



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fakultät für Medizin

Die Rolle einer langen, nicht-kodierenden RNA am Chromosom 4q27 für das Risiko koronarer Herzerkrankungen

Carolin Luisa Höhne

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitz: apl. Prof. Dr. Stefan Thorban

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Heribert Schunkert
2. Priv.- Doz. Dr. Klaus Lehmann-Horn

Die Dissertation wurde am 13.12.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.04.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	XI
1 Einleitung	15
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen	15
1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose	16
1.3 Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung	18
1.4 Phosphodiesterase 5A	21
1.5 NO-cGMP-Signalweg	22
1.6 Die Rolle des NO-cGMP-Signalwegs bei Atherosklerose	24
1.7 Nicht-kodierende RNAs	26
2 Zielsetzung	29
3 Materialien	30
3.1 Chemikalien	30
3.2 Puffer, Medien, Lösungen	33
3.2.1 Standardpuffer und -lösungen	33
3.2.2 Medien zur Kultivierung und Selektion von Bakterien	35
3.2.3 Medien und Lösungen zur Kultivierung humaner Zellen	36
3.2.4 Puffer und Lösungen für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	37
3.2.5 Puffer und Lösungen für den Electrophoretic mobility shift assay	38
3.3 Primer	41
3.4 Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	43
3.5 siRNA	43
3.6 Nukleinsäuren	44
3.7 Enzyme	44
3.8 Zelllinien	45
3.9 Kompetente Bakterien für die Transformation	45

3.10	Klonierungsvektoren	45
3.11	Kits	46
3.12	Bedarfsmaterial	47
3.13	Geräte und Utensilien	48
3.14	Software	48
3.15	Datenbanken	49
3.16	Online Tools und Ressourcen	49
4	Methoden	50
4.1	Primerdesign	50
4.2	Polymerase-Kettenreaktion	50
4.2.1	Endpunkt-PCR	50
4.2.2	Reverse Transkription	52
4.2.3	Quantitative PCR	53
4.2.4	Auswertung qPCR	54
4.3	Agarose-Gelelektrophorese	55
4.4	DNA-Extraktion aus Agarosegel	55
4.5	Klonierung	55
4.5.1	pGL4.10[<i>luc2</i>] mit SNP rs7678555	56
4.5.2	pBI-CMV2 und pcDNA3.1(+) mit <i>LINC02502</i>	56
4.5.3	Restriktionsverdau	57
4.5.4	Dephosphorylierung und Ligation	58
4.6	Gezielte Mutagenese	59
4.7	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	60
4.7.1	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	60
4.7.2	Beimpfen von Übernacht-Kulturen	61
4.7.3	Plasmid-Extraktion aus <i>E. coli</i> Bakterien	61
4.7.4	Kontrollverdau von Plasmid-DNA	62
4.8	Sequenzierung	62
4.9	Zellkultur	63
4.9.1	Passagieren der Zellen	63

4.9.2	Einfrieren der Zellen	64
4.9.3	Zellkonzentrationen und Plattenformate	64
4.10	Transiente Transfektion	65
4.10.1	Elektroporation.....	65
4.10.2	FuGENE ® HD.....	65
4.10.3	Invitrogen™ Lipofectamin® RNAiMAX™.....	66
4.10.4	FACS-Sorting transfizierter Zellen von untransfizierten Zellen.....	67
4.11	Stimulation	67
4.11.1	Stimulation der HAoSMC mit oxidiertem LDL.....	67
4.11.2	Stimulation der HAoSMC mit Interleukin-1β	67
4.12	RNA-Isolierung	68
4.12.1	RNeasy® Plus Mini Kit.....	68
4.12.2	Ambion™ TRIzol®.....	69
4.12.3	Nukleus/ Zytoplasma-Fraktionierung und RNA-Isolierung mit Ambion™ TRIzol®...	70
4.13	DNase I Verdau	70
4.14	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	71
4.15	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	71
4.16	Luciferase-Reportergen-System.....	72
4.17	Electrophoretic Mobility Shift Assay.....	73
4.17.1	Nukleärer Extrakt	73
4.17.2	3' Biotinylierung der Oligonukleotide	74
4.17.3	EMSA.....	75
4.17.4	Blotten.....	76
4.18	Statistische Analyse.....	77
5	Ergebnisse.....	79
5.1	KHK-Risikolocus auf Chromosom 4q27	79
5.2	Untersuchung von <i>LINC02502</i>	79
5.2.1	Datenrecherche über die langen, nicht-kodierenden RNA <i>LINC02502</i>	79
5.2.2	Expression von <i>LINC02502</i> in unterschiedlichen Zelllinien	82
5.2.3	Lokalisation von <i>LINC02502</i> innerhalb der Zelle	83

5.2.4	Lokalisation von <i>LINC02502</i> in einem proatherogenen Milieu	85
5.2.5	Struktur von <i>LINC02502</i>	86
5.2.6	Ergebnisse der Charakterisierung der lncRNA <i>LINC02502</i>	88
5.3	Expressionsanalyse <i>MAD2L1</i>	88
5.4	Interaktion <i>LINC02502</i> und <i>PDE5A</i>	89
5.4.1	Ergebnisse der Interaktionsuntersuchung von <i>LINC02502</i> und <i>PDE5A</i>	93
5.5	Untersuchung von rs7678555.....	94
5.5.1	Regulatorische Funktion von rs7678555	94
5.5.2	Untersuchung möglicher bindender Transkriptionsfaktoren an rs7678555	95
5.5.3	Ergebnisse der Untersuchung der SNP-Region rs7678555	96
6	Diskussion	97
6.1	<i>LINC02502</i>	97
6.2	Interaktion <i>LINC02502</i> und <i>PDE5A</i>	100
6.3	Einfluss der KHK-Risikovariante	101
6.4	Vom Genotyp zum Phänotyp	103
6.5	Ausblick	104
7	Literaturverzeichnis	105
8	Anhang.....	126
Anhang 1	Vektorkarte von pBI-CMV2.....	126
Anhang 2	Vektorkarte von pcDNA3.1(+)	126
Anhang 3	Vektorkarte von pGL4.10[luc2].....	127
Anhang 4	Sequenz <i>LINC02502</i>	127
Anhang 5	Region Einzelnukleotid-Polymorphismus rs7678555	127
9	Danksagung.....	128

Abkürzungsverzeichnis

AcGFP1/ GFP	<i>Aequorea coerulea</i> grün fluoreszierendes Protein 1/ grün-fluoreszierendes Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bp	Basenpaar
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> , Komplementär Desoxyribonukleinsäure
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> , zyklisches Guanosinmonophosphat
C _T	<i>Cycle Threshold</i> , Schwellenwertzyklus
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> , Elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assay
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FDR	<i>False discovery rate</i> , Falscherkennungsrate
gDNA	Genomische Desoxyribonukleinsäure
GTP	Guanosintriphosphat
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HAoSMC	<i>Human aortic smooth muscle cells</i> , humane aortale glatte Muskelzellen
HEK293	<i>Human embryonic kidney cell</i> , humane embryonale Nierenzelle
HIL-1 β	Humanes Interleukin-1 β
IRAG	IP3 Rezeptor-assoziiertes cGKI β -Substrat
kb	Kilo-Basenpaar
KHK	Koronare Herzkrankheit
LB	<i>Lysogeny broth</i> , Nährmedium für eine Bakterienkultur
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> , Lipoprotein niederer Dichte
lncRNA	<i>Long non-coding ribonucleic acid</i> , lange nicht-kodierende Ribonukleinsäure
MAD2L1	<i>Mitotic arrest deficient 2 like 1</i>
MALAT1	<i>Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1</i>
MI	Myokardinfarkt
MLCP	Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase

MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i> , Mikro-Ribonukleinsäure
ncRNA	<i>Non-coding ribonucleic acid</i> , nicht-kodierende Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OR	Odds-Ratio
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PKG	Proteinkinase G, zyklisches Guanosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase G
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> , Ribonukleinsäure-induzierter Stilllegungskomplex
RNA	Ribonukleinsäure
RPLP0	<i>Ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPKM	<i>Reads per kilobase per million reads</i>
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler des arithmetischen Mittels
SDS	<i>Sodium lauryl sulfate</i> , Natriumlaurylsulfat
SGC	<i>Soluble guanylyl cyclase</i> , lösliche Guanylatzyklase
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i> , kleine eingreifende Ribonukleinsäure
SMC	<i>Smooth muscle cell</i> , glatte Muskelzelle
sncRNA	<i>Small non-coding ribonucleic acid</i> , Kleine nicht-kodierende Ribonukleinsäure
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TdT	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase</i>
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
VSMC	<i>Vascular smooth muscle Cell</i> , glatte Gefäßmuskelzelle
WHO	<i>World Health Organisation</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Die Frühphase der Atherosklerose.....	17
Abbildung 2 Die atherosklerotische Läsion	18
Abbildung 3 KHK-Risikoloci, die assoziierten Gene und ihre pathophysiologischen Signalwege bei der Atherosklerose.....	19
Abbildung 4 Identifizierung des Risikoallels rs7678555	20
Abbildung 5 PDE-Familienklassifikation nach Substratspezifität	21
Abbildung 6 Der NO-cGMP-Signalweg	23
Abbildung 7 Die Rolle des NO-cGMP-Signalwegs bei der Atherosklerose.....	24
Abbildung 8 <i>PDE5A</i> -Expression und SNP-Analyse	26
Abbildung 9 Überblick über die zellulären Funktionen von lncRNAs	27
Abbildung 10 Schema des KHK-Risikolocus auf Chromosom 4q27	79
Abbildung 11 Expression von <i>LINC02502</i> in verschiedenen Geweben.....	81
Abbildung 12 Korrelation zwischen <i>PDE5A</i> und <i>LINC02502</i>	82
Abbildung 13 Detektion von <i>LINC02502</i> in humanen Zelllinien	83
Abbildung 14 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von <i>LINC02502</i> in HAoSMCs	84
Abbildung 15 Lokalisation von <i>LINC02502</i> innerhalb von HAoSMCs	85
Abbildung 16 Lokalisation von <i>LINC02502</i> innerhalb der HAoSMC nach Stimulation.....	86
Abbildung 17 Charakterisierung von <i>LINC02502</i>	87
Abbildung 18 Expression von <i>MAD2L1</i> in verschiedenen Geweben	89
Abbildung 19 Hochregulation von <i>LINC02502</i> und Zell-Sortierung	90
Abbildung 20 Analyse von <i>LINC02502</i> und <i>PDE5A</i> nach Hochregulation von <i>LINC02502</i>	91
Abbildung 21 Analyse von <i>LINC02502</i> und <i>PDE5A</i> nach Herunterregulation von <i>LINC02502</i>	92
Abbildung 22 Analyse von <i>LINC02502</i> und <i>PDE5A</i> nach Herunterregulation von <i>PDE5A</i>	93
Abbildung 23 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Luciferase-Plasmide.....	94
Abbildung 24 Regulatorische Eigenschaften der Region um den SNP rs7678555	95
Abbildung 25 Bindung von nukleären Proteinen an die SNP-Region	96
Abbildung 26 Interaktion <i>PDE5A</i> und <i>LINC02502</i>	100
Abbildung 27 Vom Genotyp zu Phänotyp, der Signalweg der KHK-Risikovariante.	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Chemikalien	30
Tabelle 2	Primer für qPCR	41
Tabelle 3	Primer, um festzustellen, ob <i>LINC02502</i> zirkulär oder linear ist.....	41
Tabelle 4	Primer für die Detektion von Gensequenzen in unterschiedlichen Geweben.....	41
Tabelle 5	Primer für die Ligation der SNP-Region in den pGL4.10[<i>luc2</i>] Vektor.....	42
Tabelle 6	Primer für die Ligation von <i>LINC02502</i> in pcDNA3.1(+) und pBI-CMV2	42
Tabelle 7	Primer für die Mutagenese des Allels von rs7678555	42
Tabelle 8	Primer zur Überprüfung der DNA-Sequenzen in den Plasmiden	42
Tabelle 9	Primer für den Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)	43
Tabelle 10	Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	43
Tabelle 11	siRNA (small interfering RNA) zur Unterdrückung der Genexpression	43
Tabelle 12	Mastermixe mit Polymerasen	44
Tabelle 13	Restriktionsenzyme für Kontrollverdaue.....	44
Tabelle 14	Restriktionsenzyme für Klonierungen.....	44
Tabelle 15	Weitere Enzyme	45
Tabelle 16	Kommerziell erhältliche Zelllinien	45
Tabelle 17	Kompetente Bakterien	45
Tabelle 18	Expressionsvektoren	45
Tabelle 19	Luciferase-Reportergen-Vektoren	46
Tabelle 20	Klonierte Plasmide.....	46
Tabelle 21	Kits.....	46
Tabelle 22	Bedarfsmaterial	47
Tabelle 23	Geräte und Utensilien.....	48
Tabelle 24	Software	48
Tabelle 25	Datenbanken	49
Tabelle 26	Online Tools und Ressourcen	49
Tabelle 27	Reaktionsprotokoll für qualitative DNA-Detektionen.....	51
Tabelle 28	Reaktionsprotokoll für Amplifikationen von gDNA/ cDNA für Klonierungen	51
Tabelle 29	PCR-Protokoll für OneTaq [®] und Q5 [®] High-Fidelity DNA-Polymerasen.....	51

Tabelle 30	Ansatz für den Denaturierungsschritt	52
Tabelle 31	Reagenzien für die cDNA-Erststrang-Synthese	53
Tabelle 32	qPCR-Reaktionsansatz pro Well auf einer 96-Well Mikrotiterplatte	53
Tabelle 33	Temperaturprofil der qPCR und Schmelzkurvenanalyse	54
Tabelle 34	Doppelverdau Reaktionsansatz.....	57
Tabelle 35	Enzyme und Puffer für den Doppelverdau	57
Tabelle 36	Ansatz der Dephosphorylierung	58
Tabelle 37	Verhältnis Vektor-DNA zur einzufügenden DNA-Sequenz.....	58
Tabelle 38	Ansatz der Ligation	59
Tabelle 39	Mutagenesereaktion	59
Tabelle 40	Temperaturprofil Mutagenesereaktion.....	60
Tabelle 41	Kontrollverdau	62
Tabelle 42	Ansatz für Sequenzierungen	63
Tabelle 43	Well-Schema für die Aussaat	64
Tabelle 44	Transfektionsansatz für den Dual-Luciferase-Assay mit FuGENE® HD	66
Tabelle 45	Ansatz für die Transfektion mit Lipofectamin® RNAiMAX™	66
Tabelle 46	Stimulationsansatz der HAoSMC mit oxidiertem LDL	67
Tabelle 47	Stimulationsansatz der HAoSMC mit humanem Interleukin-1 β	68
Tabelle 48	Pipettierschema für den DNase I Verdau	71
Tabelle 49	Eigenschaften der FISH-Sonden und von DAPI.....	72
Tabelle 50	Ansatz für eine 3' Biotin-Markierungs-Reaktion	75
Tabelle 51	EMSA Reaktionsansätze	76

Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit ist weiterhin eine der führenden Todesursachen weltweit. Genetische Prädisposition kann ihr Erkrankungsrisiko begünstigen. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. Durch genomweite Assoziationsstudien sind in den letzten Jahren über 300 genetische Varianten identifiziert worden, die mit dem erhöhten Risiko an der koronaren Herzkrankheit zu erkranken, assoziiert sind. Eine dieser Varianten ist der Einzelnukleotid-Polymorphismus rs7678555 auf Chromosom 4q27.

Das Risikoallel von rs7678555 wurde mit einer erhöhten Expression von *PDE5A* assoziiert. *PDE5A* kodiert für das Phosphodiesterase 5 A (PDE5A) Enzym. Dieses nimmt eine entscheidende Rolle im Stickstoffmonoxid (NO)-/zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)-Signalweg ein, indem es cGMP zu GMP degradiert. Auf diese Weise nimmt PDE5A Einfluss unter anderem auf die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen und die Aggregation von Thrombozyten. Der molekulare Mechanismus, der das rs7678555-Risikoallel mit der erhöhten *PDE5A*-Expression verbindet, ist jedoch unbekannt.

Das Ziel dieser Arbeit war es, diesen Mechanismus zu ergründen. Eine Möglichkeit stellt dabei die Beteiligung von nicht-kodierenden RNAs dar, welche kürzlich mit der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Verbindung gebracht wurden. In dieser Arbeit wird insbesondere die Rolle und Funktion, der am Chromosom 4q27 lokalisierten, langen, intergenischen und nicht-kodierenden RNA (lncRNA) 02502 (*LINC02502*) in Bezug auf die Regulation von *PDE5A* untersucht. Es zeigte sich, dass es sich bei *LINC02502* um eine, auch unter proatherogenen bzw. proinflammatorischen Bedingungen, zytosolisch lokalisierte lange, nicht-kodierende RNA handelt. Sie wird hauptsächlich in humanen glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert.

Im Zellkulturmodell führt die Reduktion von *LINC02502* zu einer verminderten *PDE5A* Expression, während die Überexpression von *LINC02502* eine Erhöhung der *PDE5A* Expression zur Folge hat. Zudem ergeben sich Hinweise auf einen regulatorischen Mechanismus, bei dem die Variante rs7678555 am 4q27-KHK-Locus die *PDE5A*-Expression moduliert. So zeigen Reporterassays mit der Gensequenz um rs7678555 als artifizieller Promotor, dass das Risikoallel der Variante zu einer gesteigerten Luciferase-Aktivität führt. Auf diese Weise könnte das Risikoallel des Einzelnukleotid-Polymorphismus die Expression nahegelegener Transkripte, z.B. *LINC02502*, positiv beeinflussen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen ersten Einblick in den molekularen Mechanismus des Risikolocus für die koronare Herzkrankheit. Die Variante rs7678555 weist regulatorische Aktivität auf, welche durch das Risikoallel verstärkt wird. Hierdurch kommt es mutmaßlich über die bisher nicht untersuchte lncRNA *LINC02502* zu einer gesteigerten Expression von *PDE5A*. Eine gesteigerte *PDE5A*-Expression und konsekutiv erhöhte Degradation des anti-atherosklerotischen Botenstoffes cGMP könnte einen plausiblen Mechanismus des erhöhten Erkrankungsrisikos an der koronaren Herzkrankheit darstellen. Die molekularen Mechanismen, über welche das Risikoallel zu einer gesteigerten *LINC02502*-Expression und diese wiederum zu einer gesteigerten *PDE5A*-Expression führen, bleiben Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte. Ferner sollte untersucht werden, ob *LINC02502* als Biomarker oder therapeutisches Zielmolekül bei der koronaren Herzkrankheit verwendet werden kann.

Summary

Coronary artery disease remains a leading cause of death worldwide. The risk for the disease can be enhanced through genetic predisposition. But the mechanisms behind are not yet fully understood. Genome-wide association studies have recognized more than 300 genetic variants associated with an increased risk of coronary artery disease. One of these variants is the single nucleotide polymorphism rs7678555 on chromosome 4q27. It had previously been associated with increased expression of *PDE5A*. The *PDE5A* gene encodes phosphodiesterase 5 A (PDE5A). PDE5A plays a critical role in the nitric oxide (NO)/cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway, in which it degrades cGMP to GMP. That leads to vascular smooth muscle cell migration and platelet aggregation. The molecular mechanism linking the rs7678555 genotype to *PDE5A* expression is unknown.

This work aimed to better understand the molecular mechanism linking the rs7678555 genotype to *PDE5A* expression and thus gain new insights into the importance of genetic predisposition for coronary artery disease.

In addition to DNA regions coding for genes, non-coding RNAs have also been identified to affect cellular functions in different ways. In particular, they have been linked to the development of cardiovascular disease. The role and function of the long intergenic non-coding RNA 02502 (*LINC02502*), located at chromosome 4q27, in the regulation of *PDE5A* was investigated. *LINC02502* was found to be a long non-coding RNA localized in the cytoplasm. It is expressed mainly in vascular smooth muscle cells independent of proatherogenic or proinflammatory conditions. Additionally, *LINC02502* appears to be directly involved in the regulation of *PDE5A*. Downregulation of *LINC02502* resulted in decreased detection of *PDE5A* *in vitro*. At the same time, overexpression of *LINC02502* increased *PDE5A* mRNA levels. Moreover, reporter gene assays revealed regulatory activity at the rs7678555 locus itself, which increased expression of the risk allele. This indicates that the risk allele may positively affect the expression of nearby transcripts, e.g., *LINC02502*. These results suggest that the rs7678555 variant at the 4q27 coronary artery disease locus modulates *PDE5A* expression by a regulatory mechanism through *LINC02502*.

This work provides the first insight into the molecular mechanism at the coronary artery disease risk locus on chromosome 4q27. The rs7678555 variant exhibits regulatory activity, with the risk allele associated with a stronger regulatory activity. This is thought to result in increased expression of *PDE5A* via the previously unstudied lncRNA *LINC02502*. Increased *PDE5A*

expression and consecutive degradation of the anti-atherosclerotic messenger cGMP present a plausible mechanism for increased risk for coronary artery disease. The molecular mechanisms by which the risk variant leads to increased *LINC02502* and *LINC02502* to increased *PDE5A* expression remain the subject of future research projects. Furthermore, whether *LINC02502* can be used as a biomarker or therapeutic target against coronary artery disease should be investigated.

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen weltweit mit ca. 17,5 Mio. Toten jährlich (World Health Organization, 2018) die häufigste Todesursache dar. Diese werden häufig durch die Atherosklerose verursacht, die die Gefäße des Kopfes, der Peripherie und des Herzens betreffen kann. Daraus resultieren vaskuläre Erkrankungen, wie Schlaganfall, periphere Verschlusskrankheiten und Krankheiten, die die Versorgung des Herzens betreffen. Die manifeste Atherosklerose der arteriellen Herzgefäße, die koronare Herzkrankheit (KHK), gehört zu den bedeutendsten Volkskrankheiten. Sie ist besonders gefährlich, da der Sauerstoffbedarf des Herzmuskels durch ein verengtes oder schon thrombosiertes Gefäß nicht gedeckt werden kann (Libby, 2013). Chronische Sauerstoffmangelversorgung des Myokards kann dessen Funktion einschränken und zu typischen Angina pectoris-Symptomen mit Leistungsminderung und Brustschmerzen führen. Durch einen akuten Gefäßverschluss im Falle einer Atherothrombose kann sich eine Myokardnekrose bilden. Die KHK kann somit sowohl chronisch degenerativ als auch akut lebensbedrohlich verlaufen. Weltweit wurden 2016 mehr als 15 % der Todesfälle auf die KHK zurückgeführt (WHO, 2018). Auch in Deutschland standen 2017 die chronische KHK und der akute Myokardinfarkt (MI) an den ersten beiden Stellen der letalen Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Zusammen machten sie knapp 30 % der kardiovaskulären Todesursachen aus (Statistisches Bundesamt Destatis, 2019).

In den vergangenen Jahren wurden die Therapie des akuten Myokardinfarkts und die symptomatische Behandlung der KHK verbessert. Die akute Mortalität der Erkrankung konnte deutlich reduziert werden. Im Zeitrahmen von 1990 – 2000 lag die 5-Jahres-Überlebensrate der MI-Patienten bei 54 % und stieg im Zeitrahmen 2001 – 2010 auf 61 % an. (Gerber et al., 2016) Aktuelle Daten aus den USA zeigen jedoch, dass der Anteil der Menschen mit einer asymptomatischen Koronarkalzifizierung, die mit einer erhöhten Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse einhergeht, zunimmt (Virani et al., 2021). Diese Daten verdeutlichen die Dringlichkeit und den Stellenwert der Prävention.

1.2 Pathophysiologie der Atherosklerose

Die Atherosklerose wurde von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in Genf 1958 definiert als „eine variable Kombination von Veränderungen der Intima von Arterien, bestehend aus der fokalen Ansammlung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutprodukten, faserigen Gewebe und Kalziumablagerungen“ (WHO 1958). Während die komplexe Pathophysiologie dieser arteriellen Gefäßerkrankung bereits vor 60 Jahren bekannt wurde, werden die Prozesse heute deutlich detaillierter und präziser verstanden.

Die arterielle Gefäßwand besteht aus drei Schichten. Dazu gehören die Intima, die Media und die Adventitia (Rhodin, 1962). Die Intima stellt die innere Gefäßschicht dar. Endothelzellen bilden dort eine dünne Grenze zwischen Gefäßlumen und der Gefäßwand. Distal der Endothelzellen und der Basallamina befindet sich ein extrazellulärer Raum, der vor allem elastische Fasern enthält, die von den glatten Muskelzellen (*smooth muscle cell*, SMC) aus der Media produziert werden. Glatte Muskelzellen und elastische Fasern bilden die Media. Die Adventitia bildet die äußerste Schicht. Hier finden sich u.a. Mastzellen, Fibroblasten und das Mikrogefäßsystem und die Nervenendigungen für die Versorgung und Funktion der Gefäßwand. (Libby et al., 2019)

Atherosklerotische Plaques entwickeln sich über mehrere Jahre und bleiben lange Zeit symptomlos. In der Anfangsphase der Atherosklerose migrieren Lipoproteine geringerer Dichte (*low-density Lipoprotein*, LDL) in die Intima (Libby et al., 2019) (Abbildung 1). Dort können die Partikel oxidieren und inflammatorische Prozesse anstoßen (Palinski et al., 1989). Infolgedessen binden Monozyten aus dem Blut an aktivierte Endothelzellen und migrieren in die Intima des Gefäßes (Napoli et al., 1997), wo sie sich zu Makrophagen differenzieren. Diese können über den Scavenger-Rezeptor und CD36 modifiziertes LDL in die Zelle aufnehmen und sich dadurch zu Schaumzellen entwickeln (Collot-Teixeira et al., 2007; Goldstein et al., 1979). Außerdem können sich auch glatte Muskelzellen und Endothelzellen zu Schaumzellen differenzieren (Lao et al., 2015). Im weiteren Verlauf wandern T-Zellen aus dem Plasma in die Intima ein (Ketelhuth & Hansson, 2016). Durch Entzündungsmediatoren wird die Migration von SMCs aus der Media in die Intima angeregt. Migrierte SMCs können über *LDL-receptor-related proteins* oxidiertes LDL aufnehmen (Llorente-Cortes et al., 2000), lokal proliferieren und extrazelluläre Matrixmoleküle, wie zum Beispiel Kollagen, Elastin, Proteoglykane und Glykosaminoglykane produzieren (Abbildung 2).

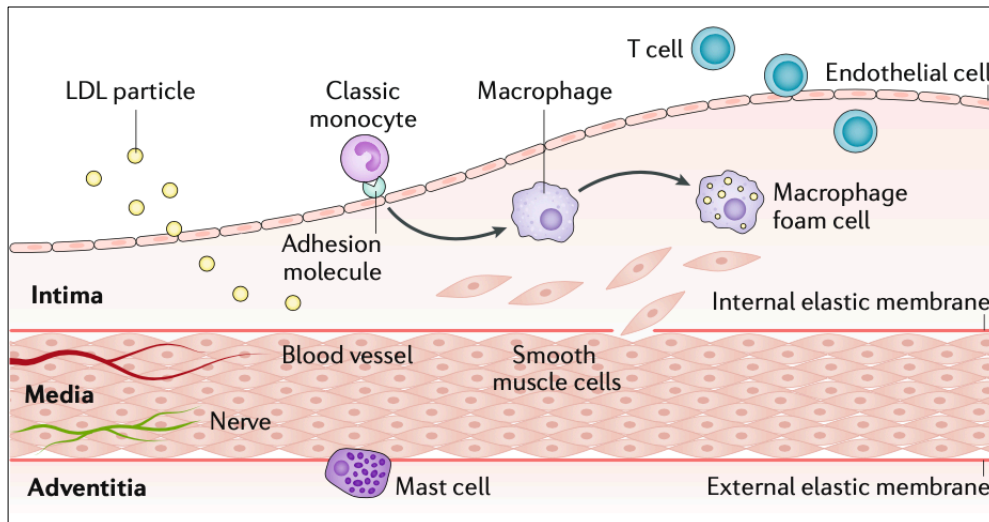


Abbildung 1 Die Frühphase der Atherosklerose. Die gesunde arterielle Gefäßwand besteht aus drei Schichten. Die äußere Schicht ist die Adventitia. Sie besteht aus Nervenendigungen (*nerves*), Mastzellen und einem Mikrogefäßsystem (*blood vessel; vasa vasorum*), welches die äußere Schicht der Media mit Nährstoffen versorgt. Die Media besteht aus glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*) und der extrazellulären Matrix. Die innerste Gefäßschicht, die Intima, ist der Entstehungsort atherosklerotischer Plaques. Lipoproteine niedriger Dichte (*low-density Lipoprotein, LDL*) können sich dort ansammeln und oxidieren. Dadurch werden inflammatorische Prozesse initiiert. Zudem werden Endothelzellen aktiviert, was zur vermehrten Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle (*adhesion molecules*) führt, an welche Monozyten (*classic monocyte*) aus dem Blutstrom binden können. Dadurch migrieren diese aus dem Plasma in die arterielle Gefäßwand. Dieser Vorgang kann durch Chemokine verstärkt werden. Die migrierten Monozyten entwickeln sich in der Intima zu Makrophagen. Diese nehmen über den Scavenger-Rezeptor auf ihrer Membranoberfläche modifiziertes LDL auf und werden so zu Schaumzellen (*macrophage foam cells*). Auch T-Zellen wandern in die Intima ein. Die akkumulierenden T-Zellen sondern Mediatoren ab, welche SMCs aus der Media anregen in die Intima zu wandern. Nachdruck und Übersetzung der Bildunterschrift mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature: Abbildung 2 von *Nature Reviews Disease Primers* 5 (2019), Artikelnummer 56 (Libby et al., 2019), copyright © 2019.

Die Neovaskularisation, ausgehend von der Adventitia in die Intima fördert die Plaquebildung (Kumamoto et al., 1995). Des Weiteren kann es zur Kalzifikation und Versteifung der Gefäßwand kommen (Stary, 2001). Neben der Gefäßversteifung können Prozesse auftreten, die zu einer Destabilisierung der Plaques führen. Beispielsweise können aktivierte Makrophagen in der Plaque verstärkt Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) exprimieren, die die Kollagene der fibrotischen Schicht der Intima degradieren (Vacek et al., 2015). Zudem wird die Kollagensynthese der SMCs durch Interferon- γ , das von T-Zellen sezerniert wird, beeinträchtigt.

Die dadurch dünner werdende fibrotische Schicht der Intima erhöht das Risiko einer Plaqueruptur. Kommt es zur Apoptose der eingewanderten Makrophagen und SMCs, eingeleitet durch *Interleukin-1 beta-converting enzyme*, entsteht ein nekrotischer Kern (Geng & Libby, 1995). Das Material aus dem Kern des Plaques, das nach einer Plaqueruptur Kontakt mit dem Blut hat, ist thrombogen und kann so zu einem thrombotischen Verschluss des Gefäßes führen (Fernández-Ortiz et al., 1994).

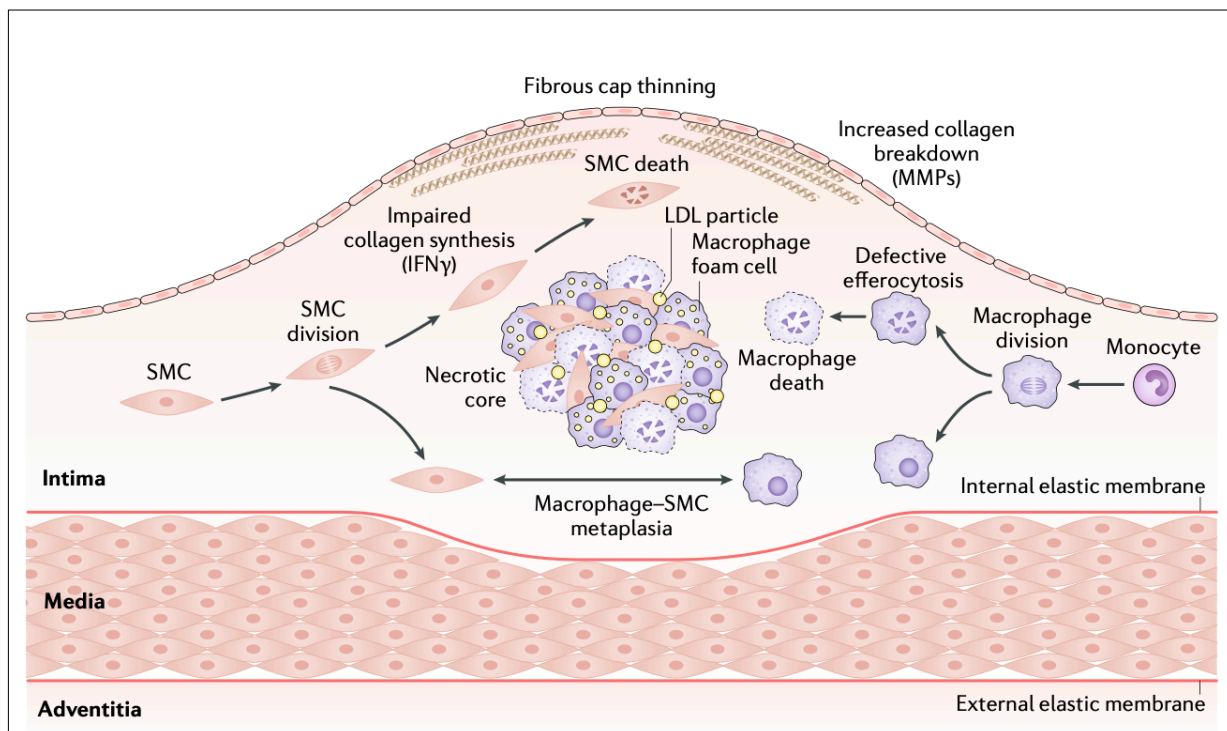


Abbildung 2 Die atherosklerotische Läsion. Im Verlauf der Atherogenese bilden sowohl die in die Intima eingewanderten als auch die dort lokalen glatten Muskelzellen (SMCs) extrazelluläre Matrixmoleküle. Die extrazelluläre Matrix spielt eine Rolle bei der Stabilisierung der Intima. Interferon- γ , welches durch T-Zellen sezerniert wird, beeinträchtigt die Synthese der Kollagene durch SMCs, was sich destabilisierend auswirken kann. Hinzu kommt, dass aktivierte Makrophagen vermehrt Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die Kollagene degradieren, produzieren. Die Schwächung der Gewebestruktur und die Verdünnung der fibrotischen Schicht in der Intima erhöht das Risiko einer Plaqueruptur. SMCs und Makrophagen können sich in der sich entwickelnden Läsion teilen. Zusätzlich können sich Makrophagen und SMCs metaplastisch verändern. Mit Fortschreiten der Läsion sterben SMCs und Makrophagen, unter anderem durch Apoptose. Dadurch entsteht ein lipidreicher nekrotischer Kern. Nachdruck und Übersetzung der Bildunterschrift mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature: Abbildung 3 von *Nature Reviews Disease Primers* 5 (2019), Artikelnummer 56 (Libby et al., 2019), copyright © 2019.

1.3 Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung

Zur Pathogenese der Atherosklerose tragen verschiedene Faktoren bei, die die Funktion der Gefäßwand und den Stoffwechsel beeinflussen. Sie können in modifizierbare und nicht-modifizierbare Risikofaktoren unterteilt werden. Zu modifizierbaren Faktoren gehören beispielsweise Krankheiten, Lebensstil- und Umweltfaktoren, die durch Maßnahmen wie Lebensstiländerung und Medikamente verändert werden können (Yusuf et al., 2004). Wichtige Erkenntnisse dazu lieferte die Framingham Heart-Studie. Seit 1948 wird in Framingham, USA, mittels einer Kohortenstudie untersucht, durch welche Ursachen und Risiken Atherosklerose und die KHK entstehen (Dawber et al., 1951). Zu den Ergebnissen zählte der Einfluss durch beispielsweise Lipide, Blutdruck, Diabetes mellitus, Rauchen und Übergewicht (Kannel et al., 1961).

Demgegenüber stehen als nicht-modifizierbare Risikofaktoren das Alter, das Geschlecht und eine positive Familienanamnese als Ausdruck einer genetischen Prädisposition. In Zwillings- und Familienstudien konnte schon früh gezeigt werden, dass bei ca. 40 – 50 % der Erkrankungen die Vererbung eine Rolle spielt (Dai et al., 2016; Lloyd-Jones et al., 2004; Marenberg et al., 1994; Myers et al., 1990).

Im Jahr 2007 wurde erstmals durch eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) gezeigt, dass bestimmte Genloci mit statistischer Signifikanz mit der KHK assoziiert sind (Samani et al., 2007). Durch Bildung internationaler Konsortien konnte diese Zahl rasch erhöht werden. Mittlerweile wurden mehr als 300 solcher Genloci identifiziert (Chen & Schunkert, 2021; Erdmann et al., 2018; Kessler & Schunkert, 2021)(Abbildung 2).

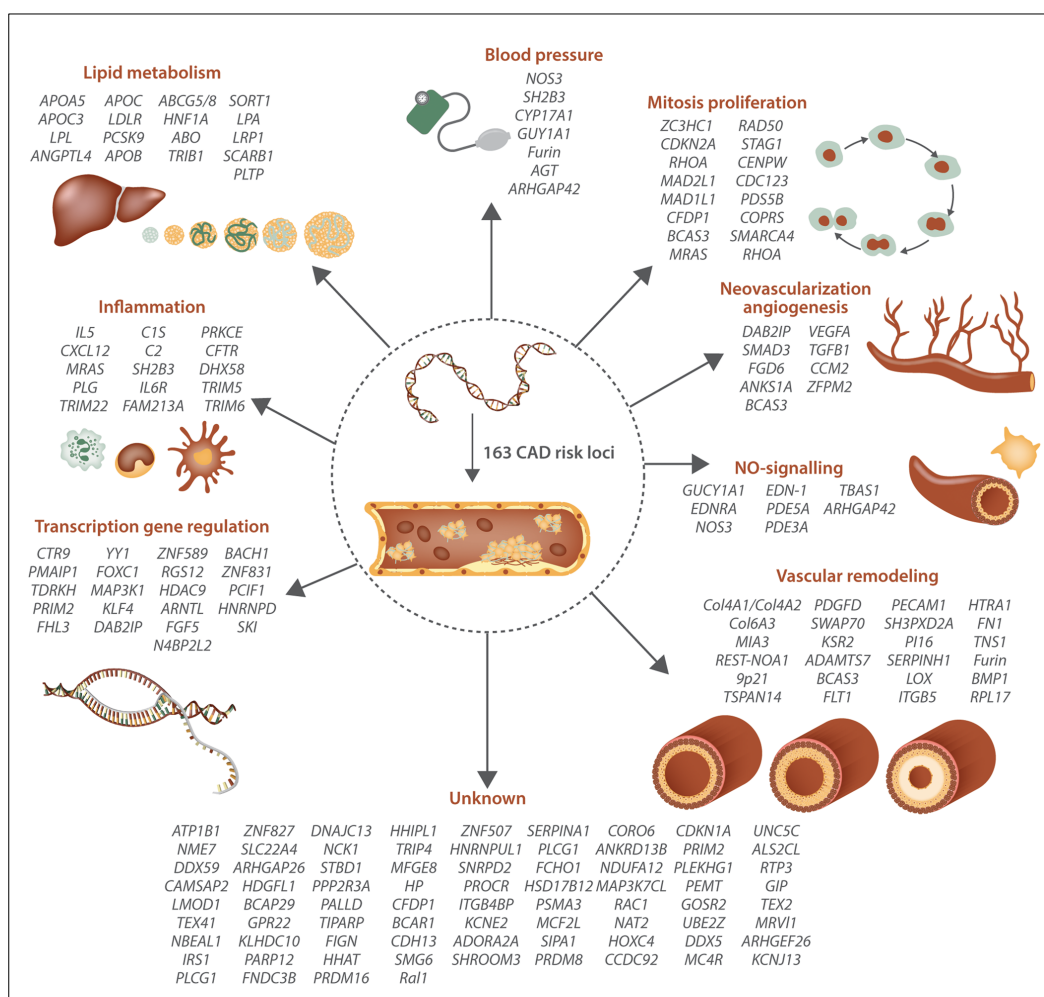


Abbildung 3 KHK-Risikoloci, die assoziierten Gene und ihre pathophysiologischen Signalwege bei der Atherosklerose. Durch GWAS wurden bereits viele Loci entdeckt, die mit einem erhöhten Risiko an einer KHK zu erkranken assoziiert sind (*CAD risk loci*). Teilweise können die Loci zu pathophysiologischen Signalwegen, die die Atherosklerose und die KHK beeinflussen, zugeordnet werden. Zu ihnen gehören Signalwege der Inflammation, des Lipidmetabolismus, der Blutdruckeinstellung, der Proliferation, der Neovaskularisierung, des vaskulären Remodelings, der Transkription und von NO/cGMP. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press: Abbildung 2 von *Cardiovascular Research* Volume 114, Ausgabe 9 (2018) Seiten 1241–1257 (Erdmann et al., 2018), copyright © 2018.

Die Mechanismen der einzelnen Loci sind größtenteils unbekannt. Einige der Loci sind mit traditionellen Risikofaktoren, z.B. Hypercholesterinämie oder arterieller Hypertonie assoziiert (Kessler et al., 2016). Auffällig ist die Häufung genetischer Varianten, die Genen zugeordnet sind, die am Stickstoffmonoxid (NO)-/zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)-Signalweg beteiligt sind. Der NO-cGMP-Signalweg bildet die funktionale Schnittstelle zwischen dem Blutfluss und der Gefäßwand. Das Gefäßendothel reagiert auf Blutdruckerhöhung mit der Synthese von NO. Dieses wird sezerniert und löst in glatten Gefäßmuskelzellen eine Signalkaskade aus, die zu einer Gefäßerweiterung führt.

Eine der Risikovarianten ist der Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism*, SNP) rs7678555 in der intergenischen Region zwischen *PDE5A* und *MAD2L1* (*Mitotic Arrest Deficient 2 Like 1*) auf Chromosom 4q27 (Nelson et al., 2017) (Abbildung 4). Weitere Risikovarianten wurden z.B. *NOS3*, *GUCY1A1* (früher *GUCY1A3*), *PDE3A* und *MRVI1* zugeordnet, welche ebenfalls am NO-cGMP-Signalweg beteiligt sind (CARDIoGRAMplusC4D et al., 2013; Wobst et al., 2018).

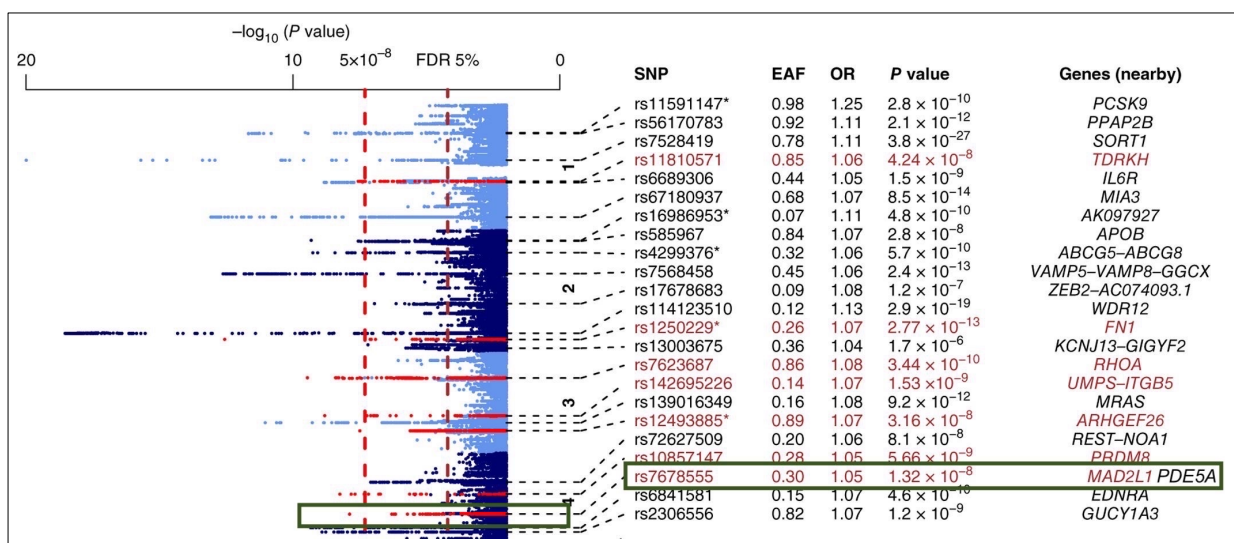


Abbildung 4 Identifizierung des Risikoallels rs7678555. In einer Metaanalyse von Nelson *et al.* (2017) wurden unter Anwendung eines additiven Rechenmodells verschiedene Varianten entdeckt, die mit sogenannten SOFT-KHK (SOFT CAD) Phänotypen, d.h. KHK inklusive Angina Pectoris assoziiert sind. Die identifizierten Risikoloci der Chromosomen 1 – 4 sind hier in einem transponierten Manhattanplot dargestellt. Der Cut-off-Wert für den p-Wert beträgt $-\log_{10}(P) = 20$. Die gezeigten genetischen Varianten stammen aus der Metaanalyse der UK Biobank mit GWAS-Daten, die mit den Daten des 1000-Genom-Projekts kalkuliert wurden (Nikpay *et al.*, 2015). Ausgeschlossen davon sind die Varianten, die durch ein Sternchen gekennzeichnet sind (Exome chip markers). Die Signifikanzschwellen der GWAS ($P = 5 \times 10^{-8}$) und FDR 5 % ($P = 6,28 \times 10^{-5}$) (*False Discovery Rate*, Falscherkennungsrate) sind durch die rote gestrichelte dargestellt. Bereits bekannte KHK-Risikoloci sind schwarz und die neuen KHK-assoziierten Loci braun markiert. Der SNP rs7678555 und die ihm zugeordneten Gene (*Genes nearby*) *MAD2L1* und *PDE5A* sind grün umrandet. EAF: *effect allele frequency*; OR: Odds ratio. Veränderter Nachdruck und Übersetzung der Bildunterschrift mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature: Abbildung 2 von *Nature Genetics* 49 (2017), Seite 1385–1391, (Nelson *et al.*, 2017), copyright © 2017.

1.4 Phosphodiesterase 5A

PDE5A gehört zu der Familie der Phosphodiesterasen, die 1962 von Butcher und Sutherland entdeckt wurden (Butcher & Sutherland, 1962). Es zeigte sich, dass sich die verschiedenen Phosphodiesterasen in kinetischen und regulatorischen Eigenschaften unterscheiden. Mittlerweile werden 11 PDE-Familien mit jeweils unterschiedlichen Isoformen und alternativen Spleißvarianten unterschieden.

Die PDE-Familien können abhängig von der Substratspezifität in drei Gruppen unterteilt werden (Bender & Beavo, 2006). Es wird unterschieden, ob die PDE-Familie spezifisch cAMP, cGMP oder beides hydrolytisch spaltet (Abbildung 5). PDE5A spaltet wie PDE6 und PDE9 spezifisch cGMP. Es besitzt am N-Terminus zwei homologe GAF-Domänen (GAF-A und GAF-B) und am C-Terminus eine katalytische Einheit (Bender & Beavo, 2006). An der GAF-A Domäne befindet sich eine cGMP-Bindestelle. Bindet cGMP an die GAF-A Domäne, führt dies zu einer 10-fachen Erhöhung der Enzymaktivität (McAllister-Lucas et al., 1993; Rybalkin et al., 2003).

Das *PDE5A* Gen kodiert für drei verschiedene *PDE5A* Isoformen (A1, A2 und A3), welche durch drei alternative erste Exons kodiert werden (Lin et al., 2000). PDE5A ist Teil des NO-cGMP-Signalwegs und kontrolliert durch einen negativen cGMP-Feedback-Mechanismus unter anderem den cGMP-Spiegel in glatten Gefäßmuskelzellen.

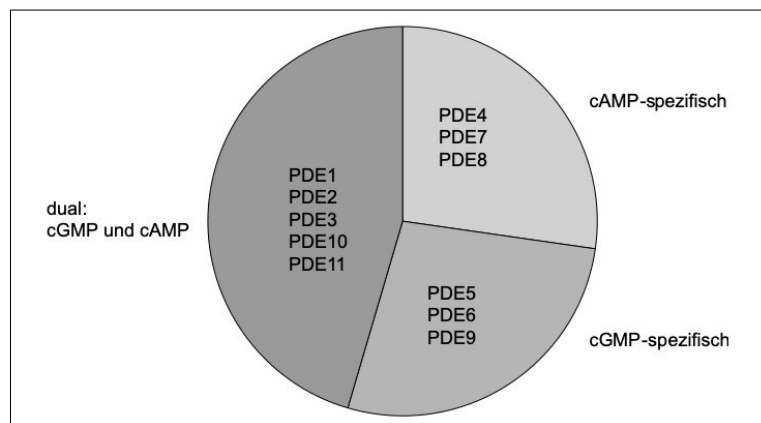


Abbildung 5 PDE-Familienklassifikation nach Substratspezifität. Die verschiedenen PDE-Isoformen können entweder cAMP, cGMP oder beides hydrolysieren. Basierend auf ihrer Substratspezifität können sie in drei Gruppen unterteilt werden. Veränderter und übersetzter Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics: Abbildung 2 aus *Pharmacological Reviews* Volume 58 no. 3 (2006), Seite 494, (Bender & Beavo, 2006), copyright © 2006.

1.5 NO-cGMP-Signalweg

Seit mehr als 140 Jahren werden Medikamente wie Glyzerinnitrat, ein NO-Donator zur Behandlung von Angina Pectoris eingesetzt (Murrell, 1879). Dies geschah, ohne dessen genauen Mechanismus zu kennen. Im Jahr 1980 entdeckten Furchgott und Zawadzki, dass das Endothel eine Substanz freisetzt, die zur Entspannung der unteren glatten Muskelschichten führt und nannten diese Substanz *endothelial-derived relaxing factor* (vom Endothel abgeleiteter Relaxationsfaktor) (Furchgott & Zawadzki, 1980). Wie in späteren Studien festgestellt wurde, handelte es sich dabei um Stickstoffmonoxid (NO) (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987). So wurde allmählich der NO-cGMP-Signalweg entschlüsselt.

Der aktuelle Stand der Forschung ist, dass im Gefäßendothel endogenes NO durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS, kodiert durch das *NOS3* Gen) gebildet wird (Abbildung 6). Diese wird durch einen Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex aktiviert und bildet aus der Aminosäure L-Arginin das zweiatomige Stickstoffmonoxid (Palmer et al., 1988).

Endogenes NO senkt die Expression von Oberflächenadhäsionsmolekülen und chemotaktische Proteinen wie MCP1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), welches die subendotheliale Migration von Makrophagen begünstigt (Zeiger et al., 1995). Es wirkt vasoprotektiv, indem es die Adhäsion und Migration der Leukozyten an das Endothel inhibiert (Kubes et al., 1991). Das in Endothelzellen gebildete NO dringt beispielsweise in glatte Gefäßmuskelzellen ein. Dort aktiviert es die lösliche Guanylatzyklase (sGC). Diese bildet aus Guanosintriphosphat (GTP) cGMP. Die sGC besteht aus zwei Untereinheiten, in den meisten Geweben aus einer $\alpha 1$ - und $\beta 1$ -Untereinheit (Budworth et al., 1999). Die $\beta 1$ -Untereinheit enthält einen Häm-Co-Faktor, an den NO binden kann (Zhao & Marletta, 1997). Durch die NO-Bindung wird die sGC aktiviert und die cGMP-Synthese um das 300-fache erhöht (Humbert et al., 1990; Stone & Marletta, 1994). cGMP wiederum ist ein sekundärer Botenstoff für verschiedene Zielproteine. Sie beeinflusst Proteinkinasen, Ionenkanäle und Phosphodiesterasen (PDE).

Die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG) hat in den glatten Gefäßmuskelzellen einen Einfluss auf die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP), das IP₃-Rezeptor-assoziierte cGKI β -Substrat (IRAG) und das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP). (Feil & Kemp-Harper, 2006) Die Aktivierung der PKG spielt eine wichtige Rolle bei der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und der Hemmung der Thrombozytenaggregation (Antl et al., 2007; Hofmann et al., 2006). cGMP-abhängige Ionenkanäle, wie z. B. Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle werden durch die Aktivität von cGMP und über cGMP-abhängige Proteinkinasen reguliert und sie modulieren ebenfalls den Gefäßtonus (Porter et al., 1998; Robertson et al., 1993).

Bekannte kardiovaskulär relevante cGMP-abhängige PDEs sind PDE1, PDE2 und PDE5A (Kass et al., 2007). PDE5A ist Teil des NO-cGMP-Signalwegs und spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation des glatten Gefäßmuskeltonus (Kass, 2012). Durch die PKG-vermittelte Phosphorylierung wird PDE5A aktiviert und hydrolysiert cGMP zu 5'-GMP (Rybalkin et al., 2002), wodurch cGMP-induzierte Funktionen gehemmt werden.

In glatten Gefäßmuskeln führt dies beispielsweise zu einer verstärkten Vasokonstriktion. Wird PDE5A dagegen gehemmt, erhöht sich die intrazelluläre cGMP-Konzentration und kann so eine vasodilatierende Wirkung haben. Bekannte PDE5A-Inhibitoren wie Sildenafil werden wegen dieser Wirkung erfolgreich zur Therapie der erektilen Dysfunktion und der pulmonalen Hypertonie eingesetzt (Fink et al., 2002; Galiè et al., 2005). Die vasodilatierende Wirkung der PDE5A-Hemmung führt bei der Erektion zu einem vermehrten Bluteinstrom und folglich einer besseren erektilen Funktion. Bei der pulmonalen Hypertonie wird durch die Relaxation der arteriellen Gefäßwände der pathologisch erhöhte pulmonale Gefäßwiderstand gesenkt.

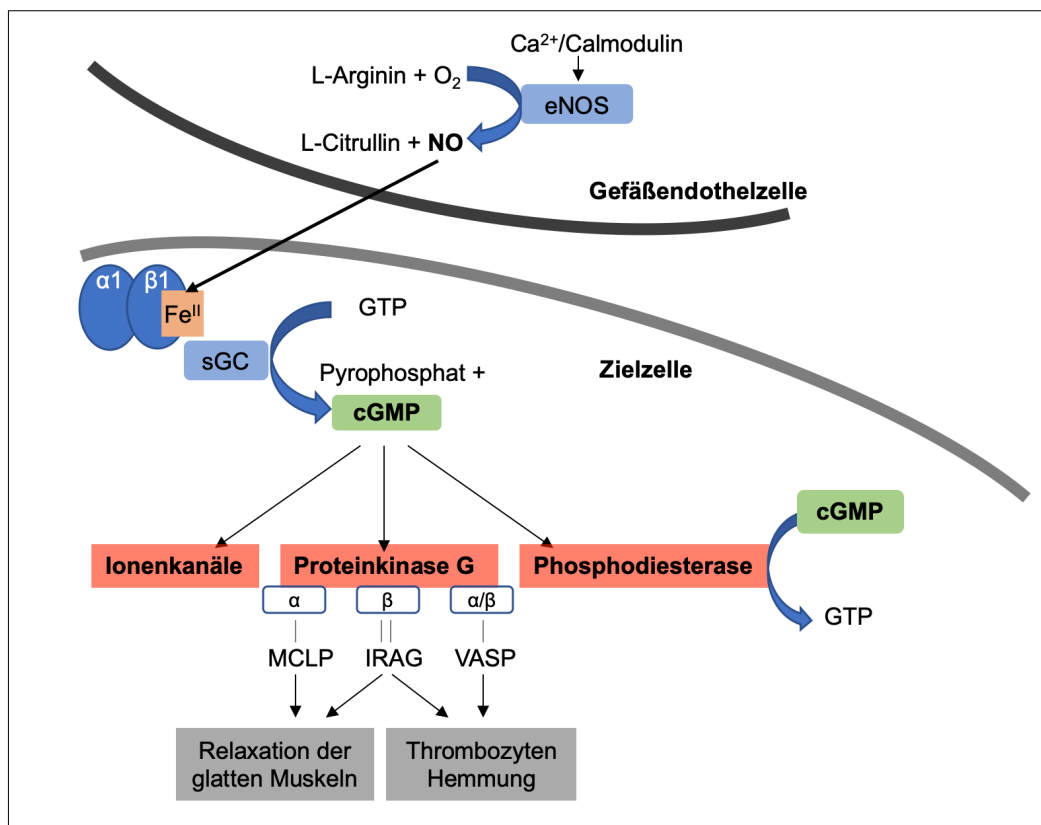


Abbildung 6 Der NO-cGMP-Signalweg. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) wird durch Bindung des Ca²⁺/Calmodulin-Komplexes aktiviert. Daraufhin katalysiert eNOS die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid (NO). NO diffundiert in diesem Beispiel aus der Gefäßendothelzelle in die glatte Gefäßmuskelzelle und bindet an das Fe^{II}-Häm der β₁-Untereinheit der löslichen Guanylatzyklase (sGC). Dadurch wird die Aktivität der sGC signifikant gesteigert, die anschließend aus Guanosintriphosphat (GTP) zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und Pyrophosphat synthetisiert. Durch cGMP werden anschließend die cGMP-abhängige Proteinkinase G (PKG), Phosphodiesterasen (PDE) und Ionenkanäle (cGMP-gated ion channels) aktiviert. Die PKG phosphoryliert verschiedene Zielproteine, die zu einer Relaxation der glatten Muskeln und Hemmung der Thrombozyten führen. PDEs hydrolysieren cGMP zu GTP. Veränderter und übersetzter Nachdruck mit Genehmigung von John Wiley & Sons: Abbildung 1 von EMBO Rep 2006. 7:149-153 (Feil & Kemp-Harper, 2006), copyright © 2006.

1.6 Die Rolle des NO-cGMP-Signalwegs bei Atherosklerose

Der NO-cGMP-Signalweg spielt eine wichtige Rolle für die Funktion der Gefäßwand. Er bildet eine funktionelle Schnittstelle zwischen Blutstrom, Endothel und glatten Gefäßmuskeln. Mehrere Genvarianten, die mit dem NO-cGMP-Signalweg verknüpft sind, wurden mit der KHK assoziiert. Die Genvarianten, die mit der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase eNOS (*NOS3*) und der sGC-Untereinheit $\alpha 1$ (*GUCY1A1*) in Verbindung stehen, wurden näher untersucht (Kessler et al., 2017; Salvi et al., 2013) (Abbildung 7).

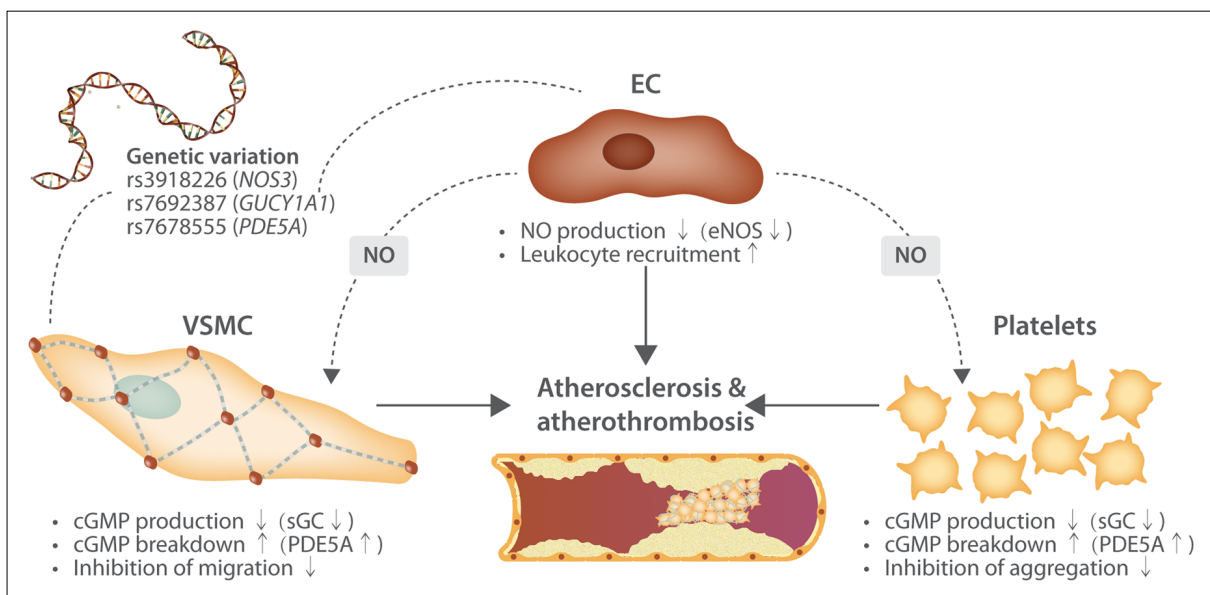


Abbildung 7 Die Rolle des NO-cGMP-Signalwegs bei der Atherosklerose. Die genetischen Variationen von *NOS3*, *GUCY1A1* und *PDE5A*, beeinflussen den NO-cGMP-Signalweg in Endothelzellen (EC), glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) und in Thrombozyten (Platelets). So führt die Risikovariante auf dem *GUCY1A1*-Locus (rs7692387) in VSMC zu einer erniedrigten sGC-Expression und folglich reduzierter cGMP-Produktion (*cGMP production*) (Kessler et al., 2017). Die Risikovariante am *PDE5A*-Locus (rs7678555) könnte durch eine erhöhte PDE5A-Expression zu einem verstärkten Abbau von cGMP (*cGMP breakdown*) führen. Dies verstärkt mutmaßlich die Migration von VSMC, in welchen cGMP die Migration normalerweise hemmt (*Inhibition of migration*). Darüber hinaus führt die Risikovariante auf dem *eNOS*-Locus (rs3918226) zu einer verringerten eNOS-Expression in ECs. Dadurch kommt es zu einer verringerten NO-Produktion (*NO production*), was sich beispielsweise auf die Leukozytenrekrutierung (*Leukocyten recruitment*) auswirkt und diese verstärkt. In Thrombozyten führen die genetischen Varianten zu einer Verringerung der cGMP-Bioverfügbarkeit, welche eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Thrombozytenaggregation spielt. All diese Mechanismen begünstigen das Fortschreiten von Atherosklerose. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press: Abbildung 4 von *Cardiovascular Research* Volume 114, Ausgabe 9 (2018) Seiten 1241–1257 (Erdmann et al., 2018), copyright © 2018.

GUCY1A1

In der Studie von Kessler et al. (2017) wurde festgestellt, dass das Nicht-Risikoallel der Genvariante rs7692387 sowohl die Plättchenhemmung als auch die Migration von glatten Muskelzellen günstig beeinflusst. Die Genvariante rs7692387 ist innerhalb eines Introns von *GUCY1A1* lokalisiert. Durch eine Verstärkung der Promotoraktivität des Gens über die

Bindung des Transkriptionsfaktor ZEB1 vorzugsweise an das Nicht-Risikoallel wird die Expression von *GUCY1A1* verstärkt. Das führt zu einer Erhöhung der Konzentration von sGC und ihrer Aktivität, welches mit einem geringeren Atheroskleroserisiko assoziiert ist. (Kessler et al., 2017) Die Ergebnisse wurden durch Erkenntnisse zum Risikoallel inklusive einer genetisch beeinträchtigten Familie unterstützt. Bei dieser Familie wurde ein gehäuftes Auftreten von KHK und MI im jungen Alter beschrieben. Die Familienmitglieder waren Träger einer Funktionsverlustmutation im *GUCY1A1*-Gen. Die Mutation führte zu einer Verringerung von α 1-sGC und β 1-sGC, was zu einer reduzierten Aktivität von sGC führte. Die Auswirkung des Risikoallels macht den Zusammenhang zwischen dem erhöhten Herzinfarktrisiko bei Trägern der Variante plausibel. (Erdmann et al., 2013)

eNOS

eNOS synthetisiert NO, welches einen vasodilatativen und vasoprotektiven Effekt hat. In einer Studie von Salvi *et al.* wurde gezeigt, dass das rs3918226-Risikoallel T eine erniedrigte eNOS-Expression zur Folge hat und sich so einschränkend auf die Funktionen von NO, zum Beispiel die Hemmung der Rekrutierung und subendotheliale Migration von Leukozyten, auswirkt. In der Untersuchung wurde außerdem festgestellt, dass homozygote Träger des Risikoallels T über einen Zeitraum von ca. 7,5 Jahren eine signifikant höhere Zunahme des systolischen und diastolischen Blutdrucks im Vergleich zu Trägern der Allele CC und CT entwickelten. (Salvi et al., 2013)

PDE5A

Es konnte eine signifikante Assoziation zwischen der Variante rs7678555 und der KHK festgestellt werden (Nelson et al., 2017). Die Variante liegt in der Nähe des *MAD2L1* Gens, welches nach aktuellem Wissensstand keine kardiovaskulär-relevante Funktion besitzt. Allerdings deuten *Expression quantitative trait loci*-Daten der STARNET-Studie darauf hin, dass homozygote Träger des Risikoallels C im Vergleich zu heterozygoten Individuen oder homozygoten Nicht-Risikoallelträgern eine signifikant erhöhte *PDE5A*-Expression in der Aorta aufweisen (Nelson et al., 2017) (Abbildung 8).

Aufgrund der bereits beschriebenen Funktion von *PDE5A* im kardiovaskulären System, stellt dieses Gen ein interessantes Zielmolekül dar. Erst kürzlich wurde in einer Familie, bei der gehäuft junge Familienmitglieder einen Myokardinfarkt erlitten, eine Co-Segregation mit einer seltenen Variante im *PDE5A*-Gen als kausal identifiziert. Diese Risikovariante steigert die *PDE5A*-Expression. (Dang et al., 2021) Diese Daten legen nahe, dass das *PDE5A* Gen für das Assoziationssignal zwischen rs7678555 und der KHK verantwortlich sein könnte. Der

funktionelle Mechanismus zwischen der häufigen Variante rs7678555 und *PDE5A* ist jedoch unklar.

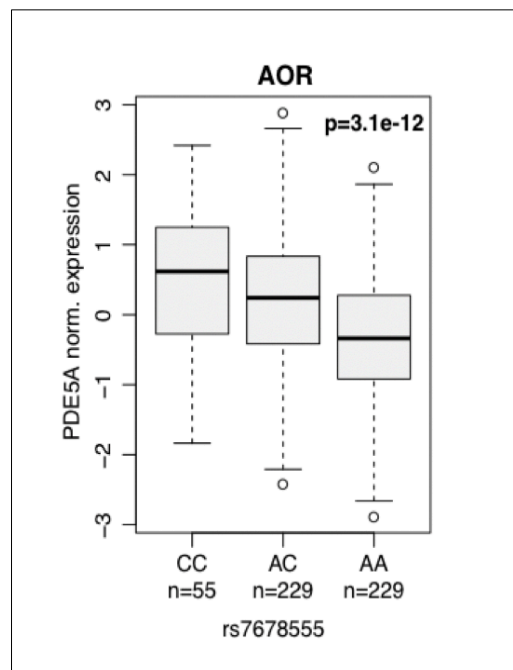


Abbildung 8 *PDE5A*-Expression und SNP-Analyse. Analyse des Einflusses des SNPs rs7678555 auf die *PDE5A*-Expression in Aorten verschiedener Individuen. Bei Vorliegen des Risikoallels „CC“ (n=55) war die Expression von *PDE5A* höher als bei Vorliegen des Genotyps „AA“ (n=229) oder „AC“ (n=229). Es wurden insgesamt 513 Gewebe untersucht. (Nelson et al., 2017)

1.7 Nicht-kodierende RNAs

Ursprünglich wurde angenommen, dass vor allem Proteine die Hauptrolle für den individuellen Phänotyp spielen. Erstaunlicherweise kodieren aber nur ca. 2 % der DNA für Proteine. Im Gegensatz dazu werden knapp 93 % des humanen Genoms in RNA transkribiert. (The ENCODE Project Consortium et al., 2012) Entgegen der früheren Annahme, es handle sich bei den nicht-kodierenden Abschnitten um *Junk*-DNA (Ohno, 1972), wurden nach und nach regulatorische Regionen und nicht-kodierende RNAs (ncRNAs) in diesen Bereichen identifiziert. Um diese große und heterogene Gruppe der RNA-Typen zu gliedern, werden sie in kleine ncRNAs (sncRNA) (unter 200 Basenpaaren (bp)) und lange ncRNAs (lncRNA) (länger als 200 bp) unterteilt. Zu den sncRNAs zählen unter anderem die microRNAs (miRNAs) mit ca. 18 – 22 bp. Durch die besondere Struktur der miRNAs können sie an mRNAs binden, um so die Translation zu hemmen oder den Abbau der mRNA zu verstärken. (Ha & Kim, 2014)

Mithilfe neuer Technologien und durch die Ergebnisse aktueller Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch lncRNAs entscheidend für die Funktion und Entwicklung der Zelle sind (Fatica & Bozzoni, 2014). Mögliche Funktionen der lncRNAs umfassen die prä-, post- und transkriptionale Regulierung der Genexpression (Abbildung 9)(Fasolo et al., 2019). Beispielsweise unterstützen lncRNAs im Nukleus die Weiterverarbeitung von prä-mRNA zu mRNA (alternatives Spleißen), die Modifikation der Chromatinaktivität und die Modulation der Transkription. Im Zytoplasma sind sie an der mRNA- und Protein-Stabilität beteiligt. Dort können sie Proteinen (z. B. Transkriptionsfaktoren) beim Eintritt in den Nukleus helfen und mit miRNAs interagieren, bevor diese in den *RNA-induced silencing complex* (RNA-induzierter Stilllegungskomplex, RISC) aufgenommen werden, um die Genexpression zu blockieren. (Fasolo et al., 2019)

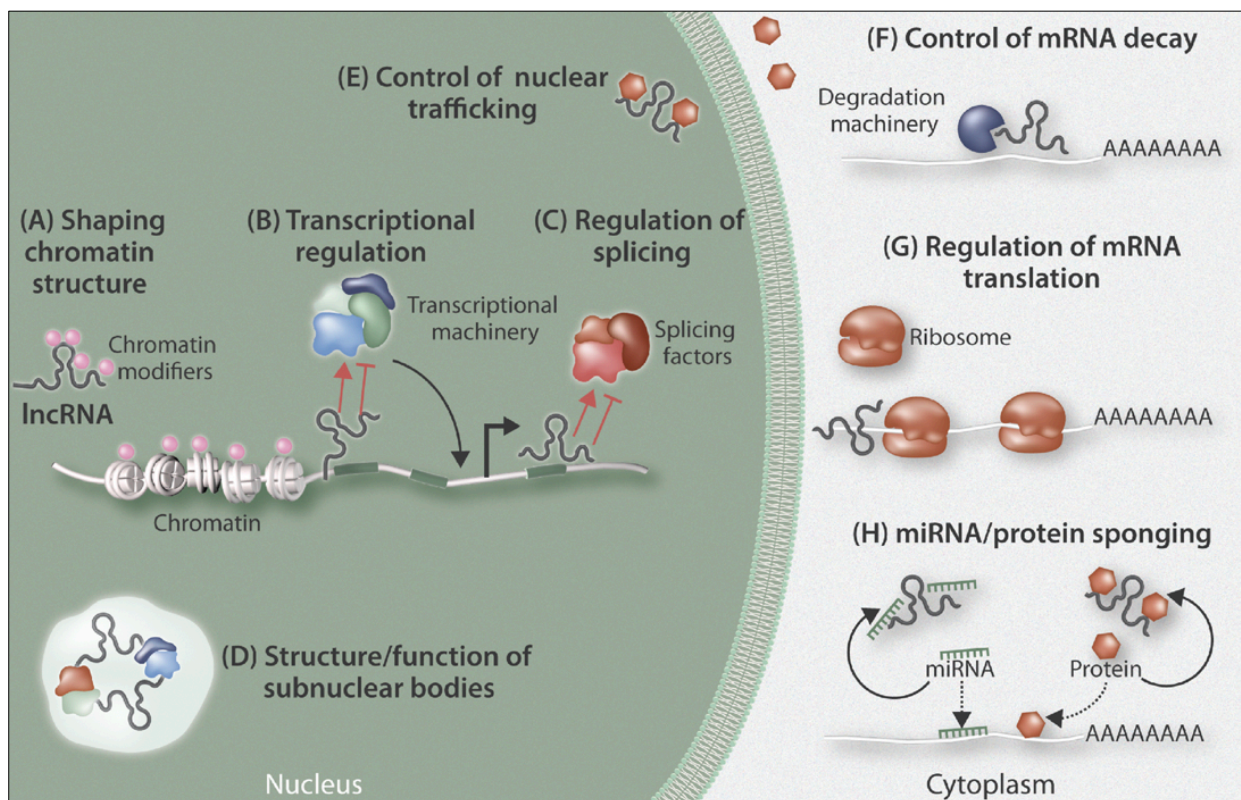


Abbildung 9 Überblick über die zellulären Funktionen von lncRNAs. lncRNAs können Funktionen sowohl im Nucleus (*Nucleus*) als auch im Zytoplasma (*Cytoplasma*) ausüben. Im Nucleus spielen sie eine Rolle bei der Chromatinstruktur (A, *Shaping chromatin structure*). Sie modulieren die Transkription (B, *Transcriptional regulation*) und regulieren das Spleißen von RNA (C, *Regulation of splicing*). lncRNAs können als Leitstrukturen dienen und so das Formen spezifischer subnukleärer Partikel unterstützen (D, *Structure/function of subnuclear bodies*). Zusätzlich sind lncRNAs am Transport von Proteinen in verschiedene Zellkompartimente involviert (E, *Control of nuclear trafficking*). Im Zytoplasma können lncRNAs den Abbau von mRNAs durch den Degenerationsprozess regulieren (F, *Control of mRNA decay*). Ribosomen können durch lncRNAs geblockt und die Translation so gehemmt werden (G, *Regulation of mRNA translation*). Sie können miRNAs und Proteine binden, sodass sie ihre Funktion nicht mehr ausführen können (H, *miRNA/protein sponging*). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Oxford University Press: Abbildung 2 von *Cardiovascular Research*, Volume 115, Ausgabe 12 (2019), Seiten 1732–1756, (Fasolo et al., 2019), copyright © 2019.

Erst in den letzten 10 Jahren ergaben sich erste Hinweise über die Rolle von lncRNAs im Herz-Kreislauf-System. Zunächst wurden lncRNAs wie *Braveheart* und *Fedrr*, die essenziell für die kardiale Entwicklung sind, entdeckt (Grote et al., 2013; Klattenhoff et al., 2013). Des Weiteren wurden lncRNAs in Verbindung mit der Entstehung der Atherosklerose gebracht. Ein Beispiel dafür ist die lncRNA *ANRIL*, welche auf Chromosom 9p21 kodiert wird und deren Einfluss durch Holdt *et al.* untersucht wurde. Eine signifikante Korrelation zwischen der Ausprägung der Atherosklerose und der Expression von *ANRIL* wurden zunächst festgestellt (Holdt et al., 2010). In folgenden Studien wurde gezeigt, dass die lineare Form von *ANRIL* (*linANRIL*) proatherogen wirkt. Durch Trans-Regulation von Zielgenen durch *linANRIL* wird sowohl Zellproliferation und -adhäsion erhöht als auch Apoptose verhindert (Holdt et al., 2013). Die zirkuläre Form (*circANRIL*) wirkt hingegen atheroprotektiv. *CircANRIL* kontrolliert in Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen die Reifung der ribosomalen RNA. Durch Bindung an einen essenziellen ribosomalen Assemblierungsfaktor löst *circANRIL* nuklearen Stress aus und aktiviert das Protein p53. In Gegensatz zu *linANRIL* leitet *circANRIL* die Apoptose ein und blockiert die Proliferation. Beides sind Schritte, die bei dem Prozess zur Atherosklerose eine Rolle spielen. (Holdt et al., 2016)

2 Zielsetzung

Durch genomweite Assoziationsstudien wurde die Risikovariante rs7678555 am Chromosom 4q27, auf welchem das *PDE5A*-Gen lokalisiert ist, mit der KHK assoziiert (Erdmann et al., 2018). Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, über welche Mechanismen die Variante rs7678555 die *PDE5A*-Expression beeinflusst und welche Rolle in der Umgebung liegende ncRNAs spielen könnten.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Tabelle 1 Chemikalien

Hersteller	Chemikalie	Katalognr.	Hauptverwaltung
AppliChem	Ampicillin Natriumsalz <i>BioChemica</i>	A0839	Darmstadt, Deutschland
	Methanol zur Analyse	131091	
	Natriumchlorid <i>BioChemica</i>	A1149	
	Nonidet® P40 (Substitute) solution 10 % peroxide-free	A2239	
	Tween® 20 <i>BioChemica</i>	A1389	
Beckton Dickinson	BD Bacto™ Trypton	211705	Franklin Lakes, NJ, USA
	BD Bacto™ Hefeextrakt	212750	
	BD Difco™ granuliertes Agar	214530	
Bio-Rad	2X Laemmli	1610737	Hercules, CA, USA
	4X laemmli	1610747	
	10X TRIS/glycine/SDS	161-0772	
Biozym Scientific	Biozym LE Agarose	8400	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Carl Roth	2-propanol ROTIPURAN® ≥99.8 %	6752	Karlsruhe, Deutschland
	Ethanol denaturiert ≥96 %	T171	
	Glycine PUFFERAN® ≥99 %	3908	
	Natronlauge (NaOH) 1 mol/l – 1 N	K021	
	Salzsäure (HCl), 2 mol/l – 2 N	T134	
	Salzsäure (HCl), 6 mol/l – 6 N	0281	
	Rotiphorese® gel 30 (37.5:1)	3029	
	Trichlormethan/Chloroform ≥99 %, für Synthesis	Y015	
	TRIS hydrochloride (TRIS-HCl) PUFFERAN® ≥99 %	9090	
TRIS PUFFERAN® ≥99.9 %	4855		

Hersteller	Chemikalie	Katalognr.	Hauptverwaltung
InvivoGen	Poly(dA/dT)	tlrl-patn	San Diego, CA, USA
Lonza	DMEM 4.5 g/l Glucose w/ UltraGlutamine	BE12-604F	Basel, Schweiz
	HEPES buffered saline solution	CC-5024	
Merck Millipore	EMPLURA® Ethanol absolut	1070172511	Billerica, MA, USA
Merck Millipore/ Biochrom	Fetal bovine serum (FBS) superior	S 0615	Billerica, MA, USA
	Dulbecco's PBS solution without Ca ²⁺ , Mg ²⁺	L 1825	Berlin, Deutschland
New England Biolabs	gel loading dye, purple 6X	B7024	Ipswich, MA, USA
	Quick-Load® 2-Log DNA ladder (0.1-10.0 kb)	N04695	
	1X super optimal broth with catabolite repression (SOC) outgrowth medium	B9020	
Promega Corporation	FuGENE® HD transfection reagent	E2312	Madison, WI, USA
PromoCell	Freezing Medium Cryo-SFM	C-29910	Heidelberg, Deutschland
	Smooth muscle cell growth medium 2	C-22062	
	Smooth muscle cell growth medium 2 SupplementMix	C-39267	
	Hepes BSS	C-40020	
	Trypsin-EDTA (0.04 %/0.03 %)	C-41020	
	Trypsin 31neutralizing solution (0.05 % trypsin inhibitor in 0.1 % BSA)	C-41120	
R&D Systems	Recombinant Human IL-1 beta/IL-1F2 Protein	201-LB-005	Minneapolis, MN, USA
Sigma-Aldrich	Ammonium persulfate (APS)	A3678	St. Louis, MO, USA
	Amphotericin B solution (250 µg/mL in deionized water)	A2942	
	Bovine Serum Albumin	A2153	
	Chloroform (anhydrous, ≥99 %, contains 0.5-1.0 % ethanol as stabilizer)	288306	
	Chloroform:isoamyl Alkohol (24:1)	C0549	
	Dextran sulfate sodium salt from Leuconostoc spp.	D8906	
	Formamid, deionized	S4117	
	MgCl ₂	63069	
	NaCl	S3014	

Hersteller	Chemikalie	Katalognr.	Hauptverwaltung
Sigma-Aldrich	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)	T9281	St. Louis, MO, USA
	Penicillin-streptomycin (10,000 units penicillin/ml, 10 mg streptomycin/ml)	P4333	
	Pepsin from porcine gastric mucosa	P7012	
	Sodium Phosphate	S9638	
	Sodium deoxycholate	D6750	
	20X SSC Buffer- 3M NaCl in 0.3M sodium citrate (pH 7.0)	S8015	
	Trizma® base	T1503	
	TWEEN® 40	P1504	
SouthernBiotech	DAPI Fluoromount-G ®	0100-20	Birmingham, AL, USA
Thermo Fisher Scientific	Ambion™ TRIzol® reagent	15596-026	Waltham, MA, USA
	BupH™ Phosphate Buffered Saline Packs	28372	
	Coomassie Brilliant Blue R-250 dye	20278	
	Gibco™ 0,5M EDTA		
	Gibco™ Geneticin® selektives Antibiotikum (G418 Sulfate)	11811031	
	Gibco™ Opti-MEM® I reduced serum medium	31985062	
	Gibco™ PBS (10X), pH 7.4	70011044	
	Gibco™ DPBS, no calcium, no magnesium	14190094	
	Gibco™ trypan blue solution, 0.4 %	15250061	
	Gibco™ trypsin-EDTA (0.25 %), phenol red	25200056	
	Invitrogen™ GlycoBlue™ coprecipitant (15 mg/ml)	AM9515	
	Invitrogen™ Lipofectamine® RNAiMAX™ transfection reagent	13778150	
	Invitrogen™ UltraPure™ Dnase/Rnase-free distilled Water	10977035	
	Invitrogen™ UltraPure™ TRIS-borate-EDTA (TBE) buffer, 10X	15581028	
	Novex™ Hi-Density TBE Sample Buffer (5X)	LC6678	
RNase Inhibitor Applied Biosystems™	N8080119		

Hersteller	Chemikalie	Katalognr.	Hauptverwaltung
United States Biochemical Corp.	Bromophenol Blue, Sodium Salt Ultrapure	12370	Cleveland, OH, USA
VWR International	peqGREEN, DNA- und RNA-Farbstoff	732-3196	Radnor, PA, USA

3.2 Puffer, Medien, Lösungen

3.2.1 Standardpuffer und -lösungen

1X Phosphate-buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

mit einer Endkonzentration von 1 mM KH_2PO_4 , 0,16 M NaCl, 2,97 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,4 bei Raumtemperatur

100 ml 10X Gibco™ PBS

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

1X Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure (TBE)

mit einer Endkonzentration von 0,1 M TRIS, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3 bei 20 °C

100 ml 10X Invitrogen™ UltraPure™ TRIS-Borate-EDTA (TBE) Puffer

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

70 % (v/v) Ethanol

35 ml Emplura ® ethanol absolute

ad 50 ml Dnase/Rnase-freies Wasser

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

FACS-Puffer (*fluorescence-activated cell sorting*)

500 ml 1X PBS

2,5 g BSA

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

1 % (v/w) Agarosegel für die Gelelektrophorese

80 ml 1X TBE Puffer

0,8 g Biozym LE Agarose

4 µl peqGREEN DNA- und RNA-Farbstoff

Für das Gel wurden zunächst 80 ml 1X TBE Puffer mit 0,8 g Biozym LE Agarose gemischt. Durch Erhitzen wurde die Agarose gelöst. Nach Abkühlen wurde der Farbstoff peqGREEN hinzugefügt und anschließend direkt in eine Gelform ausgegossen. Sobald es bei Raumtemperatur fest geworden war, wurde es entweder sofort verwendet oder bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Lysepuffer A für Nukleus-/ Zytoplasma-Fraktionierung

Mit einer Endkonzentration von 10mM pH 8 Trizma® base, 140mM NaCl, 1,5mM MgCl₂ und 0,5 % Nonidet® P40 (Substitute) solution 10 % peroxide-free.

500 µl 1M Trizma® base

1,4 ml 5M NaCl

75 µl 1M MgCl₂

2,5 ml Nonidet® P40 (Substitute) solution 10 % peroxide-free

20 µl RNase Inhibitor

ad 50 ml Dnase/Rnase-freies Wasser

Lysepuffer B für die Nukleus-/ Zytoplasma-Fraktionierung

Mit einer Endkonzentration von 1 % TWEEN® 40 und 0,05 % (v/w) Sodium deoxycholate.

100 µl TWEEN® 40

0,05 g Sodium deoxycholate

20 µl RNase Inhibitor

ad 10 ml Lysepuffer A für Nukleus-/ Zytoplasma-Fraktionierung

3.2.2 Medien zur Kultivierung und Selektion von Bakterien

Ampicillin (100 mg/ml) Lösungen

100 mg Ampicillin-Natriumsalz

ad 1 ml Millipore® Wasser

Beide Lösungen wurden mithilfe von Stericup® Filtern steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

Lysogeny broth (LB) Medium

8 g BD Bacto™ Trypton (BD)

4 g BD Bacto™ Hefeextrakt (BD)

8 g Natriumchlorid

ad 800 ml Millipore® Wasser

Das LB Medium wurde für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

LB-Agarplatten

8 g BD Bacto™ Trypton

1 g BD Bacto™ Hefeextrakt

8 g Natriumchlorid

12 g BD Difco™ granuliertes Agar

ad 800 ml Millipore® Wasser

Das Medium für LB-Agarplatten wurde für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nachdem das Medium auf 55 °C abgekühlt war, wurde das Antibiotikum der Wahl im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt. Dann wurde es in 10 cm Petrischalen ausgegossen. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4 °C.

3.2.3 Medien und Lösungen zur Kultivierung humaner Zellen

250 mg/ml Geneticin

1,5 g Geneticin® selektives Antibiotikum

ad 6 ml Millipore® Wasser

Die Geneticinlösung wurde mithilfe von Stericup® Filtern (Merck Millipore) steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

HEK293 Medium

500 ml DMEM 4,5 g/l Glukose mit Ultra Glutamine

50 ml FBS superior

1 ml Penicillin-Streptomycin

1 ml Amphotericin B Lösung

500 µl Geneticin (250 mg/ml)

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

HAoSMC Medium

500 ml Smooth Muscle Cell Growth Medium 2

25 ml Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 SupplementMix

5 ml Penicillin-Streptomycin

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

3.2.4 Puffer und Lösungen für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Fixierlösung: 4 % (w/v) Paraformaldehyd pH 7,2

1 g Paraformaldehyd

0,2 g 2 N NaOH

0,1 g 6 N HCl

10 ml 10X PBS

ad 100 ml Millipore® Wasser

Paraformaldehyd und Millipore® Wasser wurden bei 60 °C gemischt. Mithilfe von 2 N NaOH wurde ein basischer pH eingestellt, um das Paraformaldehyd zu lösen. Der pH-Wert wurde anschließend bei Raumtemperatur mithilfe von 6 N HCl auf einen pH von 7,2 eingestellt. Dann wurde 10X PBS hinzugefügt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

10 mM HCl

0,5 ml 2 N HCl

ad 100 ml Millipore® Wasser

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

0,1 % Pepsin (w/v) in 10 mM HCl

0,1 g Pepsin

ad 100 ml 10 mM HCl

Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2X SSC (Saline Sodium Citrat)

20 ml 20X SSC

ad 200 ml Millipore® Wasser

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

0,1X SSC

5 ml 2X SSC

ad 100 ml Millipore® Wasser

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

0,1 % Tween® 20 in 2X SSC

0,1 ml Tween® 20

ad 100 ml 2X SSC

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

500 mM Natrium Phosphat pH 7

0,6 g Natrium Phosphat

ad 10 ml Millipore® Wasser

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Hybridisierungspuffer

1 ml Formamid

1 g Dextran Sulfat

1 ml 500 mM Natrium Phosphat

ad 10 ml 2X SSC

Der Puffer wurde für jede Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung frisch angesetzt.

3.2.5 Puffer und Lösungen für den Electrophoretic mobility shift assay

1X PBS für *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)

mit einer Endkonzentration von 0,1 M sodium Phosphate, 0,15 M NaCl, pH 7.2.

1 Päckchen Thermo Scientific™ BupH™ PBS (Thermo Fisher Scientific) wurde in 500 ml Millipore® Wasser gelöst und bei 4 °C gelagert.

0,5X TBE Puffer

mit einer Endkonzentration von 0,05 M TRIS, 45 mM Borsäure, 10,5 mM EDTA, pH 8,3 bei 20 °C

50 ml 10X Invitrogen™ UltraPure™ TRIS-Borate-EDTA (TBE) Puffer (Thermo Fisher Scientific)

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8

27,23 g TRIS-HCL Pufferan®

ad 80 ml Millipore® Wasser

Der pH-Wert wurde mithilfe von 6 N HCl eingestellt. Anschließend wurde das Volumen auf 150 ml mit Millipore® Wasser aufgefüllt.

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8

6 g TRIS-HCL Pufferan®

ad 60 ml Millipore® Wasser

Der pH-Wert wurde mithilfe von 6 N HCl eingestellt. Anschließend wurde das Volumen auf 150 ml mit Millipore® Wasser aufgefüllt.

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

1 g APS

ad 10 ml Millipore® Wasser

Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

10 % (w/v) SDS

10 g SDS

ad 100 ml Millipore® Wasser

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

4 % Polyacrylamid Gel (Volume/Gel)

1.33 ml Rotiphorese® gel 30 (37,5:1)

500 µl 10X Invitrogen™ UltraPure™ TBE buffer

8.06 ml Millipore® Wasser

100 µl APS (10 % (w/v))

10 µl TEMED

Wichtig ist, erst am Ende APS und TEMED hinzuzufügen, da die Stoffe die Polymerisation des Gels einleiten. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

1X Laufpuffer

100 ml 10X Tris/Glycin/SDS

2 ml Tween® 20

ad 1000 ml Millipore® Wasser

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

EMSA Bindepuffer

mit einer Endkonzentration von 4 % Ficoll, 0,1 mM ZnSO₄, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM HEPES bei pH 7,9 bei 20 °C.

1 g Ficoll

1 ml 10 mM ZnSO₄

1 ml 1 M KCl

1 ml 200 mM MgCl₂

ad 100 ml 20 mM HEPES pH 7,9

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Für den EMSA wurde jedes Mal 0,1 M DTT im Verhältnis 1:100 frisch hinzugegeben.

1 % (w/v) Bovines Serum Albumin (BSA)

0,1 g BSA

ad 100 ml Millipore® Wasser

Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

3.3 Primer

Primer wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Sie wurden salzfrei und mit einer Konzentration von 100 µM bestellt. Sie wurden in Dnase/Rnase-freiem Wasser auf gewünschte Arbeitskonzentrationen verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2 Primer für qPCR

Gen	Richtung	Sequenz (5' – 3')	PCR-Produkt (bp)
<i>LINC02502</i>	vorwärts	CTCTACTGCCTTCCAAGGTTTC	184
	rückwärts	CCCTAACAGCCCCATTGACT	
<i>PDE5A</i>	vorwärts	TGGTGAGCCCTTGAACATCA	140
	rückwärts	GGGCTACACCAACAACCTCT	
<i>MALAT1</i>	vorwärts	TGAGTGTATGAGACCTTGCAGT	202
	rückwärts	GCAGCGGGATCAGAACAGTA	
<i>RPLP0</i>	vorwärts	GGCACCATTGAAATCCTGAGTG	120
	rückwärts	GATGACCAGCCCAAAGGAGAAG	

Tabelle 3 Primer, um festzustellen, ob *LINC02502* zirkulär oder linear ist

Primer	Richtung	Sequenz (5' – 3')
<i>LINC02502</i>	vorwärts	AGTCAATGGGGCTGTTAGGG
	rückwärts	GTAGAAACCTTGGAAGGCAGTA

Tabelle 4 Primer für die Detektion von Gensequenzen in unterschiedlichen Geweben

Primer/ Gensequenz	Richtung	Sequenz (5' – 3')	PCR-Produkt (bp)
<i>LINC02502</i>	vorwärts	CTCTACTGCCTTCCAAGGTTTC	184
	rückwärts	CCCTAACAGCCCCATTGACT	
<i>RPLP0</i>	vorwärts	GGCACCATTGAAATCCTGAGTG	120
	rückwärts	GATGACCAGCCCAAAGGAGAAG	

Tabelle 5 Primer für die Ligation der SNP-Region in den pGL4.10[*luc2*] Vektor

SNP-Region	Richtung	Restriktionsschnittstelle	Sequenz (5' – 3') mit Restriktionsschnittstellen (hervorgehoben)	PCR-Produkt (bp)
rs7678555 vorwärts	vorwärts	NheI	ACGTAGCT <u>GCTAGCC</u> ACT- GGGGCCTGTCAGGGGTCA	231
	rückwärts	HindIII	ACGTAGCTA <u>AAGCTT</u> GTGAA- GTAGGTTTCTTGTAGGCAGC	
rs7678555 rückwärts	vorwärts	HindIII	ACGTAGCTA <u>AAGCTT</u> CACT- GGGGCCTGTCAGGGGTCA	231
	rückwärts	NheI	ACGTAGCT <u>GCTAGCGT</u> GAA- GTAGGTTTCTTGTAGGCAGC	

Tabelle 6 Primer für die Ligation von *LINC02502* in pcDNA3.1(+) und pBI-CMV2

Richtung	Restriktionsschnittstelle	Sequenz (5' – 3') mit Restriktionsschnittstellen (hervorgehoben)	PCR-Produkt
vorwärts	BamHI	AGCT <u>G</u> GATCCATTACAAGTACCATTCTCTG	662
rückwärts	EcoRV	AGTC <u>G</u> ATATCTGCATGTACACACCAAAAATATG	

Tabelle 7 Primer für die Mutagenese des Allels von rs7678555

A>C auf dem Plusstrang und T>G auf dem Minusstrang

Richtung	Sequenz (5' – 3') mit verändertem Allel (hervorgehoben)
vorwärts	TGTATCCCAGAACTTAAAGTAAAATA <u>C</u> AAATTAAGGAGGCCCAAC
rückwärts	GTTGGGCCTCCTTTTTTTTTTAATTT <u>G</u> TATTTTACTTTAAGTTCTGGGATACA

Tabelle 8 Primer zur Überprüfung der DNA-Sequenzen in den Plasmiden

Hersteller	Primer	Plasmid	Richtung	Sequenz (5' – 3')
Promega Corporation	RVprimer3	pGL4.10[<i>luc2</i>]	vorwärts	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
	RVprimer3		rückwärts	CTTCTTAATGTTTTTGGCATCTTCC
Takara Bio Inc.	CMV	pBI-CMV2	vorwärts	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	SV40pA		rückwärts	GAAATTTGTGATGCTATTGC
Thermo Fisher Scientific	CMV	pcDNA3.1(+)	vorwärts	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	BGH		rückwärts	TAGAAGGCACAGTCGAGG

Tabelle 9 Primer für den Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Sonde	Richtung	Sequenz (5' – 3') (Allel hervorgehoben)
A-Allel (rs7678555)	vorwärts	AAGTAAAATA <u>AAA</u> ATTAAAAA
	rückwärts	TTTTTAATTT <u>I</u> TATTTTACTT
C-Allel (rs7678555)	vorwärts	AAGTAAAATA <u>CA</u> AAATTA AAAA
	rückwärts	TTTTTAATTT <u>G</u> TATTTTACTT
Kontrolle	vorwärts	AAATAATAAAAATAAGAAATAA
	rückwärts	TTATTTCTTATTTTATTATTT

3.4 Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Sonden wurden bei Qiagen (Hilden, Deutschland) bestellt. Sie lagen mit einer Konzentration von 100 µM vor und wurden in Dnase/Rnase-freiem Wasser auf gewünschte Arbeitskonzentrationen verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 10 Sonden für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Hersteller	Sonde	Katalognr.	Produktnr.	Sequenz (5' – 3')
Qiagen	<i>LINC02502</i> , Custom LNA Detection Probe lncRNA and mRNA	LCD0161474-BKD	339500	AACTAGATGAGACCTCGGTAAT
	Scramble-ISH; LNA Detection Control Probe lncRNA and mRNA	LCD0000002-BDB	339508	GTGTAACACGTCTATACGCCCA

3.5 siRNA

Tabelle 11 siRNA (small interfering RNA) zur Unterdrückung der Genexpression

Hersteller	siRNA	Katalognr.	Assay-IDs
Thermo Fisher Scientific	Ambion Silencer select negative control no. 1 siRNA 5 nmol	4390843	
	<i>LINC02502</i> 1-Silencer siRNA 5 nmol, custom-made	4399665	s536186
	<i>LINC02502</i> 2-Silencer siRNA 5 nmol, custom-made	4399665	s536188
	<i>PDE5A</i> Silencer siRNA 5 nmol, Pre-designed	AM16708	137133

3.6 Nukleinsäuren

Für die Ermittlung der zellspezifischen *LINC02502* mRNA-Expression (Kapitel 5.2.2) wurden am Deutschen Herzzentrum München vorhandene cDNA-Isolate von humanen koronararteriellen und humanen aortalen Endothelzellen (*human coronary artery endothelial cells*, hCAEC und *human aortic endothelial cells*, hAoEC; beide PromoCell), humanen Megakaryoblasten (Meg-01) und humanen Thrombozyten genutzt.

3.7 Enzyme

Tabelle 12 Mastermixe mit Polymerasen

Hersteller	Mastermix	Katalognr.	Hauptverwaltung
New England Biolabs	Q5® high-fidelity 2X master mix	M0492	Ipswich, MA, USA
New England Biolabs	OneTaq® Quick-Load® 2X master mix with standard buffer	M0486	
Quanta Biosciences	PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®, low ROX™	95074	Gaithersburg, MD, USA

Tabelle 13 Restriktionsenzyme für Kontrollverdaue

Hersteller	Anwendung	Enzym	Katalognr.	Hauptverwaltung
New England Biolabs	Kontrollverdau pcDNA3.1(+)	AlfIII	R0541	Ipswich, MA, USA
	Kontrollverdau pBI-CMV2	PvuII	R0151	
	Kontrollverdau pGL4.10[<i>luc2</i>]	BbsI	R0539	

Tabelle 14 Restriktionsenzyme für Klonierungen

Hersteller	Anwendung	Enzym	Katalognr.	Hauptverwaltung
New England Biolabs	Klonierung in pcDNA3.1(+), in pBI-CMV2	BamHI	R0136	Ipswich, MA, USA
		EcoRV	R0195	
	Klonierung in pGL4.10[<i>luc2</i>]	HindIII	R0104	
		NheI	R0131	

Tabelle 15 Weitere Enzyme

Hersteller	Enzym	Katalognr.	Hauptverwaltung
Thermo Fisher Scientific	Dnase I, amplification grade, 1 U/ μ l	18068015	Waltham, MA, USA

3.8 Zelllinien

Tabelle 16 Kommerziell erhältliche Zelllinien

Hersteller	Zelllinie	Katalognr.	Hauptverwaltung
PromoCell	Humane aortale glatte Muskelzelle (HAoSMC)	C-12533	Heidelberg, Deutschland
Sigma Aldrich	Humane embryonale Nierenzellen 293 (HEK293)	85120602	St. Louis, MO, USA

3.9 Kompetente Bakterien für die Transformation

Tabelle 17 Kompetente Bakterien

Hersteller	Bakterium	Katalognr.	Hauptverwaltung
New England Biolabs	NEB 5-alpha competent <i>E. coli</i>	C2987	Ipswich, MA, USA
Agilent Geomics	XL10-Gold® Ultracompetent Cells	200314	Santa Clara, CA, USA

3.10 Klonierungsvektoren

Tabelle 18 Expressionsvektoren

Hersteller	Vektor	Größe (bp)	Erklärung	Katalognr.	Hauptverwaltung
Thermo Fisher Scientific	pcDNA3.1(+)	5.428	Expressionsvektor	V79020	Waltham, MA, USA
Takara Bio Inc.	pBI-CMV2	3.822	Bidirektionaler Expressionsvektor	631631	Kusatsu, Japan

Tabelle 19 Luciferase-Reporter-Gen-Vektoren

Hersteller	Vektor	Größe (bp)	Erklärung	Katalognr.	Hauptverwaltung
Promega Corporation	pGL4.10[<i>luc2</i>]	4.242	Promotorloser <i>Firefly</i> Luciferase-Reporter-Vektor	E6651	Madison, WI, USA
	pRL-TK	4.045	<i>Renilla</i> Luciferase interner Kontroll-Reporter-Vektor	E2241	

Tabelle 20 Klonierte Plasmide

Plasmid	Antibiotikaresistenz	DNA-Sequenz	Größe mit eingefügter DNA
pcDNA3.1(+)	Ampicillin	<i>LINC02502</i>	6.043 bp
pBI-CMV2	Ampicillin	<i>LINC02502</i>	4.414 bp
pGL4.10[<i>luc2</i>]	Ampicillin	SNP-Region rs7678555 mit Allel A auf +Strang (= A+)	4.451 bp
		SNP-Region rs7678555 mit Allel C auf +Strang (= C+)	4.451 bp
pGL4.10[<i>luc2</i>]	Ampicillin	SNP-Region rs7678555 mit Allel T auf -Strang (= A-)	4.451 bp
		SNP-Region rs7678555 mit Allel G auf -Strang (= C-)	4.451 bp

3.11 Kits

Tabelle 21 Kits

Hersteller	Kit	Katalognr.	Hauptverwaltung
Agilent Genomics	QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit	200522	Santa Clara, CA, USA
Eurofins Genomic	Mix2Seq kit	<i>online Bestellung</i>	Ebersberg, Deutschland
Promega Corporation	Dual-Luciferase® reporter assay system	E1960	Madison, WI, USA
Qiagen	MinElute® gel extraction kit	28604	Hilden, Deutschland
	QIAshredder™	79656	
	Rneasy® Plus mini kit	74136	
Roche Lifescience	Rapid DNA Dephos & Ligation kit	04898117001	Penzberg, Deutschland

Hersteller	Kit	Katalognr.	Hauptverwaltung
Sigma Aldrich	GeneElute™ plasmid miniprep kit	PLN350-1KT	St. Louis, MO, USA
Lonza	Amaxa® Human AoSMC Nucleofector® Kit	VPC-1001	Basel, Schweiz
Thermo Fisher Scientific	Thermo Scientific™ LightShift™ chemiluminescent EMSA kit	20148	Waltham, MA, USA
	NE-PER™ nuclear and cytoplasmic extraction Reagents	78833	
	Thermo Scientific™ Pierce™ biotin 3' end DNA labeling kit	89818	
	ThermoScript™ RT-PCR system for first-strand cDNA synthesis	11146016	

3.12 Bedarfsmaterial

Tabelle 22 Bedarfsmaterial

Hersteller	Material	Katalognr.	Hauptverwaltung
5 PRIME GmbH	Phase lock gel heavy 1.5 ml	2302810	Hilden, Deutschland
Merck Millipore	Scepter™ cell counter sensors, 60 µm	PHCC60050	Billerica, MA, USA
	Stericup®-GP, 0.22 µm, polyethersulfone, 150 ml, radio-sterilised	SCGPU01RE	
Thermo Fisher Scientific	Applied Biosystems™ MicroAmp® fast optical 96 well reaction plate, 0.1 ml	4346907	Waltham, MA, USA
Thermo Fisher Scientific	Applied Biosystems™ MicroAmp® optical adhesive film	4311971	Waltham, MA, USA
	Thermo Scientific™ Biotin™ B nylon membrane, 0.45 µm, 8 cm x 12 cm	77016	

3.13 Geräte und Utensilien

Tabelle 23 Geräte und Utensilien

Hersteller	Gerät	Bezeichnung	Hauptverwaltung
Bio-Rad	Horizontales Elektrophorese System	PowerPac™ Basic	Hercules, CA, USA
GE Healthcare Life Sciences	Biomolekulars Aufnahmegerät	ImageQuant™ LAS 4000	Chicago, IL, USA
	Zellzähler	Scepter™	
Lonza	Nukleofaktor-System	Amaya™ Nucleofector™II	Basel, Schweiz
Merck Millipore	Millipore Wasser System	Milli-Q® Reference	Burlington, MA, USA
Minitüb GmbH	Wärmeplatte	HT 00 W	Tiefenbach, Deutschland
Nikon	Inverses Mikroskop	Eclipse TS100	Minato, Präfektur Tokio, Japan
Tecan Group	Mikroplatten-Leser	Infinite® M200 PRO	Männedorf, Schweiz
Thermo Fisher Scientific	Real-time PCR Instrument	Applied Biosystems™ ViiA™ 7 real-time PCR system	Waltham, MA, USA

3.14 Software

Tabelle 24 Software

Hersteller	Software	Anwendungen	Hauptverwaltung
CLC bio	CLC Main Workbench 7	Analyse von Sequenzierdaten <i>In silico</i> Klonierungen	Arhus, Dänemark
GE Healthcare Life Sciences	ImageQuant™ LAS 4000 v1.2	Dokumentation von EMSA-Gelen und Gelen nach Gelelektrophorese	Chicago, IL, USA
GraphPad Software Inc	GraphPad Prism version 7.0a for Mac OS X	Statistische Analyse	La Jolla, USA
Tecan Group	iControl v1.10	Messung der Nukleinsäurekonzentration, Luciferase-Assay	Männedorf, Schweiz
Thermo Fisher Scientific	ViiA™ 7 software v1.2.2	qPCR Messungen	Waltham, MA, USA

3.15 Datenbanken

Tabelle 25 Datenbanken

National Center for Biotechnology Information (NCBI)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI BioProject	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/
GTEEx Portal	https://www.gtexportal.org
NCBI Gene	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene
NCBI Nucleotide	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide
UCSC Genome Browser	https://genome.ucsc.edu

3.16 Online Tools und Ressourcen

Tabelle 26 Online Tools und Ressourcen

Double Digest Finder	https://nebcloner.neb.com/#!/redigest
NCBI Primer BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
NEBcutter V2.0	https://nc2.neb.com/NEBcutter2/
QuikChange Primer Design	https://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp
Reverse Complement	https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html

4 Methoden

4.1 Primerdesign

Primer wurden mithilfe des Online Tools *NCBI Primer Blast* entworfen. Restriktionsschnittstellen wurden manuell eingefügt. Mutagenese-Primer wurden mithilfe des Online Tools *QuikChange Primer Design* von Agilent Technologies designet. qPCR Primer für die Amplifikation von komplementär-DNA (*Complementary DNA*, cDNA) wurden auf Exon-Exon-Grenzen gelegt, um die Amplifikation möglicher genomischer DNA-Kontamination zu verhindern. Sequenzierprimer wurden manuell ohne spezielle Programme entworfen.

4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Um DNA-Abschnitte zu vervielfältigen, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) angewandt (Mullis et al., 1992). Dabei werden mithilfe von Primerpaaren bestimmte Sequenzen amplifiziert. Hierzu nutzt man die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen aus, die sich bei bestimmten Temperaturen lösen oder sich wieder zusammenlagern. So ergeben sich drei essenzielle Schritte der PCR: Denaturierung, Primerhybridisierung und Polymerisation bzw. Elongation. Im ersten Schritt (94 – 98 °C) trennen sich die Wasserstoffbrücken, der Doppelstrang der DNA löst sich und die DNA liegt als Einzelstrang vor. Daraufhin können sich die Primer bei einer spezifischen Temperatur an die definierte Sequenz anlagern. Die Temperatur richtet sich hierbei nach Länge und Sequenz der Primer, meistens liegt sie zwischen 50 – 65 °C. Im letzten Schritt wird die DNA-Polymerase aktiv, die nun einen komplementären Strang synthetisiert. Die Elongationstemperatur richtet sich nach der DNA-Polymerase. Die Schritte werden zwischen 20- bis 50-mal wiederholt. Dabei steigt die Menge an PCR-Produkt exponentiell.

4.2.1 Endpunkt-PCR

Für die qualitative DNA-Detektion und die Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche, die für weitere Experimente wie Klonierungen gebraucht wurden, wurde die Endpunkt-PCR gewählt. Dafür gab es zwei unterschiedliche Protokolle. Für die qualitative DNA-Bestimmung wurde die *OneTaq® DNA Polymerase* (Tabelle 27) und für die Amplifikationen von DNA die *Q5® high-fidelity DNA Polymerase* eingesetzt (Tabelle 28) (beide New England Biolabs). Das Temperaturprofil der Reaktion wurde an die Polymerase angepasst (Tabelle 29).

Die Ansätze wurden in sterile 200 µl Reaktionsgefäße pipettiert. Als Negativkontrolle diente Wasser.

Tabelle 27 Reaktionsprotokoll für qualitative DNA-Detektionen

Reagenzien	Volumen
OneTaq® Quick-Load® 2X Mastermix mit Standardpuffer	12,5 µl
cDNA (100 ng)	Variabel
10 µM Vorwärtsprimer	1 µl
10 µM Rückwärtsprimer	1 µl
Dnase/Rnase-freies Wasser	ad 25 µl

Tabelle 28 Reaktionsprotokoll für Amplifikationen von gDNA/ cDNA für Klonierungen

Reagenzien	Volumen
Q5® high-fidelity 2X Mastermix	12,5 µl
gDNA/cDNA (10 ng)	Variabel
10 µM Vorwärts-Primer	1,25 µl
10 µM Rückwärts-Primer	1,25 µl
Dnase/Rnase-freies Wasser	ad 25 µl

Tabelle 29 PCR-Protokoll für OneTaq® und Q5® High-Fidelity DNA-Polymerasen

Schritte	OneTaq® DNA-Polymerase		Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase	
	Temp.	Dauer	Temp.	Dauer
Initiale Denaturierung	94 °C	30 s	98 °C	30 s
30 Zyklen	94 °C	30 s	98 °C	10 s
	50 °C	60 s	65 °C	30 s
	68 °C	1 min/ kb	72 °C	30 s/ kb
Finale Elongation	68 °C	5 min	72 °C	2 min
Stop	4 °C	∞	4 °C	∞

4.2.2 Reverse Transkription

Die isolierte RNA wurde zunächst mithilfe einer reversen Transkriptase zu cDNA umgeschrieben, um die Genexpression im Anschluss mit der quantitativen PCR (qPCR) zu untersuchen. Die cDNA ist komplementär zu der vorliegenden RNA und enthält, im Gegensatz zu genomischer DNA, keine Introns.

Für die cDNA-Synthese wurde das ThermoScript™ RT-PCR system for first-strand cDNA synthesis (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 30 listet RNA, Primer und dNTPs auf, die im ersten Schritt in einem sterilen 200 µl Reaktionsgefäß gemischt wurden. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mit Wasser statt RNA vorbereitet.

Anschließend wurde der Ansatz für 5 min bei 65 °C inkubiert. Dabei wurde die RNA denaturiert, es konnten sich keine Sekundärstrukturen ausbilden und die Primer besser anlagern. Die Reaktion wurde sofort für 5 min auf Eis inkubiert.

Tabelle 30 Ansatz für den Denaturierungsschritt

Reagenzien	Volumen
RNA*	Variabel
Oligo(dT) Primer	1 µl
Random hexamer Primer	1 µl
10 mM dNTP Mix	2 µl
DNase/RNase-freies Wasser	ad 12 µl

* Aus HEK293 wurde 1050 ng und aus HAoSMC wurde 210 ng der isolierten RNA eingesetzt. Von der isolierten RNA aus der Nukleus-/Zytoplasma-Fraktion wurde 210 ng eingesetzt.

Nach dem Denaturierungsschritt wurde dem Ansatz für die cDNA-Erststrang-Synthese die Komponenten aus dem Kit ThermoScript™ RT-PCR system for first-strand cDNA synthesis hinzugefügt (Tabelle 31). Zunächst wurde das Reaktionsgemisch im Thermozykler für 10 min bei 25 °C, dann 50 min bei 50 °C und im letzten Schritt für 5 min bei 85 °C inkubiert. Um die anschließende Amplifikation der cDNA zu erleichtern, wurde die RNA mittels RNase H für 20 min bei 37 °C verdaut. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tabelle 31 Reagenzien für die cDNA-Erststrang-Synthese

Reagenzien	Volumen
5X cDNA Synthesepuffer	4 µl
0,1 M DTT	1 µl
RNase OUT™ (40 U/ µl)	1 µl
DNase/RNase-freies Wasser	1 µl
ThermoScript™ RT (15U/ µl)	1 µl
RNase H	1 µl

4.2.3 Quantitative PCR

Für die quantitative Analyse der Genexpression wurde die quantitative PCR (qPCR)-Methode angewendet. Hierbei wurde der Mastermix PerfeCTa® SYBR® Green FastMix®, low ROX™ (Quanta Biosciences), der unter anderem den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I enthält, benutzt.

Die PCR-Reaktionen wurden wie in Tabelle 32 beschrieben (ohne cDNA) vorbereitet und in einer 96-Well PCR Platte vorgelegt. Am Ende wurde die zu untersuchende cDNA individuell in das jeweils dafür vorgesehene Well pipettiert (Kapitel 4.2.2).

Tabelle 32 qPCR-Reaktionsansatz pro Well auf einer 96-Well Mikrotiterplatte

Reagenzien	Volumen
PerfeCTa® SYBR® Green FastMix ®	10 µl
cDNA*	Variabel
8 µM Vorwärtsprimer	1 µl
8 µM rückwärts Primer	1 µl
DNase/RNase-freies Wasser	<i>ad 20 µl</i>

* Aus Isolaten der HEK293 wurden so viel cDNA eingesetzt, sodass es einer Menge von 50 ng RNA entsprach und aus den Isolaten der HAoSMC wurde cDNA eingesetzt, die 25 ng RNA entsprach. Die eingesetzte cDNA der Nukleus-/Zytoplasma-Fraktion entsprach 25 ng RNA.

Es wurden zusätzlich zwei Negativkontrollen durchgeführt. Dazu wurde cDNA einmal durch Wasser und einmal durch 1 µl der Kontrolle der vorangegangenen reversen Transkription ersetzt. Jede Probe wurde in technischen Triplikaten gemessen, um die Messvarianz zu berücksichtigen.

Zur Messung wurde das Applied Biosystems™ ViiA™ 7 real-time PCR System zusammen mit der ViiA™ 7 software v1.2.2 (beides Thermo Fisher Scientific) genutzt.

Tabelle 33 Temperaturprofil der qPCR und Schmelzkurvenanalyse

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		95 °C	30 s
Elongation	40 x	95 °C	15 s
Polymerisation		60 °C	1 min
Schmelzkurve		95 °C	15 s
		60 °C	1 min
		95 °C	15 s

4.2.4 Auswertung qPCR

Bei der qPCR wird der Fortschritt der Amplifikation des Zielgens in Echtzeit während der PCR abgebildet. Der Farbstoff SYBR® Green I bindet dsDNA und der daraus resultierende detektierbare DNA-Farbstoffkomplex steigt im Verlauf der qPCR proportional mit der Menge des PCR-Produkts an. Das Fluoreszenzsignal wird am Ende jeder Elongation gemessen. Das Amplikon wird erkannt, sobald das Fluoreszenzsignal einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Der Schwellenwert ist erreicht, wenn die Amplifikation des PCR-Produkts in der exponentiellen Phase ist. So wird das signifikante Signal von Hintergrundrauschen abgegrenzt. Der Zyklus, bei dem die Schwelle überschritten wird, nennt sich C_T -Wert (*Threshold Cycle*, Schwellenwertzyklus). Bei einer anfänglich hohen Kopienzahl des Gens führt die PCR zu einem früher messbaren Anstieg des Amplikons und der C_T -Wert wird kleiner. Dementsprechend ist der C_T -Wert höher, wenn die Menge der Ziel-DNA geringer ist.

Neben der C_T -Wert-Messung des Zielgens wurde auch der C_T -Wert des *Housekeeping* Gens *RPLP0* (*Ribosomal protein lateral stalk subunit P0*) als Kontrolle in jeder qPCR gemessen. Die Differenz des *Housekeeping* Gens und des jeweiligen Zielgens wurde errechnet und anschließend je nach Fragestellung entweder als Wert= $2^{-\Delta C_T}$, oder Wert= $2^{-\Delta\Delta C_T}$ bzw. dessen *fold change* dargestellt. So konnten die Ergebnisse aus den Wiederholungen eines Experiments verglichen werden.

Der Farbstoff SYBR® Green I bindet an jede dsDNA, weshalb auch unspezifische dsDNA-Fragmente, wie zum Beispiel hybridisierte Primer, registriert werden können. Um die Spezifität der Primer zu überprüfen, wurde bei jedem Durchlauf und bei jeder Reaktion die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dazu wird nach abgelaufener PCR die Temperatur

erhöht, wodurch jede dsDNA denaturiert wird. Folglich löst sich der Farbstoff-DNA-Komplex und das Fluoreszenzsignal sinkt, welches gemessen wird. Abhängig von der Länge und Sequenz der dsDNA wird der Abfall des Fluoreszenzsignals ab einer spezifischen Temperatur, der Schmelztemperatur, detektiert. Erscheinen neben der charakteristischen Schmelztemperaturkurve des zu erwartenden Amplikons weitere Temperaturkurven, lässt dies auf die Bildung unspezifischer dsDNA oder Primerdimerisierung schließen.

4.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und bei 130 V elektrophoretisch aufgetrennt. Bei Verwendung der Q5® High-fidelity DNA-Polymerase wurde die DNA vor dem Auftragen auf das Gel 6:1 mit 6X purple loading dye gemischt. Bei der OneTaq® DNA-Polymerase war dieser Schritt nicht nötig, da diese den Farbstoff bereits im Mastermix enthielt (alle New England Biolabs). Als Referenzgröße wurde zusätzlich die 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs), die ein Spektrum von 0,1 bis 10,0 kb umfasst, separat auf das Gel aufgetragen. Die Gele wurden im UV-Licht im ImageQuant™ LAS 4000 biomolecular imager mithilfe des Programms ImageQuant™ LAS 4000 v1.2 software (beides GE Healthcare Life Sciences) dokumentiert.

4.4 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Die DNA-Fragmente im Agarosegel, erkennbar durch UV-Licht, wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Extraktion erfolgte nach Anleitung des MinElute® gel extraction kit (Qiagen). Dazu wurde die Probe in 300 µl QG Puffer für 10 min bei 50 °C gelöst. Die DNA wurde mit 100 µl Isopropanol (100 % v/v) ausgefällt. Die Probe wurde gemischt und auf eine MinElute® Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Probe für 1 min bei 17.900 x g zentrifugiert. Es wurde mit 500 µl QG Puffer gewaschen und anschließend für 1 min bei 17.900 x g zentrifugiert. Ein zweiter Waschschrift erfolgte mit 750 µl PE Puffer und die Probe wurde 1 min bei 17.900 x g zentrifugiert. Um restliches Ethanol aus den Waschpuffern zu entfernen, wurde die Säule erneut für 1 min bei 17.900 x g zentrifugiert. In einem letzten Zentrifugationsschritt wurde die DNA mit 20 µl DNase/RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.5 Klonierung

Die Klonierung dient der identischen Vervielfältigung von DNA. In diesem Fall wurde bei der Klonierung ein isolierter DNA-Abschnitt in einen bestimmten Vektor eingefügt und der rekombinierte Vektor dann mithilfe von kompetenten Bakterien vervielfältigt.

Im ersten Schritt wurde der zirkuläre Vektor durch einen doppelten Restriktionsverdau linearisiert (Kapitel 4.5.3). Dafür wurden Schnittstellen von Restriktionsenzymen, die in der Vektorsequenz innerhalb *der multiple cloning site* zu finden sind, ausgewählt. Um den gewünschten DNA-Abschnitt in den verdauten Vektor einfügen zu können, benötigten die PCR-amplifizierten DNA-Fragmente Enden, die den Enzymschnittstellen im Vektor entsprachen. Diese wurden daher in der Sequenz der Primer, die für die Amplifikation der zu klonierenden DNA-Fragmente erstellt wurden, berücksichtigt (Tabelle 5, Tabelle 6).

Dann wurden die Enden des Vektors dephosphoryliert und mit den Enden des gewünschten DNA-Fragments ligiert (Kapitel 4.5.4).

Der rekombinierte Vektor wurde anschließend durch die Transformation kompetenter Bakterien (Kapitel 4.7) vervielfältigt und dann aus den Bakterien isoliert (Kapitel 4.7.3). Das so vervielfältigte DNA-Plasmid konnte dann für die Transfektion von Zellen (HEK293 oder HAoSMC) verwendet werden (Kapitel 4.10).

In dieser Arbeit wurde die gesamte kodierende Sequenz von *LINC02502* in die Expressionsvektoren pBI-CMV2 und pcDNA3.1(+) eingefügt. Außerdem wurde die 209 bp-lange genomische Sequenz, die den Einzelnukleotid-Polymorphismus rs7678555 umschließt, in den Luciferase-Vektor pGL4.10[*luc2*] kloniert.

4.5.1 pGL4.10[*luc2*] mit SNP rs7678555

Für die Promotoranalyse wurde die 209 bp große genomische Region um den Einzelnukleotid-Polymorphismus rs7678555 (Tabelle 20) in den Reporter-Vektor pGL4.10[*luc2*] kloniert und die verschiedenen Genotypen mittels Mutagenese (Tabelle 7) hinzugefügt. Für die Klonierung wurde aus 10 ng humaner genomischer DNA, die 209 bp lange genomische Region um den SNP mithilfe einer Endpunkt PCR (Kapitel 4.2.1) amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer enthielten Sequenzen, die den Restriktionsschnittstellen für HindIII und NheI entsprechen (Tabelle 5).

4.5.2 pBI-CMV2 und pcDNA3.1(+) mit *LINC02502*

Für die Klonierung von *LINC02502* mit dem Vektor pBI-CMV2 wurde cDNA verwendet. Bei pBI-CMV2 handelt es sich um einen bidirektionalen Vektor, der zusätzlich zum eingesetzten DNA-Abschnitt das von *Aequorea coerulescens* stammende grün-fluoreszierende Protein (*AcGFP1*) exprimieren kann. Die Primer wurden so entworfen, dass die gesamte lncRNA mit 662 bp amplifiziert wurde und die Primer enthielten Sequenzen, die den Restriktionsschnittstellen für BamHI und EcoRV entsprechen (Tabelle 6).

4.5.3 Restriktionsverdau

Geeignete Restriktionsenzyme, deren Schnittstellen in der Vektorsequenz innerhalb der *multiple cloning site* zu finden sind, wurden ausgewählt. Mithilfe der online Software *Double Digest Finder* (<https://nebcloner.neb.com/#!/redigest>) wurden aus der Liste geeigneter Enzymen Paare ausgesucht, die unter gleichen Bedingungen aktiv sind. Der Vektor und das PCR-Produkt wurden durch einen doppelten Restriktionsverdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (Tabelle 34) für die anschließende Ligation vorbereitet. Die verwendeten Enzympaare und die verwendeten Puffer sind in Tabelle 35 gelistet. Die Reaktion wurde in einem sterilen 200 µl PCR-Reaktionsgefäß über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 34 Doppelverdau Reaktionsansatz

Reagenzien	Volumen
Vektor/ PCR Produkt	10 µl
10X Puffer	2 µl
Restriktionsenzym 1	1 µl
Restriktionsenzym 2	1 µl
DNase/RNase-freies Wasser	ad 20 µl

Tabelle 35 Enzyme und Puffer für den Doppelverdau

Plasmid	Enzym	Puffer
pcDNA3.1(+)-LINC02502	BamHI	1X NEBuffer™ 3.1
	EcoRV	1X NEBuffer™ 3.1
pBI-CMV2-LINC02502	BamHI	1X NEBuffer™ 3.1
	EcoRV	1X NEBuffer™ 3.1
pGL4.10[luc2]-rs7678555	HindIII	1X NEBuffer™ 2.1
	NheI	1X NEBuffer™ 2.1

Nach dem Verdau wurden der linearisierte Vektor und der verdaute DNA-Abschnitt aufgereinigt. Dazu wurden sie im Verhältnis 6:1 mit dem Farbstoff 6X purple loading dye (New England Biolabs) gemischt, bevor sie auf ein Agarosegel (Kapitel 4.3) aufgetragen wurden. Die Gelelektrophorese erfolgte wie bereits beschrieben (Kapitel 4.3). Anschließend wurden der DNA-Abschnitt und der Vektor aus dem Gel aufgereinigt (Kapitel 4.4) und die Konzentration gemessen (Kapitel 4.14).

4.5.4 Dephosphorylierung und Ligation

Im Anschluss an den doppelten Restriktionsverdau wurde der DNA-Abschnitt in den Vektor mithilfe des Rapid DNA Dephos & Ligation Kit (Roche) in den linearisierten Vektor ligiert.

Zunächst wurde die Dephosphorylierung von 500 ng des Vektors durchgeführt. Die Reaktion (Tabelle 36) wurde 30 min bei 37 °C in einem Thermomixer inkubiert. Um die Aktivität der Phosphatase zu stoppen, wurde die Reaktion für 2 min bei 75 °C inkubiert.

Tabelle 36 Ansatz der Dephosphorylierung

Reagenzien	Volumen
500 ng linearisierter Vektor	Variabel
10X rAPid alkaline phosphatase buffer	2 µl
rAPid alkaline phosphatase (1 U/µl)	1 µl
DNase/RNase-freies Wasser	Ad 20 µl

Im Anschluss erfolgte die Ligation des dephosphorylierten linearisierten Vektors mit dem verdauten DNA-Abschnitt. Dafür wurden in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß DNA-Abschnitt, Vektor (spezifische Verhältnisse sind in Tabelle 37 beschrieben), der Dilution Puffer und Wasser gemischt. Zuletzt wurden der Puffer und die T4 Ligase wie in Tabelle 38 beschrieben hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Tabelle 37 Verhältnis Vektor-DNA zur einzufügenden DNA-Sequenz

	Verhältnis (Insert:Vektor)	Linearisierte Vektor-DNA	Insert-DNA
LINC02502 in pcDNA3.1(+)	3:1	50 ng	150 ng
LINC02502 in pBI-CMV2	3:1	50 ng	150 ng
Region um rs7678555 in pGL4.10	1:1,3	37,5 ng	50 ng

Im nächsten Schritt erfolgte die Transformation der NEB® 5-alpha *E. coli* Bakterien (New England Biolabs) mit dem rekombinanten DNA-Plasmid (Kapitel 3.10).

Tabelle 38 Ansatz der Ligation

Reagenzien	Volumen
Vektor-DNA	Variabel
Insert-DNA	Variabel
5X DNA Dilution Puffer	2 μ l
DNase/RNase-freies Wasser	<i>ad</i> 10 μ l
T4 DNA Ligase (5 U/ μ l)	1 μ l
2X T4 DNA Ligation Puffer	10 μ l

4.6 Gezielte Mutagenese

Die verschiedenen Genotypen des rs7678555 DNA-Abschnitts im pGL4.10[luc2] Vektor wurden mittels gezielter Mutagenese (Kapitel 3.10). Dabei wurde das QuikChange II XL site-directed mutagenesis Kit (Agilent Genomics) nach Herstellerangaben verwendet. Die Komponenten aus dem Kit und die Primer sind in Tabelle 39 aufgeführt, die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 7 gelistet.

Tabelle 39 Mutagenesereaktion

Reagenzien	Volumen
10X reaction buffer	2,5 μ l
dNTP mix	0,5 μ l
Plasmid-DNA (10 ng)	Variabel
QuikSolution reagent	1,5 μ l
10 μ M Vorwärts-Mutageneseprimer	1 μ l
10 μ M Rückwärts-Mutageneseprimer	1 μ l
DNase/RNase-freies Wasser	<i>ad</i> 25 μ l

Nach zusammenführen aller in in Tabelle 39 gelisteten Reagenzien, wurde jeder Reaktion jeweils 0,5 μ l *PfuUltra* high fidelity DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l) hinzugefügt und dann gemäß des nachfolgenden Temperaturprofils (Tabelle 40) im Zykler inkubiert.

Tabelle 40 Temperaturprofil Mutagenesereaktion

Schritt	Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min
18 x Zyklen	95 °C	50 s
	60 °C	50 s
	68 °C	1 kb/min
Finale Elongation	68 °C	7 min
Stopp	4 °C	∞

Im letzten Schritt wurde das Ursprungsplasmid verdaut, indem der Mutagenese-Reaktion 1 µl DpnI (10 U/µl) hinzugefügt wurde. Die Reaktion wurde für 1 h bei 37 °C im Zykler inkubiert und das mutagenisierte Plasmid anschließend mittels Transformation kompetenter Bakterien, hier *XL10-Gold® Ultracompetent E. coli* (Agilent Genomics) vervielfältigt (Kapitel 4.7).

4.7 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

4.7.1 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA für die Anwendung in Folgeexperimenten wurden kompetente *E. coli* Bakterien genutzt. Dazu wurde die gewünschte Plasmid-DNA mittels Transformation in die kompetenten Bakterien übertragen. Bei der Transformation handelt es sich um einen Gentransfer auf horizontaler Ebene. Das extrazelluläre genetische Material, das dabei von den kompetenten Bakterien aufgenommen wird, wird beim Wachstum der Bakterien weiter vermehrt. In dieser Arbeit wurden NEB® 5-alpha kompetente *E. coli* Bakterien (New England Biolabs) und für die Mutagenesereaktion (Kapitel 4.6) wurden *XL10-Gold® Ultracompetent E. coli* Bakterien (Agilent Genomics) verwendet.

Die kompetenten NEB® 5-alpha *E. coli* Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Es wurde 100 ng Plasmid-DNA zu 50 µl NEB® 5-alpha Bakterien hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der nachfolgende Hitzeschock für 30 s bei 42 °C wurde im Wasserbad durchgeführt. Daraufhin wurden 250 µl vorgewärmtes SOC Medium hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C und 1000 rpm im Thermomixer schüttelnd inkubiert. Währenddessen wurde eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum im Brutschrank vorgewärmt (Tabelle 20). Es wurde 100 µl der transformierten Bakterien auf der LB-Agarplatte ausgestrichen. Die LB-Agarplatte wurde über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Die *XL10-Gold® Ultracompetent E. coli* Bakterien wurden nach Herstellerangaben verwendet und zunächst auf Eis aufgetaut. Es wurde 4 µl β-ME-Mix zu 100 µl der Bakterien gemischt. Danach wurde das Röhrchen vorsichtig geschwenkt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 50 ng der Plasmid-DNA hinzugefügt. Das Röhrchen wurde geschwenkt und 30 min auf Eis inkubiert. Der nachfolgende Hitzeschock für 30 s bei 42 °C wurde im Wasserbad durchgeführt. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis wurde 0,9 ml des vorgewärmten LB Mediums hinzugefügt und für 1 h bei 37 °C und 1000 rpm im Thermomixer schüttelnd inkubiert. Es wurde 100 µl der transformierten Bakterien auf der LB-Agarplatte ausgestrichen. Die LB-Agarplatte wurde über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

4.7.2 Beimpfen von Übernacht-Kulturen

Nach erfolgreicher Transformation wurde ein Klon von der Agarplatte gepickt, mit dem eine Flüssigkultur über Nacht beimpft wurde. Die Flüssigkultur bestand aus 5 ml LB-Medium und 5 µl Ampicillin. Die Kulturen wurden in einem Brutschrank über Nacht geschüttelt inkubiert und die DNA am darauffolgenden Tag aus den Bakterien extrahiert.

4.7.3 Plasmid-Extraktion aus *E. coli* Bakterien

Die vervielfältigte DNA in der Flüssigkultur wurde mithilfe des GenElute™ plasmid mini prep Kit (Sigma Aldrich) extrahiert. Das Protokoll des Herstellers wurde befolgt.

Von den 5 ml der Übernacht-Kultur wurde zweimal 2 ml für jeweils 1 min bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit in einem 2 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert und der Überstand jedes Mal verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer vollständig resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen mit 200 µl Lysepuffer lysiert. Das Reaktionsgefäß wurde mehrfach invertiert und maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Reaktion mit 350 µl Neutralisationspuffer gestoppt wurde. Das Reaktionsgefäß wurde erneut mehrfach invertiert und anschließend für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich nun die Plasmid-DNA befand, wurde dann auf zuvor vorbereitete DNA-Säulen übertragen. Zur Vorbereitung dieser Säulen wurde jede Säule innerhalb eines Reaktionsgefäßes mit 500 µl Column Preparation Solution aktiviert, indem diese für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert wurde. Um die Plasmid-DNA an die Säule zu binden, wurde diese für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend folgten zwei Reinigungsschritte mit einmal 500 µl Optional Washbuffer und einmal 750 µl Washbuffer. Bei beiden Schritten wurde die Säule jeweils für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Um restliches Ethanol von der Säule zu entfernen, wurde sie noch einmal für 2 min bei 12.000 x g trocken zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml

Reaktionsgefäß übertragen. Das Plasmid wurde mit 80 µl DNase/RNase freiem Wasser für 1 min bei maximaler Zentrifugationsgeschwindigkeit eluiert. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.7.4 Kontrollverdau von Plasmid-DNA

Jede Klonierung wurde durch einen Kontrollverdau überprüft. Dafür wurden Restriktionsenzyme (New England Biolabs) *in silico* ausgesucht, die den Vektor in definierten Bereichen in charakteristische Teilstücke schneiden sollte (Tabelle 41).

Für den Reaktionsansatz wurden 5 µl DNA-Plasmid mit 0,5 µl Restriktionsenzym, 2 µl Puffer und 12,5 µl Wasser in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert und für 1,5 h bei 37 °C im Thermozykler inkubiert. Der Kontrollverdau wurde mittels 1 % Agarosegel getrennt (Kapitel 4.3) und die Bandengrößen unter UV-Licht überprüft.

Tabelle 41 Kontrollverdau

Plasmid	DNA-Sequenz	Enzym	Puffer	Fragmentgrößen
pcDNA3.1(+)	–	AfIII	NEBuffer™ 3.1	2045, 3391
	<i>LINC02502</i>	AfIII		2045, 4006
pBI-CMV2	–	PvuII	CutSmart® Buffer	1236, 2586
	<i>LINC02502</i>	PvuII		1492, 2922
pGL4.10[<i>luc2</i>]	–	BbsI	NEBuffer™ 2.1	1950, 2300
	rs7678555	BbsI		1950, 2510

4.8 Sequenzierung

DNA und Primer wurden in den Sequenzierungstubes aus dem Mix2Seq Kit (*Eurofins Genomic*) wie in Tabelle 42 angegeben gemischt. Anschließend wurde die Sequenzierung von Eurofins Genomic durchgeführt. Die Sequenzierungsdaten wurden dann mit dem CLC Main Workbench 7 Programm überprüft.

Tabelle 42 Ansatz für Sequenzierungen

Reagenzien	Volumen
1125 ng Plasmid-DNA	Variabel
10 µM Vorwärtsprimer	1 µl
10 µM Rückwärtsprimer	1 µl
DNase/RNase-freies Wasser	ad 20 µl

4.9 Zellkultur

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde jeder Arbeitsschritt unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. In dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Zelltypen gearbeitet. Die HEK293 Zellen wurden für das Luciferase-Reporter-gen-System verwendet. Die HAoSMCs wurden für die Analyse der Überexpression bzw. siRNA-Knockdown von *LINC02502*, sowie für die Stimulation mit humanem Interleukin-1 β und oxidiertem LDL verwendet.

4.9.1 Passagieren der Zellen

HAoSMCs

Zum Auftauen wurden die HAoSMCs in einem 37 °C warmen Wasserbad geschwenkt und dann in vorgewärmtes Medium überführt. In einer T75 Zellkulturflasche mit 10 ml HAoSMC-Medium wurden die Zellen bei 37 °C/ 5 % CO₂ im Brutschrank gezüchtet. Alle 72 h wurde das Medium gewechselt (Kapitel 3.2.3).

Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht hatten, wurden sie passagiert. Dazu wurden sie zuerst mit 5 ml HEPES BSS (Promocell) gespült, was wieder abgenommen wurde, und anschließend mit 5 ml Trypsin-EDTA (0,04 % / 0,03 %) 5 min bei 37 °C/ 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, bevor die Reaktion mit 5 ml Trypsin Neutralising Solution (TNS) abgestoppt wurde (alles Promocell). Die gelösten Zellen in 10 ml Gesamtvolumen wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 200 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin vorsichtig verworfen. Das resultierende Zellpellet wurde mit 2 ml Medium vorsichtig resuspendiert. Für die Zellzählung wurden 10 µl der Zellsuspension in ein vorbereitetes 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 10 µl Gibco™ trypan blue solution (Trypanblau; Thermo Fisher Scientific) überführt und gemischt. Anschließend wurde die Trypanblau-Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop gezählt. Die gewünschte Menge Zellen wurde dann entweder in eine frische T75 Zellkulturflasche überführt, oder für Folgeexperimente in Zellkulturplatten ausgesät

HEK293 Zellen

Zum Auftauen wurden die HEK293 Zellen im 37 °C warmen Wasserbad geschwenkt und dann in ein vorgewärmtes Medium überführt. In einer T75 Zellkulturflasche mit 20 ml HEK293-Medium wurden die Zellen bei 37 °C/ 5 % CO₂ im Brutschrank gezüchtet.

Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht hatten, wurden sie passagiert. Dazu wurden sie zuerst mit 5 ml PBS gespült (Thermo Fisher Scientific). Anschließend wurden die Zellen 5 ml Gibco™ Trypsin-EDTA (0,25 %), phenol red (Thermo Fisher Scientific) 5 min bei 37 °C/ 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, bevor die Reaktion mit 10 ml HEK293-Medium abgestoppt wurde. Für die Zellzählung wurde 1 ml der Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und mithilfe des Scepter™ (Merck Millipore) gemessen. Anschließend wurde die Suspension zentrifugiert, die Flüssigkeit abgesaugt und das Zellpellet in der gewünschten Menge Medium resuspendiert. Die gewünschte Menge Zellen wurde dann entweder in eine frische T75 Zellkulturflasche überführt oder für Folgeexperimente in Zellkulturplatten ausgesät.

4.9.2 Einfrieren der Zellen

Um Zellen zur Langzeitlagerung einzufrieren, wurden sie zunächst wie schon beschrieben (Kapitel 4.9.1) trypsiniert und gezählt. Anschließend wurden $10 \cdot 10^5$ Zellen in 1 ml Freezing Medium Cryo-SFM (*PromoCell*) resuspendiert und in ein Kryotube überführt. Die Kryotubes wurden für mindestens 24 h bei -80 °C in einem mit Isopropanol (100 % v/v) gefüllten Gefriercontainer gelagert, bevor sie in den Flüssigstickstofftank mit -196 °C überführt wurden.

4.9.3 Zellkonzentrationen und Plattenformate

Für Transfektions- und Stimulationsexperimente wurden die Zellen in 6-, 12- oder 24- Well-Platten ausgesät. In folgender Tabelle 43 sind die Well-Formate mit den jeweiligen benötigten Zellkonzentrationen dargestellt.

Tabelle 43 Well-Schema für die Aussaat

Well-Platte	Fläche	Medium	HEK293 Zellkonzentration	HAoSMC Zellkonzentration
12-Well-Platte	3,9 cm ²	1,0 ml	$7,5 \cdot 10^5$ Zellen/ ml	$4,0 \cdot 10^5$ Zellen/ ml
24-Well-Platte	1,9 cm ²	0,5 ml	$5,0 \cdot 10^5$ Zellen/ ml	$2,0 \cdot 10^5$ Zellen/ ml

4.10 Transiente Transfektion

Bei transienten Transfektionen wird das eingeschleuste Gen vorübergehend in der Wirtszelle (hier: HEK293 Zellen und HAoSMC) exprimiert, aber nicht in das Wirtsgenom integriert.

Drei unterschiedliche Ansätze wurden durchgeführt. Für die Überexpressionsexperimente mit *LINC02502* wurde die Transfektion der Plasmide pBI-CMV2 (mit Fluoreszenzsignal) und pcDNA3.1(+) in HAoSMC mittels Elektroporation (Amaxa® Human AoSMC Nucleofector® Kit (Lonza)) durchgeführt. Das pBI-CMV2 Plasmid wurde für die durchflusszytometrischen Experimente und das pcDNA3.1(+) Plasmid für die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) genutzt. Die siRNA für die Herunterregulation von *LINC02502* wurde mittels dem Invitrogen™ Lipofectamin® RNAiMAX™ Kit (Thermo Fisher Scientific) in HAoSMCs und das Plasmid pGL4.10[*luc2*] mittels FuGENE® HD (Promega) in HEK293 Zellen transfiziert.

4.10.1 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden die HAoSMCs wie in Kapitel 4.9.1 beschrieben von der Well-Platte gelöst und mittels der Neubauerzählkammer gezählt. Aus der Zellsuspension wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen für jede Reaktion entnommen. Die Zellen wurden für 10 min bei $200 \times g$ in einem 50 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert, der Überstand vorsichtig verworfen und dann in 100 µl Nucleofactor Mix, bestehend aus 82 µl Nucleofactor Solution und 18 µl Supplement resuspendiert. Anschließend wurden 3 µg des gewünschten Plasmids zu jeder Reaktion hinzugefügt und die gesamte Suspension in eine Küvette überführt, die dem Kit beiliegte. Für die Elektroporation wurde das Programm U-025 des Nucleofector® Devices (Lonza) angewandt. Nach Beendigung des Programms wurden die Zellen umgehend mit 500 µl vorgewärmtem Medium in der Küvette gemischt und anschließend in eine 6-Well-Platte überführt, in der sie über Nacht in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml Medium bei $37\text{ °C} / 5\% \text{ CO}_2$ inkubiert wurden.

4.10.2 FuGENE® HD

Für den Dual-Luciferase-Assay wurden HEK293 Zellen mittels FuGENE® HD (Promega) transfiziert. Hierbei wurde eine Co-Transfektion mit zwei Plasmiden durchgeführt, zum einen mit pGL4.10[*luc2*], welches die rs7678555 Sequenz enthielt, bzw. dem leeren pGL4.10[*luc2*] Plasmid ohne SNP zur Kontrolle und pRL-TK als Co-Plasmid. Das pGL4.10[*luc2*] Plasmid exprimiert die *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle des bei der Klonierung eingefügten Promotors/SNPs. Das pRL-TK Plasmid exprimiert die *Renilla*-Luciferase, welche hier als interne Kontrolle der Normalisierung jeder Probe diente. Für jede Probe wurde 450 ng pGL4.10[*luc2*] mit bzw. ohne rs7678555 und 50 ng pRL-TK eingesetzt und der Transfektionsansatz wie nachfolgend beschrieben (Tabelle 44) vorbereitet. Anschließend wurde er für 15 min bei Raumtemperatur

inkubiert und dann vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden nach einer Inkubation von 72 h im Brutschrank (37 °C/ 5 % CO₂) geerntet und auf Luciferaseaktivität untersucht.

Tabelle 44 Transfektionsansatz für den Dual-Luciferase-Assay mit FuGENE® HD
(24-Well-Platte)

Reagenzien	Volumen
pGL4.10[<i>luc2</i>] mit rs7678555 (450 ng)	Variabel
pRL-TK (50 ng)	Variabel
FuGENE ® HD	2 µl
OptiMEM™	ad 50 µl

4.10.3 Invitrogen™ Lipofectamin® RNAiMAX™

Für die Herunterregulation von *LINC02502* und *PDE5A* wurde siRNA mittels des Invitrogen™ Lipofectamin® RNAiMAX™ Transfektionsreagenz in humane aortale glatte Muskelzellen transfiziert.

Zunächst wurde die siRNA, die als 100 µM Stocklösung vorlag, für jeden einzelnen Versuch mit DNase/RNase freiem Wasser im Verhältnis 1:10 auf 10 µM verdünnt. Der Reaktionsansatz wurde wie in Tabelle 45 beschrieben vorbereitet und nach der vollständigen Zusammenführung beider Teilansätze für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf die Zellen gegeben, die vorher in einer 24-Well-Platte ausgesät wurden. Am Ende wurden die Zellen für die gewünschte Zeit (24 h, 48 h oder 72 h) im Brutschrank (37 °C/ 5 % CO₂) inkubiert und dann für fortführende Untersuchungen geerntet.

Zur Kontrolle wurde anstelle der Target-siRNA eine sogenannte *scambled* siRNA (*Ambion Silencer® select negativ control not. 1 siRNA* (Thermo Fisher Scientific)) eingesetzt, die aus einer Nonsensesequenz bestand.

Tabelle 45 Ansatz für die Transfektion mit Lipofectamin® RNAiMAX™

	Reagenzien	Volumen
Ansatz 1	OptiMEM™	25 µl
	Lipofectamin® RNAiMAX™	1,5 µl
Ansatz 2	OptiMEM™	25 µl
	siRNA (10 µM)	0,5 µl

4.10.4 FACS-Sorting transfizierter Zellen von untransfizierten Zellen

Um untransfizierte Zellen von transfizierten Zellen zu trennen, wurde die *Fluorescence-activated cell sorting*, Durchflusszytometrie (FACS) Methode angewandt. Mithilfe des pBI-CMV2 Vektors wird nicht nur die gewünschte cDNA exprimiert, sondern auch das AcGFP1-Gen, welches für GFP kodiert. Dadurch lassen sich transfizierte Zellen optisch von untransfizierten Zellen unterscheiden und können so einfach mittels FACS sortiert werden.

Geerntete Zellen wurden für 30 s bei 8.000 x G pelletiert, anschließend in 200 ml FACS-Puffer resuspendiert und in 2 ml Reaktionsgefäße übertragen. Pro Probe wurden zwei 2 ml Reaktionsgefäße mit 500 µl Ambion™ TRIzol® vorbereitet. Die Proben wurden auf Eis gelagert und zum Institute for Cardiovascular Prevention (IPEK) transportiert. Dort wurden die Proben direkt in Ambion™ TRIzol® gesortet und sofort auf Trockeneis gelagert. Zuletzt wurde die RNA wie in Kapitel 4.12.2 beschrieben isoliert.

4.11 Stimulation

Humane aortale glatte Muskelzellen wurden mit oxidiertem LDL und humanem Interleukin-1β stimuliert, um das Expressionsverhalten und die intrazelluläre Lokalisation von *LINC02502* im Nukleus und im Zytoplasma unter Entzündungskonditionen zu untersuchen.

4.11.1 Stimulation der HAoSMC mit oxidiertem LDL

Die Stimulation der HAoSMC mit oxidiertem LDL wurde in 12-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurde oxidiertes LDL mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml benutzt (Tabelle 46). Da das oxidierte LDL in 0,3 mM EDTA in PBS (pH 7,4) gelöst vorlag, wurde als Negativkontrolle eine steril filtrierte Lösung mit 0,3 mM EDTA in PBS (pH 7,4) verwendet. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert (Kapitel 0) und die Genexpression (Kapitel 4.2) untersucht.

Tabelle 46 Stimationsansatz der HAoSMC mit oxidiertem LDL

Reagenzien	Volumen für Wells einer 12-Well-Platte
Oxidiertes LDL 1 mg/ml	50 µl
Medium	950 µl

4.11.2 Stimulation der HAoSMC mit Interleukin-1β

Die Stimulation der HAoSMC mit humanem Interleukin-1β (hIL-1β) wurde in 12-Well-Platten und mit einer Endkonzentration von 25 ng/ml durchgeführt. Zunächst wurden 5 µg hIL-1β in

200 µl PBS mit 0,1 % BSA in steriler Umgebung gelöst. Anschließend wurden die Zellen mit folgendem Ansatz (Tabelle 47) stimuliert. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mit 2 µl PBS mit 0,1 % BSA mitgeführt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, die RNA isoliert (Kapitel 0) und die Genexpression (Kapitel 4.2) untersucht.

Tabelle 47 Stimationsansatz der HAoSMC mit humanem Interleukin-1β

Reagenzien	Volumen für Wells einer 12-Well-Platte
HIL-1β 25 µg/ml	1 µl
Medium	999 µl

4.12 RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurde je nach Vor- und Folgeexperiment eine andere Methode gewählt.

Um die Genexpression nach Herunterregulation von *LINC02502* und *PDE5A* zu untersuchen, wurde die RNA mithilfe des RNeasy® Plus Mini Kits in Verbindung mit den QIAshredder™ Spin columns (beides Qiagen) isoliert.

Um die Genexpression nach Überexpression von *LINC02502* zu untersuchen, wurde die RNA mithilfe von Ambion™ TRIzol® isoliert.

Bevor die RNA für die Analyse der *LINC02502* Expression im Zytoplasma und Nukleus glatter Muskelzellen isoliert wurde, wurden die Nuklei und das Zytoplasma der Zellen mit einem Protokoll für Nukleus-/ Zytoplasma-Fraktionierung (Kapitel 4.12.3) getrennt. Anschließend wurde die RNA-Extraktion ebenfalls mit Ambion™ TRIzol® durchgeführt.

4.12.1 RNeasy® Plus Mini Kit

Die RNA-Extraktion mittels des RNeasy® Plus Mini Kits wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen, die vorher in 24-Well-Platten kultiviert und behandelt wurden, auf Eis mit 500 µl kaltem Dulbecco PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurden sie mit 350 µl Lysepuffer bei -80 °C für 3 h gefroren. Nach dem Wiederauftauen auf Eis wurden die lysierten Zellen aus dem Well geschabt und in die QIAshredder™ Spin Columns überführt. Der Durchfluss wurde nach einer 3-minütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit auf die gDNA Eliminator Columns aufgetragen und erneut für 30 s bei 8.000 x g zentrifugiert. Dann wurden 350 µl 70 % Ethanol zum Durchfluss pipettiert und zusammen auf eine RNeasy Spin Column übertragen. Das Reaktionsgefäß wurde vor den Waschsritten für 30 s bei 8.000 x g zentrifugiert. Der erste Waschschrift mit 700 µl Puffer RW1 wurde für 30

s bei 8.000 x g zentrifugiert. Darauf folgten zwei Schritte mit jeweils 500 µl Puffer RPE. Beim ersten wurde für 30 s und beim zweiten Schritt für 2 min bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde dabei vorsichtig verworfen.

Die Säule wurde erneut zum Trocknen für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und in ein neues steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Am Ende wurde mit 20 µl DNase/RNase freiem Wasser für 1 min bei 8.000 x g eluiert. Die RNA-Konzentration wurde gemessen (Kapitel 4.14) und dann bei -80 °C gelagert.

4.12.2 Ambion™ TRIzol®

Alle Arbeitsschritte mit Ambion™ TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) wurden unter einem Abzug durchgeführt.

Die Zellen, die vorher in 24-Well-Platten kultiviert und behandelt wurden, wurden mit je 500 µl pro Well kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde je 500 µl TRIzol® auf jedes Well gegeben und die Zellen für mindestens 3 h bei -80 °C eingefroren.

Anschließend wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Die Proben aus den Well-Platten wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zu jeder Probe wurden 120 µl RNase-freies Wasser und 100 µl Chloroform hinzugegeben und die Reaktionsgefäße wurden mehrfach invertiert. Danach wurde sie 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden Phase-Lock Tubes (5 PRIME GmbH) für 30 s bei 7.500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Proben wurden durch Pipettieren gemischt und in die Phase-Lock Tubes überführt, die daraufhin zum Mischen invertiert wurden. Die Proben wurden für 10 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase (380 µl) in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert. Zu jeder Probe wurden dann 280 µl eiskaltes Isopropanol (100 % v/v) und 1,5 µl Invitrogen™ GlycoBlue™ Coprecipitant (Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt und für 1 h bei -20°C inkubiert. Durch Zugabe des Invitrogen™ GlycoBlue™ Coprecipitant wurde die RNA nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C als blaues Pellet sichtbar. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, gefolgt von 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C. Nach vollständigem Trocknen des RNA-Pellets wurde die RNA in 12 µl RNase/DNase-freiem Wasser gelöst. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Durch die Zugabe des Invitrogen™ GlycoBlue™ Coprecipitant wurde die RNA nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C als blaues Pellet sichtbar.

Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet zweimal mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, gefolgt von 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C. Nach vollständigem

Trocknen des RNA-Pellets wurde die RNA in 12 µl RNase/DNase-freiem Wasser gelöst. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

4.12.3 Nukleus/ Zytoplasma-Fraktionierung und RNA-Isolierung mit Ambion™ TRIzol®

Um die intrazelluläre Lokalisation von *LINC02502* unter verschiedenen Konditionen zu untersuchen, wurden mit oxidiertem LDL und humanem Interleukin-1β (Kapitel 4.11) stimulierte oder unstimulierte HAoSMCs nach Nukleus und Zytoplasma getrennt. Dafür wurden die behandelten/unbehandelten HAoSMC, die vorher in 12-Well-Platten ausgesät wurden, mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA (0,04 % / 0,03 %) für 5 min bei 37 °C aus den Wells gelöst. Die Aktivität des Trypsins wurde mit 1 ml TNS gestoppt und die gelösten Zellen wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 10 min bei 4 °C und 1.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 200 µl Lysepuffer A und 10 µl RNase Inhibitor re-suspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und erneut für 3 min bei 4 °C bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, der die Zytoplasma-Fraktion enthielt, wurde mit 700 µl Ambion™ TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert.

Das Pellet wurde dann zweimal mit Lysepuffer A und einmal mit Lysepuffer B gewaschen. Nach dem ersten Waschschrift folgte erst eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C bei 1.000 rpm und dann zwei Zentrifugationen für 3 min bei 4 °C bei 1.000 rpm. Das Pellet, die Nukleus-Fraktion wurde mit 200 µl PBS, 10 µl RNase Inhibitor und 700 µl Ambion™ TRIzol® re-suspendiert.

Beide Proben wurden bei -80 °C gelagert. In einem auf 40 °C vorgewärmten Wasserbad wurden die Proben schwenkend aufgetaut und die RNA wie in Kapitel 4.12.2 beschrieben extrahiert. Da bei diesem Ansatz nun jeweils 910 µl Gesamtvolumen vorlagen, wurde das Protokoll angepasst. Es wurden jeweils 600 µl Chlorophorm und kein Wasser hinzugefügt. Dann wurde die RNA in 500 µl eiskaltem Isopropanol und 2 µl Invitrogen™ GlycoBlue™ Coprecipitant ausgefällt. Die Zentrifugationsschritte sowie das Waschen und die Resuspendierung der RNA wurden wie in Kapitel 4.12.2 durchgeführt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

4.13 DNase I Verdau

Im Falle der Ambion™ TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) Extraktion wurde die isolierte RNA vor der cDNA-Synthese mit DNase I (Thermo Fisher Scientific) behandelt, um genomische DNA zu beseitigen. DNase I wurde wie in Tabelle 48 hinzugefügt. Die Reaktion inkubierte für 30 min bei 37 °C und wurde mit 1 µl von einer 50 mM EDTA-Lösung für 10 min bei 65 °C gestoppt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

Tabelle 48 Pipettierschema für den DNase I Verdau

Reagenzien	Volumen
RNA (bis zu 1 µg)	Variabel
10X DNase I Reaction Buffer	1 µl
DNase I, (1U/µl)	1 µl
DNase/RNase-freies Wasser	ad 10 µl

4.14 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mithilfe des Infinite® M200 PRO Plattenlesegeräts unter Verwendung der Software iControl v1.10 gemessen (beides Tecan Group). Für jede Messung wurden 2 µl unverdünnte DNA oder RNA auf die NanoQuant Plate™ (Tecan) aufgetragen und gemessen. Durch die Messung des Absorptionsverhaltens der Probe bei 260 nm und 280 nm, kann die DNA- oder RNA-Qualität bezüglich Verunreinigungen abgeschätzt werden. Bei reiner DNA bzw. RNA liegt das Verhältnis A260/A280 bei 1,8 bzw. 2,1.

4.15 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Zur Lokalisation der lncRNA *LINC02502* in aortalen glatten Muskelzellen wurde die Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung (FISH) Methode angewandt. Hierbei wird intrazelluläre lncRNA mit einer 6' Fluorescein (6'FAM) markierten Sonde hybridisiert. Der zusätzliche Einsatz von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) hilft, den Nukleus der Zelle kenntlich zu machen und die Bestimmung der lncRNA Lokalisation zu erleichtern.

Vor jedem Experiment wurde der Hybridisierungspuffer frisch hergestellt. Die Sonden für die Detektion von *LINC02502* und die Kontroll-Sonde wurden DNase/ RNase-freiem Wasser gelöst, um eine 20 µM Stocklösung zu erhalten. Anschließend wurde diese 1:1000 mit dem Hybridisierungspuffer zu einer 20 nM Arbeitslösung verdünnt.

Zunächst wurde jeweils ein Glasplättchen pro Well einer 24-Well-Platte gelegt. Anschließend wurden $1,0 \cdot 10^5$ Zellen in 0,5 ml Medium pro Well ausgesät. Um die Expression der lncRNA zu steigern, wurden die Zellen zuvor mittels Elektroporation mit *LINC02502* (im pcDNA3.1(+) Plasmid) transfiziert (Kapitel 4.10.1). Nach 48 h Inkubation bei 37 °C/ 5 % CO₂ wurden die Zellen fixiert. Für die Fixierung wurde das Medium verworfen und die Zellen einmal mit 0,5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min mit 0,5 ml Fixierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte für jeweils 5 min mit 0,5 ml PBS. Dann wurde 0,3 ml 0,1 % Pepsin in 10 mM HCl zu den Zellen hinzugefügt und für 60 s bei 37 °C auf einer Wärmeplatte inkubiert. Danach wurde erneut zweimal mit 0,5 ml DNase/ RNase-

freiem Wasser gewaschen. Um das Wasser vollständig zu entfernen, folgten drei Dehydrierungsschritte mit 0,5 ml Ethanol in steigender Konzentration (70 %-, 90 %- und 100 % -Ethanol). Nach vollständigem Trocknen wurden 20 µl der vorverdünnten Sonde (20 nM Arbeitslösung) auf einen Objektträger gegeben. Das Glasplättchen wurde aus der 24-Well-Platte entnommen und mit den fixierten Zellen Richtung Objektträger gelegt. Dann wurden die Nukleinsäuren der Zellen bei 85 °C für 75 s denaturiert. Anschließend wurde der Objektträger bei einer Sonden-spezifischen Temperatur (Tabelle 49) für 30 min inkubiert, um die Sonde mit den zuvor denaturierten Nukleinsäuren zu hybridisieren.

Um das Glasplättchen von dem Objektträger zu lösen, wurde der Objektträger zweimal mit 0,3 ml 0,1 % Tween® 20 in 2X SSC gewaschen. Anschließend wurde das Glasplättchen dreimal mit 0,3 ml 0,1X SSC bei 64 °C für 5 min gespült und mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %-, 90 %- und 100 %-Ethanol) dehydriert. Nach vollständigem Trocknen wurde das Glasplättchen mit den fixierten Zellen Richtung Objektträger, auf dem 20 µl DAPI vorgelegt wurden, gelegt. Nach 24 h bei 4 °C wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Alle genannten Puffer sind in Kapitel 3.2.4 beschrieben.

Tabelle 49 Eigenschaften der FISH-Sonden und von DAPI

Sonde	Hersteller	Absorptionsmax.	Emissionsmaxi.	Hybridisierungstemp.
LINC02502 + 6' FAM	Qiagen	495 nm	520 nm	54 °C
Kontrolle + 6' FAM	Qiagen	495 nm	520 nm	57 °C
Beta-Aktin + 6' FAM	Qiagen	495 nm	520 nm	55 °C
DAPI	SouthernBiotech	358 nm	461 nm	Raumtemperatur

4.16 Luciferase-Reportergen-System

Mithilfe des Luciferase-Reportergen-System können Unterschiede in der Promotoraktivität, welcher z.B. durch Basenaustausch verursacht wurde, gemessen werden (Grentzmann et al., 1998). Dabei entspricht die regulatorische Aktivität des Promotors der messbaren Luciferaseaktivität, da die Luciferase erst durch die Anwesenheit eines vorgeschalteten Promotors (hier, die zu untersuchende Gensequenz) exprimiert werden kann.

Dazu wurde hier das Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega Corporation) genutzt. Zur Untersuchung der gewünschten Gensequenz 231 bp um den SNP rs7678555 mit dem A- bzw. C-Allel, wurde diese (jeweils der Plus- und der Minusstrang) in die vorgegebene

multiple cloning site des Reportergenplasmid pGL4.10[*luc2*] upstream des *Firefly*-Luciferase Gens kloniert (Kapitel 4.5.1). Diese Reportergenkonstrukte wurden jeweils mit dem pRL-TK Plasmid, welches die Gensequenz für einen Minimalpromotor und die Renilla-Luciferase enthielt, in HEK293 Zellen co-transfiziert (Kapitel 4.10.2). Die Aktivität der Renilla-Luciferase, die in allen Zellen gleich sein sollte, diente der Normalisierung der Werte. Nach der Transfektion und einer Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C/ 5 % CO₂, wurden die co-transfizierten HEK293 Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend in je 50 µl 1X Passive Lysis Buffer lysiert, indem sie bei -80 °C für 4 h eingefroren und auf Eis wieder aufgetaut wurden. Es wurde 20 µl des Zelllysats in ein Well auf einer weißen 96-Wellplatte übertragen. Parallel wurden die LARII- und Stop&Glo®-Puffer nach Herstelleranweisungen vorbereitet. Die Platte mit den Proben wurden anschließend in das Infinite® M200 PRO Plattenlesegerät gegeben, welches zusammen mit der Software iControl v1.10 (beides Tecan Group) zur Messung genutzt wurde. Mithilfe der Injektoren des Plattenlesegeräts wurden pro Well 100 µl LARII injiziert und nach einer Wartezeit von 2 s für 10 s die Lumineszenz der *Firefly*-Luciferase gemessen. Die Aktivität der *Firefly*-Luciferase wurde dann mit einer Injektion von 100 µl Stop&Glo® Reagenz gestoppt. Nach einer weiteren Wartezeit von 2 s wurde 10 s lang die Lumineszenz der *Renilla*-Luciferase gemessen.

Das Ergebnis wurde als Verhältnis der Lumineszenz-Aktivität (Light Units) der *Firefly*-Luciferase und *Renilla*-Luciferase dargestellt. Die gemessenen Werte wurden zudem korrigiert, indem der Lumineszenzwert für untransfizierte Zellen in Passive Lysis Buffer von ihnen abgezogen wurde.

4.17 Electrophoretic Mobility Shift Assay

Zur Untersuchung etwaiger Proteinbindung an die DNA-Sequenz des SNPs rs7678555, wurde ein *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) verwendet. Dabei wird der zu untersuchende DNA-Abschnitt mit Proteinen inkubiert. Bindet ein Protein an die DNA, kommt es zu einer Protein-DNA-Komplexbildung, die sich nach Auftrennung der Probe in einem Agarosegel durch einen Größen-Shift von ungebundener DNA unterscheiden lässt (Fried & Crothers, 1981; Garner & Revzin, 1981). Die Migration von DNA-Protein-Komplexen in nicht-denaturierenden Gelen ist unabhängig von der Molekularmasse und abhängig von der Nettoladungsdichte und dem hydrodynamischen Volumen.

4.17.1 Nukleärer Extrakt

Nukleäre Extrakte wurden mithilfe des NE-PER™ nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo Fisher Scientific) aus jeweils $1 \cdot 10^7$ HAoSMC extrahiert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Trypsinierte Zellen wurden pelletiert (Kapitel 4.9), anschließend in 2 ml

Thermo Scientific™ BupH™ PBS resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C für 2 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen mit 1 ml eiskaltem CER I Puffer, der 1:100 mit 100X Thermo Scientific™ Halt™ protease inhibitor cocktail (EDTA-free) supplementiert wurde, lysiert. Dann wurde die Probe mit einem Vortexmischer gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 55 µl eiskalter CER II Puffer hinzugefügt, 5 s gemischt und 1 min auf Eis gestellt. Die Probe wurde dann erneut 5 s auf dem Vortexmischer gemischt und für 5 Min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand, der den zytoplasmatischen Extrakt enthielt, wurde verworfen.

Die im Pellet enthaltenen Zellkerne wurden in 500 µl eiskaltem NER-Puffer resuspendiert, welcher zuvor 1:100 mit 100X Thermo Scientific™ Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (EDTA-free) supplementiert wurde. Die Zellkern-Puffersuspension wurde 15 s mithilfe des Vortexmischers gemischt und dann 40 min auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Probe laufend im Abstand von 10 Min erneut vermischt. Am Ende wurde die Probe für 10 min bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand, der aus dem nukleären Extrakt bestand, wurde abpipettiert, in ein vorgekühltes, steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert.

4.17.2 3' Biotinylierung der Oligonukleotide

Die im EMSA eingesetzten Oligonukleotide (O) wurden am 3'-Ende biotinyliert. Dies wurde mithilfe des Thermo Scientific™ Pierce™ 3' End Biotin Labeling Kits (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Hierzu wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Die dafür benötigten Reagenzien wurden wie in Tabelle 50 beschrieben zusammengegeben. Die Reaktion inkubierte für 30 min bei 37 °C im Thermomixer, anschließend wurde sie durch die Zugabe von 1 µl 0,5 M Gibco™ EDTA (Thermo Fisher Scientific) gestoppt. Der Reaktion wurde anschließend 50 µl Chlorophorm:Isoamyl Alkohol (24:1, Sigma Aldrich) hinzugefügt, kurz gemischt und dann für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* (TdT) auszufällen. Die wässrige Phase enthielt in einer Konzentration von 100 nM die markierten Oligonukleotide. Sie wurde in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Tabelle 50 Ansatz für eine 3' Biotin-Markierungs-Reaktion

Reagenzien	Volumen für ein 1,5 ml Reaktionsgefäß
5X TdT reaction buffer	10 µl
1 µM Vorwärts- bzw. Rückwärts- Oligonukleotid	5 µl
5 µM biotin-11-UTP	5 µl
TdT (1,5 U/µl)	5 µl
DNase/RNase-freies Wasser	25 µl

Die biotinylierten Oligonukleotide wurden anschließend dimerisiert. Dazu wurden Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotide in gleichen Anteilen in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Oligonukleotid-Endkonzentration von 50 nM zu erreichen. Für die Experimente wurden die dimerisierten Oligonukleotide weiter mit DNase/RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:5 auf eine Konzentration von 10 nM verdünnt. Zur Kontrolle wurden nicht-biotinylierte Oligonukleotide genutzt. Diese (100 µM Stocklösungen) wurden mit DNase/RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:100 auf eine Endkonzentration von 1 µM verdünnt. Auch hier wurden die Vorwärts- und Rückwärts-Oligonukleotide in gleichen Anteilen zur Dimerisierung in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lagerung der Oligonukleotide erfolgte bei -20 °C.

4.17.3 EMSA

Für den EMSA wurden die Ansätze, wie in 0 beschrieben, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Zur Kontrolle wurde anstelle von nukleärem Extrakt Wasser zugegeben (Kapitel 4.17.1). Beide Ansätze wurden mit jeweils den dimerisierten biotinylierten Oligonukleotiden für das jeweilige SNP Allel (Allel A, Allel C: 0) bzw. den dimerisierten Kontroll-Oligonukleotiden (0) gemischt.

Vor jedem Experiment wurde dem Bindepuffer 0,1 M DTT (Thermo Fisher Scientific) im Verhältnis 1:100 hinzugefügt. Die Reaktionsansätze inkubierten 15 min bei 30 °C in einem Thermoschüttler. Anschließend wurde 5 µl 1X Novex™ Hi-Density TBE Sample Puffer (Thermo Fisher Scientific) zu jeder Probe hinzugefügt und diese dann auf ein 4 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde zuvor ungeladen in eine Elektrophoresekammer gespannt, die mit 0,5X TBE Puffer gefüllt war. Die Elektrophoresekammer wurde anschließend für 1 h auf 100 V gestellt. So wurden Ionen aus dem Gel entfernt, die die Integrität von instabilen DNA-Protein-Komplexen stören könnten. Die

Proben wurden dann in dem Gel für 50 min, bis die Loading Dye $\frac{3}{4}$ des Gels durchwandert hatte, bei 100 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf einen Blot transferiert und visualisiert (Kapitel 4.17.4).

Tabelle 51 EMSA Reaktionsansätze

Reagenzien	Reaktionen	
	Ohne Extrakt	Mit Extrakt
Bindepuffer (inklusive DTT)	15 μ l	15 μ l
BSA (1 μ g / μ l)	1 μ l	1 μ l
Poly dA/dT	1 μ l	1 μ l
1 % NP-40,	1 μ l	1 μ l
Nukleärer HAoSMC Extrakt	–	2 μ l
DNase/RNase-freies Wasser	2 μ l	–
10 nM biotinyliertes bzw. Kontroll-Oligonukleotid	1 μ l	1 μ l

4.17.4 Blotten

Für das Blotten wurde die Thermo Scientific™ Biotinylated B nylon Membran (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Membran wurde durch eine 10-minütige Inkubation in 0,5X TBE Puffer aktiviert. Das Gel wurde anschließend für 45 min bei 380 mA in eiskaltem 0,5X TBE Puffer auf die Membran geblottet und die darauf enthaltene DNA und Proteine danach vernetzt, indem der Blot mit der Oberseite nach unten in das ImageQuant™ LAS4000 biomolecular (GE Healthcare Lifescience) Gerät gelegt wurde und für 15 min durch eine UV-Lichtquelle (312 nm Glühbirne) bestrahlt wurde. Anschließend wurde die Membran in 20 ml Blocking Puffer für 15 min bei 30 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Als nächstes wurde sie in 16 ml Blocking Puffer mit 50 μ l Stabilised Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate für 15 min bei 30 rpm inkubiert. Der Blot wurde kurz mit 1X Wash Puffer (in Milipore® Wasser) gespült und danach viermal für jeweils 5 min in 20 ml 1X Wash Puffer gewaschen. Dann wurde der Blot für 5 min in 30 ml Equilibration Puffer gegeben, bevor er in 3 ml Luminol/Enhancer Solution und 3 ml Stable Peroxid Solution für 7 min inkubiert wurde. Anschließend wurde er im ImageQuant™ LAS 4000 Biomolecular Imager mit der Software ImageQuant™ LAS 4000 v1.2 (beides GE Healthcare Life Science) ausgewertet.

4.18 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse wurde die Software GraphPad Prism® für Mac OS X verwendet. Bei den Versuchen wurden mindestens drei biologische unabhängige Replikate mit jeweils mehreren technischen Replikaten eingesetzt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte der biologischen Replikate mit dem Standardfehler angegeben. Ergebnisse mit einem p-Wert von $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Bei Versuchen, bei denen die relative Veränderung im Vergleich zur Kontrolle berechnet wurde, wurden die Werte der Untersuchungsbedingung zu der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Zwei verschiedene Bedingungen wurden mithilfe des Einstichproben-T-Test miteinander verglichen. Bei mehr als zwei verschiedene Bedingungen wurde die einfache Varianzanalyse (*one-way analysis of variance; ANOVA*) gefolgt von dem Šidák -Test eingesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 KHK-Risikolocus auf Chromosom 4q27

Die Risikovariante rs7678555 liegt zwischen den Genen *PDE5A* (Distanz ca. 336 kb) und *MAD2L1* (Distanz ca. 67 kb) auf Chromosom 4q27. Zwischen beiden Genen sind ferner mehrere hypothetische Transkripte und ncRNAs, als nächste die nicht-kodierende RNA *LINC02502* (blau) mit ca. 24 kb Distanz zu rs7678555, annotiert (Abbildung 10).

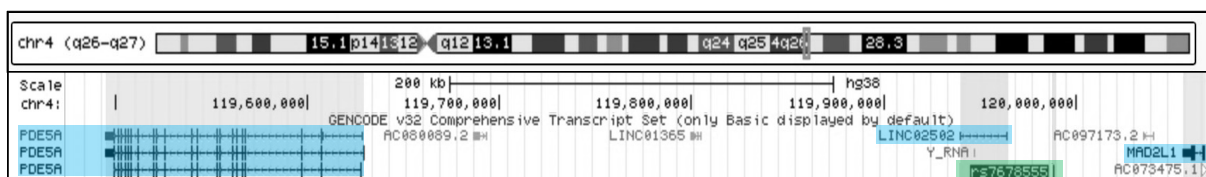


Abbildung 10 Schema des KHK-Risikolocus auf Chromosom 4q27. Die Gene und der SNP wurden mithilfe der Gencode-Daten des UCSC Genome Browsers (Kent et al., 2002 <http://genome.ucsc.edu>, Zugriffsdatum 10.12.2020) *in silico* analysiert. Die Gene und der SNP sind auf dem Chromosom 4q27 lokalisiert. *PDE5A*, *LINC02502* und *MAD2L1* sind blau markiert. rs7678555 ist grün markiert.

5.2 Untersuchung von *LINC02502*

Der Mechanismus, über den die Variante rs7678555 die *PDE5A*-Expression beeinflusst, ist bislang unklar. Bei der *in silico* Analyse der Umgebung von rs7678555 und *PDE5A* wurde die ncRNA *LINC02502* identifiziert. In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, welche Eigenschaften *LINC02502* besitzt und ob sie eine Rolle bei der *PDE5A*-Expression spielen könnte.

5.2.1 Datenrecherche über die langen, nicht-kodierenden RNA *LINC02502*

Die RNA *Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 2502*, *LINC02502* ist auf Chromosom 4q27 zwischen dem *PDE5A*-Gen und der bekannten KHK-Risikovariante rs7678555 annotiert. *LINC02502* ist 31.840 bp lang und zählt somit zu der Gruppe der langen ncRNAs. Die Datenrecherche erwies, dass diese neue lncRNA bisher kaum untersucht wurde. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100996694>, Zugriffsdatum 22.10.2020) Eine *in silico* Analyse von Sequenzierungsdaten zeigte, dass *LINC02502* hauptsächlich im Herzen exprimiert wird. Die Analyse wurde mithilfe der RNA-Sequenzierungsdaten aus drei Studien durchgeführt. (Cabili et al., 2011; Duff et al., 2015; Fagerberg et al., 2014)

In der Studie *PRJEB4337* (Fagerberg et al., 2014) wurden Transkriptomanalysen in Gewebeproben von 95 menschlichen Individuen bzw. 27 verschiedenen Geweben durchgeführt. Es wurden zwischen zwei bis sieben Proben pro Gewebe sequenziert. In 10 von 27 Geweben konnte die Expression von *LINC02502* gemessen werden.

In der Studie *PRJEB2445* (Cabili et al., 2011) wurden 16 Gewebeproben sequenziert. Die Expression von *LINC02502* wurde hier nur im Herz-, Hoden-, Skelettmuskel- und Schilddrüsengewebe gemessen.

In der Studie *PRJNA280600* (Duff et al., 2015) wurde die RNA-Sequenzierung in 20 verschiedenen Geweben durchgeführt. In fünf Geweben wurde die Expression von *LINC02502* gemessen (Herz, Gehirn, Prostata, Skelettmuskel und Schilddrüse).

Die Werte sind in Abbildung 11 zusammengefasst. Bei allen drei Studien lagen die Werte von *LINC02502* nur im Herz- und Hodengewebe über 1 RPKM (*Reads per kilobase per million reads*) (Abbildung 11, A). In den Studien *PRJNA280600* und *PRJEB2445* wurde jeweils eine Probe des Herzgewebes und bei *PRJEB4337* wurden vier verschiedenen Proben des Herzgewebes sequenziert. Bei *PRJEB4337* lag der Mittelwert der Messungen von *LINC02502* bei 12,937 RPKM mit einer Standardabweichung von $\pm 6,157$ RPKM. In Abbildung 11 B sind die Gewebe von *LINC02502* < 1 RPKM dargestellt.

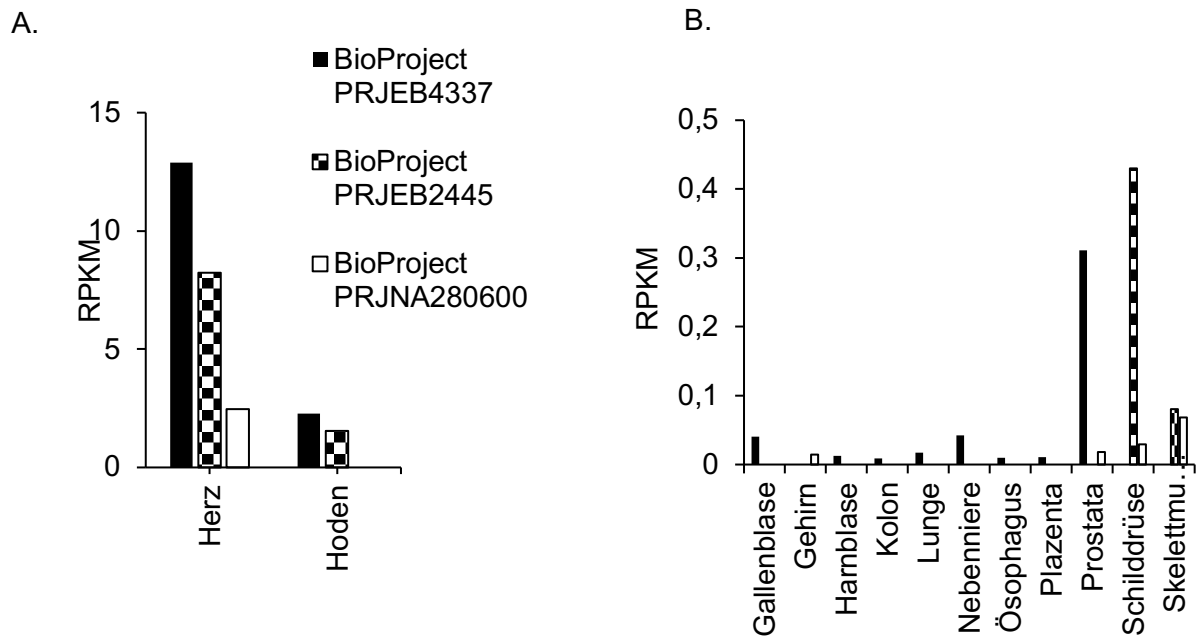


Abbildung 11 Expression von *LINC02502* in verschiedenen Geweben. Die *in silico* Analyse der drei Studien *PRJEB4337* (Fagerberg et al., 2014), *PRJEB2445* (Illumina BodyMap2 Transkriptom (Cabili et al., 2011)) und *PRJNA280600* (Duff et al., 2015) wird hier in zwei Diagrammen dargestellt. Die RNA-Sequenzierung von *LINC02502* in den unterschiedlichen Geweben wurde als RPKM (*reads per kilobase per million reads*) gemessen. In *PRJEB2445* und *PRJNA280600* wurden jeweils nur eine Probe pro Gewebe untersucht. In *PRJEB4337* wurden bis zu sieben verschiedenen Proben pro Gewebe gemessen. Im Diagramm wird nur der Durchschnittswert angegeben. (A) Das Diagramm zeigt die Gewebe, in denen *LINC02502* mit Werten > 1 RPKM gemessen wurde. (B) Das Diagramm zeigt die Gewebe mit Werten < 1 RPKM. In allen drei Studien wurde die höchste Expression von *LINC02502* im Herzgewebe gemessen. Die Daten wurden auf der Website des *National Center of Biotechnology Information* der U.S. *National Library of Medicine* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>, Zugriffsdatum 26.07.2020) bereitgestellt.

Durch die Nähe zu der KHK-Risikovariante rs7678555 und die spezifische Expression im Herzen wurde eine potenzielle Interaktion in dem NO-cGMP-Signalweg angenommen. In einem Vorexperiment wurde daher die Expression von *PDE5A* und *LINC02502* korreliert. Es wurde eine positive Korrelation detektiert ($R^2 = 0,3419$ $p = 0,017$; Abbildung 12).

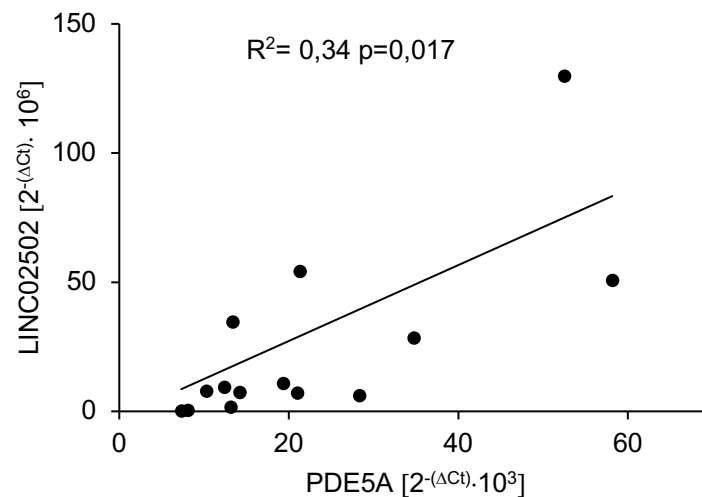


Abbildung 12 Korrelation zwischen *PDE5A* und *LINC02502*. In dieser Abbildung wird die Expression von *LINC02502* und *PDE5A* in 16 verschiedenen Proben gegenübergestellt. Es besteht lineare Regression ($p=0,017$; $R^2=0,3419$).

5.2.2 Expression von *LINC02502* in unterschiedlichen Zelllinien

PDE5A wird im kardiovaskulären System beispielsweise in glatten Gefäßmuskelzellen und Thrombozyten exprimiert. Um zu untersuchen, in welchen Zellen des kardiovaskulären Systems, mit Fokus auf den NO-cGMP-Signalweg, die lncRNA *LINC02502* eine Rolle spielt, wurde ihre Expression in verschiedenen Zelllinien untersucht.

LINC02502 wurde in humanen aortalen glatten Muskelzellen detektiert, jedoch weder in humanen koronar-arteriellen und aortalen Endothelzellen, humanen Megakaryoblasten (Meg-01) noch in humanen Thrombozyten (Abbildung 13).

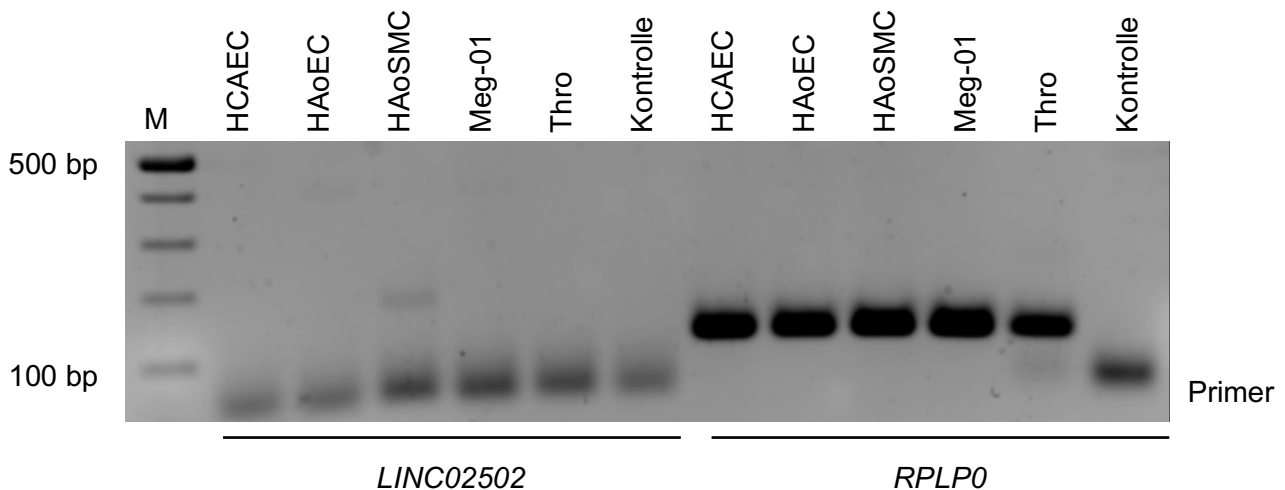


Abbildung 13 Detektion von *LINC02502* in humanen Zelllinien. Mittels semi-quantitativer PCR wurde das PCR-Produkt von *LINC02502* (184 bp) in den HAoSMCs detektiert. In den anderen Zelllinien wurde *LINC02502* nicht gefunden. hCAEC: humane koronar-arterielle Endothelzellen; HAoEC: humane aortale Endothelzellen; HAoSMC: humane aortale glatte Muskelzellen; Meg-1: humane Megakaryoblasten; Thro: Thrombozyten; RPLP0: *ribosomal protein lateral stal subunit P0*, dient mit einem 120-bp-großem PCR-Produkt als interne Kontrolle; M: Marker mit Standardgrößen.

5.2.3 Lokalisation von *LINC02502* innerhalb der Zelle

LncRNAs können in Abhängigkeit ihrer Lokalisation unterschiedliche Funktionen ausüben. Hierbei ist insbesondere von Bedeutung, ob LncRNAs sich im Zytosol oder im Zellkern befinden.

Die intrazelluläre Lokalisation von *LINC02502* in HAoSMCs wurde zunächst mit einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung untersucht. Um die Expression von *LINC02502* zu steigern und somit das Fluoreszenzsignal der 6'FAM-markierten Sonde von *LINC02502* zu verstärken, wurden *LINC02502* in HAoSMCs überexprimiert. Anschließend wurde eine Sonde mit *LINC02502* hybridisiert. Als interne Kontrolle wurde eine Sonde mit dem ubiquitär-vorkommenden beta-Aktin eingesetzt (Li et al., 2010). Zudem wurde eine Sonde, bestehend aus einer Nonsense-Sequenz, als Negativkontrolle eingesetzt. Das Fluoreszenzsignal der Sonden für *LINC02502* zeigte sich innerhalb des Zytoplasmas (Abbildung 14).

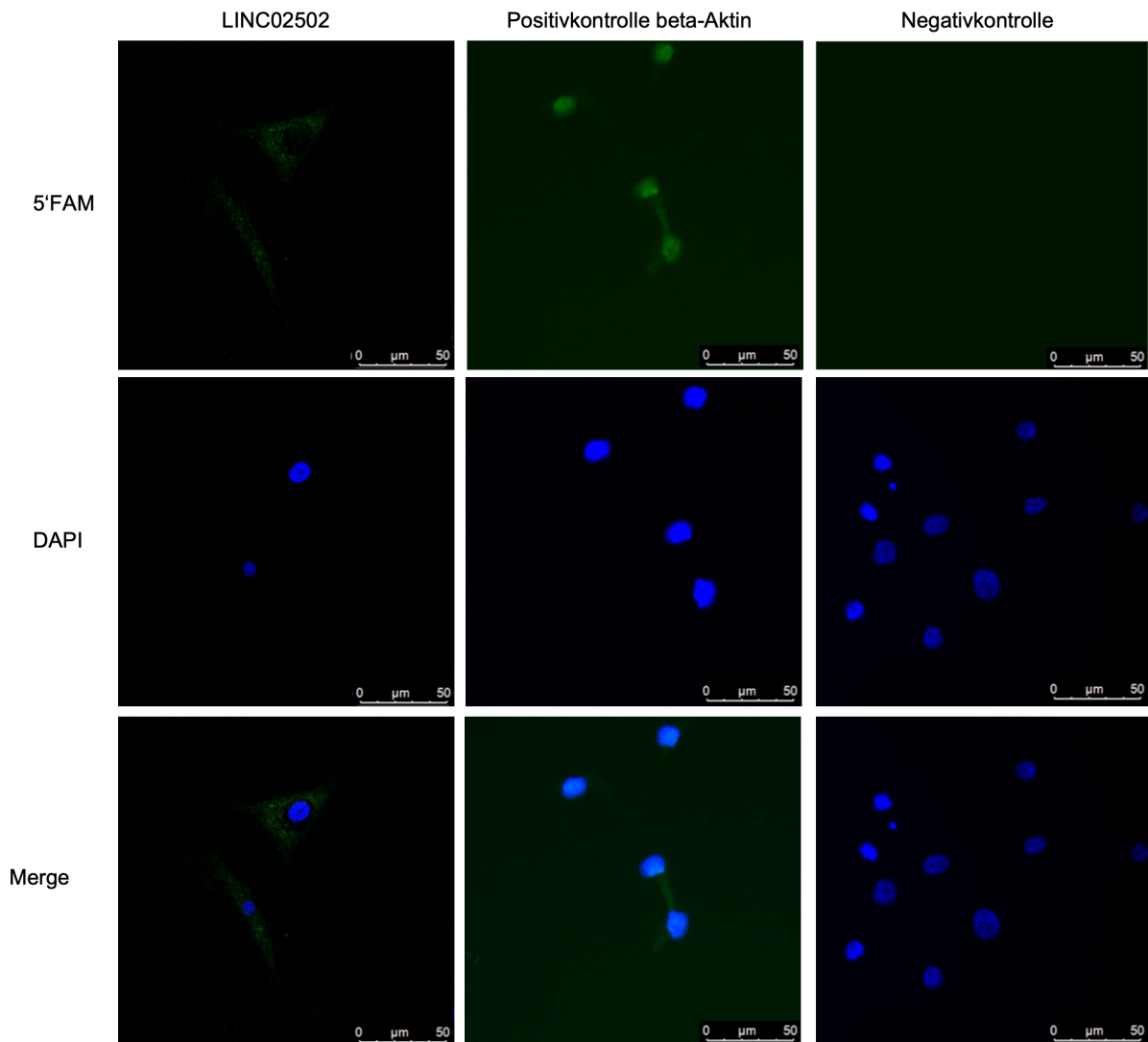


Abbildung 14 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von *LINC02502* in HAoSMCs. Die HAoSMCs (Passage 6) wurden mit pcDNA3.1 (+) mit *LINC02502* transfiziert, nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen Fluoreszenz-markierten Sonden hybridisiert und unter einem Konfokalmikroskop untersucht. Zusätzlich wurde eine interne Kontrolle mit beta-Aktin und eine Negativkontrolle durchgeführt. Es wurde (A) eine Aufnahme mit dem Absorptionsmaximum der 6'FAM-Sonde (Wellenlänge = 520 nm), (B) eine Aufnahme des Absorptionsmaximum von DAPI (Wellenlänge = 461 nm) und (C) deren Fusion aufgenommen. Das Signal von *LINC02502* wurde im Zytoplasma lokalisiert. Grün: 6'FAM-Sonde; Blau: mit DAPI-angefärbter Nukleus.

Als weitere, unabhängige Untersuchung der Lokalisation von *LINC02502* wurde eine quantitative PCR der nukleären und zytoplasmatischen Fraktion von HAoSMCs durchgeführt. Zwei Gene wurden zur Kontrolle der zytoplasmatischen und der nukleären Fraktion eingesetzt. *MALAT1* (*Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*) ist eine lncRNA, die im Nukleus zu finden ist (Hutchinson et al., 2007). *RPLP0* befindet sich nur im Zytoplasma (Hutchinson et al., 2007).

Um die Lokalisation der jeweiligen Gene darzustellen, wurden die qPCR-Daten der zytoplasmatischen zur nukleären Fraktion ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse bestätigen, dass *RPLP0* und *LINC02502* im Zytoplasma, *MALAT1* im Nukleus vorliegen (Abbildung 15).

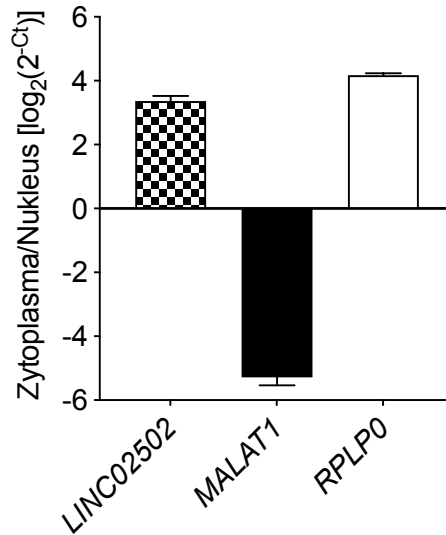


Abbildung 15 Lokalisation von *LINC02502* innerhalb von HAoSMCs. Die Ergebnisse der qPCR zeigen, dass *LINC02502* im Zytoplasma vorliegt. *RPLP0* diente als zytoplasmatische Kontrolle und *MALAT1* als nukleäre Kontrolle. Die Daten sind die Mittelwerte \pm SEM aus vier biologischen Replikaten (HAoSMC Passage 7).

5.2.4 Lokalisation von *LINC02502* in einem proatherogenen Milieu

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, inwieweit die Lokalisation von *LINC02502* durch ein proatherogenes Milieu verändert wird. Dazu wurden glatte Muskelzellen *in vitro* mit IL-1 β und oxLDL stimuliert (Guo et al., 2020; Li et al., 2015).

Nach Stimulation mit 50 μ g/ml oxidiertem LDL veränderte sich die Lokalisation von *LINC02502*, *MALAT1* und *RPLP0* innerhalb der HAoSMC nicht (Abbildung 16, A). Genauso wurden nach Stimulation mit 25 ng/ml humanem Interleukin-1 β *LINC02502* und *RPLP0* im Zytoplasma und *MALAT1* im Nukleus gemessen (Abbildung 16, B).

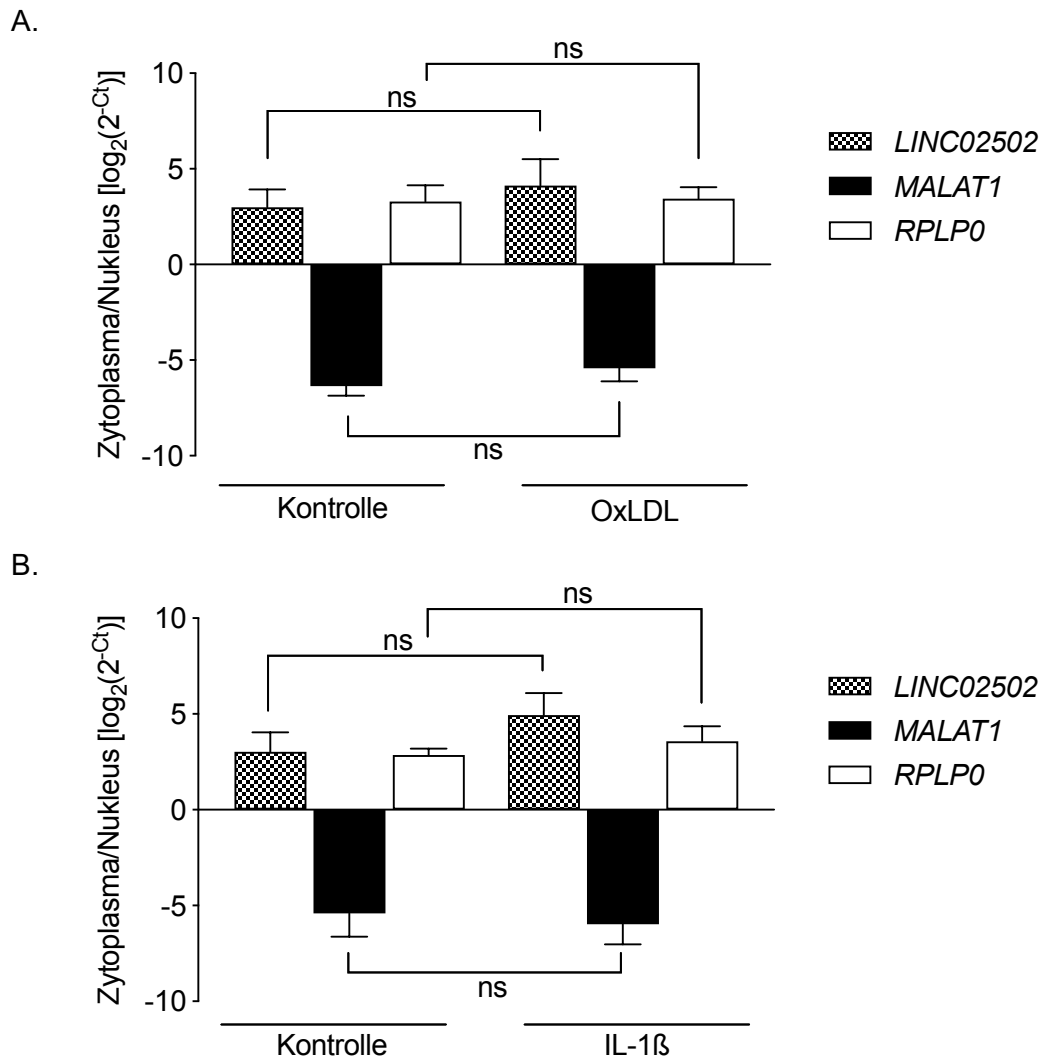


Abbildung 16 Lokalisation von *LINC02502* innerhalb der HAoSMC nach Stimulation. (A) Die HAoSMCs wurden mit 50 µg/ml oxidiertem LDL (oxLDL) stimuliert. Es zeigte sich zwischen den Bedingungen mit Stimulation und ohne Stimulation keine signifikante Veränderung (ns). Die Lokalisation der drei Transkripte blieb nach Stimulation mit oxLDL gleich. (B) Durch Stimulation mit 25 ng/ml humanem Interleukin-1β (IL-1β) veränderte sich die Lokalisation von *LINC02502*, *MALAT1* und *RPLP0* nicht. Hier zeigte sich zwischen den Bedingungen mit Stimulation und ohne Stimulation auch keine signifikante Veränderung (ns). Die HAoSMCs (Passage 3-7) mit oxLDL und mit IL-1β wurden nach 24 h nach Stimulation untersucht. Die Daten sind die Mittelwerte ± SEM aus 7 unabhängigen Experimenten und wurden mit einem Einstichproben-T-Test ausgewertet.

5.2.5 Struktur von *LINC02502*

Eine nicht-kodierende RNA kann sowohl zirkulär als auch linear vorliegen. Zur Untersuchung, ob *LINC02502* möglicherweise in zirkulärer Form vorliegt, wurde die Laufrichtung des Primerpaars, welches für die Detektion von *LINC02502* ausgewählt wurde, getauscht (Abbildung 17, A). Das Primerpaar liegt auf Exon-Exon-Grenzen von *LINC02502*, um so die Amplifikation von gDNA zu verhindern. Bei Vorliegen einer zirkulären RNA würde ein PCR-

Produkt entstehen. Im Gegensatz dazu, würde bei einer linearen RNA kein PCR-Produkt entstehen (Abbildung 17, B). Die Gelelektrophorese zeigte zwei Banden, die anschließend sequenziert wurden. Beide PCR-Produkte zeigten keine Übereinstimmung mit der Sequenz von *LINC02502*. Das Ergebnis schließt aus, dass *LINC02502* als zirkuläre Form vorliegt (Abbildung 17, C).

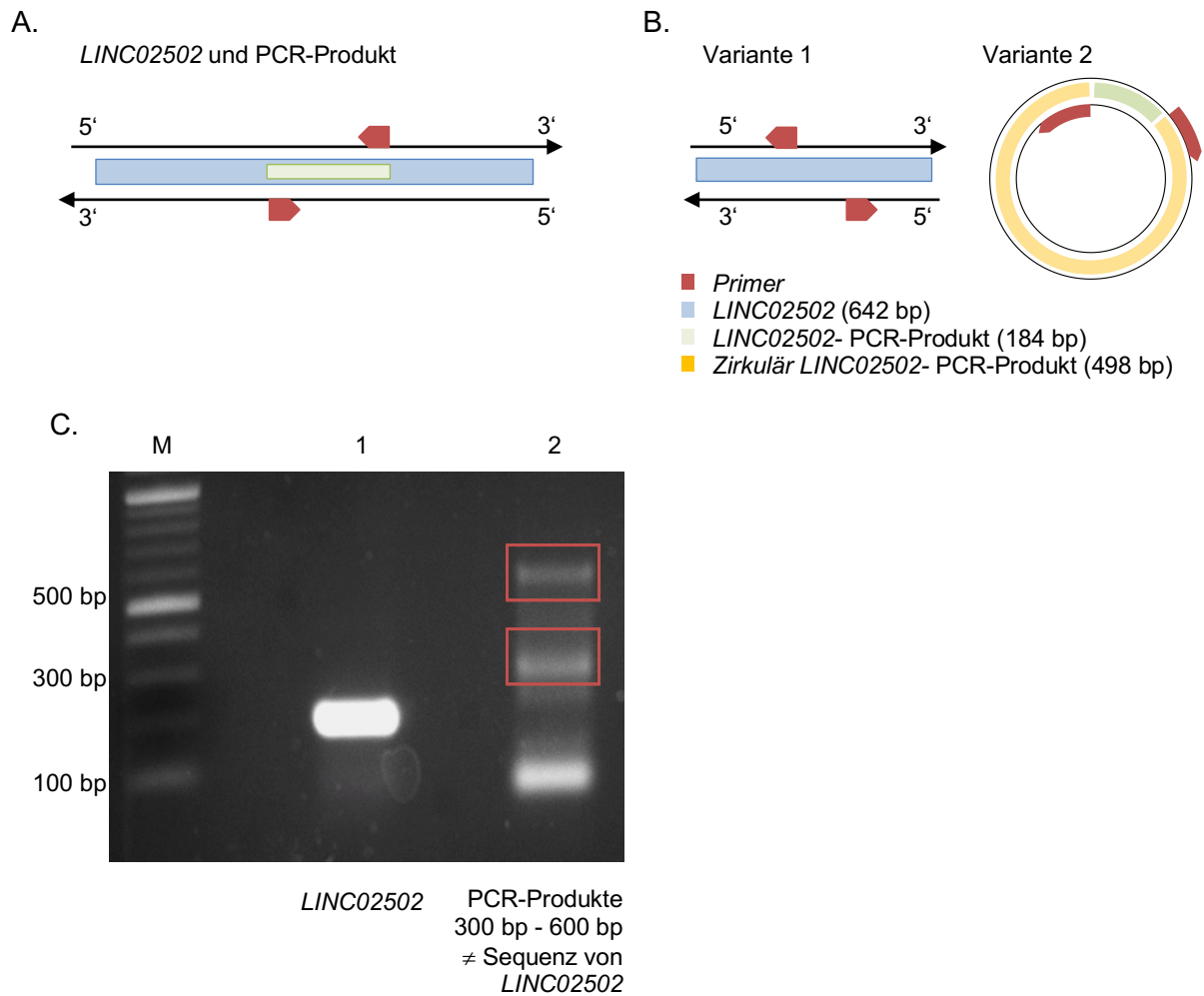


Abbildung 17 Charakterisierung von *LINC02502*. (A) Das Schema zeigt das PCR-Produkt bei der Detektion von *LINC02502*. (B) Die möglichen PCR-Produkte von *LINC02502* bei Verwendung des Primerpaars mit umgekehrter Laufrichtung sind schematisch dargestellt. Variante 1 zeigt das Fehlen eines PCR-Produkts von *LINC02502* bei einer linearen Formation. Variante 2 zeigt die Möglichkeit eines PCR-Produkts (498 bp) bei Vorliegen einer zirkulären RNA. (C) Hier ist das Ergebnis der PCR abgebildet. Die erste Bande zeigt den Marker (M) mit Standardgrößen. (1) zeigt das PCR-Produkt mit 184 bp bei Verwendung der Primer für die Detektion von *LINC02502*. (2) zeigt die PCR-Produkte nach Umkehr der Laufrichtung der Primer. Diese zwei PCR-Produkte und deren Verschiedenheit zu der Sequenz von *LINC02502* nach Sequenzierung deuten auf eine lineare Formation der lncRNA hin. Das Signal mit einer Größe von < 100 bp zeigt ein mögliches Nebenprodukt einer PCR, ein Primerdimer.

5.2.6 Ergebnisse der Charakterisierung der lncRNA *LINC02502*

Zusammenfassend ist *LINC02502* eine lange nicht-kodierende RNA, die im Herzen in aortalen glatten Muskelzellen innerhalb des Zytoplasmas lokalisiert ist. Die Lokalisation ändert sich nach Stimulation mit oxLDL und mit IL-1 β nicht. Zudem wurde in den Ergebnissen festgestellt, dass *LINC02502* am ehesten als eine lineare RNA vorliegt.

5.3 Expressionsanalyse *MAD2L1*

Das Gen *MAD2L1* (*Mitotic Arrest Deficient 2 Like 1*) befindet sich innerhalb des KHK-Risikolocus mit rs7678555 auf dem humanen Chromosom 4q27. *MAD2L1* kontrolliert während der Mitose bei dem Übergang von Metaphase zur Anaphase den Spindelapparat und stoppt den Prozess, falls die Chromosomen nicht korrekt ausgerichtet sind (Li & Benezra, 1996). Mithilfe von Transkriptomdaten aus drei Studien wurde die Expression von *MAD2L1* in verschiedenen Geweben untersucht (Abbildung 18) (Cabili et al., 2011; Duff et al., 2015; Fagerberg et al., 2014).

Die Expression von *MAD2L1* konnte in allen Geweben gemessen werden. In *PRJEB4337* wurde die höchste Expression von *MAD2L1* im Knochenmark (15,9 RPKM) gemessen. In *PRJEB2445* wurde das Knochenmark nicht sequenziert und das Hodengewebe zeigte die höchste Expression von *MAD2L1* (11,436 RPKM). In *PRJNA280600* wurde weder die RNA des Knochenmarks noch die des Hodens sequenziert.

Die höchste Expression von *MAD2L1* zeigte sich im Thymus (5,36 RPKM). In allen drei Projekten wurde im Herzgewebe eine niedrige Expression von *MAD2L1* gemessen (*PRJEB4337*: 1,22 RPKM; *PRJEB2445*: 1,109 RPKM; *PRJNA280600*: 0,0929 RPKM). Für die folgenden Untersuchungen wurde daher davon ausgegangen, dass *PDE5A* tatsächlich das kausale Gen an diesem Locus darstellt.

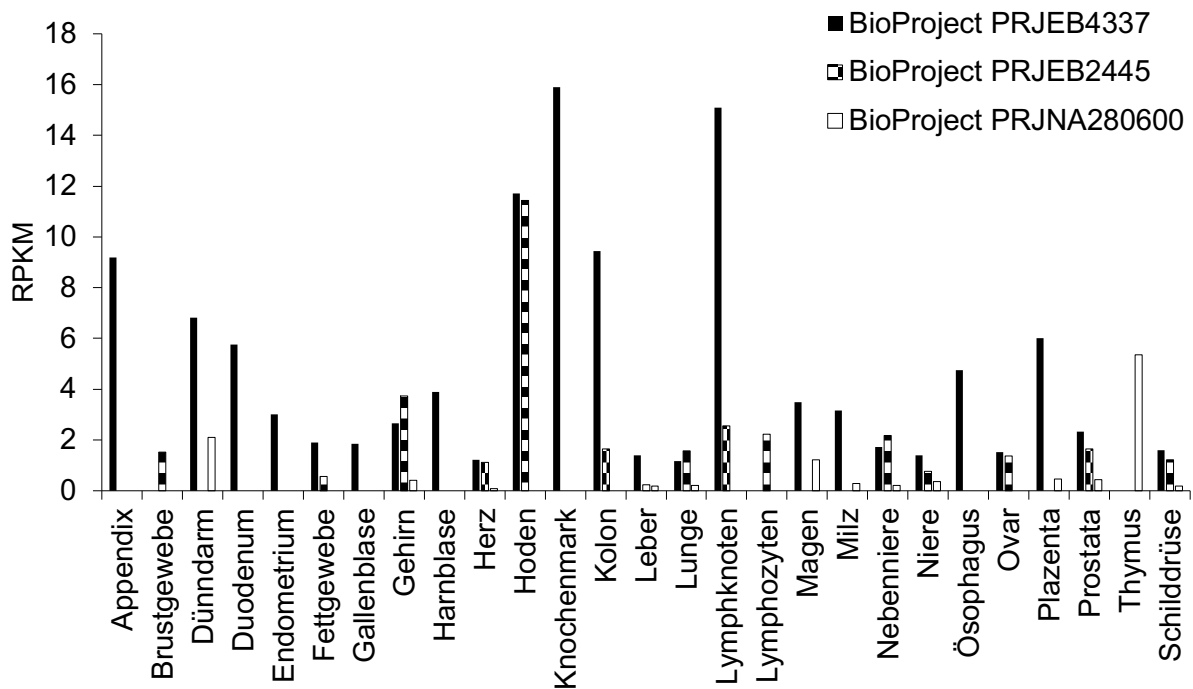


Abbildung 18 Expression von *MAD2L1* in verschiedenen Geweben. Hier wurden die Daten aus den drei Studien *PRJEB4337* (Fagerberg et al., 2014), *PRJEB2445* (Cabili et al., 2011) und *PRJNA280600* (Duff et al., 2015) analysiert. Die RNA-Sequenzierung von *MAD2L1* in den unterschiedlichen Geweben wurde als RPKM (*reads per kilobase per million reads*) gemessen. Die Expressionswerte von *MAD2L1* aus fetalem Gehirn, fetaler Leber, Pankreas, Skelettmuskel, Speicheldrüse, Trachea, Uterus und Zerebellum wurden nicht dargestellt, da die Werte in allen drei Studien < 0,6 RPKM betragen. Diese Daten wurden freundlicherweise auf der Website des *National Center of Biotechnology Information* der *U.S. National Library of Medicine* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject>, Zugriffsdatum 17.08.2020) bereitgestellt.

5.4 Interaktion *LINC02502* und *PDE5A*

Die Wechselwirkung zwischen *LINC02502* und *PDE5A* wurde analysiert, indem die Expression eines Gens verändert und die Expression des jeweils anderen Gens untersucht wurde.

Überexpression von *LINC02502*

Die Expression von *LINC02502* wurde gesteigert, indem HAOsMCs mit dem Expressionsvektor pBI-CMV2 mit *LINC02502* transfiziert wurden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde die Transfektion kontrolliert (Abbildung 19 A). Die grün-fluoreszierenden Zellen (GFP+), als Zeichen einer erfolgreichen Transfektion konnten mittels FACS-Sortierung von den nicht-fluoreszierenden Zellen (GFP-) getrennt werden (Abbildung 19, B, C).

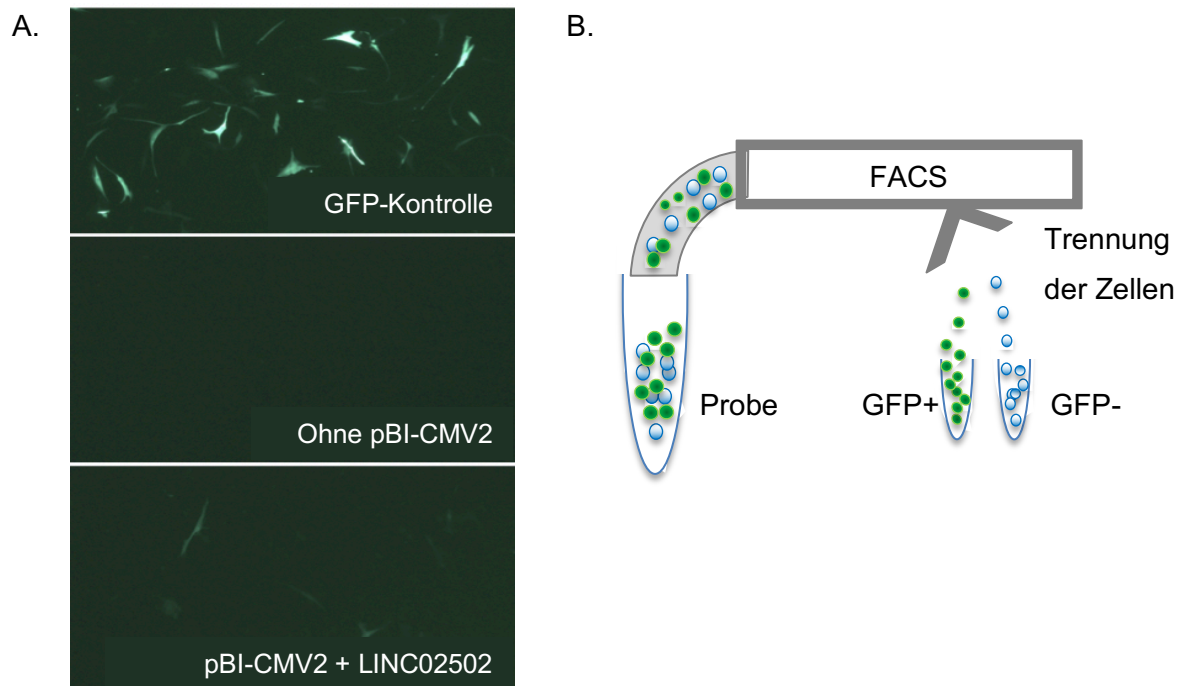


Abbildung 19 Hochregulation von *LINC02502* und Zell-Sortierung. (A) Fluoreszenzbilder der HAoSMCs (Passage 4), transfiziert mit (grün) und ohne pBI-CMV2 und LINC02502 nach einer Inkubationszeit von 48 h. Als weitere Positivkontrolle wurden HAoSMCs mit pmaxGFP™ (GFP-Kontrolle) transfiziert, was ein Bestandteil des Transfektionskits war. (B) Das Schema zeigt die Zellsortierungsstrategie. Die Probe wurde mittels FACS untersucht und ihr Fluoreszenzsignal registriert. Anschließend wurden die fluoreszierenden Zellen (grün, GFP+) von den nicht-fluoreszierenden Zellen (blau, GFP-) getrennt.

Die Expression von *LINC02502* und *PDE5A* in den GFP-positiven und -negativen HAoSMC wurde im Anschluss an die Zellsortierung mittels qPCR untersucht. Die Expression von *LINC02502* in den GFP-positiven HAoSMC wurde durch die erfolgreiche Transfektion mit pBI-CMV2 und *LINC02502* signifikant erhöht ($p < 0,05$) (Abbildung 20, A). Die Expression von *PDE5A* stieg ebenfalls signifikant an ($p < 0,05$) (Abbildung 20, B).

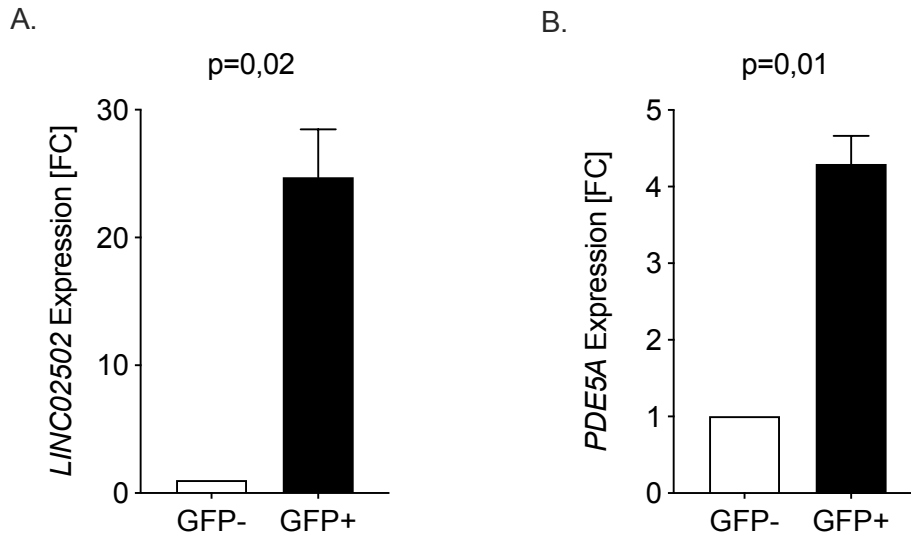


Abbildung 20 Analyse von *LINC02502* und *PDE5A* nach Hochregulation von *LINC02502*. (A) Die Expression von *LINC02502* stieg in GFP-positiven HAoSMC (GFP+) signifikant an ($p=0,02$). (B) Mit der Hochregulation von *LINC02502* stieg auch die Expression von *PDE5A* signifikant ($p=0,01$). Die GFP-negativen HAoSMC (GFP-) dienen zur Normalisierung. Die Daten wurden mit einem Einstichproben-t-Test ausgewertet. Die Daten sind die Mittelwerte \pm SEM aus den qPCR-Ergebnissen von sechs unabhängigen Experimenten.

Herunterregulation von *LINC02502*

Die Genexpression von *LINC02502* wurde post-transkriptional mittels RNA-Interferenz herunterreguliert. Dies wird durch den Einsatz kleiner interferierender RNAs (siRNA) erreicht (Kawasaki & Taira, 2003; Zeng & Cullen, 2002). Da die Lokalisation von *LINC02502* im Zytoplasma von HAoSMC festgestellt wurde, konnte man die Expression von *LINC02502* mithilfe von siRNAs reduzieren (Kapitel 5.2.3).

Es wurden zwei siRNAs (1) s536186 und (2) s536188 getestet (Abbildung 21, A). Beide siRNAs zeigten eine erfolgreiche Reduktion von *LINC02502*, jedoch verzeichnete nur s536188 bei verschiedenen Inkubationszeiten (24 h, 48 h, 72 h) eine signifikante Reduktion von *LINC02502* ($p<0,03$), so dass diese für die weiteren Experimente eingesetzt wurde. Nach Herunterregulation von *LINC02502* wurde die Expression von *PDE5A* nach verschiedenen Zeitintervallen untersucht (Abbildung 21, B). Eine signifikante Reduktion von *PDE5A* wurde 48 h und 72 h nach Herunterregulation von *LINC02502* festgestellt ($p<0,05$).

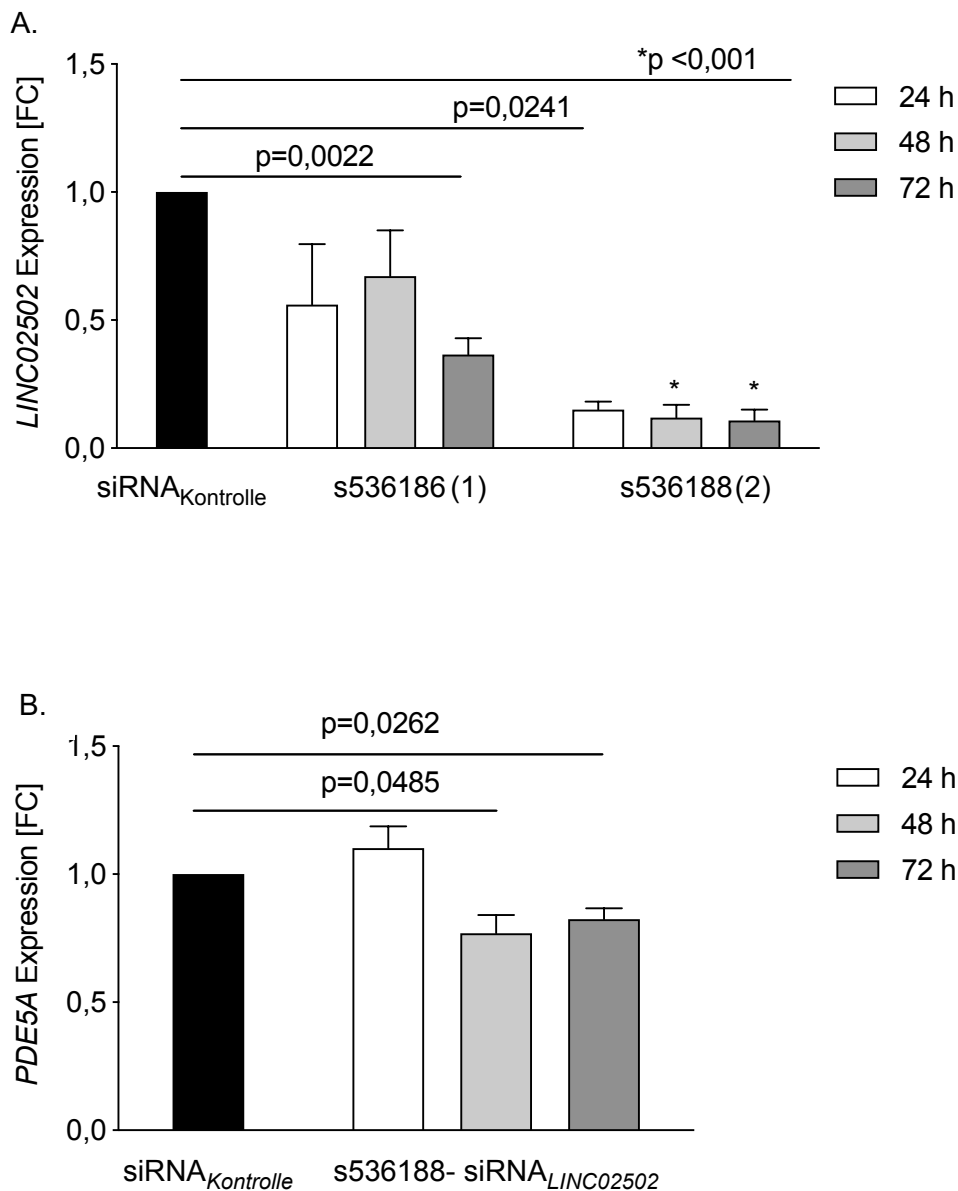


Abbildung 21 Analyse von *LINC02502* und *PDE5A* nach Herunterregulation von *LINC02502*. (A) Die *LINC02502* Expression wurde durch siRNAs post-transkriptional in HAoSMCs (Passage 5 – 8) reduziert. Zwei siRNAs (1) s536186 und (2) s536188 wurden in einem Vorexperiment getestet. siRNA (1) zeigte nach einer Inkubationszeit von 72 h eine signifikante Reduktion von *LINC02502* ($p=0,0022$). siRNA (2) zeigte nach 24 h, 48 h und 72 h eine signifikante Reduktion von *LINC02502*. (B) Die Expression von *PDE5A* wurde, nach Reduktion von *LINC02502* mit siRNA (2), ebenfalls nach 48 h ($p = 0,0485$) und 72 h ($p=0,0262$) signifikant reduziert. Die Kontroll-siRNA diente jeweils zur Normalisierung. Die Daten sind die Mittelwerte \pm SEM und stammen aus den qPCR-Ergebnissen von fünf unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten gemessen und mit einem Einstichproben-t-Test ausgewertet wurden.

Herunterregulation von *PDE5A*

Die Genexpression von *PDE5A* wurde durch eine kommerziell erhältliche siRNA (*PDE5A* Silencer, Assay-ID 137133, Thermo Fisher) in HAoSMCs herunterreguliert. Es konnte festgestellt werden, dass durch die signifikante Reduktion von *PDE5A* ($p < 0,0001$), *LINC02502* signifikant erhöht wurde ($p = 0,04$).

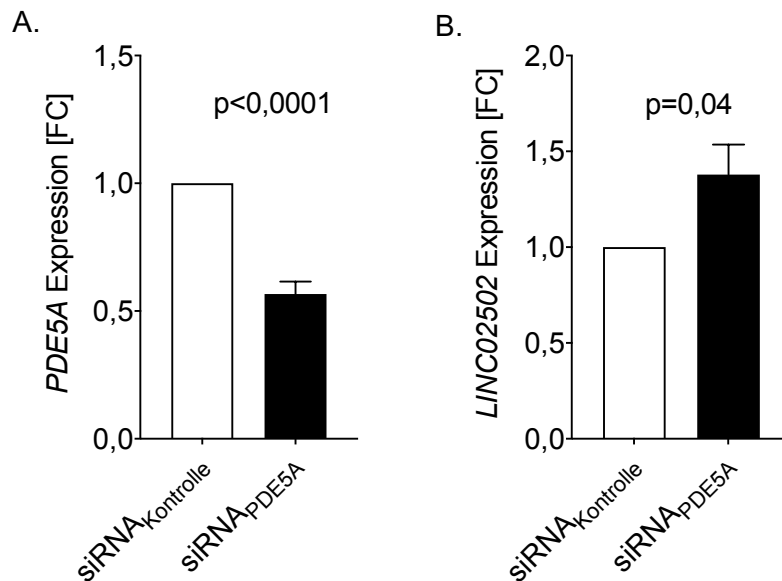


Abbildung 22 Analyse von *LINC02502* und *PDE5A* nach Herunterregulation von *PDE5A*. (A) *PDE5A* konnte nach Transfektion der HAoSMCs mit der siRNA zur Herunterregulation von *PDE5A* nach 72 h signifikant reduziert werden ($p < 0,0001$). (B) Die Expression von *LINC02502* war bei Herunterregulation von *PDE5A* signifikant erhöht ($p = 0,04$). Die Daten als Mittelwerte \pm SEM stammen aus den qPCR-Ergebnissen von 8 unabhängigen Experimenten. Die statistische Analyse wurde mit einem Einstichproben-t-Test durchgeführt.

5.4.1 Ergebnisse der Interaktionsuntersuchung von *LINC02502* und *PDE5A*

Dieser Teil der Arbeit konnte zeigen, dass *LINC02502* und *PDE5A* miteinander interagieren und die jeweilige Expression voneinander abhängig ist. Die Expression von *PDE5A* sinkt, wenn die Expression von *LINC02502* herunterreguliert wurde, und steigt, wenn *LINC02502* hochreguliert wurde. Andersherum steigt die Expression von *LINC02502* bei Herunterregulation von *PDE5A*. Die Ergebnisse deuten auf einen negativen Rückkopplungsmechanismus hin.

5.5 Untersuchung von rs7678555

5.5.1 Regulatorische Funktion von rs7678555

Um zu untersuchen, ob der SNP rs7678555 regulatorische Eigenschaften besitzt, wurde ein Luciferase Assay eingesetzt. Dazu wurde der promotorlose Luciferase-Vektor pGL4.10[*luc2*], ein Reporter-gen-System, genutzt. In dieses Plasmid wurden die 231 bp umfassende SNP-Region, entweder mit dem Nicht-Risikoallel A oder mit dem Risikoallel C, *upstream* des 5' Endes des *luc2* Gens kloniert (Abbildung 23).

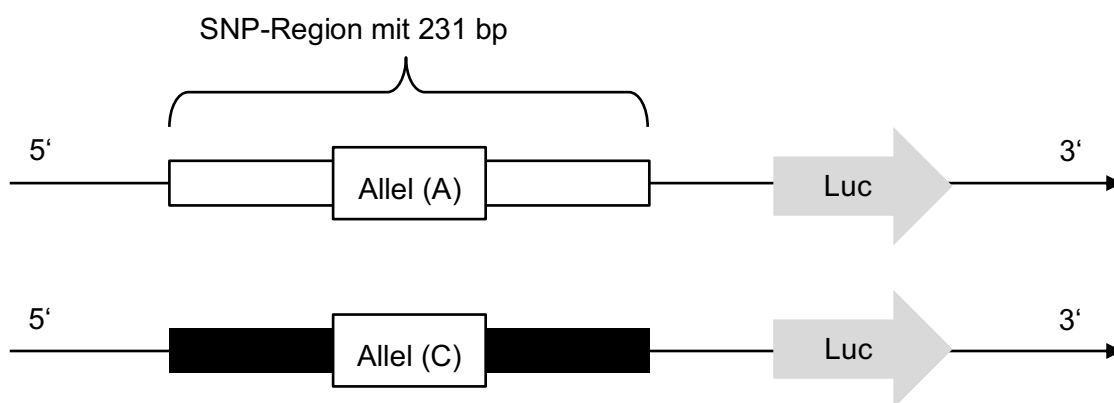


Abbildung 23 Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie der Luciferase-Plasmide. Der SNP rs7678555, mit entweder Allel A oder C, wurde mit der umgebenden Sequenz (insgesamt 231 bp umfassend) in Richtung des 5' Endes des *luc2* Gens in den Vektor pGL4.10[*luc2*] kloniert.

Im Vergleich zur promotorlosen pGL4.10 Kontrolle war bei beiden Allelen des SNPs eine erhöhte Luciferase-Aktivität, welche stellvertretend für Promotoraktivität steht, messbar um mehr als das 3-fache bei Allel A und C erhöht (Abbildung 24). Bei Vorliegen des Risikoallels C wurde eine signifikant höhere Aktivität als bei Allel A registriert ($p=0,0306$). Folglich verfügt der SNP rs7678555 über mutmaßlich regulatorische Eigenschaften, die mit dem Risikoallel C verstärkt werden.

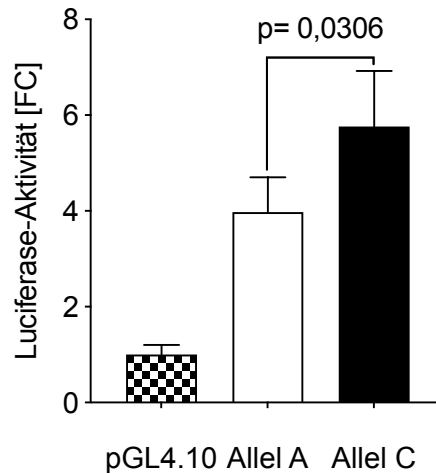


Abbildung 24 Regulatorische Eigenschaften der Region um den SNP rs7678555. In Anwesenheit des SNPs konnte eine erhöhte Luciferase-Aktivität gemessen werden. Dabei wurde bei Vorliegen des Risikoallels C eine signifikant höhere Aktivität als bei Allel A registriert ($p=0,0306$). Die Luciferase-Aktivität der Proben wurde 72 h nach der Transfektion gemessen. Die Daten sind die Mittelwerte \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten und wurden mit dem Mittelwert der pGL4.10-Kontrolle normalisiert. Die Luciferase-Aktivität von Allel A und C wurden mit einem *One-way-Anova* mit einem *Šidák -Test* statistisch verglichen.

5.5.2 Untersuchung möglicher bindender Transkriptionsfaktoren an rs7678555

Zur Identifizierung von möglichen DNA-bindenden Proteinen an die SNP-Region wurde der *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) eingesetzt. Dazu wurden nukleäre Fraktionen aus untransfizierten HEK293 Zellen bzw. HAoSMCs mit dimerisierten, biotinylierten Oligonukleotiden, die die Sequenz der SNP-Region beinhalten, inkubiert. So konnten mögliche Interaktionen zwischen nukleären Proteinen und der SNP-Sequenz untersucht werden (Abbildung 25). Ein Unterschied war in den Bandenintensitäten zwischen den Experimenten der HEK293 Zellen bzw. HAoSMCs zu sehen. Solch ein Unterschied kann durch verschiedene Belichtungszeiten entstehen. Die Banden 1-6 glichen sich in den Experimenten mit nukleären Proteinen aus HAoSMCs. Eine Bande erschien hauptsächlich in Anwesenheit von Allel A (Bande 7 bei HAoSMCs). Dies könnte auf eine differentielle Kernproteinbindung an die Allele des SNPs hindeuten.

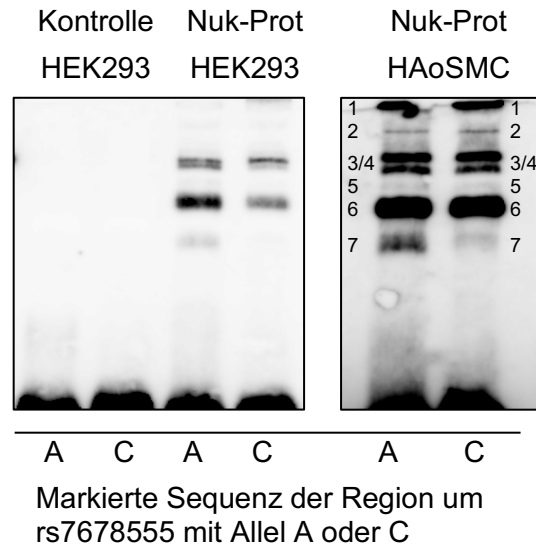


Abbildung 25 Bindung von nukleären Proteinen an die SNP-Region. Der EMSA zeigt die Bindung von nukleären Proteinen (Nuk-Prot) aus nicht-transfizierten HEK293 Zellen bzw. HAoSMCs an die SNP-Region um rs7678555. Bei der Kontrolle wurde mit Wasser anstelle von nukleärem Extrakt inkubiert.

5.5.3 Ergebnisse der Untersuchung der SNP-Region rs7678555

Die Ergebnisse dieses Abschnitts zeigen, dass rs7678555 regulatorische Eigenschaften besitzt. Sie deuten außerdem darauf hin, dass nukleäre Proteine differentiell an die SNP-Region binden könnten, wodurch sich ein Unterschied in der regulatorischen Funktion dieser Region erklären ließe.

6 Diskussion

In der Nähe des *PDE5A* Gens auf Chromosom 4q27 liegt die Genvariante rs7678555, welche mit dem Risiko einer KHK assoziiert wurde (Nelson et al., 2017). In dieser Arbeit wurde ein möglicher molekularer Mechanismus über die lncRNA *LINC02502* zwischen dem Genotyp, der Genvariante rs7678555 und dem Phänotyp, der KHK, identifiziert. Darüber hinaus wurde die Bedeutung des kausalen Gens *PDE5A* bei der KHK hervorgehoben.

6.1 LINC02502

Bei der Untersuchung des KHK-Risikolocus 4q27 zeigten sich in der Umgebung der Variante rs7678555 neben *PDE5A* auch andere Gentranskripte. Ein zwischen rs7678555 und *PDE5A* annotiertes Transkript ist die lange, intergenetische nicht-kodierende RNA 02502, *LINC02502*. Diese könnte als Interaktionspartner, nach dem *closest gene approach* betrachtet werden (Brodie et al., 2016). In den letzten 20 Jahren wurden wichtige Funktionen von lncRNAs aufgeschlüsselt. lncRNAs sind relevant für die Entwicklung der Zelle, aber auch für die Entstehung von Krankheiten (Esteller, 2011). Viele lncRNAs stellen einen neuen und noch nicht vollständig verstandenen Faktor im komplexen Zellsystem dar.

Die Datenrecherche über *LINC02502* zeigte, dass ihre Funktion und Interaktion bisher unerforscht waren. In einem Vorexperiment, einer Expressionsanalyse von *PDE5A* und *LINC02502* wurde eine positive Korrelation beobachtet, d.h. dass umso mehr *PDE5A* mRNA nachweisbar war, je mehr *LINC02502* wurde detektiert und umgekehrt (Abbildung 12).

Zusätzlich wurden die Daten der RNA-Sequenzierungsanalyse von drei Studien untersucht (*PRJEB4337* (Fagerberg et al., 2014), *PRJEB2445* (Illumina BodyMap2 Transkriptom (Cabili et al., 2011)), und *PRJNA280600* (Duff et al., 2015)) (Abbildung 11). In den Studien wurde jeweils eine geringe Stichprobenanzahl von ein bis sieben Proben pro Gewebe untersucht. Außerdem zeigte sich eine große Spannweite der RPKM-Werten von *LINC02502* im Herzgewebe. Durchschnittlich lag der RPKM-Wert im Herzen bei $10,41 \pm 6,39$. Im Kontrast dazu zeigten die Sequenzierungsergebnisse aller drei Studien von *LINC02502* aus anderen Geweben keine höheren Werte als 2,2 RPKM. Die große Spannweite der Proben könnte unter anderem durch unterschiedliche Genotypen zu erklären sein. Durch die geringe Anzahl an Proben kann der direkte Zusammenhang zwischen Herzgewebe und *LINC02502* nicht bewiesen werden. Darüber hinaus fehlen Informationen zu den einzelnen Spendern. Die Ergebnisse zeigen aber deutlich, dass *LINC02502* vor allem im Herzen exprimiert wird.

Die Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass *LINC02502* und *PDE5A* mit der Genvariante rs7678555 und einem erhöhten KHK-Risiko verknüpft sind. Daher wurde in dieser Arbeit die Rolle von *LINC02502* in der Regulation von *PDE5A* intensiver untersucht.

Bei der Untersuchung des Vorkommens von *LINC02502* wurde die Auswahl der Zelllinien auf humane Zellen, die am NO-cGMP-Signalweg des kardiovaskulären Systems beteiligt sind, begrenzt. Dabei wurden die Ergebnisse der STARNET-Studie, in der das Risikoallel C des SNPs mit erhöhter Konzentration von *PDE5A*-mRNA in der atherosklerotischen Aorta assoziiert wurde, und die Zelltypen, in denen *PDE5A* exprimiert wird, berücksichtigt (Franzen et al., 2016). Aus diesem Grund wurden in dieser Studie Endothelzellen unterschiedlicher Gefäße des Herzens (koronar und aortal), die glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta und Thrombozyten untersucht. *LINC02502* wurde nur in humanen, aortalen, glatten Gefäßmuskelzellen (HAoSMC) detektiert (Abbildung 13).

Bei der Untersuchung der lncRNA *ANRIL* auf dem KHK-Risikolocus 9p21 wurde die Relevanz ihrer Form für die biologische Funktion deutlich. Die zirkuläre Form von *ANRIL* bindet an Pescadillo-Homolog 1 (PES1). PES1 ist ein essenzieller Faktor für die 60S-Untereinheit des Ribosoms ist. Durch die Bindung wird nuklearer Stress verursacht und Apoptose eingeleitet. Dieser Prozess wirkt sich atheroprotektiv aus. (Holdt et al., 2016) Im Gegensatz dazu wurde die lineare Form von *ANRIL* mit der KHK assoziiert (Holdt et al., 2010). Epigenetische Regulation durch Alu-Elemente von *linANRIL* wirken sich sowohl positiv auf die Zellproliferation und -adhäsion als auch negativ auf die Apoptose aus (Holdt et al., 2013).

Die oben genannten Studien zeigen, dass die lineare Form von lncRNAs mit der Initiation und Progression von Krankheiten assoziiert ist. In dieser Arbeit ergaben sich keine Hinweise auf eine zirkuläre Form von *LINC02502*. Die lineare Form von *LINC02502* könnte eine Beteiligung an dem pathophysiologischen Prozess der Atherosklerose bedeuten (Holdt et al., 2013; Holdt et al., 2016). Dieses Ergebnis spiegelt nur eine Momentaufnahme von *LINC02502* wider. Um die Rolle der Konfiguration von *LINC02502* bei der Entstehung der Atherosklerose zu erfassen, wäre es bedeutsam weitere Strukturanalysen von *LINC02502* unter verschiedenen Bedingungen und in Abhängigkeit des Genotyps der KHK-Risikovariante rs7678555 durchzuführen.

In Studien wie bei Yoon et al. (2013) wurde gezeigt, dass die Eingrenzung des Wirkungsortes entscheidend ist, um funktionelle Eigenschaften in Folgeexperimenten besser beurteilen zu können. Bei der Untersuchung der lncRNA *HOTAIR* wurde diese im Zytoplasma lokalisiert und daraufhin wurden die RNA-Protein-Interaktionen mittels Immunpräzipitation untersucht. Über die Bindung an zytoplasmatische Proteine verstärkte *HOTAIR* die Ubiquitynylierung und somit die Degradation bestimmter Proteine. (Yoon et al., 2013) Nicht nur die Ubiquitynylierung von

Proteinen, sondern auch andere zytoplasmatische Prozesse, die die Genexpression modulieren, können durch lncRNAs beeinflusst werden (Fasolo et al., 2019; Noh et al., 2018). Mittels FISH wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *LINC02502* innerhalb des Zytoplasmas lokalisiert ist (Abbildung 14). Validiert wurde das Ergebnis zusätzlich durch ein unabhängiges Experiment mittels quantitativer PCR (Abbildung 15). In Hinblick auf die vorliegenden Ergebnisse sollte untersucht werden, an welche RNA-bindende Proteine des Zytoplasmas *LINC02502* bindet.

Es wurde ferner untersucht, ob sich die Lokalisation von *LINC02502* unter atherosklerotischen Bedingungen ändert. Um ein atherogenes, proinflammatorisches Milieu zu simulieren, wurden HAoSMC mit Interleukin-1 β (IL-1 β) bzw. oxidiertem LDL (oxLDL) inkubiert. Die Zell-Stimulation mit IL-1 β und oxLDL stellt ein bekanntes *in vitro* Modell der Atherosklerose dar (Guo et al., 2020; Li et al., 2015; Zhang et al., 2019).

Während der Plaqueformation sind viele Immunzellen, wie Makrophagen und T-Helferzellen, an der Progression der Atherosklerose beteiligt. Sie produzieren und sezernieren Zytokine, vor allem IL-1 β (Li et al., 2015). Nach Stimulation mit IL-1 β wurde in humanen koronaren Endothelzellen die Expression von Akute-Phase-Proteinen und der interzelluläre Austausch deutlich gesteigert, was zu einer schnelleren Progression der Atherosklerose führt (Kuret et al., 2019). Ebenso ist oxLDL in der atherosklerotischen Läsion zu finden (Skalen et al., 2002). Durch oxLDL werden Prozesse wie Endothelzellschäden, Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen und die Schaumzellbildung gefördert (Bobryshev, 2006; Ide & Lau, 1997; Liu et al., 2014).

Eine Studie über die lncRNA *HOTTIP* bewies den Einfluss von oxLDL auf eine lncRNA und das gesteigerte Risiko für Atherosklerose (Guo et al., 2020). Nach der Stimulation der HAoSMCs mit oxLDL und humanem IL-1 β veränderte sich die zytoplasmatische Lokalisation von *LINC02502* nicht (Abbildung 16). Dies wurde als Hinweis gesehen, dass es sich bei *LINC02502* um eine primär zytosolisch lokalisierte lncRNA handelt, deren Lokalisation sich auch unter proinflammatorischen und atherogenen Bedingungen nicht ändert. Es ist jedoch möglich, dass andere Stimuli eine Lokalisationsänderung von *LINC02502* bewirken könnten. Weitere Untersuchungen sollten sich hier anschließen, um den Einfluss von *LINC02502* auf die Umgebung zu analysieren. Außerdem sollte geprüft werden, welchen Einfluss *LINC02502* auf die inflammatorische Differenzierung der glatten Gefäßmuskelzelle hat.

In Zusammenschau setzen diese Ergebnisse einen Ausgangspunkt, um den Einfluss von *LINC02502* auf die Pathogenese der Atherosklerose detaillierter zu verstehen. Auf Grundlage dessen sollte die Untersuchung ihrer Struktur vertieft, die RNA-Protein-Bindungen identifiziert und weitergehende Experimente zur Rolle von der lncRNA in der Atherosklerose *in vivo* durchgeführt werden.

6.2 Interaktion *LINC02502* und *PDE5A*

Durch die Assoziation des KHK-Risikolocus 4q27 mit der KHK wurde *LINC02502* als Kandidat für eine Beteiligung am pathophysiologischen Prozess der Atherosklerose identifiziert. Bereits in früheren Studien wurde eine Assoziation zwischen lncRNAs und der Regulation von benachbarten Genen bzw. Genen beobachtet. So wurde beispielsweise nach Hochregulation der lncRNA *GAS5* die mRNA des untersuchten Gens *c-Myc* zwar nicht verändert. Jedoch zeigte sich auf Proteinebene, dass die Proteinkonzentration von *c-Myc* nach Hochregulation von *GAS5* reduziert war. *GAS5* scheint somit am ehesten die (Post-) Translation zu beeinflussen und nicht die Transkription oder die mRNA-Stabilität. (Hu et al., 2014)

Auf der Basis solcher Beobachtungen wurde hier der Einfluss von *LINC02502* auf die *PDE5A*-Expression untersucht. Im Gegensatz zu *GAS5* war ein Einfluss von *LINC02502* auf die *PDE5A*-mRNA wahrscheinlicher, da die mit der KHK assoziierte genomische Risikovariante rs7678555 bereits mit erhöhter *PDE5A*-mRNA in Verbindung gesetzt worden war (Nelson et al., 2017). In dieser Arbeit wurde daher zunächst der Einfluss der Expression von *LINC02502* auf *PDE5A* untersucht. Es wurde festgestellt, dass durch Hochregulation durch ektope Überexpression von *LINC02502* die Expression von *PDE5A*-mRNA verstärkt wurde (Abbildung 20). Dies deutet darauf hin, dass *LINC02502* einen Einfluss auf *PDE5A* über einen Mechanismus auf Transkriptions- bzw. RNA-Ebene ausübt. Passend hierzu wurde nach der Herunterregulation von *LINC02502* durch RNA-Interferenz eine Herunterregulation von *PDE5A* festgestellt (Abbildung 21). Die Konzentration von *LINC02502* zeigte somit eine positive Korrelation mit der *PDE5A*-mRNA. In einem nächsten Versuch wurde die Konzentration von *PDE5A* verändert und die *LINC02502* Expression untersucht. Durch die Herunterregulation von *PDE5A* stieg die Expression von *LINC02502*, was auf einen positiven Rückkopplungsmechanismus hindeutet (Abbildung 22). Abbildung 26 stellt die Ergebnisse des Zusammenspiels zwischen *LINC02502* und *PDE5A* graphisch dar.

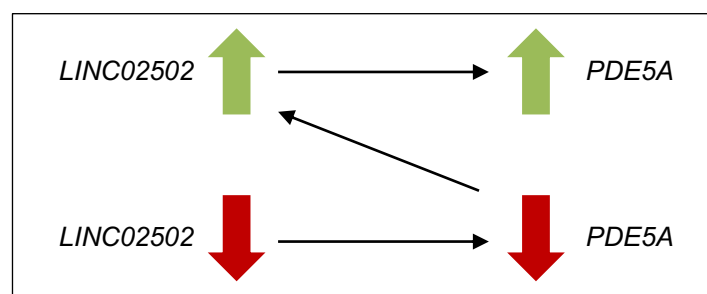


Abbildung 26 Interaktion *PDE5A* und *LINC02502*. Die Expression von *PDE5A* korreliert positiv mit der Expression von *LINC02502*. Auf der anderen Seite stieg die Expression von *LINC02502* bei einer herunterregulierten Expression von *PDE5A*. Am ehesten liegt ein Rückkopplungsmechanismus vor.

Zusammen weisen diese Ergebnisse (zytosolische Lokalisation, Beeinflussung auf mRNA-Ebene) darauf hin, dass *LINC02502* über eine zytosolische Beeinflussung der Transkription wirken könnte. Weitere Untersuchungen der Arbeitsgruppe fokussieren sich auf einen solchen Mechanismus und haben die Identifikation *LINC02502*-bindender Proteine zum Ziel.

6.3 Einfluss der KHK-Risikovariante

Die Genvariante rs7678555 liegt auf Chromosom 4q27 in der Umgebung von *PDE5A*, *MAD2L1* und *LINC02502*. Das Vorliegen der Variante C ist mit einem erhöhten Risiko, an einer KHK zu erkranken, assoziiert. In Europa sind ca. 30 % der Bevölkerung Träger des Risikoallels C (L. Phan, 2020).

Wie schon bei den meisten in GWAS detektierten Risikovarianten beobachtet, liegt die Variante rs7678555 außerhalb eines bestimmten Gens in einem intergenischen Abschnitt (Kessler & Schunkert, 2021). Dadurch beeinflusst die Variante das Erkrankungsrisiko nicht auf Proteinebene, z.B. durch Veränderung der Aminosäuresequenz. Schon bei mehreren nicht-kodierenden, in GWAS identifizierten Varianten wurden regulatorische Mechanismen identifiziert oder vermutet, wie auch bei rs7678555 (CARDIoGRAMplusC4D et al., 2013).

In dieser Arbeit wurde daher unter Verwendung des Luciferase-Reportergen-Systems die Funktion der Region um den SNP rs7678555 untersucht. Durch die Insertion der SNP-Region nahm die Reportergenaktivität im Vergleich zum Leervektor zu. Das deutet darauf hin, dass die SNP-Region regulatorische Eigenschaften besitzt (Abbildung 24). Interessanterweise führte die Insertion des C-Allels zu einer weiteren Zunahme im Vergleich zum A-Allel, was einen Hinweis auf eine gesteigerte regulatorische Aktivität des Risikoallels gibt.

Diese Ergebnisse können nicht einfach auf das humane Genom übertragen werden, da es sich um einen artifiziellen Assay handelt. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass das Risikoallel mit gesteigerter PDE5A-Expression assoziiert wurde (Nelson et al., 2017), kann vermutet werden, dass die regulatorische Eigenschaft des Risikoallels die Expression von benachbarten Genen, beispielsweise also auch *LINC02502*, verstärkt. Ein möglicher Mechanismus könnte die allelspezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren sein. Ein ähnliches Beispiel ist das *GUCY1A1*-Gen, das im gleichen Signalweg die Bildung des Botenstoff cGMP beeinflusst (Kessler et al., 2017).

In dieser Arbeit wurden Oligonukleotidbaits der unterschiedlichen Varianten mit nukleären Extrakten inkubiert und ein allelspezifisches Bandenmuster beobachtet (Abbildung 25).

Weitere Untersuchungen sollen zeigen, welche Proteine allelspezifisch an das Risiko- bzw. Nichtrisikoallel von rs7678555 binden.

Grundlage weiterer Untersuchungen war die Annahme, dass der Genotyp rs7678555 und die Pathogenese der KHK über weitere benachbarte annotierte Transkripte wie beispielsweise *MAD2L1* verbunden sind. *MAD2L1* kodiert für ein Protein, welches entscheidend für den Ablauf der Mitose ist. Sobald Chromosomen nicht korrekt am Spindelapparat ausgerichtet sind, wird der Prozess gestoppt (Li & Benezra, 1996). Dysfunktion von *MAD2L1* führt zur chromosomalen Instabilität. Studien zu *MAD2L1* thematisieren hauptsächlich die Karzinomentstehung. Es wurde beispielsweise beschrieben, dass *MAD2L1* bei der Entwicklung von Neoplasien unter anderem im Gastrointestinaltrakt und Metastasen der Lymphknoten involviert ist (Bidus et al., 2006; Kim et al., 2019; Shi et al., 2016).

In dieser Arbeit zeigte die Analyse der Expression von *MAD2L1*, dass *MAD2L1* in vielen verschiedenen Zelllinien und -geweben vorliegt, aber innerhalb des kardiovaskulären Systems nicht stark exprimiert wird (Abbildung 18). Die Assoziation von rs7678555 mit der *PDE5A*-Expression und die Involvierung von *PDE5A* im NO-cGMP-Signalweg führten zu der Annahme, dass es sich hierbei um das kausale Gen am Locus handelt. Entsprechend fokussierte sich diese Arbeit auf die Untersuchung von *PDE5A*. Dies ist ferner auch unter Berücksichtigung einer *PDE5A*-Genmutation, die als kausale genetische Veränderung in einer Familie entdeckt wurde, plausibel. Die Familie zeigte eine hohe Prävalenz, der im jungen Alter auftretenden Manifestation einer KHK. (Dang et al., 2021) Dennoch kann zu diesem Zeitpunkt eine pathophysiologische Beteiligung von *MAD2L1* nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Zukünftige Untersuchungen sollten daher eine Untersuchung der Expression und Funktion von *MAD2L1* in Abhängigkeit vom Vorliegen der Risikovariante beinhalten.

6.4 Vom Genotyp zum Phänotyp

In dieser Arbeit über die zwei unbekanntenen kardiovaskulären Einflussgrößen, die Genvariante rs7678555 und die lange nicht-kodierende RNA *LINC02502*, konnte ein möglicher Wirkmechanismus vom Genotyp zum Phänotyp, der koronaren Herzkrankheit (Abbildung 27) erarbeitet werden. Diese Daten unterstützen die Annahme, dass *PDE5A* ein kausales Gen in der Pathophysiologie der KHK ist.

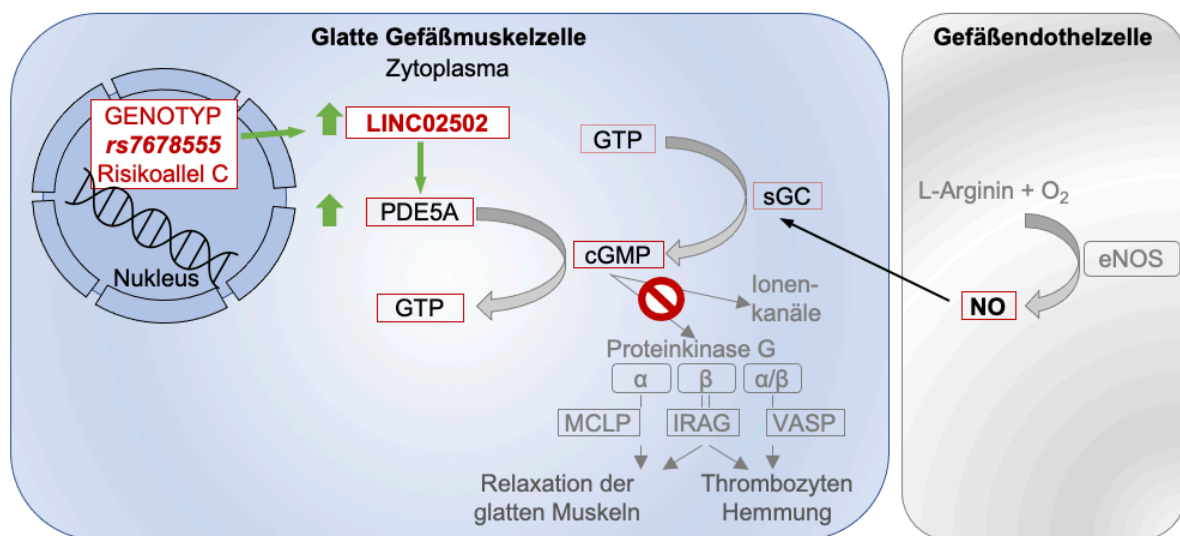


Abbildung 27 Vom Genotyp zu Phänotyp, der Signalweg der KHK-Risikovariante. Die Variante rs7678555 mit dem Risikoallel C erhöht das Risiko für eine koronare Herzkrankheit. Durch das Allel wird die Expression von der neuen langen nicht-kodierenden RNA *LINC02502* gesteigert. Das wiederum steigert die Expression des kausalen Gens *PDE5A*. Im NO-cGMP-Signalweg wird durch das vermehrt-gebildete *PDE5A* cGMP zu GTP umgewandelt. Weitere Interaktionen von cGMP werden so verhindert. Dadurch wird das atherogene Potential erhöht.

Die Risikovariante von rs7678555 mit Allel C zeigte regulatorische Eigenschaften. Sie könnte so zu einer gesteigerten Transkription von *LINC02502* führen. Ihre Funktion könnte sich organspezifisch auf die glatten Gefäßmuskelzellen des Herzens auswirken. Bei erhöhter Konzentration der lncRNA würde die Verfügbarkeit von *PDE5A* über einen bislang unbekanntem Mechanismus gesteigert werden. Durch die gesteigerte Verfügbarkeit von *PDE5A* würde cGMP degradiert und zahlreiche atheroprotektive Funktionen von cGMP nicht oder vermindert ausgeführt werden. Das proatherogene Potential würde steigen und somit auch das Erkrankungsrisiko für die KHK.

6.5 Ausblick

Die Ergebnisse zur regulatorischen Aktivität der Variante rs7678555 und zur Funktion der lncRNA *LINC02502* geben einen Einblick in bisher unbekannt pathophysiologische Prozesse und verdeutlichen die Bedeutung des NO-cGMP-Signalwegs bei der Atherosklerose. Sie stellen den Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dar, im Rahmen derer neue und individualisierte Therapieansätze entwickelt werden können. Ein individualisierter Therapieansatz mit Fokus auf den NO-cGMP-Signalweg könnte eine vielversprechende präventive Strategie sein.

7 Literaturverzeichnis

Antl, M., von Bruhl, M. L., Eiglsperger, C., Werner, M., Konrad, I., Kocher, T., Wilm, M., Hofmann, F., Massberg, S., & Schlossmann, J. (2007). IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. *Blood*, *109* (2), 552-559. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-026294>

Bender, A. T., & Beavo, J. A. (2006). Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Regulation to Clinical Use. *Pharmacological Reviews*, *58* (3), 488-520. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.5>

Bidus, M. A., Risinger, J. I., Chandramouli, G. V., Dainty, L. A., Litzi, T. J., Berchuck, A., Barrett, J. C., & Maxwell, G. L. (2006). Prediction of lymph node metastasis in patients with endometrioid endometrial cancer using expression microarray. *Clinical Cancer Research*, *12* (1), 83-88. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.Ccr-05-0835>

Bobryshev, Y. V. (2006). Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*, *37* (3), 208-222. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.10.007>

Brodie, A., Azaria, J. R., & Ofran, Y. (2016). How far from the SNP may the causative genes be? *Nucleic Acids Research*, *44* (13), 6046-6054. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw500>

Budworth, J., Meillerais, S., Charles, I., & Powell, K. (1999). Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *263* (3), 696-701. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1444>

- Butcher, R. W., & Sutherland, E. W. (1962). Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *Journal of Biological Chemistry*, 237, 1244-1250.
- Cabili, M. N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., & Rinn, J. L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes and Development*, 25 (18), 1915-1927. <https://doi.org/10.1101/gad.17446611>
- CARDIoGRAMplusC4D, Deloukas, P., Kanoni, S., Willenborg, C., Farrall, M., Assimes, T. L., Thompson, J. R., Ingelsson, E., Saleheen, D., Erdmann, J., Goldstein, B. A., Stirrups, K., König, I. R., Cazier, J. B., Johansson, A., Hall, A. S., Lee, J. Y., Willer, C. J., Chambers, J. C., Esko, T., ... Samani, N. J. (2013). Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nature Genetics*, 45 (1), 25-33. <https://doi.org/10.1038/ng.2480>
- Chen, Z., & Schunkert, H. (2021). Genetics of coronary artery disease in the post-GWAS era. *Journal of Internal Medicine*, 290 (5), 980-992. <https://doi.org/10.1111/joim.13362>
- Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R., & McGregor, J. L. (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 75 (3), 468-477. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.03.010>

- Dai, X., Wiernek, S., Evans, J. P., & Runge, M. S. (2016). Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. *World Journal of Cardiology*, 8 (1), 1-23. <https://doi.org/10.4330/wjc.v8.i1.1>
- Dang, T. A., Kessler, T., Wobst, J., Wierer, M., Braenne, I., Strom, T. M., Tennstedt, S., Sager, H. B., Meitinger, T., Erdmann, J., & Schunkert, H. (2021). Identification of a Functional PDE5A Variant at the Chromosome 4q27 Coronary Artery Disease Locus in an Extended Myocardial Infarction Family. *Circulation*, 144 (8), 662-665. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.120.052975>
- Dawber, T. R., Meadors, G. F., & Moore, F. E., Jr. (1951). Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *American journal of public health and the nation's health*, 41 (3), 279-281. <https://doi.org/10.2105/ajph.41.3.279>
- Duff, M. O., Olson, S., Wei, X., Garrett, S. C., Osman, A., Bolisetty, M., Plocik, A., Celniker, S. E., & Graveley, B. R. (2015). Genome-wide identification of zero nucleotide recursive splicing in Drosophila. *Nature*, 521 (7552), 376-379. <https://doi.org/10.1038/nature14475>
- Erdmann, J., Kessler, T., Munoz Venegas, L., & Schunkert, H. (2018). A decade of genome-wide association studies for coronary artery disease: the challenges ahead. *Cardiovascular Research*, 114 (9), 1241-1257. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy084>
- Erdmann, J., Stark, K., Esslinger, U. B., Rumpf, P. M., Koesling, D., de Wit, C., Kaiser, F. J., Braunholz, D., Medack, A., Fischer, M., Zimmermann, M. E., Tennstedt, S., Graf, E., Eck, S., Aherrahrou, Z., Nahrstaedt, J., Willenborg, C., Bruse, P., Braenne, I., ... Schunkert, H.

(2013). Dysfunctional nitric oxide signalling increases risk of myocardial infarction. *Nature*, 504 (7480), 432-436. <https://doi.org/10.1038/nature12722>

Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, 12 (12), 861-874. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>

Fagerberg, L., Hallström, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., Habuka, M., Tahmasebpoor, S., Danielsson, A., Edlund, K., Asplund, A., Sjöstedt, E., Lundberg, E., Szgyarto, C. A., Skogs, M., Takanen, J. O., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., ... Uhlén, M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13 (2), 397-406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>

Fasolo, F., Di Gregoli, K., Maegdefessel, L., & Johnson, J. L. (2019). Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 115 (12), 1732-1756. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz203>

Fatica, A., & Bozzoni, I. (2014). Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetics*, 15 (1), 7-21. <https://doi.org/10.1038/nrg3606>

Feil, R., & Kemp-Harper, B. (2006). cGMP signalling: from bench to bedside. Conference on cGMP generators, effectors and therapeutic implications. *EMBO reports*, 7 (2), 149-153. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400627>

- Fernández-Ortiz, A., Badimon, J. J., Falk, E., Fuster, V., Meyer, B., Mailhac, A., Weng, D., Shah, P. K., & Badimon, L. (1994). Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: Implications for consequences of plaque rupture. *Journal of the American College of Cardiology*, 23 (7), 1562-1569. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0735-1097\(94\)90657-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0735-1097(94)90657-2)
- Fink, H. A., Mac Donald, R., Rutks, I. R., Nelson, D. B., & Wilt, T. J. (2002). Sildenafil for male erectile dysfunction: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, 162 (12), 1349-1360. <https://doi.org/10.1001/archinte.162.12.1349>
- Franzen, O., Ermel, R., Cohain, A., Akers, N. K., Di Narzo, A., Talukdar, H. A., Foroughi-Asl, H., Giambartolomei, C., Fullard, J. F., Sukhvasi, K., Koks, S., Gan, L. M., Giannarelli, C., Kovacic, J. C., Betsholtz, C., Losic, B., Michoel, T., Hao, K., Roussos, P., ... Bjorkegren, J. L. (2016). Cardiometabolic risk loci share downstream cis- and trans-gene regulation across tissues and diseases. *Science*, 353 (6301), 827-830. <https://doi.org/10.1126/science.aad6970>
- Fried, M., & Crothers, D. M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 9 (23), 6505-6525. <https://doi.org/10.1093/nar/9.23.6505>
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288 (5789), 373-376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>

- Galiè, N., Ghofrani, H. A., Torbicki, A., Barst, R. J., Rubin, L. J., Badesch, D., Fleming, T., Parpia, T., Burgess, G., Branzi, A., Grimminger, F., Kurzyna, M., & Simonneau, G. (2005). Sildenafil Citrate Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *New England Journal of Medicine*, 353 (20), 2148-2157. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050010>
- Garner, M. M., & Revzin, A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Research*, 9 (13), 3047-3060. <https://doi.org/10.1093/nar/9.13.3047>
- Geng, Y. J., & Libby, P. (1995). Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *The American journal of pathology*, 147 (2), 251-266. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7639325>
- Gerber, Y., Weston, S. A., Enriquez-Sarano, M., Berardi, C., Chamberlain, A. M., Manemann, S. M., Jiang, R., Dunlay, S. M., & Roger, V. L. (2016). Mortality Associated With Heart Failure After Myocardial Infarction: A Contemporary Community Perspective. *Circulation: Heart Failure*, 9 (1), e002460. <https://doi.org/10.1161/circheartfailure.115.002460>
- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K., & Brown, M. S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76 (1), 333-337. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.333>

- Greutzmann, G., Ingram, J. A., Kelly, P. J., Gesteland, R. F., & Atkins, J. F. (1998). A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *RNA*, 4 (4), 479-486. <https://rnajournal.cshlp.org/content/4/4/479.full.pdf>
- Grote, P., Wittler, L., Hendrix, D., Koch, F., Wahrisch, S., Beisaw, A., Macura, K., Blass, G., Kellis, M., Werber, M., & Herrmann, B. G. (2013). The tissue-specific lncRNA Fendrr is an essential regulator of heart and body wall development in the mouse. *Developmental Cell*, 24 (2), 206-214. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.12.012>
- Guo, X., Liu, Y., Zheng, X., Han, Y., & Cheng, J. (2020). HOTTIP knockdown inhibits cell proliferation and migration via regulating miR-490-3p/HMGB1 axis and PI3K-AKT signaling pathway in ox-LDL-induced VSMCs. *Life Sciences*, 248, 117445. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117445>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15 (8), 509-524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., & Schlossmann, J. (2006). Function of cGMP-Dependent Protein Kinases as Revealed by Gene Deletion. *Physiological Reviews*, 86 (1), 1-23. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2005>
- Holdt, L. M., Beutner, F., Scholz, M., Gielen, S., Gabel, G., Bergert, H., Schuler, G., Thiery, J., & Teupser, D. (2010). ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30 (3), 620-627. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.109.196832>

- Holdt, L. M., Hoffmann, S., Sass, K., Langenberger, D., Scholz, M., Krohn, K., Finstermeier, K., Stahringer, A., Wilfert, W., Beutner, F., Gielen, S., Schuler, G., Gäbel, G., Bergert, H., Bechmann, I., Stadler, P. F., Thiery, J., & Teupser, D. (2013). Alu elements in ANRIL non-coding RNA at chromosome 9p21 modulate atherogenic cell functions through trans-regulation of gene networks. *Plos Genetics*, 9 (7), e1003588-e1003588. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003588>
- Holdt, L. M., Stahringer, A., Sass, K., Pichler, G., Kulak, N. A., Wilfert, W., Kohlmaier, A., Herbst, A., Northoff, B. H., Nicolaou, A., Gabel, G., Beutner, F., Scholz, M., Thiery, J., Musunuru, K., Krohn, K., Mann, M., & Teupser, D. (2016). Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. *Nat Commun*, 7, 12429. <https://doi.org/10.1038/ncomms12429>
- Hu, G., Lou, Z., & Gupta, M. (2014). The long non-coding RNA GAS5 cooperates with the eukaryotic translation initiation factor 4E to regulate c-Myc translation. *PloS One*, 9 (9), e107016-e107016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107016>
- Humbert, P., Niroomand, F., Fischer, G., Mayer, B., Koesling, D., Hinsch, K. D., Gausepohl, H., Frank, R., Schultz, G., & Bohme, E. (1990). Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *European Journal of Biochemistry*, 190 (2), 273-278. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15572.x>
- Hutchinson, J. N., Ensminger, A. W., Clemson, C. M., Lynch, C. R., Lawrence, J. B., & Chess, A. (2007). A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics*, 8, 39. [https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-](https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-39)

- Ide, N., & Lau, B. H. (1997). Garlic compounds protect vascular endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49 (9), 908-911. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06134.x>
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84 (24), 9265-9269. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>
- Kannel, W. B., Dawber, T. R., Kagan, A., Revotskie, N., & Stokes, J., 3rd. (1961). Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Annals of Internal Medicine*, 55, 33-50. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-55-1-33>
- Kass, D. A. (2012). Cardiac role of cyclic-GMP hydrolyzing phosphodiesterase type 5: from experimental models to clinical trials. *Current Heart Failure Reports*, 9 (3), 192-199. <https://doi.org/10.1007/s11897-012-0101-0>
- Kass, D. A., Takimoto, E., Nagayama, T., & Champion, H. C. (2007). Phosphodiesterase regulation of nitric oxide signaling. *Cardiovascular Research*, 75 (2), 303-314. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.02.031>
- Kawasaki, H., & Taira, K. (2003). Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells. *Nucleic Acids Research*, 31 (2), 700-707. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg158>

Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, D. (2002). *The human genome browser at UCSC*. Genome Research. Abgerufen am 10.12.2020 von https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr4%3A119530537%2D120126091&hgscid=1179144935_QOijwsQrJAu0h8bJPD5mpyzXAhao

Kessler, T., & Schunkert, H. (2021). Coronary Artery Disease Genetics Enlightened by Genome-Wide Association Studies. *JACC Basic Transl Sci*, 6 (7), 610-623. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2021.04.001>

Kessler, T., Vilne, B., & Schunkert, H. (2016). The impact of genome-wide association studies on the pathophysiology and therapy of cardiovascular disease. *EMBO Molecular Medicine*, 8 (7), 688-701. <https://doi.org/10.15252/emmm.201506174>

Kessler, T., Wobst, J., Wolf, B., Eckhold, J., Vilne, B., Hollstein, R., von Ameln, S., Dang, T. A., Sager, H. B., Moritz Rumpf, P., Aherrahrou, R., Kastrati, A., Bjorkegren, J. L. M., Erdmann, J., Lusi, A. J., Civelek, M., Kaiser, F. J., & Schunkert, H. (2017). Functional Characterization of the GUCY1A3 Coronary Artery Disease Risk Locus. *Circulation*, 136 (5), 476-489. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024152>

Ketelhuth, D. F. J., & Hansson, G. K. (2016). Adaptive Response of T and B Cells in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118 (4), 668-678. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306427>

- Kim, Y., Choi, J. W., Lee, J. H., & Kim, Y. S. (2019). Spindle assembly checkpoint MAD2 and CDC20 overexpressions and cell-in-cell formation in gastric cancer and its precursor lesions. *Human Pathology*, *85*, 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.10.029>
- Klattenhoff, C. A., Scheuermann, J. C., Surface, L. E., Bradley, R. K., Fields, P. A., Steinhauser, M. L., Ding, H., Butty, V. L., Torrey, L., Haas, S., Abo, R., Tabebordbar, M., Lee, R. T., Burge, C. B., & Boyer, L. A. (2013). Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell*, *152* (3), 570-583. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.003>
- Kubes, P., Suzuki, M., & Granger, D. N. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88* (11), 4651-4655. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4651>
- Kumamoto, M., Nakashima, Y., & Sueishi, K. (1995). Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Human Pathology*, *26* (4), 450-456. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90148-5](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90148-5)
- Kuret, T., Sodin-Šemrl, S., Mrak-Poljšak, K., Čučnik, S., Lakota, K., & Erman, A. (2019). Interleukin-1 β Induces Intracellular Serum Amyloid A1 Expression in Human Coronary Artery Endothelial Cells and Promotes its Intercellular Exchange. *Inflammation*, *42* (4), 1413-1425. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01003-3>
- L. Phan, Y. J., H. Zhang, W. Qiang, E. Shekhtman, D. Shao, D. Revoe, R. Villamarin, E. Ivanchenko, M. Kimura, Z. Y. Wang, L. Hao, N. Sharopova, M. Bihan, A. Sturcke, M. Lee, N. Popova, W. Wu, C. Bastiani, M. Ward, ... B. L. Kattman. (2020). *ALFA: Allele Frequency*

Aggregator. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Abgerufen am 04.05.2020 von www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/

Lao, K. H., Zeng, L., & Xu, Q. (2015). Endothelial and smooth muscle cell transformation in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 26 (5), 449-456. <https://doi.org/10.1097/-mol.0000000000000219>

Li, Y., & Benezra, R. (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science*, 274 (5285), 246-248. <https://doi.org/10.1126/science.274.5285.246>

Li, Y., Guo, Y., Chen, Y., Wang, Y., You, Y., Yang, Q., Weng, X., Li, Q., Zhu, X., Zhou, B., Liu, X., Gong, Z., & Zhang, R. (2015). Establishment of an interleukin-1beta-induced inflammation-activated endothelial cell-smooth muscle cell-mononuclear cell co-culture model and evaluation of the anti-inflammatory effects of tanshinone IIA on atherosclerosis. *Mol Med Rep*, 12 (2), 1665-1676. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3668>

Li, Z., Yang, L., Wang, J., Shi, W., Pawar, R. A., Liu, Y., Xu, C., Cong, W., Hu, Q., Lu, T., Xia, F., Guo, W., Zhao, M., & Zhang, Y. (2010). beta-Actin is a useful internal control for tissue-specific gene expression studies using quantitative real-time PCR in the half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis* challenged with LPS or *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29 (1), 89-93. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.021>

Libby, P. (2013). Mechanisms of Acute Coronary Syndromes and Their Implications for Therapy. *New England Journal of Medicine*, 368 (21), 2004-2013. <https://doi.org/10.1056/-NEJMra1216063>

- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgözoğlu, L., & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 5 (1), 56. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>
- Lin, C. S., Lau, A., Tu, R., & Lue, T. F. (2000). Identification of three alternative first exons and an intronic promoter of human PDE5A gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268 (2), 596-602. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2186>
- Liu, J., Ren, Y., Kang, L., & Zhang, L. (2014). Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin. *International Journal of Molecular Medicine*, 33 (5), 1341-1347. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1681>
- Llorente-Cortes, V., Martinez-Gonzalez, J., & Badimon, L. (2000). LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20 (6), 1572-1579. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.6.1572>
- Lloyd-Jones, D. M., Nam, B.-H., D'Agostino, S., Ralph B., Levy, D., Murabito, J. M., Wang, T. J., Wilson, P. W. F., & O'Donnell, C. J. (2004). Parental Cardiovascular Disease as a Risk Factor for Cardiovascular Disease in Middle-aged AdultsA Prospective Study of Parents and Offspring. *JAMA*, 291 (18), 2204-2211. <https://doi.org/10.1001/jama.291.18.2204>
- Marenberg, M. E., Risch, N., Berkman, L. F., Floderus, B., & de Faire, U. (1994). Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *New England Journal of Medicine*, 330 (15), 1041-1046. <https://doi.org/10.1056/nejm199404143301503>

McAllister-Lucas, L. M., Sonnenburg, W. K., Kadlecsek, A., Seger, D., Trong, H. L., Colbran, J. L., Thomas, M. K., Walsh, K. A., Francis, S. H., Corbin, J. D., & et al. (1993). The structure of a bovine lung cGMP-binding, cGMP-specific phosphodiesterase deduced from a cDNA clone. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (30), 22863-22873.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, 24, 17-27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422010>

Murrell, W. (1879). Nitro-glycerin as a remedy for angina pectoris. *The Lancet*, 113 (2890), 80-81. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)46032-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)46032-1)

Myers, R. H., Kiely, D. K., Cupples, L. A., & Kannel, W. B. (1990). Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study. *American Heart Journal*, 120 (4), 963-969. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(90\)90216-k](https://doi.org/10.1016/0002-8703(90)90216-k)

Napoli, C., D'Armiento, F. P., Mancini, F. P., Postiglione, A., Witztum, J. L., Palumbo, G., & Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *The Journal of Clinical Investigation*, 100 (11), 2680-2690. <https://doi.org/10.1172/JCI119813>

National Center of Biotechnology Information der U.S. National Library of Medicine. (11.06.2021). *LINC02502 long intergenic non-protein coding RNA 2502 [Homo sapiens*

(human) J. National Center of Biotechnology Information der U.S. National Library of Medicine. Abgerufen am 22.10.2020 von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100996694>

Nelson, C. P., Goel, A., Butterworth, A. S., Kanoni, S., Webb, T. R., Marouli, E., Zeng, L., Ntalla, I., Lai, F. Y., Hopewell, J. C., Giannakopoulou, O., Jiang, T., Hamby, S. E., Di Angelantonio, E., Assimes, T. L., Bottinger, E. P., Chambers, J. C., Clarke, R., Palmer, C. N. A., ... Deloukas, P. (2017). Association analyses based on false discovery rate implicate new loci for coronary artery disease. *Nature Genetics*, 49 (9), 1385-1391. <https://doi.org/10.1038/ng.3913>

Nikpay, M., Goel, A., Won, H. H., Hall, L. M., Willenborg, C., Kanoni, S., Saleheen, D., Kyriakou, T., Nelson, C. P., Hopewell, J. C., Webb, T. R., Zeng, L., Dehghan, A., Alver, M., Armasu, S. M., Auro, K., Bjornes, A., Chasman, D. I., Chen, S., ... Farrall, M. (2015). A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nature Genetics*, 47 (10), 1121-1130. <https://doi.org/10.1038/ng.3396>

Noh, J. H., Kim, K. M., McClusky, W. G., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. (2018). Cytoplasmic functions of long noncoding RNAs. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 9 (3), e1471-e1471. <https://doi.org/10.1002/wrna.1471>

Ohno, S. (1972). So much "junk" DNA in our genome. In: *Smith HH, editor. Evolution of Genetic Systems. New York: Gordon and Breach.*, 366–370.

Palinski, W., Rosenfeld, M. E., Ylä-Herttuala, S., Gurtner, G. C., Socher, S. S., Butler, S. W., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Steinberg, D., & Witztum, J. L. (1989). Low density

lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86 (4), 1372-1376. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.4.1372>

Palmer, R. M., Ferrige, A. G., & Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327 (6122), 524-526. <https://doi.org/10.1038/327524a0>

Palmer, R. M. J., Rees, D. D., Ashton, D. S., & Moncada, S. (1988). L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 153 (3), 1251-1256. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)81362-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)81362-7)

Porter, V. A., Bonev, A. D., Knot, H. J., Heppner, T. J., Stevenson, A. S., Kleppisch, T., Lederer, W. J., & Nelson, M. T. (1998). Frequency modulation of Ca²⁺ sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 274 (5), C1346-C1355. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.5.C1346>

Rhodin, J. A. (1962). Fine structure of vascular walls in mammals with special reference to smooth muscle component. *Physiological Reviews. Supplement*, 5, 48-87.

Robertson, B. E., Schubert, R., Hescheler, J., & Nelson, M. T. (1993). cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 265 (1), C299-C303. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.265.1.C299>

- Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. G., Feil, R., Hofmann, F., & Beavo, J. A. (2002). Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (5), 3310-3317. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106562200>
- Rybalkin, S. D., Rybalkina, I. G., Shimizu-Albergine, M., Tang, X.-B., & Beavo, J. A. (2003). PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain. *The EMBO Journal*, 22 (3), 469-478. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg051>
- Salvi, E., Kuznetsova, T., Thijs, L., Lupoli, S., Stolarz-Skrzypek, K., D'Avila, F., Tikhonoff, V., De Astis, S., Barcella, M., Seidlerova, J., Benaglio, P., Malyutina, S., Frau, F., Velayutham, D., Benfante, R., Zagato, L., Title, A., Braga, D., Marek, D., ... Staessen, J. A. (2013). Target sequencing, cell experiments, and a population study establish endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene as hypertension susceptibility gene. *Hypertension*, 62 (5), 844-852. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.113.01428>
- Samani, N. J., Erdmann, J., Hall, A. S., Hengstenberg, C., Mangino, M., Mayer, B., Dixon, R. J., Meitinger, T., Braund, P., Wichmann, H.-E., Barrett, J. H., König, I. R., Stevens, S. E., Szymczak, S., Tregouet, D.-A., Iles, M. M., Pahlke, F., Pollard, H., Lieb, W., ... Schunkert, H. (2007). Genomewide Association Analysis of Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*, 357 (5), 443-453. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa072366>
- Schunkert, H., König, I. R., Kathiresan, S., Reilly, M. P., Assimes, T. L., Holm, H., Preuss, M., Stewart, A. F., Barbalic, M., Gieger, C., Absher, D., Aherrahrou, Z., Allayee, H., Altshuler, D., Anand, S. S., Andersen, K., Anderson, J. L., Ardissino, D., Ball, S. G., Balmforth, A. J., ..., CARDIoGRAM Consortium Samani, N. J. (2011). Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nature Genetics*, 43 (4), 333-338. <https://doi.org/10.1038/ng.784>

Shi, Y. X., Zhu, T., Zou, T., Zhuo, W., Chen, Y. X., Huang, M. S., Zheng, W., Wang, C. J., Li, X., Mao, X. Y., Zhang, W., Zhou, H. H., Yin, J. Y., & Liu, Z. Q. (2016). Prognostic and predictive values of CDK1 and MAD2L1 in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 7 (51), 85235-85243. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13252>

Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E. K., Hulten, L. M., Wiklund, O., Innerarity, T. L., & Boren, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, 417 (6890), 750-754. <https://doi.org/10.1038/nature00804>

Strydom, H. C. (2001). The development of calcium deposits in atherosclerotic lesions and their persistence after lipid regression. *American Journal of Cardiology*, 88 (2a), 16e-19e. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(01\)01713-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(01)01713-1)

Statistisches Bundesamt Destatis. (2019). *Sterbefälle durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen insgesamt 2017*. Abgerufen am 13.02.2020 von <https://www.destatis.de/DE/Themen/-Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html>

Stone, J. R., & Marletta, M. A. (1994). Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, 33 (18), 5636-5640. <https://doi.org/10.1021/bi00184a036>

The ENCODE Project Consortium, Dunham, I., Kundaje, A., Aldred, S. F., Collins, P. J., Davis, C. A., Doyle, F., Epstein, C. B., Frietze, S., Harrow, J., Kaul, R., Khatun, J., Lajoie, B. R., Landt, S. G., Lee, B.-K., Pauli, F., Rosenbloom, K. R., Sabo, P., Safi, A., Sanyal, A., ...

Gasper, C. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489 (7414), 57-74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>

Vacek, T. P., Rehman, S., Neamtu, D., Yu, S., Givimani, S., & Tyagi, S. C. (2015). Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. *Vascular health and risk management*, 11, 173-183. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S68415>

Virani, S. S., Alonso, A., Aparicio, H. J., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Cheng, S., Delling, F. N., Elkind, M. S. V., Evenson, K. R., Ferguson, J. F., Gupta, D. K., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Lee, C. D., Lewis, T. T., ... Tsao, C. W. (2021). Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 143 (8), e254-e743. <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000950>

Weltgesundheitsorganisation (1958). Classification of atherosclerotic lesions; report of a study group. *World Health Organization Technical Report Series*, 57 (143), 1-20.

Weltgesundheitsorganisation (2018). *The top 10 causes of death*. Abgerufen am 25.02.2020 von <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

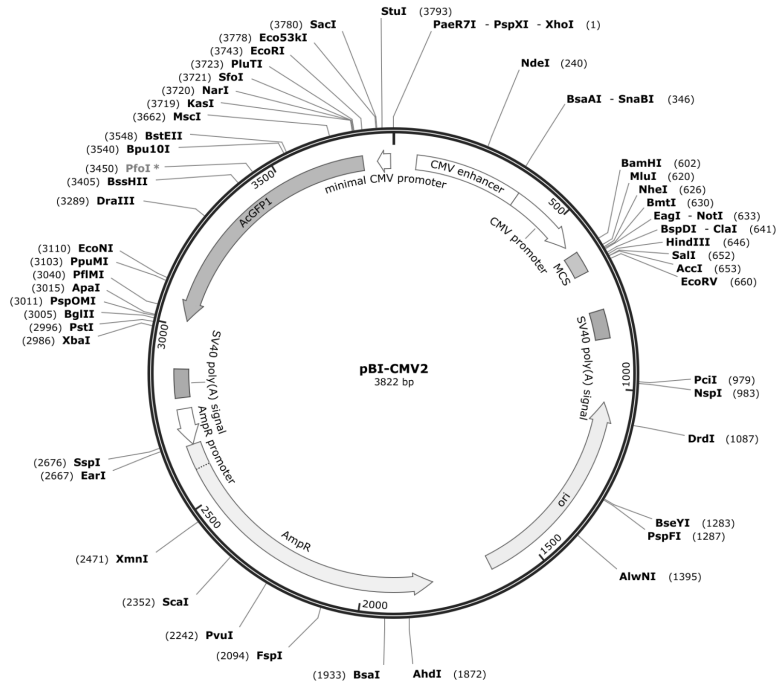
Wobst, J., Schunkert, H., & Kessler, T. (2018). Genetic alterations in the NO-cGMP pathway and cardiovascular risk. *Nitric Oxide*, 76, 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.03.019>

- Yoon, J.-H., Abdelmohsen, K., Kim, J., Yang, X., Martindale, J. L., Tominaga-Yamanaka, K., White, E. J., Orjalo, A. V., Rinn, J. L., Kreft, S. G., Wilson, G. M., & Gorospe, M. (2013). Scaffold function of long non-coding RNA HOTAIR in protein ubiquitination. *Nature communications*, 4, 2939-2939. <https://doi.org/10.1038/ncomms3939>
- Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., Lisheng, L., & Investigators, I. S. (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*, 364 (9438), 937-952. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17018-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17018-9)
- Zeiber, A. M., Fisslthaler, B., Schray-Utz, B., & Busse, R. (1995). Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circulation Research*, 76 (6), 980-986. <https://doi.org/10.1161/01.res.76.6.980>
- Zeng, Y., & Cullen, B. R. (2002). RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA* 8(7), 855-860. <https://doi.org/10.1017/s1355838202020071>
- Zhang, B., Dong, Y., & Zhao, Z. (2019). LncRNA MEG8 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, migration and apoptosis by targeting PPARalpha. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 510 (1), 171-176. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.074>
- Zhao, Y., & Marletta, M. A. (1997). Localization of the heme binding region in soluble guanylate cyclase. *Biochemistry*, 36 (50), 15959-15964. <https://doi.org/10.1021/bi971825x>

8 Anhang

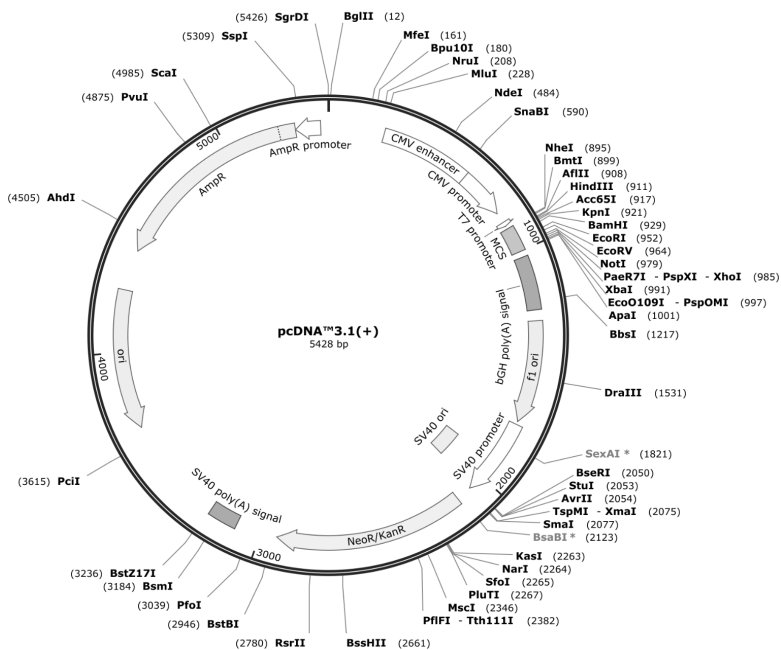
Anhang 1 Vektorkarte von pBI-CMV2

Created with SnapGene®

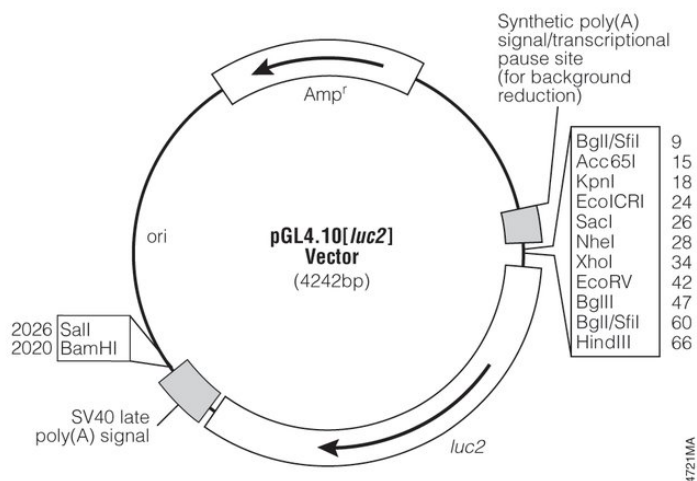


Anhang 2 Vektorkarte von pcDNA3.1(+)

Created with SnapGene®



Anhang 3 Vektorkarte von pGL4.10[luc2]



Anhang 4 Sequenz LINC02502

5'

attacaactagttaccattctctgtatttaaccagcggaactacatatcggaactaaaattattggagagattctcagaaccatact
 agaaacattaccgaggtctcatctagttttctctactgccttccaaggttctactgtacaatttctcattgaaaactgcctcagcattttt
 aagaagacatcacttccccctggggaagaaagaactcaatgacttgaagaaactgatgcttcagggtaccttgaaaaattcagct
 ggttttgatgagaacagtcaatggggctgttaggggtcctggcggatgcttaggcagtggtgtcctggattccagggaatgcc
 caaacccagtgatgcaggaccaggactccatctgctcatttctcataaggttggtcacagggtcatctgctgagaagggtcatcttct
 ccgttctactgggctcactgaatgaggacattccaagatcccagctcatctcatttgagctttccttttctaataccatgcatctgtgtt
 tgagaaaatctccaagtgatagatcttctatttccgatttctccatgtgtattactttttttaataataataataacacatattttggt
 gtgtacatgca

3'

Anhang 5 Region Einzelnukleotid-Polymorphismus rs7678555 mit 124 bp um (unterstrichen)

5'

gttctcactcataagcagaagctgaacaatgagaacacatggaaagagggagggggaacaacaccactggggcctgtcaggg
 gtcatggggaggaggggaggagaaaatcaggacaaatagctaagcattatgaggcttaaaccctagatgacaggttgatag
 gtgcagcaaaccatggcacacgtatacctatgtaacaaacctgcacgttctgcacatgtatcccagaactaaagtaaaata
aaaataaaaaaaaaaggaggccaactagatgctgcctacaagaaaccttctacttaaaaaaaaaacacatagactgaa
 agtgaaggagtaggaaaagacattctgtgtgattggaagcagaacaggaataggtatacttagtaaaagcagattacaatttaag
 gttgtaaaaatgagataaagggtcactatatttatagttcaa

3'

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt und bestärkt haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Schunkert, dem Klinikdirektor der Erwachsenenkardiologie am Deutschen Herzzentrum München. Unter seiner Leitung konnte ich meine Promotion in der Herz- und Kreislaufforschung anfertigen. Mit seiner beachtlichen Erfahrung und fachlichen Expertise betreute er meine experimentelle Forschung. Er förderte mich darüber hinaus bei meiner persönlichen Entwicklung und meinem Werdegang zur Ärztin.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. Thorsten Kessler für seine herausragende Unterstützung bedanken. Mit seiner positiven und progressiven Art half er mir das Projekt weiterzuentwickeln und somit herausragende Fortschritte zu erzielen. Mit großem Engagement half er mir jederzeit als Ansprechpartner.

Für die Einführung in die Techniken der Zell- und Molekularbiologie möchte ich besonders Frau Dr. rer. nat. Jana Wobst bedanken. Ohne ihre Unterstützung hätte meine Doktorarbeit nicht dieses Niveau, auf dem sie sich letztendlich befindet, erreichen können.

Mein Dank geht an die technische und seelische Unterstützung von Tan An Dang, Dr. rer. nat. Julia Werner, Dr. rer. nat. Barbara Stiller, Michael Winkler, Dr. med. Bernhard Wolf, Prof. Dr. med. Hendrik Sager, Julia Hinterdobler, Benedikt Miritsch, Jan Hettwer, Dr. med. habil. Michael Hristov, Maria Isabel Castellanos, Marion Cranmore, Ann-Marie Kahlert und Matthias Richter.

Ein außerordentlicher Dank geht an meine Eltern, meinen Bruder und meine Freunde, die mich während der Promotion und während meines Studiums begleitet und bedingungslos unterstützt haben.

