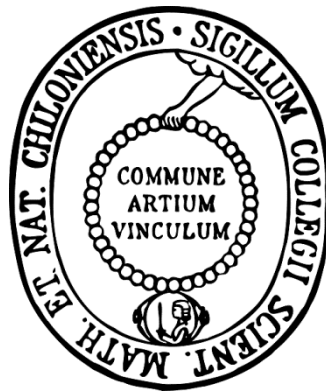


Funktionelle Charakterisierung
der langen nichtkodierenden RNA *ANRIL*
in der Ätiologie
der Parodontitis und Atherosklerose

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von
Dipl.-Biol. Gregor Bochenek

Kiel, 2013

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Philip Rosenstiel

Zweite Gutachterin:

Prof. Dr. Ruth Schmitz-Streit

Tag der mündlichen Prüfung:

04.03.2014

Zum Druck genehmigt:

04.03.2014

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Parodontitis	1
1.2 Atherosklerose	4
1.3 Assoziationen zwischen Parodontitis und Atherosklerose	7
1.4 Genetische Assoziationsstudien.....	8
1.5 <i>ANRIL</i> als gemeinsames Risikogen der Parodontitis und Atherosklerose.....	11
1.6 Lange nichtkodierende RNAs.....	15
1.7 Ziel der Arbeit.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Geräte.....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Chemikalien/ Reagenzien	24
2.1.4 Kits.....	26
2.1.5 Primer.....	28
2.1.6 Enzyme	31
2.1.7 Lösungen und Puffer.....	31
2.1.8 Bakteriennährmedien/-nährboden.....	32
2.1.9 Zellkulturmedien.....	32
2.1.10 Antikörper	33
2.1.11 Kompetente Bakterien	33
2.1.12 Zelllinien.....	33
2.1.13 Vektoren.....	33
2.1.14 Software und Internet-Seiten	33
2.2 Methoden	35

2.2.1 Zellbiologische Methoden	35
2.2.1.1 Zellkultivierung.....	35
2.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte.....	35
2.2.1.3 Transfektion eukaryotischer Zellen	36
2.2.1.4.1 Transfektion mit FuGENE.....	36
2.2.1.4.2 Transfektion mit jetPEI.....	36
2.2.1.5 Generierung stabiler Zelllinien	37
2.2.1.6 Induktion stabil transfizierter Zellen.....	37
2.2.1.7 Kryokonservierung stabil transfizierter Zellen	38
2.2.1.8 Auftauen kryokonservierter Zellen	38
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	38
2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	38
2.2.2.2 DNA Aufreinigung aus Agarosegelen	39
2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.2.2.4 Isolierung genomischer DNA	39
2.2.2.5 Isolierung zellulärer RNA.....	40
2.2.2.6 cDNA Synthese.....	40
2.2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
2.2.2.8 Sequenzierung.....	42
2.2.2.9 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR).....	43
2.2.2.10 Klonierung	44
2.2.2.10.1 Klonierung einer kurzen <i>ANRIL</i> Variante in ein Überexpressions-Plasmid...45	
2.2.2.10.2 Klonierung eines shRNA-Konstrukts zur Repression kurzer <i>ANRIL</i> Varianten	46
2.2.2.11 Präparation von Plasmid DNA (Mini Präparation).....	48
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	48
2.2.3.1 Isolation zellulärer Proteine	48

2.2.3.1.1 Isolation denaturierter Gesamtproteinlysate	48
2.2.3.1.2 Zellfraktionierung	48
2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	49
2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	49
2.2.2.4 Western-Blot und Immundetektion.....	50
2.2.5 RNA-Analysen.....	51
2.2.5.1 Mikrochip-Hybridisierung	51
2.2.5.2 Statistische Auswertung von Mikroarray-Daten.....	53
2.2.5.3 Gen-Ontologie Analysen	54
2.2.6 Genetische Analysen.....	54
2.2.6.1 Studienpopulationen	54
2.2.6.2 Isolierung und Amplifizierung genomischer DNA.....	57
2.2.6.3 Genotypisierung und statistische Analysen	57
3 Ergebnisse	59
3.1 Etablierung eines induzierbaren Repressionssystems.....	59
3.1.1 Überprüfung der stabil transfizierten T-REx-293 Zellen.....	59
3.1.2 Validierung der <i>cis</i> -regulatorischen <i>ANRIL</i> Funktion auf <i>CDKN2A/B</i> in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen	62
3.2 Genomweite Expressionsprofilierung.....	65
3.2.1 Aufarbeitung der Mikroarray-Daten	65
3.2.2 Statistische, funktionelle Analyse mittels Gostat.....	66
3.2.3 Identifizierung potentieller Kandidatengene.....	68
3.3 Validierung ausgewählter, durch Mikroarray-Analysen identifizierter Kandidatengene	72
3.3.1 Validierung in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen	72
3.3.2 Validierung in transient transfizierten HeLa Zellen	76
3.3.3 Reversible Expression der Zielgene nach Tetracyclin-Depletion.....	79
3.4 Überexpression einer spezifischen <i>ANRIL</i> Spleißvariante	81

3.4.1 Identifizierung gewebsspezifischer Spleißvarianten in humanen gingivalen Fibroblasten.....	81
3.4.2 Überexpression des Transkriptes EU741058 in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen	82
3.5 TGF- β Stimulation humaner gingivaler Fibroblasten.....	84
3.6 6 <i>In silico</i> Analyse der genomischen Regionen von <i>ADIPOR1</i> , <i>VAMP3</i> und <i>C11ORF10</i>	85
3.7 Genetische Analysen der chromosomalen Regionen von <i>ADIPOR1</i> , <i>C11ORF10</i> und <i>VAMP3</i>	87
3.7.1 Genetische Analyse der <i>VAMP3</i> Region	87
3.7.2 Genetische Analyse der <i>C11ORF10</i> Region.....	90
3.7.2 Genetische Analyse der <i>ADIPOR1</i> Region.....	91
4 Diskussion.....	93
4.1 Wahl der Versuchsparameter für die Identifizierung <i>trans</i> -regulierter Gene	93
4.1.1 Evaluierung der zu untersuchenden <i>ANRIL</i> Spleißvarianten für die Identifizierung <i>trans</i> -regulierter, krankheitsrelevanter Gene der Atherosklerose und Parodontitis.....	93
4.1.2 Selektionskriterien für das gewählte Expressionssystem	94
4.2 Identifizierung <i>ANRIL</i> regulierter Gene.....	95
4.2.1 Statistische Aufarbeitung der Mikroarray Daten	95
4.2.2 Einordnung der durch Mikroarray-Experimente identifizierten Gene in biologische Prozesse.....	97
4.2.3 <i>ADIPOR1</i> , <i>C11ORF10</i> und <i>VAMP3</i> werden am stärksten durch die kurzen <i>ANRIL</i> Spleißvarianten reguliert.....	99
4.4 Validierung des regulatorischen Einflusses der kurzen <i>ANRIL</i> Spleißvarianten auf <i>ADIPOR1</i> , <i>C11ORF10</i> und <i>VAMP3</i>	102
4.4.1 Untersuchung möglicher Off-Target Effekte.....	102
4.4.2 Überexpression des EU741058 Transkriptes in einer stabilen Zelllinie.....	104
4.5 Stimulation humaner gingivaler Fibroblasten mit TGF- β	105

4.6 <i>In silico</i> Analyse der chromosomalen Regionen von <i>ADIPOR1</i> , <i>C11ORF10</i> und <i>VAMP3</i>	107
4.7 Genetische Analysen der chromosomalen Regionen von <i>C11ORF10</i> und <i>VAMP3</i>	108
5. Fazit und Ausblick.....	112
6 Zusammenfassung.....	114
7 Summary.....	115
Literaturverzeichnis.....	116
Anhang.....	132
Abbildungsverzeichnis.....	144
Tabellenverzeichnis.....	146
Abkürzungsverzeichnis.....	148
Lebenslauf.....	151
Eidesstattliche Erklärung.....	153
Danksagung.....	154

1 Einleitung

1.1 Parodontitis

Die Parodontitis ist eine der am häufigsten auftretenden infektiös-entzündlichen Erkrankungen und eine der Hauptursachen für Knochenverlust (Hugoson et al., 2008; Loe et al., 1986; Morris et al., 2001). Unbehandelt kann sie von einzelner Zahnverlust bis hin zu totaler Zahnlosigkeit führen (Listgarten, 1986). Bei der Krankheit handelt es sich um eine durch einen komplexen Biofilm induzierte, chronische Entzündung des aus Gingiva, Wurzelhaut, Wurzelzement und Alveolarknochen bestehenden Zahnhalteapparates (Parodontium) (Armitage, 1999). Generell wird die Krankheit in zwei Hauptformen unterteilt, der chronischen Parodontitis (CP) und der aggressiven Parodontitis (AgP). Während die CP durch einen langsamen Krankheitsverlauf gekennzeichnet ist und hauptsächlich Menschen über 35 Jahre betrifft (Lindhe et al., 1999), ist die AgP durch einen schnellen Krankheitsverlauf bei jungen Menschen (< 35 Jahren) charakterisiert (Lang et al., 1999). Epidemiologische Studien zeigten, dass weltweit 5-15% der über 40-Jährigen von der CP betroffen sind (Petersen, 2003), wohingegen die AgP lediglich bei 2% der globalen Population auftritt (Albandar et al., 1997).

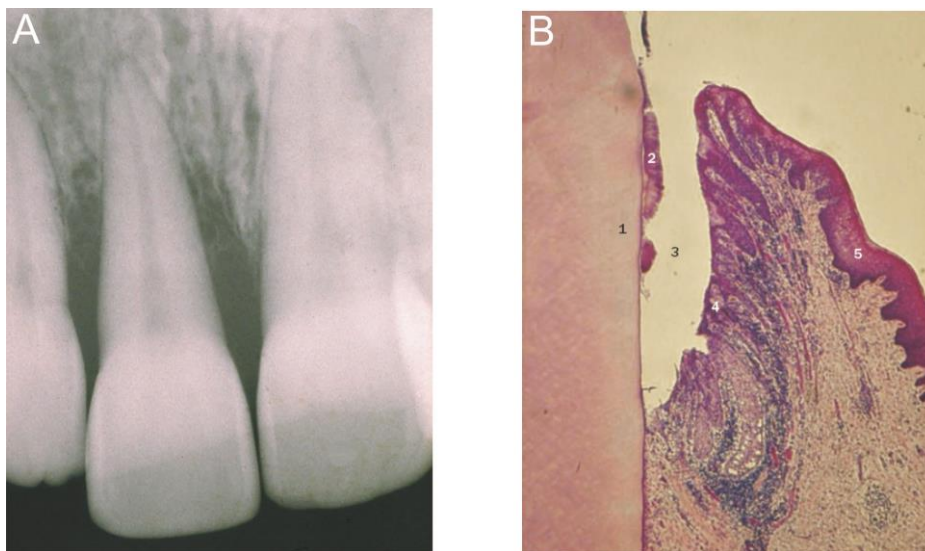


Abbildung 1 Klinische Bilder der Parodontitis.

A. Röntgenaufnahme des Oberkiefers mit fortgeschrittener Parodontitis an den Schneidezähnen und daraus folgendem Abbau des Alveolarknochens. (Pihlstrom *et al.*, 2005)

B. Dünnschliffmikroskopische Aufnahme einer Zahnwurzeloberfläche: Zahnstein (1), Plaque (2), parodontale Tasche (3), entzündetes Taschen- (4) und Gingivalepithel (5). (de Pablo et al., 2009)

Das initiale pathogene Ereignis der Parodontitis ist die Akkumulation oraler Bakterien, welche entlang der Zahnoberfläche in einem Biofilm eingebettet sind. In den meisten Fällen führt der bakterielle Biofilm zu einer vorübergehenden Entzündungsreaktion, welche als Gingivitis bezeichnet wird und klinisch durch lokale Schwellungen und Rötungen des Gewebes gekennzeichnet ist (Abbas et al., 1986; van der Velden et al., 1985). Die Gingivitis ist ein reversibler Zustand, welcher normalerweise durch ausreichende Mundhygiene kontrolliert werden kann (Löe et al., 1965). Wenn der Biofilm nicht entfernt wird, kann er in Größe und Komplexität wachsen, was in einer destruktiven chronischen Infektion des Gewebes enden kann. Durch die Bildung von Zahnfleischtaschen entsteht ein ökologisches Umfeld für anaerobe oder fakultativ anaerobe gramnegative Bakterien, zu denen unter anderem parodontale Pathogene wie *Porphyromonas gingivalis* (P.g.), *Prevotella intermedia* (P.i.) und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.) zählen (Kumar et al., 2006; Noiri et al., 2001; Socransky et al., 1998).

Zwar ist das Vorhandensein parodontaler Pathogene notwendig, aber nicht ausreichend für den Ausbruch der Parodontitis. So haben mehrere Studien gezeigt, dass auch die Wirtsreaktion eine wichtige Rolle in der Schädigung des parodontalen Gewebes spielt (Graves et al., 2008; Preshaw, 2008). Die angeborene Immunantwort des Wirts beinhaltet das Erkennen mikrobieller Komponenten als Gefahrensignal durch Wirtszellen und die anschließende Produktion von Entzündungsmediatoren. Zytokine des angeborenen Immunsystems werden sowohl durch residente Zellen (z.B. Epithelzellen und Fibroblasten), als auch durch Phagozyten (z.B. neutrophile Granulozyten und Makrophagen) in dem parodontalen Gewebe gebildet. Eine Konsequenz der erhöhten Konzentration von Entzündungsmediatoren ist die Resorption des Alveolarknochens aufgrund eines veränderten Verhältnisses des Rezeptor Aktivators von NF- κ B (RANK) –Liganden (RANK-L) zu Osteoprotegerin (OPG) (Nakashima et al., 2000).

Während der Knochenhomöostase wird das Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau durch das Verhältnis RANK-L zu OPG reguliert (Boyle et al., 2003; Nagasawa et al., 2007). RANK-L wird auf verschiedenen Zellen exprimiert und bindet an den auf Osteoklasten-Vorläufern exprimierten RANK. Dadurch differenzieren die Osteoklasten-Vorläufer zu makrophagenähnlichen Zellen, welche ihrerseits Enzyme sezernieren, die zum Knochenabbau führen (Hsu et al., 1999; Nakagawa et al., 1998). OPG ist ein löslicher RANK-L Rezeptor, der die Interaktion von RANK mit RANK-L verhindert (Simonet et al., 1997; Tsuda et al., 1997). Bei hohen OPG-Konzentrationen bindet RANK-L somit nicht an

die Osteoklasten-Vorläufer, wodurch der Knochenabbau verhindert wird (Mizuno et al., 1998).

Zusätzlich zu der Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen parodontale Bakterien auch zu einer Mobilisierung des adaptiven Immunsystems. Die Aktivierung der adaptiven Immunantwort beginnt mit der Erkennung der Pathogene durch antigenpräsentierende Zellen (Cutler and Jotwani, 2004). Nach ihrer Aktivierung exprimieren reife dendritische Zellen kostimulierende Moleküle und Zytokine, welche die anschließende Polarisierung und Aktivierung von antigenspezifischen Lymphozyten auslösen (Cutler and Jotwani, 2004). Interferon-Gamma (IFN- γ), das charakteristische Zytokin der Th1-Zellen, ist ein Hauptfaktor der Phagozytenaktivierung (Schroder et al., 2004). Es stimuliert die Osteoklastenbildung und den Knochenabbau durch antigenvermittelte T-Zellaktivierung und Chemoattraktion von RANK-L exprimierenden Zellen (Gao et al., 2007; Repeke et al., 2010).

1.2 Atherosklerose

Kardiovaskuläre Krankheiten gehören mit 16,7 Millionen Toten jährlich zu den Haupttodesursachen auf der Welt (Dahlöf, 2010; Lloyd-Jones, 2010). Der den Krankheiten zugrundeliegende pathologische Prozess ist die Atherosklerose, eine sich langsam entwickelnde chronische Störung der großen und mittleren Arterien. Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine degenerative Erkrankung der Gefäßwand mit einer entzündlichen Komponente, die durch ausgeprägte immunologische Aktivität charakterisiert ist. Die Atherosklerose beinhaltet die Bildung arterieller Läsionen (Plaque), die durch Entzündungsreaktion, Lipidansammlung, Zelltod und Fibrose gekennzeichnet sind (Ross et al., 1984; Stary et al., 1995). Atherosklerotische Läsionen sind asymmetrische, fokale, subendotheliale Verdickungen der Intima, der innersten Schicht der Gefäße. Sie bestehen aus Zellen, Bindegewebelementen und Lipiden (Stary et al., 1995). Dem Plaque geht eine Akkumulation lipidbeladener Zellen unter dem Endothelium voraus (fatty streak) (Stary et al., 1994). Den Hauptbestandteil der Zellen bilden Makrophagen und T-Zellen. Fatty streaks lassen sich bereits bei jungen Menschen finden, verursachen zunächst zwar keine Symptome, können sich jedoch im Laufe des Lebens zu einer atherosklerotischen Läsion entwickeln. In der Mitte eines Plaques bilden Schaumzellen zusammen mit Lipidtröpfchen eine Kernregion, die von Zellen der glatten Muskulatur und kollagenreicher Matrix umgeben ist. T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen infiltrieren die Läsion und sind vor allem an Stellen anzutreffen, an denen das Atherom wächst (Jonasson et al., 1986; Kovanen et al., 1995; Stary et al., 1995). Von einem Myokardinfarkt spricht man, wenn das Atherom den Blutfluss durch die koronaren Arterien verhindert. Dabei ist die Thrombusbildung an der Oberfläche des Plaques auslösend für den Infarkt (Davies, 1996; Hackett et al., 1988). Für die Thrombusbildung gibt es zwei Hauptgründe: Plaqueruptur und Endothelerosion. Durch die Plaqueruptur, welche bei 60-70% der Fälle beobachtet werden kann, tritt prothrombisches Material wie Phospholipide oder Zelladhäsionsmoleküle aus dem Plaquekern (Falk et al., 1995). Plaquerupturen kommen besonders häufig vor, wenn die faserige Kappe des Plaques dünn oder partiell zerstört ist. An diesen Stellen findet man aktivierte Immunzellen, die verschiedene Entzündungsmoleküle und proteolytische Proteine produzieren (van der Wal et al., 1994). Dadurch wird die Kappe weiter geschwächt und Zellen im Inneren des Kerns aktiviert, was den ehemals stabilen in einen instabilen Plaque transformiert, welcher letztlich bricht und die Thrombusbildung induziert.

Hypercholesterinämie und hoher Blutdruck, zwei der Hauptrisikofaktoren der Atherosklerose, verursachen eine Aktivierung des Endothels in großen und mittelgroßen Arterien. Wenn die Plasmaspiegel der cholesterinreichen Lipoproteine niedriger Dichte (LDL; Low Density Lipoprotein) steigen, infiltrieren die Lipoproteine die Arterienwand in einem Maß, das die Fähigkeit ihrer Eliminierung aus der Wand übersteigt, wodurch sie in der extrazellulären Matrix gespeichert werden (Camejo et al., 1998a). Hierbei handelt es sich um das initiale Ereignis der Atherosklerose (Skálén et al., 2002). Die Infiltration und Speicherung von LDL in die arterielle Intima initiiert eine Entzündungsreaktion in der arteriellen Wand (Leitinger, 2003; Skalen et al., 2002). Enzymatische oder oxidative Modifikationen des LDL in der Intima führen zu einer Freisetzung von Phospholipiden, die endotheliale Zellen aktivieren können (Kume et al., 1992). Aktivierte Endothelzellen exprimieren verschiedene Adhäsionsmoleküle, die das Entlangrollen von Blutzellen an der vaskulären Oberfläche und ihre Adhäsion an der aktivierten Stelle erlauben (Eriksson et al., 2001). Nachdem Monozyten an das Endothel der betroffenen Arterie gebunden haben, migrieren sie in den subendothelialen Raum. Diese subendotheliale Migration wird durch Chemokine in der Intima ausgelöst. (Takeya et al., 1993).

Das Zytokin M-CSF (Makrophagen Kolonie stimulierende Faktor), das in der entzündeten Intima gebildet wird, induziert die Differenzierung eintretender Monozyten zu Makrophagen, was einen notwendigen Schritt der Atherosklerose darstellt (Smith et al., 1995). Durch die Aufnahme von Lipiden und Cholesterinestern durch die Makrophagen transformieren diese zu Schaumzellen, den prototypischen Zellen der Atherosklerose (Aviram, 1995; Khoo et al., 1992). Ferner produzieren aktivierte Makrophagen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche wiederum einen Einfluss auf die Lipoprotein-Oxidation und Zytotoxizität haben (Sugiyama et al., 2001). Darüber hinaus sezernieren sie proteolytische Enzyme, die Komponenten der Matrix degradieren, was zu einer Destabilisierung des Plaques und folglich zu einem erhöhten Plaque-Bruchrisiko führt. (Jormsjö et al., 2002; Libby and Aikawa, 2002; Liu et al., 2004; Shah et al., 1995). T-Zellen werden parallel zu Makrophagen durch denselben Mechanismus, der Adhäsionsmoleküle und Chemokine beinhaltet, in die Intima rekrutiert (Jonasson et al., 1986). T-Lymphozyten treten in die Intima ein und werden durch die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen oder dendritischen Zellen aktiviert. Daraufhin können sie zu Th1 oder Th2 Zellen differenzieren, wobei den Haupttyp der läSIONalen T-Zellen Th1 Zellen ausmachen (Frostegård et al., 1999). In den Plaques produzieren Th1 Zellen proinflammatorische Zyto- und Chemokine, die die Entwicklung der

atherosklerotischen Plaquevulnerabilität durch die Rekrutierung weiterer Immunzellen vorantreiben. Dadurch wird die Entzündungsreaktion fortgesetzt, was zu einer schwächeren Synthese von Kollagen durch die glatten Muskelzellen sowie zu einer erhöhten Synthese von Metalloproteinasen führt. Dies wiederum beeinflusst die Beschaffenheit der extrazellulären Matrix und setzt die Stabilität des Plaques hinab (Hansson and Libby, 2006).

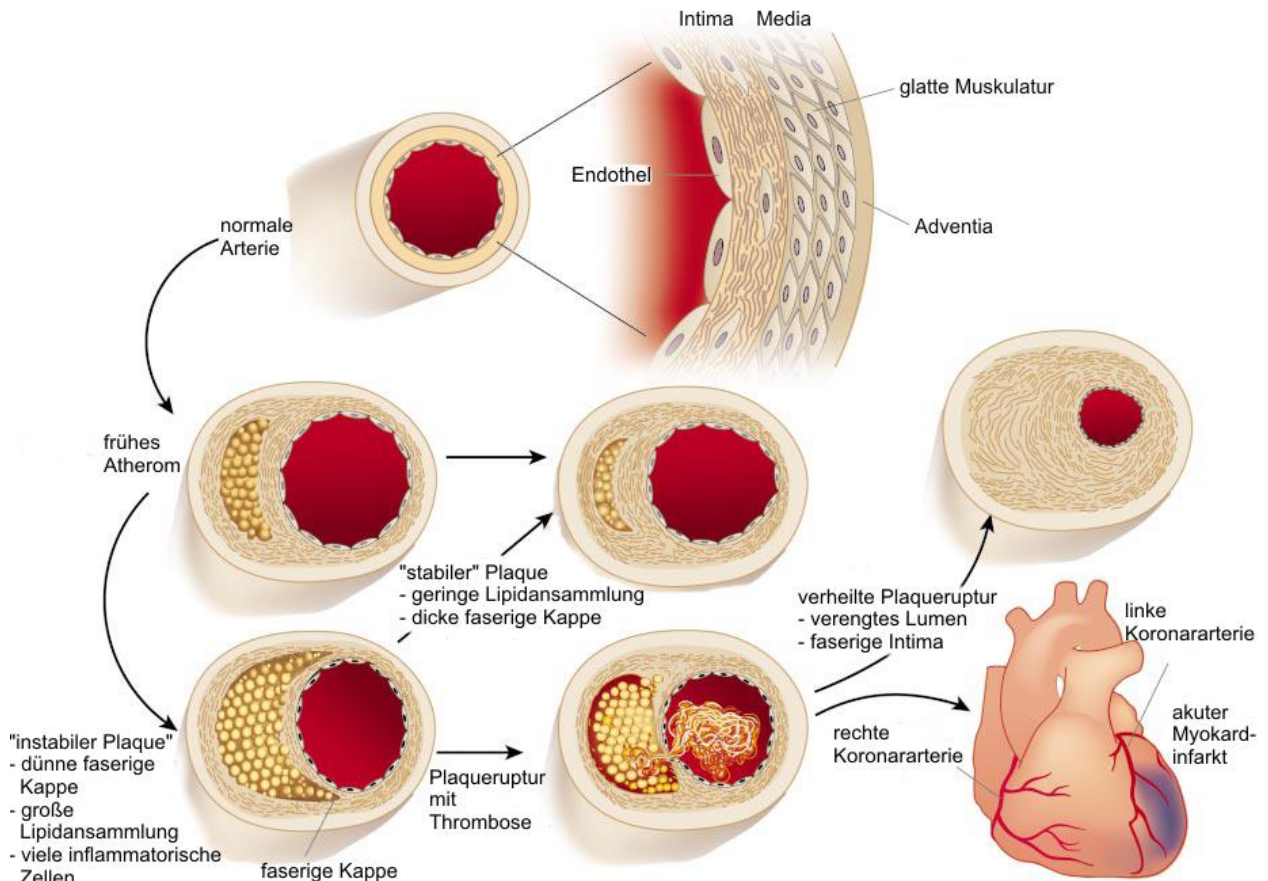


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Atherom-Entwicklung.

Eine normale Koronararterie hat einen typischen trilaminaren Aufbau. Die Endothelzellen treten mit dem Blutstrom in arteriellen Lumen in Kontakt und liegen der Intima auf. Diese besteht gewöhnlich aus einer Basalmembran, einer subendothelialen Schicht aus Bindegewebszellen und extrazellulärer Matrix. Durch die Membrana elastica interna wird die Intima von der Media abgegrenzt. Die Media wird durch mehrere Schichten aus glatten Muskelzellen charakterisiert, die in einer elastin- und kollagenreichen Matrix eingebettet sind.

Während der frühen Atherogenese führt die Rekrutierung inflammatorischer Zellen und die Akkumulation von Fetten zu der Bildung eines lipidreichen Kerns innerhalb der Intima. Durch anhaltende Entzündungen und Risikofaktoren, wie Dyslipidämie, wächst der Lipidkern und aktiviert Leukozyten, welche Proteinasen freisetzen. Dies führt zum einen zu einer Degradation der extrazellulären Matrix und zum anderen zu einer IFN- γ vermittelten Hemmung der Kollagensynthese. Dadurch wird die faserige Kappe geschwächt, was sie anfälliger für eine Plaqueruptur macht. Wenn ein Plaque bricht, kommt prothrombisches Material aus dem Plaquekern mit den Blutplättchen in Kontakt, wodurch die Thrombusbildung ausgelöst wird. Sofern der Thrombus eine Koronararterie verstopft, kann ein akuter Myokardinfarkt die Folge sein. Die Thrombusbildung führt zwar auch zur Wundheilung, wodurch die faserige Kappe neu aufgebaut wird, jedoch hat dies auch gleichzeitig eine weitere Verengung des Lumens zur Folge. (Libby, 2002)

1.3 Assoziationen zwischen Parodontitis und Atherosklerose

Durch Metaanalysen konnte eine Verbindung zwischen der Parodontitis und der Atherosklerose nachgewiesen werden (Humphrey et al., 2008). Diese äußert sich in einem erhöhten Auftreten koronarer Herzkrankheiten bei Patienten mit Parodontitis (Bahekar et al., 2007) und wird ferner durch gemeinsame Risikofaktoren, welche den Ausbruch beider Krankheiten befördern, bestärkt. Neben dem Rauchen, welches als Haupt-Risikofaktor angesehen wird (Bornemisza et al., 1981; Haber et al., 1993), konnten auch Diabetes mellitus (Ainamo et al., 1990; Beckman et al., 2002), Fettleibigkeit (Al-Zahrani et al., 2003; McGill Jr et al., 2002) und ein erhöhter Triglycerid- und Cholesterinspiegel als gemeinsame Risikofaktoren identifiziert werden (Lösche et al., 2005; Morita et al., 2004; Sharrett et al., 1994).

Zwar konnte ein direkter kausaler Zusammenhang beider Krankheiten noch nicht bewiesen werden, jedoch lassen mehrere Studien verschiedene Mechanismen vermuten, bei welchen das Eintreten oraler Bakterien bzw. bakterieller Produkte in den Blutkreislauf als eines der biologischen Schlüsselereignisse angesehen wird (Kebschull et al., 2010). Neben dem Nachweis der DNA verschiedener oraler Bakterien, wie *P. gingivalis* oder *A. actinomycetemcomitans*, in atherosklerotischen Läsionen (Fiehn et al., 2005) konnten auch lebendige Bakterien in den Läsionen nachgewiesen werden (Kozarov et al., 2005). Es gibt Hinweise, dass parodontale Pathogene genauso wie bakterielle Produkte manche ihrer proatherogenen Effekte durch die Aktivierung von Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs) ausüben, insbesondere über TLR-2 und TLR-4 auf Endothelzellen (Hajishengallis et al., 2009; Yumoto et al., 2005). Durch die Interaktion mit den Bakterien setzen Endothelzellen zusammen mit Zellen der glatten Muskulatur proatherogene Mediatoren wie Interleukin (IL) -1, Tumornekrosefaktor (TNF) - α , IL-6 und MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) frei (Dzau et al., 2002), welche unter anderem Neutrophile und Monozyten aktivieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass orale Bakterien die Thrombusbildung durch direkte Interaktion mit Thrombozyten induzieren können (Herzberg et al., 1983).

Parodontale Infektionen führen zu einer lokalen Entzündung, was mit einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine und Entzündungsmarker, wie IL-6 und CRP (C-reaktives Protein), in dem betroffenen Gewebe einhergeht (Ebersole, 2003; Lamster and Ahlo, 2007; Loos, 2005). Man geht davon aus, dass diese lokal synthetisierten Entzündungsmediatoren in den Blutkreislauf gelangen und so zu einer systemischen

Entzündung beitragen können, welche durch erhöhte CRP- und IL-6-Werte erkennbar ist (Loos, 2005; Loos et al., 2000; Noack et al., 2001). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Parodontitis, die die klinischen Symptome reduziert, auch zu einem niedrigerem Spiegel systemischer Entzündungsmediatoren führt (Paraskevas et al., 2008; Tonetti et al., 2007). Verschiedene Studien untersuchten den Einfluss einer parodontalen Therapie auf die endotheliale Dysfunktion, die erste Stufe der atherosklerotischen Entwicklung, welche häufig mit Parodontitis assoziiert ist (Amar et al., 2003). Diese Studien zeigten einen positiven Effekt auf die Endothelfunktion, welcher sich bereits sechs Monate nach der Behandlung einstellte (Elter et al., 2006; Mercanoglu et al., 2004; Seinost et al., 2005).

1.4 Genetische Assoziationsstudien

Assoziationsstudien sind ein Hauptwerkzeug für die Identifizierung derjenigen genetischen Varianten, welche die Anfälligkeit für bestimmte Krankheiten erklären. Man unterscheidet dabei zwischen monogenen und komplexen Krankheiten. Unter komplexen Krankheiten versteht man diejenige Krankheiten, bei denen sowohl verschiedene genetische Faktoren als auch Umweltfaktoren zu dem individuellen Risiko des Krankheitsausbruches beitragen (Dempfle et al., 2008; Risch, 2000). Komplexe Krankheiten beruhen in der Regel auf einer größeren Anzahl unterschiedlicher genetischer Risikovarianten, wodurch einzelne Varianten häufig nur einen moderaten Einfluss auf die Pathogenese aufweisen. Einzelne Risikoallele treten häufig in der gesunden Normalbevölkerung auf und führen erst durch eine spezifische Kombination mehrerer Risikoallele zum Ausbruch der Krankheit (Page et al., 2003). Die Wahrscheinlichkeit, mit der ein bestimmter Genotyp zur Ausprägung des dazugehörigen Phänotyps führt, wird als Penetranz einer Variante bezeichnet. In komplexen Krankheiten liegt stets eine unvollständige Penetranz vor. Dieser Komplexität stehen monogene Krankheiten gegenüber, bei denen der Krankheitsausbruch allein durch das Auftreten des entsprechenden Risikoallels bedingt ist.

Genetische Assoziationsstudien suchen nach der Korrelation zwischen einem Krankheitsbild und genetischen Varianten, um Kandidatengene oder genomische Regionen, die bei dem Ausbruch der Krankheit mitwirken, zu identifizieren. Eine höhere Häufigkeit eines Markers oder Genotyps in einer krankheitsbetroffenen Individuengruppe lässt den Schluss eines erhöhten Krankheitsrisikos infolge der getesteten Variante zu. Einzelnukleotid-

Polymorphismen (SNP, single nucleotide polymorphism) sind die am häufigsten getesteten Marker in Assoziationsstudien, daneben werden aber auch Mikrosatelliten, Insertionen/Deletionen und Kopienzahlvariationen (CNV, copy number variation) für Assoziationsstudien benutzt.

SNPs

SNPs sind einzelne Positionen innerhalb des Genoms, an denen alternative Nukleotide (Allele) in Individuen einer Population auftreten können. Um SNPs von Mutationen abzugrenzen, muss das seltenere Allel per Definition in mindestens 1% der Individuen vorkommen (Brookes, 1999; Zhao et al., 1998). Obwohl SNPs generell bi-, tri- oder tetraallelisch auftreten können, findet man bei Menschen fast ausnahmslos biallelische SNPs (Brookes, 1999). Dabei zeigen ungefähr zwei Drittel aller bekannter SNPs einen Nukleotidaustausch von Cytosin zu Thymin, wohingegen der Austausch von Guanin zu Adenin seltener auftritt. Die Prävalenz des beobachteten Austausches eines Cytosins durch ein Thymin lässt sich durch die häufige Methylierung des Cytosins zu 5-Methylcytosin und die anschließende spontan auftretende Desaminierung zu Thymin erklären (Holliday and Grigg, 1993). Die momentan im humanen Genom beschriebenen SNPs sind in der Datenbank "dbSNP" des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) zugänglich (Sayers et al., 2011).

SNPs können entweder auf direkte Weise in die Pathogenese einer genetisch bedingten Krankheit eingreifen, oder nur mit ihr assoziiert sein und werden dementsprechend in verschiedene Kategorien eingeteilt. Sofern das entsprechende Allel eines SNPs den Krankheitsausbruch direkt beeinflusst, spricht man von kausativen SNPs. Diese SNPs können auf unterschiedlichen Ebenen wirken. Kodierende SNPs (cSNPs) sind in den Exonen eines Gens lokalisiert. Bei ihnen unterscheidet man zwischen synonymen und nicht-synonymen SNPs. Von synonymen SNPs spricht man, wenn der Basenaustausch zwar zu einer veränderten Information des Codons führt, das Tripletts aber weiterhin für dieselbe Aminosäure kodiert und somit keinen Einfluss auf die Proteinfunktion hat. Nicht-synonyme SNPs (nsSNPs) führen dagegen zu einem Aminosäureaustausch, was eine veränderte Proteinfunktion zur Folge haben und physiologische Effekte nach sich ziehen kann. So hat beispielsweise der SNP rs2241880 im *ATG16L1* Gen einen Austausch einer polaren gegen eine unpolare Aminosäure zur Folge und ist mit Morbus Crohn assoziiert (Hampe et al., 2007).

Es werden aber auch kausative SNPs in nicht proteinkodierenden Bereichen gefunden. Beispielsweise können SNPs in Spleißstellen zu differentiell gespleißten mRNAs führen und dadurch das Risiko für einen krankheitsspezifischen Phänotyp erhöhen (Valentonyte et al., 2005). Des Weiteren können SNPs in regulatorischen Regionen wie Promotoren, Enhancern, 5' und 3'UTR (untranslatierten Regionen) und Intronen *cis*- oder *trans*-Effekte auf die transkriptionelle Regulation haben, wodurch die Konzentration des entsprechenden Genproduktes beeinflusst werden kann (Cunnington et al., 2010; Folkersen et al., 2009; Libioule et al., 2007). Neben diesen kausativen SNPs gibt es auch krankheitsassoziierte SNPs. Diese haben zwar keinen direkten Einfluss auf die Pathogenese, sind aber mit den kausativen SNPs assoziiert, weil sie mit ihnen in einem Kopplungsungleichgewicht stehen.

Kopplungsungleichgewicht

Ein Kopplungsungleichgewicht (LD, Linkage disequilibrium) beschreibt die gemeinsame Vererbung zweier benachbarter Allele, die häufiger auftritt als es durch Zufall in einer Population zu erwarten wäre. Kopplungsungleichgewichte treten auf, wenn ein neues Allel durch Mutation in einer Population entsteht. Anfänglich ist das neue Allel auf das Ursprungschromosom beschränkt und dementsprechend mit den darauf befindlichen SNPs gekoppelt, wodurch ein perfektes Kopplungsungleichgewicht zwischen dem gesamten Chromosom und der Mutation besteht. Über Generationen hinweg ereignen sich zwischen der Mutation und anderen SNPs auf dem Chromosom Rekombinationsereignisse, wodurch sich das Kopplungsungleichgewicht auflöst. Da die Auflösung des Kopplungsungleichgewichtes eine Funktion der Rekombinationshäufigkeit ist und die Wahrscheinlichkeit eines Rekombinationsereignisses zwischen zwei SNPs mit der Zunahme ihrer physischen Entfernung steigt, zeigen zwei SNPs, die sich in enger Nachbarschaft zueinander befinden, ein stärkeres Kopplungsungleichgewicht als zwei SNPs, die weit voneinander entfernt liegen. Jedoch findet die Rekombination nicht an jedem Punkt eines Chromosoms mit derselben Wahrscheinlichkeit statt, vielmehr gibt es Bereiche relativ geringer Rekombinationshäufigkeit, die von Bereichen hoher Rekombinationsaktivität unterbrochen werden (Gabriel et al., 2002; Myers et al., 2005). Durch diese Rekombinationsdynamiken werden einzelne LD Blöcke voneinander abgegrenzt (Daly et al., 2001; Gabriel et al., 2002; Kauppi et al., 2003).

Eine geläufige Einheit, um das LD zwischen zwei SNPs zu beschreiben, ist r^2 , welches einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen kann. Dabei gibt 0 die vollständige Entkoppelung zweier SNPs an, während 1 eine vollständige Kopplung zweier SNPs anzeigt (Hill and Robertson,

1968). r^2 repräsentiert somit die Wahrscheinlichkeit der Kosegregation zweier SNPs. In der Praxis nimmt man an, dass zwei SNPs mit einem r^2 Wert $> 0,8$ in vollem LD zueinander stehen und somit gemeinsam als Einheit vererbt werden. Solche Bereiche mit erhöhtem LD werden als Haplotyp-Blöcke bezeichnet und umfassen in der Regel eine genomische Region von 10-100 kb (Gabriel et al., 2002). Da aus den oben genannten Gründen Rekombinationen selten innerhalb der Haplotyp-Blöcke auftreten, ist die Kombination der SNPs innerhalb eines Haplotyps relativ konstant. Dadurch kann die Identifizierung eines SNP Allels in einem Haplotyp-Block Aufschluss über die Allele aller anderen SNPs in demselben Haplotyp-Block geben. Solche SNPs werden als Haplotyp Marker SNPs (htSNP, haplotype tagging SNPs) bezeichnet, mithilfe derer man in einer genetischen Assoziationsanalyse bestimmte Haplotyp-Blöcke mit dem Vorkommen bestimmter Krankheiten korrelieren kann. Dabei zeigt eine Assoziation mit einem htSNP nicht zwangsläufig einen kausalen Zusammenhang zwischen dem htSNP und der Krankheit an, vielmehr sind auch alle anderen SNPs in demselben Haplotyp-Block mit der Krankheit assoziiert. Für die Suche nach der kausativen Variante muss anschließend der assoziierte Haplotyp-Block genauer untersucht werden (Collins et al., 1997).

1.5 ANRIL als gemeinsames Risikogen der Parodontitis und Atherosklerose

Durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) konnte eine Region auf Chromosom 9, Position 9p21.3 als gemeinsamer genetischer Suszeptibilitätsloкус der Atherosklerose und Parodontitis identifiziert werden (Schaefer et al., 2009). Dieser Genort ist die bislang am häufigsten replizierte und am stärksten mit Atherosklerose assoziierte Region, unabhängig traditioneller Risikofaktoren (Broadbent et al., 2008; Deloukas et al., 2012). Interessanterweise konnten auch andere Krankheiten wie Typ 2 Diabetes (Broadbent et al., 2008; Cugino et al., 2011), Alzheimer (Emanuele et al., 2011) und verschiedene Krebsformen (Bei et al., 2010; Shete et al., 2009; Turnbull et al., 2010) mit diesem Genort in Verbindung gebracht werden. In der krankheitsassoziierten Region sind drei proteinkodierende Gene lokalisiert: die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren 2A und 2B (CDKN2A/B, cyclin dependent kinase inhibitor 2A/B) und die Methyl-Thioadenosin-Phosphorylase (MTAP). Ferner konnte an diesem Genort auch die lange nicht proteinkodierende RNA *ANRIL* (Antisense noncoding RNA in the INK4 locus) identifiziert werden. Bei *CDKN2A/B* handelt es sich um Tumorsuppressor-Gene, deren Rolle bei Prozessen wie der Zellproliferation, Apoptose und Seneszenz bereits gut beschrieben ist (Brookes et al., 2002; Frost et al., 1999;

Stiewe and Pützer, 2000). Zusätzlich konnten Deletionen des *MTAP*-Gens direkt mit der Karzinogenese in Verbindung gebracht werden (Hellerbrand et al., 2005; Schmid et al., 1998). Bemerkenswerterweise liegen die mit Atherosklerose und Parodontitis assoziierten Marker (SNPs) in einem Haplotyp-Block, der nicht in den proteinkodierenden Genen, sondern in dem *ANRIL* Gen lokalisiert ist (Abbildung 3).

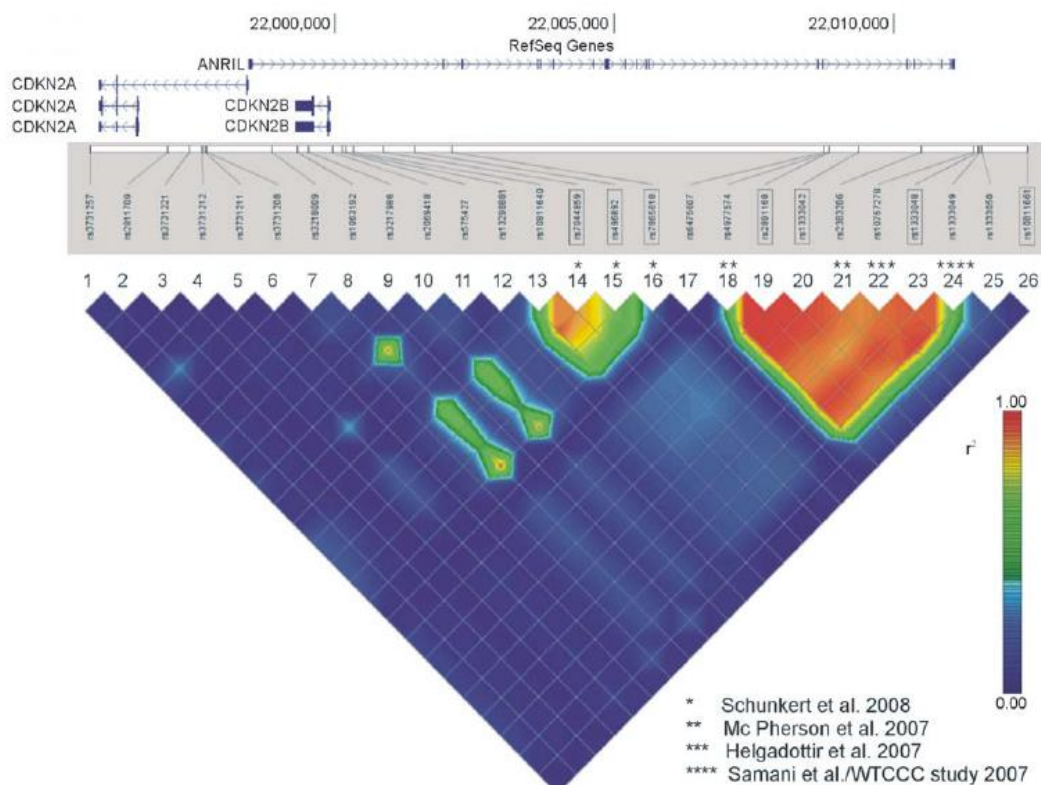


Abbildung 3 LD Struktur (r²) des Chromosoms 9p21.3 in HapMap CEU.

Die Abbildung spiegelt die durch Marker SNPs (1-26) bestimmten Kopplungsungleichgewichte entlang der chromosomalen Region 9p21.3 wieder. Die *CDKN2A/B* Gene werden dabei von den SNPs 1-13 abgedeckt. In der an die Gene anschließende mit AgP und KHK assoziierte LD-Region sind die SNPs 14-16 lokalisiert. SNPs 18-24 zeigen den durch GWAS Studien identifizierten Hauptrisiko-Haplotyp der AgP und KHK an. Der mit Typ 2 Diabetes assoziierte SNP wird durch die Nummer 26 angezeigt. Die für die jeweiligen GWAS verwendeten Marker-SNPs sind in der Abbildung durch Sternchen gekennzeichnet. SNP 17 und 25, die in unmittelbarer Nähe von rs4977574 bzw. rs1333049 liegen, wurden in die Abbildung aufgenommen, um die scharfen Grenzen der jeweiligen LD-Blöcke anzuzeigen. (Schaefer et al., 2009)

Die chromosomale Region trägt die meisten krankheitsassoziierten Varianten im gesamten humanen Genom und zeigt eine hohe Anzahl vorhergesagter Enhancer (Harismendy et al., 2011; Shea et al., 2011). Viele der Polymorphismen in der 9p21-Region beeinträchtigen verschiedene Transkriptionsfaktorbindestellen, was die Vermutung nahelegt, dass dieser Genort durch verschiedene Signalwege reguliert wird (Harismendy et al., 2011). *ANRIL* wird zum Beispiel durch den STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1) Signalweg reguliert, welcher infolge einer Stimulation durch das proinflammatorische Zytokin IFN- γ eine Entzündungsantwort vermittelt (Harismendy et al., 2011). Folgerichtig konnte eine erhöhte Expression des *ANRIL* Transkriptes infolge einer bakteriellen Stimulation in humanen gingivalen Fibroblasten (hGF) beobachtet werden, was die Rolle des Gens bei Entzündungsreaktionen bestärkt (Schaefer et al., 2011).

In verschiedenen Studien wurde der Einfluss der krankheitsassoziierten Varianten dieses Genortes auf die Expression der dort lokalisierten Gene *ANRIL*, *CDKN2A* und *CDKN2B* untersucht. Jedoch zeigten die Studien kein einheitliches Bild. Während manche Studien von einer erhöhten *ANRIL* Expression bei homozygoten Trägern der Risikovarianten berichteten (Holdt et al., 2010; Jarinova et al., 2009), zeigten andere Veröffentlichungen eine verminderte *ANRIL* Expression in homozygoten Trägern der Risikovarianten (Congrains et al., 2012; Motterle et al., 2012). In einer weiteren Studie wurde der Einfluss der Risikoallele der Atherosklerose und Parodontitis auf die Expression verschiedener *ANRIL* Transkripte untersucht. Die Autoren konnten eine verminderte Expression der Transkripte, die die Exone 1-2, beziehungsweise 4-6 beinhalten, in homozygoten Trägern der Risikoallele nachweisen. Dagegen wurde die Expression der Exon 18-19 tragenden Transkripte nicht durch den Genotyp beeinflusst (Burd et al., 2010), was eine spezifische Rolle der ersten Exone in der Ätiologie der Atherosklerose und Parodontitis vermuten lässt.

Durch die spezifische Bindung an CBX7 (Chromobox homolog 7) und SUZ12 (Suppressor Of Zeste 12), zwei Proteine der Polycomb-Gruppe, nimmt *ANRIL* einen *cis*-regulatorischen Einfluss auf die Histonmodifikationen von *CDKN2A/B* (Kotake et al., 2010; Yap et al., 2010). Die Interaktion des elongierenden *ANRIL* Transkriptes mit SUZ12 führt zu einer Rekrutierung des Polycomb Repressor Komplex 2 (PRC2) und initiiert die Methylierung von Histon 3 an Lysin 27 (H3K27) (Yap et al., 2010). CBX7, ein Protein des Polycomb Repressor Komplex 1 (PRC1), bindet ebenfalls an das *ANRIL* Transkript und erkennt die zuvor etablierte H3K27 Methylierung, was zu einer Monoubiquitinierung von Histon 2A an Lysin 119 (H2AK119) führt (Yap et al., 2010). Die Interaktion des *ANRIL* Transkriptes mit SUZ12

und CBX7 führt somit zu einer epigenetischen Stilllegung des *CDKN2A/B* Lokus (Abbildung 4).

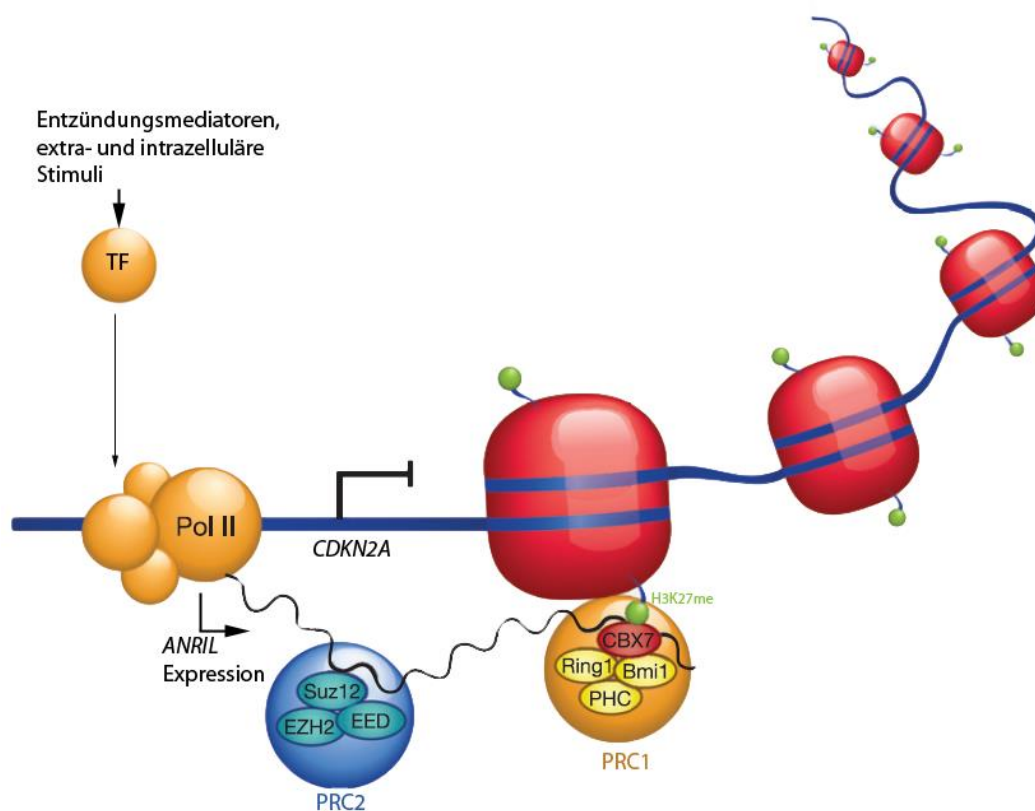


Abbildung 4 Schema der *ANRIL* vermittelten *CDKN2A/B* Regulation.

Die chromosomale Region 9p21 ist reich an regulatorischen Elementen und verschiedenen Transkriptionsfaktorbindestellen. Entsprechende Transkriptionsfaktoren können durch unterschiedliche Stimuli wie Entzündungsmediatoren (z.B. STAT1) aktiviert werden, wodurch sie die Expression des *ANRIL* Gens verändern können. Die Polycomb Protein Komplexe 1 und 2 (PRC1 und PRC2) besitzen RNA-Bindedomänen in ihren CBX7 bzw. SUZ12 Untereinheiten. Durch die Bindung des *ANRIL* Transkriptes an die SUZ12 Untereinheit des PRC2 Komplexes wird die Methylierung von Histon 3 an Lysin 27 (H3K27) induziert, was zu einer Stilllegung der *CDKN2A/B* Genregion führt. Die Bindung von *ANRIL* an CBX7 in PRC1 erlaubt die Erkennung des methylierten H3K27 (H3K27me), wodurch das Histon 2A an Lysin 119 (H2AK119) monoubiquitiniert und die Stilllegung des Genortes aufrechterhalten wird. (Yap et al., 2010)

1.6 Lange nichtkodierende RNAs

ANRIL gehört zu der Klasse langer nichtkodierender RNAs (lncRNAs). Dabei handelt es sich um Transkripte, die länger als 200 Nukleotide sind und keine Protein-kodierende Eigenschaften besitzen. Diese RNA-Klasse wurde lange Zeit als transkriptionelles Rauschen betrachtet (Struhl, 2007; Wang et al., 2004b), jedoch zeigte die Sequenzierung des humanen Genoms eine Gesamtheit von lediglich 20.000 – 25.000 Protein-kodierenden Genen, was weniger als 2% der gesamten genomischen Sequenzen ausmacht (International Human Genome Sequencing, 2004). Interessanterweise zeigten die Genome verschiedener Metazoa trotz großer Unterschiede in ihrer Komplexität eine ähnliche Anzahl Protein-kodierender Gene (Taft et al., 2007). So weist beispielsweise der Nematode *Caenorhabditis elegans* eine ähnlich große Anzahl Protein-kodierender Gene wie der Mensch auf (Wilusz et al., 2009). Bemerkenswert ist jedoch, dass die Anzahl von nicht-proteinkodierenden intronischen und intergenischen Sequenzen im Genom mit der Komplexität der Organismen zunimmt, was eine spezifische Funktion dieser Sequenzen vermuten lässt (Taft et al., 2007). Wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, ist die Transkription nicht nur auf die Protein-kodierenden Regionen beschränkt, sondern umfasst annähernd das gesamte Genom (Bertone et al., 2004; Carninci et al., 2005; Cheng et al., 2005; Katayama et al., 2005). Zum Beispiel wird mehr als 90% des gesamten humanen Genoms transkribiert, was zu einer Vielzahl langer RNA Transkripte ohne nennenswerte Protein-kodierende Eigenschaften führt (Birney et al., 2007). Anhand ihrer Lage im Genom lassen sich diese Transkripte in antisense, intronische, divergente und intergenische lncRNAs unterteilen (Abbildung 5)

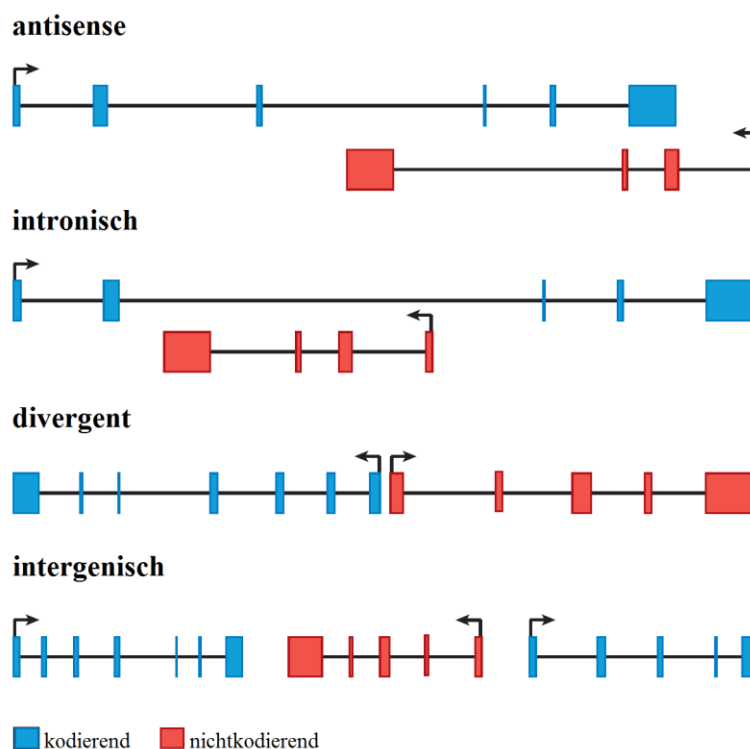


Abbildung 5 Klassifizierung langer nichtkodierender RNAs anhand ihrer Lage im Genom.

Antisense lncRNAs initiieren in oder bei dem 3'-Ende eines Protein-kodierenden Gens, werden in der entgegengesetzten Richtung des Protein-kodierenden Gens transkribiert und überlappen mindestens ein kodierendes Exon. Intronische lncRNAs initiieren in einem Intron eines Protein-kodierenden Gens, können sowohl in als auch gegen die Transkriptionsrichtung des kodierenden Gens abgelesen werden und überlappen niemals mit Protein-kodierenden Exonen. Divergente lncRNAs initiieren von demselben Promotor wie Protein-kodierenden Gene, jedoch in entgegengesetzter Richtung. Intergenische lncRNAs (auch lincRNAs genannt) werden separat von Protein-kodierenden Genen als eigene Transkriptionseinheiten exprimiert. Per Definition liegen sie mindestens 5 kb von Protein-kodierenden Genen entfernt (Mitchell Guttman et al., 2009). (Rinn and Chang, 2012)

Mittlerweile sind verschiedene Funktionen der lncRNAs bekannt, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Chromatin-Modifikationen

Lange nichtkodierende RNAs können epigenetische Veränderungen durch die Rekrutierung Chromatin-umstrukturierender Komplexe zu spezifischen genomischen Regionen vermitteln. Neben der im vorangegangenen Abschnitt dargestellten epigenetischen Regulation der *CDKN2A/B* Gene durch die *ANRIL* Transkripte ist dieser Mechanismus auch von anderen lncRNAs bekannt. Beispielsweise wirken hunderte lncRNAs durch verschiedene Histon-Methylierungen bei der zeitlichen und räumlichen Regulation des humanen Homöobox Locus mit (Rinn et al., 2007). Eine dieser lncRNAs, die HOX Transkript antisense RNA (*HOTAIR*), liegt im *HOXC* Locus und reprimiert die Transkription entlang des *HOXD* Locus, indem sie den repressiven Chromatinzustand durch die Rekrutierung des PRC2 induziert (Rinn et al., 2007).

Regulation der Transkription

Neben der Rekrutierung von RNA-bindenden Proteinen zu Promotorstellen können lncRNAs auch als Kofaktoren wirken, welche die Aktivität von Transkriptionsfaktoren modulieren. (Wang et al., 2008). Darüber hinaus können lncRNAs auch die Promotorwahl der RNA Polymerase (RNAP) II durch die Interaktion mit dem Initiationskomplex beeinflussen (Martianov et al., 2007). Eine weitere Möglichkeit die Transkription zu regulieren ist die Bindung regulatorischer Proteine durch lncRNA, wodurch diese nicht mehr an die entsprechenden DNA Elemente binden können (Kino et al., 2010).

Posttranskriptionelle Regulation

Die Fähigkeit langer nichtkodierender RNAs komplementäre Sequenzen zu erkennen ermöglicht spezifische Bindungen an prä-mRNA Transkripte, wodurch verschiedene Schritte der posttranskriptionellen Modifizierung, wie etwa das Spleißen, die Editierung, der Transport oder der Abbau reguliert werden können. Die meisten Säugergene exprimieren antisense Transkripte, welche eine Rolle bei der mRNA-Dynamik spielen (He et al., 2008). Sie können zum Beispiel durch die Interaktion mit der prä-mRNA, RNA-Duplexe bilden, welche *cis*-Elemente verdecken und dadurch das Spleißmuster der mRNA verändern (Beltran et al., 2008). Darüber hinaus können RNA-Duplexe aus lncRNA und mRNA oder gar innerhalb ein und derselben lncRNA in endogene siRNAs prozessiert werden und dadurch analog des siRNA Signalweges die Expression der entsprechenden Gene reprimieren. Dies macht deutlich, dass auch lncRNAs in dem RNAi-vermittelten Abschalten spezifischer Gene eine Rolle spielen können (Ogawa et al., 2008)

Zusammengefasst spielen lncRNAs durch unterschiedliche Mechanismen eine wichtige Rolle in der Regulation der Expression verschiedener Gene. All diesen Mechanismen ist die Interaktion der lncRNA mit Proteinen oder anderen Polynukleotiden gemein. Die verschiedenen Mechanismen sind in Abbildung 6 zusammengefasst.

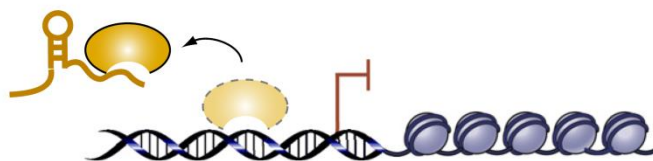
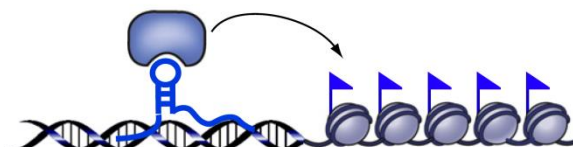
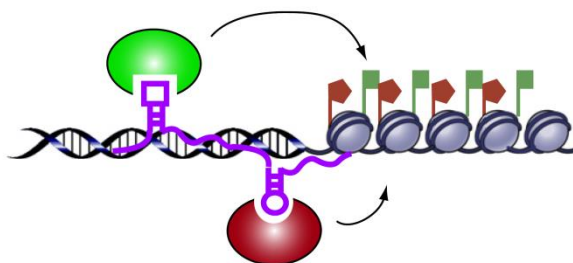
I. Inhibitor**II. Guide****III. Gerüst**

Abbildung 6 Schematische Darstellung der verschiedenen lncRNA Hauptmechanismen.

Mechanismus I.: Als Inhibitor können lncRNAs an Transkriptionsfaktoren und andere regulatorische Proteine binden und diese damit von deren Wirkungsort fernhalten. Mechanismus II.: Als Guides können lncRNAs Chromatin-modifizierende Enzyme zu ihren bestimmten Genen lotsen. Diese Gene können sowohl *in cis*, als auch *in trans* zu dem Ort der lncRNA Transkription liegen. Mechanismus III.: Als Gerüste können lncRNAs verschiedene Proteine in räumliche Nähe zu einem Ribonukleoproteinkomplex (RNP) zusammenbringen. Der lncRNA-RNP kann zum Beispiel, wie dargestellt, die Chromatinstruktur durch Histon-Modifizierung beeinflussen. (Wang and Chang, 2011)

1.7 Ziel der Arbeit

ANRIL ist bislang das stärksten und am häufigsten replizierte Risikogen der Atherosklerose und Parodontitis (Deloukas et al., 2012; Schaefer et al., 2013). Trotz der Bedeutung die dem Gen zukommt ist seine molekulare Funktion in der Ätiologie dieser Krankheiten bislang nicht gänzlich verstanden. Studien in Krebszellen konnten einen regulatorischen Einfluss der *ANRIL* Transkripte auf die benachbarten Zellzyklusregulatoren *CDKN2A/B* nachweisen (Yap et al., 2010). Ein solcher Mechanismus bietet eine schlüssige Erklärung für die Funktion die *ANRIL* bei der Krebsentstehung spielen könnte, seine Rolle in der Ätiologie der Atherosklerose und Parodontitis erklärt es jedoch nicht. Lange nicht kodierende RNAs, zu denen auch *ANRIL* gehört, können neben einem *cis*-regulatorischen Einfluss auf ihre benachbarten Gene auch einen *trans*-regulatorischen Einfluss auf Gene weit ihrer eigenen genomischen Lokalisation ausüben. Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass *ANRIL* neben seiner *cis*-regulatorischen Funktion auf *CDKN2A/B* auch einen *trans*-regulatorischen Einfluss auf bislang nicht bekannte Gene ausübt. Ziel der Arbeit war die Identifizierung dieser Gene und damit zusammenhängend die Beschreibung von Schlüsselsignalwegen, welche eine entscheidende Rolle in der Ätiologie beider Krankheiten spielen. Darauf Aufbauend sollten ferner weitere gemeinsame Risikogene der Atherosklerose und Parodontitis identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

3 K 30 Tischzentrifuge	Sigma, Osterode am Harz, Deutschland
7900 HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Analysenwaagen 870	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Auflichtmikroskop H 500	Helmut Hund, Wetzlar, Deutschland
Axio Image Z1	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
Axio Observer A1	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
BB 16	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
Biofuge	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
Biofuge pico	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
Blockthermostat BT100	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland
Cellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience, Lawrence, USA
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge TJ-6	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Certomat MV (Vortexer)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
ChemiDoc XRS	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
CO ₂ -Inkubator CB 150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
CO ₂ Brutschrank C150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Curix 60	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Fresco21 Centrifuge	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
Gelkammer mini sub-cell GT	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Gelkammer wide sub-cell GT	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
GeneChip Autoloader	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip Hybridisation Ofen 640	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip Scanner 3000	Affymetrix, Santa Clara, USA
Genios pro	Tecan Group, Männedorf, Schweiz

GradientCycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
GS Gene Linker UV Chamber	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Heizblock QBD2	Grant Instruments, Cambridgeshire, England
Heratherm OMH100	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hund V300	Helmut Hund, Wetzlar, Deutschland
Incucell 55-Standard	MMM Einrichtungen, München, Deutschland
Labofuge 400	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Maxigel	Biometra, Göttingen, Deutschland
Megafuge 16	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
Mikroplattenschüttler KM2	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Mikropipetten 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle R798	Sharp Electronics, Hamburg, Deutschland
Mini Protean Tetra cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
MIR-154	Sanyo Denki K.K., Moriguchi, Japan
MLS 3780 751 Toplader Autoklav	Sanyo Denki K.K., Moriguchi, Japan
Multigel G 44	Biometra, Göttingen, Deutschland
Multi-Microplate Genie	Scientific Industries, New York, USA
Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Novex Mini Gel	Life Technologies, Carlsbad, USA
Orbital Incubator SI500	Stuart Scientific, Redhill, England
Pico21 Centrifuge	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
Pipetboy	BRAND, Wertheim, Deutschland
Plattenschüttler TiMix Control RT	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Powerpack 300	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Power Pac Universal	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
PP 3000 Power Pack	Biometra, Göttingen, Deutschland
PP 4000 Power Pack	Biometra, Göttingen, Deutschland
Präzisionswaage 572	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
ProMax 1020	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
pH/Cond 340i Set	VWR International, Radnor, USA
Reinstwassersystem	SG Water, Hamburg, Deutschland
Rolenmixer SRT6	Stuart Scientific, Redhill, England
Schüttel-Inkubator 3033	GFL, Burgwedel, Deutschland
Schüttler Milenia	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

Schüttler DSG 304/M4	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Sicherheitswerkbank Herasafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spectra Fluor Plus	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Spectrofotometer ND-1000	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Symphony pH Meter	VWR International, Radnor, USA
TaqMan Genotypisierung System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Tecan Freedom Evo 200	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Thermo BBD 6220	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
Thermocycler 2720	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermocycler 96well GeneAmp 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TransBlot SB cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
TransBlot Turbo Transfer System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Varifuge 3 OR	Heraeus Holding, Hanau, Deutschland
Varioskan Flash	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Veriti 96well Thermocycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
Vibrofix VF1	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Vortex Genie	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Wasserbad K3	Biometra, Göttingen, Deutschland
Wide-mini Subcell GT	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

6well Zellkulturplatten	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
96well Zellkultur-Platten	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Blotting Papier, Typ: Whatman 3MM Chr	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
CryoPure 2, 0 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Custom genotyping array Immunochip	Illumina, San Diego, USA
Extra Thick Filter Paper 15 x 20 cm	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
GeneChip Human Gene 1.0 ST Array	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip Human Mapping 500K Array	Affymetrix, Santa Clara, USA
Hybond-P (Blotmemembran)	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
HyperfilmECL 5x7 inch	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
Leb-Tek Chamber Slides (4-Well)	Nunc, Rochester, NY, USA
Multiply®-µStrip 0, 2 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Multiple 96 well Plate round Bottom	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
PCR Softtubes 0, 2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Oprical Flat Cap Stripes	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Petrischale, 10 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze mit Filter (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
QIAshredder	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Reagiergefäß (0, 5 ml, 1, 5 ml, 2, 0 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Schraubröhre (15 ml, 50 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Schutzgefäß 126 x 30 mm	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette (5 ml, 10 ml, 25 ml)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflasche (25 cm ² , 75 cm ²)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (6 well, 24 well, 96 well)	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschale, 10 ml	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber, 25cm	SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Chemikalien/ Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
30% Acrylamid/Bis Solution, 37, 5:1	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Lonza, Basel, Schweiz
Aceton	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Agar Noble	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bacterial Peptone	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
APS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bacto Tryptone	Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA
Benzamidine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Blotting Grade Blocker (Non-Fat Dry Milk)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Brillant Blue R	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA	VWR International, Radnor, USA
Casein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CHAPS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DEPC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
dNTP-Set	Promega Corporation, Madison, USA
Dodecylsulfat Natriumsalz	Merck, Darmstadt, Deutschland
DTT (Di-Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ECL	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
ECL Plus	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Entwickler	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethidiumbromid	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ficoll	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fixierer	Agfa-Gevaert, Mortsel, Belgien
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Formamid deionisiert	Merck, Darmstadt, Deutschland
FuGENE Transfection Reagent	Roche, Basel, Schweiz
Genetecin G-418 Sulphate	PAA Laboratories, Velizy-Villacoublay, Frankreich
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycine	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
HBSS	PAA Laboratories, Velizy-Villacoublay, Frankreich
Heparin sodium salt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hygromycin B	Invitrogen, Carlsbad, USA
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
jetPEI	Polyplus-transfection, Illkirch, Frankreich
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA
Lithiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Loading-Dye (6x)	peQLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Lysozym	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Maleinsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS ohne Ca und Mg	PAA Laboratories, Velizy-Villacoublay, Frankreich
Penicillin-Streptomycin	PAA Laboratories, Velizy-Villacoublay, Frankreich

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PhosphataseInhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protease Inhibitor mini EDTA free	Roche, Basel, Schweiz
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green PCR Master Mix	Life Technologies, Carlsbad, USA
SmartLadder	Eurogentec Headquarters, Seraing, Belgien
TEMED	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Carlsbad, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.4 Kits

Ambion WT Expression Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
cDNA Synthesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
GeneChip Hybridization Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip Poly-A RNA Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip WT Terminal Labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip WT Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Genomic DNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
GenomiPhi	Amersham, Uppsala, Schweden
Invisorb Blood Universal Kit	Invitex, Berlin, Deutschland
Plasmid Miniprep System	Promega, Madison, USA
QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Basel, Schweiz
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
RNA 3' End Biotinylation Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

RNase free DNase Set	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Rneasy Mini kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
Wizard SV Plasmid DNA Purification System	Promega, Madison, USA

2.1.5 Primer

Tabelle 1 Verwendete Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
ADIPOR1 fw (qRT)	TCGGA CTTTTTCCAAACTGG
ADIPOR1 rv (qRT)	GCTGTGGGGAGCAGTAGAAG
ANRIL Exon 1 c-1 (NotI)	GCGTGCGGCCGCAGCTACATCCGTCACCTG
ANRIL Exon 1 c-1 49 (HindIII)	GCGTAAGCTTAGCTACATCCGTCACCTG
ANRIL Exon 1 c-1 49 (HindIII)	GCGTAAGCTTAGCTACATCCGTCACCTG
ANRIL Exon 1 c-2 42 (HindIII)	GCGTAAGCTTAGCTACATCCGTCAC
ANRIL Exon 1 c-2 42 (HindIII)	GCGTAAGCTTAGCTACATCCGTCAC
ANRIL Exon 1 fw (Tm 55°C)	CCCCTATTCCCCTTATTTTAT
ANRIL Exon 1 fw (Tm 60°C)	CCTAGCTACATCCGTCACCTG
ANRIL Exon 1 gw (HindIII)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAAGCTTAGCTACATCCGTCACCTG
ANRIL Exon 1 gw (NotI)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCGGCCGCAGCTACATCCGTCACCTG
ANRIL Exon 13 c1 (ApaI)	GCGTGGGCCCATTTGTTTATAGATTTTATTGAAC
ANRIL Exon 13 c1 (NotI)	GCGTGCGGCCGCATTGTTTATAGATTTTATTGAAC
ANRIL Exon 13 c-1 49 (XhoI)	CGCAGAGCTCATTGTTTATAGATTTTATTGAACTTTCAAT
ANRIL Exon 13 c-1 49 (XhoI)	CGCAGAGCTCATTGTTTATAGATTTTATTGAACTTTCAAT
ANRIL Exon 13 c1.1 49 (XhoI)	GCGTCTCGAGATTGTTTATAGATTTTATTGAACTTTCAAT
ANRIL Exon 13 c-2 42 (XhoI)	CGCAGAGCTCATTGTTTATAGATTTTATTGAAC
ANRIL Exon 13 c-2 42 (XhoI)	CGCAGAGCTCATTGTTTATAGATTTTATTGAAC
ANRIL Exon 13 c2.1 42 (XhoI)	GCGTCTCGAGATTGTTTATAGATTTTATTGAAC
ANRIL Exon 13 fw (qRT)	GGACATTGGACAAAAACACAGA
ANRIL Exon 13 gw (ApaI)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGGCCCATTTGTTTATAGATTTTATTGAAC
ANRIL Exon 13 gw (NotI)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCGGCCGCATTGTTTATAGATTTTATTGAAC

ANRIL Exon 13 gw (XhoI)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCGAGATTGTTTATAGATTTTATTGAAC
ANRIL Exon 13 rev (Tm 55°C)	TTTTTGTCCAATGTCCTTTTA
ANRIL Exon 13 rev (Tm 60°C)	TTTATCACCCAGCTTCGTAGG
ANRIL Exon 13 rv (n1)	CCTTTTATCACCCAGCTTCG
ANRIL Exon 13 rv (n2)	TCTGTGTTTTTGTCCAATGTCC
ANRIL Exon 13 rv (qRT)	GCAGGTATCATTCTCCTCAAAT
ANRIL Exon 13 shRNA 13 bottom	AAAAGCTAGGAATTTCTACGAAGCTTCGGCTTCGTAGGAAATTCCTAGC
ANRIL Exon 13 shRNA 13 top	CACCGCTAGGAATTTCTACGAAGCCGAAGCTTCGTAGGAAATTCCTAGC
ANRIL Exon 13 shRNA 134 bottom	AAAAGGAGAATGATACCTGCTTCTTCGAGAAGCAGGTATCATTCTCCT
ANRIL Exon 13 shRNA 134 top	CACCAGGAGAATGATACCTGCTTCTCGAAAGAAGCAGGTATCATTCTCC
ANRIL Exon 13 shRNA 4 bottom	AAAAGATTACGGAGCTAGGAATTTCTTCGGAAATTCCTAGCTCCGTAATC
ANRIL Exon 13 shRNA 4 top	CACCGATTACGGAGCTAGGAATTTCCGAAGAAATTCCTAGCTCCGTAATC
ANRIL Exon 13 shRNA 82 bottom	AAAACCAGGATCCATCACTGATTATTCGTAATCAGTGATGGATCCTGGT
ANRIL Exon 13 shRNA 82 top	CACCACCAGGATCCATCACTGATTACGAATAATCAGTGATGGATCCTGG
ANRIL Exon 13.13 fw U6 shRNA	CACCGCTAGGAATTTCTACGAAGCCGAAGCTTCGTAGGAAATTCCTAGC
ANRIL Exon 13.13 rv U6 shRNA	AAAAGCTAGGAATTTCTACGAAGCTTCGGCTTCGTAGGAAATTCCTAGC
ANRIL Exon 13.135 fw U6 shRNA	CACCGGAGAATGATACCTGCTTCTCCGAAGAGAAGCAGGTATCATTCTCC
ANRIL Exon 13.135 rv U6 shRNA	AAAAGGAGAATGATACCTGCTTCTTCGGAGAAGCAGGTATCATTCTCC
ANRIL Exon 13.4 fw U6 shRNA	CACCGATTACGGAGCTAGGAATTTCCGAAGAAATTCCTAGCTCCGTAATC
ANRIL Exon 13.4 rv U6 shRNA	AAAAGATTACGGAGCTAGGAATTTCTTCGGAAATTCCTAGCTCCGTAATC
ANRIL Exon 13.98 fw U6 shRNA	CACCGATTAGCTGTATTATATTTGTTCGAAACAAATATAATACAGCTAATC
ANRIL Exon 13.98 rv U6 shRNA	AAAAGATTAGCTGTATTATATTTGTTTCGACAAATATAATACAGCTAATC
ANRIL Exon 19 fw (qRT)	GGATGCATGAGCTATTGAGG
ANRIL Exon 19 rv (qRT)	ATTTGCAAAAACAGCTGACC
ANRIL Exon 19 shRNA 469 bottom	AAAAGAAGTTGCACCGCTGGTAATTTTCGAATTACCAGCGGTGCAACTTC
ANRIL Exon 19 shRNA 469 top	CACCGAAGTTGCACCGCTGGTAATTCGAAAATTACCAGCGGTGCAACTTC

ANRIL Exon 19 shRNA 472 bottom	AAAAGTTGCACCGCTGGTAATTGGCTTCGGCCAATTACCAGCGGTGCAAC
ANRIL Exon 19 shRNA 472 top	CACCGTTGCACCGCTGGTAATTGGCCGAAGCCAATTACCAGCGGTGCAAC
ANRIL Exon 19 shRNA 509 bottom	AAAAGCAGTCTAACCTTAGAGTAATTTTCGATTACTCTAAGGTTAGACTGC
ANRIL Exon 19 shRNA 509 top	CACCGCAGTCTAACCTTAGAGTAATCGAAATTACTCTAAGGTTAGACTGC
ANRIL Exon1 fw (n1)	AGGAAAGCGAGGTCATCTCA
ANRIL Exon1 fw (n2)	CTCTATCCGCCAATCAGGAG
C11ORF10 fw (qRT)	AGATATAACCAGCCCAGTG
C11ORF10 rv (qRT)	AGTGTACTTGGTAGAGGTGA
CDKN2A fw (qRT)	GCACCAGAGGCAGTAACC
CDKN2A rv (qRT)	ATCGGGGATGTCTGAGG
CDKN2B fw (qRT)	CACCATGAAGCGAAACACAG
CDKN2B rv (qRT)	TCCATCGGAAGATTCGTAGC
GAPDH fw (qRT)	TGACATCAAGAAGGTGGTGA
GAPDH rv (qRT)	TGTCGCTGTTGAAGTCAGAG
OAS1 fw (qRT)	AGGTGGTAAAGGGTGGCTCC
OAS1 rv (qRT)	ACAACCAGGTCAGCGTCAGAT
VAMP3-fw (qRT)	GTGGCCAGCTGTGAGGAGAA
VAMP3-rv (qRT)	GGGTTACATGGGTCTGGGCA
β -Aktin fw	AATGCTTCTAGGCGGACTAT
β -Aktin rv	AAAAACAAATAAAGCCATGC

2.1.6 Enzyme

Advantage 2 Polymerase Mix	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
ApaI	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
BamHI	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
HindIII	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
NotI	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
XhoI	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
GoTaq Polymerase	Promega, Madison, USA
Proteinase K	Dako, Hamburg, Deutschland
RNase free DNase Set	QIAGEN, Hilden, Deutschland
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.7 Lösungen und Puffer

1x PBS	37 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 12 mM Gesamt-Phosphat (pH7,4)
10 x DNA-Ladepuffer	50% (v/v) Glycerol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol
10 x TBE	1 M Tris, 0.9 M Borsäure, 0.01 M EDTA
10 x TGS	0.25M Tris (pH 8.6), 1.92M Glycin, 1.0% SDS
25 x TAE	1 M Tris/HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 500 mM Essigsäure
4 x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4% (w/v) SDS
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8), 0,4% (w/v) SDS
5x SDS-Ladepuffer	312,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% (w/v) SDS, 50%(v/v) Glycerol, 10% (v/v) β - Mercaptoethanol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Anodenpuffer 1	30 mM Tris-Base, 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	300 mM Tris-Base, 20% (v/v) Methanol
<i>First</i> Puffer	10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM Kaliumchlorid, 1,5 mM Magnesiumchlorid, 10mM Natriumfluorid
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base, 20%(v/v) Methanol, 40 mM 6-Amino-Caprone

RIPA	150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% Na-desoxychelate, 0,1% SDS, 50 mM Tris (pH 8)
<i>Second</i> Puffer	20 mM HEPES (pH 7,9), 420 mM Natriumchlorid, 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM EDTA, 25% Glycerol, 10 mM Natriumfluorid
<i>Stripping</i> -Puffer	62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2% (w/v) SDS, 0,7% (v/v) β -Mercaptoethanol
TE (pH 7,6; pH 8,0)	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA
TTBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween20

2.1.8 Bakteriennährmedien/-nährboden

LB-Agarplatten	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar Agar
LB-Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
S.O.C.-Medium	2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄

2.1.9 Zellkulturmedien

Cell freezing medium +DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM	PAA Laboratories, Velizy-Villacoublay, Frankreich
RPMI	PAA Laboratories, Velizy-Villacoublay, Frankreich

2.1.10 Antikörper

Tabelle 2 Verwendete Antikörper mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor.

Bezeichnung	Spezies/ Verdünnung	Hersteller
α - β -ACTIN	Maus; 1:5000 in 5% MMP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
α -ADIPOR1	Ziege; 1:2000 in 5% MMP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
α -C11ORF10	Kaninchen; 1:2000 in 5% MMP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
α -VAMP3	Ziege; 1:2000 in 5% MMP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
α -goat-HRP	Esel; 1:5000 in 5% MMP	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
α -rabbit-HRP	Ziege; 1:5000 in 5% MMP	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

2.1.11 Kompetente Bakterien

One Shot Chemically Competent *E. coli* Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.12 Zelllinien

HeLa DMSZ, Braunschweig, Deutschland
 HEK-293 DMSZ, Braunschweig, Deutschland
 T-REx-293 Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.13 Vektoren

pcDNA6/TR Invitrogen, Carlsbad, USA
 pENTR/H1/TO Invitrogen, Carlsbad, USA
 pENTR/U6 Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.14 Software und Internet-Seiten

NCBI Pubmed <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
 NCBI Blast http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome
 BLOCK-iT RNAi designer <http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>
 GeneCards <http://www.genecards.org>
 GenomeStudio Data analysis Illumina, San Diego, USA
 PLINK pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/
 Primer3 <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>
 Affymetrix NetAffx Analysis Center <http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>

UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
BioEdit	Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA
RMA	R, Bioconductor, USA
TIBCO Spotfire IBD	Tibco, USA
Gene Ontology Consortium	http://www.geneontology.org
LocusZoom	http://www.csg.sph.umich.edu/locuszoom
mVISTA	http://www.genome.lbl.gov/vista/mvista
rVISTA	http://www.genome.lbl.gov/vista/rvista

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter keimarmen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank (HeraSafe, Hanau) durchgeführt.

2.2.1.1 Zellkultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchte von 95% kultiviert. Allen Kulturmedien wurde 1% Penicillin/ Streptomycin, sowie 10% hitzeinaktiviertes FCS zugesetzt. Alle drei bis vier Tage wurden die Zellen optisch mittels eines Inversmikroskops (h500, Hund, Wetzlar) überprüft und das Nährmedium ausgetauscht. Nach Erreichen von 70-90%iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Nährmedium abgenommen und die Zellen einmal mit auf 37°C erwärmtem PBS gewaschen. Zell-Zell, bzw. Zell-Substrat Kontakte wurden mit einer einfachen Trypsin/EDTA-Lösung für fünf Minuten bei 37°C in einem Brutschrank aufgelöst. Das Trypsin wurde anschließend mit Kulturmedium inaktiviert und die Zellen vorsichtig durch Auf-und Abpipettieren vereinzelt. Anschließend erfolgte die Aussaat der Zellen in einem Verhältnis von 1:3 in neuen Zellkulturschalen. Sofern nicht anders beschrieben, wurden für die Experimente nur Zellen mit einer Konfluenz von 50-60% benutzt, die die 25. Passage nicht überschritten hatten.

Zusätzlich wurden die Zellkulturen einmal pro Monat auf Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

2.2.1.2 Bestimmung der Zelldichte

Für die Zelldichtebestimmung wurden die vereinzelteten Zellen nach der Trypsin-Inaktivierung (2.2.2) verwendet. Hierzu wurden 20 µl der Zellsuspension auf eine Cellometer Zählkammer aufgetragen, welche für die Dichtebestimmung in den Cellometer Auto T4 eingeführt wurde. Die Zelldichtebestimmung erfolgte im Cellometer automatisch in Zellen pro ml.

2.2.1.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

In den Experimenten wurde Fremd-DNA mittels Lipofektion in eukaryotische Zellen eingebracht. Hierbei wird genetisches Material mit Hilfe von Liposomen, welche mit der Zellmembran fusionieren, in die Zelle transportiert, wobei die DNA an der Oberfläche der kationischen Lipidvesikel komplexiert wird. Bei der Transfektion wurde darauf geachtet, dass die zu transfektierenden Zellen eine Konfluenz von 50 - 60% aufzeigten.

2.2.1.4.1 Transfektion mit FuGENE

Bei der Transfektion mit FuGENE wurde die zu transfektierende DNA gemäß der in Tabelle 3 angegebenen Volumina mit Medium vermischt. Dem Gemisch wurde die entsprechende Menge FuGENE zugesetzt und sofort vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Gemisch tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und diese bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Tabelle 3 Verwendete DNA/FuGENE Mengen.

Plattenformat	DNA Menge [µg]	FuGENE [µl]	Medium [µl]
10 ml	3	12	500
6 x Mikrotiterplatten	1	3	100

2.2.1.4.2 Transfektion mit jetPEI

Bei der Transfektion mit jetPEI wurde zunächst in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße in Abhängigkeit des zu transfektierenden Zellkulturformats (Tabelle 4) jeweils 150 mM Natriumchlorid Lösung vorgelegt. Einem der Gefäße wurde Plasmid DNA, dem anderen die entsprechende Menge jetPEI zugesetzt. Nach sofortigem Mischen wurden beide Lösungen vereinigt, nochmals gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung tröpfchenweise der Zellkultur zugesetzt und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Tabelle 4 Verwendete DNA/JetPEI Mengen.

Platte	DNA [µg]	JetPEI [µl]	NaCl [µl] / Reaktionsgefäß	Gesamtmenge [µl]
96 x Mikrotiterplatten	0,05	0,2	10	20
24 x Mikrotiterplatten	0,25	1	25	50
12 x Mikrotiterplatten	0,5	1,5	50	100
6 x Mikrotiterplatten	1	3	50	100
10 ml	3	12	100	200

2.2.1.5 Generierung stabiler Zelllinien

Um eine stabile Zelllinie zu generieren musste zunächst die Sensitivität der zu transfektierenden Zelllinie gegen das Selektionsantibiotikum, in diesem Fall Zeocin, bestimmt werden. Hierzu wurden sie in sechs 10 ml Platten mit einer Konfluenz von 25% ausgesät. Nach einer Über-Nacht-Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden den 6 Platten Zeocin unterschiedlicher Konzentration (50, 100, 150, 200, 250 und 300 µg/ml) zugegeben. Das Selektionsmedium wurde alle 3 Tage ausgetauscht und dabei die Zelldichte visuell mit einem Inversmikroskop (h500, Hund, Wetzlar) überprüft. Zur Selektion wurde eine Zeocin-Konzentration benutzt, die die Zellen binnen 10-14 Tagen abtötet.

Die Zellen wurden, wie in 2.2.4 beschrieben, mit einem Vektor transfektiert. Am Folgetag wurden sie, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, in ein 10 ml Zellkulturformat in zwei 6 x Mikrotiterplatten überführt, wobei die Zellen 1:2 verdünnt wurden und dem Medium Blasticidin (5µg/ml) und Zeocin (100µg/ml) zugesetzt wurde. Die Selektion wurde fortgesetzt, bis sich resistente Kolonien gebildet hatten, wobei das Selektionsmedium alle 3 Tage ausgewechselt wurde. Einzelne Kolonien wurden dann inklusive 100 µl Medium vorsichtig mit einer Pipette abgelöst und vereinzelt in die Vertiefungen einer 96 x Mikrotiterplatten Platte überführt. Die Zellen in den Vertiefungen wurden weiter unter dem antibiotischen Selektionsdruck kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 80-90% erreichten. Anschließend wurden die Zellen einer jeder Vertiefung mittels Trypsin-Verdau in jeweils eine Vertiefung einer 24 Loch Platte überführt. In dieser verblieben sie, bis wiederum eine Konfluenz von 80-90% erreicht wurde, woraufhin sie in 6 x Mikrotiterplatten überführt wurden, wobei das Selektionsmedium alle 3 Tage gewechselt wurde. Abschließend wurden die Zellen in das 10 ml Format überführt, das für experimentelle Arbeiten verwendet wurde.

2.2.1.6 Induktion stabil transfizierter Zellen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Induktionsexperimente wurde das Tetracyclin-System verwendet. Durch die Zugabe von 1µg/ml Tetracyclin zu dem Nährmedium wird die Expression der in dem Vektor kodierten shRNA induziert. Um eine gleichbleibende Expression zu gewährleisten musste das Medium bzw. das Tetracyclin alle 3 Tage ersetzt werden.

2.2.1.7 Kryokonservierung stabil transfizierter Zellen

Stabil transfizierte Zellen wurden in 10 ml Zellkulturschalen nach Erreichen von 70-90% Konfluenz trypsiniert (Abschnitt 2.2.1.1), in 10 ml Medium (+10% FCS) aufgenommen und in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Suspension wurde für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde zur Lagerung in 1 ml "Cell Freezing Buffer" resuspendiert und in ein Kryotube überführt, das in einem Isopropanolring bei -80°C eingefroren wurde.

2.2.1.8 Auftauen kryokonservierter Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad auf 37°C aufgetaut, in 10 ml vorgewärmtes Medium (+20% FCS) aufgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde für fünf Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand aufgenommen und das Pellet in 10 ml frischem Medium (+20% FCS) resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen in 5 ml Zellkulturflaschen überführt und bei 37°C in einem Brutschrank angezogen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes können mit Hilfe von Agarosegelen Nukleinsäure-Ketten entsprechend ihrer Länge aufgetrennt werden. Unterschiedliche Agarosekonzentrationen der Gele führen hierbei zu unterschiedlichen Auflösungsvermögen in hoch- oder niedermolekularem Bereich.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde Agarose in 0,5x TAE Puffer in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach vollständigem Lösen der Agarose wurde die Lösung abgekühlt und mit "SYBR Safe" (Invitrogen, Karlsruhe) ($1\ \mu\text{l}/100\ \text{ml}$) versetzt. In Elektrophoreseschlitten mit entsprechenden Gelkämmen polymerisierte die Agaroselösung zu einem Gel und wurde anschließend in Gelelektrophoresekammern überführt, in denen 0,5x TAE vorgelegt war.

DNA enthaltende Proben (z.B. PCR-Produkte, Restriktionsenzymverdaue von Plasmiden) wurden in entsprechendem Verhältnis in den 10x DNA-Ladepuffer aufgenommen und in die mittels der Gelkämme entstandenen Taschen geladen. Als Größenmarker zur Bestimmung

der bp Länge diente SmartLadder (200 bis 10000 bp, Eurogentec), welches DNA-Fragmente in definierten Größen enthält. Elektrophoretisch aufgetrennte Banden konnten in einem UV-Transilluminator (ChemiDoc XRS, Bio-Rad Laboratories) mittels UV-Licht detektiert und mit einer angeschlossenen Kamera dokumentiert werden.

Um RNA-Degradation in Proben, die für die cDNA Synthese benutzt werden sollten, auszuschließen, wurden RNA enthaltende Proben analog zu DNA enthaltenden Proben untersucht. Nicht degradierte RNA zeichnet sich durch definierte 28S- und 18S-Banden aus, wobei die 28S-Bande doppelt so intensiv fluoreszieren sollte wie die 18S-Bande. Im Falle von RNA-Degradation ist das 2:1 Verhältnis von 28S zu 18S nicht gegeben, bzw. es sind keine klar voneinander getrennten Banden sichtbar.

2.2.2.2 DNA Aufreinigung aus Agarosegelen

Für die DNA Aufreinigung wurden DNA enthaltene Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und die SYBR Safe gefärbte Bande gewünschter DNA-Sequenz (Länge) nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up-System" nach Angaben des Herstellers. Nach verschiedenen Waschschrritten erfolgte die Elution der DNA von der Säulenmatrix mit 30-50 µl A. bidest.

2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem UV-Photometer (NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 260 nm bestimmt, während bei 280 nm die Protein- und Phenolkonzentration bestimmt wurde. Ein E260/E280 von < 1,8 (DNA) bzw. < 2,0 (RNA) kann auf eine Protein- oder Phenolkontamination hinweisen, welche die korrekte Quantifizierung von DNA oder RNA stört. Ein hoher E230-Wert reflektiert Verunreinigungen durch z.B. Kohlenhydrate, Peptide, Phenol oder aromatische Verbindungen. E260/E230 sollte bei reinen Proben > 2,0 liegen.

2.2.2.4 Isolierung genomischer DNA

Um aus Patienten gewonnene primäre Zellen zu genotypisieren wurde mithilfe des QIAamp DNA Mini Kits (QIAGEN, Hilden), gemäß Herstellerprotokoll, genomische DNA (gDNA)

isoliert. Die Konzentration der gDNA wurde, wie in 2.2.2.3 beschrieben, bestimmt und die isolierte DNA entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5 Isolierung zellulärer RNA

Unabhängig von Zelltyp oder Behandlung wurde RNA mittels des “RNeasy Mini Kits“ isoliert. Hierbei wurden die Zellen nach gründlichem Entfernen des Kulturmediums mit PBS gewaschen, in 350 µl RLT Puffer (mit 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml) lysiert und mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale abgekratzt. Nach Überführung in ein steriles, RNase-freies 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden die Proben bei -20 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Hierzu wurde das Lysat durch Zentrifugation über eine QiaShredder-Säule (13.000 x g, 2 Minuten, RT) aufgeschlossen. Die RNA-Isolation erfolgte nach den Protokollen des Herstellers. Die aufgeschlossenen Proben wurden nach Zugabe des gleichen Volumens an 70%igen Ethanol auf Silikagelmembran-Säulen pipettiert. Zur Eliminierung unerwünschter genomischer DNA wurde ein DNase I-Verdau durchgeführt. Sonstige Schmutzstoffe wurden mittels entsprechender Waschlösung entfernt, gefolgt von der Elution in 50 µl RNase-freiem H₂O. Nach Bestimmung der Konzentration (Abschnitt 2.2.2.3) wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.2.6 cDNA Synthese

Reverse Transkription ist ein Vorgang, bei dem ausgehend von einem mRNA-Template mittels einer reversen Transkriptase komplementäre, einzelsträngige DNA (cDNA) generiert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde das “RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) verwendet. Die in dem Kit verwendete MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse Transkriptase synthetisiert, ausgehend von einem Primer, einen zu einer gegebenen RNA komplementären DNA Strang. In dieser Arbeit wurden Oligo-dT-Primer verwendet. Folglich wurden nur polyadenylierte RNAs in DNA umgeschrieben und in nachfolgenden Experimenten zur Untersuchung herangezogen. Die Zusammensetzung und der Ablauf einer cDNA-Synthese ist beispielhaft in Tabelle 5 dargestellt. Die cDNA wurde entweder sofort verwendet oder bis zur weiteren Nutzung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 5 Reaktionsansatz für die cDNA Synthese.

Ingredienz	Volumen [μ l]	Inkubation
RNA (1 μ g)	x	
Oligo-dt-Primer (100 μ M)	0,125	
dNTPs (10mM)	0,5	
DEPC-H ₂ O	x	
	Σ 7,5	5 Minuten bei 65°C
5 x RT Puffer	2	
RevertAid Enzym Mix	0,5	
	Σ 10	15 Minuten bei 25°C
		30 Minuten bei 50°C
		5 Minuten bei 85°C

2.2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion basiert auf der Fähigkeit der DNA Polymerase, einen neuen DNA Strang, komplementär an einen vorgegebenen Strang zu synthetisieren. Diese Reaktion bedarf einer vorgegebenen 3'OH Gruppe, welche durch Primer zur Verfügung gestellt wird. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene DNA Polymerasen verwendet, die GoTaq DNA Polymerase (Promega) und die Advantage DNA Polymerase (Becton Dickinson). Die Advantage DNA Polymerase unterscheidet sich von der GoTaq DNA Polymerase durch eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität (Proofreading), wodurch die Einbaurrate nicht komplementärer Nukleotide reduziert wird. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die PCRs wie in Tabelle 6 und Tabelle 7 dargestellt durchgeführt. Die Elongationszeit richtete sich dabei nach der Länge der zu erwartenden Produkte, wobei als Faustregel angenommen wurde, dass die Polymerase eine Nukleotideinbaurrate von 1000 Nukleotiden pro Minute aufweist.

Tabelle 6 PCR-Ansatz mit der GoTaq-Polymerase.

Ingredienz	Volumen [μ l]	Inkubation	Zyklen
Matrize	2	95°C für 5 Minuten	1
5x GoTaq-Reaktionspuffer	5		
Oligonukleotide (je 10 μ M)	1	95°C für 1 Minute	
dNTPs (10 mM)	1	T _{Hybrid} für 30 sec	30
GoTaq DNA-Polymerase	0,4	72°C für x Minute	
A. bidest	auf 20		
		72°C für 5 Minute	1

Tabelle 7 PCR-Ansatz mit der Advantage-Polymerase.

Ingredienz	Volumen [μ l]	Inkubation	Zyklen
Matrize	2	95°C für 5 Minuten	1
5x GoTaq-Reaktionspuffer	5		
Oligonukleotide (je 10 μ M)	1	95°C für 1 Minuten	
dNTPs (10 mM)	1	T _{Hybrid} für 30 Sekunden	30
GoTaq DNA-Polymerase	0,4	68°C für x Minuten	
A. bidest	auf 25		
		68°C für 5 Minuten	1

2.2.2.8 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde eine modifizierte Version der Kettenabbruchmethode nach Sanger in Form des "BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits" benutzt. Durch den zufälligen Einbau von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten ddNTPs erfolgt ein Kettenabbruch, was in DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge und Endmarkierung resultiert. In einem Kapillarsequenzierer können die DNA-Fragmente als einzelne Farbbanden detektiert und analysiert werden.

Ein limitierender Faktor dieser Methode liegt in der maximalen Sequenzierlänge von ~1000 bp. Sofern längere DNA Fragmente sequenziert werden mussten, bediente man sich Primern mit überlappenden Sequenzabschnitten. In Tabelle 8 ist beispielhaft ein Sequenzierungsansatz dargestellt.

Tabelle 8 Sequenzierungsansatz.

Ingredienz	Volumen [μ l]	Inkubation	Zyklen
Matrize (300 ng)	x	95°C für 1 Minute	1
BigDye Mix	5		
Oligonukleotide (10 μ M)	1	95°C für 10 Sekunden	
A. bidest	auf 10	50°C für 5 Sekunden	30
		60°C für 4 Minuten	

2.2.2.9 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR handelt es sich um eine molekularbiologische Methode, die basierend auf der herkömmlichen PCR neben der DNA Amplifikation auch deren Quantifizierung ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenz-Messungen, die während eines jeden Zyklus erfasst werden. Da die Fluoreszenz in einem proportionalen Verhältnis zu der synthetisierten DNA-Menge steht, lässt sich am Ende des Laufs anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase vornehmen.

In dieser Arbeit wurde, soweit nicht anders beschrieben, ein Fluoreszenz Farbstoff (SYBR Green PCR Master Mix, Life Technologies, Carlsbad, USA) verwendet, der unspezifisch mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Für die Quantifizierung wurde die relative Expression der untersuchten Gene zu der Expression von GAPDH normalisiert.

Soweit nicht anders beschrieben, setzten sich die qRT-PCR Reaktionen wie in Tabelle 9 angegeben zusammen. Als Qualitätskontrolle wurde am Ende jeden Laufes eine Schmelzkurve ausgewertet.

Tabelle 9 PCR-Ansatz für die qRT-PCR.

Ingredienz	Volumen [μ l]	Inkubation	Zyklen
Matrize (10 ng)	x	50°C für 2 Minuten	1
SYBR Green PCR Master Mix	4,5		
Oligonukleotide (10 μ M)	0,5	95°C für 10 Minuten	1
A. bidest	add 10	95°C für 15 Sekunden	45
		60°C für 1 Minute	

2.2.2.10 Klonierung

Unter Klonierung versteht man die Integration eines DNA-Fragmentes in einen Vektor (Plasmid), der zur Vervielfachung des DNA-Fragmentes in einen Wirtsorganismus (hier chemisch kompetente *E. coli*) eingebracht wird. Durch die Vermehrung des Wirtsorganismus findet auch eine Vervielfältigung des Plasmides statt. Dieses kann anschließend aus dem Wirtsorganismus isoliert und in weiteren Versuchen verwendet werden.

Bei der klassischen Klonierung wird mittels Primern, von denen jeder eine Restriktionsschnittstelle für ein Restriktionsenzym zur späteren Exzision des DNA-Fragmentes enthält, ein DNA-Fragment amplifiziert (Abschnitt 2.2.2.7). Das erhaltene Fragment wird aufgereinigt (Abschnitt 2.2.2.2), anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten (Tabelle 10) und wiederum mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Der Vektor, in den das DNA-Fragment ligiert werden soll, wird mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten und ebenfalls mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Durch den Verdau mit denselben Enzymen entstehen komplementäre Enden an Vektor und DNA-Fragment. In der nachfolgenden Ligation, die durch die T4 DNA-Ligase (Invitrogen) katalysiert wird, werden die Enden der Einzelstränge kovalent miteinander verbunden (Tabelle 11).

Tabelle 10 Beispielhafter Reaktionsansatz für Restriktionsverdaue.

Ingredienz	Zu verdauende DNA	
	DNA-Fragment	Vektor
DNA	1 µg	0,2 µg
10x Fast digest Puffer	3 µl	3 µl
1. Fast digest Enzym	1 µl	1 µl
2. Fast digest Enzym	1 µl	1 µl
Bidest H ₂ O	x µl	x µl
Endvolumen	20 µl	30 µl

5 minütige Inkubation bei 37°C

Tabelle 11 Beispielhafter Ligationsansatz.

Ingredienz	Menge
5x Ligase Reaktionspuffer	4 µl
Vektor	30 fmol
DNA-Fragment	90 fmol
T4 DNA-Ligase	0,1 unit
Bidest H ₂ O	X µl
Endvolumen	20 µl

Inkubation für 1 Stunde bei 23-26°C

Im Anschluss folgte die Transformation in chemisch kompetente Bakterienzellen. Hierzu wurden 2 µl des Ligationsansatzes mit 25 µl chemisch kompetenter *E. coli* Zellen vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte ein 30 sekündiger Hitzeschock bei 42°C, wonach die Zellen sofort auf Eis zurückgestellt wurden. Der Ansatz wurde mit 250 µl LB-Medium vermischt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Für die Selektion der Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten, wurden 50 µl des Transformationsansatzes auf ein dem Resistenzgen entsprechendes Selektionsmedium ausgestrichen. So werden nur diejenigen Bakterienzellen selektiert, die ein Plasmid aufgenommen haben. Durch Vermehrung dieser einzelnen Bakterienzellen entstehen Bakterienkolonien, sogenannte Klone. Zur weiteren Vermehrung wurde mit diesen Kolonien ein Flüssigmedium mit einem entsprechendem Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag wurde das Plasmid isoliert (Abschnitt 2.2.2.11) und mittels eines Testverdaus überprüft. Plasmide, die das erwartete Bandenmuster aufwiesen, wurden weiter mittels Sequenzierung überprüft (Abschnitt 2.2.2.8).

2.2.2.10.1 Klonierung einer kurzen *ANRIL* Variante in ein Überexpressions-Plasmid

Die für die Klonierung vorgesehene *ANRIL* Variante wurde mit den in Tabelle 1 angegebenen Primern amplifiziert, über ein Agarosegel aufgereinigt und wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben in den pcDNA6/TR Vektor kloniert.

2.2.2.10.2 Klonierung eines shRNA-Konstrukts zur Repression kurzer *ANRIL* Varianten

Als “knockdown“ bezeichnet man in der Molekularbiologie eine Technik, mit der die Expression eines oder mehrerer Gene gezielt reduziert werden kann. Oft wird dabei das Prinzip der RNA-Interferenz (RNAi) angewandt, bei dem durch den vorzeitigen Abbau der mRNA die Neubildung eines entsprechenden Genproduktes vermindert wird.

In dieser Arbeit wurde ein induzierbares knockdown System von Invitrogen benutzt (BLOCK-iT). Bei diesem System wird mittels eines RNA Polymerase III Promotor nachgeschalteten Tetracyclin Operators die Expression einer shRNA (short hairpin RNA) reguliert.

Unter Zuhilfenahme der open source software RNAi-Designer (Invitrogen, <http://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress>) wurden zunächst shRNA Oligonukleotide entworfen, welche putativ zu einer hohen Repression des zu untersuchenden Genes führen. Dabei wurde jeweils ein sense-antisense Paar synthetisiert, welches vor der Ligation in einen entsprechenden Vektor hybridisiert wurde. Das für die shRNA kodierende, doppelsträngige Oligonukleotid wurde entweder in den BLOCK-iT/H1/TO oder BLOCK-iT/U6 Vektor (Invitrogen) ligiert, wobei die Ligation für beide Vektoren auf dieselbe Weise (Tabelle 12) erfolgt.

Tabelle 12 Reaktionsansatz für die Ligation eines shRNA-Konstrukts in den entsprechenden Vektor.

Schritt	Vorgehen
Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide zu einem doppelsträngigen Oligonukleotid	<ol style="list-style-type: none"> Reaktionsansatz <ul style="list-style-type: none"> 200 μM sense Oligonukleotid 5 μl 200 μM antisense Oligonukleotid 5 μl 10X Oligo Hybridisierungspuffer 2 μl DNase/RNase freies Wasser 8 μl Σ 20 μl Reaktionsansatz für 4 Minuten auf 95 °C erhitzen 5 – 10 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen anzentrifugieren für 5 Sekunden 10000-fache Verdünnung der doppelsträngigen Oligonukleotide
Klonierung der doppelsträngigen Oligonukleotide in einen Vektor	<ol style="list-style-type: none"> Reaktionsansatz <ul style="list-style-type: none"> 5X Ligationspuffer 4 μl Vektor 2 μl Doppelsträngige Oligonukleotide (5 nM) 1-5 μl DNase/RNase freies Wasser x μl T4 DNA Ligase 1 μl Σ 20 μl durchmischen des Reaktionsansatzes und 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur
Transformation in One Shot TOP10 chemisch kompetente <i>E. coli</i>	<ol style="list-style-type: none"> 2 μl Ligationsansatz wurden mit 25 μl chemisch kompetenten <i>E. coli</i> vermischt Inkubation des Ansatzes für 30 Minuten auf Eis 30 sekundiger Hitzeschock bei 42°C, danach sofort auf Eis setzten Zugabe von 250 μl vorgewärmten LB Medium 1 stündige Inkubation bei 37°C unter ständigem schütteln 50 μl des Ansatzes wurden auf Selektions LB-Platte (50 μg/ml Kanamycin) ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert

Anschließend wurden einzelne Kolonien mittels Kolonie-PCR überprüft, entsprechende Plasmide isoliert (Abschnitt 2.2.2.11) und durch Sequenzierung überprüft (Abschnitt 2.2.2.8).

2.2.2.11 Präparation von Plasmid DNA (Mini Präparation)

Plasmid-Mini-Präparationen wurden mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kits (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurde je 5 ml Bakteriensuspension aus einer Übernachtskultur abzentrifugiert, das Pellet in 250 µl Resuspensionspuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 250 µl Lysis Puffer zugesetzt und das Reaktionsgefäß fünfmal invertiert, bevor 350 µl Neutralisationspuffer zugesetzt wurde. Nach einer fünf minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand auf GeneJET Säule übertragen und für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 500 µl Waschlösung auf die Säule geladen und diese wiederum zentrifugiert. Nach einer Wiederholung des Waschschrilles wurde die Säule trocken zentrifugiert und abschließend die DNA mit 50 µl Bidest Wasser eluiert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Isolation zellulärer Proteine

Die Expression ausgewählter Gene wurde nicht nur auf mRNA-Ebene, sondern auch auf Protein-Ebene untersucht. Dabei wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt, um der Degradation der Proteine vorzubeugen.

2.2.3.1.1 Isolation denaturierter Gesamtproteinlysate

Nach einem Waschschrill mit kaltem PBS wurden adhärenle Zellen mit einem Gummi-Schaber abgetragen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen, für 3 Minuten bei 500 rpm zentrifugiert und abschließend in 100 µl DLB Puffer, dem Protease-und Phosphatase-Inhibitorcocktail (Sigma, München, Deutschland) zugesetzt war, resuspendiert. Zum Aufschluss wurden die Zellen 5 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend sonifiziert (2 x 5 Sekunden). Abschließend wurden die Lysate 15 Minuten bei 16000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

2.2.3.1.2 Zellfraktionierung

Um die Proteinexpression in verschiedenen Zellkompartimenten zu untersuchen, wurden diese wie folgt voneinander getrennt: Nach einem Waschschrill mit kaltem PBS wurden adhärenle Zellen 300 µl "Firts Puffer" zugesetzt, die Zellen mithilfe eines Gummi-Schabers

abgetragen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Die Suspension wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert, 15-mal durch eine 26G Nadel auf- und abgezogen und 10 Minuten bei 1000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Bei dem Pellet handelt es sich um die Zellkerne, welche 3-mal mit kaltem PBS gewaschen, in 40 µl "Second Puffer" resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert wurden. Um die Zellkernfraktion zu erhalten wurde die Suspension für 15 Minuten bei 16000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Um die Membran- und cytoplasmatische Fraktion zu erhalten wurde der erste Überstand für 45 Minuten bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Bei dem so erhaltenem Überstand handelt es sich um die cytoplasmatische Fraktion. Das Pellet wurde 3-mal mit kaltem PBS gewaschen und in RIPA-Puffer resuspendiert um die Membranfraktion zu gewinnen.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung wurde das DC Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) verwendet. Das Kit basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry, bei der die Bildung eines blau-violetten, quadratisch-planaren Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung einer Reduktion des Folin Reagenz zu Molybdänblau folgt. Die resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels eines Photometers ausgenutzt.

Hierfür wurden 5 µl des zu vermessenden Proteinlysates mit 0,5 µl Reagenz S, 24,5 Reagenz A und 200 µl Reagenz B versetzt, für 15 Minuten auf einem Plattenschüttler vermischt und die Absorption bei 612 nm gemessen. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde ein BSA-Standard zugezogen.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird benutzt um denaturierte Proteine ihrem Molekulargewicht nach aufzutrennen. Zur Denaturierung wird dem Proteingemisch β -Mercaptoethanol und das anionische Detergens SDS zugesetzt. Letzteres spaltet Wasserstoffbrückenbindungen, was zu einer Zerstörung der Tertiär- und Sekundärstruktur und somit zu einer linearisierten Peptidkette führt. Zusätzlich führt das SDS durch seine Anlagerung an die Disulfidbrücken der Aminosäure eine negative Ladung, die die ursprüngliche Ladung des Proteins überdeckt,

ein. Durch das konstante Masse/Ladung-Verhältnis können die Polypeptidketten auf einem Trägermaterial in einem elektrischen Feld ihrer Masse nach aufgetrennt werden. Als Trägermaterial dienen Polyacrylamid-Gele, die in ihrer Durchlässigkeit durch verschiedene Acrylamidkonzentrationen variiert werden können.

Um eine hohe Auflösung der Proteine zu gewährleisten wird dem eigentlichen Trenngel noch ein Sammelgel vorgeschaltet. Dieses zeichnet sich durch die Weite seiner Poren und den niedrigeren pH-Wert (6,8) im Vergleich zum Trenngel (pH 8,8) aus, wodurch eine Konzentrierung der Proteine an der Trenngelfront erreicht wird. In Tabelle 13 ist die Zusammenstellung der Gele aufgeführt, wobei APS und Temed immer zuletzt zugesetzt wurden

Tabelle 13 Zusammensetzungen von Polyacrylamid Trenn- und Sammelgelen.

Ingredienz	Trenngel		Sammelgel
% Acrylamid	12%	15%	3%
A.bidest (ml)	3.5	2.5	1.95
4 x Trenn-/Sammelgel Puffer (ml)	2.5	2.5	0.75
N,N'-Methylenbisacrylamid (ml)	4	5	0.3
TEMED(μl)	10	10	3
10%APS (μl)	100	100	30

Die zu untersuchenden Proben wurden mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt. Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurden immer identische Mengen auf ein Gel aufgetragen, als Größenstandard wurde auch 5 μl PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden die Proben bei 15 mA/Gel für 30 Minuten in einem Sammelgel an der Trenngelfront fokussiert, dann bei 30 mA/Gel für 45 Minuten im Trenngel der Größe nach aufgetrennt.

2.2.2.4 Western-Blot und Immundetektion

Der Western-Blot ist eine Methode um durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine für eine anschließende Immundetektion auf eine Trägermembran zu übertragen. In dieser Arbeit wurden die Proteine mittels des "semi-dry" Verfahrens auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese Methode bedient sich erneut des Elektrophorese-Prinzips, wobei jedoch das elektrische Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung aufgebaut wird. Dadurch werden die negativ-geladenen Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel zur positiven Anode gezogen und somit auf die darunter liegende Trägermembran übertragen. Zu diesem Zweck wurden zwei

zurechtgeschnittene Whatman-Papiere entweder in Anoden- oder Kathodenpuffer für 15 Minuten vorinkubiert. Die PVDF-Membran wurde für 5 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend für 5 Minuten in aqua bidest. äquilibriert. Für den Proteintransfer wurde ein Blot-Stapel aus Whatman-Papier, Gel, Membran und Whatman-Papier luftblasenfrei aufgebaut. Der Stapel wurde entsprechend der vorinkubierten Whatman-Papiere (Anode oder Kathode) zwischen die Graphitplatten der Blotting-Apparatur (Trans-Blot Turbo Transfer System, BioRad) eingesetzt. Der Transfer erfolgte pro Blot bei 1 Ampere (A) und 25 Volt für 30 Minuten. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran 3-mal in TTBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit Magermilchpulver (5% in TTBS) abgesättigt. Anschließend wurden die an die Membran gebundenen Proteine mit Antikörpern detektiert. Hierfür wurde die Membran mit einem proteinspezifischen Antikörper, der wie in Tabelle 2 angegeben in einer 5%igen Magermilch-TTBS-Lösung verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TTBS erfolgte die Detektion des primären Antikörpers mittels eines sekundären Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten Antikörpers (in 5% Magermilchpulver in TTBS). Einer 1-stündigen Inkubation mit dem sekundären Antikörper folgten drei Waschschrritte mit TTBS und eine Überschichtung der Membran mit ECL-Reagenz (GE Healthcare Europe) für 3 Minuten. Das im ECL-Reagenz enthaltene Luminol wird durch die an den Sekundärantikörper gebundene HRP gespalten, wodurch es zu einer Lichtemission kommt, die mittels eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann.

Sollte die Membran für mehrere Immundetektionen verwendet werden, so wurden gebundene Antikörper mittels alkalischer Denaturierung entfernt. Zu diesem Zweck wurde die Membran für 40 Minuten bei 55°C in "stripping-Puffer" inkubiert und anschließend in TTBS gewaschen. Abschließend konnten weitere Proteine wie oben beschrieben mittels Primär- und Sekundärantikörpern nachgewiesen werden.

2.2.5 RNA-Analysen

2.2.5.1 Mikrochip-Hybridisierung

Mithilfe von genomweiten Genexpression-Mikroarrays kann die transkriptionelle Aktivität eines Genoms in einem Experiment untersucht werden. Hierfür muss aus den Zellen mRNA gewonnen, in cDNA umgeschrieben und erneut in cRNA transkribiert werden. Die cRNA wird schließlich fragmentiert, biotinyliert und mit sogenannten Microarrays (Affymetrix Human Gene 1.0 ST, Affymetrix) hybridisiert (GeneChip WT Terminal Labeling an

Hybridization Kit, Affymetrix). Auf Microarrays sind tausende, synthetisch erstellte Oligonukleotide gebunden, die komplementär zu unterschiedlichen mRNA Transkripten sind. Nach diversen Waschschriften folgt die Färbung der gebundenen, biotinylierten cRNA mit Streptavidin, an das ein Fluorochrom gekoppelt ist. Die Intensität der Fluoreszenzemission ist proportional zur Menge gebundener cRNA und kann mittels eines Scanners und entsprechender Software ausgewertet werden.

Für die vorliegenden Analysen wurde der Einfluss einer verminderten Expression kurzer *ANRIL* Spleißvarianten auf das Transkriptom von T-Rex-293 Zellen untersucht. Dafür wurden drei unterschiedliche Stimulationszeitpunkte miteinander verglichen, wobei das Transkriptom eines jeden Zeitpunktes durch fünf unabhängige RNA Proben bestimmt wurde.

Alle für die Mikrochip-Hybridisierung erforderlichen Schritte wurden entsprechend der Herstellerprotokolle durchgeführt.

2.2.5.2 Statistische Auswertung von Mikroarray-Daten

Die Normalisierung der Daten wurde unter Verwendung der quelloffenen Software RMA (R, Bioconductor) vorgenommen. Expressionsunterschiede wurden basierend auf den Quotienten der Mediane berechnet. Die Falscherkennungsrate (false discovery rate, FDR) wurde mithilfe der Westfall & Young Permutation wie in "Wiley Series in Probability & Mathematical Statistics", "Resampling-Based Multiple Testing: Examples and Methods for p-Value Adjustment" von Peter Westfall und Stanley Young (New York, 1993) beschrieben, mit 5000 Permutationen bestimmt. Differentielle Genexpression wurde durch folgende Kriterien definiert: Die Stärke der Genexpressionsänderung zwischen zwei Vergleichsgruppen musste $< 0,667$ für erniedrigte Expression und $> 1,5$ für erhöhte Expression betragen, was einer 1,5-fachen Genexpressionsänderung entspricht. Zusätzlich wurden nur jene Expressionsänderungen als aussagekräftig betrachtet, deren FDR unter 1% lagen und keine Ausreißer aufwiesen. Letztere wurden definiert als Transkripte einer Messgruppe, deren relative Expressionswerte in den Messbereichen einer anderen Messgruppe lagen (Abbildung 7). Cluster Analysen wurden unter Verwendung der Software TIBCO Spotfire IBD (Tibco) durchgeführt, wobei die Korrelationen als Abstandsmessungen angezeigt wurden.

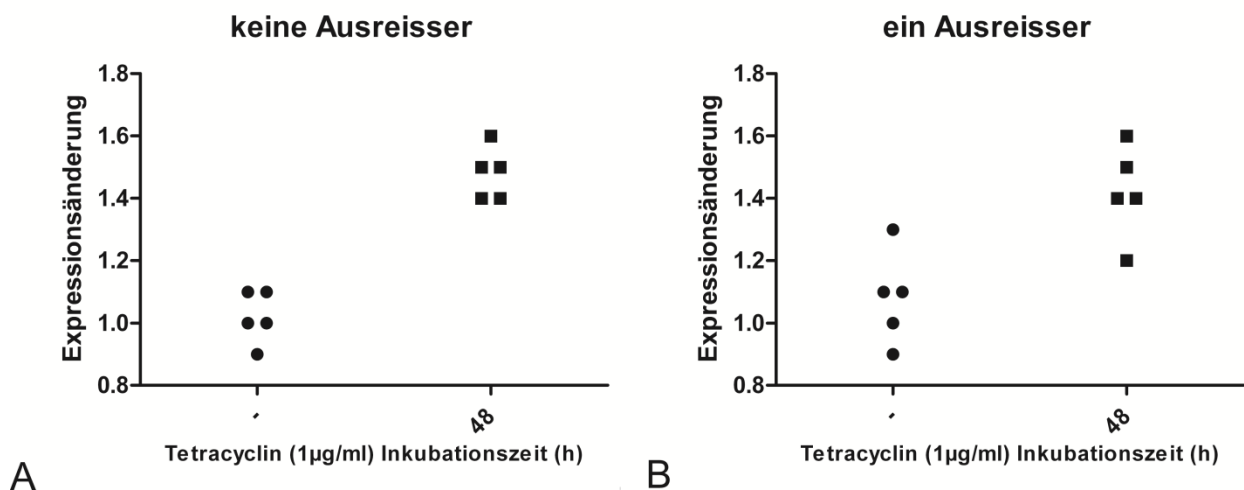


Abbildung 7 Beispiel für das Qualitätskriterium „kein Ausreißer“.

A. Die Messwerte der zwei Messgruppen "unstimuliert" und "48 Stunden stimuliert" zeigen keinerlei Überlappung in der Stärke der Expressionsänderung. Damit ist das Qualitätsmerkmal "kein Ausreißer" erfüllt.

B. Es kommt zu einer Überschneidung zwischen den Messgruppen um jeweils einen Messwert. Damit ist das Qualitätsmerkmal "kein Ausreißer" nicht erfüllt.

2.2.5.3 Gen-Ontologie Analysen

Die Zuordnung in Gene-Ontologie (GO)-Gruppen wurde wie in “GOstat: Find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes“ beschrieben durchgeführt (Beissbarth and Speed, 2004). Dafür wurden die mit den Transkripten und Kandidatengenen assoziierten biologischen Prozesse von dem Gene Ontology Consortium bezogen (www.geneontology.org).

2.2.6 Genetische Analysen

2.2.6.1 Studienpopulationen

Aggressive Parodontitis (AgP) Patienten wurden in den Niederlanden, Österreich, der Türkei und Deutschland rekrutiert. Dabei wurden nur diejenigen Patienten für die Studie mit einbezogen, die aufgrund des Geburtsortes beider Elternteile und den Familiennamen der entsprechenden Ethnie zugeordnet werden konnten. Aufgrund der nachgewiesenen geringen Allelfrequenzunterschiede in den deutschen Subpopulationen konnten alle in Deutschland rekrutierten Individuen in die Analyse einbezogen werden (Steffens et al., 2006). Die AgP Patienten durften keinen Diabetes aufweisen und mussten folgendes Kriterium erfüllen: Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, vor dem 35. Lebensjahr, mussten mindestens zwei Zähne einen mehr als 30%igem Alveolarknochen-Abbau aufweisen. Umweltfaktoren wie Gesundheitszustand und Rauchverhalten (Raucher, ehemaliger Raucher oder Nichtraucher) wurden mittels eines Fragebogens erhoben. Als Kontrollen wurden den jeweiligen AgP-Gruppen entsprechende ethnisch passende Populationen zugeordnet. Für die explorative Studie (ImmunoChip) wurden die deutschen AgP-Kontrollen zufällig aus dem Schleswig-Holsteinischen Einwohnerregister ausgewählt. Die niederländischen AgP-Kontrollen wurden sowohl für die Replikation der Assoziationssignale von *C11ORF10*, dem *FADS* Gen-Cluster, *VAMP3*, *PER3* und *PARK7* als auch für die Replikation von SNP rs17030881 in *CAMTA1* benutzt. Sie wurden als parodontitis- und diabetesfrei diagnostiziert und zu ihrem Rauchverhalten befragt, ansonsten wurden keine weiteren klinischen Untersuchungen durchgeführt.

Die türkischen AgP-Fälle und Kontrollen wurden entsprechend der Amerikanischen Akademie für Parodontologie (Armitage, 1999) durch die Hacettepe-, Ankara- und Kocaeli-Universitäten rekrutiert. Probanden der Kontrollgruppe zeigten weder eine akute Parodontitis, noch war eine entsprechende Erkrankung in ihrer Krankenakte vermerkt. Neben parodontalen Untersuchungen und periapikalen Aufnahmen wurden bei den Parodontitis-Patienten zusätzlich persönliche, familiäre und medizinische Daten erhoben. Dadurch konnten Patienten mit einer Hepatitis- oder HIV-Infektion, einer systemischen Krankheit (z.B. Diabetes), einer Immundefizienz oder einer längerfristigen Behandlung mit antiinflammatorischen Medikamenten und antibiotischer Prophylaxe aus der Analyse ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden auch Schwangere oder Stillende sowie unter 18-Jährige für die Analysen nicht mit einbezogen. Für jedes Individuum wurden Alter, Geschlecht, Rauchverhalten und soziodemographische Daten erhoben.

Patienten der Gruppe der Koronaren Herzkrankheiten (KHK) bestehen aus einer populationsrepräsentativen Sammlung von nicht verwandten Deutschen, die ausschließlich im Norden Schleswig-Holsteins durch die PopGen Biobank rekrutiert wurden (Krawczak et al., 2006). Sie zeigten in einer Koronarangiographie mindestens eine 70%ige Stenose in einem der Haupt-Herzkranzgefäße. Der größte Teil der Patienten (90,3%) zeigte eine schwere Atherosklerose und hat sich bereits einer koronaren Revaskularisation unterzogen (Angioplastie oder Bypass). Des Weiteren zeigten 1148 der KHK Patienten einen BMI unter 30. Als Kontrollen dienten 493 populationsrepräsentative Individuen, die durch die PopGen Biobank aus dem Norden Schleswig-Holsteins rekrutiert wurden, sowie 1757 weitere populationsrepräsentative Individuen, die durch das Max-Rubner-Institut zu Kiel rekrutiert wurden. Die genannten Studienpopulationen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14 Zusammenfassung der Studienpopulationen.

Studie	Diagnose	Herkunft	N	Männlich (%)	Weiblich (%)	Unbekannt (%)	Raucher (%)	Unbekannt (%)	
Explorativ	AgP	Deutschland (explorativ)	600	223 (41)	321 (59)	56	345 (63)	54 (9)	
Replikation	AgP	Deutschland, Österreich	136	50 (40)	74 (60)	12 (9)	52 (59)	48 (35)	
		Niederlande	155	40 (25.8)	115 (74.2)	0	137 (41.3)	9 (6.2)	
		Italien	49	16 (33)	33 (67)	0	-	-	
		Türkei	93	25 (26.9)	31 (33.3)	37 (39.8)	20 (21.5%)	38 (40.9)	
Validierung	CP	Deutschland	1,437	632 (43.9)	795 (55.3)	10 (0.7)	708 (49.3)	45 (3.1)	
Explorativ	Kontrollen	Deutschland (explorativ)	1.448 (Pop.-Repräsentativ)	701 (48)	747 (52)	0	230 (48)	972 (67)	
Replikation	Kontrollen	Deutschland (Parodontitis frei)	581	354 (60.9)	189 (32.5)	38 (6.5)	52 (12)	137 (24)	
		Niederlande (Parodontitis frei)	341	187 (54.8)	151 (44.3)	3 (0.9)	137 (41.3)	9 (2.6)	
			679	404 (59.5)	152 (22.4)	123 (18.1)	-	679 (100)	
			(Blut-Donoren)						
		Italien (Parodontitis frei)	103	43 (42)	60 (58)	0	-	-	
	Türkei (Parodontitis frei)	75	10 (13.3)	23 (30.7)	42 (56)	7 (9.3)	44 (58.7)		
Validierung	Kontrollen	Deutschland (Blut-Donoren)	1.125	599 (53)	525 (47)	0	271 (60)	675 (60)	

2.2.6.2 Isolierung und Amplifizierung genomischer DNA

Vollblut wurde in, 1,2-2 mg EDTA/ml enthaltende S-Monovetten gesammelt und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Aus den Blutproben wurde genomische DNA (gDNA) mit dem "Invisorb Blood Universal Kit" (Invitek) nach Herstellerprotokoll isoliert. Die Konzentration der gDNA Proben wurde durch Zugabe des Quant-iT PicoGreen dsDNA Reagenz und anschließender Detektion mit dem "Varioskan Flash" bestimmt. Für die Qualitätsbestimmung der Proben wurden diese auf einem 2%igem Agarose Gel visualisiert. Diejenigen Proben, welche auf dem Agarosegel eine einzelne, scharfe Bande zeigten, wurden anschließend für die Gesamt-Genom-Amplifizierung nach Herstellerprotokoll (Amersham) verwendet. Die DNA Proben wurden mit der "Tecan Freedom Evo 200 Station" auf 20 ng/ μl normalisiert, abschließend wurde die Quantifizierung der DNA Proben wiederholt um die Genauigkeit des Normalisierungsschrittes sicherzustellen.

2.2.6.3 Genotypisierung und statistische Analysen

Die Genotypen für die chromosomalen Regionen von *VAMP3* und *C11ORF10* sowie dem Bereich 91 kb stromabwärts des *CAMTA1* Gens wurden mittels des "custom genotyping array ImmunoChip" generiert und automatisiert durch die "GenomeStudio Data analysis" Software bestimmt. Die Genotypisierungs-Ausgangsdaten wurden für die Qualitätskontrolle und das Clustering zusammengefügt. SNPs, die eine Genotypisierungsrate $< 98\%$ und/oder einen Separationswert $< 0,4$ aufwiesen, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Nach der Qualitätskontrolle blieb für den explorativen Teil der Studie eine Gesamtzahl von 600 AgP Fällen und 1441 Kontrollen. Nachträglich wurden alle SNPs mit einer Allelfrequenz der seltenen Variante (minor allele frequency, MAF) von unter 5% von der Analyse ausgeschlossen.

Die Genotypen für *CAMTA1* und *ADIPOR1* wurden mit dem Affymetrix "GeneChip Human Mapping 500K Array" gewonnen. SNPs mit einer Genotypisierungsrate $< 90\%$ und einer Allelfrequenz der seltenen Variante $< 5\%$, oder einem p-Wert unter 5×10^{-2} wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die GWAS Genotypen wurden automatisch mit dem BRMBLL Algorithmus bestimmt, zusätzlich wurde der SNP rs17030881 mit dem "TaqMan" Genotypisierungs-System auf einer automatisierten Plattform genotypisiert. Alle Marker wurden nach Abweichungen vom Hardy-Weinberg Equilibrium in den Kontrollen getestet, bevor sie in die Analyse einbezogen wurden ($p = 0,05$).

Die Genotypen wurden mit der PLINK v2.049 Software analysiert. Signifikante Assoziationen wurden durch den Chi^2 Test in zweifelder-Kontingenztafeln bestimmt. Genotypische, dominante, multiplikative und rezessive genetische Modelle wurden für die Abschätzung des genetischen Effektes der assoziierten Allele benutzt. Für die Assoziation der seltenen Variante rs17030881 wurde der exakte Test nach Fisher benutzt. $p < 0,05$ wurde als nominal signifikant betrachtet und die LD-Bestimmung der Haplotypen mit HaploView 4.2 berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines induzierbaren Repressionssystems

Die lncRNA *ANRIL* kommt in unterschiedlichen Geweben in verschiedenen Spleißvarianten vor (Jarinova et al., 2009). Grundsätzlich kommen zwei Haupt-Spleißvarianten des *ANRIL* Gens vor, diese unterscheiden sich durch verschiedene polyadenylierte 3'-Exone. Die kurzen Varianten beinhaltet die Exone 1 bis 13, wobei das 13te Exon polyadenyliert wird und in den langen Varianten nicht auftaucht. Die langen Varianten beginnen mit dem ersten Exon und enden mit dem polyadenylierten 20ten Exon (Pasmant et al., 2007).

Potentiell durch *ANRIL* Transkripte *in trans* regulierte Gene sollten mithilfe eines induzierbaren Systems identifiziert werden. Hierbei fiel die Wahl auf das "Tet-ON" System. Dabei wird durch Zugabe von Tetracyclin zum Nährmedium die Expression einer shRNA induziert, was wiederum zu einer Repression des Zielgens führt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine shRNA gegen das 13te Exon des *ANRIL* Gens designt. Dadurch konnten alle kurzen Spleißvarianten runterreguliert werden, da diese stets das 13te Exon beinhalten.

3.1.1 Überprüfung der stabil transfizierten T-REx-293 Zellen

Mit dem shRNA-Konstrukt gegen das 13te Exon des *ANRIL* Gens wurde eine stabile Zelllinie hergestellt. Anschließend wurde diese auf ihre Funktionsfähigkeit hin untersucht, wobei die Repression der kurzen und der langen *ANRIL* Spleißvarianten unter dem Einfluss verschiedener Tetracyclin-Konzentrationen betrachtet wurde.

Die Transkriptlevel der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten konnten durch beide verwendeten Tetracyclin-Konzentrationen signifikant gesenkt werden. Dabei führte 1 µg/ml Tetracyclin zu einem 0,42-fach verringerten Transkriptniveau ($p = 0,008$), während 10 µg/ml Tetracyclin das Transkriptniveau um das 0,5-Fache senkte ($p = 0,005$) (Abbildung 8). Die Stärke der Repression zwischen den verwendeten Tetracyclin-Konzentrationen zeigte einen 1,2-fachen Unterschied, welcher keine statistische Signifikanz aufwies. Demgegenüber zeigte sich, dass das Transkriptniveau der langen *ANRIL* Spleißvarianten durch die Tetracyclin-Stimulation und der daraus resultierenden shRNA-Expression nicht signifikant verändert wurde (Abbildung 8). In den folgenden Experimenten wurde für die Induktion der shRNA eine Tetracyclin-Konzentration von 1 µg/ml verwendet.

Während einer viralen Infektion kann doppelsträngige RNA (dsRNA), die z.B. im Zuge der viralen Replikation gebildet wurde, zu einer Aktivierung diverser antiviraler Mechanismen in der Wirtszelle führen (Nat. Cell Biol., Karpala et al., 2005, Vol. 5, 489–490; Malmgaard, 2004; Sadler and Williams, 2008). Die durch Interferone induzierbaren 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetasen (*OAS*) sind Schlüsselenzyme dieser Reaktion. Die Enzyme werden durch die Interaktion mit dsRNA aktiviert und katalysieren die Polymerisierung von ATP zu 2'-5'-verknüpften Oligoadenylatketten (Hovanessian and Justesen, 2007). Die Oligoadenylatketten binden an die Endoribonuklease RNaseL, womit diese aktiviert und RNA degradiert wird (Player and Torrence, 1998; Wreschner et al., 1981). Um sicherzustellen, dass eine etwaige Repression des Transkriptlevels auf die shRNA zurückzuführen ist und nicht auf eine unspezifische RNA Degradation infolge einer zellulären Antwort auf doppelsträngige RNA, wurde die Expression der 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase 1 (*OAS1*) unter den verwendeten Versuchsbedingungen untersucht.

In den Experimenten wurde durch die Tetracyclin-vermittelte shRNA-Expression die Expression von *OAS1* nicht signifikant induziert (Abbildung 8). Zwar konnte eine leicht erhöhte *OAS1* Expression nach Stimulation mit 10 µg/ml beobachtet werden, jedoch war diese nicht signifikant und erreichte auch nicht die in der Literatur beschriebene 100-fache Transkriptionsänderung (Bridge et al., 2003).

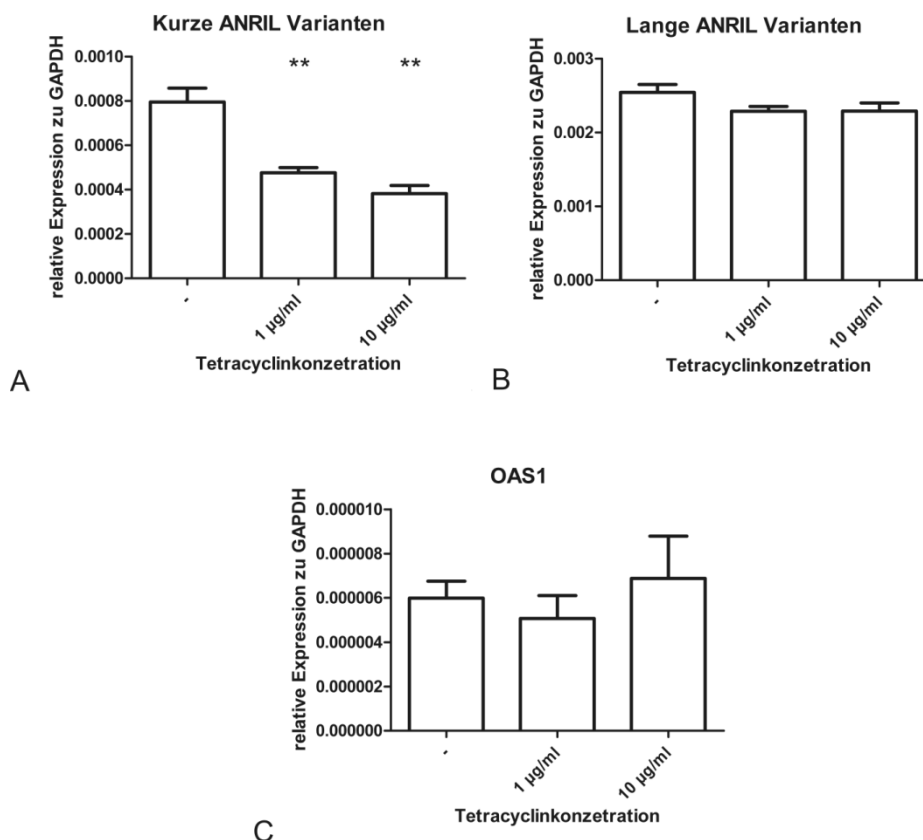


Abbildung 8 Expression von *OAS1* sowie der langen und kurzen *ANRIL* Spleißvarianten unter verschiedenen Tetracyclin-Konzentrationen.

Durch die Zugabe verschiedener Tetracyclin-Konzentrationen wurde die Expression der gegen Exon 13 gerichteten shRNA induziert. **A.** Die Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin führte zu einer 0,42-fachen Reduktion ($p = 0,008$), während 10 µg/ml Tetracyclin zu einer 0,5-fachen Reduktion ($p = 0,005$) der kurzen Spleißvarianten führte. **B.** Durch die verwendeten Tetracyclin-Konzentrationen wurde die Expression der langen *ANRIL* Varianten nicht signifikant geändert. **C.** Unter den verwendeten Versuchsbedingungen wurde die Expression von *OAS1* durch die Tetracyclin-vermittelte shRNA-Expression nicht signifikant induziert.

Die Werte repräsentieren den Durchschnitt aus drei unabhängigen Experimenten, von denen jedes als Triplikat durchgeführt wurde. Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an (* $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$; *** $p < 0,00005$).

Nachfolgend sollte der Zeitpunkt bestimmt werden, an dem die Repression der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten ihr Maximum erreicht. Hierfür wurden die stabilen Zellen mit 1 µg/ml Tetracyclin inkubiert und die Expression zu acht verschiedenen Zeitpunkten nach der Tetracyclin-Zugabe betrachtet.

Bereits 4 Stunden nach Tetracyclin-Zugabe zeigte sich ein um das 0,24-fach reduziertes Transkriptlevel ($p = 0,0054$) der kurzen Spleißvarianten, wobei eine 2-stündige Tetracyclin-Inkubation keinen Einfluss auf das Transkriptniveau hatte. Das niedrigste Transkriptniveau (0,6-fach reduziert) konnte 48 Stunden nach Tetracyclin-Zugabe beobachtet werden ($p = 0,0003$). Von diesem Zeitpunkt an blieb das Transkriptlevel für den beobachteten Zeitraum unverändert. Auch nach 96 Stunden war das Transkriptlevel der kurzen *ANRIL* Varianten

etwa 0,58-fach reduziert, durch eine höhere Streuung der Einzelwerte stieg der p-Wert jedoch auf 0,0025 (Abbildung 9).

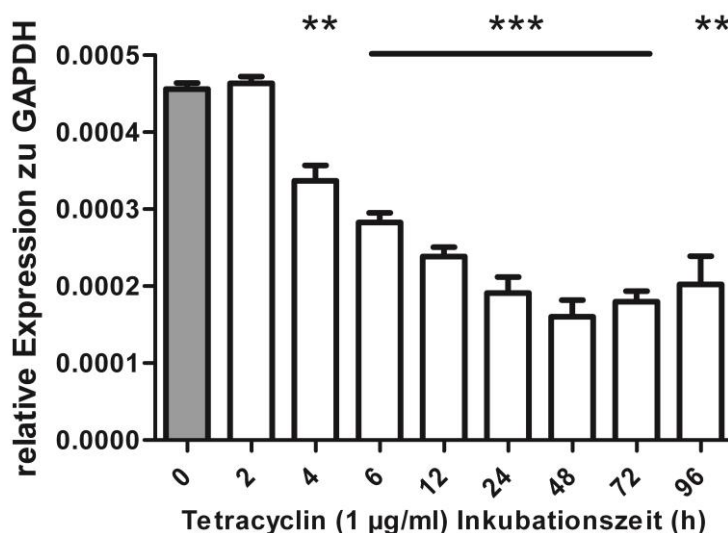


Abbildung 9 Induzierbare Repression der *ANRIL* Transkripte über einen Zeitraum von 96 Stunden. Die shRNA-vermittelte Repression der mit Exon 13 endenden *ANRIL* Transkripte wurde durch die Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin induziert. Die Repression wurde über einen Zeitraum von 96 Stunden aufgezeichnet, wobei die niedrigsten Transkriptniveaus (0,6-fache Repression) bereits nach 48 Stunden erreicht wurden. Die Werte repräsentieren den Durchschnitt aus drei unabhängigen Experimenten, von denen jedes als Triplikat durchgeführt wurde. Der Fehlerbalken repräsentiert den SEM (* $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$; *** $p < 0,00005$).

3.1.2 Validierung der *cis*-regulatorischen *ANRIL* Funktion auf *CDKN2A/B* in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen

Eine bekannte Funktion der *ANRIL* Transkripte ist ihr regulatorischer Einfluss auf die benachbarten Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* (Yap et al., 2010). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Repression der kurzen *ANRIL* Varianten zu einer veränderten Expression dieser Gene führt. Hierzu wurden die Transkriptniveaus 48 und 96 Stunden nach shRNA-Induktion mit den Transkriptniveaus in nicht stimulierten Zellen verglichen (Abbildung 10).

Sowohl *CDKN2A* als auch *CDKN2B* zeigten 96 Stunden nach Tetracyclin-Zugabe einen signifikanten Unterschied in den Transkriptleveln. Diese waren für *CDKN2A* 1,5-mal ($p = 0,013$) und für *CDKN2B* 1,3-mal ($p = 0,0017$) höher.

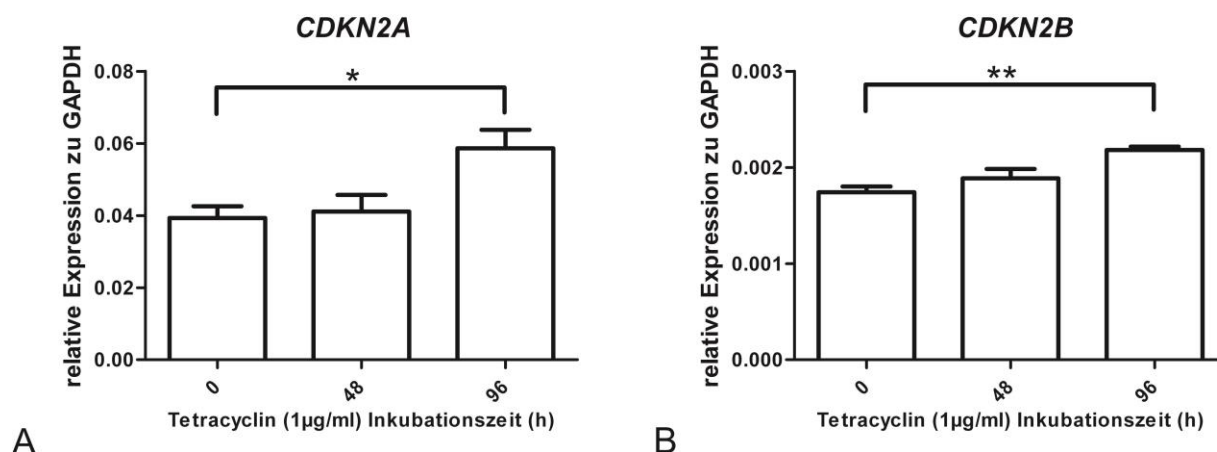


Abbildung 10 *CDKN2A* und *CDKN2B* Transkriptniveaus nach Tetracyclin-induzierter Repression der kurzen *ANRIL* Varianten.

Die Expression der shRNA gegen kurze *ANRIL* Varianten wurde durch Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin zu dem Nährmedium induziert und die relativen Transkriptniveaus der *ANRIL* benachbarten Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* nach 48 Stunden und 96 Stunden bestimmt. **A.** Die Expression von *CDKN2A* war nach 96 Stunden signifikant erhöht (1,5-fach, $p = 0,0136$). **B.** Die Expression von *CDKN2B* war 96 Stunden nach shRNA-Induktion signifikant erhöht (1,3-fach, $p = 0,0017$).

Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten, von denen jedes als Triplikat durchgeführt wurde. Der Fehlerbalken gibt den SEM an.

CDKN2A und *CDKN2B* sind gut charakterisierte Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6, welche den Übergang aus der G1- in die S-Phase des Zellzyklus steuern (Hannon and Beach, 1994; Serrano et al., 1993). Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern sich die veränderte Expression von *CDKN2A* und *CDKN2B* auf die Zellteilungsrate auswirkt. Hierzu wurden die Zellen eine Woche mit Tetracyclin behandelt, wobei alle drei Tage die Zellen in einem 1:2 Verhältnis in neue Kulturschalen aufgeteilt wurden und dabei die Zellzahl dokumentiert wurde. Als Kontrolle dienten Zellen, welche zwar den Tetracyclin-Repressor exprimieren, das shRNA-Konstrukt jedoch nicht enthalten. Bei diesen Kontrollzellen konnte zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen Tetracyclin-induzierten und nicht-induzierten Zellen beobachtet werden (Abbildung 11). Die stabile Zelllinie zeigte nach drei Tagen ebenfalls keinen Unterschied in der Zelldichte zwischen Tetracyclin-induzierten und nicht-induzierten Zellen. Sechs Tage nach Tetracyclin-Induktion war die Zelldichte in den Tetracyclin-behandelten Zellen verglichen mit der Zelldichte nach drei Tagen um mehr als die Hälfte zurück gegangen, während die nicht-induzierten Zellen eine ähnliche Zellzahl pro ml wie nach drei Tagen aufwiesen (Abbildung 11).

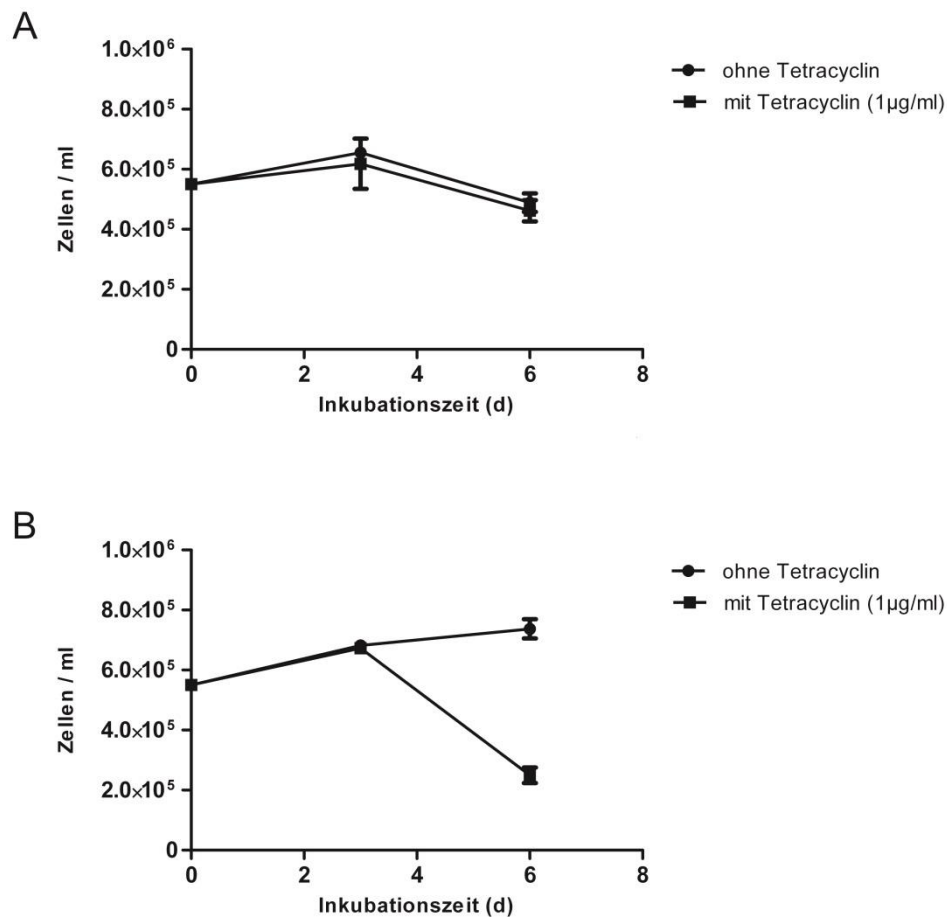


Abbildung 11 shRNA-vermittelte Repression kurzer *ANRIL* Varianten vermindert die Zellteilungsrate in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen.

Durch die Zugabe von Tetracyclin wurde die Expression der shRNA gegen Exon 13 der kurzen *ANRIL* Varianten induziert und die Zellzahl nach drei und sechs Tagen dokumentiert. **A.** Die Kontrollgruppe nicht-transfizierter T-REx-293 Zellen zeigte keinen Unterschied zwischen Tetracyclin-behandelten und unbehandelten Zellen. **B.** Stabil transfizierte T-REx-293 Zellen zeigten sechs Tage nach shRNA-Induktion eine um das 0,77-fache verringerte Zellzahl.

Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten, von denen jedes als Triplikat durchgeführt wurde. Der Fehlerbalken gibt den SEM an.

3.2 Genomweite Expressionsprofilierung

3.2.1 Aufarbeitung der Mikroarray-Daten

Von den möglichen 40.716 RefSeq-Transkripten, die mit dem “Affymetrix Human Gene 1.0 ST Mikroarray“ hätten detektiert werden können, zeigten 20.339 ein positives Hybridisierungssignal. Bevor eine Aussage über eine differentielle Genexpression infolge der shRNA-Induktion getroffen werden konnte, mussten die Datensätze hinsichtlich ihrer Belastbarkeit überprüft werden.

Die Stärke der Genexpressionsänderungen (fold change, FC) variierte in den Datensätzen zwischen -2,72 und 2,07, wobei 1 keiner Änderung, < 1 einer verringerten Genexpression und > 1 einer erhöhten Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe entspricht. Mit welcher Wahrscheinlichkeit der FC ein Zufallsbefund darstellte, wurde mit der Falscherkennungsrate (false discovery rate, FDR) untersucht, welche in dem Datensatz je nach Transkript zwischen 0% und 71% variierte. Durch den Vergleich der genomweiten Expressionsprofile von nicht-stimulierten Zellen und Zellen, die für 96 Stunden mit Tetracyclin stimuliert wurden, soll der Einfluss der gewählten Ausschlusskriterien auf die Anzahl der gemessenen Hybridisierungssignale beispielhaft verdeutlicht werden. Durch Einschränkung der FDR auf $< 5\%$ konnte die Anzahl der Hybridisierungssignale auf 2.526 gesenkt werden. Um die Anzahl potentieller falsch positiver Signale weiter zu minimieren wurde als zusätzliches Kriterium “kein Ausreißer“ festgelegt. Dieses schließt alle Hybridisierungssignale aus, bei denen die Messgruppen nicht absolut distinkt voneinander sind: Es durfte zu keiner Überlappung zwischen den Messwerten einer jeden Messgruppe mit den Messwerten der Referenzgruppe kommen. Durch das Einbeziehen dieses Ausschlusskriteriums konnte die Anzahl der Hybridisierungssignale weiter auf 1.888 gesenkt werden. Durch das Herabsetzen des zulässigen FDR auf $< 1\%$, bei gleichzeitiger Beibehaltung des “kein Ausreißer“-Kriteriums konnte die Zahl der detektierbaren Transkripte nochmals auf 1.225 gesenkt werden. Tabelle 15 fasst die Ausschlusskriterien und die daraus resultierenden Verringerungen der Hybridisierungssignale zusammen.

Tabelle 15 Einfluss der gewählten Ausschlusskriterien auf die Anzahl der Hybridisierungssignale in den untersuchten Vergleichsgruppen.

Auswahlkriterium	Hybridisierungssignale	
	0 gegen 48 Stunden	0 gegen 96 Stunden
Kein	20.339	20.339
FDR < 5%	1.818	2.526
FDR < 5% und "kein Ausreißer"	1.227	1.888
FDR < 1% und "kein Ausreißer"	790	1.225

Das Beispiel demonstriert die Notwendigkeit einer Qualitätskontrolle um die Anzahl potentieller falsch-positiver Befunde aus einem großen Datensatz zu entfernen. Für die nachfolgende Gostat-Einordnung der differentiell exprimierten Gene zu biologischen Prozessen wurden ausschließlich jene Transkripte herangezogen, die ein Hybridisierungssignal bei einer FDR < 1% und "kein Ausreißer" zeigten.

3.2.2 Statistische, funktionelle Analyse mittels Gostat

Regulierte Prozesse nach 48-stündigem knockdown der kurzen *ANRIL* Varianten

Die Funktion der Gene, die durch die 48-stündige Induktion der shRNA eine differentielle Expression zeigten, wurde mit Hilfe des Onlinetools Gostat in der Hauptkategorie "Biologischer Prozess" statistisch untersucht. Als Referenzliste dienten die 790 Genprodukte, die nach Anlegen der beschriebenen Ausschlusskriterien ein Hybridisierungssignal zeigten. Mittels Gostat wurden die Genprodukte bzw. Gene in Gen-Ontologie (GO) -Gruppen eingeordnet. Anhand statistischer Berechnungen konnten häufig vorkommende GO-Gruppen der differentiell exprimierten Gene identifiziert werden (Abbildung 12).

Gene, die bei dem biologischen Prozess "Ossifikation während der Knochenreifung" beteiligt sind, wurden durch die verringerte Transkriptniveaus der kurzen *ANRIL* Varianten am stärksten reguliert. Demgegenüber zeigte die Analyse, dass Gene, die eine Rolle bei der Energiegewinnung durch Oxidation organischer Metabolite spielen, durch das verminderte Transkriptlevel der kurzen *ANRIL* Varianten weniger beeinflusst werden, als es der Zufall erwarten lassen würde. Tabelle 22 (Anhang) gibt die Gene, die dem Prozess "Ossifikation während der Knochenreifung" zugerechnet werden können, wieder.

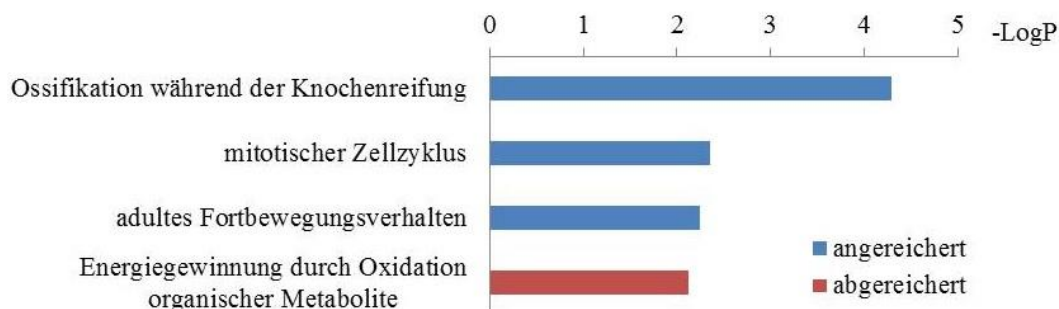


Abbildung 12 Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO) -Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte infolge einer shRNA-vermittelten Repression der kurzen *ANRIL* Varianten nach 48 Stunden.

Gene, welche im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach 48 Stunden eine differentielle Expression aufgrund eines reduzierten Transkriptniveaus der kurzen *ANRIL* Varianten zeigten, wurden mittels Gostat hinsichtlich ihrer biologischen Funktion untersucht. Als Referenzliste dienten dabei die 790 Genprodukte, die ein Hybridisierungssignal und sowohl eine $FDR < 1\%$ als auch “keine Ausreißer“ zeigten. In Abhängigkeit ihrer biologischen Funktion wurden die regulierten Gene verschiedenen Prozessen zugeordnet. In der Abbildung sind diejenigen Prozesse gegen den $-\text{LogP}$ -Wert dargestellt, bei denen die Anzahl der regulierten Gene höher (angereichert/blau) oder niedriger (abgereichert/rot) liegt, als es durch Zufall zu erwarten wäre.

Regulierte Prozesse nach 96-stündigem knockdown der kurzen *ANRIL* Varianten

Die biologische Funktion der Gene, die eine differentielle Expression durch ein vermindertes Transkriptlevel der kurzen *ANRIL* Varianten nach 96 Stunden zeigten, wurde ebenfalls durch eine Gostat-Analyse untersucht. Hierfür wurden nur diejenigen 1.225 Genprodukten verwendet, die eine $FDR < 1\%$ und “keine Ausreißer“ aufwiesen.

Die Analyse ergab erneut, dass die meisten regulierten Gene dem Prozess der “Ossifikation während der Knochenreifung“ zugeordnet werden können (Abbildung 13), die entsprechenden Gene sind in Tabelle 23 (Anhang) dargestellt. Daneben zeigten auch Prozesse wie das “adulte Fortbewegungsverhalten“, die “Bildung der Polarität des embryonalem Epithels“ und der “Lipid-Katabolismus“ eine auffallend hohe Anreicherung regulierter Gene. Interessanterweise wurden Gene, die dem biologischen Prozess der Zellalterung zugeordnet werden, weniger häufig differentiell exprimiert, als per Zufall zu erwarten wäre.

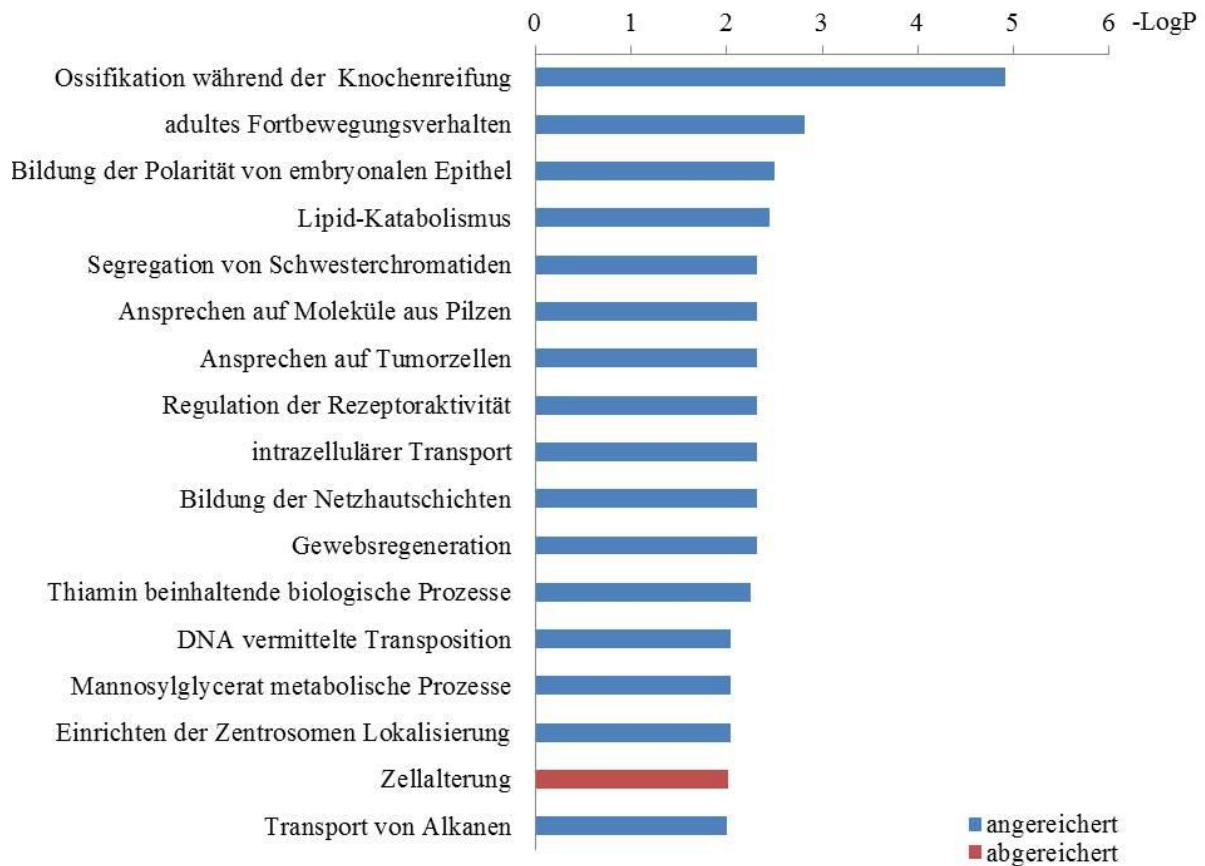


Abbildung 13 Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO) -Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte infolge einer shRNA-vermittelten Repression der kurzen *ANRIL* Varianten nach 96 Stunden.

Gene, welche im Vergleich zu unbehandelten Zellen nach 96 Stunden eine differentielle Expression aufgrund eines reduzierten Transkriptniveaus der kurzen *ANRIL* Varianten zeigten, wurden mittels Gostat hinsichtlich ihrer biologischen Funktion untersucht. Als Referenzliste dienten dabei die 1.225 Genprodukte, die ein Hybridisierungssignal und sowohl eine $FDR < 1\%$ als auch "keine Ausreißer" zeigten. In Abhängigkeit ihrer biologischen Funktion wurden die regulierten Gene verschiedenen Prozessen zugeordnet. In der Abbildung sind diejenigen Prozesse gegen den $-\text{LogP}$ Wert dargestellt, bei denen die Anzahl der regulierten Gene höher (angereichert/blau) oder niedriger (abgereichert/rot) liegt, als es durch Zufall zu erwarten wäre.

3.2.3 Identifizierung potentieller Kandidatengene

Wie in Abschnitt 3.2.2.1 beschrieben, erfüllten 790 bzw. 1.225 der regulierten Gene die vorgegebenen Ausschlusskriterien nach 48 bzw. 96 Stunden. In den folgenden Validierungsexperimenten sollten nur die am stärksten regulierten Gene betrachtet werden. Hierfür wurden nur die Gene berücksichtigt, welche einen $FC > +/- 1,5$ zeigten.

Tabelle 16 gibt die Gene wieder, die nach 48 Stunden die gewählten Kriterien erfüllten. Von den 13 Genen, die 48 Stunden nach knockdown der kurzen *ANRIL* Varianten differentiell exprimiert waren, zeigte nur *MTIG* eine erhöhte Expression. Unter den zwölf Genen, die ein verringertes Transkriptniveau aufwiesen, sind mit einem $FC < -2$ *ANKRD1*, *DNAH17*, *VAMP3* und *C11ORF10* besonders hervorzuheben.

Tabelle 16 Zusammenfassung der durch den 48-stündigen knockdown der kurzen *ANRIL* Varianten regulierten Gene. Alle Gene zeigten eine FDR < 1%, "keine Ausreißer" und eine Expressionsänderung > +/- 1,5.

ProbeSetID	Chromosom	Strang	Gen	Expressionsänderung
8001531	16	-	MT1G	1.56
8046380	2	+	ITGA6	-1.51
8004167	17	+	FAM64A	-1.51
7896744	1	+	OR4F16	-1.52
7923503	1	-	ADIPOR1	-1.56
7996908	16	+	SNTB2	-1.64
7950142	11	-	CLPB	-1.66
8141133	7	-	SHFM1	-1.74
7920707	1	-	C1orf2	-1.78
7948606	11	-	C11orf10	-2.00
7897370	1	+	VAMP3	-2.01
8018902	17	-	DNAH17	-2.07
7934979	10	-	ANKRD1	-2.10

Ein verringertes Transkriptniveau der kurzen *ANRIL* Varianten für 96 Stunden bewirkte eine FC > +/- 1,5 bei 43 Genen. Von diesen 43 Genen zeigte keines eine erhöhte Expression, während *C11ORF10*, *VAMP3*, *PSAP* und *CRIPAK* eine FC < -2,0 aufwiesen (Tabelle 17).

Tabelle 17 Zusammenfassung der durch den 96-stündigen knockdown der kurzen *ANRIL* Varianten regulierten Gene. Alle Gene zeigten eine FDR < 1%, "keine Ausreißer" und eine Expressionsänderung > +/- 1,5.

ProbeSetID	Chromosom	Strang	Gen	Expressionsänderung
8116372	5	-	RNF130	-1.52
8114787	5	-	GNPDA1	-1.52
7953200	12	+	CCND2	-1.52
8075182	22	-	XBP1	-1.53
7911345	1	-	OR4F16	-1.54
7904137	1	+	HIPK1	-1.54
8158523	9	+	PPP2R4	-1.55
7977270	14	+	LOC388022	-1.55
7971388	13	-	SLC25A30	-1.56
8136370	7	+	AGBL3	-1.56
8014115	17	-	MYO1D	-1.57
8065868	20	-	EIF6	-1.57
7918757	1	-	DENND2C	-1.58
7937485	11	+	PNPLA2	-1.59
8167013	23	+	PHF16	-1.59
8147503	8	+	LAPTM4B	-1.60
8005407	17	+	LLGL1	-1.60
8167347	23	+	SUV39H1	-1.61
8150126	8	-	PPP2CB	-1.63
7902883	1	+	LRRC8D	-1.64
7950644	11	-	NDUFC2	-1.64
8146278	8	+	SGK196	-1.64
7976571	14	+	C14orf129	-1.64
7903980	1	+	C1orf162	-1.68
7950142	11	-	CLPB	-1.69
7962146	12	-	FAM60A	-1.71
7923503	1	-	ADIPOR1	-1.74
8173713	23	-	MAGT1	-1.74
7996908	16	+	SNTB2	-1.76
8018872	17	-	DNAH17	-1.76
8037913	19	-	NAPA	-1.79
8121749	6	+	GJA1	-1.81
8046380	2	+	ITGA6	-1.92
8093494	4	+	CRIPAK	-2.00
7934196	10	-	PSAP	-2.00
7897370	1	+	VAMP3	-2.46
7948606	11	-	C11orf10	-2.72

Für die nachfolgenden Validierungsexperimente sollten diejenigen Gene ausgesucht werden, welche die stärksten Expressionsänderungen nach knockdown der kurzen *ANRIL* Varianten zeigten. Potentielle Kandidatengene mussten 48 Stunden nach shRNA-Induktion einen FC $\geq \pm 1,5$ aufweisen welcher sich darüber hinaus in den folgenden 48 Stunden vergrößern/verkleinern musste. Durch diese Betrachtung konnte die Anzahl der für die Nachverfolgung selektierten und mit der *ANRIL* Expression korrelierten Gene auf *ADIPOR1*, *VAMP3* und *C11ORF10* eingeschränkt werden (Tabelle 18).

Tabelle 18 Zusammenfassung der durch den knockdown der kurzen *ANRIL* Varianten regulierten Gene. Alle Gene zeigten eine FDR $< 1\%$ und "keine Ausreißer". Gene, die nach 48 Stunden einen FC $< -1,5$ zeigten und darüber hinaus nach 96 Stunden stärker reguliert waren als nach 48 Stunden, sind in der Tabelle durch eine Linie von den restlichen Genen abgetrennt.

ProbeSetID	Chromosom	Strang	Gen	Expressionsänderung	
				nach 48 h	nach 96 h
7897370	1	+	VAMP3	-2,01	-2,46
7948606	11	-	C11orf10	-2,00	-2,72
7923503	1	-	ADIPOR1	-1,56	-1,74
8173713	23	-	MAGT1	-1,47	-1,74
7976571	14	+	C14orf129	-1,43	-1,64
8014115	17	-	MYO1D	-1,41	-1,57
7902883	1	+	LRRC8D	-1,41	-1,64
7937485	11	+	PNPLA2	-1,39	-1,59
7903980	1	+	C1orf162	-1,33	-1,68
8114787	5	-	GNPDA1	-1,30	-1,52
7914021	1	-	SLC9A1	-1,29	-1,43
8016159	17	-	DCAKD	-1,29	-1,47
8065868	20	-	EIF6	-1,28	-1,57
8116372	5	-	RNF130	-1,27	-1,52
8120833	6	+	SH3BGRL2	-1,25	-1,45

3.3 Validierung ausgewählter, durch Mikroarray-Analysen identifizierter Kandidatengene

Wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, zeigten in den Mikroarray-Analysen *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3* die stärksten mit *ANRIL* korrelierten Expressionsänderungen nach 48 und 96 Stunden. Nachfolgend wurde die Richtigkeit dieser Befunde mittels weiterer Methoden verifiziert.

3.3.1 Validierung in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen

Validierung auf RNA-Ebene

Die regulatorische Wirkung der kurzen *ANRIL* Transkripte wurde zunächst mittels quantitativer Echtzeit PCR (qRT-PCR) überprüft. Hierfür wurden die stabilen Zelllinien wie bei den Mikroarray-Analysen mit 1 µg/ml Tetracyclin inkubiert. 48 und 96 Stunden nach Tetracyclin-Zugabe wurden die Zellen geerntet und die Expression der untersuchten Gene analysiert (Abbildung 14).

Infolge der Tetracyclin-Zugabe war das Transkriptlevel der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten nach 48 Stunden um das 0,55-Fache reduziert ($p = 0,0003$). Wie in den vorhergehenden Experimenten war das Transkriptniveau der kurzen Transkripte nach 96 Stunden nur geringfügig niedriger als nach 48 Stunden (Reduktion um das 0,6-Fache; $p = 0,0001$). Im Fall von *ADIPOR1* konnte nach 48 Stunden ein verringertes Transkriptlevel dokumentiert werden (0,63-fache Reduktion; $p < 0,0001$), während nach 96 Stunden das Transkriptlevel um das 0,55-Fache niedriger ($p = 0,0005$) als der nicht-stimulierte Ausgangswert war. Im Einklang mit den Mikroarray-Daten zeigte *C11ORF10* 48 Stunden nach shRNA-Induktion ein reduziertes Transkriptniveau (0,76-Fache Reduktion; $p < 0,0001$), welches sich nach 96 Stunden nur geringfügig veränderte (0,77-fache Reduktion; $p < 0,0001$). Ein ähnliches Bild konnte auch für *VAMP3* beobachtet werden. Der Repression nach 48 Stunden (0,77-fache Reduktion; $p < 0,0001$) folgte nur eine geringfügig stärkere Repression nach 96 Stunden (0,78-fache Reduktion; $p < 0,0001$).

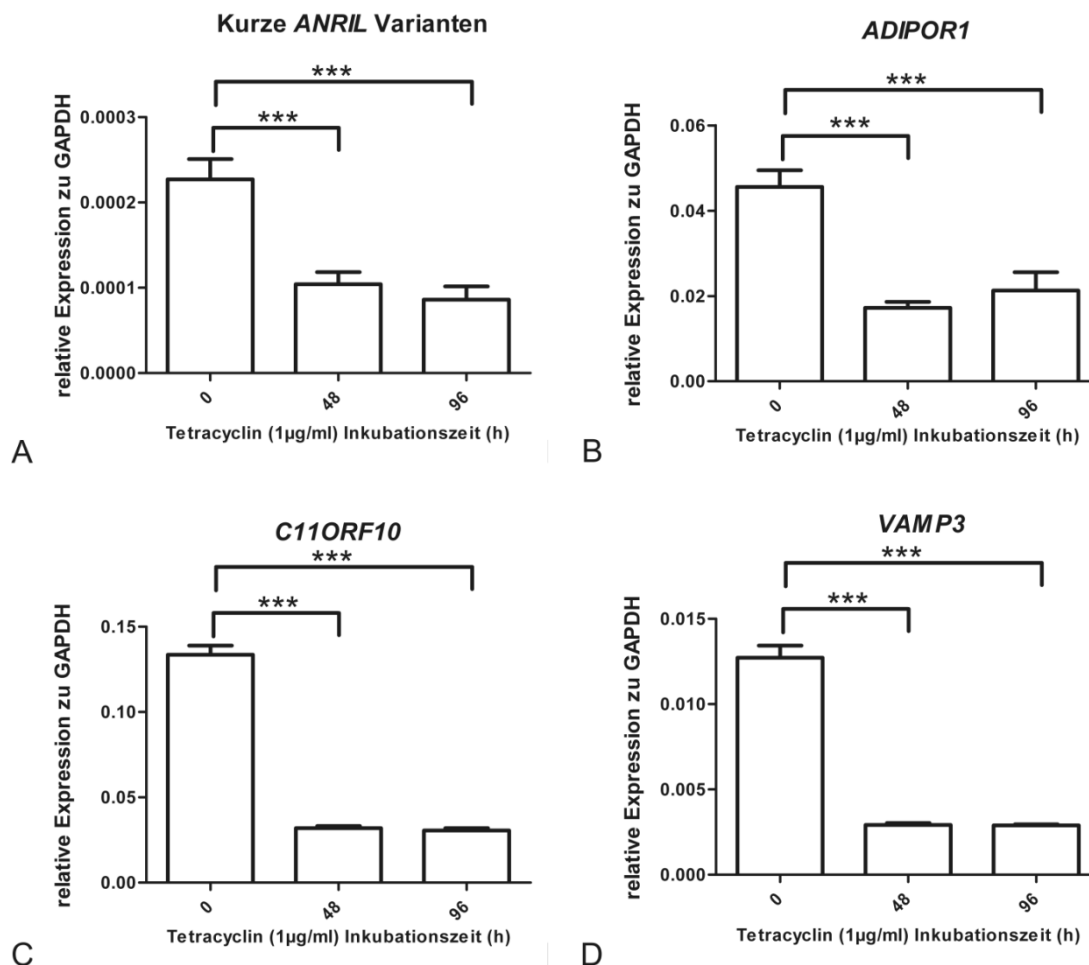


Abbildung 14 Transkriptniveaus von *ANRIL*, *C11ORF10*, *VAMP3* und *ADIPOR1* in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen 48 und 96 Stunden nach Tetracyclin-Induktion.

Die shRNA-Expression wurde durch Zugabe von 1µg/ml Tetracyclin zu dem Nährmedium induziert. Die Transkriptniveaus der betrachteten Gene wurden nach 0, 48 und 96 Stunden bestimmt. **A.** Die Expression der kurzen *ANRIL* Transkripte zeigte nach 48 Stunden eine 0,55-fache ($p = 0,0003$) und nach 96 Stunden eine 0,6-fache Repression ($p = 0,0001$). **B.** Die Expression von *ADIPOR1* zeigte nach 48 Stunden eine 0,63-fache ($p < 0,0001$) und nach 96 Stunden eine 0,55-fache Repression ($p = 0,0005$). **C.** Die Expression von *C11ORF10* zeigte nach 48 Stunden eine 0,76-fache ($p < 0,0001$) und nach 96 Stunden eine 0,77-fache Repression ($p < 0,0001$). **D.** Die Expression von *VAMP3* zeigte nach 48 eine 0,77-fache ($p < 0,0001$) und nach 96 Stunden eine 0,78-fache ($p < 0,0001$) Repression. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten, von denen jedes als Triplikat durchgeführt wurde. Der Fehlerbalken gibt den SEM an.

Durch Polymerase III transkribierte shRNAs können eine Interferonantwort induzieren (Bridge et al., 2003). Eine mögliche Erklärung dafür könnte das Triphosphat an dem 5'-Ende der shRNA darstellen, welches zu der Aktivierung des Retinsäure induzierbaren Proteins (RIG) -I führen kann (Hornung et al., 2006; Nallagatla et al., 2007). Um eine unspezifische Regulation der identifizierten Gene infolge der durch RIG-I aktivierten antiviralen Signalkaskade auszuschließen, sollte überprüft werden, wie sich die Expression einer unspezifischen shRNA auf die Expression der identifizierten Gene auswirkt.

Zu diesem Zweck wurde eine stabile Zelllinie generiert, welche eine shRNA gegen Exon 19 des *ANRIL* Transkriptes exprimiert, jedoch weder die kurzen noch die langen Spleißvarianten reprimiert. Wie Abbildung 15 zu entnehmen ist, führte die Expression dieser shRNA zu keiner signifikant veränderten Expression der betrachteten Gene.

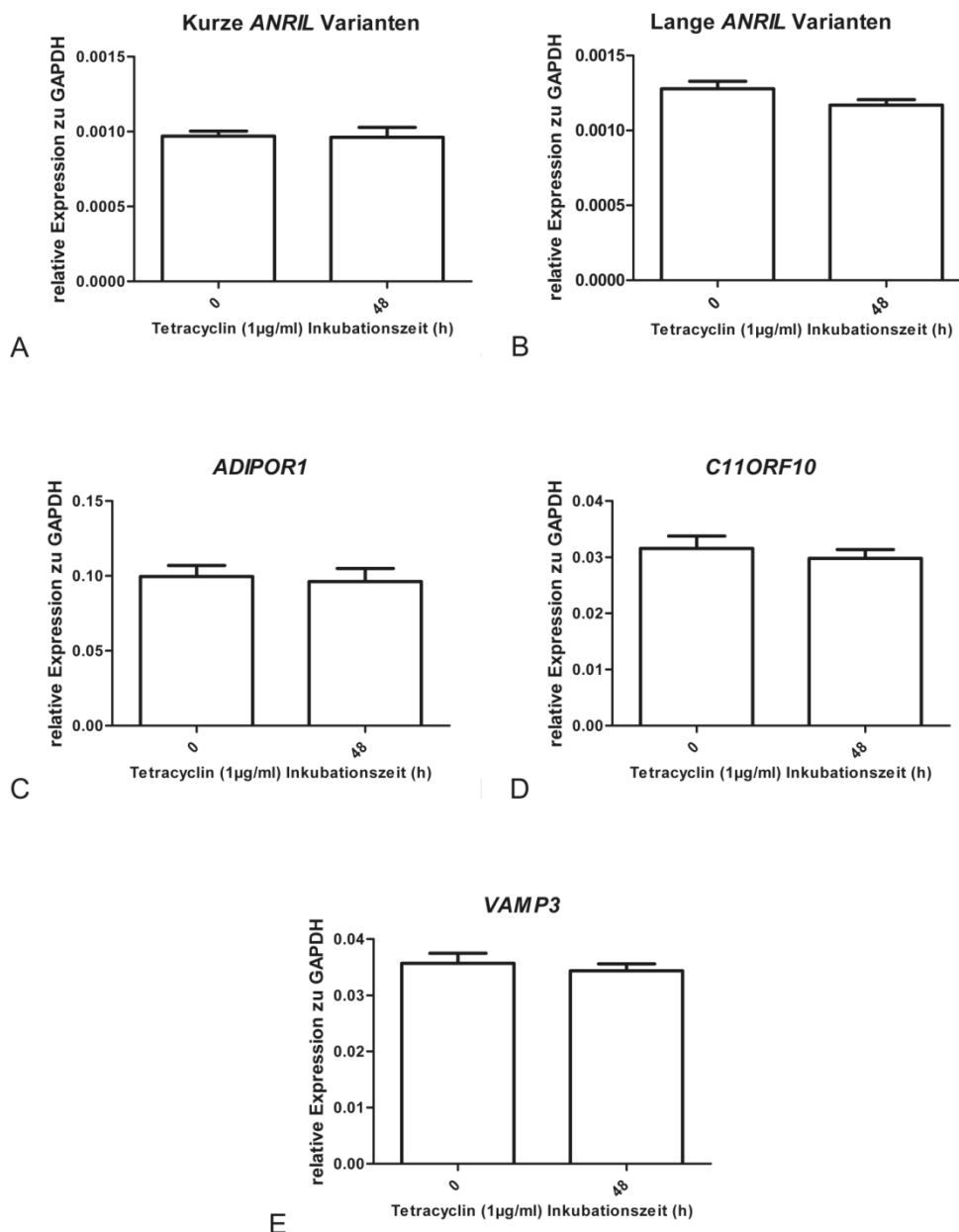


Abbildung 15 Expressionsniveaus von *ANRIL*, *C11ORF10*, *VAMP3* und *ADIPOR1* in T-REx-293 Zellen, die stabil mit einer unspezifischen shRNA transfiziert worden sind, vor und nach 48-stündiger Induktion der shRNA durch Tetracyclin-Zugabe.

1µg/ml Tetracyclin wurde dem Nährmedium zugesetzt und die Transkriptniveaus 48 Stunden nach Induktion mit nicht-induzierten Zellen verglichen. Die Transkriptlevel von **A.** kurzen *ANRIL* Transkripten, **B.** langen *ANRIL* Transkripten, **C.** *ADIPOR1*, **D.** *C11ORF10* und **E.** *VAMP3* wurden durch die Induktion der unspezifischen shRNA nicht signifikant geändert. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten, von denen jedes als Triplikat durchgeführt wurde. Der Fehlerbalken gibt den SEM an.

Validierung auf Proteinebene

Nachdem die Ergebnisse der Mikroarray-Analysen mittels qRT-PCR bestätigt werden konnten, sollte nun überprüft werden, ob die beobachteten Unterschiede in den Transkriptniveaus auch auf Proteinebene nachgewiesen werden können. Hierzu wurden die stabilen Zelllinien für sechs Tage mit 1 µg/ml Tetracyclin stimuliert, wobei das Nährmedium alle drei Tage durch frisches, Tetracyclin beinhaltenes Nährmedium ersetzt wurde. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und die verschiedenen Zellfraktionen getrennt. Mittels "Western Blot" wurde der Proteingehalt in der cytosolischen Fraktion und der Membranfraktion von Tetracyclin-stimulierten und nicht-stimulierten Zellen untersucht (Abbildung 16).

Im Vergleich zu den nicht-stimulierten Kontrollzellen konnte infolge der Tetracyclin-vermittelten Reduktion der kurzen *ANRIL* Transkripte eine verminderte Proteinmenge in der cytosolischen Fraktion für C11ORF10 und ADIPOR1 nachgewiesen werden. Demgegenüber lag der Proteingehalt in der Membranfraktion für beide Proteine unterhalb der Nachweisgrenze. VAMP3 zeigte infolge der Tetracyclin-vermittelten Repression der kurzen *ANRIL* Transkripte eine verminderte Proteinkonzentrationen in der cytosolischen- und der Membranfraktion.

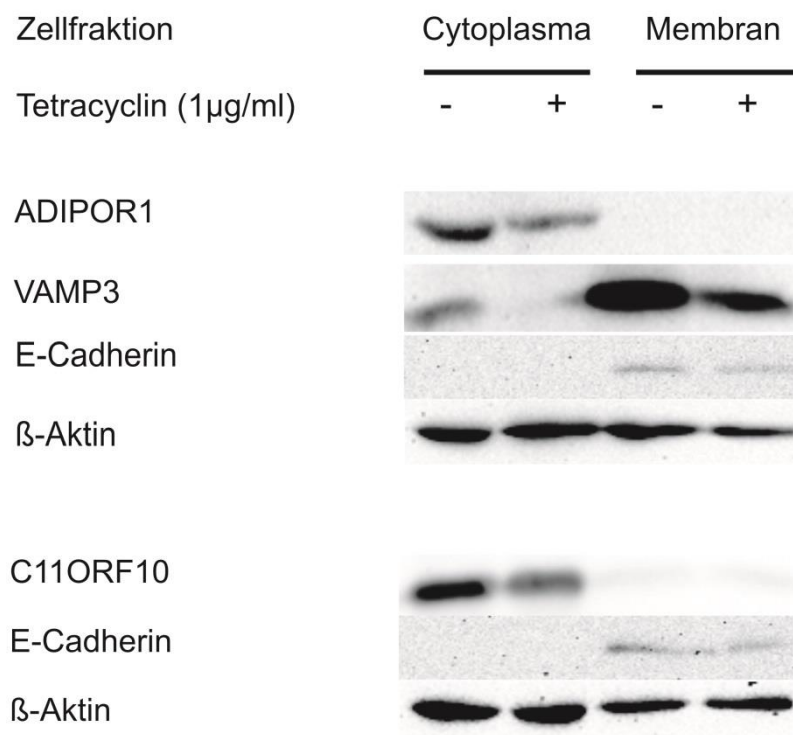


Abbildung 16 Verminderte Proteinmenge von ADIPOR1, C11ORF10 und VAMP3 infolge des shRNA-vermittelten knockdowns der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten.

Der knockdown der mit Exon 13 endenden *ANRIL* Transkripte führte nach sieben Tagen zu einer verringerten Proteinmenge von ADIPOR1, C11ORF10 und VAMP3. Während ADIPOR1 und C11ORF10 nur in der cytoplasmatischen Fraktion detektiert werden konnten, wurde VAMP3 auch in der Membranfraktion nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin detektiert. Der Nachweis von E-Cadherin in der Membranfraktion diente als Kontrolle der Zellfraktionierung.

3.3.2 Validierung in transient transfizierten HeLa Zellen

Um die durch RNAi-Experimente erhaltenen Daten zu validieren, sollten diese Experimente mit einer weiteren shRNA, welche eine andere Sequenz auf demselben Transkript abdeckt, repliziert werden (Stein and Krieg, 1994). Des Weiteren wird empfohlen, wenn möglich, Ergebnisse durch mehrere RNAi-Effektoren gegen dasselbe Ziel aber mit unterschiedlichen Sequenzen zu validieren (Nat. Cell Biol., 2003, Vol. 5, 489–490).

Aus den oben genannten Gründen sollten die durch Mikroarray-Analysen identifizierten und durch qRT-PCR validierten Ergebnisse in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen, durch eine transiente Transfektion bestätigt werden. Dadurch kann auch ausgeschlossen werden, dass die durch Mikroarray-Analysen erhaltenen Daten nicht auf eine Insertion der shRNA in eine aktive Transkriptionseinheit zurückzuführen sind. Hierfür wurde zum einen eine weitere shRNA gegen das 13te Exon des *ANRIL* Transkriptes verwendet und zum anderen ein weiterer Expressionsvektor (pENTR/U6). Anders als der Vektor, der für die Herstellung der

stabilen Zelllinien benutzt wurde, ist der Vektor nicht induzierbar, sondern konstitutiv aktiv und die Expression der shRNA wird statt über einen H1 über einen U6 Promotor initiiert.

Für das Validierungsexperiment wurden HeLa Zellen benutzt. Anders als bei den T-REx-293 Zellen ist aufgrund des nicht vorhandenen Tetracyclinrepressors für die Induzierung der transfizierten shRNA keine Tetracyclin-Zugabe notwendig. Stattdessen wird die shRNA sofort nach der Transfektion über die entsprechenden Promotoren transkribiert.

Im Einklang mit den Experimenten in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen zeigte sich nach 48 Stunden für beide verwendeten shRNAs ein vermindertes Transkriptniveau der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten (0,33-fach für pENTR/H1/TO, $p = 0,0008$; 0,5-fach für pENTR/U6, $p = 0,0001$). Auch konnte in beiden Gruppen 48 Stunden nach Transfektion signifikant reduzierte Transkriptniveaus von *ADIPOR1* ($p = 0,0014$ für pENTR/H1/TO; $p = 0,0036$ für pENTR/U6), *C11ORF10* ($p = 0,00173$ für pENTR/H1/TO; $p = 0,0001$ für pENTR/U6) und *VAMP3* ($p = 0,0003$ für pENTR/H1/TO; $p = 0,0009$ für pENTR/U6) beobachtet werden (Abbildung 17).

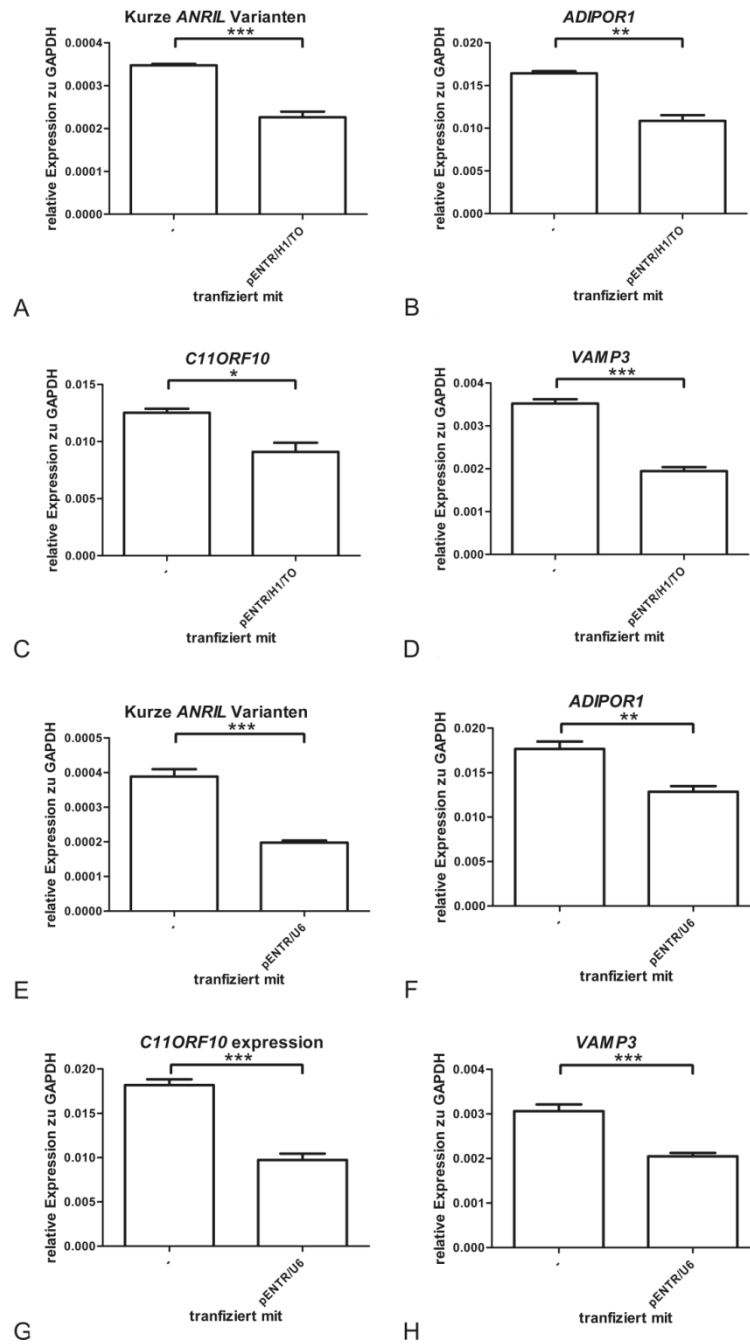


Abbildung 17 Knockdown der kurzen *ANRIL* Varianten in transient transfizierten HeLa Zellen und die korrelierende Expressionsänderung von *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3*.

Die shRNA 13.134, kloniert in den pENTR/H1/TO Vektor, wurde durch eine transiente Transfektion in HeLa Zellen eingebracht und dort konstitutiv exprimiert. 48 Stunden nach der Transfektion waren die Expressionsniveaus von **A.** den kurzen *ANRIL* Transkripten um das 0,33-Fache ($p = 0,0008$), **B.** *ADIPOR1* um das 0,33-Fache ($p = 0,0014$), **C.** *C11ORF10* um das 0,29-Fache ($p = 0,00173$) und **D.** *VAMP3* um das 0,45-Fache ($p = 0,0003$) gesenkt.

Die shRNA 13.135, kloniert in den pENTR/U6 Vektor, wurde durch eine transiente Transfektion in HeLa Zellen eingebracht und dort konstitutiv exprimiert. 48 Stunden nach der Transfektion waren die Expressionsmengen von **E.** den kurzen *ANRIL* Transkripten um das 0,5-Fache ($p = 0,0001$), **F.** *ADIPOR1* um das 0,29-Fache ($p = 0,0036$), **G.** *C11ORF10* um das 0,47-Fache ($p = 0,0001$) und **H.** *VAMP3* um das 0,37-Fache ($p = 0,0009$) gesenkt.

Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten, von denen jedes als Triplikat durchgeführt wurde. Der Fehlerbalken gibt den SEM an.

3.3.3 Reversible Expression der Zielgene nach Tetracyclin-Depletion

Im folgenden Experiment sollte überprüft werden, wie schnell nach der Depletion von Tetracyclin aus dem Nährmedium das ursprüngliche Transkriptlevel der durch *ANRIL* regulierten Gene wieder hergestellt wird. Hierfür wurden die stabil transfizierten T-REx-293 Zellen zunächst für 96 Stunden mit 1µg/ml Tetracyclin stimuliert, danach wurde das Nährmedium gegen Tetracyclin-freies Medium ausgetauscht und die Zellen wiederum für 96 Stunden unter den neuen Inkubationsbedingungen kultiviert. Während des Experiments wurde alle 48 Stunden das Nährmedium ausgetauscht, wobei jeweils Zellen für spätere Analysen geerntet wurden.

Wie zu erwarten und in vorherigen Experimenten bereits beschrieben, wurden durch die Induktion der shRNA gegen die kurzen *ANRIL* Spleißvarianten die Transkriptniveaus von *ANRIL*, *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3* nach 48 und 96 Stunden signifikant reduziert. Bereits 48 Stunden nach der Kultivierung der Zellen in Tetracyclin-freiem Medium zeigte sich, bezogen auf die 96-stündige Tetracyclin-Stimulation, ein 1,4-mal höheres Transkriptniveau der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten ($p = 0,045$). Nach weiteren 48 Stunden ohne Tetracyclin überstieg das Transkriptlevel der kurzen Spleißvarianten das nach 96-stündiger Tetracyclin-Stimulation beobachtete Transkriptlevel um das 1,9-Fache ($p = 0,0223$). Eine signifikante Regeneration der Transkriptniveaus von *ADIPOR1* und *C11ORF10* konnte erst 96 Stunden nach Entfernen des Tetracyclins aus dem Nährmedium beobachtet werden. Während *ADIPOR1* nach 96-stündiger Tetracyclin-Depletion ein 2,5-mal höheres Transkriptlevel ($p < 0,0001$) im Vergleich zur 96-stündigen Tetracyclin-Inkubation zeigte, war die Expression von *C11ORF10* 96 Stunden nach Tetracyclin-Wegnahme 3,1-mal ($p = 0,0002$) höher als der stimulierte Ausgangswert. Das Transkriptlevel von *VAMP3* war 96 Stunden nach Entfernen des Tetracyclins 1,5-mal höher als vor der Tetracyclin-Depletion ($p = 0,025$), erreichte jedoch nur das 0,4-fache Transkriptniveau des nicht-stimulierten Ausgangwertes (Abbildung 18).

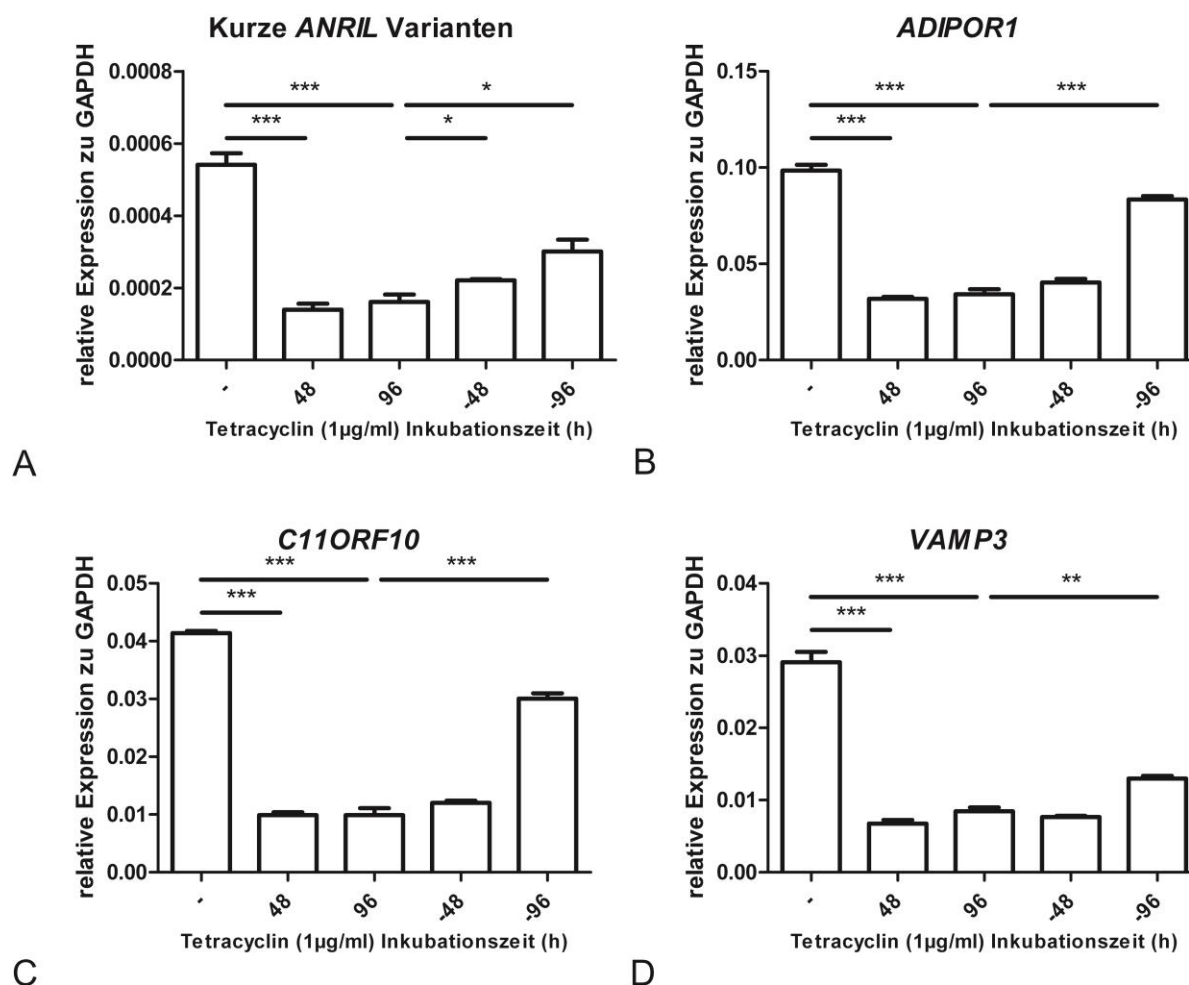


Abbildung 18 Rekonstitution der Transkriptniveaus von *ANRIL*, *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3* nach shRNA-vermitteltem knockdown und anschließender Tetracyclin-Depletion.

Durch Zugabe von Tetracyclin zum Nährmedium wurde die Expression der shRNA gegen die kurzen *ANRIL* Varianten in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen induziert. 96 Stunden nach der Induktion wurde das Nährmedium durch frisches, Tetracyclin-freies Medium ausgetauscht und die Zellen für weitere 96 Stunden unter den neuen Bedingungen kultiviert. **A.** Nach Tetracyclin-Zugabe sanken die Transkriptniveaus der kurzen *ANRIL* Varianten binnen 48 Stunden auf das 0,26-Fache ($p = 0,0004$) und nach 96 Stunden auf das 0,29-Fache ($p = 0,0006$) des Ausgangswertes. Nach Entfernen des Tetracyclins aus dem Nährmedium stieg das Transkriptlevel nach 48 Stunden signifikant auf das 1,4-Fache ($p = 0,045$) und binnen 96 Stunden auf das 1,9-Fache ($p = 0,023$) des Transkriptniveaus nach 96-stündiger Tetracyclin-Stimulation. **B.** Die Expression der *ADIPOR1* Transkripte sank 48 Stunden nach Tetracyclin-Induktion auf das 0,33-Fache ($p < 0,0001$) bzw. das 0,34-Fache ($p < 0,0001$) des Ausgangswertes. Die Kultivierung der Zellen in Tetracyclin-freiem Medium zeigte in den ersten 48 Stunden keinen signifikanten Anstieg der *ADIPOR1* Transkripte, jedoch stieg das Transkriptlevel nach 96 Stunden auf das 2,4-Fache ($p < 0,0001$) des Transkriptniveaus vor der Tetracyclin-Depletion. **C.** Nach Tetracyclin-Zugabe sank das Transkriptlevel von *C11ORF10* binnen 48 Stunden auf das 0,24-Fache ($p < 0,0001$) des Ausgangswertes und blieb für die nächsten 48 Stunden auf diesem Niveau. Nach Entfernen des Tetracyclins aus dem Nährmedium stieg das Transkriptlevel in den ersten 48 Stunden nicht signifikant, erreichte jedoch nach 96 Stunden ein nur 0,23-mal niedrigeres Niveau des Ausgangswertes. **D.** Das Niveau der *VAMP3* Transkripte sank 48 Stunden nach Tetracyclin-Induktion auf das 0,24-Fache ($p = 0,0001$) bzw. nach 96 Stunden auf das 0,28-Fache ($p = 0,0001$). Die Kultivierung der Zellen in Tetracyclin-freiem Medium zeigte in den ersten 48 Stunden keinen signifikanten Anstieg der *ADIPOR1* Transkriptlevel, nach 96 Stunden war das Transkriptniveau 1,6-fach höher ($p = 0,0025$) verglichen mit dem Niveau vor der Tetracyclin-Depletion.

Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten, von denen jedes als Triplikat durchgeführt wurde. Der Fehlerbalken gibt den SEM an.

3.4 Überexpression einer spezifischen *ANRIL* Spleißvariante

Im folgenden Experiment sollte überprüft werden, wie sich die Überexpression einer spezifischen *ANRIL* Spleißvariante auf die Expression der zuvor identifizierten Gene auswirkt. Hierfür sollten zunächst diejenigen Spleißvarianten identifiziert werden, die in humanen gingivalen Fibroblasten (hGF) vorkommen und somit potentiell in der Ätiologie der Parodontitis mitwirken können.

3.4.1 Identifizierung gewebsspezifischer Spleißvarianten in humanen gingivalen Fibroblasten

Für die Identifizierung hGF-spezifischer *ANRIL* Spleißvarianten wurde zunächst die gesamte RNA aus den Zellen isoliert und cDNA synthetisiert. Transkripte wurden mit den in Tabelle 1 aufgeführten Primern amplifiziert, wobei jeweils ein Primerpaar für die Amplifizierung der kurzen bzw. der langen Variante benutzt wurde. Die durch Sequenzierung identifizierten Spleißvarianten sind in Tabelle 19 aufgeführt. Insgesamt konnten drei Spleißvarianten bestimmt werden, wobei eine der kurzen und zwei der langen Form zugerechnet werden konnten. Ein Abgleich mit bereits bekannten Spleißvarianten zeigte, dass zwei der identifizierten Varianten bereits aus anderen Geweben bekannt sind (HUVEC), wohingegen eine Variante der langen Form bislang noch nicht beschrieben wurde.

Tabelle 19 In hGFs nachgewiesene *ANRIL* Spleißvarianten.

Transkriptlänge (bp)	beinhaltende Exone	auch identifiziert in
800	1-5-6-7-13	HUVEC
1000	1-5-6-20	HUVEC
1200	1-5-6-14-15-20	

3.4.2 Überexpression des Transkriptes EU741058 in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen

Für die Überexpression wurde ein die Exone 1-5-6-7-13 enthaltendes Transkript (EU741058) gewählt, welches bereits in anderen Zellen (HUVEC) beschrieben wurde (Folkersen et al., 2009) und in dieser Arbeit auch in humanen gingivalen Fibroblasten nachgewiesen werden konnte (Tabelle 19). Nach der Klonierung der Spleißvariante in den pcDNA4/TO Expressionsvektor wurde eine stabile T-REx-293 Zelllinie hergestellt. Die Zellen wurden für 48 Stunden mit Tetracyclin stimuliert, anschließend wurden die Genexpressionslevel von stimulierten und nicht-stimulierten Zellen miteinander verglichen (Abbildung 19).

48 Stunden nach Tetracyclin-Stimulation stiegen die Transkriptniveaus des *ANRIL* Transkriptes auf das 75-Fache ($p = 0,0002$). Dies hatte keinen signifikanten Effekt auf die Expression von *ADIPOR1*, *VAMP3* und *CDKN2B*, deren Transkriptniveaus über den beobachteten Zeitraum konstant blieben. Im Gegenteil dazu zeigte *C11ORF10* eine 1,9-fach erhöhte Expression ($p = 0,0014$).

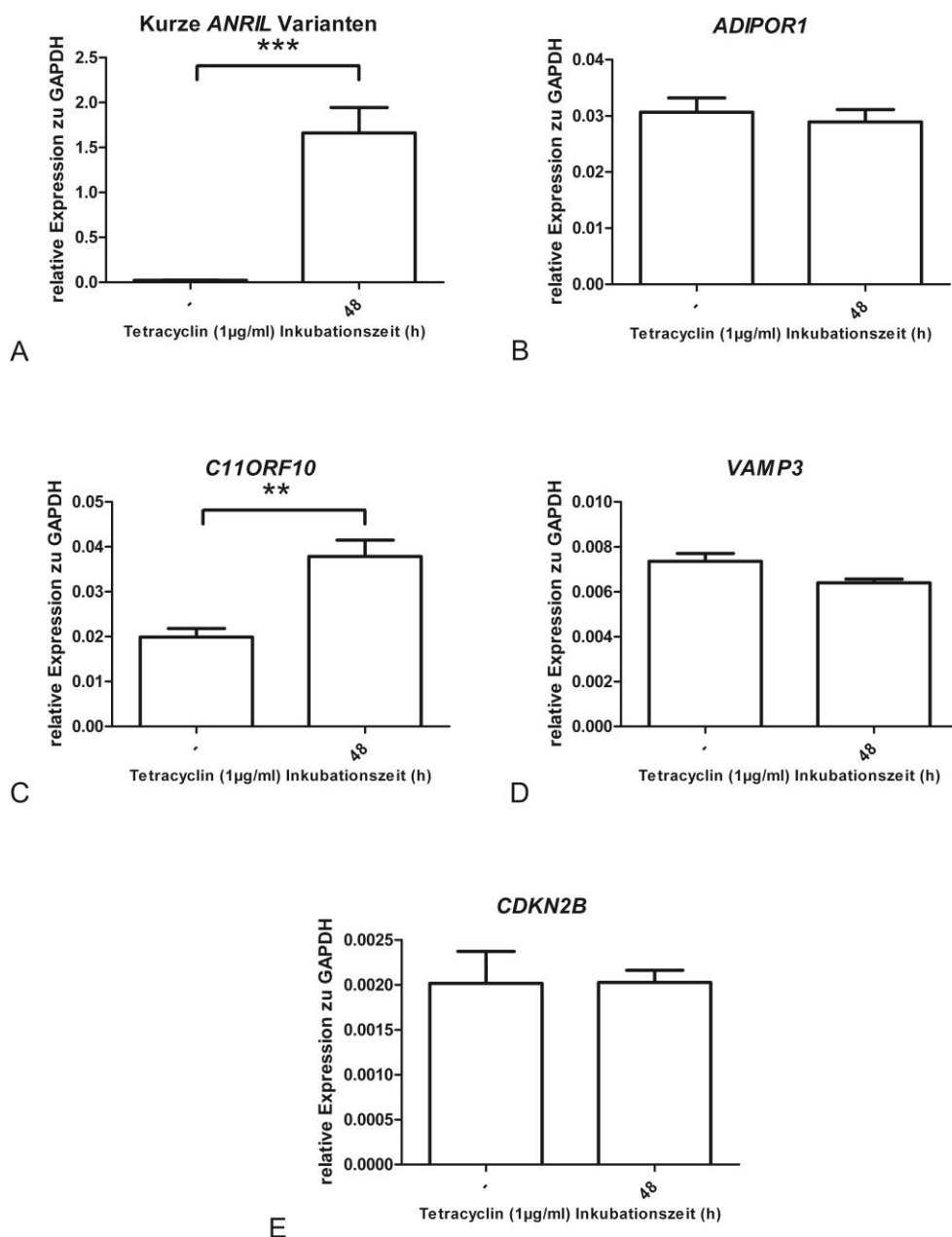


Abbildung 19 Relative Transkriptniveaus von *ANRIL*, *ADIPOR1*, *C11ORF10*, *VAMP3* und *CDKN2B* in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen vor und nach Induktion des Transkriptes EU741058.

Die Expression von EU741058 wurde durch Zugabe von 1µg/ml Tetracyclin induziert und die Transkriptniveaus bestimmt. **A.** Die Expression des kurzen *ANRIL* Transkriptes war 48 Stunden nach Tetracyclin-Zugabe um das 75-Fache gegenüber dem Ausgangswert erhöht ($p = 0,0002$). **B.** Die Expression von *ADIPOR1* wurde durch die gewählten Versuchsbedingungen nicht signifikant verändert. **C.** *C11ORF10* zeigte im Vergleich zu nicht-stimulierten Kontrollen nach 48 Stunden eine 1,9-mal höhere Expression ($p = 0,0014$). **D.** Die Expression von *VAMP3* zeigte keinen signifikanten Unterschied. **E.** *CDKN2B* zeigte im Vergleich zu nicht-stimulierten Kontrollen 48 Stunden nach Tetracyclin-Zugabe keinen signifikanten Expressionsunterschied. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten, von denen jedes als Triplikat durchgeführt wurde. Der Fehlerbalken gibt den SEM an.

3.5 TGF- β Stimulation humaner gingivaler Fibroblasten

In verschiedenen Publikationen wurde eine veränderte Expression von *ADIPOR1* und *CDKN2B* infolge einer TGF- β Stimulation beschrieben (Hannon and Beach, 1994; Otani et al., 2010). Inwieweit diese Expressionsänderungen mit einer veränderten *ANRIL* Expression einhergehen und gegebenenfalls aus dieser resultieren, sollte durch eine TGF- β Stimulation humaner gingivaler Fibroblasten untersucht werden. Hierzu wurden drei unterschiedliche Donoren für 48 Stunden in einem TGF- β (20ng/ml) enthaltenden Nährmedium inkubiert.

Ein signifikant reduziertes Transkriptlevel nach TGF- β Stimulation zeigten *ANRIL* (0,3-fach; $p = 0,0003$), *ADIPOR1* (0,19-fach; $p = 0,0023$) und *VAMP3* (0,24-fach; $p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu stieg das Transkriptlevel von *CDKN2B* signifikant auf das 1,9-Fache ($p = 0,0221$) der nicht stimulierten Vergleichsdonoren, während für *C11ORF10* keine signifikante Expressionsänderung beobachtet werden konnte (Abbildung 20).

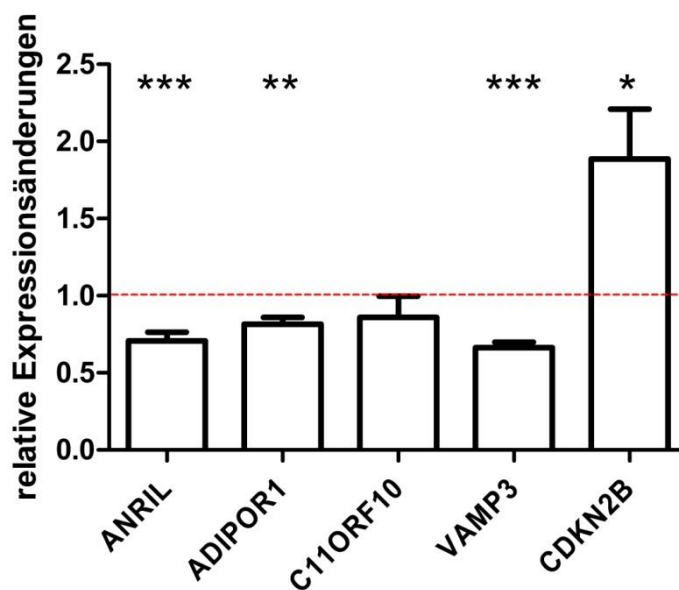


Abbildung 20 Relative Expressionsänderungen von *ANRIL*, *ADIPOR1*, *C11ORF10*, *VAMP3* und *CDKN2B* in humanen gingivalen Fibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit TGF- β .

Humane gingivale Fibroblasten aus drei unterschiedlichen Donoren wurden für 48 Stunden mit TGF- β (20 ng/ml) inkubiert. Dargestellt sind die durchschnittlichen Expressionsänderungen in den Fibroblasten der drei Donoren für die betrachteten Gene. Die rote Linie spiegelt das Transkriptlevel von nicht stimulierten Zellen wieder, welche als 1 definiert wurde. Im Vergleich zu den entsprechenden, nicht-stimulierten Vergleichsdonoren zeigten *ANRIL* (0,3-fach; $p = 0,0003$), *ADIPOR1* (0,19-fache; $p = 0,0023$) und *VAMP3* (0,24-fach; $p < 0,0001$) eine verminderte Expression nach TGF- β Stimulation. Die Expression von *CDKN2B* stieg signifikant auf das 1,9-Fache ($p = 0,0221$) der nicht stimulierten Vergleichsdonoren an, während für *C11ORF10* keine signifikante Expressionsänderung durch TGF- β Stimulation beobachtet werden konnte.

3.6 6 *In silico* Analyse der genomischen Regionen von *ADIPOR1*, *VAMP3* und *C11ORF10*

Die gemeinsame Regulation von *ADIPOR1*, *VAMP3* und *C11ORF10* durch die kurzen *ANRIL* Transkripte erlaubt die Vermutung eines gemeinsamen regulatorischen Mechanismus. Ein solcher Mechanismus, welcher beispielsweise durch DNA-bindende Proteine vermittelt werden könnte, würde gemeinsame, konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) voraussetzen. Um solche Elemente zu identifizieren wurden die chromosomalen Regionen von *ADIPOR1*, *VAMP3* und *C11ORF10* einschließlich der Sequenzen 2.500 bp stromab und -aufwärts mit dem Programm mVISTA (<http://genome.lbl.gov/vista/mvista/submit.shtml>) verglichen. Das Programm sucht unter den eingespielten genomischen Sequenzen nach konservierten DNA-Bereichen, welche in mindestens zwei der angegebenen Gene auftauchen. DNA-Elemente wurden als konserviert betrachtet, sofern sie eine Sequenzübereinstimmung von mindestens 70% aufwiesen und dabei mehr als 200 bp umfassten.

Mit dieser Analyse konnten drei Genbereiche identifiziert werden, welche die vordefinierten Ausschlusskriterien erfüllten und in allen untersuchten Genen konserviert vorlagen (Abbildung 21). Diese Elemente umfassten > 200 Nukleotide und waren im jeweiligen Referenzgen in den gleichen Regionen lokalisiert. Ferner zeigte die Analyse, dass die identifizierten DNA-Elemente nicht der LINE-, SINE- oder LTR-Familie repetitiver DNA-Sequenzen zugeordnet werden können.

Um einen Zufallsbefund auszuschließen wurde der Versuch 10-mal mit jeweils 3 zufällig ausgewählten Genen wiederholt, wobei diese in der Länge etwa dem genomischen Bereich von *ADIPOR1*, *VAMP3* und *C11ORF10* entsprachen. Hierbei zeigten nur die genomischen Bereiche von *IL1B*, *ASB17* und *F3* eine gemeinsame, konservierte Nukleotidsequenz, während bei den anderen untersuchten Genen oft nur konservierte Bereiche zwischen jeweils zwei genomischen Regionen gefunden werden konnten (Anhang).

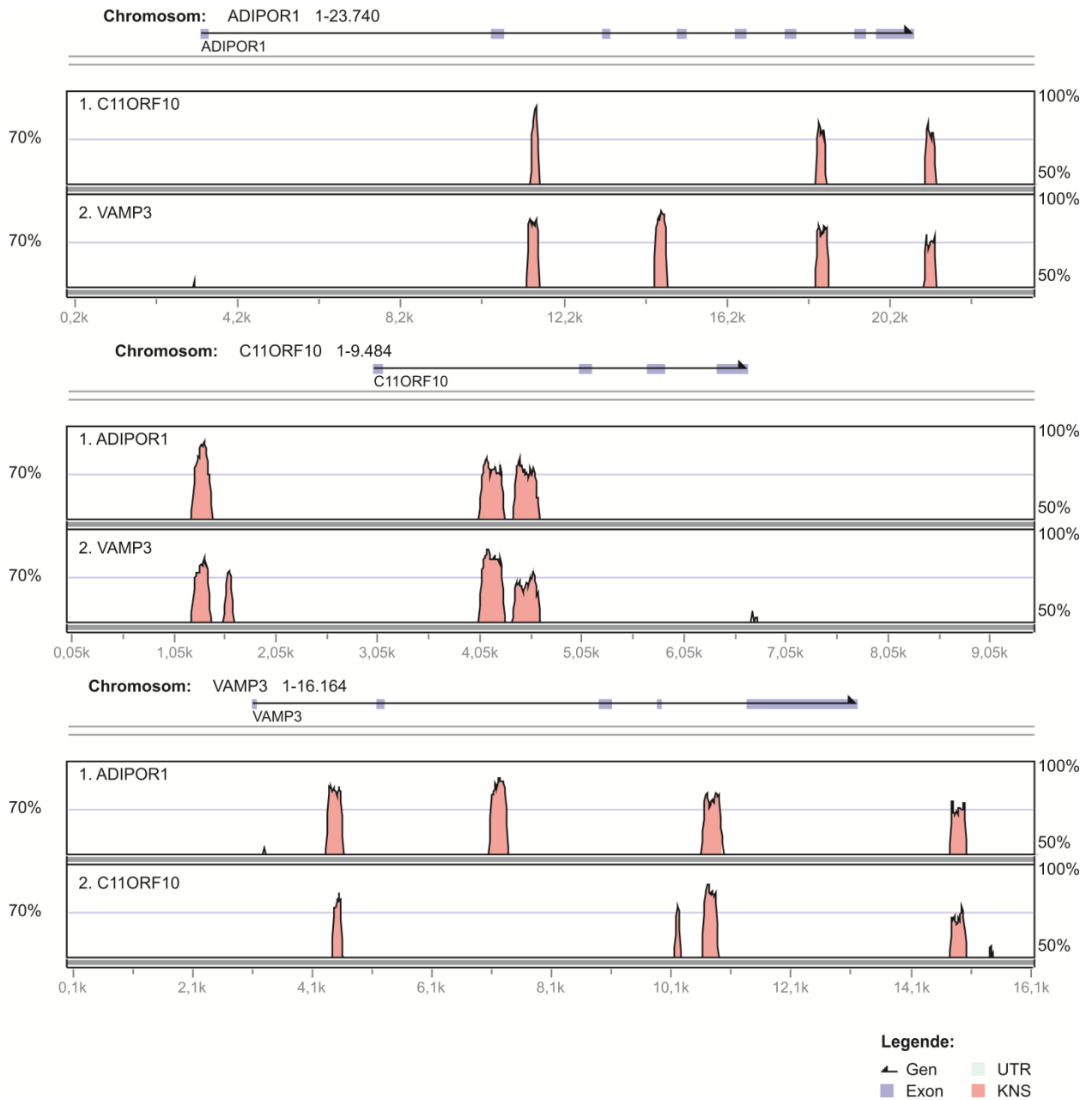


Abbildung 21 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3*.

Jedes Diagramm zeigt im oberen Teil der Darstellung ein Referenzgen einschließlich des umliegenden chromosomalen Bereichs von 2.500 bp stromab und -aufwärts. Die roten Flächen im unteren Teil jeder Abbildung repräsentieren die chromosomalen Bereiche, die bei einer Sequenzlänge von mehr als 200 bp eine Sequenzhomologie von mindestens 70% aufweisen (horizontale blaue Linie).

Als Nächstes wurden die identifizierten konservierten Sequenzen auf potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Die identifizierten Transkriptionsfaktoren sind in Tabelle 20 zusammengefasst. In KNS1 konnten sechs, in KNS2 fünf und in KNS3 drei gemeinsame Transkriptionsfaktorbindestellen identifiziert werden. Interessanterweise wurde die Bindestelle für PITX2 in allen konservierten Sequenzen nachgewiesen.

Tabelle 20 Transkriptionsfaktorbindestellen in den konservierten Nukleotidsequenzen (KNS) von *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3*.

KNS1	KNS2	KNS3
PITX2	PITX2	PITX2
HOXA4	HOXA4	ER
CRX	CRX	MEF2
CACD	AHRHIF	
IK2	AHR	
LUN1		

3.7 Genetische Analysen der chromosomalen Regionen von *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3*

Allgemein wird angenommen, dass krankheitsrelevante Gene funktionell verbunden, bzw. miteinander in biologischen Signalwegen interagieren, welche zu der Entwicklung einer Krankheit beitragen (Marchini, Donnelly et al. 2005; Peng, Luo et al. 2010). Aus dem Grund sollte überprüft werden, inwiefern auch genetische Risikovarianten der Parodontitis und Atherosklerose in den regulierten Genen identifiziert werden können.

3.7.1 Genetische Analyse der *VAMP3* Region

In der kodierenden Region von *VAMP3* konnten bislang keine genomweiten SNP-Assoziationen mit einer Krankheit identifiziert werden. Jedoch zeigte das 3 kb stromabwärts von *VAMP3* lokalisierte *PER3* (period circadian protein homolog 3) Gen eine genomweite Assoziation zu Morbus Crohn (Franke et al., 2010).

2 kb stromaufwärts von *VAMP3* liegt das Gen *CAMTA1* (calmodulin-binding transcription activator1), das einen chromosomalen Bereich von mehr als 1 mb umfasst und eine große Anzahl Enhancer-Elemente beinhaltet. Interessanterweise zeigte ein Bereich innerhalb von *CAMTA1* eine genomweite Assoziation mit der Kolonisierung parodontaler Pathogene (Divaris et al., 2012). Um potentielle krankheitsassoziierte Varianten in dieser chromosomalen Region zu identifizieren, wurde der entsprechende Bereich mit dem Genotypisierungsarray ImmunoChip (Illumina) genotypisiert. Der ImmunoChip ist ein

Genotypisierungschip, der sowohl für die Replikation als auch für die Feinkartierung von genetischen Risikoregionen entwickelt wurde. Der Chip deckt insbesondere genetische Risikovarianten von verschiedenen Autoimmun- und Entzündungskrankheiten, wie z.B. Typ 1 Diabetes, rheumatoide Arthritis oder Morbus Crohn ab. Insgesamt können 196.524 Polymorphismen genotypisiert werden, wobei jede Krankheit mit etwa 3.000 spezifischen SNPs in unterschiedlichen Genen auf dem Chip repräsentiert ist (Cortes and Brown, 2011). Auf dem Immunochip war die genetische Region um *CAMTA1* (91kb), *VAMP3* und *PER3* (466kb) mit insgesamt 524 SNPs abgedeckt. Die durchschnittliche Abdeckung lag bei 1 SNP pro 0,9 kb ($\pm 1,2$ kb). Die Häufigkeit des seltenen Allels derjenigen SNPs, die in die Analyse einbezogen wurden, lag bei $> 5\%$ (minor allele frequency, MAF). Insgesamt wurden 600 deutsche AgP-Fälle und 1.440 deutsche, populationsrepräsentative Kontrollen genotypisiert.

Mit dem vordefinierten Signifikanzschwellenwert (zwei benachbarten SNPs mit $p < 0,01$) konnte keine Assoziation der Parodontitis mit dem auf dem Immunochip repräsentierten Bereich über *CAMTA1*, *VAMP3*, *PER3* und *PARK7* gefunden werden. Die Region, welche als assoziiert mit spezifischen parodontalen Keimen beschrieben wurde, war mit dem Immunochip nicht vollständig abgedeckt. Aus diesem Grund wurde der Bereich mit bereits vorhandenen Genotypdaten des Affymetrix 500K Gene Array (Schaefer et al., 2010) auf eine Assoziation mit AgP hin untersucht. Die Daten zeigten mehrere signifikante SNP-Assoziationen in *CAMTA1*, von denen die Varianten rs10864294 und rs17030881 die besten Assoziationssignale zeigten. Beide SNPs liegen unmittelbar stromaufwärts der mit der Pathogenkolonisierung assoziierten Region und stehen nicht in einem LD zueinander ($r^2 < 0,8$; Abbildung 22).

Um die statistische Teststärke zu erhöhen wurde die Assoziation in einer Fall-Kontroll-Stichprobe aus 864 deutschen, österreichischen und niederländischen AgP-Patienten und 3.664 gesunden Kontrollen mit demselben geographischen Hintergrund untersucht. Die Assoziation von rs10864294 konnte mit $p = 0,008$ und einem genetischen Effekt (OR, odds ratio) = 1,31 (95% Konfidenzintervall [C.I.] 1,2-1,6) bestätigt werden. Auch rs17030881 war mit $p = 0,002$ OR = 4,36 (95% C.I. 1,5 – 12,5) signifikant assoziiert (Tabelle 21).

Unter Verwendung einer Meta-Analyse von 14 genomweiten Assoziationsstudien für koronare Herzkrankheiten (KHK), bestehend aus 22.233 Fällen und 64.762 Kontrollen europäischer Abstammung (Schunkert et al., 2011), wurden die Daten abschließend *in silico* repliziert. SNP rs10864294 wies eine geringe Genotypisierungsqualität (call rate, CR) auf

und konnte in dieser Analysepopulation nicht verwendet werden. rs10864294 liegt mit dem 760 bp stromaufwärts gelegenen SNP rs2301462 in vollem LD ($D' = 1$; Abbildung 23). Da für rs2301462 die CR ausreichend war ($> 95\%$), wurde er für die Replikation als tagging SNP verwendet. Nach Adjustierung für Alter und Geschlecht war SNP rs2301462 in dieser Analysepopulation signifikant mit KHK assoziiert ($p = 0,00106$).

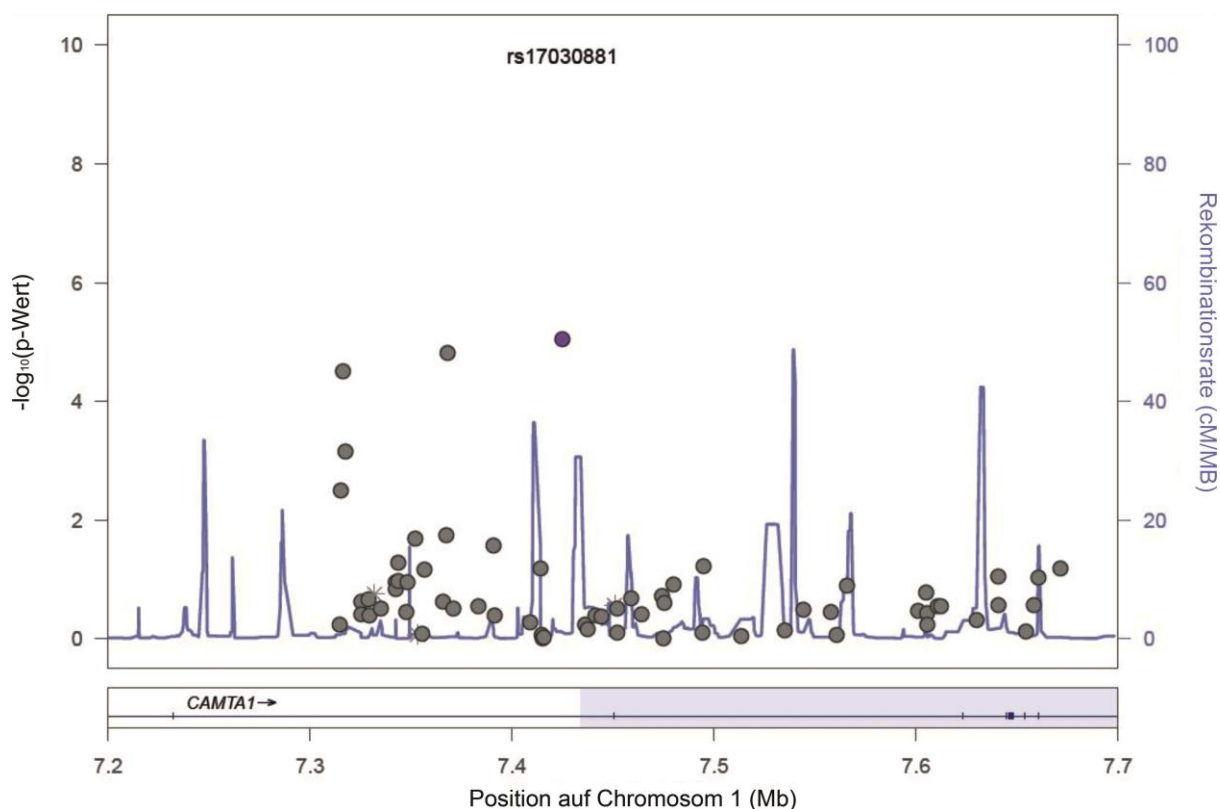


Abbildung 22 $-\log_{10}$ p-Werte der assoziierten Region in *CAMTA1*.

Der obere Teil der Abbildung gibt den nominalen $-\log_{10}$ p-Wert für die überprüften SNPs (Affymetrix 500K Gene Array) wieder (300 AgP Fälle und 763 Kontrollen). Die $-\log_{10}$ p-Werte wurden mithilfe der Software "LocusZoom" als Funktion der genomischen htSNP Position (NCBI build 36) aufgetragen. Der untere Teil der Abbildung zeigt die chromosomale Position der untersuchten *CAMTA1* Region. In Blau ist der proximale Teil der mit parodontalen Pathogenen assoziierten Region dargestellt. SNPs mit einem p-Wert $< 1 \cdot 10^{-4}$ sind, von links nach rechts gelesen, rs10864294, rs6677949 und rs17030881 (Violett).

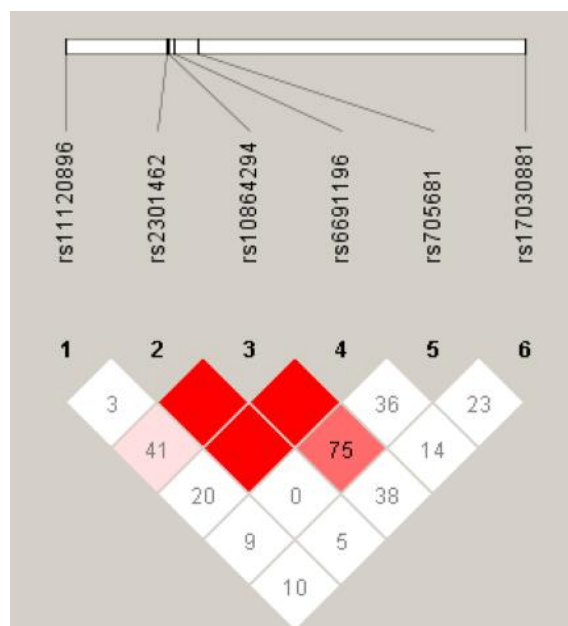


Abbildung 23 Kopplungsungleichgewicht der mit KHK und AgP assoziierten Region in *CAMTA1*.

In der *in silico* Replikation von 14 genomweiten Assoziationsstudien für 22.333 Fälle und 64.762 Kontrollen europäischer Abstammung ist der SNP rs2301462 mit KHK assoziiert. Er steht in einem kompletten LD zu SNP rs10864294 ($D' = 1$), welcher eine signifikante Assoziation in den nord-westeuropäischen AgP und norddeutschen KHK Fall-Kontroll-Studien zeigte. D' -Werte wurden für die LD-Berechnung verwendet, um den großen Unterschieden in den Allelfrequenzen von rs2301462 (MAF = 41%) und rs10864294 (MAF = 7%) Rechnung zu tragen.

3.7.2 Genetische Analyse der *C11ORF10* Region

7 kb proximal von *C11ORF10* liegt der *FADS 1-3* (fatty acid desaturases 1-3) Gen-Cluster. Ein Haplotyp-Block über *C11ORF9*, *C11ORF10*, *FADS1* und *FADS2* zeigte genomweite Assoziationen mit dem metabolischen Syndrom (Zabaneh and Balding, 2010), veränderten Phospholipid-Konzentrationen (Lemaitre et al., 2011), Typ 2 Diabetes (Dupuis et al., 2010) und Morbus Crohn (Franke et al., 2010). Eine Assoziation mit Atherosklerose ist jedoch nicht bekannt. Um potentielle Assoziationen mit Parodontitis zu identifizieren wurden Varianten in *C11ORF9*, *C11ORF10*, *FADS1* und *FADS2* in der deutschen AgP Fall-Kontroll-Population (600 AgP Fälle, 1.441 Kontrollen) mit dem ImmunoChip analysiert. Es konnten signifikante Assoziationen mit dem Haplotyp-Block gefunden werden, wobei der am besten assoziierte SNP (rs1535) in Intron 6 des Gens *FADS2* lokalisiert war ($p_{\text{allelisch}} = 0,016$, OR = 0,84, 95% C.I. 0,72 – 0,98) (Abbildung 24, Tabelle 21).

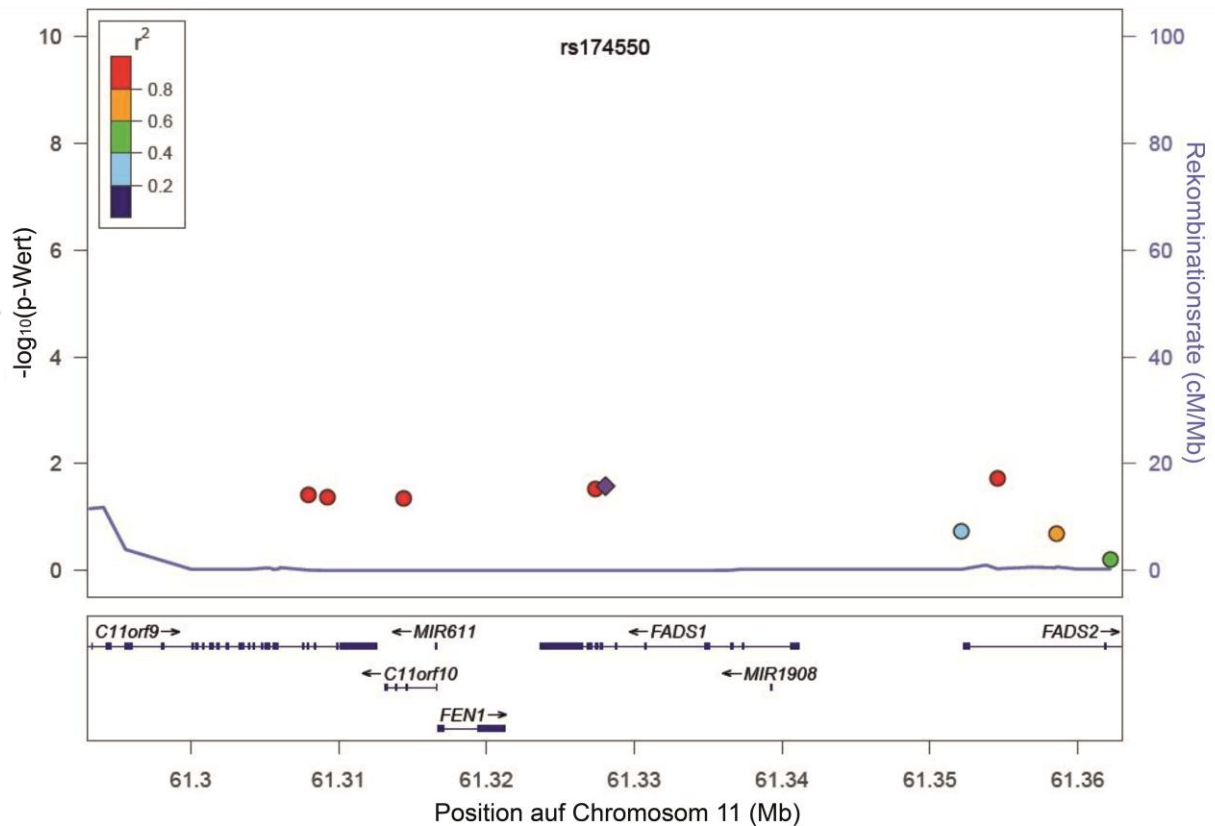


Abbildung 24 $-\log_{10}$ p-Werte der assoziierten chromosomalen Region um *C11ORF10*.

Der obere Teil der Abbildung gibt den nominalen $-\log_{10}$ p-Wert für die überprüften SNPs in der durch den Illumina Genotypisierungsarray abgedeckten chromosomalen Region wieder (600 AgP Fälle und 1440 Kontrollen). Die $-\log_{10}$ p-Werte wurden mithilfe der Software "LocusZoom" als Funktion der genomischen htSNP Position (NCBI build 36) aufgetragen. Der untere Teil der Abbildung zeigt die entsprechenden chromosomalen Positionen von *C11ORF9* bis *FADS2* an. Die in rot dargestellten SNPs liegen im LD ($r^2 > 0,8$) zu SNP rs174550 (violetter Diamant). Sie zeigten eine Assoziation zu AgP ($p < 0,05$) und sind genomweit assoziiert mit (von links nach rechts): rs174535 = Lipidmetabolismus, rs174537, rs102275 = Lipidmetabolismus, Morbus Crohn, metabolisches Syndrom; rs174547 = Lipidmetabolismus, metabolisches Syndrom, Ruhepuls; rs174550 = Typ 2 Diabetes, Lipidmetabolismus; rs1535 = Lipidmetabolismus, metabolisches Syndrom, Ansprechen auf eine Statintherapie.

3.7.2 Genetische Analyse der *ADIPOR1* Region

Für die chromosomale Region um *ADIPOR1* (> 200 kb) konnte in den 500K GWAS Daten keine Assoziation mit AgP beobachtet werden. Darüber hinaus war die genomische Region um *ADIPOR1* nicht durch den ImmunoChip abgedeckt.

Tabelle 21 Assoziationsstatistiken für SNPs in der *CAMTA1* Region und der *C11ORF9*, *C11ORF10*, *FADS1* und *FADS2* Region.

Chr.	Gen	SNP	p-Wert (allelisch)	OR	Fälle			Kontrollen				
					MAF%	N11 (F11)	N12 (F12)	N22 (F22)	MAF%	N11 (F11)	N12 (F12)	N22 (F22)
1	<i>CAMTA1</i>	rs10864294	0.015	1.30	8.22	1,241	218	12	7.14	2,359	365	13
		(CAD)*		(1.1-1.6)		(84.38)	(14.81)	(0.82)		(86.19)	(13.34)	(0.47)
		rs10864294	0.008	1.31	9.20	717	146	7	7.32	3,165	493	23
		(AgP)**		(1.1-1.6)		(82.41)	(16.78)	(0.81)		(85.98)	(13.39)	(0.63)
		rs17030881	0.009	6.09	0.27	1,476	8	0	0.04	2,248	2	0
		(CAD)*		(1.3-28.7)		(99.46)	(0.54)	(0)		(99.91))	(0.09)	(0)
		rs17030881	0.002	4.36	0.41	855	7	0	0.09	3,728	7	0
		(AgP)**		(1.5-12.5)		(99.19)	(0.81)	(0)		(99.81)	(0.19)	(0)
		rs2301462	0.001	1.04								
		(CARDIoGRAM)		(1.02-1.07)								
	<i>C11ORF9</i>	rs174535 [#]	0.040	0.86	31,50	277	268	55	34,84	608	662	171
				(0.8-0.99)		(46.17)	(44.67)	(9.17)		(42.19)	(45.94)	(11.87)
		rs174537	0.036	0.86	30,92	281	267	52	34,32	620	653	168
				(0.7-0.99)		(46.83)	(44.50)	(8.67)		(43.03)	(45.32)	(11.66)
11	<i>C11ORF10</i>	rs102275 ^{##}	0.047	0.86	31,42	279	265	56	34,64	611	659	169
				(0.8-0.99)		(46.50)	(44.17)	(9.33)		(42.46)	(45.80)	(11.74)
		rs174547 ^{###}	0.025	0.85	30,83	282	266	52	34,46	615	655	168
				(0.73-0.98)		(47.00)	(44.33)	(8.67)		(42.77)	(45.55)	(11.68)
	<i>FADS1</i>	rs174550 ⁺	0.025	0.85	30,83	282	266	52	34,46	616	657	168
				(0.7-0.98)		(30.83)	(47.00)	(8.67)		(42.75)	(45.59)	(11.66)
	<i>FADS2</i>	rs1535 [◇]	0.016	0.84	30,67	283	266	51	34,58	613	658	169
				(0.7-0.97)		(47.17)	(44.33)	(8.50)		(42.57)	(45.69)	(11.74)

allelisch = allelischer Test; OR = Odds ratio; C.I. = Konfidenzintervall; F = Frequenz, 11 = homozygote Träger des häufigen Allels; 12 = heterozygote Träger; 22 = homozygote Träger des seltenen Allels. Chromosom 1: * 1.471 KHK Fälle, rekrutiert aus Norddeutschland (Schleswig-Holstein), wurden mit populationsrepräsentativen Kontrollen (N = 2.737) aus derselben geographischen Region verglichen. ** AgP Fälle, rekrutiert in Deutschland (N = 631), Wien (N = 69) und den Niederlanden (N = 164), wurden zum einen mit den KHK-Kontrollen und zum anderen mit Parodontitis-freien Kontrollen aus Süddeutschland (N = 559) und den Niederlanden (N = 368) verglichen. In einer Metaanalyse aus 14 genomweiten Assoziationsstudien der KHK, bestehend aus 22.233 Individuen mit KHK und 64.762 Kontrollen europäischer Abstammung zeigte SNP rs10864294 eine geringe Genotypisierungsqualität (callrate). Aus dem Grund wurde SNP rs2301462, der in vollem LD mit rs2301462 liegt ($D' = 1$), für die Replikation verwendet. Der p-Wert von rs2301462 in der Metaanalyse wurde für Alter und Geschlecht adjustiert. Chromosom 11: genomweite Assoziation mit # = Lipidmetabolismus; ## = Lipidmetabolismus, Morbus Crohn, metabolisches Syndrom; ### = Lipidmetabolismus, metabolisches Syndrom, Ruhepuls; + = Typ 2 Diabetes, Lipidmetabolismus; ◇ = Lipidmetabolismus, metabolisches Syndrom, Ansprechen auf eine Statintherapie. In der Analyse wurden 600 deutsche AgP Fälle und 1.441 deutsche, populationsrepräsentative Kontrollen mit dem Genotypisierungsarray Immunochip (Illumina) genotypisiert.

4 Diskussion

Die lncRNA *ANRIL* liegt in der chromosomalen Region 9p21.3 und ist das am besten replizierte Risikogen der koronaren Herzkrankheiten (Deloukas et al., 2013; Helgadottir et al., 2007; Schunkert et al., 2011) und Parodontitis (Ernst et al., 2010; Schaefer et al., 2013; Schaefer et al., 2009). Des Weiteren konnten auch Assoziationen zu Typ 2 Diabetes (Scott et al., 2007) und verschiedenen Krebsformen (Shete et al., 2009; Turnbull et al., 2010) festgestellt werden. Obwohl die Region mit einem p-Wert von $1,39 \times 10^{-52}$ die stärkste Assoziation und den stärksten Effekt (OR = 1,2) aller bekannten KHK Risiko-Loci zeigt (Deloukas et al., 2013), ist die molekulare Funktion der lncRNA *ANRIL* in der Ätiologie der Parodontitis und Atherosklerose bisher kaum verstanden. Zwar konnte ein *cis*-regulatorischer Effekt des elongierenden *ANRIL* Transkriptes auf die benachbarten Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* beschrieben werden (Yap et al., 2010), jedoch erklärt dieser allein nicht den Beitrag des Gens in der Entwicklung der Parodontitis und Atherosklerose. Da von anderen lncRNAs ebenfalls *trans*-regulatorische Funktionen bekannt sind (Huarte et al., 2010; Rinn et al., 2007; Tian et al., 2010), wurde die Hypothese einer *trans*-regulatorischen Funktion auf bisher nicht identifizierte Gene formuliert.

4.1 Wahl der Versuchsparameter für die Identifizierung *trans*-regulierter Gene

4.1.1 Evaluierung der zu untersuchenden *ANRIL* Spleißvarianten für die Identifizierung *trans*-regulierter, krankheitsrelevanter Gene der Atherosklerose und Parodontitis

Das *ANRIL* Gen umfasst einen chromosomalen Bereich von 126,3 kb und besteht aus 20 Exonen, wobei zwei Haupt-Spleißvarianten mit jeweils polyadenylierten 3'-Exonen exprimiert werden. Die kurzen Varianten enden mit dem 13ten Exon, während die langen Varianten mit dem 20ten Exon enden und das 13te Exon nicht beinhalten (Pasmant et al., 2007). Von diesen zwei Hauptformen werden gewebsspezifische weitere Spleißvarianten exprimiert (Folkersen et al., 2009). In mehreren Studien wurde der Einfluss des Risiko-Haplotyps auf die Expression verschiedener Spleißvarianten untersucht, wobei kein konsistentes Expressionsprofil beobachtet werden konnte. So zeigte eine Studie eine erhöhte

Expression der kurzen Varianten bei gleichzeitig verminderter Expression der langen Varianten (Jarínova et al., 2009), während eine andere Studie zwar den Einfluss des Risiko-Haplotyps auf die kurzen Spleißvarianten bestätigen, jedoch keinen Einfluss auf die lange Spleißvarianten feststellen konnte (Holdt et al., 2010). Demgegenüber berichteten drei Studien von einer verringerten Expression der kurzen und einer unveränderten Expression der langen *ANRIL* Spleißvarianten in homozygoten Trägern des Risiko-Haplotyps (Burd et al., 2010; Congrains et al., 2012; Cunnington et al., 2010). Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Befunde der Studien könnten die Unterschiede der verwendeten Gewebstypen, sowie die für die qRT-PCR benutzten Primer bieten. Trotz der unterschiedlichen Befunde der genannten Studien, bezogen auf eine erhöhte oder verminderte Expression der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten in Abhängigkeit des Risiko-Haplotyps, lässt sich festhalten, dass in allen Studien immer eine differentielle, Genotyp-abhängige Expression der kurzen Spleißvarianten beobachtet werden konnte. Bei den langen Spleißvarianten war dies jedoch nicht der Fall. Dies lässt eine spezifische Rolle der kurzen *ANRIL* Varianten in der Ätiologie der Atherosklerose und Parodontitis vermuten. Aus diesem Grund wurden die kurzen *ANRIL* Transkripte ausgewählt, um ihre Effekte auf genomweiter Expressionsebene zu untersuchen. Hierdurch sollten *trans*-regulierte Gene identifiziert werden.

4.1.2 Selektionskriterien für das gewählte Expressionssystem

In der vorliegenden Studie sollten von *ANRIL* Transkripten regulierte Gene identifiziert werden. Dazu sollte das pENTR/H1/TO knockdown System von Invitrogen verwendet werden. Durch die Induzierbarkeit der shRNA-Expression kann hier der genaue Start des Experiments bestimmt werden. Ferner wurde durch die Generierung einer stabilen Zelllinie sichergestellt, dass die Induktion durch Tetracyclin in jeder Zelle zu einem verringerten *ANRIL* Transkriptlevel führte, wodurch auch kleinste Expressionsänderungen in nachgeschalteten Genen detektiert werden konnten. Ein weiterer Vorteil des knockdown-Systems liegt in dem verringerten Transkriptniveau aller kurzen Spleißvarianten, während bei einer Überexpression nur eine spezielle Variante untersucht werden kann. Aufgrund der hohen Anzahl verschiedener Spleißvarianten in unterschiedlichen Geweben (Folkersen et al., 2009) mit bislang jeweils unbekannter Krankheitsrelevanz bietet dieser Ansatz den Vorteil einer gleichzeitigen Analyse vieler verschiedener Varianten. Allerdings können die identifizierten *trans*-regulierten Gene nicht dem Einfluss einer spezifischen Spleißvariante

zugeordnet werden. Des Weiteren wurde in einer Studie auch eine neue zirkuläre Variante beschrieben, die ebenso wie die langen Spleißvarianten in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurden (Burd et al., 2010).

In den in 4.1.1 genannten Studien wurde zwischen homozygoten Trägern des Risiko- und des geläufigen Allels ein maximal zweifacher Expressionsunterschied der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten beobachtet. Aufgrund der starken Promotoren, die in den meisten Überexpressionsvektoren verwendet werden (z.B. pcDNA4/TO; Invitrogen), sind diese nur bedingt geeignet um tatsächlich existierende physiologische Zustände zu simulieren. Vielmehr können sehr große Transkriptmengen infolge einer Überexpression zu unspezifischen Zellantworten führen (z.B. “Unfolded Protein Response“) (Steffens et al., 2006), wodurch die regulatorische Funktion eines Gens nur eingeschränkt charakterisiert werden kann und viele unnatürliche Nebeneffekte erfasst werden. In diesem Zusammenhang ist eine Studie zu nennen, in welcher ein kurzes *ANRIL* Transkript mehr als 500-fach überexprimiert wurde. Eine genomweite Expressionsprofilierung zeigte einen Einfluss auf Gene, welche hauptsächlich in der Regulation des Zellkerns eine Rolle spielen (Sato et al., 2010). Es ist wahrscheinlich, dass dieser Befund auf die große, nicht aus dem Zellkern exportierte RNA-Menge zurückzuführen ist und nicht auf einer tatsächlichen Funktion der kurzen *ANRIL* Spleißvariante beruht.

4.2 Identifizierung *ANRIL* regulierter Gene

4.2.1 Statistische Aufarbeitung der Mikroarray Daten

Das durch den knockdown verringerte Transkriptlevel der kurzen *ANRIL* Varianten führte zu einer veränderten Expression einer Vielzahl unterschiedlicher Gene. Dies ist zu erwarten, da bei solch einem Versuchsaufbau zwei Arten von Fehlern auftreten können. Unter falsch positiven Befunden oder Fehlern I Art versteht man Gene, die zwar als differentiell reguliert identifiziert werden, es aber de facto nicht sind, während es sich bei falsch negativen oder Fehlern II Art genau umgekehrt verhält. Der Vorteil von Mikroarray-Experimenten, die gleichzeitige simultane Überprüfung tausender Expressionsunterschiede, birgt aber auch Probleme. Wenn viele Hypothesen getestet werden und jede eine vorgegebene Wahrscheinlichkeit der Fehler I Art aufweist, so steigt das Auftreten des Fehlers mit der Anzahl der getesteten Hypothesen. Beispielsweise werden bei 1000 Tests 50 falsch positive Befunde erwartet, die bei einem Fehler I Art von 0.05 als signifikant deklariert sind. Dadurch

ergibt sich, dass ein p-Wert von unter 0,05, der bei einer Einzelbetrachtung als signifikant angesehen werden kann, bei dem simultanen Testen tausender Hypothesen nicht mehr einem wahren Befund entsprechen muss. Aufgrund der beschränkten Anzahl der Mikroarray-Chips, bestehend aus fünf pro Kontrollgruppe, kann der p-Wert nicht auf ein Maß gesenkt werden, das dem multiplen Testen mit über 40.000 Transkripten standhalten könnte. Diesem Problem wurde in der vorliegenden Studie unter Einbeziehung der Falscherkennungsrate (false discovery rate, FDR) entgegengewirkt. Diese ist definiert als erwarteter Anteil Fehler I. Art an den verworfenen Null-Hypothesen (Benjamini and Hochberg, 1995). Mit anderen Worten gibt man sich eine FDR vor, so dass man weiß, wie viele der Tests vermutlich falsch-positiv sind – man weiß nur nicht, welche es sind. Beispielsweise entsprechen in einer Untersuchung, bei der 100 Gene als signifikant exprimiert identifiziert wurden bei einer FDR von 30% nur 70 Gene richtigen Befunden. Um eine Aussage über signifikante Transkriptionsänderungen treffen zu können wurde aus den genannten Gründen in der vorliegenden Arbeit die FDR unter Einbeziehung von 5.000 Permutationen benutzt. Die auf diese Weise identifizierten Gene wurden wie später beschrieben mittels weiterer Methoden validiert.

Für die nachfolgenden systembiologischen Untersuchungen musste ein Kompromiss zwischen der errechneten Signifikanz der Mikroarray-Daten und einer ausreichend hohen Anzahl auswertbarer Genprodukte geschlossen werden. Eine zu hohe Stringenz würde den Verlust der Erkennung möglicher wahrer systembiologischer Zusammenhänge nach sich ziehen (Typ II Fehler). Neben der FDR wurde die statistische Streuung der Genprodukte (Ausreißer) als weiteres Kriterium in die Auswertung einbezogen. Unter den stringentesten Auswahlkriterien ($FDR < 1\%$ und keine Ausreißer) konnte 48 Stunden nach shRNA-Induktion eine differentielle Expression bei 790 Genen detektiert werden, 96 Stunden nach Induktion waren es 1.225 Genprodukte. Die Anzahl der detektierten Gene war damit unter den härtesten Auswahlkriterien hoch genug für die anschließende systembiologische Analyse.

4.2.2 Einordnung der durch Mikroarray-Experimente identifizierten Gene in biologische Prozesse

Die Einteilung der differentiell exprimierten Genprodukte in Gene Ontology (GO)-Gruppen zeigte einen starken regulatorischen Einfluss auf verschiedene biologische Prozesse. Von diesen wies der Prozess "Ossifikation während der Knochenreifung" sowohl nach 48 als auch nach 96 Stunden die größte Anreicherung regulierter Gene auf. Unter Ossifikation versteht man die Ablagerung von Knochenmaterial durch Osteoblasten, wodurch neues Knochengewebe gebildet werden kann (Caetano-Lopes et al., 2007). Dieser Prozess spielt nicht nur während der Bildung neuen Knochens eine Rolle, sondern ist auch entscheidend an der Knochenhomöostase beteiligt, bei der durch Osteoklasten abgebauter Knochen durch Osteoblasten wieder aufgebaut wird (Frost, 1986). Interessanterweise ist die Parodontitis durch eine entzündungsvermittelte Störung der Knochenhomöostase und einen damit verbundenen Abbau des Alveolarknochens gekennzeichnet (Hugoson et al., 2008; Loe et al., 1986). Das Verhältnis der Osteoklasten zu Osteoblasten wird durch die Wechselbeziehung von RANKL und OPG gesteuert, welche in der Parodontitis aufgrund der hohen Konzentration inflammatorischer Zytokine gestört ist (Graves and Cochran, 2003). Die Analyse der Mikroarray-Daten zeigte, dass weder für *RANKL* noch für *OPG* ein Hybridisierungssignal detektiert werden konnte. Dieser Umstand ist wahrscheinlich dem verwendeten Zelltyp geschuldet, da laut der MOPED- und PaxDb-Datenbanken zumindest *RANKL* nicht in Hek293 Zellen exprimiert wird.

Ein Prozess, der bei der Ossifikation eine wichtige Rolle spielt, ist die Kalzifizierung. Darunter versteht man physiologisch die Einlagerung von Kalziumsalzen in die kollagene Knochenmatrix während des Knochenwachstums (McLean and Bloom, 1940). Interessanterweise geht auch die Atherosklerose oft mit der Kalzifizierung der arteriellen Wand einher, was in einer verringerten Elastizität der Gefäße resultiert (Fitzpatrick et al., 1994). Die Gefäßverkalkung entwickelt sich in zwei verschiedenen Schichten der arteriellen Wand, der Intima und der Media. Die Kalzifizierung der arteriellen Media, auch Arteriosklerose Typ Mönckeberg genannt, findet sich häufig in den Arterien der Extremitäten, repräsentiert den physiologischen Alterungsprozess der Arterie und tritt häufig gemeinsam mit Diabetes mellitus auf (Lehto et al., 1996; Shanahan et al., 1999). Die Kalzifizierung der arteriellen Intima repräsentiert eine fortgeschrittene Phase der Atherosklerose und ist mit der Entwicklung eines pathologischen Atheroms assoziiert, das unter Umständen eine Stenose verursachen kann (Shanahan et al., 1999). Die Verkalkung der

koronaren Arterien stellt einen aktiven Prozess dar, der durch verschiedene zelluläre Signalwege, die auch bei der Knochenbildung eine Rolle spielen, gesteuert wird (Doherty et al., 2004; Johnson et al., 2006). Schlüsselspieler dieser Signalwege sind die knochenmorphogenetischen Proteine 2 und 4 (bone morphogenic protein, BMP-2 und BMP-4), das Osteopontin und das Osteonektin (Dhore et al., 2001). Zwar konnte für keines der genannten Gene eine differentielle Expression nach der Repression der kurzen *ANRIL* Varianten beobachtet werden, jedoch zeigten assoziierte Proteine wie die BMP-2 induzierbare Kinase (BMP2K) und das Osteocalcin (BGLAP) eine signifikante Expressionsänderung nach 96, nicht aber nach 48 Stunden (Tabelle 23). Osteocalcin ist das am häufigsten vertretene, nichtkollagene Protein im Knochen (Hauschka et al., 1989). Seine Konzentration im Serum korreliert mit dem Knochenmetabolismus und dient als biologischer Marker für die klinische Einschätzung von Knochenerkrankungen (Calvo et al., 1996). Osteocalcin beeinflusst die Knochenhomöostase auf unterschiedliche Weise. Zum einen wirkt es durch seine Bindung an Hydroxylapatit (Poster and Price, 1979) direkt in der Knochenmineralisierung mit (Ducy et al., 1996), zum anderen rekrutiert es aber auch Osteoklasten (Chenu et al., 1994) und Osteoblasten (Bodine and Komm, 1999), welche wiederum die Knochenhomöostase beeinflussen. Auf diese Weise könnte das Osteocalcin auch eine Rolle bei der Parodontitis spielen. In der Tat wurde in mehreren Studien eine erhöhte Osteocalcin-Konzentration in der Sulkusflüssigkeit von an Parodontitis erkrankten Probanden nachgewiesen (Bullon et al., 2005; Giannobile et al., 1995), welche darüber hinaus auch mit der Schwere der Erkrankung korrelierte (Kunimatsu et al., 1993). Interessanterweise findet sich auch eine erhöhte Osteocalcin-Konzentration bei an Atherosklerose erkrankten Patienten, welche ebenfalls mit der Schwere der Erkrankung einhergeht (Gössl et al., 2008; Jie et al., 1995; Reyes-Garcia et al., 2012).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der biologische Prozess "Ossifikation während der Knochenreifung" die meisten regulierten RefSeq Sequenzen beinhaltet. Interessanterweise spielen Signalwege und Zelltypen die diesem Prozess zugeordnet werden können, wie beispielsweise das Osteocalcin, die Osteoklasten und die Osteoblasten, eine wichtige Rolle bei der Ätiologie der Parodontitis und Atherosklerose spielt.

4.2.3 ADIPOR1, C11ORF10 und VAMP3 werden am stärksten durch die kurzen ANRIL Spleißvarianten reguliert

Wie beschrieben, zeigte die Analyse der durch die kurzen *ANRIL* Transkripte regulierten biologischen Prozesse einen besonders hohen Anteil von Genen, die eine Rolle bei der Ossifikation spielen. Schlüsselspieler dieses Prozesses, wie das Osteocalcin, zeigten eine signifikante Regulation erst 96 Stunden nach der Induktion der shRNA, nicht jedoch nach 48 Stunden. Dies lässt den Schluss einer indirekten Regulation durch die untersuchten *ANRIL* Transkripte zu. Um Gene zu identifizieren, die potentiell direkt durch die *ANRIL* Transkripte reguliert wurden, mussten härtere Ausschlusskriterien definiert werden. Zu diesen Ausschlusskriterien zählte eine Expressionsänderung nach 48 Stunden von $> \pm 1,5$, welche 96 Stunden nach Versuchstart stärker als nach 48 Stunden ausfallen musste. Insgesamt erfüllten drei Gene die vordefinierten Kriterien. Bei diesen handelt es sich um den Adiponektin Rezeptor 1 (*ADIPOR1*), das Vesikel assoziierte Membranprotein 3 (*VAMP3*) und Chromosom 11 offenes Leseraster 10 (*C11ORF10*).

ADIPOR1

ADIPOR1 ist ein hochaffiner Rezeptor für Adiponektin, einem Peptidhormon, das beim Menschen vor allem in Fettzellen gebildet und in den Blutkreislauf entlassen wird (Nakano et al., 1996; Scherer et al., 1995). Verringerte Plasmaspiegel des Hormons korrelieren mit Fettleibigkeit (Hu et al., 1996), Typ 2 Diabetes (Spranger et al., 2003) und einem erhöhten Myokardinfarktrisiko (Pischon et al., 2004). Dabei entfaltet das Hormon seine antidiabetische (Kubota et al., 2002; Yamauchi et al., 2001) und antiatherogene (Okamoto et al., 2002; Yamauchi et al., 2003) Wirkung unter anderem durch die Regulation der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) und des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor- α (PPAR- α). Dadurch nimmt es einen direkten Einfluss auf die Gluconeogenese und Fettsäureoxidation (Yamauchi et al., 2007). Darüber hinaus vermindert Adiponektin die Insulinresistenz (Yamauchi et al., 2001), indem es die insulinvermittelte Expression des Glukosetransporters 4 (GLUT4) und seine Translokation zur Plasmamembran erhöht (Ceddia et al., 2005; Fu et al., 2005). Die Wirkung des Hormons konnte auch bei Entzündungsreaktionen nachgewiesen werden. Beispielsweise vermindert es in arteriellen Endothelzellen neben der durch TNF- α induzierten Adhäsion von Monozyten auch die Expression des vaskulären Adhäsionsmoleküls 1 (VCAM-1), des E-Selectins und des interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) (Ouchi et al., 1999). Im gingivalen Gewebe konnte eine abschwächende

Wirkung auf die durch LPS induzierte Expression von IL1 β , IL-6, IL-8, Matrix Metalloproteinase (MMP) -1 und MMP-3 beobachtet werden (Kraus et al., 2012).

Wie bereits beschrieben, deuten viele Studien auf eine verringerte Expression der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten in homozygoten Trägern des mit Atherosklerose und Parodontitis assoziierten Haplotyps hin (Burd et al., 2010; Congrains et al., 2012; Cunnington et al., 2010). Durch die Repression dieser Transkripte konnte in der vorgelegten Arbeit dieser Zustand simuliert werden. Eine erniedrigte *ADIPOR1* Expression könnte somit auch in homozygoten Trägern des Risiko-Haplotyps gefunden werden, wodurch die anti-atherosklerotische Wirkungen des Adiponektins bei diesen Individuen vermindert sein könnten. In diesem Zusammenhang sei eine Studie zu nennen, in der im *ADIPOR1* Gen ein Risiko-Haplotyp für Atherosklerose identifiziert wurde, welcher bei Diabetes-Patienten zu einer 30-40% verringerten *ADIPOR1* mRNA Menge führt (Soccio et al., 2006). Darüber hinaus konnte ein Zusammenhang zwischen einer verminderten *ADIPOR1* Expression sowohl mit dem metabolischem Syndrom als auch mit Typ 2 Diabetes nachgewiesen werden (Iwabu et al., 2010; Wang et al., 2004a). Interessanterweise ist die genomische Region des *ANRIL* Gens auch mit Typ 2 Diabetes assoziiert, wobei die Typ 2 Diabetes Assoziation unabhängig von der KHK und Parodontitis Assoziation ist (Schaefer et al., 2009; Schunkert et al., 2008). Bisher sind keinerlei Studien bekannt, die sich mit der Auswirkung des mit Typ 2 Diabetes assoziierten Haplotyps auf die Expression der kurzen und langen *ANRIL* Spleißvarianten befassen. Dennoch scheint es nicht ausgeschlossen, dass auch diese Risikovarianten die *ANRIL* Expression modulieren und in einem kausalen Zusammenhang zu der verminderten *ADIPOR1* Expression in Typ 2 Diabetes Patienten stehen.

ADIPOR1 wurde in der GOSTat-Analyse dem Prozess "Ossifikation während der Knochenreifung" zugeordnet. Der Rezeptor wird ebenfalls auf Osteoblasten exprimiert, in denen die Interaktion mit Adiponektin zu einer erhöhten Proliferation führt und mit einer erhöhten Osteocalcin Expression einhergeht (Luo et al., 2005). Somit könnte die beobachtete erhöhte Expression von *ADIPOR1* nach 48 Stunden die erhöhte Expression des Osteocalcins nach 96 Stunden erklären.

VAMP3

VAMP3 gehört zu der VAMP/Synaptobrevin-Familie, deren Mitglieder einen wesentlichen Anteil der Membranproteine von sekretorischen Vesikeln ausmachen und an ihrer Fusion mit der Plasmamembran beteiligt sind (Baumert et al., 1989). In dem Kontext der Ätiologie der Atherosklerose und Parodontitis sind zwei Prozesse, an denen VAMP3 beteiligt ist, hervorzuheben, die Entzündungsreaktionen und der Insulinsignalweg. Während der angeborenen Immunantwort bewirkt die Stimulation von Makrophagen mit LPS eine erhöhte Expression von VAMP3, die wiederum mit einer erhöhten Sekretion von TNF- α einhergeht (Murray et al., 2005). Hierbei ist VAMP3 entscheidend an dem Verschmelzen von TNF- α beladenen Vesikeln mit der Plasmamembran beteiligt, wodurch es eine schnelle TNF- α Sekretion erlaubt (Bajno et al., 2000; Murray et al., 2005). Interessanterweise ist VAMP3, ebenso wie Adiponektin, am GLUT4 vermittelten Glukosemetabolismus beteiligt. Ein erhöhter Insulinspiegel führt zu einer Translokation von GLUT4 zu der Plasmamembran, wodurch die Aufnahme von Glukose in die Zelle ermöglicht wird. Dieser Prozess der Translokation wird unter anderem durch VAMP3 vermittelt (Schwenk et al., 2012; Schwenk et al., 2008).

Sofern sich das verminderte Transkriptniveau der kurzen *ANRIL* Varianten, wie es in homozygoten Trägern des Risiko-Haplotyps der Atherosklerose und Parodontitis beobachtet werden kann, auch *in vivo* auf die Expression von VAMP3 auswirkt, würden die Risikovarianten unter anderem die Fähigkeit des Organismus vermindern, den Blutglukosespiegel rasch zu senken. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Hyperglykämie, also ein erhöhter Blutzuckerspiegel, die Entwicklung der Atherosklerose begünstigt (Aronson and Rayfield, 2002; Bornfeldt and Tabas, 2011) und letztlich zu einer Insulinresistenz und daraus folgender Diabetes führen kann (Stenbit et al., 1997). Interessanterweise konnte der mit Atherosklerose assoziierte Haplotyp mit einer erhöhten Glykosylierung des Hämoglobins, welche einen Marker für die Hyperglykämie darstellt, in Verbindung gebracht werden (Doria et al., 2008).

C11ORF10

Bei C11ORF10 handelt es sich um ein bisher nicht charakterisiertes Membranprotein. Bisher sind keine Varianten in dieser Region mit Parodontitis oder Atherosklerose assoziiert, jedoch zeigt sich eine genomweit signifikante Assoziation zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Franke et al., 2010). Darüber hinaus ist auch eine genetische Assoziation

mit veränderten Phospholipid- und Sphingolipidspiegeln beschrieben (Demirkan et al., 2012). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass das Auftreten bestimmter Varianten in der *C11ORF10* Genregion zu einem erhöhten α -Linolensäure-Plasmaspiegel führen, wobei gleichzeitig auch ein verminderter Eicosapentaensäure- und Docosapentaensäure-Plasmaspiegel beobachtet werden konnte (Lemaitre et al., 2011). Diese Studie legt eine Beteiligung der Gene in der *C11ORF10* Region bei der Umwandlung der α -Linolensäure zu Eicosapentaensäure und Docosapentaensäure nahe. Interessanterweise zeigen Studien, dass sowohl der Eicosapentaensäure als auch der Docosapentaensäure eine antiatherosklerotische Bedeutung zukommt. Neben der blutdruck- und pulssenkenden Wirkung der Docosapentaensäure konnte auch ein direkter Zusammenhang zwischen hohen Blutspiegeln der Fettsäure und einem verringerten Herzinfarktrisiko nachgewiesen werden (Mori et al., 1999; Rissanen et al., 2000). Daneben zeigte eine andere Studie, dass die Gabe von Eicosapentaensäure das Herzinfarktrisiko bei Patienten mit einem erhöhten Serumcholesterinspiegel signifikant senken kann (Yokoyama et al., 2007).

4.4 Validierung des regulatorischen Einflusses der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten auf *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3*

Die durch Mikroarray detektierte differentielle Expression von *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3* konnte in dem stabil transfizierten Zellsystem auf mRNA-Ebene (qRT-PCR) und Proteinebene validiert werden. Um die Möglichkeit einer unspezifischen Regulation von *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3*, die in Wirklichkeit nicht auf den *ANRIL* Transkripten beruht, auszuschließen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt.

4.4.1 Untersuchung möglicher Off-Target Effekte

Während einer viralen Infektion kann doppelsträngige RNA (dsRNA), die z.B. im Zuge der viralen Replikation gebildet wurde, zu einer Aktivierung diverser antiviraler Mechanismen in der Wirtszelle führen (Nat. Cell Biol., Karpala et al., 2005, Vol. 5, 489–490; Malmgaard, 2004; Sadler and Williams, 2008). Die durch Interferone induzierbare 2'-5'-Oligoadenylat Synthetasen (*OAS*) sind Schlüsselenzyme dieser Reaktion (Hovanessian and Justesen, 2007). Die Enzyme werden durch die Interaktion mit dsRNA aktiviert und katalysieren die Polymerisierung von ATP zu 2'-5'-verknüpften Oligoadenylatketten (Hovanessian and Justesen, 2007). Die Oligoadenylatketten binden an die Endoribonuklease RNaseL, womit

diese aktiviert und RNA degradiert wird (Player and Torrence, 1998; Wreschner et al., 1981). Aufgrund der unveränderten *OAS1* Expression unter den gegebenen Versuchsbedingungen können die veränderten Expressionen der untersuchten Gene infolge eines *OAS1* vermittelten unspezifischen RNA-Abbaus ausgeschlossen werden.

Neben der durch dsRNA vermittelten Aktivierung der *OAS* Gene ist ebenfalls bekannt, dass manche shRNA-Vektoren auch zu einer Aktivierung der *OAS* Gene führen (Bridge et al., 2003). Eine mögliche Erklärung dafür könnte das Triphosphat an dem 5'-Ende der shRNA darstellen, welches zu der Aktivierung des Retinsäure induzierbaren Proteins (RIG)-I führen kann (Hornung et al., 2006; Nallagatla et al., 2007). Um auszuschließen, dass die beobachteten Expressionsänderungen auf eine RIG-I aktivierte, antivirale Signalkaskade zurückzuführen sind, wurde der Einfluss der Expression einer unspezifischen shRNA sowohl auf die kurzen und langen *ANRIL* Spleißvarianten, als auch auf die am stärksten regulierten Gene, *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3*, untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression der unspezifischen shRNA zu keiner Änderung der betrachteten Gene führte, weshalb eine unspezifische RNA Degradation über diesen Signalweg ausgeschlossen werden kann.

Die in den stabilen Zelllinien identifizierten, von *ANRIL* regulierten Gene konnten auch in einem weiteren Zellsystem repliziert werden. Dabei wurde als zusätzliche Kontrolle ein weiterer Expressionsvektor und eine abgewandelte shRNA benutzt. Erwartungsgemäß fiel die Expressionsänderung bei der transienten Transfektion nicht so stark aus wie in der stabilen Zelllinie. Aufgrund der fehlenden Selektion nach der Transfektion kann nicht davon ausgegangen werden, dass in allen Zellen der shRNA-Expressionsvektor funktionell integriert wurde, wodurch bei diesen die Expression der betrachteten Gene über den Versuchszeitraum unverändert blieb. Ein möglicher Kritikpunkt bei dem durchgeführten Versuch ist die Tatsache, dass sich die verwendete shRNA nur in einem Nukleotid von der shRNA in den stabilen Zelllinien unterscheidet. Jedoch ist aus der Literatur bekannt, dass zwei siRNAs gegen dasselbe Transkript, welche sich in nur zwei Nukleotiden unterscheiden, vollkommen unterschiedliche Repressionseffizienzen aufweisen können (Reynolds et al., 2004). Aufgrund der geringen Länge des 13ten Exons von nur 212 Nukleotiden ergaben sich bei einer vorgegebenen shRNA-Zielsequenzlänge von 21 Nukleotiden maximal zehn vollkommen unterschiedliche shRNA-Sequenzen. Wenn man bedenkt, dass shRNAs, welche von einem G/C-Gehalt von 30-52% abweichen, eine geringe Repressionseffizienz aufweisen (Elbashir et al., 2002; Reynolds et al., 2004), sinkt die Anzahl der möglichen, funktionell

aktiven shRNAs noch weiter. Neben den shRNA innewohnenden Einschränkungen müssen auch Kriterien innerhalb der Ziel RNA für eine starke Repression erfüllt sein. Für einen effizienten RNA-Abbau muss die Zielsequenz für den siRISC Komplex zugänglich sein. Dies kann durch die Bildung von Sekundärstrukturen innerhalb der Ziel-mRNA verhindert werden, wenn die Zielsequenz, zum Beispiel durch homologe Basenpaarung, innerhalb einer Haarnadelstruktur liegt. Brown *et al* konnten zeigen, dass nur durch das Auflösen einer Stammstruktur, an der die Zielsequenz einer benutzten shRNA beteiligt war, die knockdown-Effizienz von 2% auf 65% gesteigert werden konnte (Brown et al., 2005; Overhoff et al., 2005). mRNA-bindende Proteine lagern sich bereits an naszierende mRNA-Vorläufer an und vermitteln unterschiedliche RNA Prozessierungsschritte wie das 5'-Kapping, das Spleißen und die Polyadenylierung (Dreyfuss et al., 2002; Maniatis and Reed, 2002). Diese Proteine können sterische Hindernisse darstellen, welche unabhängig der Sekundärstruktur einer RNA die Bindung des siRISC Komplexes an die Zielsequenz zusätzlich verhindern können.

Interessanterweise wird die Funktion von vielen lncRNAs zum einen durch ihre Struktur und nicht durch die Primärsequenz (Hindorff et al., 2009; Khalil and Rinn, 2011; Silverman et al., 2013) und zum anderen durch RNA-bindende Proteine vermittelt (Mercer et al., 2009). Darüberhinaus gibt es Anzeichen, dass ncRNAs eine Sekundärstruktur ausbilden, die stabiler ist, als es von einer nicht-ncRNA mit gleicher Nukleotidzusammensetzung zu erwarten wäre (Uzilov et al., 2006). Eine ausgeprägte Sekundärstruktur, die darüber hinaus sehr stabil und mit vielen RNA bindenden Proteinen assoziiert vorliegt, könnte also die Erklärung für die geringe Anzahl der funktionsfähigen shRNAs gegen das 13te Exon der *ANRIL* Transkripte bieten.

4.4.2 Überexpression des EU741058 Transkriptes in einer stabilen Zelllinie

In einem weiteren Validierungsexperiment wurde die Spleißvariante EU741058 in einem stabilen induzierbaren Zellsystem überexprimiert. Das verwendete Transkript beinhaltet die Exone 1-5-6-7-13 und wurde bereits in humanen Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) beschrieben (Folkersen et al., 2009). Es konnte in dieser Arbeit auch in hGFs nachgewiesen werden. Die Überexpression des Transkriptes führte lediglich zu einer erhöhten Expression von *C11ORF10*. Die Tatsache einer unveränderten Expression von *ADIPOR1* und *VAMP3* kann aufgrund der Regulation dieser Gene durch andere Spleißvarianten als EU741058 erklärt werden. Diese wurden zwar durch die Verwendung einer shRNA gegen das 13te Exon in den knockdown-Experimenten runterreguliert, in der Überexpression jedoch nicht

brücksichtigt. Generell können unterschiedliche biologische Prozesse dank verschiedener Isoformen eines Gens durch den Gebrauch unterschiedlicher Exonkombinationen reguliert werden (Ashhab et al., 2001; Holmberg et al., 2000). Die hohe Anzahl verschiedener, zelltypspezifisch exprimierter Transkripte lässt auch für *ANRIL* solch einen Mechanismus vermuten (Burd et al., 2010; Folkersen et al., 2009; Jarinova et al., 2009). Diese Hypothese bedarf jedoch weiterer Überprüfung durch die Überexpression verschiedener Spleißvarianten in unterschiedlichen Zellsystemen.

4.5 Stimulation humaner gingivaler Fibroblasten mit TGF- β

In den durchgeführten Experimenten führte die Stimulation humaner gingivaler Fibroblasten mit TGF- β sowohl zu einer signifikant verringerten Expression der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten, *ADIPOR1* und *VAMP3*, als auch zu einer erhöhten Expression von *CDKN2B*. Während in der Literatur der regulatorische Einfluss von TGF- β auf *ADIPOR1* und *CDKN2B* gut dokumentiert ist (Hannon and Beach, 1994; Otani et al., 2010), liegen zur *ANRIL* und *VAMP3* solche Studien nicht vor. Festzuhalten ist, dass auch *C11ORF10* einen Trend zu einer verringerten Expression nach TGF- β Stimulation zeigt, welcher jedoch nicht den Signifikanzschwellenwert erreicht.

TGF- β ist ein multifunktionaler Wachstumsfaktor, der zelluläre Prozesse während der Proliferation, Differenzierung, Apoptose und der Immunantwort steuert, wobei die meisten Effekte über SMAD Transkriptionsfaktoren vermittelt werden (Derynck and Zhang, 2003; Heldin et al., 1997).

Atherosklerose wird unter anderem durch die fortschreitende subendotheliale Akkumulation von Cholesterol in der arteriellen Wand verursacht, welche sich mit der Zeit zu komplexen Strukturen, den atherosklerotischen Plaques entwickelt (Nakashima et al., 2008). Dabei ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Plaquebildung das Freisetzen von Lipoproteinen niedriger Dichte (low density lipids, LDL) aus der arteriellen Wand in die Lymphe (Libby, 2002; Wrana et al., 1994). In diesem Zusammenhang kann TGF- β mit der Entwicklung der Atherosklerose in Verbindung gebracht werden (Bobik et al., 1999). Durch die Induktion biochemischer Veränderungen in den durch glatte Muskelzellen sezernierten Proteoglykanen bewirkt TGF- β eine stärkere Bindung von LDL in den Gefäßwänden. Dies hat eine erhöhte Lipidspeicherung in der Intima der arteriellen Gefäße zur Folge und endet letztlich in einer beschleunigten Plaquebildung und Atherosklerose (Camejo et al., 1998b).

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine erhöhte Glukosekonzentration mit einer erhöhten TGF- β Expression korreliert (Sharma et al., 1997). Interessanterweise konnte in der vorliegenden Studie ein negativer regulatorischer Einfluss von TGF- β auf *VAMP3* beobachtet werden. Wie bereits beschrieben, wirkt *VAMP3* entscheidend bei der Insulin induzierten Translokation des GLUT4 Transporters zur Plasmamembran mit, was zu einer schnellen Senkung des Glukosespiegels führt (Schwenk et al., 2012). Zusammenfassend lassen frühere Studien, die eine erhöhte TGF- β Konzentration bei der Hyperglykämie zeigten (Sharma et al., 1997), und die vorgelegten Daten, die eine verminderte *VAMP3* Expression nach TGF- β Stimulation zeigten, eine Verstärkungsschleife vermuten. Ein erhöhter Blutglukosespiegel führt zu einer erhöhten TGF- β Expression, welche die Expression von *VAMP3* verringert. Dadurch wird Glukose nicht mehr so schnell aus dem Blut in die Zellen aufgenommen, wodurch der Glukosespiegel länger auf einem erhöhten Niveau bleibt.

Die Ähnlichkeit der Resultate zwischen der knockdown-vermittelten und der TGF- β vermittelten transkriptionellen Änderung der betrachteten Gene legt die Vermutung nahe, dass auch die TGF- β vermittelten Expressionsänderungen primär auf die *ANRIL* Funktion zurückzuführen sind. Obgleich dies zumindest für *ADIPOR1* und *VAMP3* möglich erscheint, lässt sich ein solcher Signalweg für *CDKN2B* aufgrund der in der Arbeit vorgelegten Daten wiederlegen. Eine veränderte *CDKN2B* Expression konnte erst 96 Stunden nach der shRNA-Induktion beobachtet werden, während *ANRIL*, *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3* schon nach 48 Stunden differentiell exprimiert wurden. In einer vorangegangenen Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass das elongierende *ANRIL* Transkript mit CBX7 und SUZ12 interagiert, welche Bestandteile der PRC2 und PRC1 Komplexe darstellen (Yap et al., 2010). Diese Interaktion führt durch die Methylierung von Histon 3 an Lysin 27 (H3K27) und der anschließenden Monoubiquitinierung von Histon 2A an Lysin 119 (H2AK119) zu einer epigenetischen Repression der *CDKN2A/B* Gene (Yap et al., 2010). Ferner konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass das *ANRIL* Transkript entscheidend bei der Etablierung, nicht aber bei der Aufrechterhaltung eines epigenetischen Zustandes beteiligt ist (Yu et al., 2008). Histonmodifikationen, speziell Methylierungen, werden als Langzeit-Regulationsmechanismen angesehen (MacRae, 2011). Zwar können Methylierungen durch Demethylasen wieder entfernt werden (Agger et al., 2007; Metzger et al., 2005), dies nimmt jedoch eine längere Zeit in Anspruch (Qi et al., 2012), was einen Grund für die zeitlich versetzten Expressionsänderungen der *CDKN2A/B* Gene nach knockdown der kurzen *ANRIL* Spleißvarianten darstellen könnte. Aufgrund der erhöhten *CDKN2B* Expression 48 Stunden

nach TGF- β Zugabe legen die Daten eine *ANRIL* unabhängige *CDKN2B* Regulation durch TGF- β nahe. Inwiefern *ADIPOR1* und *VAMP3* in dem TGF- β Signalweg direkt durch *ANRIL* reguliert werden, lässt sich aufgrund der Daten nicht belegen und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.6 *In silico* Analyse der chromosomalen Regionen von *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3*

Wie bereits beschrieben, zeigten sich für *ADIPOR1*, *C11ORF10*, *VAMP3* und *CDKN2B* unterschiedliche Zeitpunkte, nach denen auf das veränderte *ANRIL* Transkriptlevel mit einer veränderten Expression reagiert wurde. Für *CDKN2A/B* ist ein epigenetischer Regulationsmechanismus gut beschrieben (Yap et al., 2010; Yu et al., 2008). Ferner konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass die Expression von *CDKN2A/B* nicht unmittelbar mit einem veränderten *ANRIL* Transkriptniveau korreliert. In den in der vorliegenden Studie durchgeführten Versuchen zeigten sich 48 Stunden nach shRN-Induktion bereits signifikante Expressionsänderungen für die *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3* Gene. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass nach einer Inaktivierung der shRNA-Expression die Transkriptniveaus von *ANRIL*, *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3* zeitgleich steigen. Dies lässt die Existenz eines chromatinmodifikation-unabhängigen Regulationsmechanismus auf *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3* vermuten. Neben der Regulation von in einer Genwirkkette nachgeschalteten Genen über die Veränderung der Histonmodifikationen (Gupta et al., 2010; Rinn et al., 2007) sind auch weitere Regulationsmechanismen für lncRNAs bekannt wie die Regulation der Transkriptionsfaktoraktivität durch deren Bindung (Hung et al., 2011; Kino et al., 2010). Die *in silico* Analyse der genomischen Regionen von *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3* samt der sie umgebenden 2.500 bp stromauf- und abwärts zeigte drei hoch konservierte Bereiche, die in allen drei Genen zu finden sind und sich an derselben Stelle innerhalb des gewählten Referenzgens befinden. Eine Analyse der an diese Nukleotidsequenzen bindenden Transkriptionsfaktoren zeigte, dass u.a. in allen konservierten Bereichen eine Bindestelle für PITX2 zu finden ist. PITX2 gehört zu der Bicoid-Klasse der Homöodomänen-Proteine. Mitglieder dieser Familie besitzen Lysinreste an Position 9 der dritten Helix und sind auch durch ihre Fähigkeit, sowohl DNA als auch RNA zu binden, charakterisiert (Amendt et al., 1998; Cox et al., 2002; Dubnau and Struhl, 1996). Es ist daher möglich, obwohl hoch spekulativ, dass die in dieser Studie beschriebenen Expressionsänderungen nach knockdown der kurzen *ANRIL* Transkripte zumindest in Teilen

auf die Interaktion zwischen PITX2 und *ANRIL* zurückzuführen sind. Diese Hypothese bedarf weiterer Untersuchungen, etwa des Nachweises einer direkten Interaktion zwischen den *ANRIL* Tarsnkripten und PITX2.

4.7 Genetische Analysen der chromosomalen Regionen von *C11ORF10* und *VAMP3*

Krankheitsassoziierte Gene können funktionell verbunden sein und/oder miteinander in biologischen Signalwegen, welche an der Entwicklung einer Krankheit beteiligt sind, interagieren (Marchini et al., 2005; Peng et al., 2010). Es ist daher anzunehmen, dass nur eine eingeschränkte Anzahl biologischer Prozesse überhaupt das Potential hat um bei der Ätiologie einer spezifischen Krankheit mitzuwirken (Carlborg and Haley, 2004). Die Vermutung liegt also nahe, dass, sofern *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3* von den Produkten des mit Atherosklerose und Parodontitis assoziierten *ANRIL* Gens reguliert werden, auch genetische Assoziationen mit den erwähnten Krankheiten in den genomischen Bereichen der identifizierten Gene gefunden werden können.

C11ORF10

In der durchgeführten genetischen Analyse der genomischen Region von *C11ORF10* war ein Haplotyp über *C11ORF9*, *C11ORF10*, *FADS1* und *FADS2* mit AgP, jedoch nicht mit Atherosklerose assoziiert. Interessanterweise ist dieser Haplotyp ebenfalls mit dem metabolischem Syndrom (Zabaneh and Balding, 2010), veränderten Phospholipidkonzentrationen (Demirkan et al., 2012; Lemaitre et al., 2011), Typ2 Diabetes (Dupuis et al., 2010) und Morbus Crohn assoziiert (Franke et al., 2010). Die durch die *FADS1* und *FADS2* Gene kodierten Desaturasen sind für das Einführen von Doppelbindungen zwischen bestimmten Kohlenstoffatomen der Fett-Acyl-Kette verantwortlich, womit sie die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme in der Verstoffwechslung von langkettigen, mehrfach ungesättigten n-3 und n-6 Fettsäuren sind (Cho et al., 1999a; Cho et al., 1999b). Eine Wechselwirkung dieser Fettsäuren bei der Entstehung der Atherosklerose und Parodontitis ist sehr gut dokumentiert (Bucher et al., 2002; Kesavalu et al., 2007; Rosenstein et al., 2003; Thies et al., 2003).

VAMP3

Die genetische Analyse der *VAMP3* Region zeigte mehrere mit Parodontitis assoziierte SNPs, welche im *CAMTA1* Gen liegen und nicht im LD zueinander stehen. Diese SNPs liegen unmittelbar stromaufwärts einer Region, die eine Assoziation mit der Kolonisierung der Mundhöhle durch parodontopathogene Markerkeime des orangenen und roten Komplexes zeigt (Divaris et al., 2012). Innerhalb des subgingivalen Plaques sind die parodontopathogenen Keime die primäre Ursache für die parodontale Erkrankung, wobei der Verlauf der Parodontalerkrankung nicht durch das Vorhandensein und die Konzentration einzelner Keime bestimmt wird (Löe et al., 1965; Socransky et al., 1998). Vielmehr ist das gemeinsame Vorkommen verschiedener Bakterienspezies, die demgemäß zu sogenannten “Bakterienkomplexen“ zusammengeführt werden, sowie deren Interaktionen von maßgeblicher Bedeutung für den Krankheitsverlauf (Socransky et al., 1998). Hierbei beschreibt der orangene Komplex moderat- bis stark-pathogene Bakterien, die für den Attachmentverlust und die Zunahme der Taschentiefe verantwortlich sind. Darüber hinaus schaffen Bakterien des orangenen Komplexes durch ihren Stoffwechsel ein ökologisches Umfeld für die strikt anaeroben Keime des roten Komplexes. Der rote Komplex beinhaltet gramnegative Keime, die durch proteolytische Enzyme den Abbau des parodontalen Weich- und Knochengewebes verantworten (Holt and Ebersole, 2005).

CAMTA1 gehört zu den Calmodulin bindenden Transkriptionsaktivatoren (CAMTAs), welche eine starke Konservierung von Pflanzen bis zu Menschen aufweisen (Bouché et al., 2002). Das Gen zeigt eine starke Expression im embryonalen Herzen, wo es wahrscheinlich die Funktion von Transkriptionsfaktoren bei der Genexpression reguliert (Song et al., 2006). Darüber hinaus wird auch die Rolle von *CAMTA1* während der Zellproliferation und Tumorunterdrückung diskutiert (Barbashina et al., 2005; Henrich et al., 2006; Maris et al., 2000).

Diese Assoziation wurde in einer Meta-Analyse aus 14 genomweiten Assoziationsstudien für koronare Herzkrankheiten, bestehend aus 22.233 Fällen und 64.762 Kontrollen europäischer Abstammung, repliziert (Schunkert et al., 2011). Der SNP rs10864294, welcher sowohl in der AgP als auch in der KHK Kohorte eine Assoziation zeigte, wies nur eine geringe Genotypisierungsqualität auf, weshalb für die Analyse ein 760 bp entfernter SNP, der in vollem LD (D^{\prime}) zu rs10864294 liegt, benutzt wurde. Durch die Genotypisierung dieses SNPs konnte auch für Atherosklerose eine signifikante Assoziation des mit AgP assoziierten Haplotyps nachgewiesen werden. Für die Bestimmung des LD wurde in der vorliegenden

Studie D' statt des im HapMap Projekt genutzte r^2 verwendet, da mit r^2 kein LD zwischen den SNPs berechnet werden konnte. Dies lässt sich durch die Art der Berechnung beider Methoden erklären. Während bei der Berechnung mit r^2 die Allelfrequenzen miteinbezogen werden, ist dies bei D' nicht der Fall (Devlin and Risch, 1995; Lewontin, 1988). Da in der vorliegenden Analyse die MAF von rs10864294 bei 8,22% und die von rs2301462 bei 40,59% lag, war die Berechnung mit D' besser geeignet, um das LD zwischen beiden SNPs zu beschreiben.

Auffällig ist das hohe Odds Ratio des SNPs rs17030881 bei der AgP und Atherosklerose, welches bei 6,09 und 4,36 liegt. Einerseits deuten diese Odds Ratios auf einen engen Zusammenhang zwischen dem Auftreten beider Krankheiten und der erwähnten Risikovariante hin, andererseits muss bei der Betrachtung auch das jeweilige Konfidenzintervall berücksichtigt werden. Dieses zeigt für beide Krankheiten eine starke Streuung, was die Aussagekraft der Odds Ratios relativiert, wobei festzuhalten ist, dass das Konfidenzintervall für beide Krankheiten in einem Bereich > 1 lag. Breite Konfidenzintervalle deuten auf einen geringen Stichprobenumfang, niedrige MAFs oder eine starke Variabilität in der Grundgesamtheit hin. Somit kann die hohe Streuung der beobachteten Konfidenzintervalle in der vorliegenden Arbeit möglicherweise auf die kleinen Studienpopulationen bzw. die niedrige MAF zurückgeführt werden. Dies zeigte auch die Genotypisierung des mit rs17030881 im LD liegenden rs2301462 in dem CARDIoGRAM Datensatz. Das Odds Ratio lag hier bei 1,04 und zeigte ein enges Konfidenzintervall (1,02-1,07).

Studiendesign der durchgeführten genetischen Assoziationsstudien

Generell weisen die in der Arbeit dargelegten genetischen Krankheitsassoziationen p-Werte auf, die weitaus über dem Schwellenwert für eine genomweite Signifikanz liegen. Die statistische Teststärke, die die Identifizierung krankheitsassoziierter Varianten erlaubt, ist abhängig von der Stichprobenzahl, dem Ausmaß des genetischen Risikos (dargestellt durch das Odds Ratio) und der Allelfrequenz des Risikoallels in der untersuchten Population. Bei GWAS werden viele Hypothesen gleichzeitig getestet, wodurch das Risiko falsch positiver Befunde mit der Anzahl der simultan getesteten Nullhypothesen steigt. Um dieses Problem zu lösen wird ein jeder assoziierter SNP mittels Bonferroni-Korrektur für multiples Testen korrigiert, um eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ zu gewährleisten. Entsprechend werden durch GWAS identifizierte krankheitsassoziierte Varianten dem Selektionskriterium

eines p-Wertes von 5×10^{-8} unterworfen, um die Möglichkeit falsch positiver Befunde zu minimieren. Aufgrund dessen weisen die meisten durch GWAS identifizierten Risikovarianten einen starken Effekt bei hoher Allelfrequenz auf, da sich dieses in einer hohen statistischen Teststärke niederschlägt (Iles, 2008). Konsequenterweise sind GWAS gut dazu geeignet, häufige Risikovarianten zu identifizieren, während für die Identifizierung von seltenen Risikovarianten die Studienpopulation stark vergrößert werden muss um die benötigte statistische Signifikanz zu erreichen. Durch den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Ansatz einer Kandidatengenstudie konnten die genannten Nachteile einer GWAS umgangen werden. Beispielsweise lieferte die Assoziation in der genetischen Region um *VAMP3* in dem AgP Datensatz eine Hypothese. Diese wurde nachfolgend in der KHK Population überprüft und stellte sich als signifikant heraus. Abschließend wurde diese eine Assoziation in dem CARDIoGRAM Datensatz repliziert. Da nur ein SNP in der Replikation betrachtet wurde, musste auch nur um den Faktor 1 korrigiert werden. Aufgrund der begrenzten Anzahl der getesteten SNPs wurden so auch seltene Risikovarianten mit einer Allelfrequenz von 0,27% im Fall von rs17030881 bzw. 9,20% im Fall von rs10864294 identifiziert. Durch die Bonferroni-Korrektur wird die Teststärke weiterhin gesenkt, was sich vor allem bei Analysen kleiner Studienpopulationen bemerkbar machen kann. Eine kleine Stichprobenzahl ist anfälliger für statistische Fehler, da stochastische Schwankungen das Ergebnis beeinflussen können, welche hingegen bei großen Stichprobenzahlen ausgeglichen werden. Neben der Bonferroni-Korrektur ist die Replikation einer Risikovariante in einer unabhängigen Fall-Kontroll Population der Goldstandard um Typ I Fehler auszuschließen. Die in der vorliegenden Studie krankheitsassoziierten Varianten wurden aus diesem Grund in mindestens einer weiteren unabhängigen Population repliziert.

5. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte neben dem bekannten *cis*-regulatorischen Einfluss der *ANRIL* Transkripte auch ein *trans*-regulatorischer Einfluss der kurzen Spleißvarianten nachgewiesen werden. Die Gene *ADIPOR1*, *C11ORF10* und *VAMP3* zeigten die stärksten Expressionsänderungen nach knockdown der kurzen *ANRIL* Transkripte. Für *ADIPOR1* und *VAMP3* ist eine Rolle im Fett- und Glukosestoffwechsel gut beschrieben, während die Funktion von *C11ORF10* bislang nicht charakterisiert ist. Die beschriebenen genetischen Assoziationen mit veränderten Phospholipid- und Sphingolipidspiegeln lassen jedoch auch eine Rolle des *C11ORF10* Genproduktes bei dem Fettstoffwechsel vermuten. Die Bedeutung des Fett- und Glukosespiegels ist bei der Entwicklung der Atherosklerose gut dokumentiert, während ihre Bedeutung bei der Entwicklung der Parodontitis zurzeit diskutiert wird. Interessanterweise lässt sich auch eine direkte Verbindung zwischen Entzündungen und metabolischen Störungen herstellen (Hotamisligil, 2006). In diesem Zusammenhang kommt dem Adiponektin mit seiner entzündungshemmenden Wirkung eine gewichtige Bedeutung zu.

Die Einordnung der regulierten Gene in biologische Prozesse zeigte eine Anreicherung von Genen, die bei der Ossifikation während der Knochenreifung eine Rolle spielen. Die dem Prozess zugeordneten Gene spielen nicht nur während der Knochenreifung eine Rolle, sondern sind auch wichtige Vermittler der Knochenhomöostase, einem Prozess, der bei dem durch Parodontitis verursachten Abbau des Alveolarknochens gestört ist. Darüber hinaus ist auch eine Beteiligung der entsprechenden Genprodukte bei der Einlagerung von Calciumsalzen in die arterielle Wand gut beschrieben. Eine systematische Nachverfolgung dieser Gene in kommenden Studien erscheint aus diesen Gründen sinnvoll.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Expressionsdynamik spezifischer Gene mit der Expression der *ANRIL* Transkripte EU741058 and DQ485454 korreliert und diese Effekte durch molekularbiologische Methoden in verschiedenen Zelltypen auf Transkriptions- und Translationsebene verifiziert. Aufgrund des Vorhandenseins einer Bindestelle des Transkriptionsfaktors PITX2 in allen drei der beschriebenen Gene lässt sich im Gegensatz zur *ANRIL* vermittelten *cis*-Regulation des Gens *CDKN2B* eine transkriptionsfaktorvermittelte Regulation vermuten, wie sie auch schon für andere lncRNAs beschrieben ist. Diese Hypothese muß in zukünftigen Arbeiten durch die Identifizierung *ANRIL* bindender Transkriptionsfaktoren bestätigt werden. Ferner bleibt

offen, ob einzelne, distinkte Spleißvarianten spezifische Gene regulieren. Die Überexpressionsexperimente mit EU741058 zeigten nur eine Expressionsänderung von *CI1ORF10*, während die Expression der anderen, durch den knockdown aller kurzen Spleißvarianten regulierten Gene durch die Überexpression nicht beeinflusst wurde. Das Vorkommen verschiedener Spleißvarianten in verschiedenen Geweben wurde bereits in mehreren Studien beschrieben. Daher ist davon auszugehen, dass die in dieser Arbeit identifizierten Gene nicht das vollständige Spektrum der durch die kurzen *ANRIL* Spleißvarianten regulierten Gene abbilden. Es wäre möglich, dass andere kurze Spleißvarianten, die nicht in HEK293 Zellen vorkommen, ein anderes Spektrum nachgeschalteter Gene regulieren. Ferner sind unterschiedliche Haplotyp-Blöcke im *ANRIL* Gen mit einer erhöhten Prädisposition zu anderen Krankheiten wie bspw. Diabetes und verschiedenen Krebsformen assoziiert. Eine systematische Aufklärung des gesamten Spektrums der Transkripte, die durch diese Varianten moduliert werden, und die nachfolgende Charakterisierung ihrer biologischen Funktion können in weiterführenden Studien zu der Identifizierung regulatorischer Netzwerke führen, welche eine Rolle bei der Ätiologie dieser Krankheiten spielen. In diesem Zusammenhang ist auch die Identifizierung der durch die langen *ANRIL* Spleißvarianten regulierten Gene sinnvoll.

6 Zusammenfassung

Die lange nicht kodierende RNA *ANRIL* ist die am besten replizierte Risikoregion der Atherosklerose und Parodontitis. Darüber hinaus weist dieser Genort unabhängige Assoziationen sowohl zu weiteren immunvermittelten und metabolischen Krankheiten, als auch zu verschiedenen Krebsformen auf. *ANRIL* zeigt einen *cis*-regulatorischen Einfluss auf die Tumorsuppressorgene "Cyclin abhängige Kinase" 2A (*CDKN2A*) und 2B (*CDKN2B*). Wie genau verschiedene Varianten dieser gewebspezifisch, alternativ gespleißten lncRNA zu unterschiedlichen Krankheitsausprägungen führen war jedoch bisher kaum verstanden. Verschiedene Studien konnten eine verminderte Konzentration der kurzen *ANRIL* Transkripte in homozygoten Trägern des mit Atherosklerose und Parodontitis assoziierten Risiko-Haplotyps nachweisen. Um die Funktion dieser Transkripte in der Manifestation beider Krankheiten zu untersuchen wurde ein induzierbares, stabiles shRNA Zellsystem verwendet. Durch die genomweite Expressionsprofilierung konnte eine zeitabhängige, mit der verminderten *ANRIL* Expression korrelierende Transkriptionsänderung von *ADIPOR1*, *VAMP3* und *C11ORF10* nachgewiesen werden. Die Untersuchung der identifizierten Gene auf das Vorhandensein von krankheitsassoziierten Varianten zeigte eine Assoziation mit einem erhöhten Risiko für Atherosklerose [rs10864294 P = 0.015, Odds Ratio (OR) = 1.30, 95% Konfidenzintervall (CI) = 1.1-1.6, 1471 Fälle, 2737 Kontrollen] und aggressive Parodontitis (AgP; P = 0.008, OR = 1.31, 95% CI = 1.1-1.6, 864 Fälle, 3664 Kontrollen) in dem stromaufwärts von *VAMP3* gelegenen *CAMTA1* Gen. Diese Assoziation konnte durch den mit rs10864294 im gleichen Haplotyp liegenden rs2301462 in einer Metaanalyse, bestehend aus 14 genomweiten Assoziationsstudien der Atherosklerose (CARDIoGRAM), *in silico* repliziert werden (P = 0.001). Zusätzlich zeigte ein Haplotyp-Block über *C11ORF10* und den *FADS* Gen-Cluster, welcher genomweit mit verschiedenen metabolischen- und Entzündungskrankheiten assoziiert ist, eine Assoziation mit aggressiver Parodontitis ($p_{\text{allelisch}} = 0.016$, Odds Ratio [OR] = 0.84, 95% C.I. = 0.72-0.98), jedoch nicht mit Atherosklerose. Die Ergebnisse der Arbeit lassen eine Rolle spezifischer *ANRIL* Varianten bei der Regulation von Schlüsselgenen des Glukose- und Fettsäure-Metabolismus vermuten.

7 Summary

The non-coding RNA *ANRIL* is the best replicated genetic risk locus of coronary artery disease (CAD) and periodontitis, and independently associated with a variety of other immune-mediated and metabolic disorders, and several forms of cancer. *ANRIL* *cis*-regulates the expression of the tumour suppressor genes cyclin-dependent kinase 2A (*CDKN2A*) and 2B (*CDKN2B*). However, how variants of this tissue specific and alternatively spliced lncRNA translate into different disease manifestations is currently unknown. Several studies showed a correlation of decreased concentrations of short *ANRIL* transcripts with homozygous carriership of the CAD and PD main risk alleles. To elucidate the relation of these transcripts to disease manifestation, a short hairpin RNA targeting the short *ANRIL* transcripts was constructed in a stable inducible knockdown cell system. By genome-wide expression profiling, the transcription of *ADIPOR1*, *VAMP3* and *C11ORF10* was identified to be correlated with decreased *ANRIL* expression in a time-dependent manner. Exploration of the identified genes for the presence of disease associated variants, highlighted a region upstream of *VAMP3* within *CAMTA1* to be associated with increased risk of CAD [rs10864294 P = 0.015, odds ratio (OR) = 1.30, 95% confidence interval (CI) = 1.1-1.6, 1471 cases, 2737 controls] and aggressive periodontitis (AgP; P = 0.008, OR = 1.31, 95% CI = 1.1-1.6, 864 cases, 3664 controls). *In silico* replication in a meta-analysis of 14 genome-wide association studies of CAD of the CARDIoGRAM Consortium identified rs2301462, located on the same haplotype block, as associated with P = 0.001. Additionally, a haplotype block spanning *C11ORF10* and the *FADS* gene cluster, which is genomewide associated with various metabolic and inflammatory diseases, gave evidence for association with aggressive periodontitis ($p_{\text{allelic}} = 0.016$, odds ratio [OR] = 0.84, 95% C.I. = 0.72-0.98), but not with CAD. The results give evidence that specific isoforms of *ANRIL* regulate key genes of glucose and fatty acid metabolism.

Literaturverzeichnis

- (2003). Whither RNAi? *Nat Cell Biol* 5, 489-490.
- Abbas, F., van der Velden, U., Moorer, W.R., Everts, V., Vroom, T.M., and Scholte, G. (1986). Experimental gingivitis in relation to susceptibility to periodontal disease. II. Phase-contrast microbiological features and some host-response observations. *J Clin Periodontol* 13, 551-557.
- Agger, K., Cloos, P.A., Christensen, J., Pasini, D., Rose, S., Rappsilber, J., Issaeva, I., Canaani, E., Salcini, A.E., and Helin, K. (2007). UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449, 731-734.
- Ainamo, J., Lahtinen, A., and Uitto, V.J. (1990). Rapid periodontal destruction in adult humans with poorly controlled diabetes. A report of 2 cases. *J Clin Periodontol* 17, 22-28.
- Al-Zahrani, M.S., Bissada, N.F., and Borawski, E.A. (2003). Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. *Journal of periodontology* 74, 610-615.
- Albandar, J.M., Brown, L.J., and Loe, H. (1997). Clinical features of early-onset periodontitis. *J Am Dent Assoc* 128, 1393-1399.
- Amar, S., Gokce, N., Morgan, S., Loukideli, M., Van Dyke, T.E., and Vita, J.A. (2003). Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 1245-1249.
- Amendt, B.A., Sutherland, L.B., Semina, E.V., and Russo, A.F. (1998). The Molecular Basis of Rieger Syndrome ANALYSIS OF PITX2 HOMEODOMAIN PROTEIN ACTIVITIES. *Journal of Biological Chemistry* 273, 20066-20072.
- Armitage, G.C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4, 1-6.
- Aronson, D., and Rayfield, E.J. (2002). How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovascular Diabetology* 1, 1.
- Ashhab, Y., Alian, A., Polliack, A., Panet, A., and Yehuda, D.B. (2001). Two splicing variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern. *FEBS letters* 495, 56-60.
- Aviram, M. (1995). LDL-platelet interaction under oxidative stress induces macrophage foam cell formation. *Thrombosis and haemostasis* 74, 560.
- Bahekar, A.A., Singh, S., Saha, S., Molnar, J., and Arora, R. (2007). The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. *Am Heart J* 154, 830-837.
- Bajno, L., Peng, X.-R., Schreiber, A.D., Moore, H.-P., Trimble, W.S., and Grinstein, S. (2000). Focal exocytosis of VAMP3-containing vesicles at sites of phagosome formation. *The Journal of cell biology* 149, 697-706.
- Barbashina, V., Salazar, P., Holland, E.C., Rosenblum, M.K., and Ladanyi, M. (2005). Allelic losses at 1p36 and 19q13 in gliomas: correlation with histologic classification, definition of a 150-kb minimal deleted region on 1p36, and evaluation of CAMTA1 as a candidate tumor suppressor gene. *Clinical cancer research* 11, 1119-1128.
- Baumert, M., Maycox, P.R., Navone, F., De Camilli, P., and Jahn, R. (1989). Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *EMBO J* 8, 379-384.
- Beckman, J.A., Creager, M.A., and Libby, P. (2002). Diabetes and atherosclerosis. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 287, 2570-2581.
- Bei, J.-X., Li, Y., Jia, W.-H., Feng, B.-J., Zhou, G., Chen, L.-Z., Feng, Q.-S., Low, H.-Q., Zhang, H., and He, F. (2010). A genome-wide association study of nasopharyngeal carcinoma identifies three new susceptibility loci. *Nature genetics* 42, 599-603.
- Beissbarth, T., and Speed, T.P. (2004). Gostat: find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes. *Bioinformatics* 20, 1464-1465.

- Beltran, M., Puig, I., Peña, C., García, J.M., Álvarez, A.B., Peña, R., Bonilla, F., and de Herreros, A.G. (2008). A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial–mesenchymal transition. *Genes & development* 22, 756-769.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*, 289-300.
- Bertone, P., Stolc, V., Royce, T.E., Rozowsky, J.S., Urban, A.E., Zhu, X., Rinn, J.L., Tongprasit, W., Samanta, M., and Weissman, S. (2004). Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science* 306, 2242-2246.
- Birney, E., Stamatoyannopoulos, J.A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T.R., Margulies, E.H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E.T., and Thurman, R.E. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447, 799-816.
- Bobik, A., Agrotis, A., Kanellakis, P., Dille, R., Krushinsky, A., Smirnov, V., Tararak, E., Condrón, M., and Kostolias, G. (1999). Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation* 99, 2883-2891.
- Bodine, P., and Komm, B. (1999). Evidence that conditionally immortalized human osteoblasts express an osteocalcin receptor. *Bone* 25, 535-543.
- Bornemisza, P., Major, G., Suci, I., and Major, I. (1981). Cigarette smoking as a risk factor for atherosclerosis. Study of the biologic changes consecutive to smoking in normals, in patients with coronary heart disease and in diabetics. *Med Interne* 19, 251-258.
- Bornfeldt, K.E., and Tabas, I. (2011). Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell metabolism* 14, 575-585.
- Bouché, N., Scharlat, A., Snedden, W., Bouchez, D., and Fromm, H. (2002). A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21851-21861.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423, 337-342.
- Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L., and Iggo, R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 34, 263-264.
- Broadbent, H.M., Peden, J.F., Lorkowski, S., Goel, A., Ongen, H., Green, F., Clarke, R., Collins, R., Franzosi, M.G., and Tognoni, G. (2008). Susceptibility to coronary artery disease and diabetes is encoded by distinct, tightly linked SNPs in the ANRIL locus on chromosome 9p. *Human molecular genetics* 17, 806-814.
- Brookes, A.J. (1999). The essence of SNPs. *Gene* 234, 177-186.
- Brookes, S., Rowe, J., Ruas, M., Llanos, S., Clark, P.A., Lomax, M., James, M.C., Vatcheva, R., Bates, S., and Vousden, K.H. (2002). INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence. *The EMBO journal* 21, 2936-2945.
- Brown, K.M., Chu, C.-y., and Rana, T.M. (2005). Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nature structural & molecular biology* 12, 469-470.
- Bucher, H.C., Hengstler, P., Schindler, C., and Meier, G. (2002). N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American journal of medicine* 112, 298-304.
- Bullon, P., Goberna, B., Guerrero, J.M., Segura, J.J., Perez-Cano, R., and Martínez-Sahuquillo, A. (2005). Serum, saliva, and gingival crevicular fluid osteocalcin: their relation to periodontal status and bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of periodontology* 76, 513-519.
- Burd, C.E., Jeck, W.R., Liu, Y., Sanoff, H.K., Wang, Z., and Sharpless, N.E. (2010). Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk. *PLoS genetics* 6, e1001233.
- Caetano-Lopes, J., Canhao, H., and Fonseca, J.E. (2007). Osteoblasts and bone formation. *Acta reumatológica portuguesa* 32, 103.

- Calvo, M.S., Eyre, D.R., and Gundberg, C.M. (1996). Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrine reviews* 17, 333-368.
- Camejo, G., Hurt-Camejo, E., Wiklund, O., and Bondjers, G. (1998a). Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 139, 205-222.
- Camejo, G., Hurt-Camejo, E., Wiklund, O., and Bondjers, G. (1998b). Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 139, 205-222.
- Carlborg, Ö., and Haley, C.S. (2004). Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nature Reviews Genetics* 5, 618-625.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., and Wells, C. (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559-1563.
- Ceddia, R., Somwar, R., Maida, A., Fang, X., Bikopoulos, G., and Sweeney, G. (2005). Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia* 48, 132-139.
- Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., and Helt, G. (2005). Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308, 1149-1154.
- Chenu, C., Colucci, S., Grano, M., Zigrino, P., Barattolo, R., Zambonin, G., Baldini, N., Vergnaud, P., Delmas, P., and Zallone, A. (1994). Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *The Journal of cell biology* 127, 1149-1158.
- Cho, H.P., Nakamura, M., and Clarke, S.D. (1999a). Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem* 274, 37335-37339.
- Cho, H.P., Nakamura, M.T., and Clarke, S.D. (1999b). Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. *J Biol Chem* 274, 471-477.
- Collins, F.S., Guyer, M.S., and Charkravarti, A. (1997). Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278, 1580-1581.
- Congrains, A., Kamide, K., Oguro, R., Yasuda, O., Miyata, K., Yamamoto, E., Kawai, T., Kusunoki, H., Yamamoto, H., and Takeya, Y. (2012). Genetic variants at the 9p21 locus contribute to atherosclerosis through modulation of ANRIL and *CDKN2A/B*. *Atherosclerosis* 220, 449-455.
- Cortes, A., and Brown, M.A. (2011). Promise and pitfalls of the Immunochip. *Arthritis research & therapy* 13, 101.
- Cox, C.J., Espinoza, H.M., McWilliams, B., Chappell, K., Morton, L., Hjalt, T.A., Semina, E.V., and Amendt, B.A. (2002). Differential regulation of gene expression by PITX2 isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25001-25010.
- Cugino, D., Gianfagna, F., Santimone, I., de Gaetano, G., Donati, M., Iacoviello, L., and Di Castelnuovo, A. (2011). Type 2 diabetes and polymorphisms on chromosome 9p21: A meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*.
- Cunnington, M.S., Koref, M.S., Mayosi, B.M., Burn, J., and Keavney, B. (2010). Chromosome 9p21 SNPs associated with multiple disease phenotypes correlate with ANRIL expression. *PLoS genetics* 6, e1000899.
- Cutler, C.W., and Jotwani, R. (2004). Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. *Periodontology 2000* 35, 135-157.
- Dahlöf, B. (2010). Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *The American journal of cardiology* 105, 3A-9A.
- Daly, M.J., Rioux, J.D., Schaffner, S.F., Hudson, T.J., and Lander, E.S. (2001). High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nature genetics* 29, 229-232.
- Davies, M.J. (1996). Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* 94, 2013-2020.

- Deloukas, P., Kanoni, S., Willenborg, C., Farrall, M., Assimes, T.L., Thompson, J.R., Ingelsson, E., Saleheen, D., Erdmann, J., and Goldstein, B.A. (2012). Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nature genetics*.
- Deloukas, P., Kanoni, S., Willenborg, C., Farrall, M., Assimes, T.L., Thompson, J.R., Ingelsson, E., Saleheen, D., Erdmann, J., Goldstein, B.A., *et al.* (2013). Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet* *45*, 25-33.
- Demirkan, A., van Duijn, C.M., Ugocsai, P., Isaacs, A., Pramstaller, P.P., Liebisch, G., Wilson, J.F., Johansson, A., Rudan, I., Aulchenko, Y.S., *et al.* (2012). Genome-wide association study identifies novel loci associated with circulating phospho- and sphingolipid concentrations. *PLoS Genet* *8*, e1002490.
- Dempfle, A., Scherag, A., Hein, R., Beckmann, L., Chang-Claude, J., and Schäfer, H. (2008). Gene-environment interactions for complex traits: definitions, methodological requirements and challenges. *European Journal of Human Genetics* *16*, 1164-1172.
- Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* *425*, 577-584.
- Devlin, B., and Risch, N. (1995). A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* *29*, 311-322.
- Dhore, C.R., Cleutjens, J.P., Lutgens, E., Cleutjens, K.B., Geusens, P.P., Kitslaar, P.J., Tordoir, J.H., Spronk, H.M., Vermeer, C., and Daemen, M.J. (2001). Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *21*, 1998-2003.
- Divaris, K., Monda, K., North, K., Olshan, A., Lange, E., Moss, K., Barros, S., Beck, J., and Offenbacher, S. (2012). Genome-wide association study of periodontal pathogen colonization. *Journal of dental research* *91*, S21-S28.
- Doherty, T.M., Fitzpatrick, L.A., Inoue, D., Qiao, J.-H., Fishbein, M.C., Detrano, R.C., Shah, P.K., and Rajavashisth, T.B. (2004). Molecular, endocrine, and genetic mechanisms of arterial calcification. *Endocrine reviews* *25*, 629-672.
- Doria, A., Wojcik, J., Xu, R., Gervino, E.V., Hauser, T.H., Johnstone, M.T., Nolan, D., Hu, F.B., and Warram, J.H. (2008). Interaction between poor glycemic control and 9p21 locus on risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *JAMA: the journal of the American Medical Association* *300*, 2389-2397.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N., and Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *3*, 195-205.
- Dubnau, J., and Struhl, G. (1996). RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein.
- Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., and Gundersen, C. (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice.
- Dupuis, J., Langenberg, C., Prokopenko, I., Saxena, R., Soranzo, N., Jackson, A.U., Wheeler, E., Glazer, N.L., Bouatia-Naji, N., Gloyn, A.L., *et al.* (2010). New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet* *42*, 105-116.
- Dzau, V.J., Braun-Dullaeus, R.C., and Sedding, D.G. (2002). Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nature medicine* *8*, 1249-1256.
- Ebersole, J.L. (2003). Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontology 2000* *31*, 135-166.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* *26*, 199-213.
- Elter, J.R., Hinderliter, A.L., Offenbacher, S., Beck, J.D., Caughey, M., Brodala, N., and Madianos, P.N. (2006). The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: a pilot trial. *American heart journal* *151*, 47. e41-47. e46.

- Emanuele, E., Lista, S., Ghidoni, R., Binetti, G., Cereda, C., Benussi, L., Maletta, R., Bruni, A.C., and Politi, P. (2011). Chromosome 9p21. 3 genotype is associated with vascular dementia and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging* 32, 1231-1235.
- Eriksson, E.E., Xie, X., Werr, J., Thoren, P., and Lindbom, L. (2001). Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *The Journal of experimental medicine* 194, 205-218.
- Ernst, F.D., Uhr, K., Teumer, A., Fanghanel, J., Schulz, S., Noack, B., Gonzales, J., Reichert, S., Eickholz, P., Holtfreter, B., *et al.* (2010). Replication of the association of chromosomal region 9p21.3 with generalized aggressive periodontitis (gAgP) using an independent case-control cohort. *BMC Med Genet* 11, 119.
- Falk, E., Shah, P.K., and Fuster, V. (1995). Coronary plaque disruption. *Circulation* 92, 657-671.
- Fiehn, N.-E., Larsen, T., Christiansen, N., Holmstrup, P., and Schroeder, T.V. (2005). Identification of periodontal pathogens in atherosclerotic vessels. *Journal of periodontology* 76, 731-736.
- Fitzpatrick, L., Severson, A., Edwards, W., and Ingram, R. (1994). Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 94, 1597.
- Folkersen, L., Kyriakou, T., Goel, A., Peden, J., Mälarstig, A., Paulsson-Berne, G., Hamsten, A., Franco-Cereceda, A., Gabrielsen, A., and Eriksson, P. (2009). Relationship between CAD risk genotype in the chromosome 9p21 locus and gene expression. Identification of eight new ANRIL splice variants. *PLoS One* 4, e7677.
- Franke, A., McGovern, D.P., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., *et al.* (2010). Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 42, 1118-1125.
- Frost, H.M. (1986). *Intermediary organization of the skeleton* (CRC Press Boca Raton).
- Frost, S.J., Simpson, D.J., Clayton, R.N., and Farrell, W.E. (1999). Transfection of an inducible p16/CDKN2A construct mediates reversible growth inhibition and G1 arrest in the AtT20 pituitary tumor cell line. *Molecular Endocrinology* 13, 1801-1810.
- Frostegård, J., Ulfgren, A.-K., Nyberg, P., Hedin, U., Swedenborg, J., Andersson, U., and Hansson, G.K. (1999). Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* 145, 33-43.
- Fu, Y., Luo, N., Klein, R.L., and Garvey, W.T. (2005). Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *Journal of lipid research* 46, 1369-1379.
- Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., and Faggart, M. (2002). The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296, 2225-2229.
- Gao, Y., Grassi, F., Ryan, M.R., Terauchi, M., Page, K., Yang, X., Weitzmann, M.N., and Pacifici, R. (2007). IFN- γ stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *Journal of Clinical Investigation* 117, 122-132.
- Giannobile, W.V., Lynch, S.E., Denmark, R.G., Paquette, D.W., Fiorellini, J.P., and Williams, R.C. (1995). Crevicular fluid osteocalcin and pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) as markers of rapid bone turnover in periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 22, 903-910.
- Gössl, M., Mödder, U.I., Atkinson, E.J., Lerman, A., and Khosla, S. (2008). Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* 52, 1314-1325.
- Graves, D., and Cochran, D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of periodontology* 74, 391-401.
- Graves, D.T., Fine, D., Teng, Y.T., Van Dyke, T.E., and Hajishengallis, G. (2008). The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 35, 89-105.

- Gupta, R.A., Shah, N., Wang, K.C., Kim, J., Horlings, H.M., Wong, D.J., Tsai, M.-C., Hung, T., Argani, P., and Rinn, J.L. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 464, 1071-1076.
- Haber, J., Wattles, J., Crowley, M., Mandell, R., Joshipura, K., and Kent, R.L. (1993). Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol* 64, 16-23.
- Hackett, D., Davies, G., and Maseri, A. (1988). Pre-existing coronary stenoses in patients with first myocardial infarction are not necessarily severe. *European heart journal* 9, 1317-1323.
- Hajishengallis, G., Wang, M., and Liang, S. (2009). Induction of distinct TLR2-mediated proinflammatory and proadhesive signaling pathways in response to *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *The Journal of Immunology* 182, 6690-6696.
- Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., et al. (2007). A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 39, 207-211.
- Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371, 257-261.
- Hansson, G.K., and Libby, P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nature Reviews Immunology* 6, 508-519.
- Harismendy, O., Notani, D., Song, X., Rahim, N.G., Tanasa, B., Heintzman, N., Ren, B., Fu, X.-D., Topol, E.J., and Rosenfeld, M.G. (2011). 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-[ggr] signalling response. *Nature* 470, 264-268.
- Hauschka, P., Lian, J., Cole, D., and Gundberg, C. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews* 69, 990-1047.
- He, Y., Vogelstein, B., Velculescu, V.E., Papadopoulos, N., and Kinzler, K.W. (2008). The antisense transcriptomes of human cells. *Science* 322, 1855-1857.
- Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471.
- Helgadottir, A., Thorleifsson, G., Manolescu, A., Gretarsdottir, S., Blondal, T., Jonasdottir, A., Sigurdsson, A., Baker, A., Palsson, A., Masson, G., et al. (2007). A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. *Science* 316, 1491-1493.
- Hellerbrand, C., Mühlbauer, M., Wallner, S., Schuierer, M., Behrmann, I., Bataille, F., Weiss, T., Schölmerich, J., and Bosserhoff, A.-K. (2005). Promoter-hypermethylation is causing functional relevant downregulation of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 27, 64-72.
- Henrich, K.-O., Fischer, M., Mertens, D., Benner, A., Wiedemeyer, R., Brors, B., Oberthuer, A., Berthold, F., Wei, J.S., and Khan, J. (2006). Reduced expression of CAMTA1 correlates with adverse outcome in neuroblastoma patients. *Clinical cancer research* 12, 131-138.
- Herzberg, M.C., Brintzenhofe, K., and Clawson, C. (1983). Aggregation of human platelets and adhesion of *Streptococcus sanguis*. *Infection and immunity* 39, 1457-1469.
- Hill, W., and Robertson, A. (1968). Linkage disequilibrium in finite populations. *Theoretical and Applied Genetics* 38, 226-231.
- Hindorff, L.A., Sethupathy, P., Junkins, H.A., Ramos, E.M., Mehta, J.P., Collins, F.S., and Manolio, T.A. (2009). Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 9362-9367.
- Holdt, L.M., Beutner, F., Scholz, M., Gielen, S., Gäbel, G., Bergert, H., Schuler, G., Thiery, J., and Teupser, D. (2010). ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30, 620-627.
- Holliday, R., and Grigg, G.W. (1993). DNA methylation and mutation. *Mutat Res* 285, 61-67.
- Holmberg, J., Clarke, D.L., and Frisén, J. (2000). Regulation of repulsion versus adhesion by different splice forms of an Eph receptor. *Nature* 408, 203-206.

- Holt, S.C., and Ebersole, J.L. (2005). Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology* 2000 38, 72-122.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., *et al.* (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314, 994-997.
- Hotamisligil, G.S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867.
- Hovanessian, A.G., and Justesen, J. (2007). The human 2'-5' oligoadenylate synthetase family: unique interferon-inducible enzymes catalyzing 2'-5' instead of 3'-5' phosphodiester bond formation. *Biochimie* 89, 779-788.
- Hsu, H., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., Tan, H.-L., Elliott, G., Kelley, M.J., and Sarosi, I. (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 3540-3545.
- Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B.M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *Journal of Biological Chemistry* 271, 10697-10703.
- Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M.J., Kenzelmann-Broz, D., Khalil, A.M., Zuk, O., Amit, I., Rabani, M., *et al.* (2010). A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* 142, 409-419.
- Hugoson, A., Sjodin, B., and Norderyd, O. (2008). Trends over 30 years, 1973-2003, in the prevalence and severity of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 35, 405-414.
- Humphrey, L.L., Buckley, D.I., Freeman, M., and Mark Helfand MD, M. (2008). Periodontal disease and coronary heart disease incidence: a systematic review and meta-analysis. *Journal of General Internal Medicine* 23, 2079-2086.
- Hung, T., Wang, Y., Lin, M.F., Koegel, A.K., Kotake, Y., Grant, G.D., Horlings, H.M., Shah, N., Umbricht, C., and Wang, P. (2011). Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nature genetics* 43, 621-629.
- Iles, M.M. (2008). What can genome-wide association studies tell us about the genetics of common disease? *PLoS Genet* 4, e33.
- International Human Genome Sequencing, C. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.
- Iwabu, M., Yamauchi, T., Okada-Iwabu, M., Sato, K., Nakagawa, T., Funata, M., Yamaguchi, M., Namiki, S., Nakayama, R., Tabata, M., *et al.* (2010). Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1. *Nature* 464, 1313-1319.
- Jarinova, O., Stewart, A.F., Roberts, R., Wells, G., Lau, P., Naing, T., Buerki, C., McLean, B.W., Cook, R.C., and Parker, J.S. (2009). Functional analysis of the chromosome 9p21. 3 coronary artery disease risk locus. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 1671-1677.
- Jie, K.-S.G., Bots, M.L., Vermeer, C., Witteman, J., and Grobbee, D.E. (1995). Vitamin K intake and osteocalcin levels in women with and without aortic atherosclerosis: a population-based study. *Atherosclerosis* 116, 117-123.
- Johnson, R.C., Leopold, J.A., and Loscalzo, J. (2006). Vascular calcification pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circulation Research* 99, 1044-1059.
- Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., and Hansson, G.K. (1986). Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 6, 131-138.
- Jormsjö, S., Wuttge, D.M., Sirsjö, A., Whatling, C., Hamsten, A., Stemme, S., and Eriksson, P. (2002). Differential expression of cysteine and aspartic proteases during progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of pathology* 161, 939-945.
- Karpala, A.J., Doran, T.J., and Bean, A.G. (2005). Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies. *Immunol Cell Biol* 83, 211-216.

- Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C., Suzuki, M., and Kawai, J. (2005). Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309, 1564-1566.
- Kauppi, L., Sajantila, A., and Jeffreys, A.J. (2003). Recombination hotspots rather than population history dominate linkage disequilibrium in the MHC class II region. *Human molecular genetics* 12, 33-40.
- Kebschull, M., Demmer, R., and Papapanou, P. (2010). "Gum bug, leave my heart alone!"—epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *Journal of dental research* 89, 879-902.
- Kesavalu, L., Bakthavatchalu, V., Rahman, M., Su, J., Raghu, B., Dawson, D., Fernandes, G., and Ebersole, J. (2007). Omega-3 fatty acid regulates inflammatory cytokine/mediator messenger RNA expression in *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontal disease. *Oral microbiology and immunology* 22, 232-239.
- Khalil, A.M., and Rinn, J.L. (2011). RNA–protein interactions in human health and disease. Paper presented at: Seminars in cell & developmental biology (Elsevier).
- Khoo, J.C., Miller, E., Pio, F., Steinberg, D., and Witztum, J.L. (1992). Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 12, 1258-1266.
- Kino, T., Hurt, D.E., Ichijo, T., Nader, N., and Chrousos, G.P. (2010). Noncoding RNA gas5 is a growth arrest-and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Science Signaling* 3, ra8.
- Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M., and Xiong, Y. (2010). Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15INK4B tumor suppressor gene. *Oncogene* 30, 1956-1962.
- Kovanen, P.T., Kaartinen, M., and Paavonen, T. (1995). Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation* 92, 1084-1088.
- Kozarov, E.V., Dorn, B.R., Shelburne, C.E., Dunn, W.A., and Progulske-Fox, A. (2005). Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, e17-e18.
- Kraus, D., Winter, J., Jepsen, S., Jager, A., Meyer, R., and Deschner, J. (2012). Interactions of adiponectin and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on human oral epithelial cells. *PLoS One* 7, e30716.
- Krawczak, M., Nikolaus, S., von Eberstein, H., Croucher, P.J., El Mokhtari, N.E., and Schreiber, S. (2006). PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships. *Community Genet* 9, 55-61.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., and Satoh, H. (2002). Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 25863-25866.
- Kumar, P.S., Leys, E.J., Bryk, J.M., Martinez, F.J., Moeschberger, M.L., and Griffen, A.L. (2006). Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J Clin Microbiol* 44, 3665-3673.
- Kume, N., Cybulsky, M., and Gimbrone Jr, M. (1992). Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* 90, 1138.
- Kunimatsu, K., Mataka, S., Tanaka, H., Mine, N., Kiyoki, M., Hosoda, K., Kato, Y., and Kato, I. (1993). A cross-sectional study on osteocalcin levels in gingival crevicular fluid from periodontal patients. *Journal of periodontology* 64, 865-869.
- Lamster, I.B., and Ahlo, J.K. (2007). Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1098, 216-229.
- Lang, N., Bartold, P.M., Cullinan, M., Jeffcoat, M., Mombelli, A., Murakami, S., Page, R., Papapanou, P., Tonetti, M., and Dyke, T.V. (1999). Consensus report: aggressive periodontitis. *Annals of periodontology* 4, 53-53.

- Lehto, S., Niskanen, L., Suhonen, M., Rönnemaa, T., and Laakso, M. (1996). Medial artery calcification a neglected harbinger of cardiovascular complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 16, 978-983.
- Leitinger, N. (2003). Oxidized phospholipids as modulators of inflammation in atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* 14, 421.
- Lemaitre, R.N., Tanaka, T., Tang, W., Manichaikul, A., Foy, M., Kabagambe, E.K., Nettleton, J.A., King, I.B., Weng, L.C., Bhattacharya, S., *et al.* (2011). Genetic loci associated with plasma phospholipid n-3 fatty acids: a meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE Consortium. *PLoS Genet* 7, e1002193.
- Lewontin, R. (1988). On measures of gametic disequilibrium. *Genetics* 120, 849-852.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.
- Libby, P., and Aikawa, M. (2002). Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nature medicine* 8, 1257-1262.
- Libioulle, C., Louis, E., Hansoul, S., Sandor, C., Farnir, F., Franchimont, D., Vermeire, S., Dewit, O., De Vos, M., and Dixon, A. (2007). Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS genetics* 3, e58.
- Lindhe, J., Ranney, R., Lamster, I., Charles, A., Chung, C.-P., Flemmig, T., Kinane, D., Listgarten, M., Löe, H., and Schoor, R. (1999). Consensus report: chronic periodontitis. *Annals of periodontology* 4, 38-38.
- Listgarten, M.A. (1986). Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 13, 418-430.
- Liu, J., Sukhova, G.K., Sun, J.-S., Xu, W.-H., Libby, P., and Shi, G.-P. (2004). Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 24, 1359-1366.
- Lloyd-Jones, D.M. (2010). Cardiovascular Risk Prediction Basic Concepts, Current Status, and Future Directions. *Circulation* 121, 1768-1777.
- Loe, H., Anerud, A., Boysen, H., and Morrison, E. (1986). Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 13, 431-445.
- Löe, H., Theilade, E., and Jensen, S.B. (1965). Experimental gingivitis in man. *Journal of periodontology* 36, 177-187.
- Loos, B.G. (2005). Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J Periodontol* 76, 2106-2115.
- Loos, B.G., Craandijk, J., Hoek, F.J., Dillen, P.M.W.-v., and Velden, U.V.D. (2000). Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *Journal of periodontology* 71, 1528-1534.
- Lösche, W., Marshal, G., Krause, S., Kocher, T., and Kinane, D. (2005). Lipoprotein-associated phospholipase A2 and plasma lipids in patients with destructive periodontal disease. *Journal of clinical periodontology* 32, 640-644.
- Luo, X.-H., Guo, L.-J., Yuan, L.-Q., Xie, H., Zhou, H.-D., Wu, X.-P., and Liao, E.-Y. (2005). Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Experimental cell research* 309, 99-109.
- MacRae, C.A. (2011). Genetics primer for the general cardiologist. *Circulation* 123, 467-467.
- Malmgaard, L. (2004). Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 24, 439-454.
- Maniatis, T., and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416, 499-506.
- Marchini, J., Donnelly, P., and Cardon, L.R. (2005). Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nat Genet* 37, 413-417.
- Maris, J.M., Weiss, M.J., Guo, C., Gerbing, R.B., Stram, D.O., White, P.S., Hogarty, M.D., Sulman, E.P., Thompson, P.M., and Lukens, J.N. (2000). Loss of heterozygosity at 1p36 independently predicts for disease progression but not decreased overall survival probability in neuroblastoma patients: a Children's Cancer Group study. *Journal of clinical oncology* 18, 1888-1899.

- Martianov, I., Ramadass, A., Barros, A.S., Chow, N., and Akoulitchev, A. (2007). Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* *445*, 666-670.
- McGill Jr, H.C., McMahan, C.A., Herderick, E.E., Zieske, A.W., Malcom, G.T., Tracy, R.E., and Strong, J.P. (2002). Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation* *105*, 2712-2718.
- McLean, F.C., and Bloom, W. (1940). Calcification and ossification. Calcification in normal growing bone. *The Anatomical Record* *78*, 333-359.
- Mercanoglu, F., Oflaz, H., Öz, O., Gökbuget, A.Y., Genchellac, H., Sezer, M., Nisanci, Y., and Umman, S. (2004). Endothelial dysfunction in patients with chronic periodontitis and its improvement after initial periodontal therapy. *Journal of periodontology* *75*, 1694-1700.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., and Mattick, J.S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews Genetics* *10*, 155-159.
- Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J.M., Schneider, R., Peters, A.H., Gunther, T., Buettner, R., and Schule, R. (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* *437*, 436-439.
- Mitchell Guttman, I.A., Garber, M., French, C., Lin, M.F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B.W., Cassady, J.P., and Cabili, M.N. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* *458*, 223-227.
- Mizuno, A., Amizuka, N., Irie, K., Murakami, A., Fujise, N., Kanno, T., Sato, Y., Nakagawa, N., Yasuda, H., and Mochizuki, S.-i. (1998). Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochemical and biophysical research communications* *247*, 610-615.
- Mori, T.A., Bao, D.Q., Burke, V., Puddey, I.B., and Beilin, L.J. (1999). Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension* *34*, 253-260.
- Morita, M., Horiuchi, M., Kinoshita, Y., Yamamoto, T., and Watanabe, T. (2004). Relationship between blood triglyceride levels and periodontal status. *Community dental health* *21*, 32-36.
- Morris, A.J., Steele, J., and White, D.A. (2001). The oral cleanliness and periodontal health of UK adults in 1998. *Br Dent J* *191*, 186-192.
- Motterle, A., Pu, X., Wood, H., Xiao, Q., Gor, S., Ng, F.L., Chan, K., Cross, F., Shohreh, B., and Poston, R.N. (2012). Functional analyses of coronary artery disease associated variation on chromosome 9p21 in vascular smooth muscle cells. *Human molecular genetics* *21*, 4021-4029.
- Murray, R.Z., Kay, J.G., Sangermani, D.G., and Stow, J.L. (2005). A role for the phagosome in cytokine secretion. *Science* *310*, 1492-1495.
- Myers, S., Bottolo, L., Freeman, C., McVean, G., and Donnelly, P. (2005). A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. *Science* *310*, 321-324.
- Nagasawa, T., Kiji, M., Yashiro, R., Hormdee, D., Lu, H., Kunze, M., Suda, T., Koshy, G., Kobayashi, H., and Oda, S. (2007). Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. *Periodontology 2000* *43*, 65-84.
- Nakagawa, N., Kinosaki, M., Yamaguchi, K., Shima, N., Yasuda, H., Yano, K., Morinaga, T., and Higashio, K. (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* *253*, 395-400.
- Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N.-H., Mazda, T., and Tomita, M. (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Journal of biochemistry* *120*, 803-812.
- Nakashima, T., Kobayashi, Y., Yamasaki, S., Kawakami, A., Eguchi, K., Sasaki, H., and Sakai, H. (2000). Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochemical and biophysical research communications* *275*, 768-775.
- Nakashima, Y., Wight, T.N., and Sueishi, K. (2008). Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc Res* *79*, 14-23.

- Nallagatla, S.R., Hwang, J., Toroney, R., Zheng, X., Cameron, C.E., and Bevilacqua, P.C. (2007). 5'-triphosphate-dependent activation of PKR by RNAs with short stem-loops. *Science* 318, 1455-1458.
- Noack, B., Genco, R.J., Trevisan, M., Grossi, S., Zambon, J.J., and Nardin, E.D. (2001). Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level. *Journal of periodontology* 72, 1221-1227.
- Noiri, Y., Li, L., and Ebisu, S. (2001). The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *J Dent Res* 80, 1930-1934.
- Ogawa, Y., Sun, B.K., and Lee, J.T. (2008). Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science* 320, 1336-1341.
- Okamoto, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Nishida, M., Arita, Y., Kumada, M., Ohashi, K., Sakai, N., Shimomura, I., and Kobayashi, H. (2002). Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 106, 2767-2770.
- Otani, K., Kitayama, J., Kamei, T., Soma, D., Miyato, H., Yamauchi, T., Kadowaki, T., and Nagawa, H. (2010). Adiponectin receptors are downregulated in human gastric cancer. *Journal of gastroenterology* 45, 918-927.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Maeda, K., Kuriyama, H., Okamoto, Y., Hotta, K., Nishida, M., Takahashi, M., Nakamura, T., *et al.* (1999). Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100, 2473-2476.
- Overhoff, M., Alken, M., Far, R.K.-K., Lemaitre, M., Lebleu, B., Sczakiel, G., and Robbins, I. (2005). Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *Journal of molecular biology* 348, 871-881.
- Page, G.P., George, V., Go, R.C., Page, P.Z., and Allison, D.B. (2003). "Are we there yet?": Deciding when one has demonstrated specific genetic causation in complex diseases and quantitative traits. *Am J Hum Genet* 73, 711-719.
- Paraskevas, S., Huizinga, J.D., and Loos, B.G. (2008). A systematic review and meta-analyses on C-reactive protein in relation to periodontitis. *Journal of clinical periodontology* 35, 277-290.
- Pasmant, E., Laurendeau, I., Heron, D., Vidaud, M., Vidaud, D., and Bieche, I. (2007). Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF. *Cancer Res* 67, 3963-3969.
- Peng, G., Luo, L., Siu, H., Zhu, Y., Hu, P., Hong, S., Zhao, J., Zhou, X., Reveille, J.D., Jin, L., *et al.* (2010). Gene and pathway-based second-wave analysis of genome-wide association studies. *Eur J Hum Genet* 18, 111-117.
- Petersen, P.E. (2003). The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 31 Suppl 1, 3-23.
- Pischon, T., Girman, C.J., Hotamisligil, G.S., Rifai, N., Hu, F.B., and Rimm, E.B. (2004). Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 291, 1730-1737.
- Player, M.R., and Torrence, P.F. (1998). The 2-5A system: modulation of viral and cellular processes through acceleration of RNA degradation. *Pharmacol Ther* 78, 55-113.
- Poster, J., and Price, P. (1979). A method for decarboxylation of g-carboxyglutamic acid in proteins: properties of the decarboxylated g-carboxyglutamic acid protein from calf bone. *Journal of Biological Chemistry* 254, 431-436.
- Preshaw, P.M. (2008). Host response modulation in periodontics. *Periodontology* 2000 48, 92-110.
- Qi, W., Chan, H., Teng, L., Li, L., Chuai, S., Zhang, R., Zeng, J., Li, M., Fan, H., and Lin, Y. (2012). Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 21360-21365.
- Repeke, C.E., Ferreira Jr, S.B., Claudino, M., Silveira, E.M., de Assis, G.F., Avila-Campos, M.J., Silva, J.S., and Garlet, G.P. (2010). Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and

- CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. *Bone* 46, 1122-1130.
- Reyes-Garcia, R., Rozas-Moreno, P., Jimenez-Moleon, J., Villoslada, M., Garcia-Salcedo, J., Santana-Morales, S., and Muñoz-Torres, M. (2012). Relationship between serum levels of osteocalcin and atherosclerotic disease in type 2 diabetes. *Diabetes & metabolism* 38, 76-81.
- Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S., and Khvorova, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nature biotechnology* 22, 326-330.
- Rinn, J.L., and Chang, H.Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual review of biochemistry* 81, 145-166.
- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Bruggmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., and Segal, E. (2007). Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell* 129, 1311-1323.
- Risch, N.J. (2000). Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405, 847-856.
- Rissanen, T., Voutilainen, S., Nyyssönen, K., Lakka, T.A., and Salonen, J.T. (2000). Fish Oil-Derived Fatty Acids, Docosahexaenoic Acid and Docosapentaenoic Acid, and the Risk of Acute Coronary Events The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Circulation* 102, 2677-2679.
- Rosenstein, E.D., Kushner, L.J., Kramer, N., and Kazandjian, G. (2003). Pilot study of dietary fatty acid supplementation in the treatment of adult periodontitis. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids 68, 213-218.
- Ross, R., Wight, T., Strandness, E., and Thiele, B. (1984). Human atherosclerosis. I. Cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *The American journal of pathology* 114, 79.
- Sadler, A.J., and Williams, B.R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 8, 559-568.
- Sato, K., Nakagawa, H., Tajima, A., Yoshida, K., and Inoue, I. (2010). ANRIL is implicated in the regulation of nucleus and potential transcriptional target of E2F1. *Oncol Rep* 24, 701-707.
- Sayers, E.W., Barrett, T., Benson, D.A., Bolton, E., Bryant, S.H., Canese, K., Chetvernin, V., Church, D.M., DiCuccio, M., and Federhen, S. (2011). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic acids research* 39, D38-D51.
- Schaefer, A.S., Bochenek, G., Manke, T., Nothnagel, M., Graetz, C., Thien, A., Jockel-Schneider, Y., Harks, I., Staufenbiel, I., Wijmenga, C., et al. (2013). Validation of reported genetic risk factors for periodontitis in a large-scale replication study. *J Clin Periodontol* 40, 563-572.
- Schaefer, A.S., Richter, G.M., Dommisch, H., Reinartz, M., Nothnagel, M., Noack, B., Laine, M.L., Folwaczny, M., Groessner-Schreiber, B., and Loos, B.G. (2011). CDKN2BAS is associated with periodontitis in different European populations and is activated by bacterial infection. *Journal of medical genetics* 48, 38-47.
- Schaefer, A.S., Richter, G.M., Groessner-Schreiber, B., Noack, B., Nothnagel, M., El Mokhtari, N.E., Loos, B.G., Jepsen, S., and Schreiber, S. (2009). Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. *PLoS Genet* 5, e1000378.
- Schaefer, A.S., Richter, G.M., Nothnagel, M., Manke, T., Dommisch, H., Jacobs, G., Arlt, A., Rosenstiel, P., Noack, B., and Groessner-Schreiber, B. (2010). A genome-wide association study identifies GLT6D1 as a susceptibility locus for periodontitis. *Human molecular genetics* 19, 553-562.
- Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 270, 26746-26749.
- Schmid, M., Malicki, D., Nobori, T., Rosenbach, M.D., Campbell, K., Carson, D.A., and Carrera, C.J. (1998). Homozygous deletions of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) are more frequent than p16INK4A (CDKN2) homozygous deletions in primary non-small cell lung cancers (NSCLC). *Oncogene* 17, 2669.
- Schroder, K., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* 75, 163-189.

- Schunkert, H., Gotz, A., Braund, P., McGinnis, R., Tregouet, D.A., Mangino, M., Linsel-Nitschke, P., Cambien, F., Hengstenberg, C., Stark, K., *et al.* (2008). Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease. *Circulation* 117, 1675-1684.
- Schunkert, H., Konig, I.R., Kathiresan, S., Reilly, M.P., Assimes, T.L., Holm, H., Preuss, M., Stewart, A.F., Barbalic, M., Gieger, C., *et al.* (2011). Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. *Nat Genet* 43, 333-338.
- Schwenk, R.W., Angin, Y., Steinbusch, L.K., Dirkx, E., Hoebbers, N., Coumans, W.A., Bonen, A., Broers, J.L., van Eys, G.J., and Glatz, J.F. (2012). Overexpression of Vesicle-associated Membrane Protein (VAMP) 3, but Not VAMP2, Protects Glucose Transporter (GLUT) 4 Protein Translocation in an in Vitro Model of Cardiac Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry* 287, 37530-37539.
- Schwenk, R.W., Luiken, J.J., Bonen, A., and Glatz, J.F. (2008). Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. *Cardiovascular research* 79, 249-258.
- Scott, L.J., Mohlke, K.L., Bonnycastle, L.L., Willer, C.J., Li, Y., Duren, W.L., Erdos, M.R., Stringham, H.M., Chines, P.S., Jackson, A.U., *et al.* (2007). A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316, 1341-1345.
- Seinost, G., Wimmer, G., Skerget, M., Thaller, E., Brodmann, M., Gasser, R., Bratschko, R.O., and Pilger, E. (2005). Periodontal treatment improves endothelial dysfunction in patients with severe periodontitis. *American heart journal* 149, 1050-1054.
- Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.
- Shah, P.K., Falk, E., Badimon, J.J., Fernandez-Ortiz, A., Mailhac, A., Villareal-Levy, G., Fallon, J.T., Regnstrom, J., and Fuster, V. (1995). Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 92, 1565.
- Shanahan, C.M., Cary, N.R., Salisbury, J.R., Proudfoot, D., Weissberg, P.L., and Edmonds, M.E. (1999). Medial Localization of Mineralization-Regulating Proteins in Association With Mönckeberg's Sclerosis Evidence for Smooth Muscle Cell-Mediated Vascular Calcification. *Circulation* 100, 2168-2176.
- Sharma, K., Ziyadeh, F.N., Alzahabi, B., McGowan, T.A., Kapoor, S., Kurnik, B.R., Kurnik, P.B., and Weisberg, L.S. (1997). Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type II diabetes. *Diabetes* 46, 854-859.
- Sharrett, A.R., Patsch, W., Sorlie, P.D., Heiss, G., Bond, M.G., and Davis, C.E. (1994). Associations of lipoprotein cholesterol, apolipoproteins AI and B, and triglycerides with carotid atherosclerosis and coronary heart disease. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 14, 1098-1104.
- Shea, J., Agarwala, V., Philippakis, A.A., Maguire, J., Banks, E., DePristo, M., Thomson, B., Guiducci, C., Onofrio, R.C., and Kathiresan, S. (2011). Comparing strategies to fine-map the association of common SNPs at chromosome 9p21 with type 2 diabetes and myocardial infarction. *Nature genetics* 43, 801-805.
- Shete, S., Hosking, F.J., Robertson, L.B., Dobbins, S.E., Sanson, M., Malmer, B., Simon, M., Marie, Y., Boisselier, B., and Delattre, J.-Y. (2009). Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nature genetics* 41, 899-904.
- Silverman, I.M., Li, F., and Gregory, B.D. (2013). Genomic era analyses of RNA secondary structure and RNA-binding proteins reveal their significance to post-transcriptional regulation in plants. *Plant Sci* 205-206, 55-62.
- Simonet, W., Lacey, D., Dunstan, C., Kelley, M., Chang, M.-S., Lüthy, R., Nguyen, H., Wooden, S., Bennett, L., and Boone, T. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.
- Skalen, K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., Hultén, L.M., Wiklund, O., Innerarity, T.L., and Boren, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 417, 750-754.

- Skålén, K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., Hultén, L.M., Wiklund, O., Innerarity, T.L., and Borén, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* *417*, 750-754.
- Smith, J.D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., and Miyata, M. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *92*, 8264-8268.
- Soccio, T., Zhang, Y.-Y., Bacci, S., Mlynarski, W., Placha, G., Raggio, G., Di Paola, R., Marucci, A., Johnstone, M.T., and Gervino, E.V. (2006). Common haplotypes at the adiponectin receptor 1 (ADIPOR1) locus are associated with increased risk of coronary artery disease in type 2 diabetes. *Diabetes* *55*, 2763-2770.
- Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., and Kent, R.L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* *25*, 134-144.
- Song, K., Backs, J., McAnally, J., Qi, X., Gerard, R.D., Richardson, J.A., Hill, J.A., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2006). The transcriptional coactivator CAMTA2 stimulates cardiac growth by opposing class II histone deacetylases. *Cell* *125*, 453-466.
- Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Bergmann, M.M., Ristow, M., Boeing, H., and Pfeiffer, A.F. (2003). Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *The Lancet* *361*, 226-228.
- Strydom, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *15*, 1512-1531.
- Strydom, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *14*, 840-856.
- Steffens, M., Lamina, C., Illig, T., Bettecken, T., Vogler, R., Entz, P., Suk, E.K., Toliat, M.R., Klopp, N., Caliebe, A., *et al.* (2006). SNP-based analysis of genetic substructure in the German population. *Hum Hered* *62*, 20-29.
- Stein, C.A., and Krieg, A.M. (1994). Problems in interpretation of data derived from in vitro and in vivo use of antisense oligodeoxynucleotides. *Antisense Res Dev* *4*, 67-69.
- Stenbit, A.E., Tsao, T.S., Li, J., Burcelin, R., Geenen, D.L., Factor, S.M., Houseknecht, K., Katz, E.B., and Charron, M.J. (1997). GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nat Med* *3*, 1096-1101.
- Stiewe, T., and Pützer, B.M. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nature genetics* *26*, 464-469.
- Struhl, K. (2007). Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nature structural & molecular biology* *14*, 103-105.
- Sugiyama, S., Okada, Y., Sukhova, G.K., Virmani, R., Heinecke, J.W., and Libby, P. (2001). Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *The American journal of pathology* *158*, 879-891.
- Taft, R.J., Pheasant, M., and Mattick, J.S. (2007). The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays* *29*, 288-299.
- Takeya, M., Yoshimura, T., Leonard, E.J., and Takahashi, K. (1993). Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Human pathology* *24*, 534-539.
- Thies, F., Garry, J., Yaqoob, P., Rerkasem, K., Williams, J., Shearman, C.P., Gallagher, P.J., Calder, P.C., and Grimble, R.F. (2003). Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *The Lancet* *361*, 477-485.

- Tian, D., Sun, S., and Lee, J.T. (2010). The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell* 143, 390-403.
- Tonetti, M.S., D'Aiuto, F., Nibali, L., Donald, A., Storry, C., Parkar, M., Suvan, J., Hingorani, A.D., Vallance, P., and Deanfield, J. (2007). Treatment of periodontitis and endothelial function. *New England Journal of Medicine* 356, 911-920.
- Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S.-i., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., and Higashio, K. (1997). Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochemical and biophysical research communications* 234, 137-142.
- Turnbull, C., Ahmed, S., Morrison, J., Pernet, D., Renwick, A., Maranian, M., Seal, S., Ghousaini, M., Hines, S., and Healey, C.S. (2010). Genome-wide association study identifies five new breast cancer susceptibility loci. *Nature genetics* 42, 504-507.
- Uzilov, A.V., Keegan, J.M., and Mathews, D.H. (2006). Detection of non-coding RNAs on the basis of predicted secondary structure formation free energy change. *BMC Bioinformatics* 7, 173.
- Valentonyte, R., Hampe, J., Huse, K., Rosenstiel, P., Albrecht, M., Stenzel, A., Nagy, M., Gaede, K.I., Franke, A., and Haesler, R. (2005). Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nature genetics* 37, 357-364.
- van der Velden, U., Abbas, F., and Hart, A.A. (1985). Experimental gingivitis in relation to susceptibility to periodontal disease. (I.) Clinical observations. *J Clin Periodontol* 12, 61-68.
- van der Wal, A.C., Becker, A., Van der Loos, C., and Das, P. (1994). Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 89, 36-44.
- Wang, H., Zhang, H., Jia, Y., Zhang, Z., Craig, R., Wang, X., and Elbein, S.C. (2004a). Adiponectin receptor 1 gene (ADIPO1) as a candidate for type 2 diabetes and insulin resistance. *Diabetes* 53, 2132-2136.
- Wang, J., Zhang, J., Zheng, H., Li, J., Liu, D., Li, H., Samudrala, R., Yu, J., and Wong, G.K.-S. (2004b). Mouse transcriptome: neutral evolution of 'non-coding' complementary DNAs. *Nature* 431.
- Wang, K.C., and Chang, H.Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular cell* 43, 904-914.
- Wang, X., Arai, S., Song, X., Reichart, D., Du, K., Pascual, G., Tempst, P., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K., and Kurokawa, R. (2008). Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* 454, 126-130.
- Wilusz, J.E., Sunwoo, H., and Spector, D.L. (2009). Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes & development* 23, 1494-1504.
- Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370, 341-347.
- Wreschner, D.H., James, T.C., Silverman, R.H., and Kerr, I.M. (1981). Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A(ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells. *Nucleic Acids Res* 9, 1571-1581.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Imai, Y., Shimozawa, N., Hioki, K., Uchida, S., Ito, Y., Takakuwa, K., and Matsui, J. (2003). Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *Journal of Biological Chemistry* 278, 2461-2468.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., and Tsuboyama-Kasaoka, N. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nature medicine* 7, 941-946.
- Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., and Kubota, T. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nature medicine* 13, 332-339.
- Yap, K.L., Li, S., Muñoz-Cabello, A.M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M.J., and Zhou, M.-M. (2010). Molecular Interplay of the Noncoding RNA *ANRIL* and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of *INK4a*. *Molecular cell* 38, 662-674.

- Yokoyama, M., Origasa, H., Matsuzaki, M., Matsuzawa, Y., Saito, Y., Ishikawa, Y., Oikawa, S., Sasaki, J., Hishida, H., and Itakura, H. (2007). Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *The Lancet* 369, 1090-1098.
- Yu, W., Gius, D., Onyango, P., Muldoon-Jacobs, K., Karp, J., Feinberg, A.P., and Cui, H. (2008). Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature* 451, 202-206.
- Yumoto, H., Chou, H.-H., Takahashi, Y., Davey, M., Gibson, F.C., and Genco, C.A. (2005). Sensitization of human aortic endothelial cells to lipopolysaccharide via regulation of Toll-like receptor 4 by bacterial fimbria-dependent invasion. *Infection and immunity* 73, 8050-8059.
- Zabaneh, D., and Balding, D.J. (2010). A genome-wide association study of the metabolic syndrome in Indian Asian men. *PLoS One* 5, e11961.
- Zhao, L.P., Aragaki, C., Hsu, L., and Quiaoit, F. (1998). Mapping of complex traits by single-nucleotide polymorphisms. *American journal of human genetics* 63, 225.

Anhang

Tabelle 22 Gene die dem Prozess "Ossifikation während der Knochenreifung" zugerechnet werden können und eine signifikante Expressionsänderung 48 Stunden nach Tetracyclin-Induktion zeigten (FC).

Gen	FC	Gen	FC	Gen	FC	Gen	FC	Gen	FC
ADIPOR1	-1,56	CREB5	-1,23	DNAJB6	-1,16	PAF1	-1,13	PMS2L11	-1,09
MAGT1	-1,47	KIAA0409	-1,22	PMS2L2	-1,16	PITPNA	-1,13	ACSS2	-1,09
ATRX	-1,43	HDAC3	-1,21	HS2ST1	-1,16	GEN1	-1,13	PSMC3IP	-1,09
PHF16	-1,41	CDS2	-1,21	GTF2F1	-1,15	MED1	-1,13	CREBL2	-1,09
ATRX	-1,40	ABHD4	-1,21	EP300	-1,15	PIK3CG	-1,12	AHR	-1,09
PNPLA2	-1,39	PLD2	-1,21	NEK4	-1,15	RABGGTA	-1,12	RAD9A	-1,09
CGA	-1,38	EIF4A3	-1,21	FBXO21	-1,15	PKMYT1	-1,12	PRPS1	-1,09
ERP29	-1,37	FOS	-1,20	BRD8	-1,15	ELL	-1,12	MCAT	-1,09
MCM2	-1,34	CDC25A	-1,20	MLLT1	-1,15	CIRBP	-1,12	OTUB1	-1,09
BAZ2A	-1,33	PIGG	-1,20	POMT2	-1,15	ATP6AP1	-1,12	MDC1	-1,08
POLR3A	-1,32	ALG1	-1,20	CTBP1	-1,15	MUL1	-1,12	MDC1	-1,08
PSMD1	-1,31	RBM3	-1,20	ADRM1	-1,15	PPME1	-1,12	PLK1	-1,08
MTM1	-1,30	HNRNPH2	-1,19	IP6K1	-1,14	PCYOX1	-1,12	FANCE	-1,08
GNPDA1	-1,30	GNAI2	-1,19	PEMT	-1,14	PTPN1	-1,12	DAPK3	-1,08
CREB3	-1,29	PABPN1	-1,18	RING1	-1,14	RBM4B	-1,11	NFE2L1	-1,08
DCAKD	-1,29	MAPK1	-1,18	ROCK1	-1,14	ACD	-1,11	CHSY1	-1,08
GALNT7	-1,29	CTSA	-1,18	FCN3	-1,14	POLE3	-1,11	BACE1	-1,08
KSR1	-1,28	NCOA5	-1,18	PMS2L2	-1,14	MLL	-1,11	DDAH1	-1,08
PHKG2	-1,28	MMS19	-1,18	MED27	-1,14	NOP2	-1,11	ASPHD1	-1,08
EIF6	-1,28	PMS2L5	-1,18	CHM	-1,14	PCYT1A	-1,11	EDEM3	-1,08
CUL1	-1,28	BRPF3	-1,18	ATP11A	-1,14	RBM5	-1,11	NRF1	-1,08
CYLD	-1,28	RING1	-1,17	MYST3	-1,14	RNPC3	-1,11	OS9	-1,08
ALKBH1	-1,28	PMS2L2	-1,17	CBL	-1,14	ALDH6A1	-1,11	GBA	-1,08
AGBL3	-1,27	PMS2L2	-1,17	PSMC3	-1,14	NFIA	-1,10	MYST2	-1,08
OVGPI	-1,27	MCM7	-1,17	INSR	-1,14	PI4K2A	-1,10	FTSJ3	-1,08
MAPK3	-1,26	ATP6V0D1	-1,17	MCM5	-1,14	PMS2L2	-1,10	ISG20	-1,08
LMAN2L	-1,26	RBM23	-1,17	DGCR14	-1,13	ADAT3	-1,10	PRPF19	-1,08
EDEM1	-1,25	GPR175	-1,17	CLN6	-1,13	AFF4	-1,10	LPGAT1	-1,07
CTPS2	-1,25	CALCOCO1	-1,17	ERC1	-1,13	PI4KAP2	-1,10	FANCG	-1,07
EPC1	-1,25	KIAA0999	-1,16	MRRF	-1,13	IGF1R	-1,10	PIK3C3	-1,07
LYN	-1,25	CDIPT	-1,16	PFKL	-1,13	CASC3	-1,10	MAGOHB	-1,07
DUSP8	-1,24	ROCK2	-1,16	PPP1R10	-1,13	GSG2	-1,10	MARK2	-1,07
CTDSP1	-1,23	KIAA0317	-1,16	PPP1R10	-1,13	DIDO1	-1,10	MYO18A	-1,07
PLA2G4C	-1,23	ING3	-1,16	PPP1R10	-1,13	RBM22	-1,10	IMP3	-1,07
CLK4	-1,23	PLRG1	-1,16	IGF1R	-1,13	CIT	-1,10	PPIF	-1,07
INTS2	-1,23	ALG3	-1,16	DUSP16	-1,13	REPIN1	-1,10	PANK1	-1,07
COL4A3BP	-1,23	KLHL21	-1,16	PGC	-1,13	BTRC	-1,09	RFWD3	-1,06

Tabelle 23 Gene die dem Prozess "Ossifikation während der Knochenreifung" zugerechnet werden können und eine signifikante Expressionsänderung 96 Stunden nach Tetracyclin-Induktion zeigten (FC).

Gen	FC	Gen	FC	Gen	FC
MAGT1	-1,74	PGC	-1,23	PMS2L2	-1,13
ADIPOR1	-1,74	POMT2	-1,23	ACD	-1,13
PHF16	-1,59	IP6K1	-1,23	RING1	-1,13
PNPLA2	-1,59	CTPS2	-1,22	PRPS1	-1,13
EIF6	-1,57	REPIN1	-1,22	NRF1	-1,13
AGBL3	-1,56	KIAA0317	-1,21	PMS2L2	-1,13
GNPDA1	-1,52	PFKL	-1,21	PKMYT1	-1,12
DCAKD	-1,47	GPR175	-1,20	MCAT	-1,12
PSMD1	-1,45	PABPN1	-1,20	MUL1	-1,12
ATRX	-1,42	ELL	-1,20	PMS2L2	-1,11
MCM2	-1,39	CTBP1	-1,20	PIIF	-1,11
LYN	-1,39	PI4K2A	-1,20	DUSP16	-1,11
CDC25A	-1,38	MED1	-1,20	MCM5	-1,11
EDEM1	-1,38	NCOA5	-1,19	BRPF1	-1,11
POLR3A	-1,38	PPME1	-1,19	ING3	-1,10
HS2ST1	-1,37	MCM7	-1,19	BACE1	-1,09
MMS19	-1,36	INTS2	-1,19	RBM10	-1,09
PLD2	-1,35	DDAH1	-1,19	PRPF19	-1,09
CREB3	-1,34	NEK4	-1,19	GSG2	-1,09
OVGP1	-1,33	PANK1	-1,18	NUP98	-1,09
PHKG2	-1,33	KIAA0999	-1,18	ALDH6A1	-1,09
CYLD	-1,33	ISG20	-1,18	BGLAP	-1,08
PEMT	-1,33	BMP2K	-1,17		
ALG3	-1,32	CHSY1	-1,17		
ROCK2	-1,31	MED27	-1,17		
GNAI2	-1,31	CTDSP1	-1,17		
EPC1	-1,30	MYST3	-1,17		
CDIPT	-1,30	AFF4	-1,17		
KSR1	-1,30	ABHD4	-1,17		
GALNT7	-1,28	DNAJB6	-1,17		
EIF4A3	-1,28	ATP11A	-1,16		
MAPK1	-1,28	CLN6	-1,16		
PLRG1	-1,28	EDEM3	-1,15		
PLA2G4C	-1,28	PMS2L5	-1,15		
MTM1	-1,27	RBM22	-1,15		
CBL	-1,27	RING1	-1,15		
DUSP8	-1,26	PIGG	-1,15		
MRRF	-1,25	ADAT3	-1,15		
ROCK1	-1,24	RBM3	-1,15		
NFIA	-1,24	IGF1R	-1,15		
CDS2	-1,24	CREB5	-1,14		
MLLT1	-1,24	RABGGTA	-1,14		
KLHL21	-1,23	GEN1	-1,14		
ADRM1	-1,23	OTUB1	-1,13		

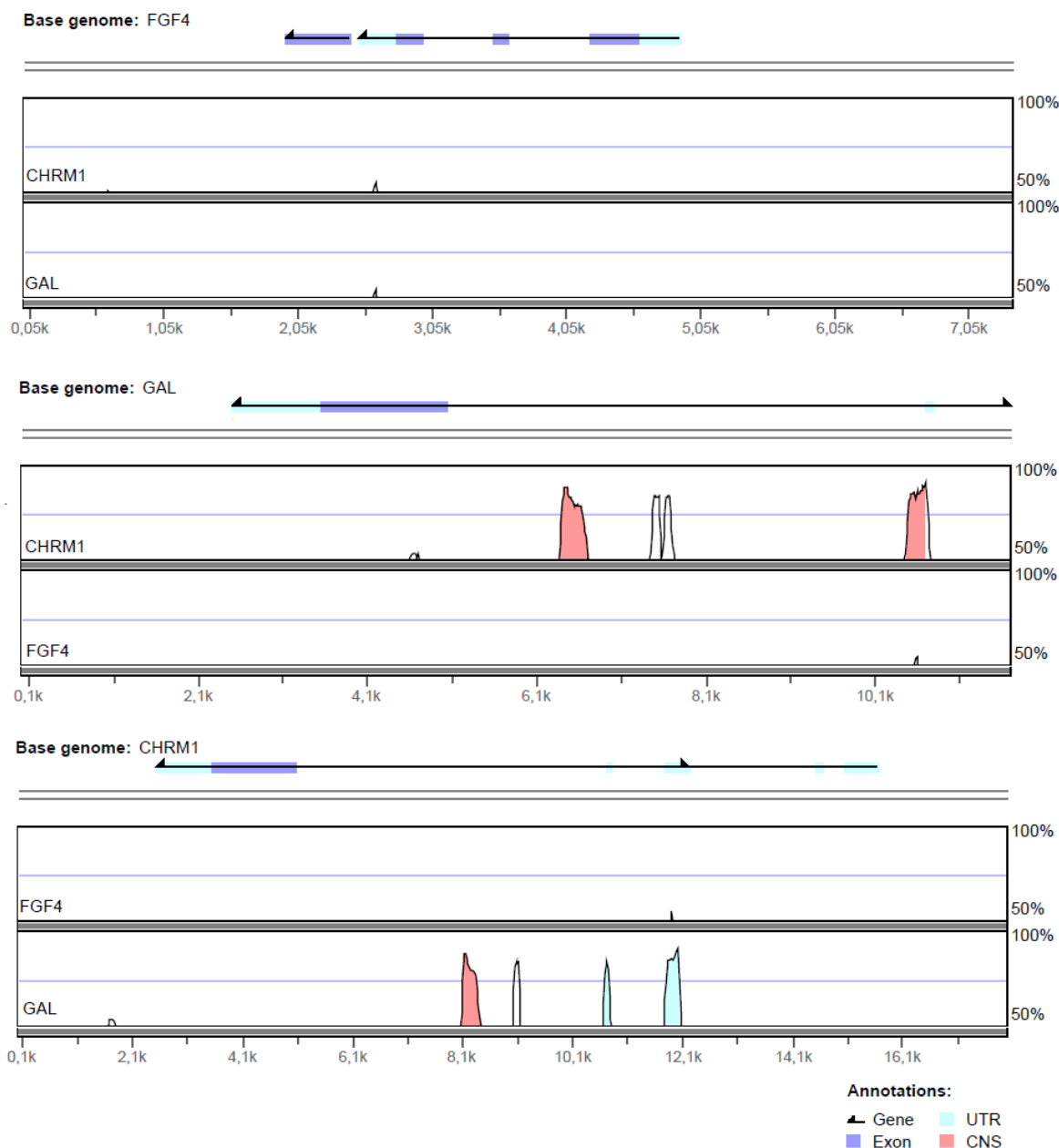


Abbildung 25 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von *FGF4*, *GAL* und *CHRM1*.

Jedes Diagramm zeigt im oberen Teil der Darstellung ein Referenzgen einschließlich des umliegenden chromosomalen Bereichs von 2.500 bp stromab und -aufwärts. Die roten Flächen im unteren Teil jeder Abbildung repräsentieren die chromosomalen Bereiche, die bei einer Sequenzlänge von mehr als 200 bp eine Sequenzhomologie von mindestens 70% aufweisen (horizontale blaue Linie). Weiße Flächen, die die blaue Linie übersteigen, repräsentieren Bereiche, die zwar eine Sequenzhomologie > 70% aufweisen, die vorgegebene Länge der homologen Bereiche (200 bp) jedoch nicht erreichen.

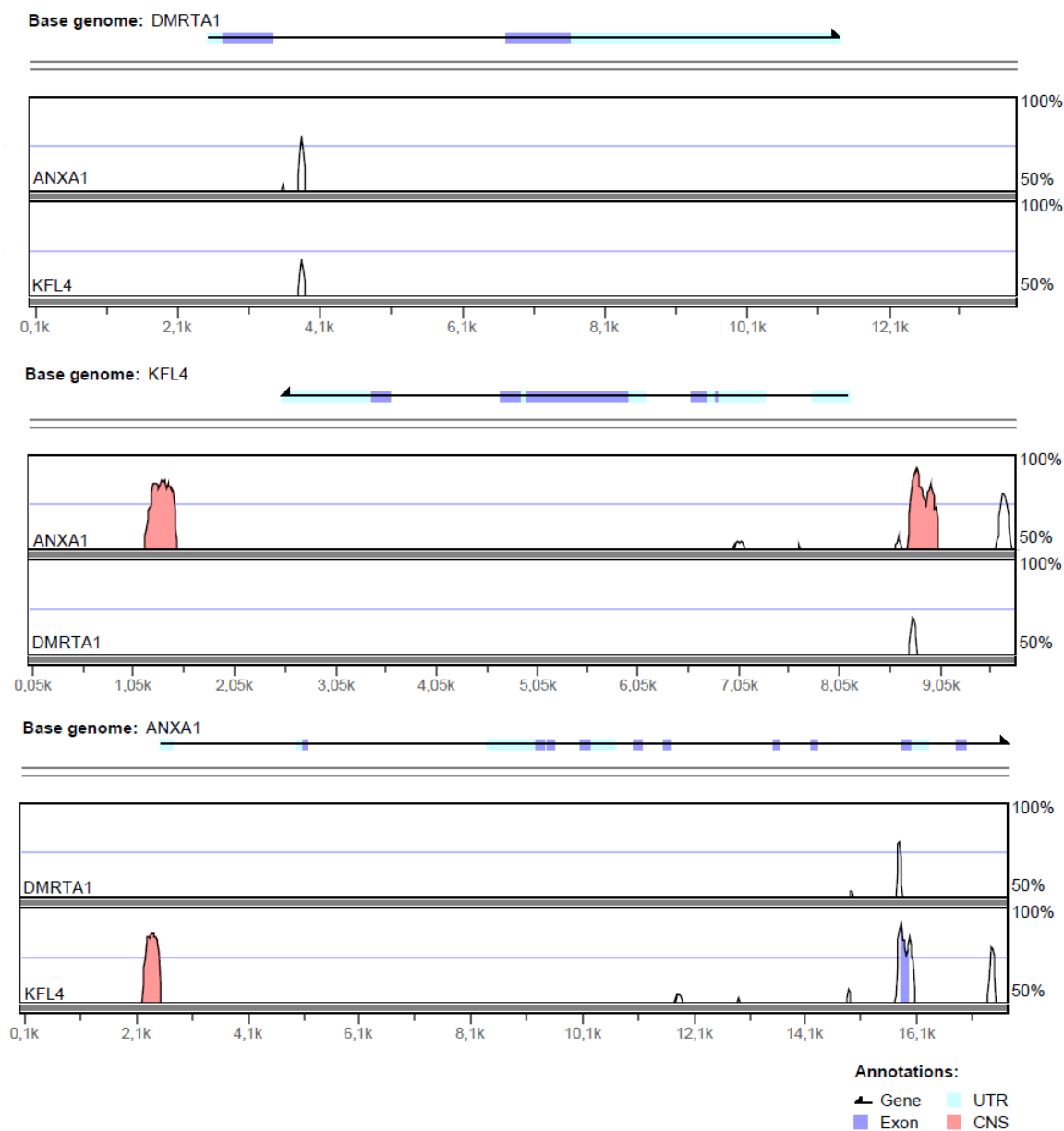


Abbildung 26 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von *DMRTA1*, *KFL4* und *ANXA1*.

Jedes Diagramm zeigt im oberen Teil der Darstellung ein Referenzgen einschließlich des umliegenden chromosomalen Bereichs von 2.500 bp stromab und -aufwärts. Die roten Flächen im unteren Teil jeder Abbildung repräsentieren die chromosomalen Bereiche, die bei einer Sequenzlänge von mehr als 200 bp eine Sequenzhomologie von mindestens 70% aufweisen (horizontale blaue Linie). Weiße Flächen, die die blaue Linie übersteigen, repräsentieren Bereiche, die zwar eine Sequenzhomologie > 70% aufweisen, die vorgegebene Länge der homologen Bereiche (200 bp) jedoch nicht erreichen.

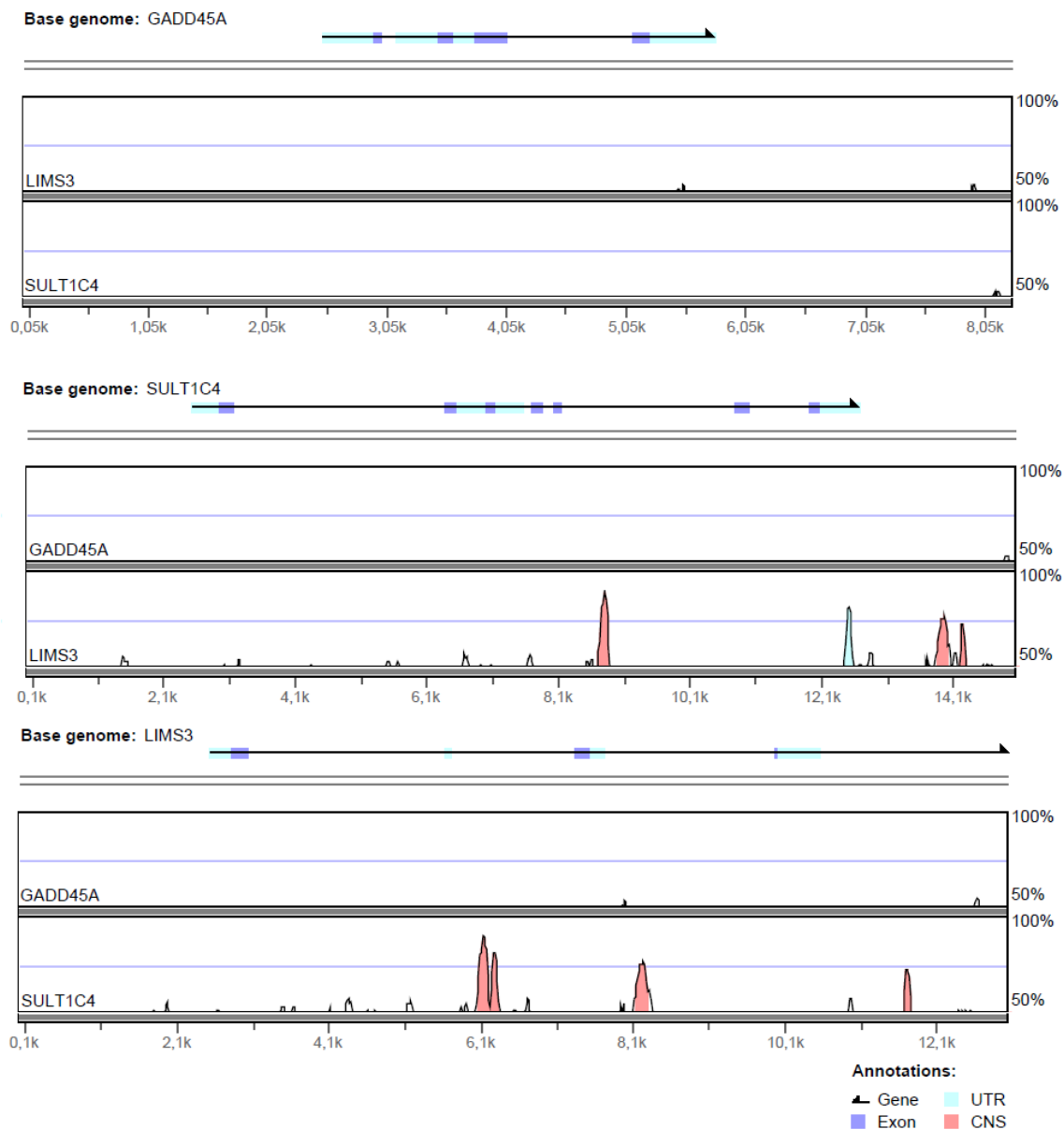


Abbildung 27 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von *GADD45A*, *SULT1C4* und *LIMS3*.

Jedes Diagramm zeigt im oberen Teil der Darstellung ein Referenzgen einschließlich des umliegenden chromosomalen Bereichs von 2.500 bp stromab und -aufwärts. Die roten Flächen im unteren Teil jeder Abbildung repräsentieren die chromosomalen Bereiche, die bei einer Sequenzlänge von mehr als 200 bp eine Sequenzhomologie von mindestens 70% aufweisen (horizontale blaue Linie). Weiße Flächen, die die blaue Linie übersteigen, repräsentieren Bereiche, die zwar eine Sequenzhomologie > 70% aufweisen, die vorgegebene Länge der homologen Bereiche (200 bp) jedoch nicht erreichen.

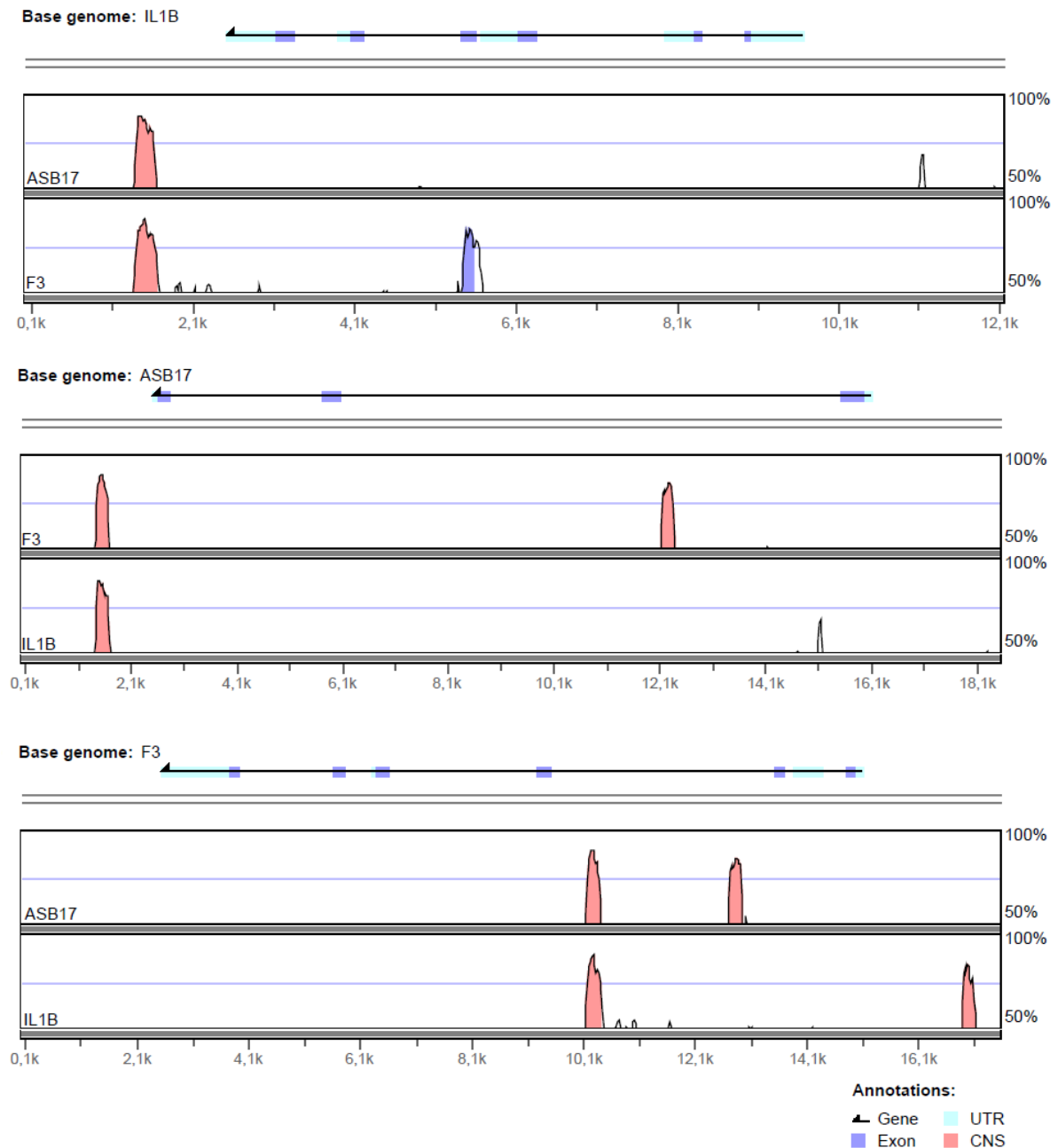


Abbildung 28 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von *IL1B*, *ASB17* und *F3*.

Jedes Diagramm zeigt im oberen Teil der Darstellung ein Referenzgen einschließlich des umliegenden chromosomalen Bereichs von 2.500 bp stromab und -aufwärts. Die roten Flächen im unteren Teil jeder Abbildung repräsentieren die chromosomalen Bereiche, die bei einer Sequenzlänge von mehr als 200 bp eine Sequenzhomologie von mindestens 70% aufweisen (horizontale blaue Linie). Weiße Flächen, die die blaue Linie übersteigen, repräsentieren Bereiche, die zwar eine Sequenzhomologie > 70% aufweisen, die vorgegebene Länge der homologen Bereiche (200 bp) jedoch nicht erreichen.

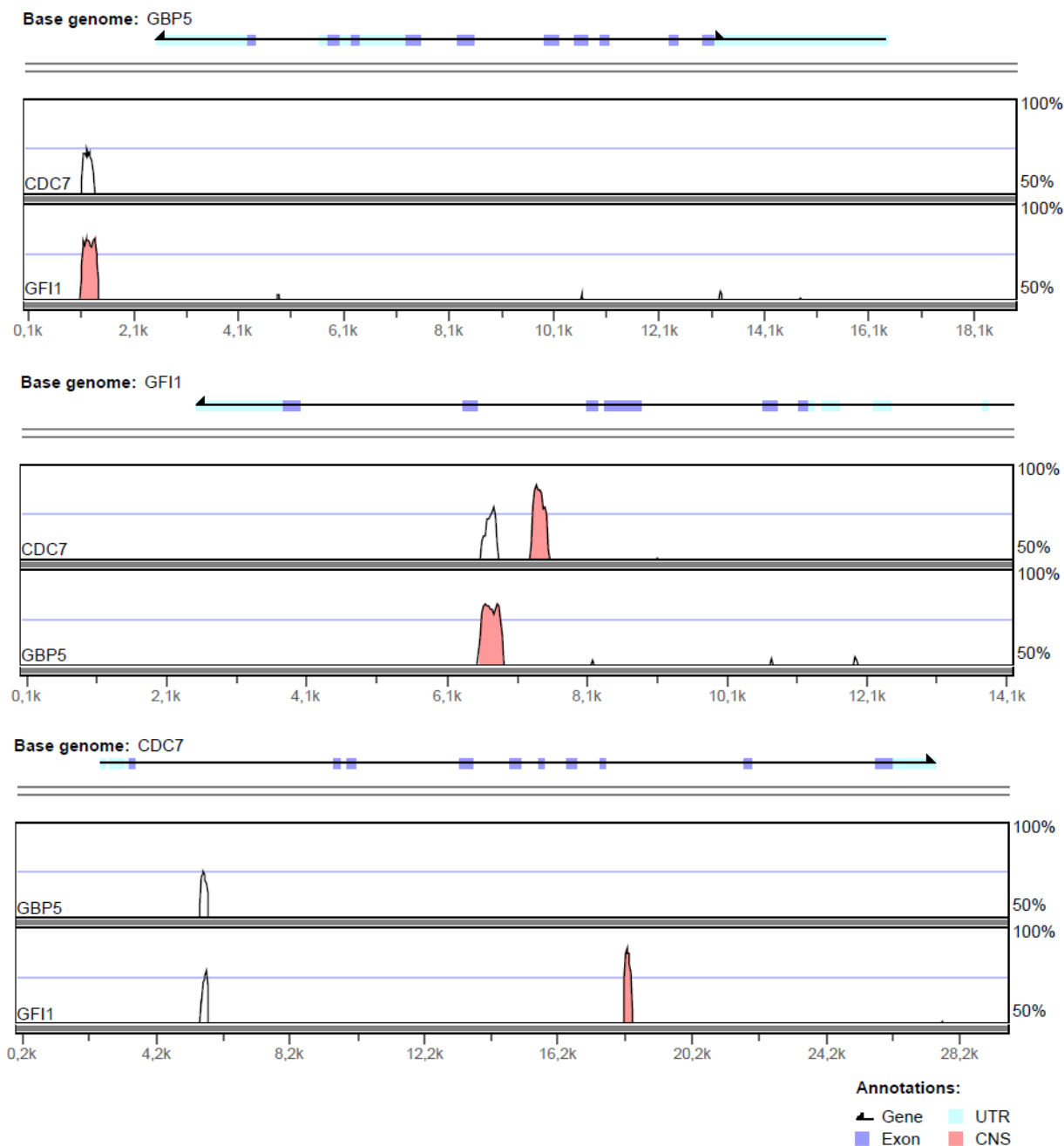


Abbildung 29 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von *GBP5*, *GFI1* und *CDC7*.

Jedes Diagramm zeigt im oberen Teil der Darstellung ein Referenzgen einschließlich des umliegenden chromosomalen Bereichs von 2.500 bp stromab und -aufwärts. Die roten Flächen im unteren Teil jeder Abbildung repräsentieren die chromosomalen Bereiche, die bei einer Sequenzlänge von mehr als 200 bp eine Sequenzhomologie von mindestens 70% aufweisen (horizontale blaue Linie). Weiße Flächen, die die blaue Linie übersteigen, repräsentieren Bereiche, die zwar eine Sequenzhomologie > 70% aufweisen, die vorgegebene Länge der homologen Bereiche (200 bp) jedoch nicht erreichen.

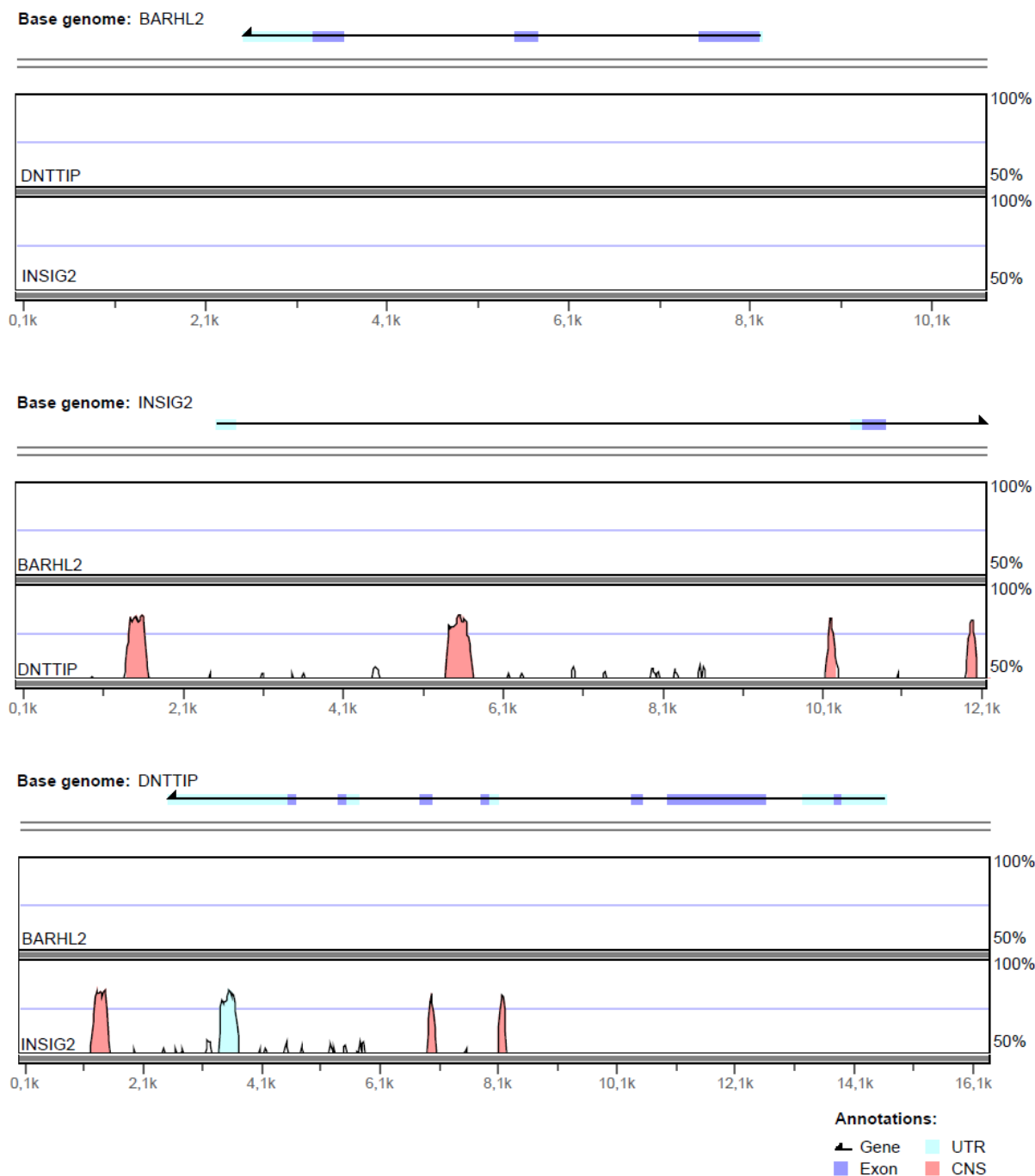


Abbildung 30 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von *BARHL2*, *INSIG2* und *DNTTIP*.

Jedes Diagramm zeigt im oberen Teil der Darstellung ein Referenzgen einschließlich des umliegenden chromosomalen Bereichs von 2.500 bp stromab und -aufwärts. Die roten Flächen im unteren Teil jeder Abbildung repräsentieren die chromosomalen Bereiche, die bei einer Sequenzlänge von mehr als 200 bp eine Sequenzhomologie von mindestens 70% aufweisen (horizontale blaue Linie). Weiße Flächen, die die blaue Linie übersteigen, repräsentieren Bereiche, die zwar eine Sequenzhomologie > 70% aufweisen, die vorgegebene Länge der homologen Bereiche (200 bp) jedoch nicht erreichen.

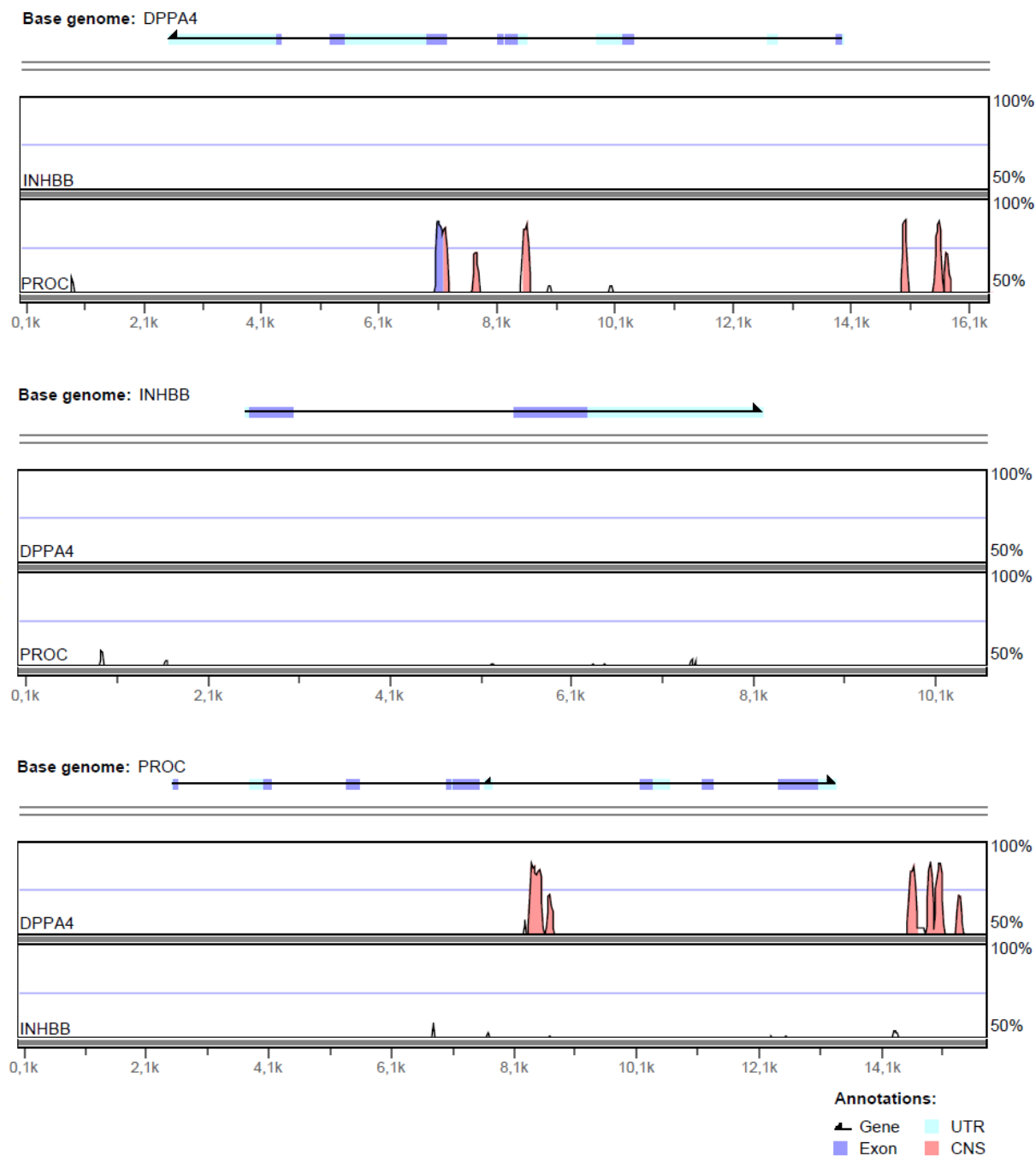


Abbildung 31 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von *DPPA4*, *INHBB* und *PROC*.

Jedes Diagramm zeigt im oberen Teil der Darstellung ein Referenzgen einschließlich des umliegenden chromosomalen Bereichs von 2.500 bp stromab und -aufwärts. Die roten Flächen im unteren Teil jeder Abbildung repräsentieren die chromosomalen Bereiche, die bei einer Sequenzlänge von mehr als 200 bp eine Sequenzhomologie von mindestens 70% aufweisen (horizontale blaue Linie). Weiße Flächen, die die blaue Linie übersteigen, repräsentieren Bereiche, die zwar eine Sequenzhomologie > 70% aufweisen, die vorgegebene Länge der homologen Bereiche (200 bp) jedoch nicht erreichen.

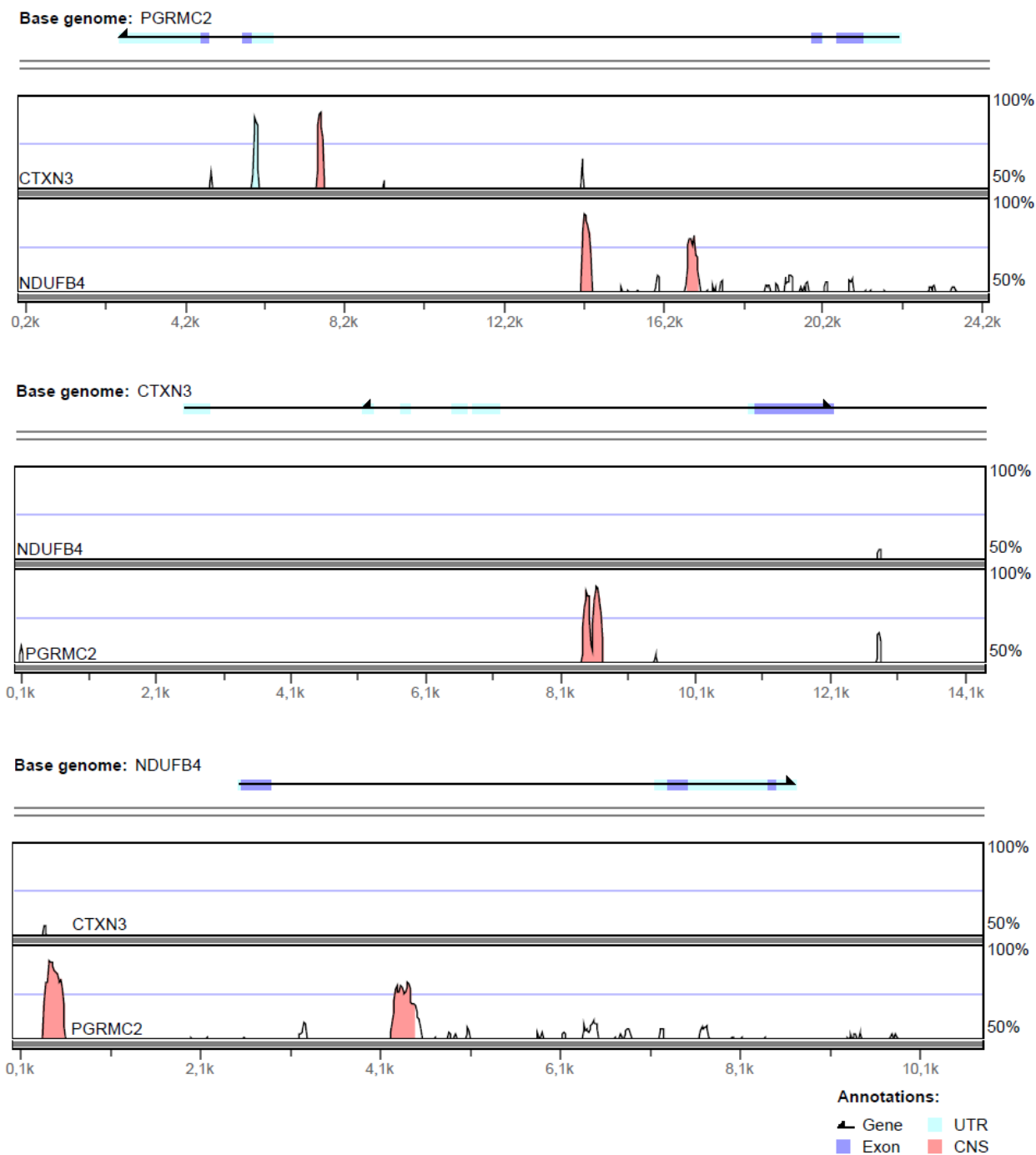


Abbildung 32 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von *PGRMC2*, *CTXN3* und *NDUFB4*.

Jedes Diagramm zeigt im oberen Teil der Darstellung ein Referenzgen einschließlich des umliegenden chromosomalen Bereichs von 2.500 bp stromab und -aufwärts. Die roten Flächen im unteren Teil jeder Abbildung repräsentieren die chromosomalen Bereiche, die bei einer Sequenzlänge von mehr als 200 bp eine Sequenzhomologie von mindestens 70% aufweisen (horizontale blaue Linie). Weiße Flächen, die die blaue Linie übersteigen, repräsentieren Bereiche, die zwar eine Sequenzhomologie > 70% aufweisen, die vorgegebene Länge der homologen Bereiche (200 bp) jedoch nicht erreichen.

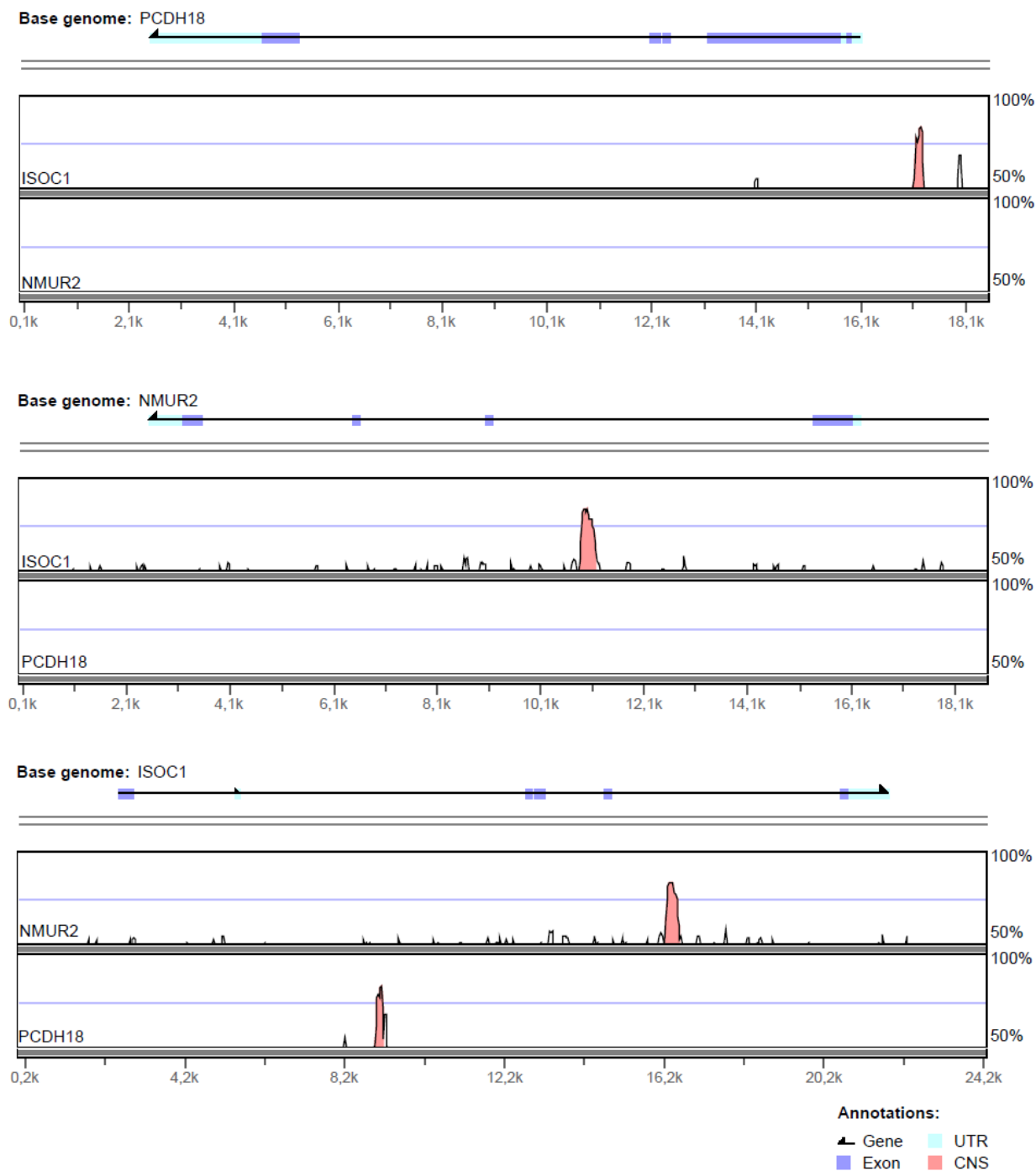


Abbildung 33 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von *PCDH18*, *NMUR2* und *ISOC1*.

Jedes Diagramm zeigt im oberen Teil der Darstellung ein Referenzgen einschließlich des umliegenden chromosomalen Bereichs von 2.500 bp stromab und -aufwärts. Die roten Flächen im unteren Teil jeder Abbildung repräsentieren die chromosomalen Bereiche, die bei einer Sequenzlänge von mehr als 200 bp eine Sequenzhomologie von mindestens 70% aufweisen (horizontale blaue Linie). Weiße Flächen, die die blaue Linie übersteigen, repräsentieren Bereiche, die zwar eine Sequenzhomologie > 70% aufweisen, die vorgegebene Länge der homologen Bereiche (200 bp) jedoch nicht erreichen.

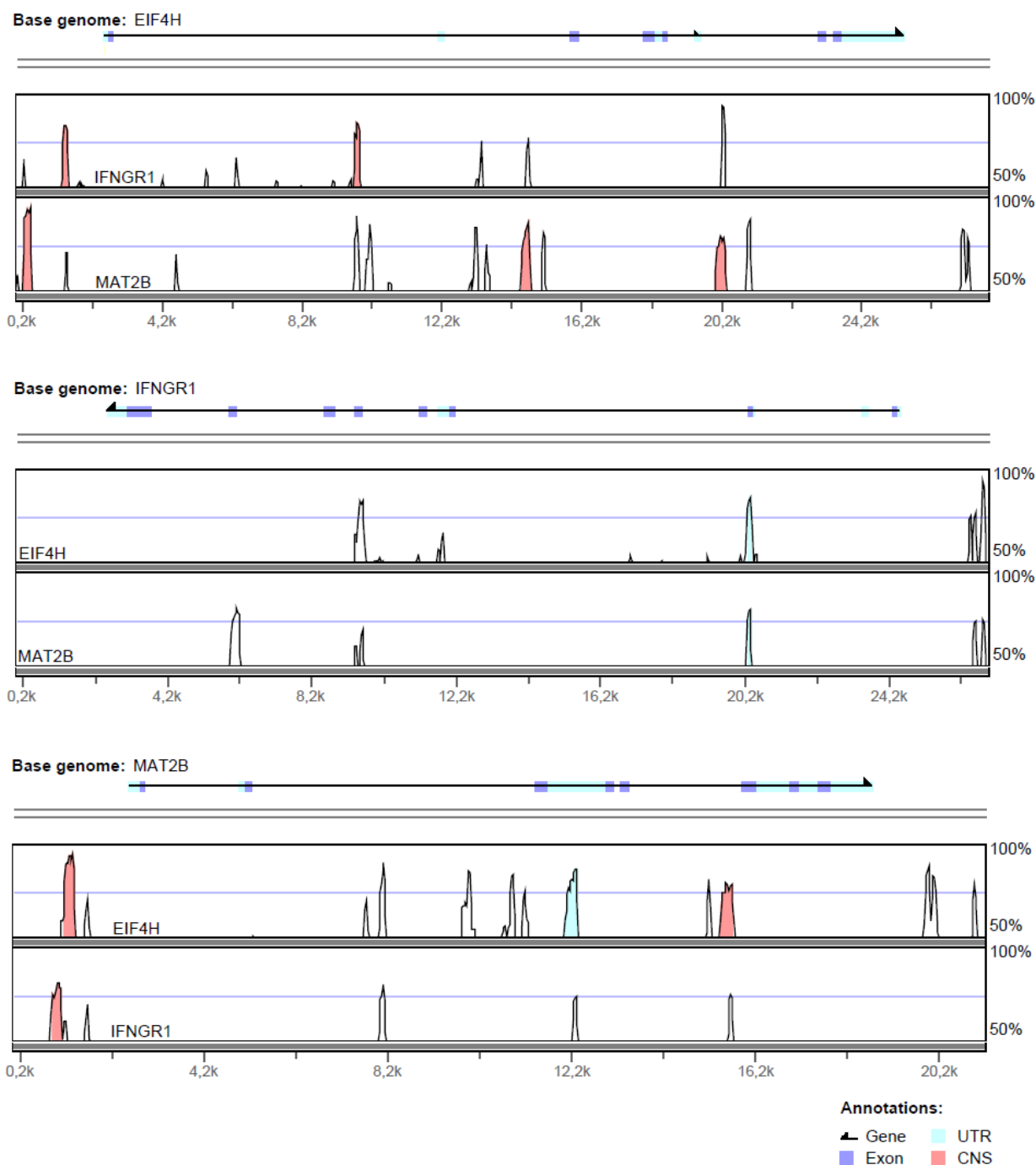


Abbildung 34 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von *EIF4H*, *IFNGR1* und *MAT2B*.

Jedes Diagramm zeigt im oberen Teil der Darstellung ein Referenzgen einschließlich des umliegenden chromosomalen Bereichs von 2.500 bp stromab und -aufwärts. Die roten Flächen im unteren Teil jeder Abbildung repräsentieren die chromosomalen Bereiche, die bei einer Sequenzlänge von mehr als 200 bp eine Sequenzhomologie von mindestens 70% aufweisen (horizontale blaue Linie). Weiße Flächen, die die blaue Linie übersteigen, repräsentieren Bereiche, die zwar eine Sequenzhomologie > 70% aufweisen, die vorgegebene Länge der homologen Bereiche (200 bp) jedoch nicht erreichen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Klinische Bilder der Parodontitis.....	1
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Atherom-Entwicklung.....	6
Abbildung 3 LD Struktur (r^2) des Chromosoms 9p21.3 in HapMap CEU.....	12
Abbildung 4 Schema der <i>ANRIL</i> vermittelten <i>CDKN2A/B</i> Regulation.....	14
Abbildung 5 Klassifizierung langer nichtkodierender RNAs anhand ihrer Lage im Genom..	16
Abbildung 6 Schematische Darstellung der verschiedenen lncRNA Hauptmechanismen.....	18
Abbildung 7 Beispiel für das Qualitätskriterium „kein Ausreißer“.....	53
Abbildung 8 Expression von <i>OAS1</i> sowie der langen und kurzen <i>ANRIL</i> Spleißvarianten unter verschiedenen Tetracyclin-Konzentrationen.	61
Abbildung 9 Induzierbare Repression der <i>ANRIL</i> Transkripte über einen Zeitraum von 96 Stunden.	62
Abbildung 10 <i>CDKN2A</i> und <i>CDKN2B</i> Transkriptniveaus nach Tetracyclin-induzierter Repression der kurzen <i>ANRIL</i> Varianten.....	63
Abbildung 11 shRNA-vermittelte Repression kurzer <i>ANRIL</i> Varianten vermindert die Zellteilungsrate in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen.....	64
Abbildung 12 Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO) -Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte infolge einer shRNA-vermittelten Repression der kurzen <i>ANRIL</i> Varianten nach 48 Stunden.....	67
Abbildung 13 Überrepräsentierte Gene Ontologie (GO) -Gruppen der differentiell exprimierten Genprodukte infolge einer shRNA-vermittelten Repression der kurzen <i>ANRIL</i> Varianten nach 96 Stunden.....	68
Abbildung 14 Transkriptniveaus von <i>ANRIL</i> , <i>C11ORF10</i> , <i>VAMP3</i> und <i>ADIPOR1</i> in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen 48 und 96 Stunden nach Tetracyclin-Induktion.....	73
Abbildung 15 Expressionsniveaus von <i>ANRIL</i> , <i>C11ORF10</i> , <i>VAMP3</i> und <i>ADIPOR1</i> in T-REx-293 Zellen, die stabil mit einer unspezifischen shRNA transfiziert worden sind, vor und nach 48-stündiger Induktion der shRNA durch Tetracyclin-Zugabe.....	74
Abbildung 16 Verminderte Proteinmenge von <i>ADIPOR1</i> , <i>C11ORF10</i> und <i>VAMP3</i> infolge des shRNA-vermittelten knockdowns der kurzen <i>ANRIL</i> Spleißvarianten.....	76
Abbildung 17 Knockdown der kurzen <i>ANRIL</i> Varianten in transient transfizierten HeLa Zellen und die korrelierende Expressionsänderung von <i>ADIPOR1</i> , <i>C11ORF10</i> und <i>VAMP3</i>	78

Abbildung 18 Rekonstitution der Transkriptniveaus von <i>ANRIL</i> , <i>ADIPOR1</i> , <i>C11ORF10</i> und <i>VAMP3</i> nach shRNA-vermitteltem knockdown und anschließender Tetracyclin-Depletion..	80
Abbildung 19 Relative Transkriptniveaus von <i>ANRIL</i> , <i>ADIPOR1</i> , <i>C11ORF10</i> , <i>VAMP3</i> und <i>CDKN2B</i> in stabil transfizierten T-REx-293 Zellen vor und nach Induktion des Transkriptes EU741058.	83
Abbildung 20 Relative Expressionsänderungen von <i>ANRIL</i> , <i>ADIPOR1</i> , <i>C11ORF10</i> , <i>VAMP3</i> und <i>CDKN2B</i> in humanen gingivalen Fibroblasten nach 48-stündiger Stimulation mit TGF- β	84
Abbildung 21 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von <i>ADIPOR1</i> , <i>C11ORF10</i> und <i>VAMP3</i>	86
Abbildung 22 $-\log_{10}$ p-Werte der assoziierten Region in <i>CAMTA1</i>	89
Abbildung 23 Kopplungsungleichgewicht der mit KHK und AgP assoziierten Region in <i>CAMTA1</i>	90
Abbildung 24 $-\log_{10}$ p-Werte der assoziierten chromosomalen Region um <i>C11ORF10</i>	91
Abbildung 25 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von <i>FGF4</i> , <i>GAL</i> und <i>CHRM1</i>	134
Abbildung 26 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von <i>DMRTA1</i> , <i>KFL4</i> und <i>ANXA1</i>	135
Abbildung 27 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von <i>GADD45A</i> , <i>SULT1C4</i> und <i>LIMS3</i>	136
Abbildung 28 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von <i>IL1B</i> , <i>ASB17</i> und <i>F3</i>	137
Abbildung 29 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von <i>GBP5</i> , <i>GFII</i> und <i>CDC7</i>	138
Abbildung 30 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von <i>BARHL2</i> , <i>INSIG2</i> und <i>DNTTIP</i>	139
Abbildung 31 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von <i>DPPA4</i> , <i>INHBB</i> und <i>PROC</i>	140
Abbildung 32 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von <i>PGRMC2</i> , <i>CTXN3</i> und <i>NDUFB4</i>	141
Abbildung 33 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von <i>PCDH18</i> , <i>NMUR2</i> und <i>ISOC1</i>	142
Abbildung 34 Konservierte Nukleotidsequenzen (KNS) in den genomischen Regionen von <i>EIF4H</i> , <i>IFNGR1</i> und <i>MAT2B</i>	143

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Verwendete Primer.	28
Tabelle 2	Verwendete Antikörper mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor.	33
Tabelle 3	Verwendete DNA/FuGENE Mengen.	36
Tabelle 4	Verwendete DNA/JetPEI Mengen.	36
Tabelle 5	Reaktionsansatz für die cDNA Synthese.	41
Tabelle 6	PCR-Ansatz mit der GoTaq-Polymerase.	42
Tabelle 7	PCR-Ansatz mit der Advantage-Polymerase.	42
Tabelle 8	Sequenzierungsansatz.	43
Tabelle 9	PCR-Ansatz für die qRT-PCR.	43
Tabelle 10	Beispielhafter Reaktionsansatz für Restriktionsverdau.	44
Tabelle 11	Beispielhafter Ligationsansatz.	45
Tabelle 12	Reaktionsansatz für die Ligation eines shRNA-Konstrukts in den entsprechenden Vektor.	47
Tabelle 13	Zusammensetzungen von Polyacrylamid Trenn- und Sammelgelen.	50
Tabelle 14	Zusammenfassung der Studienpopulationen.	56
Tabelle 15	Einfluss der gewählten Ausschlusskriterien auf die Anzahl der Hybridisierungssignale in den untersuchten Vergleichsgruppen.	66
Tabelle 16	Zusammenfassung der durch den 48-stündigen knockdown der kurzen <i>ANRIL</i> Varianten regulierten Gene. Alle Gene zeigten eine FDR < 1%, “keine Ausreißer“ und eine Expressionsänderung > +/- 1,5.	69
Tabelle 17	Zusammenfassung der durch den 96-stündigen knockdown der kurzen <i>ANRIL</i> Varianten regulierten Gene. Alle Gene zeigten eine FDR < 1%, “keine Ausreißer“ und eine Expressionsänderung > +/- 1,5.	70
Tabelle 18	Zusammenfassung der durch den knockdown der kurzen <i>ANRIL</i> Varianten regulierten Gene.	71
Tabelle 19	In hGFs nachgewiesene <i>ANRIL</i> Spleißvarianten.	81
Tabelle 20	Transkriptionsfaktorbindestellen in den konservierten Nukleotidsequenzen (KNS) von <i>ADIPOR1</i> , <i>C11ORF10</i> und <i>VAMP3</i>	87
Tabelle 21	Assoziationsstatistiken für SNPs in der <i>CAMTA1</i> Region und der <i>C11ORF9</i> , <i>C11ORF10</i> , <i>FADS1</i> und <i>FADS2</i> Region.	92

Tabelle 22 Gene die dem Prozess "Ossifikation während der Knochenreifung" zugerechnet werden können und eine signifikante Expressionsänderung 48 Stunden nach Tetracyclin-Induktion zeigten (FC)..... 132

Tabelle 23 Gene die dem Prozess "Ossifikation während der Knochenreifung" zugerechnet werden können und eine signifikante Expressionsänderung 96 Stunden nach Tetracyclin-Induktion zeigten (FC)..... 133

Abkürzungsverzeichnis

A.a.	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AgP	aggressive Parodontitis
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANRIL	antisense noncoding RNA in the INK4 locus
BMP	bone morphogenic protein
BMP2K	BMP-2 induzierbare Kinase
C11ORF9	chromosome 11 open reading frame 9
C11ORF10	chromosome 11 open reading frame 10
CAMTA1	calmodulin-binding transcription activator1
CBX7	Chromobox homolog 7
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B	cyclin dependent kinase inhibitor 2B
CNV	copy number variations
CP	chronische Parodontitis
CR	call rate
CRP	C-reaktives Protein
cSNP	kodierender SNP
dsRNA	doppelsträngige RNA
FADS 1-3	fatty acid desaturases 1-3
FC	fold change
FDR	false discovery rate
GLUT4	Glukosetransporters 4
GO	Gen-Ontologie
GWAS	genomweite Assoziationsstudien
H2AK119	Histon 2A an Lysin 119
H3K27	Histon 3 an Lysin 27
HEK293	human embryonic kidney 293 cells
hGF	humane gingivalen Fibroblasten
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM-1	interzellulären Adhäsionsmoleküls 1
IFN- γ	Interferon-Gamma

IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit
KNS	konservierte Nukleotidsequenzen
LD	linkage disequilibrium
LDL	low density Lipoprotein
lncRNA	Long non-coding RNA
LPS	Lipopolysaccharide
MAF	minor allele frequency, MAF
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
M-CSF	Makrophagen Kolonie stimulierende Faktor
MMP	Matrix Metalloproteinase
MTAP	Methyl-Thioadenosin-Phosphorylase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ncRNA	non-coding RNA
nsSNPs	nicht-synonymer SNP
OAS	Oligoadenylat-Synthetasen
OPG	Osteoprotegerin
OR	odds ratio
PER3	period circadian protein homolog 3
P.g.	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
P.i.	<i>Prevotella intermedia</i>
PITX2	Paired-like homeodomain transcription factor 2
PPAR- α	Proliferator-aktivierten Rezeptor- α
PRC1	Polycomb Repressor Komplex 1
PRC2	Polycomb Repressor Komplex 2
qRT-PCR	quantitativer Echtzeit PCR
RANK	Rezeptor Aktivators von NF- κ B
RANK-L	Rezeptor Aktivator von NF- κ B Ligand
RIG	Retinsäure induzierbares Proteins
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

shRNA	short hairpin
siRNA	small interfering RNA
SNP	single nucleotide polymorphism
STAT1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
SUZ12	Suppressor of Zeste 12
TGF- β	transforming growth factor beta
TLR	Toll-ähnlichen Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
VAMP3	Vesikel-assoziiertes Membranprotein 3
VCAM-1	vaskulären Adhäsionsmoleküls 1

Lebenslauf

Persönliche Daten

.....

Name	Gregor Bochenek
Geburtsdatum	10. Juli 1981
Geburtsort	Hindenburg, Polen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Wohnort	Sternwartstrasse 34 40223 Düsseldorf

Schulausbildung

.....

1988 - 1989	Szkoła podstawowa, Hindenburg, Polen
1989 - 1992	Von-Vincke-Grundschule, Hamm
1992 - 2002	Galilei-Gymnasium, Hamm, Abschluss: Abitur
2002 - 2003	Zivildienst, ASB Hamm

Studium

.....

10/2003 – 3/2006	Grundstudium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
4/2006 – 8/2009	Hauptstudium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg Abschluss: Diplom Prüfungsfächer: - molekulare Genetik - Biochemie - Zellbiologie - pharmazeutische Biologie

Promotion

.....

seit 4 / 2010	Institut für Klinische Molekularbiologie, Leitung: Prof. Dr. Stefan Schreiber, Arbeitsgruppe Zellbiologie, Prof. Dr. Philip Rosenstiel, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
---------------	--

Publikationen

.....

Bochenek G, Häslers R, El Mokhtari NE, König IR, Loos BG, Jepsen S, Rosenstiel P, Schreiber S, Schaefer AS (2013). 'The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10.' *Hum Mol Genet.* 2013 Nov 15;22(22):4516-27.

Schaefer AS, Bochenek G, Manke T, Nothnagel M, Graetz C, Thien A, Jockel-Schneider Y, Harks I, Staufenbiel I, Wijmenga C, Eberhard J, Guzeldemir-Akcakanat E, Cine N, Folwaczny M, Noack B, Meyle J, Eickholz P, Trombelli L, Scapoli C, Nohutcu R, Bruckmann C, Doerfer C, Jepsen S, Loos BG, Schreiber S.
(2013). 'Validation of reported genetic risk factors for periodontitis in a large-scale replication study.' *J Clin Periodontol.* 2013 Jun;40(6):563-72.

Arne S. Schaefer, Gregor Bochenek, Arne Jochens, David Ellinghaus, Henrik Dommisch Esra Guzeldemir, Christian Graetz, Inga Harks, Yvonne Jockel-Schneider, Ingmar Staufenbiel, Jörg Eberhard, Joerg Meyle, Peter Eickholz, Garry Linden, Naci Cine, Rahime Nohutcu, Engin Yilmaz, Ervin Weiss, Yael Hourri-Haddad, Fuad Iraqi, Mathias Folwaczny, Barbara Noack, Konstantin Strauch, Christian Gieger, Melanie Waldenberger, Annette Peters, Cisca Wijmenga, Wolfgang Lieb, Andre Franke, Philip Rosenstiel, Christof Doerfer, Corinna Bruckmann, CARDIoGENICS, Inke König, Søren Jepsen, Bruno G. Loos, Stefan Schreiber. 'Genome-wide Exploration for Shared Genetic Risk Factors of Atherosclerosis and Periodontitis adds *PLG*, *FURIN* and *TGFBRAP1* to *ANRIL* and *VAMP3/CAMTA1* and highlights the relevance of TGF- β signalling in the shared aetiology of both diseases.' *submitted*

Posterpräsentationen

.....

'ANRIL a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis' Bochenek G, Schaefer AS, Richter GM, Loos BG, Jepsen S, Schreiber S. Anlässlich des International Symposium of the Clinical Research Unit 208 „Aetiology and Sequelae of Periodontal Diseases - Genetic, Cell Biological and Biomechanical Aspects“ on September 17, 2010 in Königswinter-Bonn.

Vorträge

.....

'Funktionale Charakterisierung von ANRIL – Risikogen der Parodontitis und Atherosklerose'. Auf dem 4. Workshop der Klinischen Forschergruppe 208 „Ursachen und Folgen von Parodontopathien – genetische, zellbiologische und biomechanische Aspekte“ am 6. Juli 2012 in Bonn - Bad Godesberg.

'Funktionale Bedeutung der regulatorischen RNA ANRIL in der Ätiologie der Parodontitis und Atherosklerose'. Auf dem 5. Workshop der Klinischen Forschergruppe 208 „Ursachen und Folgen von Parodontopathien – genetische, zellbiologische und biomechanische Aspekte“ am 12. Juli 2013 in Bonn - Bad Godesberg.

Preise

.....

Miller Preis 2013, vergeben durch die DGZMK.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis eigständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass die Arbeit - abgesehen von der Beratung durch meine wissenschaftlichen Betreuer Prof. Dr. Philip Rosenstiel und PD Dr. Arne Schäfer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Zudem erkläre ich, keine früheren Promotionsversuche unternommen zu haben.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in internationalen Fachmagazinen veröffentlicht.

Kiel, den 17.12.2013

Gregor Bochenek

Danksagung

Zu allererst möchte ich Prof. Dr. Stefan Schreiber dafür danken, dass ich die Möglichkeit hatte am Institut für klinische Molekularbiologie an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel zu promovieren. Danken möchte ich aber vor allem auch meinen zwei Betreuern Prof. Dr. Philip Rosenstiel und PD Dr. Arne Schäfer, die mir stets durch ihren fachlichen und konstruktiven Rat bei der Erarbeitung meiner Promotionsarbeit zur Seite standen. Dr. Robert Häsler und Dorina Ölsner danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der genomweiten Expressionsprofilierung. Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Inke König für die Hilfe bei der Replikation der genetischen Befunde in dem CARDIoGRAM Datensatz bedanken. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Dr. Sören Jepsen und PD Dr. Henrik Dommisch für die Bereitstellung der primären gingivalen Fibroblasten und das stetige Interesse an meiner Arbeit. Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre möchte ich mich besonders bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Molekularbiologie, insbesondere den Mitarbeitern in den Laboren und meinen Kollegen in der Zellbiologie bedanken. Alexandra, Lilly, Benni, Marcel und Thies, euch danke ich für die erheiternden Stunden im und außerhalb des Büros. Nicht nur für das Korrekturlesen der Arbeit, sondern vor allem für die Ablenkung, glückliche Momente und das Verständnis danke ich besonders meiner Freundin Wiebke Lettau. Und nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, die in jeglicher Hinsicht die Grundsteine für meinen Weg gelegt haben und mich in allen Lebenslagen unterstützt haben.