Leber, Gehirn und anderen Geweben produziert wird. Es ist Teil aller Lipoproteine ausser von LDL. Die wichtigste Funktion von ApoE ist es, als Ligand für den ApoB und ApoE (LDL)-Rezeptor sowie für den Chylomikronen Remnant Rezeptor zu dienen – dadurch wird die Entfernung der Lipoproteine aus der Zirkulation durch die Leber möglich.

Im Jahr 1992 wurden ApoE-defiziente Mäuse gleichzeitig von zwei verschiedenen Gruppen als Atherosklerosemodell vorgestellt [Piedrahita et al., 1992, Plump et al., 1992]. Die Mäuse hatten keinen offensichtlichen Phänotyp, zeigten eine normale Entwicklung und normales Wachstum und waren auch normal fertil. Allerdings hatten sie ein deutlich pathologisches Lipoproteinprofil (Tabelle 3) – und zwar unter einer normalen Diät. Interessanterweise zeigten sie auch eine Umverteilung des Cholesterols von HDL (das bei Mäusen normalerweise das Hauptlipoprotein darstellt) zu Chylomikronen und VLDL.

**Tabelle 3. Plasma Cholesterol- und Triglyzeridspiegel in ApoE-defizienten C57Bl/6 Mäusen (mg/dl, ± SD)**

Genotyp	Gesamt-Cholesterol	HDL-Cholesterol	Triglyzeride
+/+	86 ± 20	73 ± 28	73 ± 36
+/-	88 ± 22	75 ± 18	102 ± 40
-/-	434 ± 129	33 ± 15	123 ± 51

Modifiziert nach Jawien, et al. J. Physiol Pharmacol. 55:503, 2004.

Die Entwicklung der atherosklerotischen Plaques in ApoE-defizienten Mäusen reflektiert diejenige in grösseren Tieren und im Menschen erstaunlich gut. Der Hauptunterschied zwischen diesem Mausmodell und dem Menschen besteht darin, dass die Plaques in den ApoE-defizienten Mäusen nicht rupturieren. Ein möglicher Grund für dieses Phänomen könnte im geringen Durchmesser der murinen Aorta (< 1 mm) liegen: mit dem Abnehmen des Gefäßdurchmessers steigt die Oberflächenspannung exponentiell an, es könnte daher sein, dass eine Plaqueruptur allein aufgrund der hohen Oberflächenspannung in der Maus nicht zustande kommt.

### 1.3.7.2. LDLR-defiziente Mäuse

Im Jahr 1993 wurden LDLR-defiziente Mäuse als Atherosklerosemodell eingeführt [Ishibashi et al., 1993]. Diese Mäuse haben einen weit geringeren Anstieg des Plasmacholesterols unter einer normalen Diät (etwa 250 mg/dL) als ApoE-defiziente Mäuse und entwickeln unter einer normalen Diät auch keine atherosklerotischen Läsionen. Um die Entwicklung

atherosklerotischer Läsionen zu induzieren, werden LDLR-defiziente Mäuse mit einer „Western Diet“ gefüttert (21% Fett, 0.15% Cholesterol, keine Gallensäuren).

### **1.3.7.3. Knochenmarkstransplantationsmodelle**

Will man den Effekt eines bestimmten Genproduktes auf die Atherogenese untersuchen, so können Mäuse, welche defizient für dieses Gen sind, mit ApoE-defizienten oder LDLR-defizienten Mäuse gekreuzt werden [Linton und Fazio, 1999]. Wenn jedoch pro- oder antiatherogene Effekte dieses Genproduktes ausschließlich in den hämatopoietischen Zellen, insbesondere in den Makrophagen, untersucht werden sollen, dann werden ApoE-defiziente oder LDLR-defiziente Mäuse mit dem Knochenmark von Mäusen, welche defizient für das zu untersuchende Gen sind, transplantiert. Durch diese Transplantationsmodelle ist es möglich, die Bedeutung eines Gens für die Atherogenese spezifisch in den Makrophagen zu untersuchen und den Effekt dieses Gens in anderen Zellen, z.B. Endothelzellen, auszublenden. Allerdings kann bereits die Bestrahlung und Transplantation der Mäuse allein Effekte auf die Atherogenese haben. So wurde gezeigt, dass durch die Transplantation an sich die Grösse der Läsionen abnimmt und dass sich atherosklerotische Läsionen in transplantierten Mäusen auch histopathologisch von Läsionen in nicht-transplantierten Mäusen unterscheiden [Schiller et al., 2001].

## **2. Methodik**

### **2.1. Tierhaltung**

ISG12-defiziente Mäuse (4. Generation im C57Bl/6 Background), sowie LDLR-defiziente Mäuse (C57Bl/6 Background) wurden zu je vier Tieren in 20 x 20 cm grossen Käfigen gehalten. Die Tiere hatten Zugang zu Wasser und Futter ad libitum. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch einen automatischen zwölf Stunden Licht-Dunkel Zyklus simuliert. Alle Experimente mit Mäusen wurden entsprechend den ethischen Richtlinien (<http://www.meduniwien.ac.at/center-biomed-research>) der Medizinischen Universität Wien durchgeführt.

## 2.2. Rückkreuzen von ISG12-defizienten Mäusen in den C57Bl/6 genetischen Hintergrund

Für die Atherosklerosestudien wurden ISG12-defiziente Mäuse in einem gemischten genetischen Hintergrund (129S/v und Swiss) bis zur vierten Generation in den C57Bl/6 Hintergrund zurückgekreuzt. ISG12<sup>+/-</sup> Mäuse wurden mit (reinen) C57Bl/6 Mäusen gekreuzt, die Nachkommen wurden am Tag 21 abgesetzt und im Alter von vier bis fünf Wochen genotypisiert. ISG12<sup>+/-</sup> Tiere im Alter von sechs bis sieben Wochen wurden dann wieder mit einem C57Bl/6 Partner weitergekreuzt. Für jede Generation wurde ein anderes C57Bl/6 Tier verwendet.

## 2.3. Genotypisierung

### 2.3.1. Kennzeichnung der Mäuse und Lyse des Ohrgewebes

Die Mäuse wurden im Alter von vier bis fünf Wochen mit Hilfe eines Ohrmarkers nach dem Schema in Abbildung 8 gekennzeichnet. Das aus dem Ohr ausgestanzte Gewebstück (Durchmesser etwa 2 mm) wurde in einem 1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß in 75 µl Lysis Buffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 5) verdaut. Das Gewebstück wurde mindestens drei Stunden bei 55°C unter Schütteln verdaut. Danach wurde das Lysat mit Aqua bidest. auf 1 ml verdünnt und die Proteinase K zehn Minuten lang bei 99°C im Heizblock inaktiviert. Von diesem Lysat wurde 1 µl in der PCR Reaktion für die Genotypisierung eingesetzt.

Abbildung 8. Schema der Ohrmarken zur Identifizierung der Mäuse.

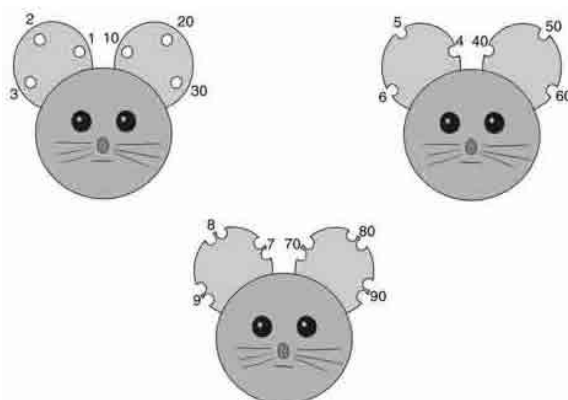


Tabelle 4. Lysis Buffer für den Gewebsverdau

Bestandteil	Konzentration final	Konzentration der Stammlösung	Menge an Stammlösung für 100 ml Lysis Buffer	Zweck
Tris-Cl pH 8.0	100 mM	1 M	10 ml	Pufferung
NaCl	200 mM	2 M	10 ml	Pufferung
EDTA pH 8.0	5 mM	0.5 M	1 ml	Hemmung der DNAsen
SDS	0.2%	20%	1 ml	Detergens, Zellaufschluss
Proteinase K	10 mg/ml	100 mg/ml	wird frisch dazugegeben	Verdau der zellulären Proteine

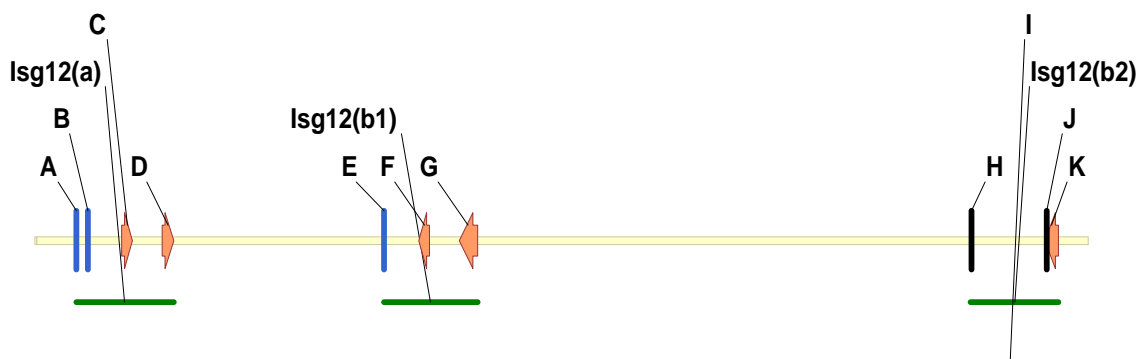
### 2.3.2. DNA Isolierung aus Blut

Die Isolierung genomischer DNA aus Blut erfolgte mit Hilfe des 'QIAamp DNA Blood Mini Kits' (Qiagen, Hilden, Deutschland).

### 2.3.3. Sequenzierung und Primerdesign

Abbildung 9 zeigt die Organisation der drei murinen Isg12 Gene. Auf etwa 16 kb genomischer DNA liegen Isg12(a) mit 4 Exons (A bis D), Isg12(b1) mit 3 Exons (E-G) und Isg12b(2) mit 4 Exons (H-K). Die Pfeilrichtung zeigt die Orientierung der Gene an. Diese Übersicht sowie die Alignments (s.u.) wurde mit Hilfe des Programms Vector NTI (Invitrogen) und der Ensembl Datenbank ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) erstellt.

Abbildung 9. Organisation der drei murinen ISG12 Gene.

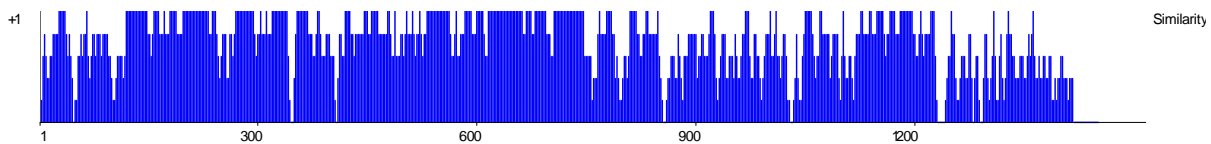


isg12 genomic sequence overview

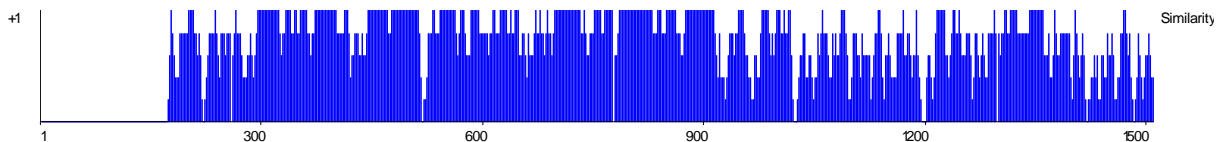
16114 bp

Das Hauptproblem bei der Genotypisierung der ISG12-defizienten Mäuse bestand darin, dass das ISG12(b2) Gen, für welches diese Mäuse defizient sind, zu den beiden anderen ISG12-Genen, nämlich (a) und (b1), grosse Homologien aufweist. Abbildung 10 zeigt das Alignment von ISG12(b2) gegen (b1) und gegen (a), wobei bei diesem Alignment auch die Introns berücksichtigt wurden, d.h. es wurden jeweils die gesamten in Abbildung 9 grün markierten genomischen Sequenzen analysiert.

**Abbildung 10A. Alignment (Identität = 72%) von ISG12(b2) gegen ISG12(b1).**



**Abbildung 10B. Alignment (Identität = 67%) von ISG12(b2) gegen ISG12(a).**



Während auf der X-Achse die Basenpaare aufgetragen sind (ISG12(a): 1502 bp; ISG12(b1): 1426 bp; ISG12(b2): 1347 bp), ist auf der Y-Achse die „Similarity“ aufgetragen (eine Similarity von 1 bedeutet, dass die Sequenzen identisch sind). Man sieht, dass (sogar bei Berücksichtigung der intronischen Sequenzen) eine grosse Homologie zwischen diesen Genen besteht. Um spezifische Primer für ISG12(b2) zu erstellen war es daher zunächst notwendig, den genauen Integrationsort des Targeting Vektors festzustellen.

Zu diesem Zweck wurde eine PCR von genomischer DNA einer ISG12<sup>-/-</sup> Maus durchgeführt: der Forward Primer lag vor dem Exon H von Isg12(b2) (5'-CAGAAAGGAGCTGTAGCCAACTCTC-3'), der Reverse Primer lag innerhalb des Targeting Vektor auf dem Neomycinresistenzgen (5'-AATGTGTGCGAGGCCAGAGG-3').

Das entstehende PCR Produkt (630 bp) wurde dann mit einem Enzymmix (ExoSapIT, Invitrogen, Carlsbad, CA) aus einer Phosphatase (dephosphoryliert die überschüssigen Nukleotide der PCR) und einer DNase (degradiert die einzelsträngige DNA der PCR Primer) verdaut (5 µl PCR Produkt + 2 µl ExoSapIT, Verdau 30 Minuten auf 37°C, danach Inaktivierung der Enzyme für 10 Minuten bei 70°C).

Danach wurde die Sequenzreaktion nach folgendem Schema angesetzt:

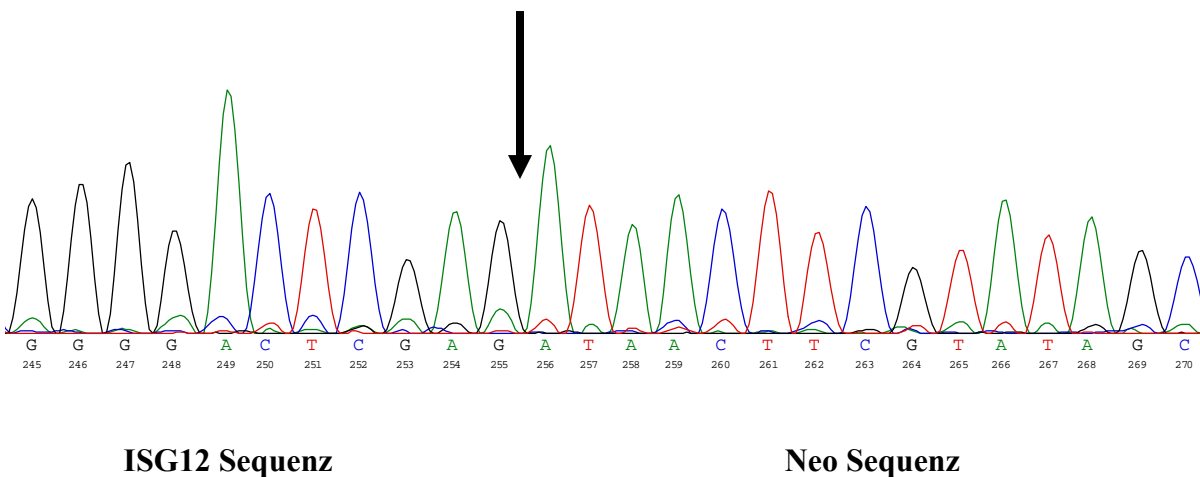
5x Sequenzier Puffer (Applied Biosystems, Foster City, CA)	1.75 µl
Big Dye Terminator Mix version 3.1 (Applied Biosystems)	0.5 µl
Primer 3.3 pmol/µl	1 µl
PCR Produkt	7 µl

Die Sequenzreaktion wurde nach folgendem Temperaturprotokoll ausgeführt:

1 min	96°C	1x
10 sec	96°C	25x
5 sec	50°C	25x
4 min	60°C	25x
Hold	4°C	

Um die überschüssigen Nukleotide und die Primer aus der Sequenzreaktion zu entfernen, wurde eine Aufreinigung mit Hilfe einer 96well Aufreinigungsplatte (Millipore) durchgeführt. Die Sequenzierung wurde anschließend auf einem ABI-3100XL Sequenzierer der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Abbildung 11 zeigt den Teil der Sequenz, in dem der Übergang der genomischen DNA in den Targeting Vektor (Pfeil) zu sehen ist.

**Abbildung 11. Genomische Sequenz der ISG12-defizienten Maus mit Integration des Targeting Vektors (Pfeil).**



In Kenntnis des genauen Integrationsortes des Targeting Vektors wurden schließlich Primer mit Hilfe des Programms „Primer3“ für die Genotypisierung erstellt. Das Programm „Primer3“ findet sich unter ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Es

war danach notwendig, verschiedene Primer Kombinationen zu testen um ein Primerpaar zu identifizieren, welches keine unspezifischen Banden amplifiziert. Schließlich wurden folgende Primerpaare ausgewählt: ISG12wt-f: 5'-CAACTCCTCCCATTTCCTCA-3', ISG12wt-r: 5'-CTCTCTCCTTCACACACACACA-3' zur Amplifikation des ISG12 wildtyp Allels sowie ISG12ko-f: 5'-CTCTCCTCCCAACTCCTTCC-3' und Neo-r: 5'-GCCAGAGGCCACTTGTGTAG-3' zur Amplifikation des Knockout-Allels.

Abbildung 12 zeigt die Sequenz des ursprünglich sequenzierten PCR Produktes (die Primer mit denen dieses PCR Produkt amplifiziert und sequenziert wurde, sind unterstrichen), den Übergang in den Targeting Vektor (die Sequenz des Targeting Vektors ist fett markiert) sowie die neu erstellten Genotypisierungsprimer für die Amplifikation des Knockout-Allels (rot).

**Abbildung 12. Nukleotidsequenz des sequenzierten PCR Produktes (Primer sind unterstrichen, ISG12 Sequenz normal, Neo Sequenz fett, neu erstellte Primer sind rot):**

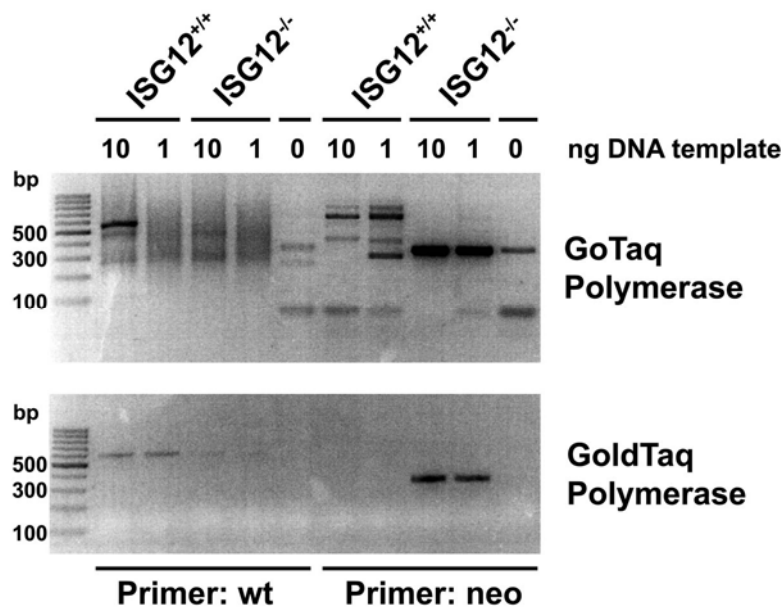
```
C AGAAAGGAGC TGTAGCCAAC
13101 TCTCCTCCCA GCTCTCCTCC CAACTCTCCT CCTCCCAATT
      CCTTCCTGAT AGACACCTGA GAGGAGGCTG CAGCTCACTG
      CCTCCCCCCC CTTCCCCCCC CCCCCCCCCC CCCGCCAGAA
      AGGAGCTGTA GCCAACTCTC CTCCCAACTC TCCTCCTCCC
      AATTCCTTCC TGATAGACAC CTGAGAGGAG GCTGCAGCTC
13301 ACGCCCCCAC CCCCCTCGC CAGAAAGGAG CTGTAGCCAA
      CTCTCCTCCC AACTCTCCTC CCAACTCCTT CCAACTCCTC
      CCATTTCCCTC AGCTAGCTGT TAAAAGCCCC CTCCTGTCAG
      TGCTCAGGGT CGAACTCCCC TGCCTGTCAT GGCAGAGGGA
      CTTTCATCCTC AGCTAGCTGA TAAAACCTCT TGCAGTTTGC
13501 ATCAGGTGTG GGTCACTGGG GTGCTGTCCA GCTCATCCCG
      GGGACTCGAG ATAACTTCGT ATAGCATACA TTATACGAAG
      TTATGGCCCC TGCAGGTCAA TTCTACCGGG TAGGGGAGGC
      GCTTTTCCCA AGGCAGTCTG GAGCATGCGC TTTAGCAGCC
      CCGCTGGGCA CTTGGCGCTA CACAAGTGGC CTCTGGCCTC
13701 GCACACATT
```

### 2.3.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde mit zwei verschiedenen Polymerasen (GoldTaq, Applied Biosystems und GoTaq, Promega, Madison, WI) sowie bei verschiedenen Annealing Temperaturen (Temperaturgradient) ausgetestet. Dabei zeigte sich zunächst, dass die GoTaq Polymerase viel prozessiver ist als die GoldTaq Polymerase. Hohe Prozessivität einer Polymerase ist

eigentlich ein Vorteil, bei der ISG12-Genotypisierung stellte sich jedoch heraus, dass die GoTaq Polymerase gerade aufgrund ihrer hohen Prozessivität viele unspezifische Produkte amplifiziert. Daher wurden alle weiteren Experimente mit der GoldTaq Polymerase von Applied Biosystems durchgeführt. Diese Polymerase ist eine Hot Start Polymerase, was wahrscheinlich auch wesentlich zu der beobachteten spezifischeren Amplifikation beiträgt. Abbildung 13 zeigt den Vergleich zwischen GoldTaq und GoTaq Polymerase.

**Abbildung 13. Genotypisierung von ISG12<sup>+/+</sup> bzw. ISG12<sup>-/-</sup> Mäusen – Vergleich zwischen GoTaq und GoldTaq Polymerase.**



Die PCR Reaktion wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Buffer 10x	2.5 µl
dNTPs (2mM)	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (2 mM)	2 µl
DNA	1 µl
GoldTaq Polymerase	0.25 µl
Wasser	ad 25 µl

Folgendes Temperaturprotokoll wurde verwendet:

95°C	2 min (initiale Denaturierung)	
95°C	40 sec (Denaturierung)	
61°C	40 sec (Annealing)	40 Zyklen
72°C	40 sec (Extension)	
72°C	3 min (finale Extension)	
4°C	∞ (Hold)	



### **2.3.5. Gelelektrophorese**

Die PCR Produkte wurden auf einem 1.5%igen, ethidiumbromid-hältigen Agarosegel aufgetrennt und mittels UV-Licht in einem Transilluminator sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Thermodruckers bzw. digital.

## **2.4. Untersuchung der in vitro Schaumzellbildung**

### **2.4.1. Erzeugung von oxidiertem LDL (oxLDL)**

LDL ( $\rho = 1.019-1.063$  g/ml) wurde aus dem Plasma von Normal Spendern mittels präparativer, sequentieller Ultrazentrifugation gewonnen [Havel et al., 1955, Redgrave et al., 1975]. Die Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Optima TLX Ultrazentrifuge (Beckman). Danach wurde das LDL mit Hilfe eines Dialyseschlauches (Porengröße 500 kDa) 48 Stunden lang gegen PBS dialysiert, steril filtriert und auf 4°C gelagert. oxLDL wurde durch Zugabe von  $\text{CuSO}_4$  (finale Konzentration 10  $\mu\text{M}$ ) zu EDTA-freiem LDL und Inkubation über Nacht (37°C) erzeugt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (200  $\mu\text{M}$ ) gestoppt. Das oxLDL wurde danach erneut über Nacht gegen PBS-EDTA (200  $\mu\text{M}$ ) dialysiert.

### **2.4.2. In vitro Schaumzellbildung**

Um Makrophagen von ISG12<sup>-/-</sup> bzw. ISG12<sup>+/+</sup> Mäusen zu gewinnen, wurde jeweils zwei Mäusen 1 ml 4%iges Thioglykolat intraperitoneal injiziert. Nach 72 Stunden wurde die Peritonealhöhle der Mäuse mit 8 ml eiskaltem PBS gespült und die Makrophagen entnommen. Die Makrophagen wurden dann 24 Stunden lang auf Objektträgern in der Anwesenheit von oxLDL oder in Kontrollmedium (Dulbeccos' modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum) kultiviert. Nach Fixation mit 4%igem Formaldehyd, wurden die intrazellulären Lipide mit „Oil Red O“ gefärbt. Danach wurden die Zellen mit Hämatoxylin gegengefärbt. Mindestens 200 Zellen wurden von drei unterschiedlichen Regionen des Objektträgers gezählt und der Anteil der Schaumzellen basierend auf dem intrazellulären Lipidgehalt („Oil Red O“-Färbung) festgestellt. Der Anteil der Schaumzellen wurde als Prozentsatz der Gesamtzellanzahl ausgedrückt.

## **2.5. Knochenmarkstransplantation**

### **2.5.1. Bestrahlung der Mäuse**

Um die eigenen Knochenmarkszellen der Mäuse vollständig abzutöten, erhielten die Empfängertiere (fünf bis sechs Wochen alte weibliche LDLR-defiziente Mäuse) eine letale Ganzkörperbestrahlung (12 Gy Gesamtdosis, Cobalt-60-Strahlungsquelle). Werden diese Mäuse im weiteren nicht transplantiert, so sterben sie zwischen dem zehnten und zwölften Tag nach Bestrahlung aufgrund einer Aplasie der Hämatopoese.

### **2.5.2. Entnahme des Spender-Knochenmarks**

Je zwei ISG12<sup>-/-</sup> bzw. ISG12<sup>+/+</sup> Mäusen wurden durch Überanästhesie mit Isofluran (Isoforane<sup>®</sup>, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) getötet. Danach wurden Femur und Tibia beider Hinterbeine mit PBS unter sterilen Bedingungen gespült um das Knochenmark zu entnehmen. Die Leukozytenzahl wurde in einer Fuchs-Rosenthal Zählkammer bestimmt und 2 Millionen Zellen in 100 µl PBS resuspendiert.

### **2.5.3. Transplantation**

Nach der Bestrahlung der LDLR-defizienten Mäuse wurden diese in zwei Gruppen zu je neun Mäusen randomisiert. Beide Gruppen unterschieden sich nicht im mittleren Gewicht (21.6±0.9 g versus 21.3±0.7 g) oder Alter (51 Tage± 7 Tage in beiden Gruppen) , alle Mäuse waren weiblich. Eine Gruppe erhielt Knochenmark von ISG12<sup>-/-</sup> Mäusen, die andere erhielt Knochenmark von ISG12<sup>+/+</sup> Mäusen. Eine Kontrollmaus erhielt kein Knochenmark. Die Transplantation erfolgte durch retro-orbitale Injektion von jeweils zwei Millionen Knochenmarkszellen nach Kurzanästhesie der Tiere mit Isofluran. Nach der Transplantation wurden die Mäuse vier Wochen lang zur Knochenmarksrekonstitution auf einer normalen Diät gehalten.

## **2.6. Fettdiät**

Vier Wochen nach der Transplantation wurden beide Gruppen auf eine dreimonatige Fettdiät vom Typ der „Western Diet“ gesetzt. Die Fettdiät (ssniff<sup>®</sup> EF R/M TD88137, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) enthielt 42% Fett, 43% Kohlehydrate und 15% Protein. Die Lagerung des Futters erfolgte bei 4°C. Die Fettdiät wurde von beiden Gruppen gut toleriert. Das Gewicht der Mäuse wurde regelmäßig dokumentiert.

## **2.7. Messung von Triglyzeriden und Cholesterol im Serum**

Vor Beginn der Fettdiät sowie vier, acht und zwölf Wochen nach Beginn der Fettdiät wurde den Mäusen unter Kurzanästhesie mit Isofluran retro-orbital mittels heparinierter Mikrohämatokritkapillaren 75 µl Blut abgenommen. Das Blut wurde zehn Minuten lang bei 2100 g auf 4°C zentrifugiert, danach wurde das Plasma abgehoben und auf -20°C eingefroren. Nach der letzten Blutabnahme wurde das Plasma einmalig aufgetaut und 1:5 mit PBS verdünnt. Der Plasma-Triglyzerid und -Cholesterolspiegel wurde auf einem Olympus AU2700 (Olympus, Tokyo, Japan) am Klinischen Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik der Medizinischen Universität Wien bestimmt.

## **2.8. En face Präparation der Aorta und des Herzens [Tangirala et al., 1995]**

Nach Abschluss der dreimonatigen Fettdiät wurden die Mäuse durch Überanästhesie mit Isofluran getötet. Unmittelbar nach Eintritt des Todes wurde die Vena cava inferior freigelegt, mit einer 27 gauge Nadel anpunktiert und 100 µl einer 3.8%igen Zitratlösung zur Antikoagulation eingespritzt. Danach wurden im selben Arbeitsschritt 800 µl Blut abgenommen. Im weiteren wurden die Rippen beidseits des Sternums durchtrennt, das Sternum nach oben geklappt und der linke Ventrikel mit einer 25 gauge Nadel punktiert. Das Tier wurde sodann mit 20 ml PBS über einen Zeitraum von 15 Minuten perfundiert. Der Fortschritt der Perfusion wurde anhand der Entfärbung von Leber und Nieren beurteilt. Danach folgte die Perfusion mit 15 ml einer 3.8%iger Zink-Formalinlösung über einen Zeitraum von 10 Minuten. Nach Entfernung der inneren Organe wurde die Aorta vom Aortenursprung an der Herzbasis über den Aortenbogen, die Aorta thoracalis sowie die Aorta

abdominalis bis etwa 5 mm distal der iliakalen Bifurkation in situ präpariert. Dieser Arbeitsschritt erfolgte mit Hilfe eines Mikrodisektionsmikroskopes (Zeiss, Göttingen, Deutschland) unter 20facher Vergrößerung und erforderte die vollständige Entfernung des umliegenden Fettgewebes sowie der Adventitia der Aorta. Danach wurde die gesamte Aorta in situ longitudinal aufgeschnitten. Zuerst wurde ein Schnitt von der Aorta abdominalis herzwärts und an der inneren Kurvatur des Aortenbogens bis zur Herzbasis geführt. Danach wurde die Herzbasis oberhalb der Klappenebene parallel zur Aortenklappe abgetrennt. Ein zweiter Schnitt wurde von der Herzbasis an der äusseren Kurvatur des Aortenbogens bis zur A. subclavia geführt, sodass die Vorder- und Hinterfläche des Aortenbogens inklusive der Gefäßabgänge auseinandergeklappt werden konnten. Nach Entfernung der Seitenäste (Karotiden, Nierenarterien, Iliakalarterien) wurde die Aorta entnommen und gemeinsam mit der Herzbasis in einer 3.8%igen Zink-Formalinlösung 24 Stunden lang fixiert. Die Herzspitze wurde (noch in situ) unterhalb der Klappenebene und ebenfalls parallel zur Aorta abgetrennt und verworfen. Nach der Fixierung wurde die Aorta in einer Dissektionswanne auf schwarzem Wachs mit Hilfe von Nadeln (Durchmesser 0.1 mm) unter dem Dissektionsmikroskop gepinnt, sodass die gesamte Innenfläche der Aorta in einer Ebene ausgebreitet lag.

## **2.9. Färbung der atherosklerotischen Plaques**

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Neutrallipide der atherosklerotischen Läsionen durch eine Sudan IV Färbung sichtbar gemacht [Tangirala et al., 1995]. Dazu wurden die gepinnten Aorten in den Dissektionswannen zunächst fünf Minuten lang mit 70%igem Ethanol vorinkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit Sudan IV-Lösung (5 g/l in 70%igem Isopropanol) für 45 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schwenken der Wannen. Anschließend wurden die Aorten 3 Minuten lang mit 80%igem Ethanol entfärbt und vorsichtig mit fließendem Leitungswasser gespült. Die weitere Aufbewahrung der Aorten erfolgte in gefiltertem PBS.

## **2.10. Quantifizierung der atherosklerotischen Plaques an der Aorta**

Die Dokumentation der Aorten erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera am Mikrodisektionsmikroskop unter 20facher Vergrößerung sowie 1.5 fachem Zoom der Kamera mit drei überlappenden Bildern (JPEG Format, ein Bild etwa 2.5 MB). Ein Millimeter-Maßstab wurde mit jeder Aorta mitfotografiert. Die Bilder wurden dann mit Adobe Photoshop CS2 (Version 9.0) geöffnet und die Aorta aus den drei Bildern zusammengefügt. Die weitere Bildbearbeitung und die Quantifizierung der Läsionen erfolgte mit Adobe Photoshop und dem Programm „ImageJ“ (National Institute of Health, NIH) im TIFF Format in folgenden Arbeitsschritten [Tangirala et al., 1995]:

- a.** Kalibrierung der Datei im Programm ImageJ. Mit Hilfe des mitfotografierten Maßstabes wird die Länge „1 mm“ in Pixel (Px) definiert. Aufgrund der standardisierten Bildgröße aller fotografierten Aorten entsprach 1 mm auf allen Bildern 36 Px.
- b.** Festlegung der Gesamtfläche der Aorta im Adobe Photoshop. Zunächst wird die gesamte Aorta mit der Funktion „magnetisches Lasso“ umrandet, mit dem „Füllwerkzeug“ mit der Farbe schwarz (100% Deckkraft) gefüllt und in einer eigenen Ebene gespeichert.
- c.** Festlegung der Fläche der Läsionen im Adobe Photoshop. Zunächst wird mit dem „Farbaufnahmewerkzeug“ die Farbe der Läsionen aufgenommen. Danach werden die Läsionen über den Menüpunkt „Auswahl/Farbbereich auswählen“ definiert. Schließlich wird mit der Funktion „zoom in“ auf 300% vergrößert und die Auswahl der Läsionen noch einmal kontrolliert. Manuelle Korrekturen werden, wenn notwendig, mit dem „Zauberstabwerkzeug“ vorgenommen. Die Läsionen werden mit dem „Füllwerkzeug“ mit der Farbe rot (100% Deckkraft) gefüllt und wieder in einer eigenen Ebene gespeichert.
- d.** Die Ebene, welche die Gesamtaorta enthält wird – ebenso wie die Ebene, welche die Läsionen enthält – in einer eigenen Datei gespeichert.
- e.** Diese Dateien werden sodann mit dem Programm ImageJ geöffnet. Zunächst wird das Bild in den 8-bit Typ umgewandelt. Danach wird der Schwellenwert für die Erkennung der Gesamtaorta bzw. der Läsionen festgelegt (Image/Adjust/Threshold). Schließlich wird die Fläche der Gesamtaorta bzw. der Läsionen ausgewertet (Analyze/Measure) und die Resultate werden als Excel Datei gespeichert.

Abbildung 14 zeigt die Darstellung der atherosklerotischen Läsionen als Prozentsatz der Gesamtfläche der Aorta.

**Abbildung 14. Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen der Aorta mit Hilfe von Adobe Photoshop und Image J.**



## **2.11 Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen an Querschnitten durch den Aortenursprung (Herzbasis)**

### **2.11.1. Dehydrierung und Einbettung der Herzbasis**

Die Entnahme der Herzbasis wurde im Kapitel 2.9. beschrieben. Nach der Fixierung des Gewebes (3.8%ige Zink-Formalinlösung, 24 Stunden) erfolgte die Dehydrierung der Herzbasis an einer Leica TP1020 Station (Leica, Heidelberg, Deutschland) durch folgende Arbeitsschritte:

1. aufsteigende Ethanolreihe (70, 80 und 96% (je 1 Mal) sowie 100% (2 Mal), jeweils 30 Minuten)

2. Xylol (2 Mal, jeweils 30 Minuten)
3. Paraffin 56-58°C (2 Mal, jeweils 1 Stunde)

Das Giessen der Blöcke erfolgte an einer Leica EG1150H Station unter Zuhilfenahme einer beheizbaren Pinzette (Leica EGF). Die Herzspitze bzw. die Schnittfläche, an der die Herzspitze abgetrennt wurde, ist beim Giessen der Blöcke nach unten orientiert. Die Aorta wird luftblasenfrei mit Paraffin gefüllt.

### **2.11.2. Anfertigung der Schnitte durch die Herzbasis**

Die Schnitte durch den Paraffinblock werden mit dem Rotationsmikrotom HM335E erstellt. Von der Herzspitze (von der Unterseite des Blockes ausgehend) werden 10 µm dicke Schnitte angefertigt, bis ein kompletter Transversalschnitt durch das Herz auf Ebene der Klappen sichtbar wird. Danach wird die Schnittstärke auf 4 µm verringert. Jeder fünfte Schnitt (alle 20 µm) wird zur Quantifizierung der Läsionen herangezogen. Auf diese Weise wird die Klappenebene vollständig aufgeschnitten, sodass die Tiefe der Läsionen zur Gänze erfasst und quantifiziert werden kann.

### **2.11.3. Färbung der Schnitte**

Zunächst werden die Schnitte nach einem Standardprotokoll entparaffiniert: Xylol (2 Mal 3 Minuten), absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 80% und 70% Ethanol, jeweils 3 Minuten), danach Aqua bidest. Danach werden die Schnitte mit Hematoxylin und Eosin (H&E) gefärbt. Nach Behandlung mit gefiltertem Hematoxylin (zwei Minuten) wird der Farbstoff mit Leitungswasser abgespült und die Schnitte fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend werden die Schnitte mit Aqua bidest. gespült und mit Eosin Y Lösung inkubiert (90 Sekunden). Es folgt die Differenzierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%). Schließlich werden die Schnitte nach kurzer Vorbehandlung mit n-Butylazetat eingedeckt (Paramount Eindeckmedium).

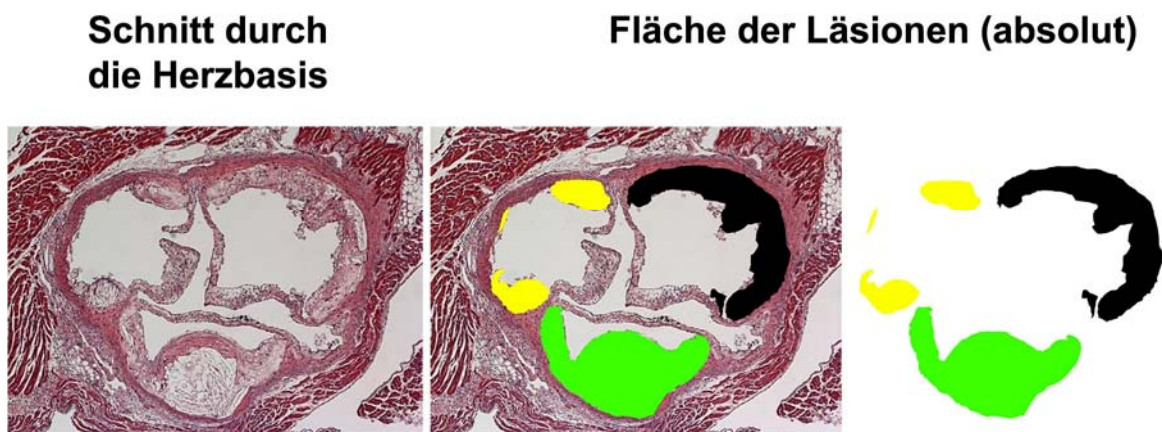
### **2.11.4. Dokumentation und Auswertung**

Die Dokumentation der Bilder erfolgt mit Hilfe eines Zeiss Axio Mikroskopes und einer angeschlossenen digitalen Kamera (Axio Cam MRC5). Die Bilder werden immer mit der gleichen Vergrößerung erstellt (Lupe 1.0, Objektiv 5x). Die Kalibrierung mittels ImageJ sowie die Bildbearbeitung in Adobe Photoshop (Markierung sowie Füllung der Läsionen mit den Funktionen „magnetisches Lasso“ und „Füllwerkzeug“ in verschiedenen Ebenen,

speichern der Ebenen/Läsionen in eigenen Dateien) erfolgen analog zu den oben beschriebenen Arbeitsschritten (2.11). Auch die Quantifizierung der Fläche der Läsionen mit ImageJ wird auf die gleiche Weise durchgeführt (Abbildung 15).

Der Hauptunterschied zwischen der Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen der Aorta und jener der „Leaflets“ der Aortenklappe besteht darin, dass die Fläche der Aortenläsionen auf die Gesamtfläche der Aorta bezogen wird, während die Läsionen der Aortenklappe „absolut“ in  $\mu\text{m}^3$  quantifiziert werden. Dies ist möglich, da die Fläche der Läsionen der Aortenklappe an zahlreichen, 20  $\mu\text{m}$  voneinander entfernten Schnitten quantifiziert wird. Die Fläche der Läsion an einem Schnitt wird mit dem Abstand zwischen zwei benachbarten Schnitten (in der Regel 20  $\mu\text{m}$ ) multipliziert um das Volumen der Läsion zwischen diesen beiden Schnitten zu erhalten. Das Gesamtvolumen der Läsion ergibt sich aus der Addition aller Teilvolumina. Diese Methode vernachlässigt die Tatsache, dass sich die Querschnittsfläche der Läsionen zwischen zwei Schnitten ändert – die Läsionen verjüngen sich zur Herzspitze hin – und geht von der Annahme aus, dass sich die Verjüngungstendenz der Läsionen zwischen zwei Schnittebenen zwischen den verschiedenen Läsionen nicht wesentlich unterscheidet.

**Abbildung 15. Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen an der Herzbasis mittels Adobe Photoshop und Image J.**





## 2.12. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Standardabweichung und SEM (standard error of the mean). Um die Signifikanz zu bestimmen, wurde der Student's T-Test angewandt. Ein Unterschied wurde als signifikant gewertet, wenn  $p < 0.05$ .

## 3. Resultate

### 3.1. Rückkreuzung der ISG12-defizienten Mäuse in den C57/Bl6 genetischen Hintergrund

Zu Beginn dieser Studie lagen die ISG12-defizienten Mäuse in einem gemischten genetischen Hintergrund vor. Atherosklerosestudien werden prinzipiell im C57Bl/6 Hintergrund durchgeführt, weil nur dieser Mausstamm für die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen empfänglich ist (s. Kapitel 1.3.7.). Um die ISG12-defizienten Mäuse in den C57Bl/6 Hintergrund zurückzukreuzen, wurde jeweils ein ISG12-heterozygotes Männchen mit zwei C57Bl/6 Weibchen (oder ein C57/Bl6 Männchen mit zwei ISG12-heterozygoten Weibchen) zusammengesetzt. In der vierten Generation wurden ISG12<sup>+/-</sup> Tiere zusammengekreuzt um ISG12<sup>-/-</sup> (bzw. ISG12<sup>+/+</sup>) Mäuse für die Fragestellungen dieses Projektes zu generieren. Die ISG12-defizienten Mäuse wurden im weiteren bis in die neunte Generation in den C57Bl/6 genetischen Hintergrund zurückgekreuzt. Das Zurückkreuzen verlief problemlos, die Generationenzeit (= Zeit von der Geburt der Eltern bis zur Geburt der Nachkommen) betrug durchschnittlich 65 Tage (Tabelle 5). Die durchschnittliche Wurfgröße war 7, davon waren 44% Weibchen und 56% Männchen. 13% der Tiere starben vor dem Absetzen im Alter von 21 Tagen. Laut der Mendel'schen Gesetze war eine 1 : 2 : 1 Verteilung zwischen ISG12<sup>+/+</sup> (Wildtyp), ISG12<sup>+/-</sup> (heterozygot) und ISG12<sup>-/-</sup> (knockout) beim Zusammenkreuzen der ISG12<sup>+/-</sup> Tiere in der vierten Generation zu erwarten. Tatsächlich ergab sich jedoch eine 1 : 1,3 : 0,7 Verteilung.

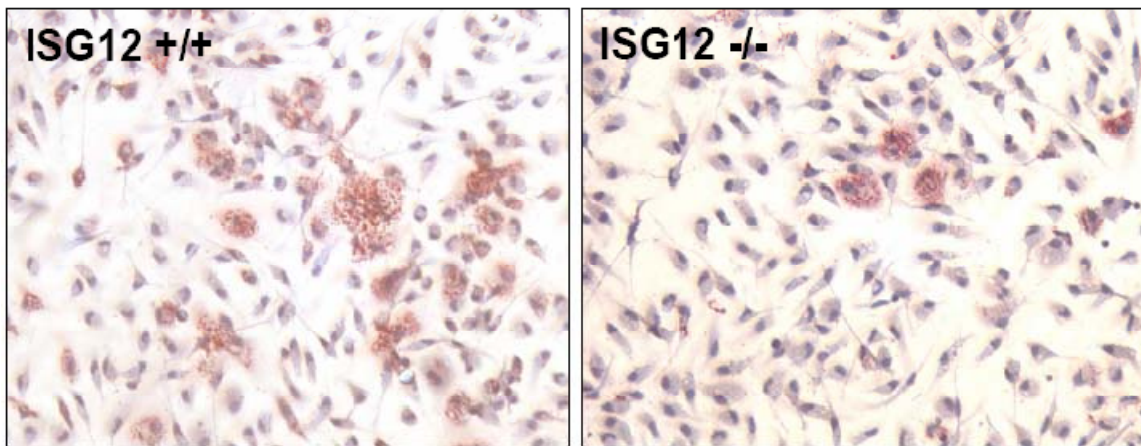
Tabelle 5. Überblick über die Zucht der ISG12<sup>-/-</sup> Mäuse.

Käfig Nr.	Zuchtprogramm	Generation (N)	Geb. datum	Wurf-grösse	davon gestorben	abgesetzt		Absetzdatum	Absetzalter in Tagen	N → N+1 (Tage)	Genotyp		
						♀	♂				(+/+)	(+/-)	(-/-)
I 3	Rückkreuzen	N1 → N2	23.01.06	10	1	3	6	13.03.06 10.04.06	24 28				
			17.02.06	6	0	4	2						
			13.03.06	12	4	5	3						
I 2	Rückkreuzen	N2 → N3	27.03.06	8	1	3	4	21.04.06	25				
I 11	Rückkreuzen	N3 → N4	25.05.06	8	0	4	4	20.06.06	26	59			
			30.05.06	4	2	1	1	26.06.06	27	64			
I 12	Rückkreuzen	N3 → N4	06.06.06	7	0	3	4	05.07.06	29				
I 19	Rückkreuzen	N4 → N5	29.07.06	2	1	3	4	31.08.06	33	60			
			01.08.06	6				31.08.06	30	63			
I 23	Rückkreuzen	N4 → N5	24.08.06	6	1	2	3	17.09.06	24	79			
I 39	Rückkreuzen	N4 → N5	30.11.06	7	0	4	3	02.01.07	33				
			13.12.06	3	0	1	2	18.01.07	36				
I 22	Zusammenkreuzen ISG12 <sup>+/+</sup> x ISG12 <sup>-/-</sup>	N4	06.08.06	6	1	1	4	31.08.06	25		2	2	1
			27.08.06	10	0	7	3	27.09.06	31		3	6	1
			17.10.06	12	0	2	10	06.11.06	20		3	6	2
			07.12.06	6	1	0	5	07.01.07	31		1	3	1
			10.11.06	16	4	5	7	05.12.06	25		4	4	4
I 32	Rückkreuzen	N5 → N6	22.10.06	6	0	3	3	17.11.06	26	59			
			02.11.06	6	2	2	2	27.11.06	25				
			19.11.06	3	0	5	4	18.12.06	29				
			29.11.06	6	0			18.12.06	19				
I 44	Rückkreuzen	N6 → N7	26.12.06	5	2	4	4	22.01.07	27	70			
			02.01.07	6	1				20	77			

### 3.2. Effekt der ISG12-Defizienz auf die *in vitro* Schaumzellbildung

Um die Bedeutung von ISG12 auf die Entstehung der atherosklerotischen Läsionen zu untersuchen, wurde in einem ersten Schritt die *in vitro* Bildung von Schaumzellen aus Makrophagen untersucht. Zunächst wurde den Tieren (ISG12-defizienten Mäusen bzw. altersentsprechenden ISG12-Wildtyp Mäusen) intraperitoneal Thioglykolat injiziert um eine sterile Peritonitis zu erzeugen. Die mobilisierten Makrophagen wurden drei Tage nach der Thioglykolatinjektion durch Spülung der Peritonealhöhle mit eiskaltem PBS entnommen und *in vitro* mit oxLDL inkubiert. Nach 24stündiger Kultur in Anwesenheit von oxLDL wurde der Prozentsatz an Schaumzellen (bezogen auf die Gesamtzahl gezählter Makrophagen) festgestellt. Dabei zeigte sich, dass Makrophagen von ISG12-defizienten Mäusen weniger Schaumzellen bildeten als Makrophagen von Kontrollmäusen. Die wenigen Schaumzellen, welche aus ISG12-defizienten Makrophagen entstanden, unterschieden sich auch morphologisch deutlich von denen der Kontrollmäuse (Abbildung 16). Diese Daten lassen vermuten, dass ISG12 eine Rolle in der Aufnahme von Lipiden in die Makrophagen haben könnte.

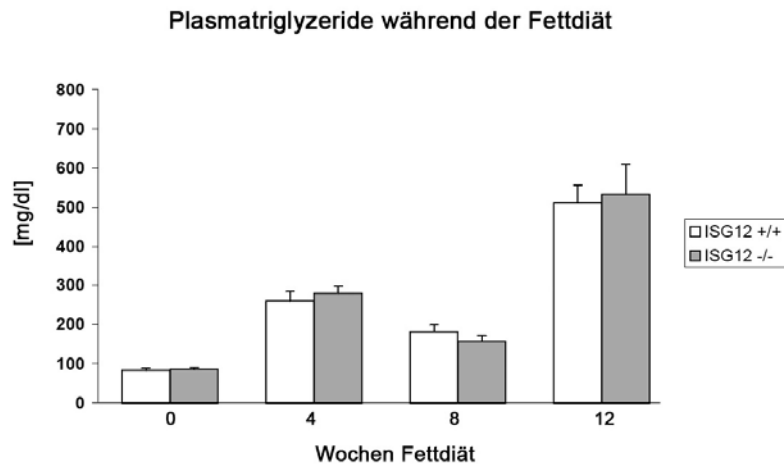
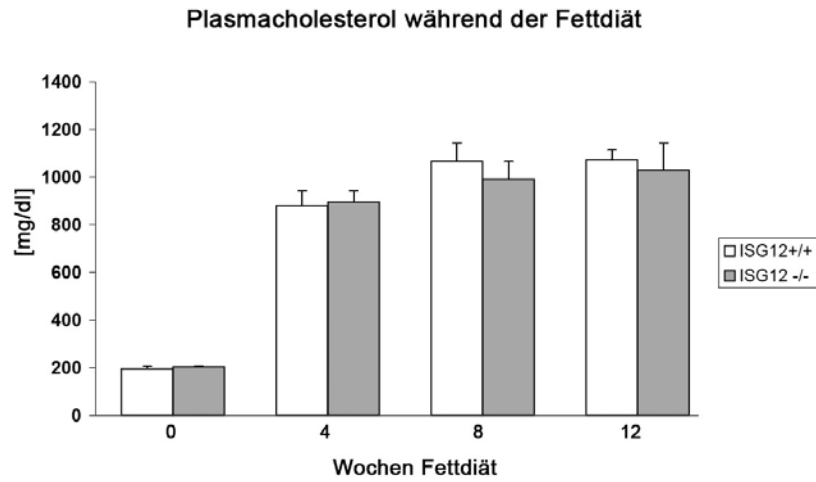
Abbildung 16. In vitro Schaumzellbildung aus ISG12<sup>-/-</sup> bzw. ISG12<sup>+/+</sup> Makrophagen.



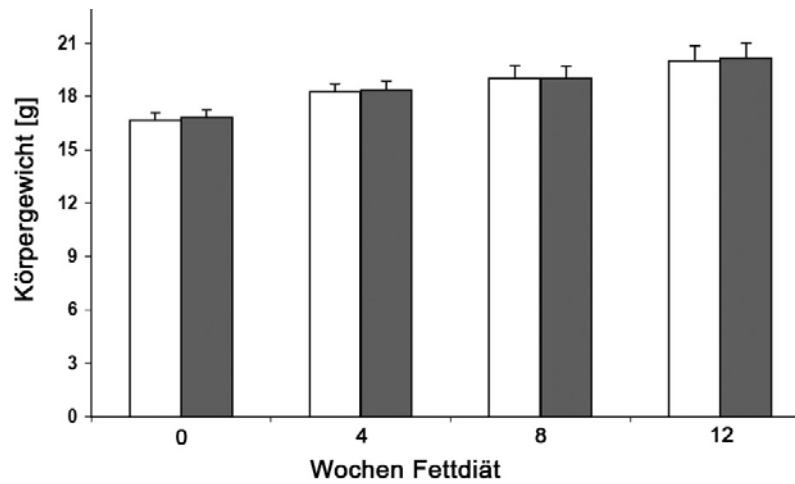
### 3.3. Serumtriglyceridspiegel, Serumcholesterolspiegel und Körpergewichts-entwicklung in ISG12<sup>-/-</sup>-transplantierten LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen

Makrophagen nehmen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der atherosklerotischen Plaque ein. Um die Rolle von ISG12 in der Atherogenese speziell in Makrophagen (ohne Berücksichtigung der Endothelzellen) *in vivo* zu untersuchen, wurden LDLR-defiziente Mäuse mit Knochenmark von ISG12<sup>-/-</sup> Mäusen transplantiert. Als Kontrolle wurden LDLR-defiziente Mäuse mit Knochenmark von ISG12<sup>+/+</sup> aus dem gleichen Wurf (littermates) transplantiert. Nach der Transplantation wurden die Mäuse zunächst vier Wochen auf einer normalen Diät gehalten. Danach erhielten die Tiere drei Monate lang eine Fettdiät. Um einen direkten Effekt von ISG12 auf die Höhe der Serumtriglycerid- bzw. Cholesterolspiegel auszuschliessen, wurden die Serumlipide der transplantierten Mäuse vor Beginn der Fettdiät sowie alle vier Wochen während der Fettdiät gemessen. Dabei zeigte sich, dass sich (wie erwartet) die Serumlipidprofile der ISG12<sup>-/-</sup> Mäuse von denen der Kontrollmäuse (ISG12<sup>+/+</sup>) nicht unterschieden (Abbildung 17). Auch die Gewichtsentwicklung der beiden Gruppen verlief parallel (Abbildung 18). Diese Daten zeigen, dass ISG12 keinen direkten Effekt auf die Höhe der Serumlipide sowie auf die Gewichtsentwicklung unter Fettdiät hat.

Abbildung 17. Serumlipidprofile von ISG12<sup>-/-</sup>- bzw. ISG12<sup>+/+</sup>-transplantierten Mäusen. Resultate zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 9 Tieren.



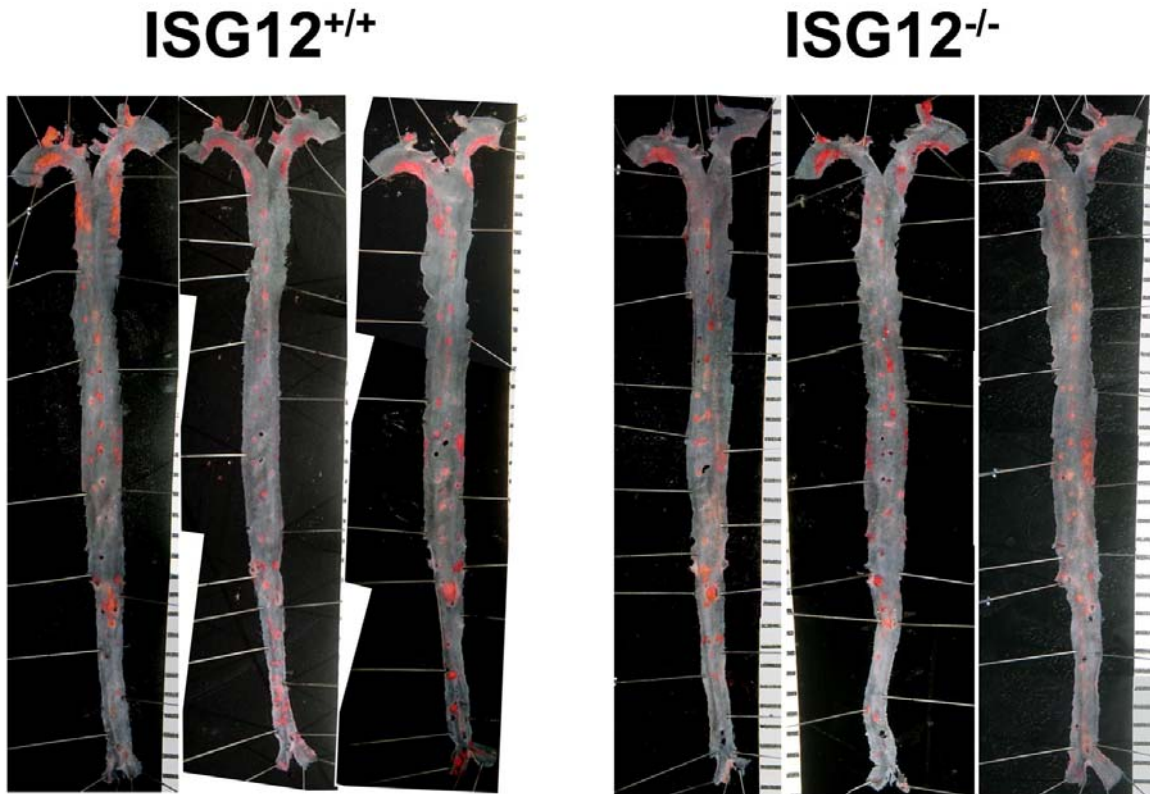
**Abbildung 18. Gewichstentwicklung von ISG12<sup>-/-</sup>- bzw. ISG12<sup>+/+</sup>-transplantierten Mäusen. Resultate zeigen den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von jeweils 9 Tieren.**



### **3.4. Effekt der ISG12-Defizienz auf die Entstehung atherosklerotischer Läsionen**

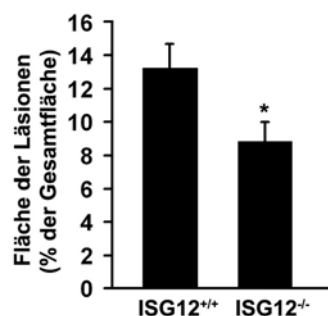
Um die Bedeutung von ISG12 für die Atherogenese speziell in den Makrophagen zu untersuchen, wurde die Grösse der atherosklerotischen Läsionen in ISG12<sup>-/-</sup> - bzw. ISG12<sup>+/+</sup>-transplantierten LDLR-defizienten Mäusen am Ende der dreimonatigen Fettdiät quantifiziert. Zu diesem Zweck wurde die Aorta der Tiere inklusive der Abgänge der grossen Gefässe mikrodiseziert und die atherosklerotischen Läsionen gefärbt (Abbildung 19, siehe auch Abbildung 14).

Abbildung 19. Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen in der Aorta. Man sieht Aorten von drei repräsentativen  $ISG12^{-/-}$ -transplantierten Mäusen sowie von drei repräsentativen  $ISG12^{+/+}$ -transplantierten Mäusen.



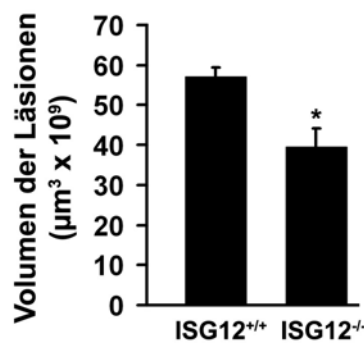
Die Quantifizierung der Läsionen (in Bezug auf die Fläche der Gesamtaorta) zeigte, dass  $ISG12^{-/-}$ -transplantierte Mäuse tatsächlich kleinere Läsionen aufwiesen als die Kontrollgruppe ( $8,83 \pm 1,18\%$  in  $ISG12^{-/-}$ -transplantierten Mäusen versus  $13,24 \pm 1,48\%$  in  $ISG12^{+/+}$ -transplantierten Mäusen, Abbildung 20).

Abbildung 20. Statistische Auswertung der Quantifizierung der aortalen Läsionen in  $ISG12^{-/-}$ - bzw.  $ISG12^{+/+}$ -transplantierten LDLR-defizienten Mäusen. Resultate repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  SEM von 9  $ISG12^{-/-}$  und 8  $ISG12^{+/+}$ -transplantierten Tieren.



Um dieses Ergebnis in einem zweiten Assay zu verifizieren, wurde im weiteren auch das Volumen der Läsionen am Aortenursprung quantifiziert. Dazu wurden Serienschnitte von der Herzspitze bis unter die Aortenklappe angefertigt und einer H&E-Färbung unterzogen (Abbildung 15). Das Volumen der Läsionen wurden anschließend aus der Fläche der Läsionen (quantifiziert an den Schnitten) und der Höhe der Läsionen (ergibt sich aus der Anzahl der Schnitte) berechnet (Abbildung 21). Auch hier zeigte sich, dass die ISG12<sup>-/-</sup>-transplantierte Gruppe signifikant kleinere Läsionen hatte als die Kontrollgruppe. Diese Daten weisen darauf hin, dass ISG12 in den Makrophagen eine wichtige Rolle in der Atherogenese spielen könnte.

**Abbildung 21. Statistische Auswertung der Quantifizierung der Läsionen an der Herzbasis in ISG12<sup>-/-</sup>- bzw. ISG12<sup>+/+</sup>-transplantierten LDLR-defizienten Mäusen. Resultate repräsentieren den Mittelwert ± SEM von jeweils 6 ISG12<sup>-/-</sup> und ISG12<sup>+/+</sup>-transplantierten Tieren. Asterisk: p < 0,0001**



## 4. Diskussion

Falsche Ernährung und die daraus resultierende Hypercholesterinämie spielen eine entscheidende Rolle für die Entstehung atherosklerotischer Läsionen. Auf zellulärer Ebene führt die Aufnahme von cholesterolhaltigen Lipoproteinen durch Makrophagen, die Umwandlung in Schaumzellen, sowie die Interaktion der Makrophagen mit anderen Zellen des Immunsystems zu einem chronisch entzündlichen Prozess, der zur Entwicklung der atherosklerotischen Plaque führt [Glass und Witztum, 2001]. Ganz entscheidend für die Entstehung und Propagation dieser chronischen Entzündungsreaktion sind Zytokine – kleine Moleküle, über die die Zellen des Immunsystems kommunizieren und sich gegenseitig aktivieren oder auch hemmen. IFN $\gamma$  ist ein Zytokin, das von T-Zellen sezerniert wird und die

Funktion von Makrophagen moduliert. Die Bedeutung von IFN $\gamma$  in der Atherogenese ist nicht endgültig geklärt – es gibt aber vielfältige Hinweise darauf, dass IFN $\gamma$  ein wichtiges pro-inflammatorisches Molekül in der Atherogenese ist [Leon und Zuckerman, 2005]. IFN $\gamma$  bindet an den IFN $\gamma$ -Rezeptor und nimmt auf die Expression zahlreicher Moleküle in den Makrophagen Einfluss. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von ISG12, einem kleinen IFN-induzierbaren Molekül [Martensen und Justesen, 2004], in der Atherogenese untersucht.

Um die Rolle dieses Proteins gezielt in den Makrophagen zu untersuchen, wählten wir ein Modell in dem LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse mit Knochenmark von ISG12-defizienten Mäusen transplantiert wurden. Durch diesen Versuchsansatz konnte die Rolle von ISG12 in Makrophagen von jener in Endothelzellen und anderen nicht-hämatopoietische Zellen separiert werden [Linton und Fazio, 1999]. Wir fanden, dass LDLR<sup>-/-</sup> Mäuse, welche mit Knochenmark von ISG12-defizienten Mäusen rekonstituiert worden waren, unter einer Fettdiät signifikant weniger atherosklerotische Plaques entwickelten als die Kontrollgruppe. Dieses Resultat konnte in zwei voneinander unabhängigen Assays bestätigt werden. In einem ersten Schritt wurde die Fläche der atherosklerotischen Plaques in der Aorta (bezogen auf die Gesamtfläche der Aorta) quantifiziert. In einem zweiten Schritt wurden das Volumen der atherosklerotischen Läsionen an der Herzbasis anhand von Serienschritten quantifiziert. Mit Hilfe dieser beiden voneinander unabhängigen Techniken konnten wir zeigen, dass die Transplantation von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen mit ISG12-defizientem Knochenmark tatsächlich einen protektiven Effekt auf die Entwicklung atherosklerotischer Plaques hat. Wie erwartet, war dieser Effekt nicht auf unterschiedliche Triglyzerid- oder Cholesterinspiegel zwischen den ISG12<sup>-/-</sup> und ISG12<sup>+/+</sup>-rekonstituierten Tieren zurückzuführen. Auch die Gewichtsentwicklung der beiden unterschiedlich transplantierten Tiergruppen unterschied sich nicht voneinander. Diese Beobachtungen sind in guter Übereinstimmung mit Studien, die gezeigt haben, dass die Transplantation von LDLR<sup>-/-</sup> Mäusen mit LDLR<sup>+/+</sup> Knochenmark keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe der Plasmalipide hat [Boisvert et al., 1997, Fazio et al., 1997b].

Die für die Atherogenese wichtigsten hämatopoietischen Zellen sind Monozyten bzw. die aus den Monozyten hervorgehenden Makrophagen. Bereits kurze Zeit nach der Knochenmarkstransplantation (mit vorangehender letaler Bestrahlung) sind Spender-Makrophagen in den atherosklerotischen Plaques nachweisbar [Fazio et al., 1997a, Kraal et al., 1987]. Es ist daher naheliegend, dass eine Veränderung der Makrophagenfunktion durch die ISG12-Defizienz dazu führt, dass weniger atherosklerotische Plaques in den ISG12<sup>-/-</sup>-



transplantierten Mäusen entstehen. Zu dieser Vermutung passt auch unsere Beobachtung, dass ISG12-defiziente Makrophagen *in vitro* eine eingeschränkte Fähigkeit zur Bildung von Schaumzellen haben. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch andere ISG12-defiziente hämatopoietische Zellen, speziell T- und NK-Zellen zum beobachteten Phänotyp der Mäuse in unserem Transplantationsmodell beitragen.

Die Beobachtung, dass ISG12-Defizienz in Makrophagen einen protektiven Effekt auf die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen hat passt gut zu den Resultaten einer anderen rezenteren Studie aus unserem Labor. Papac-Milicevic und Kollegen konnten in dieser Arbeit zeigen, dass es in ISG12-defizienten Mäusen nach dem Setzen einer standardisierten Gefäßverletzung (Ligation der Karotis-Arterie) zu einer geringeren Rate an Restenose kommt als in Kontrollmäusen. Obwohl der Reparaturprozeß im Rahmen einer Gefäßverletzung nicht mit der Entwicklung atherosklerotischer Plaques unter einer Fettdiät vergleichbar ist, kann man doch spekulieren dass die ISG12-Defizienz in den Makrophagen in beiden Modellen einen anti-inflammatorischen Effekt hat und dies den Zustand der Blutgefäße positiv beeinflusst.

Die Rolle von  $\text{IFN}\gamma$  in der Atherogenese wurde in der Vergangenheit von mehreren Gruppen mit Hilfe von  $\text{IFN}\gamma$ - bzw.  $\text{IFN}\gamma\text{R}$ -defizienten Mäusen untersucht. In diesen Studien zeigte sich, dass  $\text{IFN}\gamma$  die Entwicklung atherosklerotischer Plaques fördert bzw. das Fehlen von  $\text{IFN}\gamma$  protektive Effekte hat. Diese Beobachtungen wurden sowohl in ApoE-defizienten Mäusen als auch in LDLR-defizienten Mäusen gemacht [Buono et al., 2003, Gupta et al., 1997]. Auch die direkte Injektion von  $\text{IFN}\gamma$  führte zu messbaren proatherogenen Effekten [Whitman et al., 2000]. Obwohl die Atherosklerose-fördernde Wirkung von  $\text{IFN}\gamma$  *in vivo* gut dokumentiert ist, sind die zugrundeliegenden Mechanismen auf zellulärer Ebene weniger klar. Ein gut beschriebener  $\text{IFN}\gamma$ -abhängiger Mechanismus in der Atherogenese ist die vermehrte Produktion und Ausschüttung von verschiedenen chemotaktisch wirkenden Chemokinen (1.3.3.1.) welche zur Konzentration proinflammatorischer Zellen in der Plaque führen. Die Wirkungen von  $\text{IFN}\gamma$  auf die Expression von Scavenger Rezeptoren in Makrophagen sind jedoch bereits viel unklarer. Zahlreiche *in vitro* Studien kamen in unterschiedlichen Zellen und Modellen zu teilweise kontroversiellen Ergebnissen (1.3.3.2.). Ein weiterer Mechanismus welcher zu der beobachteten proatherogenen Wirkung von  $\text{IFN}\gamma$  beitragen könnte ist eine Hemmung des reversen Cholesterolexports aus Makrophagen (1.3.3.3.). Insgesamt kann man sagen, dass die proatherogenen Wirkungen von  $\text{IFN}\gamma$  auf zellulärer Ebene, speziell der fördernde Einfluss auf die Entstehung von Schaumzellen, noch nicht vollständig verstanden werden.

Ein wichtiger molekularer Mechanismus, welcher zu den proatherogenen Effekten von  $\text{IFN}\gamma$  in Makrophagen beiträgt, ist die Modulation der transkriptionellen Aktivität von nukleären Rezeptoren. Die Familie der „peroxisome proliferator-activated receptors“ (PPARs) sowie die NR4A Familie der nukleären Rezeptoren sind zentrale Transkriptionsfaktoren in Makrophagen, deren Aktivität unter anderem die Produktion von Chemokinen sowie die Expression von Scavenger Rezeptoren reguliert. Eine Studie aus unserem Labor konnte kürzlich zeigen, dass ISG12 an  $\text{PPAR}\alpha$ ,  $\text{PPAR}\gamma$  sowie Mitglieder der NR4A Familie bindet [Papac-Milicevic et al., 2007]. Wird ISG12 überexprimiert, so wird die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren substantiell gehemmt. In ISG12-defizienten Zellen jedoch ist die transkriptionelle Aktivität von PPAR- und NR4A Proteinen hochreguliert [Papac-Milicevic et al., 2007]. Obwohl diese Daten nicht in Makrophagen generiert wurden, liegt die Vermutung nahe, dass eine vermehrte Aktivität dieser nukleären Transkriptionsfaktoren aufgrund der ISG12-Defizienz auch für den beobachteten Phänotyp der Mäuse in der vorliegenden Studie relevant ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die ISG12-Defizienz hämatopoietischer Zellen in  $\text{LDLR}^{-/-}$ -Mäusen einen protektiven Einfluss auf die Entstehung atherosklerotischer Plaques hat. Zukünftige Studien werden mit Hilfe von  $\text{ISG12}^{-/-} \text{LDLR}^{-/-}$  bzw.  $\text{ISG12}^{-/-} \text{ApoE}^{-/-}$  doppelt-defizienten Tieren die Bedeutung von ISG12 für die Atherogenese auch in Endothelzellen untersuchen.

## 5. Literaturverzeichnis

AGATSON, A. *The South Beach Diet*. St. Martin's Press: New York, pps. 243-257.

ALBERT C M, GAZIANO J M, WILLETT W C, MANSON J E. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the Physicians' Health Study. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1382-1387.

APPEL L J, MOORE T J, OBARZANEK E, VOLLMER W M, SVETKEY L P, SACKS F M, BRAY G A, VOGT T M, CUTLER J A, WINDHAUSER M M, LIN P H, KARANJA N. A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1997; 336: 1117-1124.

ARKENBOUT E K, DE W, V, VAN B M, VAN ACHTERBERG T A, GRIMBERGEN J M, PICHON B, PANNEKOEK H, DE VRIES C J. Protective function of transcription factor TR3 orphan receptor in atherogenesis: decreased lesion formation in carotid artery ligation model in TR3 transgenic mice. *Circulation* 2002; 106: 1530-1535.

ATKINS, R. *Dr. Atkins New Diet Revolution*. Avon Books: New York, pps. 121-125.

AUDE Y W, AGATSTON A S, LOPEZ-JIMENEZ F, LIEBERMAN E H, MARIE A, HANSEN M, ROJAS G, LAMAS G A, HENNEKENS C H. The national cholesterol education program diet vs a diet lower in carbohydrates and higher in protein and monounsaturated fat: a randomized trial. *Arch Intern Med* 2004; 164: 2141-2146.

BIERMAN E L. George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 647-656.

BJORKHEM I. Mechanism of degradation of the steroid side chain in the formation of bile acids. *J Lipid Res* 1992; 33: 455-471.

BODZIOCH M, ORSO E, KLUCKEN J, LANGMANN T, BOTTCHER A, DIEDERICH W, DROBNIK W, BARLAGE S, BUCHLER C, PORSCH-OZCURUMEZ M, KAMINSKI W E, HAHMANN H W, OETTE K, ROTHE G, ASLANIDIS C, LACKNER K J, SCHMITZ G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 1999; 22: 347-351.

BOGEN S, PAK J, GARIFALLOU M, DENG X, MULLER W A. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med* 1994; 179: 1059-1064.

BOISVERT W A, SPANGENBERG J, CURTISS L K. Role of leukocyte-specific LDL receptors on plasma lipoprotein cholesterol and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 340-347.

BORING L, GOSLING J, CLEARY M, CHARO I F. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 894-897.

BRAUN M, PIETSCH P, FELIX S B, BAUMANN G. Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 2571-2579.

BRAVATA D M, SANDERS L, HUANG J, KRUMHOLZ H M, OLKIN I, GARDNER C D, BRAVATA D M. Efficacy and safety of low-carbohydrate diets: a systematic review. *JAMA* 2003; 289: 1837-1850.

BROOKS-WILSON A, MARCIL M, CLEE S M, ZHANG L H, ROOMP K, VAN D M, YU L, BREWER C, COLLINS J A, MOLHUIZEN H O, LOUBSER O, OUELETTE B F, FICHTER K, SHBOURNE-EXCOFFON K J, SENSEN C W, SCHERER S, MOTT S, DENIS M, MARTINDALE D, FROHLICH J, MORGAN K, KOOP B, PIMSTONE S, KASTELEIN J J, GENEST J, JR., HAYDEN M R. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 1999; 22: 336-345.

BUONO C, COME C E, STAVRAKIS G, MAGUIRE G F, CONNELLY P W, LICHTMAN A H. Influence of interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLR-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 454-460.

BUTTERY L D, SPRINGALL D R, CHESTER A H, EVANS T J, STANDFIELD E N, PARUMS D V, YACOUB M H, POLAK J M. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996; 75: 77-85.

CHAWLA A, BOISVERT W A, LEE C H, LAFFITTE B A, BARAK Y, JOSEPH S B, LIAO D, NAGY L, EDWARDS P A, CURTISS L K, EVANS R M, TONTONOZ P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 2001; 7: 161-171.

CLINTON S K, UNDERWOOD R, HAYES L, SHERMAN M L, KUFE D W, LIBBY P. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1992; 140: 301-316.

COSTET P, LUO Y, WANG N, TALL A R. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 28240-28245.

COUFFINHAL T, DUPLAA C, MOREAU C, LAMAZIERE J M, BONNET J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 225-234.

CYBULSKY M I und GIMBRONE M A, JR. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251: 788-791.

CYRUS T, WITZTUM J L, RADER D J, TANGIRALA R, FAZIO S, LINTON M F, FUNK C D. Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest* 1999; 103: 1597-1604.

DAVIES M J, WOOLF N, ROWLES P M, PEPPER J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J* 1988; 60: 459-464.

DETMERS P A, HERNANDEZ M, MUDGETT J, HASSING H, BURTON C, MUNDT S, CHUN S, FLETCHER D, CARD D J, LISNOCK J, WEIKEL R, BERGSTROM J D, SHEVELL D E, HERMANOWSKI-VOSATKA A, SPARROW C P, CHAO Y S, RADER D J, WRIGHT S D, PURE E. Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol* 2000; 165: 3430-3435.

DOLL R, PETO R, BOREHAM J, SUTHERLAND I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ* 2004; 328:1519-27.

DOLLAR A L, KRAGEL A H, FERNICOLA D J, WACLAWIW M A, ROBERTS W C. Composition of atherosclerotic plaques in coronary arteries in women less than 40 years of age with fatal coronary artery disease and implications for plaque reversibility. *Am J Cardiol* 1991; 67: 1223-1227.

ENGLISH J P, WILLIUS F A, BERKSA N J. Tobacco and coronary disease. *The Journal of the American Medical Association* 1940; 115: 1327-1329.

ELMADFA I, FREISLING H, NOWAK V, HOFSTÄDTER D, et al. Österreichischer Ernährungsbericht 2008. Wien, 2009.

ELMADFA I, WEICHSELBAUM E, TRICHOPOULOU A, et al. European Nutrition and Health Report. EC, Health and Consumer Protection Directorate-General, Grant agreement No SPC.2002356, Wien, 2004.

FAZIO S, BABAIEV V R, MURRAY A B, HASTY A H, CARTER K J, GLEAVES L A, ATKINSON J B, LINTON M F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997a; 94: 4647-4652.

FAZIO S, HASTY A H, CARTER K J, MURRAY A B, PRICE J O, LINTON M F. Leukocyte low density lipoprotein receptor (LDL-R) does not contribute to LDL clearance in vivo: bone marrow transplantation studies in the mouse. *J Lipid Res* 1997b; 38: 391-400.

FEBBRAIO M, PODREZ E A, SMITH J D, HAJJAR D P, HAZEN S L, HOFF H F, SHARMA K, SILVERSTEIN R L. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000; 105: 1049-1056.

FERRIERES J. The French paradox: lessons for other countries. *Heart* 2004; 90: 107-111.

FOSTER G D, WYATT H R, HILL J O, MCGUCKIN B G, BRILL C, MOHAMMED B S, SZAPARY P O, RADER D J, EDMAN J S, KLEIN S. A randomized trial of a low-carbohydrate diet for obesity. *N Engl J Med* 2003; 348: 2082-2090.

FROSTEGARD J, ULFGREN A K, NYBERG P, HEDIN U, SWEDENBORG J, ANDERSSON U, HANSSON G K. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 1999; 145: 33-43.

GARNER B, BAOUTINA A, DEAN R T, JESSUP W. Regulation of serum-induced lipid accumulation in human monocyte-derived macrophages by interferon-gamma. Correlations with apolipoprotein E production, lipoprotein lipase activity and LDL receptor-related protein expression. *Atherosclerosis* 1997; 128: 47-58.

GAZIANO, J.M. (1996). Epidemiology of risk factor reduction., in: *Vascular Medicine*. J.Loscalzo, M.Creagher, and V.Dzau (eds), Little Brown: Boston, pps. 569-586.

GENG Y J und HANSSON G K. Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 1992; 89: 1322-1330.

GJERMANDSEN I M, JUSTESEN J, MARTENSEN P M. The interferon-induced gene ISG12 is regulated by various cytokines as the gene 6-16 in human cell lines. *Cytokine* 2000; 12: 233-238.

GLASS C K und WITZTUM J L. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 2001; 104: 503-516.

GUPTA S, PABLO A M, JIANG X, WANG N, TALL A R, SCHINDLER C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 2752-2761.

HAMMOND E C und HORN D. Landmark article March 15, 1958: Smoking and death rates--report on forty-four months of follow-up of 187,783 men. By E. Cuyler Hammond and Daniel Horn. JAMA 1984; 251: 2840-2853.

HAVEL R J, EDER H A, BRAGDON J H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J Clin Invest 1955; 34: 1345-1353.

HU F B, STAMPFER M J, MANSON J E, RIMM E, COLDITZ G A, ROSNER B A, HENNEKENS C H, WILLETT W C. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. N Engl J Med 1997; 337: 1491-1499.

HUO Y, WEBER C, FORLOW S B, SPERANDIO M, THATTE J, MACK M, JUNG S, LITTMAN D R, LEY K. The chemokine KC, but not monocyte chemoattractant protein-1, triggers monocyte arrest on early atherosclerotic endothelium. J Clin Invest 2001; 108: 1307-1314.

ISHIBASHI S, BROWN M S, GOLDSTEIN J L, GERARD R D, HAMMER R E, HERZ J. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J Clin Invest 1993; 92: 883-893.

JAWIEN J, NASTALEK P, KORBUT R. Mouse models of experimental atherosclerosis. J Physiol Pharmacol 2004; 55: 503-517.

JIANG C, TING A T, SEED B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. Nature 1998; 391: 82-86.

JOHNSON-TIDEY R R, MCGREGOR J L, TAYLOR P R, POSTON R N. Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. Am J Pathol 1994; 144: 952-961.

JOINT NATIONAL COMMITTEE ON DETECTION EVALUATION AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE. The fifth report of the Joint National Committee on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC V). Arch Intern Med 1993; 153: 154-183.

JONASSON L, HOLM J, SKALLI O, BONDJERS G, HANSSON G K. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. Arteriosclerosis 1986; 6: 131-138.

JOSHIPURA K J, HU F B, MANSON J E, STAMPFER M J, RIMM E B, SPEIZER F E, COLDITZ G, ASCHERIO A, ROSNER B, SPIEGELMAN D, WILLETT W C. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. Ann Intern Med 2001; 134: 1106-1114.

KEANEY J F, JR. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med* 2000; 21: 99-166.

KELLY J M, PORTER A C, CHERNAJOVSKY Y, GILBERT C S, STARK G R, KERR I M. Characterization of a human gene inducible by alpha- and beta-interferons and its expression in mouse cells. *EMBO J* 1986; 5: 1601-1606.

KEYS A, MENOTTI A, KARVONEN M J, ARAVANIS C, BLACKBURN H, BUZINA R, DJORDJEVIC B S, DONTAS A S, FIDANZA F, KEYS M H, . The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol* 1986; 124: 903-915.

KIRK E A, DINAUER M C, ROSEN H, CHAIT A, HEINECKE J W, LEBOEUF R C. Impaired superoxide production due to a deficiency in phagocyte NADPH oxidase fails to inhibit atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1529-1535.

KOCKX M M, DE MEYER G R, MUHRING J, JACOB W, BULT H, HERMAN A G. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998; 97: 2307-2315.

KOERTGE J, WEIDNER G, ELLIOTT-ELLER M, SCHERWITZ L, MERRITT-WORDEN T A, MARLIN R, LIPSENTHAL L, GUARNERI M, FINKEL R, SAUNDERS JR D E, MCCORMAC P, SCHEER J M, COLLINS R E, ORNISH D. Improvement in medical risk factors and quality of life in women and men with coronary artery disease in the Multicenter Lifestyle Demonstration Project. *Am J Cardiol* 2003; 91: 1316-1322.

KRAAL G, REP M, JANSE M. Macrophages in T and B cell compartments and other tissue macrophages recognized by monoclonal antibody MOMA-2. An immunohistochemical study. *Scand J Immunol* 1987; 26: 653-661.

KRAUSS R M, ECKEL R H, HOWARD B, APPEL L J, DANIELS S R, DECKELBAUM R J, ERDMAN J W, JR., KRIS-ETHERTON P, GOLDBERG I J, KOTCHEN T A, LICHTENSTEIN A H, MITCH W E, MULLIS R, ROBINSON K, WYLIE-ROSETT J, ST J S, SUTTIE J, TRIBBLE D L, BAZZARRE T L. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation* 2000; 102: 2284-2299.

KUSHI L H, LEW R A, STARE F J, ELLISON C R, EL L M, BOURKE G, DALY L, GRAHAM I, HICKEY N, MULCAHY R, . Diet and 20-year mortality from coronary heart disease. The Ireland-Boston Diet-Heart Study. *N Engl J Med* 1985; 312: 811-818.

KUULASMAA K, TUNSTALL-PEDOE H, DOBSON A, FORTMANN S, SANS S, TOLONEN H, EVANS A, FERRARIO M, TUOMILEHTO J. Estimation of contribution of changes in classic risk factors to trends in coronary-event rates across the WHO MONICA Project populations. *Lancet* 2000; 355: 675-687.



LABRADA L, LIANG X H, ZHENG W, JOHNSTON C, LEVINE B. Age-dependent resistance to lethal alphavirus encephalitis in mice: analysis of gene expression in the central nervous system and identification of a novel interferon-inducible protective gene, mouse ISG12. *J Virol* 2002; 76: 11688-11703.

LAWN R M, WADE D P, GARVIN M R, WANG X, SCHWARTZ K, PORTER J G, SEILHAMER J J, VAUGHAN A M, ORAM J F. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 1999; 104: R25-R31.

LEFEBVRE P, CHINETTI G, FRUCHART J C, STAELS B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006; 116: 571-580.

LEON M L und ZUCKERMAN S H. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res* 2005; 54: 395-411.

LI A C, BROWN K K, SILVESTRE M J, WILLSON T M, PALINSKI W, GLASS C K. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 2000; 106: 523-531.

LI H, FREEMAN M W, LIBBY P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J Clin Invest* 1995; 95: 122-133.

LI Q, ZHANG M, KUMAR S, ZHU L J, CHEN D, BAGCHI M K, BAGCHI I C. Identification and implantation stage-specific expression of an interferon-alpha-regulated gene in human and rat endometrium. *Endocrinology* 2001; 142: 2390-2400.

LIAO F, BERLINER J A, MEHRABIAN M, NAVAB M, DEMER L L, LUSIS A J, FOGELMAN A M. Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice. *J Clin Invest* 1991; 87: 2253-2257.

LINTON M F, ATKINSON J B, FAZIO S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science* 1995; 267: 1034-1037.

LINTON M F und FAZIO S. Macrophages, lipoprotein metabolism, and atherosclerosis: insights from murine bone marrow transplantation studies. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10: 97-105.

LINTON M F und FAZIO S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27 Suppl 3: S35-S40.

MACH F, SAUTY A, IAROSSO A S, SUKHOVA G K, NEOTE K, LIBBY P, LUSTER A D. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999; 104: 1041-1050.

MACH F, SCHONBECK U, SUKHOVA G K, BOURCIER T, BONNEFOY J Y, POBER J S, LIBBY P. Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1931-1936.

MAGNUS P und BEAGLEHOLE R. The real contribution of the major risk factors to the coronary epidemics: time to end the "only-50%" myth. *Arch Intern Med* 2001; 161: 2657-2660.

MARTENSEN P M und JUSTESEN J. Small ISGs coming forward. *J Interferon Cytokine Res* 2004; 24: 1-19.

MARTENSEN P M, SOGAARD T M, GJERMANDSEN I M, BUTTENSCHON H N, ROSSING A B, BONNEVIE-NIELSEN V, ROSADA C, SIMONSEN J L, JUSTESEN J. The interferon alpha induced protein ISG12 is localized to the nuclear membrane. *Eur J Biochem* 2001; 268: 5947-5954.

MARTINEZ-GONZALEZ J und BADIMON L. The NR4A subfamily of nuclear receptors: new early genes regulated by growth factors in vascular cells. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 609-618.

MCDONALD C C und STEWART H J. Fatal myocardial infarction in the Scottish adjuvant tamoxifen trial. The Scottish Breast Cancer Committee. *BMJ* 1991; 303: 435-437.

MCGILL H C, JR., MCMAHAN C A, ZIESKE A W, TRACY R E, MALCOM G T, HERDERICK E E, STRONG J P. Association of Coronary Heart Disease Risk Factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth. *Circulation* 2000; 102: 374-379.

MOORE K J, ROSEN E D, FITZGERALD M L, RANDOW F, ANDERSSON L P, ALTSHULER D, MILSTONE D S, MORTENSEN R M, SPIEGELMAN B M, FREEMAN M W. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med* 2001; 7: 41-47.

NAITO M, HAYASHI S, YOSHIDA H, NISHIKAWA S, SHULTZ L D, TAKAHASHI K. Abnormal differentiation of tissue macrophage populations in 'osteopetrosis' (op) mice defective in the production of macrophage colony-stimulating factor. *Am J Pathol* 1991; 139: 657-667.

NAKAGAWA T, NOZAKI S, NISHIDA M, YAKUB J M, TOMIYAMA Y, NAKATA A, MATSUMOTO K, FUNAHASHI T, KAMEDA-TAKEMURA K, KURATA Y,

YAMASHITA S, MATSUZAWA Y. Oxidized LDL increases and interferon-gamma decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1350-1357.

NAVAB M, BERLINER J A, WATSON A D, HAMA S Y, TERRITO M C, LUSIS A J, SHIH D M, VAN LENTEN B J, FRANK J S, DEMER L L, EDWARDS P A, FOGELMAN A M. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 831-842.

NIU X L, YANG X, HOSHIAI K, TANAKA K, SAWAMURA S, KOGA Y, NAKAZAWA H. Inducible nitric oxide synthase deficiency does not affect the susceptibility of mice to atherosclerosis but increases collagen content in lesions. *Circulation* 2001; 103: 1115-1120.

O'BRIEN K D, OLIN K L, ALPERS C E, CHIU W, FERGUSON M, HUDKINS K, WIGHT T N, CHAIT A. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation* 1998; 98: 519-527.

ORNISH D, SCHERWITZ L W, BILLINGS J H, BROWN S E, GOULD K L, MERRITT T A, SPARLER S, ARMSTRONG W T, PORTS T A, KIRKEEIDE R L, HOGEBROOM C, BRAND R J. Intensive lifestyle changes for reversal of coronary heart disease. *JAMA* 1998; 280: 2001-2007.

OVAN-WRIGHT E M, FERRIER G R, ROBERTSON H A, HOWLETT S E. Increased expression of the gene for alpha-interferon-inducible protein in cardiomyopathic hamster heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 103-108.

PANOUSIS C G und ZUCKERMAN S H. Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000a; 20: 1565-1571.

PANOUSIS C G und ZUCKERMAN S H. Regulation of cholesterol distribution in macrophage-derived foam cells by interferon-gamma. *J Lipid Res* 2000b; 41: 75-83.

PAPAC-MILICEVIC N, RYBAN L, ZAUJEC J, OLCAYDU D, HOCHRAINER K, BARANYI U, PLYUSHCH T, BAUER M, CHRENEK P, HOLSBOER F, LUCAE S, BINDER C J, BREUSS J M, BINDER E B, UHRIN P, BINDER B R. The interferon-inducible gene 12 (ISG12), a novel factor modulating the vascular response to injury. Manuscript in preparation 2007.

PARKER N und PORTER A C. Identification of a novel gene family that includes the interferon-inducible human genes 6-16 and ISG12. *BMC Genomics* 2004; 5: 8.

PEET D J, TURLEY S D, MA W, JANOWSKI B A, LOBACCARO J M, HAMMER R E, MANGELSDORF D J. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 1998; 93: 693-704.

PEI L, CASTRILLO A, CHEN M, HOFFMANN A, TONTONOZ P. Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli. *J Biol Chem* 2005; 280: 29256-29262.

PETERSEN S, PETO V, RAYNER M, LEAL J, LUENGO-FERNANDEZ R, GRAY A. *European cardiovascular disease statistics, 2005 Edition*. Oxford, 2005.

PIEDRAHITA J A, ZHANG S H, HAGAMAN J R, OLIVER P M, MAEDA N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 4471-4475.

PLUMP A S, SMITH J D, HAYEK T, ALTO-SETALA K, WALSH A, VERSTUYFT J G, RUBIN E M, BRESLOW J L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 1992; 71: 343-353.

POLS T W, BONTA P I, DE VRIES C J. NR4A nuclear orphan receptors: protective in vascular disease? *Curr Opin Lipidol* 2007; 18: 515-520.

POSTON R N, HASKARD D O, COUCHER J R, GALL N P, JOHNSON-TIDEY R R. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1992; 140: 665-673.

PYORALA K, LAAKSO M, UUSITUPA M. Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3: 463-524.

RAINES E W und ROSS R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993; 69: S30-S37.

RASMUSSEN U B, WOLF C, MATTEI M G, CHENARD M P, BELLOCQ J P, CHAMBON P, RIO M C, BASSET P. Identification of a new interferon-alpha-inducible gene (p27) on human chromosome 14q32 and its expression in breast carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 4096-4101.

RECKLESS J, METCALFE J C, GRAINGER D J. Tamoxifen decreases cholesterol sevenfold and abolishes lipid lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 1997; 95: 1542-1548.

REDGRAVE T G, ROBERTS D C, WEST C E. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem* 1975; 65: 42-49.

REISS A B, AWADALLAH N W, MALHOTRA S, MONTESINOS M C, CHAN E S, JAVITT N B, CRONSTEIN B N. Immune complexes and IFN-gamma decrease cholesterol 27-hydroxylase in human arterial endothelium and macrophages. *J Lipid Res* 2001; 42: 1913-1922.

REISS A B, PATEL C A, RAHMAN M M, CHAN E S, HASNEEN K, MONTESINOS M C, TRACHMAN J D, CRONSTEIN B N. Interferon-gamma impedes reverse cholesterol transport and promotes foam cell transformation in THP-1 human monocytes/macrophages. *Med Sci Monit* 2004; 10: BR420-BR425.

REPA J J, LIANG G, OU J, BASHMAKOV Y, LOBACCARO J M, SHIMOMURA I, SHAN B, BROWN M S, GOLDSTEIN J L, MANGELSDORF D J. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRA and LXRbeta. *Genes Dev* 2000a; 14: 2819-2830.

REPA J J, TURLEY S D, LOBACCARO J A, MEDINA J, LI L, LUSTIG K, SHAN B, HEYMAN R A, DIETSCHY J M, MANGELSDORF D J. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000b; 289: 1524-1529.

ROLLINS B J, YOSHIMURA T, LEONARD E J, POBER J S. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am J Pathol* 1990; 136: 1229-1233.

ROSAMOND W, FLEGAL K, FRIDAY G, FURIE K, GO A, GREENLUND K, HAASE N, HO M, HOWARD V, KISSELA B, KITTNER S, LLOYD-JONES D, MCDERMOTT M, MEIGS J, MOY C, NICHOL G, O'DONNELL C J, ROGER V, RUMSFELD J, SORLIE P, STEINBERGER J, THOM T, WASSERTHIEL-SMOLLER S, HONG Y. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007; 115: e69-171.

ROSENFELD M E, YLA-HERTTUALA S, LIPTON B A, ORD V A, WITZTUM J L, STEINBERG D. Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *Am J Pathol* 1992; 140: 291-300.

RUST S, ROSIER M, FUNKE H, REAL J, AMOURA Z, PIETTE J C, DELEUZE J F, BREWER H B, DUVERGER N, DENEFLÉ P, ASSMANN G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 1999; 22: 352-355.

RUTQVIST L E und MATTSSON A. Cardiac and thromboembolic morbidity among postmenopausal women with early-stage breast cancer in a randomized trial of adjuvant

tamoxifen. The Stockholm Breast Cancer Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1398-1406.

SACKS F M, APPEL L J, MOORE T J, OBARZANEK E, VOLLMER W M, SVETKEY L P, BRAY G A, VOGT T M, CUTLER J A, WINDHAUSER M M, LIN P H, KARANJA N. A dietary approach to prevent hypertension: a review of the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) Study. *Clin Cardiol* 1999; 22: III6-10.

SACKS F M, SVETKEY L P, VOLLMER W M, APPEL L J, BRAY G A, HARSHA D, OBARZANEK E, CONLIN P R, MILLER E R, III, SIMONS-MORTON D G, KARANJA N, LIN P H. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 2001; 344: 3-10.

SAKAGUCHI H, TAKEYA M, SUZUKI H, HAKAMATA H, KODAMA T, HORIUCHI S, GORDON S, VAN DER LAAN L J, KRAAL G, ISHIBASHI S, KITAMURA N, TAKAHASHI K. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* 1998; 78: 423-434.

SAMAHA F F, IQBAL N, SESHADRI P, CHICANO K L, DAILY D A, MCGRORY J, WILLIAMS T, WILLIAMS M, GRACEY E J, STERN L. A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *N Engl J Med* 2003; 348: 2074-2081.

SATA M, SAIURA A, KUNISATO A, TOJO A, OKADA S, TOKUHISA T, HIRAI H, MAKUUCHI M, HIRATA Y, NAGAI R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002; 8: 403-409.

SCANDINAVIAN SIMVASTATIN SURVIVAL STUDY (4S). Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344: 1383-1389.

SCHILLER N K, KUBO N, BOISVERT W A, CURTISS L K. Effect of gamma-irradiation and bone marrow transplantation on atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1674-1680.

SEMPLE R K, CHATTERJEE V K, O'RAHILLY S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 581-589.

SHEPHERD J, COBBE S M, FORD I, ISLES C G, LORIMER A R, MACFARLANE P W, MCKILLOP J H, PACKARD C J. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 1301-1307.

STARY H C, CHANDLER A B, DINSMORE R E, FUSTER V, GLAGOV S, INSULL W, JR., ROSENFELD M E, SCHWARTZ C J, WAGNER W D, WISSLER R W. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92: 1355-1374.

STEINBERG D, PARTHASARATHY S, CAREW T E, KHOO J C, WITZTUM J L. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-924.

STRONG J P, MALCOM G T, MCMAHAN C A, TRACY R E, NEWMAN W P, III, HERDERICK E E, CORNHILL J F. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. *JAMA* 1999; 281: 727-735.

SUZUKI H, KURIHARA Y, TAKEYA M, KAMADA N, KATAOKA M, JISHAGE K, UEDA O, SAKAGUCHI H, HIGASHI T, SUZUKI T, TAKASHIMA Y, KAWABE Y, CYN Shi O, WADA Y, HONDA M, KURIHARA H, ABURATANI H, DOI T, MATSUMOTO A, AZUMA S, NODA T, TOYODA Y, ITAKURA H, YAZAKI Y, KODAMA T. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997; 386: 292-296.

TAKAHASHI K, TAKEYA M, SAKASHITA N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc* 2002; 35: 179-203.

TALL A R, JIANG X, LUO Y, SILVER D. 1999 George Lyman Duff memorial lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1185-1188.

TANGIRALA R K, RUBIN E M, PALINSKI W. Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 1995; 36: 2320-2328.

TUNSTALL-PEDOE H, KUULASMAA K, MAHONEN M, TOLONEN H, RUOKOKOSKI E, AMOUYEL P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet* 1999; 353: 1547-1557.

TUZCU E M, KAPADIA S R, TUTAR E, ZIADA K M, HOBBS R E, MCCARTHY P M, YOUNG J B, NISSEN S E. High prevalence of coronary atherosclerosis in asymptomatic teenagers and young adults: evidence from intravascular ultrasound. *Circulation* 2001; 103: 2705-2710.

VOGELVANG T E, VAN DER MOOREN M J, MIJATOVIC V, KENEMANS P. Emerging selective estrogen receptor modulators: special focus on effects on coronary heart disease in postmenopausal women. *Drugs* 2006; 66: 191-221.

WAGNER A H, GEBAUER M, POLLOK-KOPP B, HECKER M. Cytokine-inducible CD40 expression in human endothelial cells is mediated by interferon regulatory factor-1. *Blood* 2002; 99: 520-525.

WAGSATER D, OLOFSSON P S, NORGRÉN L, STENBERG B, SIRSJÖ A. The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 1187-1193.

WHITE C R, BROCK T A, CHANG L Y, CRAPO J, BRISCOE P, KU D, BRADLEY W A, GIANTURCO S H, GORE J, FREEMAN B A, . Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1044-1048.

WHITMAN S C, RAVISANKAR P, ELAM H, DAUGHERTY A. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *Am J Pathol* 2000; 157: 1819-1824.

WHO MONICA PROJECT PRINCIPAL INVESTIGATORS. The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. *J Clin Epidemiol* 1988; 41: 105-114.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Report 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. World Health Organization, Genf, 2002.

YANG J B, DUAN Z J, YAO W, LEE O, YANG L, YANG X Y, SUN X, CHANG C C, CHANG T Y, LI B L. Synergistic transcriptional activation of human Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 gene by interferon-gamma and all-trans-retinoic acid THP-1 cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 20989-20998.

YUSAF S, HAWKEN S, OUNPUU S, DANS T, AVEZUM A, LANAS F, MCQUEEN M, BUDAJ A, PAIS P, VARIGO J, LISHENG A, on behalf of the INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART Study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 937-952.

YANO K, MACLEAN C J, REED D M, SHIMIZU Y, SASAKI H, KODAMA K, KATO H, KAGAN A. A comparison of the 12-year mortality and predictive factors of coronary heart disease among Japanese men in Japan and Hawaii. *Am J Epidemiol* 1988; 127: 476-487.



YLA-HERTTUALA S, ROSENFELD M E, PARTHASARATHY S, GLASS C K, SIGAL E, WITZTUM J L, STEINBERG D. Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6959-6963.

ZIBARA K, CHIGNIER E, COVACHO C, POSTON R, CANARD G, HARDY P, MCGREGOR J. Modulation of expression of endothelial intercellular adhesion molecule-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in aortic arch lesions of apolipoprotein E-deficient compared with wild-type mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2288-2296.

ZUCKERMAN S H, EVANS G F, O'NEAL L. Cytokine regulation of macrophage apo E secretion: opposing effects of GM-CSF and TGF-beta. *Atherosclerosis* 1992; 96: 203-214.



## 6. Lebenslauf

Julia Mayerhofer  
geboren am 31.7.1981  
in Klagenfurt

### Ausbildung

1987 – 1991	Volksschule Kirchbach
1991 – 1995	Hauptschule Kötschach Mauthen
1995 – 1999	Oberstufenrealgymnasium Hermagor
1999 – 2000	Freiwilliges Soziales Jahr, Altersheim Treffen
2000 – 2001	Studium der Germanistik und Pädagogik, Universität Klagenfurt
seit 2001	Studium der Ernährungswissenschaften, Universität Wien