Dkk1 beeinflusst quantitativ die Stabilität und Größe atherosklerotischer Plaques im Mausmodell

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Julia Dronka

aus Wuppertal

Wuppertal, Juli 2016

aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere (EMT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ulrich Rüther

Korreferent: Prof. Dr. Malte Kelm

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2016

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
1.EINLEITUNG	
1.1 ATHEROSKLEROSE	5
1.2 DER KANONISCHE WNT-SIGNALWEG UND SEINE ROLLE IN DER ATHEROSKLEROSE	9
1.4 DKK1 UND SEINE MÖGLICHE ROLLE IN DER ATHEROSKLEROSE	
1.3 DKK1 ALS ANTAGONIST DES WNT-SIGNALWEGES	
1.5 Apoe-/- Mausmodell der Atherosklerose	
1.6 Ziel dieser Arbeit	14
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 SALZFÄLLUNG VON DNA AUS SCHWANZSPITZEN	
2.2 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	15
2.3 GENOTYPISIERUNG DURCH PCR	
2.4 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	
2.5 TIERHALTUNG UND ZUCHT	
2.6 ZUCHT DER APOE ^{_/-} ; DKK1 ^{+/-} MAUSLINIE	
2.7 Provokation der Atherosklerose in den <i>Apoe-/-;Dkk1+/+</i> und <i>Apoe-/-;Dkk1+/-</i> Mä	AUSEN 19
2.8 Ermittlung der Körpermassenanteile	
2.9 ORGANISOLIERUNG UND PRÄPARATION DES TRUNCUS BRACHIOCEPHALICUS	20
2.10 Serumgewinnung	
2.11 MESSUNG VON BLUTPARAMETERN IM MAUSSERUM	
2.12 RNA-ISOLIERUNG AUS GEWEBE	
2.13 REVERSE TRANSKRIPTASE PCR/ cDNA SYNTHESE	
2.14 REAL-TIME PCR	
2.15 sqRT-PCRs	
2.16 DENSITOMETRISCHE BESTIMMUNG	25
2.17 ANFERTIGUNG VON PARAFFINSCHNITTEN	
2.18 HÄMALAUN EOSIN-FÄRBUNG VON PARAFFINSCHNITTEN	
2.19 ANFERTIGUNG VON GEFRIERSCHNITTEN	
2.20 Von Kossa-Färbung von Gefrierschnitten	
2.21 MOVAT'S-FÄRBUNG VON GEFRIERSCHNITTEN	
2.22 Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten	
2.23 Foto-Dokumentation	
2.24 Auswertung der Atherosklerotischen Plaques	
2.25 Auswertung der Daten	

3.ERGEBNISSE
3.1 ANALYSE DES PHÄNOTYPS VON APOE ^{-/-} ;DKK1+/- MÄNNCHEN NACH 18 WOCHEN AUF HOCH-
KALORISCHER DIÄT (HFD)
3.2 UNTERSCHIEDE IN DER MORPHOLOGIE ATHEROSKLEROTISCHER PLAQUES VON APOE-/-;DKK1+/-
MÄNNCHEN NACH 18 WOCHEN AUF HOCH-KALORISCHER DIÄT (HFD)
3.3 DIE ENTWICKLUNG VON ATHEROSKLEROSE IN MÄNNLICHEN APOE-/-;DKK1+/- MÄUSEN NACH EINEM
JAHR STANDARDFUTTER IST REDUZIERT IM VERGLEICH ZU <i>Apoe-/-;Dkk1+/+</i> Mäusen
4. DISKUSSION
4.1 DKK1 UND SEINE ROLLE IN DER ADIPOGENESE HABEN VERMUTLICH EINFLUSS AUF DAS
KÖRPERGEWICHT IN APOE ^{-/-} MÄUSEN
4.2 DKK1 UND WNT/B-CATENIN IN DER FRÜHEN UND SPÄTEN ATHEROGENESE
4.3 Morphologische Unterschiede der Atherosklerotischen Plaques
4.3.1 Die Dkk1-Heterozygotie führt zu einer vermehrten Ansammlung extrazellulärer Matrix
in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques und tendenziell dickeren fibrösen Kappen 49
4.3.1.1 Der Wnt-Signalweg in der Regulation der VSMCs50
4.3.1.2 Die Rolle von Dkk1 und Wnt in EZM-Produktion/Fibrose
4.3.2 Die Dkk1-Dosis hat Einfluss auf die Größe des nekrotischen Kerns
4.3.3 Die Rolle von Dkk1 in der Gefäßkalzifizierung
4.4 DKK1 UND WNT UND IHRE ROLLE IN DER INFLAMMATORISCHEN KASKADE UND DER MÖGLICHE
EINFLUSS AUF DIE ATHEROGENESE
4.5 WNT/B-CATENIN UNABHÄNGIGE WIRKUNG VON DKK163
5. AUSBLICK
6. ZUSAMMENFASSUNG
6. SUMMARY
7.ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS
8. LITERATURVERZEICHNIS
DANKSACUNC 85
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG
ANHANG

1.Einleitung

1.1 Atherosklerose

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sind trotz Rückläufigkeit mit 38,9 % nach wie vor die häufigste Todesursache in Deutschland (Statistisches Bundesamt; 2014). Die häufigsten Herz-Kreislauf Erkrankungen sind die koronare Herzkrankheit und der Schlaganfall (**Abb.1**).



Abbildung1: Krankheitsbedingte Sterberate von 1998-2013 bei Männern und Frauen Quelle: Gesundheitsberichterstattung des Bundes gemeinsam getragen von RKI und DESTATIS Berlin, November 2015

Beide Erkrankungen sind in den meisten Fällen eine Manifestation der Atherosklerose. Die Atherosklerose ist eine inflammatorisch induzierte Gefäßerkrankung der Arterien (R. Ross, 1999). Sie führt zu einer Veränderung der Gefäßwand, welche von der Intima, der innersten Gefäßschicht, ausgeht. Die Intima grenzt die Arterie zum Lumen ab und besteht aus dem Endothel und der Basalmembran. An die Intima grenzt die Media, die überwiegend aus glatten Muskelzellen besteht. Nach außen wird das Gefäß duch die Adventitia, eine Bindegewebsschicht, abgegrenzt. Zwischen Media und Intima liegt die *lamina elastica interna* und zwischen Media und Adventitia die *lamina elastica externa*.

Entwicklung atherosklerotischer Plaques

Zu Beginn der Atherogenese steht die Endotheldysfunktion, die durch Glucosestoffwechselstörung Hypertonie, Rauchen. und erhöhte Cholesterinspiegel begünstigt werden kann (Campuzano et al., 2003; Sorensen et al., 1994; Steinberg et al., 1996). Die Endotheldysfunktion führt zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels für Lipoproteine. Die Akkumulation von LDL (Low Density Lipoprotein) in der Intima ist der Beginn der Bildung der atherosklerotischen Läsion. LDL wird in der Intima gebunden und oxidiert, was zu einer verstärkten Einwanderung von Monozyten aus dem Blut in die Intima führt. Hier werden die Monozyten zu Makrophagen, welche das oxidierte LDL (ox-LDL) aufnehmen. Makrophagen die mit ox-LDL gesättigt sind werden als Schaumzellen bezeichnet. In dieser Phase spricht man von einem Xanthom oder Fettstreifen, welcher sich wieder zurückentwickeln oder aber wie folgt fortschreiten kann. Das Absterben der Schaumzellen führt zur Anhäufung von Zelltrümmern und zur extrazellulären Ablagerung der Lipide. Nun spricht man vom **Präatherom**, einem frühen Stadium eines atherosklerotischen Plagues. Durch die zerfallenden Schaumzellen werden Wachstumsfaktoren freigesetzt, die eine Proliferation und Migration glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima herbeiführen. Extrazelluläre Lipide und sterbende Schaumzellen lagern sich zum Lipidkern (nekrotischer Kern) zusammen. Der Lipidkern und die glatten Muskelzellen zwischen Lipidkern und Endothel sind Charakteristika eines Atheroms. In Folge lagern sich weitere Gefäßmuskelzellen unter dem Endothel an und bilden eine kollagenreiche Bindegewebsmatrix. Diese Schicht wird als fibröse Plaquekappe bezeichnet und verleiht dem Plaque Stabilität. Bei dieser fortgeschrittenen Läsion handelt es sich um ein Fibroatherom (Stary et al., 1995; Virmani et al., 2000).

Eine weitere präatherosklerotische Läsion neben dem Xanthom ist die Verdickung der Intima. Diese ist in erster Linie eine physiologische Adaption des Gefäßes an mechanischen Stress. Sie entsteht unabhängig von den Risikofaktoren der Atherosklerose durch Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC=*Vascular Smooth Muscle Cell*) und enthält keine Schaumzellen (Stary et al., 1992; Virmani et al., 2002). Die Verdickung der Intima ist kein Krankheitsbild, sind aber die physiologischen Bedingungen so, dass sich Atherosklerose entwickeln kann, dann entwickelt sie sich bevorzugt an Stellen an denen bereits eine Verdickung der Intima vorliegt (Stary et al., 1992).



Abbildung 2 : Schematische Darstellung der Plaque-Entwicklung in einer Arterie

Die Morphologie eines Plagues ist ausschlaggebend um eine Aussage über den Fortschritt der Erkrankung und die Gefährdung einer potentiellen Ruptur zu machen. Fortgeschrittene Plaques können sich in ihrer Zusammensetzung und damit auch in ihrer klinischen Relevanz stark voneinander unterscheiden. Es gibt Läsionen mit dünner oder dicker fibröser Kappe, die Größe und Lage des nekrotischen Kerns fällt unterschiedlich aus, es kann zu Verkalkungen oder Einblutungen innerhalb der Läsion kommen oder sich um eine rein fibröse Läsion handeln. Als instabil/vulnerabel gelten Plagues die eine dünne fibröse Kappe, eine große Zahl an Entzündungszellen und einen großen nekrotische Kern aufweisen (Libby & Aikawa, 2002). Bei diesen Plagues kommt es häufiger zu einer Plagueruptur. Solch eine Ruptur hat meist die Bildung eines Thrombus zur Folge und kann somit zum direkten Gefäßverschluss führen. Des Weiteren können sich gebildete Thromben auch lösen und mit dem Blutstrom in kleinere Gefäße transportiert werden, welche sie dann verschliessen und zum Infarkt im entspechenden Organ führen. Neben einer Ruptur, kann auch eine Erosion auf der Plaqueoberfläche zu einer Thrombenbildung führen (Zaman et al., 2000).

Atherosklerotische Plaques kommen häufig vor und können sich in nahezu allen Arterien des Körpers bilden. Je nach Stadium der Atherogenese und nach Morpologie des Plaques bleibt die Erkrankung klinisch unauffällig. In der frühen Atherogenese kommt es sowohl im Menschen, als auch im Mausmodell zu einer kompensatorischen Erweiterung der Gefäße (Glagov et al., 1987; Lutgens et al., 2001). Trotz der Plaquentwicklung bleibt das Lumen des Gefäßes also gleich groß, weil sich das Gefäß ausdehnt. Hat die Kompensation allerdings ihr Maximum erreicht, führt die Plaquebildung zur Verengung der Gefäße, der Stenose. Eine fortschreitende Stenose kann zu Durchblutungsstörungen der von der Arterie versorgten Körperteile oder Organe führen. Klinisch relevanter als die Stenose ist allerdings die Thrombenbildung durch Plaqueruptur oder Erosion.



Abbildung 3: Mögliche Entwicklung atherosklerotischer Plaques und ihre Folgen Original aus (Virmani et al., 2000)

Neben den äußeren Faktoren wie Adipositas und Rauchen, kann auch eine genetische Prädisposition zu den Risikofaktoren der Atherogenese gezählt werden. Zu den Risikogenen zählen unter anderem *APOE*, *ACE* und *Angiotensinogen* (Humphries & Morgan, 2004). So kann es dazu kommen,

dass ein Mensch mit genetischer Prädisposition schon bei wesentlich geringerer Ausprägung oder sogar ohne äußere Risikofaktoren, eher Atherosklerose entwickelt, als ein genetisch nicht vorbelasteter Mensch. Ein Ziel der Forschung an diesen Genen ist, ihr Zusammenspiel zu erkennen, pro- und auch anti-atherogene Gene zu entdecken und dieses Wissen einzusetzten um Atherosklerose frühzeitig zu verhindern und zu bekämpfen.

1.2 Der kanonische Wnt-Signalweg und seine Rolle in der Atherosklerose

In der Atherosklerose spielt der kanonische Wnt-Signalweg bei der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (Vascular Smooth Muscle Cells=VSMCs) eine wichtige Rolle. So kommt es zum Beispiel *in vivo* (im Rattenmodell) nach einer Verletzung des Gefäßes durch einen Ballonkatheder zur Proliferation der VSMCs durch Aktivierung des Wnt-Signalweges (X. Wang et al., 2002). Auch die Ligatur von Maus-Aorten zur Provokation der Intima-Verdickung führt zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges in Zusammenhang mit der VSMC-Proliferation (Tsaousi et al., 2011). *In vitro* führt oxidiertes LDL, welches zu Beginn der Atherogenese von besonderer Bedeutung ist, zur Aktivierung des Wnt-Signalweges in humanen glatten Gefäßmuskelzellen (Bedel et al., 2008). Auch in den Endothelzellen hat der Wnt/β-Catenin-Signalweg eine Wirkung. Er aktiviert die Proliferation der Endothelzellen und scheint auch eine Rolle bei der Adhärenz von Monozyten an Endothelzellen zu spielen (D. K. Lee et al., 2006; Masckauchan et al., 2005).

Wnt-Moleküle sind cysteinreiche Glykoproteine, die an Rezeptoren der Zielzelle binden und dort eine Signalkaskade auslösen können. In Abwesenheit von Wnt-Proteinen wird das zytoplasmatische β -Catenin konstant abgebaut. Für diesen Abbau verantwortlich ist der Axin-Komplex, der aus den Proteinen Axin, dem APC (Adenomatous Polyposis Coli) und der GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) besteht. GSK3 β und Casein-Kinase 1(CK1) phosphorylieren β -Catenin. Die Interaktion der Kinasen mit β -Catenin wird durch APC und Axin erleichtert. Phosphoryliertes β -Catenin wird ubiquitiniert und durch Proteasomen abgebaut



Abbildung 4: Schematische Darstellung des Wnt-Signalweges. Links: inaktiver Wnt-Signalweg. Ohne Wnt-Protein ist der Axin-Komplex aktiv und β-Catenin wird phosphoryliert und somit zum Abbau markiert. **Rechts:** aktiver Wnt-Signalweg. Das Wnt-Protein bindet an Fz und den LRP-Rezeptor, DvI wird rekrutiert und phosphoryliert, worauf der Axinkomplex inaktiviert und β-Catenin im Zytoplasma stabilisiert wird. **Original aus (MacDonald et al., 2009)**

Sekretierte Wnt-Proteine binden an Frizzled (Fz)-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Neben der Wnt-Frizzled-Interaktion benötigt der Wnt-Signalweg ein weiteres Transmembranprotein der Low Density Lipoprotein-Related Superfamilie (LDLR) LRP5/6. Durch die Bildung des Wnt-Fz-LRP5/6-Komplexes wird die Signalkaskade ins Zellinnere an das zytoplasmatische Protein Dishevelled (DvI) weitergeleitet. DvI kann direkt mit dem Frizzled-Rezeptor interagieren. Durch die Bindung von Wnt wird DvI an Frizzled rekrutiert und daraufhin phosphoryliert. Als Folge davon wird auch LRP5/6 phosphoryliert und Axin rekrutiert wodurch der Axin-Komplex aufgelöst wird. Es kommt zu einem Nicht-Abbau von β -Catenin im Zytoplasma, was zu dessen Akkumulation im Nukleus führt.

Im Zellkern fungiert β -Catenin als Koaktivator von Wnt-Zielgenen (**Abb.4**). Es interagiert mit Proteinen der Familie der *T-cell-factors* (Tcf) und *Lymphoid-enhancing-factors* (Lef). In Abwesenheit von Wnt-Signalen fungiert Tcf als Repressor von Wnt-Zielgenen indem es einen Komplex mit Groucho bildet.

β-Catenin im Kern bindet an Tcf und verdrängt Groucho und verwandelt so den Repressor-Komplex in einen Aktivator-Komplex (MacDonald et al., 2009; Niehrs, 2012).

1.4 Dkk1 und seine mögliche Rolle in der Atherosklerose

Wenige Studien haben bisher eine Verbindung zwischen Dkk1 und Atherosklerose untersucht. Ueland et al. wiesen einen erhöhten DKK1-Serumspiegel in Patienten mit Angina pectoris nach. Aktivierte Thrombozyten wurden als eine Quelle des erhöhten DKK1-Spiegels identifiziert. Zudem konnten sie zeigen, dass DKK1 aus den Thrombozyten in Endothelzellen in vitro die Expression inflammatorischer Zytokine aktiviert. Auch das Ausschalten des im Endothel exprimierten *DKK1* führte zu einer Verminderung der Zytokinexpression in den Endothelzellen. Ebenso wurde eine Korrelation zwischen der DKK1-Expression in atherosklerotischen Plaques von Patienten mit Carotisendarterektomie und dem Grad der vorhandenen Stenose festgestellt. Auch in atherosklerotischen Läsionen Apoe defizienter Mäuse konnte Dkk1-Expression nachgewiesen werden (Ueland et al., 2009). Kim et al. zeigten in ihrer Studie eine signifikant erhöhte DKK1-Serumkonzentration in Patienten mit koronarer Atherosklerose im Vergleich zu Patienten ohne Atherosklerose. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der DKK1-Konzentration im Serum und der Anzahl der atherosklerotischen Plagues bzw. dem fortschreitendem Stadium der Atherosklerose gezeigt werden. Zudem deckten sie einen Zusammenhang zwischen dem DKK1-Spiegel und der Kalzifizierung der Plaques auf. Patienten mit kalzifizierten Plaques hatten einen höheren DKK1-Serumspiegel als Patienten mit nicht kalzifizierten Plagues (K. I. Kim et al., 2011).

Eine neuere *in vitro* Studie zeigt den Effekt von DKK1 bei der Bildung von Schaumzellen. Demnach stimuliert ox-LDL die *DKK1*-Expression in Makrophagen. Eine Inhibierung mittels si-RNA von *DKK1* führt zu einer vermehrten Aufnahme von Lipiden in die Zelle, während eine Behandlung

der Makrophagen mit rekombinanten DKK1 die intrazelluläre Lipidtröpfchenbildung inhibiert (Y. Zhang et al., 2015).

Die *Dkk1*-Expression ist in der Atherosklerose verändert, welche Rolle Dkk1 in der Atherogenese hat, konnte jedoch bisher *in vivo* nicht festgestellt werden.

1.3 Dkk1 als Antagonist des Wnt-Signalweges

Die Dickkopf (Dkk)-Proteine sind sekretierte Wnt-Inhibitoren. Vier verschiedene *Dkk*-Gene (*Dkk1-4*) wurden in Vertebraten identifiziert (Krupnik et al., 1999; Monaghan et al., 1999).

Dkk1 ist der am besten charakterisierte Inhibitor des Wnt–Signalweges (Glinka et al., 1998). Das Dkk1-Protein bindet mit hoher Affinität an den LRP5/6-Rezeptor (Mao et al., 2001; Semenov et al., 2001) und an Kremen, ein weiteres Transmembranmolekül (Mao & Niehrs, 2003; Mao et al., 2002). Ältere Studien zeigten, dass Dkk1, LRP und Kremen einen ternären Komplex bilden, wodurch zunächst die Bindung von Wnt an LRP und Frizzled (Fzd) verhindert wird. Die inhibierende Wirkung von Dkk1 wird noch verstärkt indem der ternäre Komplex durch Endozytose internalisiert wird und somit die LRP-Rezeptoren von der Zelloberfläche entfernt werden (Mao et al., 2002). Neueren Studien zufolge findet keine Internalisierung der Rezeptoren statt (Semenov et al., 2008) und Kremen ist nicht immer an der Dkk1 gesteuerten Inhibition des Wnt-Signalweges beteiligt (Ellwanger et al., 2008). Demnach konkurriert Dkk1 mit Wnt um die LRP5/6 Bindestelle (**Abb.5**) und verhindert so die LRP5/6-Wnt-Frizzled-Interaktion (Semenov et al., 2001).

Die durch Dkk1 vermittelte Inhibition des Wnt-Signalweges spielt sowohl in der Emryonalentwicklung (Ang et al., 2004; Glinka et al., 1998; Mukhopadhyay et al., 2001), als auch im adulten Organismus eine wichtige Rolle (Aguilera et al., 2006; Yamabuki et al., 2007). Hier wird eine veränderte *DKK1-Expression* häufig in Krankheitsbildern festgestellt. So wiesen zum Beispiel Yamabuki et al. (2007) eine erhöhte *DKK1*-Expression in

Lungentumoren nach, die mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert wurde.



Abbildung 5: Schematische Darstellung der inhibitorischen Wirkung von Dkk1 auf den Wnt-Signalweg. Durch die Bindung von Dkk1 LRP5/6 wird an die Komplexbildung von Wnt-LRP-FZD verhindert und der kanonische Wnt-Signalweg inhibiert. Original aus (Saini et al., 2011)

Andere Studien zeigten eine epigenetische Repression der *DKK1*-Expression in Darmkrebs, Nierenkrebs und Gebärmutterhalskrebs (Aguilera et al., 2006; Hirata et al., 2011; J. Lee et al., 2008). *Dkk1* fungiert in Nierenkrebszellen als Tumorsupressorgen, da eine erhöhte Dickkopfexpression in diesen Zellen zum Zellzyklusarrest und zum induzierten Zelltod führt (Hirata et al., 2011). Die Expression von *Dkk1* wird unter anderem duch eine negative Rückkopplung des Wnt-Signalweges gesteuert. Das bedeutet, der kanonische Wnt-Signalweg selbst kann *Dkk1*-Expression aktivieren und reguliert sich damit zu einem gewissen Grad selbst (Chamorro et al., 2005; Lieven et al., 2014; Niida et al., 2004).

1.5 Apoe^{-/-} Mausmodell der Atherosklerose

Um die Atherosklerose molekular zu analysieren und zu verstehen wurden verschiedene Gene in Mäusen deaktiviert. Die *Apoe^{-/-}* Maus ist ein etabliertes Modell zur Analyse der Atherosklerose, da die Plaqueentwicklung und Plaquemorphologie der im Menschen sehr ähnlich ist. In der *Apoe^{-/-}* Maus entwickelt sich die Atherosklerose sowohl auf Standardfutter, als auch auf

hoch-kalorischer Diät (Nakashima et al., 1994; Reddick et al., 1994; Rosenfeld et al., 2000), wobei sich die Plaques früher und schneller auf hoch-kalorischer Diät entwickeln, wie es auch beim Menschen der Fall ist (Nakashima et al., 1994). Eine Aufgabe des Apoe-Proteins ist die Bindung und Entfernung von Triglyceriden, Phospholipiden und Cholesterin in Form sogenannter Remnants aus dem Blutplasma. Apoe bindet als Bestandteil der Lipoproteine an Rezeptoren der LDL-Rezeptor-related-Protein Familie, wie LRP1 und LRP8. In der Leber führt dies zur Rezeptor vermittelten Endocytose und zum anschließenden Abbau der Fette. Neben der *lipid clearance*, hat Apoe noch Einfluss auf die Proliferation der glatten Muskelzellen, das Immunsystem und Cholesterin-Efflux in Makrophagen (Getz & Reardon, 2009). *Apoe*^{-/-} Mäuse weisen gegenüber wildtypischen Mäusen einen 5fach erhöhten Cholesterinspiegel im Plasma auf (S. H. Zhang et al., 1992).

1.6 Ziel dieser Arbeit

In atherosklerotischen Plagues in der Maus und im Menschen wurde die Expression von *Dkk1* nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle von Dkk1 an der Atheroskleroseentwicklung analysiert werden. Hierzu wurde das etablierte Mausmodel für Atherosklerose die Apoe^{-/-} Maus mit der Dkk1 heterozygoten Mauslinie gekreuzt. Die Analyse von Dkk1--- Mäusen ist aufgrund embryonaler Lethalität nicht möglich. In dieser generierten Mauslinie soll die Auswirkung der um ca. 50 % reduzierten Dkk1-Expression (siehe Anhang: Abbildung I) auf die Plaqueentwicklung untersucht werden. Wenn die Dkk1-Dosis einen kritischen Faktor für die Atheroskleroseentwicklung darstellt, so wird in den Dkk1 heterozygoten Tieren eine geringere oder veränderte Ausprägung der Atherosklerose erwartet.

2. Material und Methoden

2.1 Salzfällung von DNA aus Schwanzspitzen

Die Mausschwanzspitzen wurden mit 750 μ l Schwanzspitzenpuffer und 35 μ l Proteinase K versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Zur Proteinfällung wurden dann 70 μ l gesättigte NaCl-Lösung zugefügt, invertiert und 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde abgenommen und mit 120 μ l Isopropanol versetzt, erneut gemischt und 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das Präzipitat wurde anschließend mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und in 200 μ l TE-Puffer gelöst.

Material:

Schwanzspitzenpuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 100 mM EDTA, pH 8.0

100 mM NaCl

1 % (w/v) SDS

Proteinase K (10 mg/ml)

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCI 1 mM EDTA, pH 8.0 (mit HCI eingestellt)

2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Bei der PCR (eng. *Polymerase Chain Reaction*) werden spezifische DNA-Abschnitte vervielfältigt. Dazu werden einzelsträngige Oligonukleotide (*Primer*) eingesetzt, die den zu amplifizierenden Bereich der DNA flankieren. Als Polymerasen wurden die GoTaq-Polymerase mit entsprechendem Puffer verwendet oder die im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere (EMT) hergestellte P-Taq.

Die PCR besteht aus drei wesentlichen Schritten, die 25-30 mal wiederholt werden.

- 1. Denaturierung
- 2. Anlagerung der Oligonukleotide (Hybridisierung)
- 3. Verlängerung der Primer durch die Polymerase (Elongation)

Der Denaturierungsschritt wird bei 95°C durchgeführt, dabei werden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge getrennt. Die Hybridisierungs-Temperatur hängt von der Länge und Basenzusammensetzung der Oligonukleotide ab und liegt meist zwischen 50°C und 70°C. Der Elongationsschritt wird bei 72°C durchgeführt. Die Dauer der einzelnen Schritte hängt dabei von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments ab.

Ein 20 µl PCR Ansatz bestand aus:

4 µl 5x Polymerase-Puffer (Promega)

je 1 µl Oligonukleotid (frw/rev) (10 pmol/µl)

4 µl dNTPs (1mM)

1 µI DMSO

0,2 µl Polymerase (5U/µl)

1 µl DNA-Template (20-100ng)

ad 20 µl ddH₂O

Material:

Eppendorf Mastercycler Personal

Eppendorf Mastercycler Gradient

DMSO (Dimethylsulfoxid) Merck

dNTPs : 10 mM dATP (Roche #1969064) 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP

GoTaq Polymerase System (Promega)

2.3 Genotypisierung durch PCR

Mit der DNA aus den Schwanzspitzen und spezifischen Oligonukleotiden für den *Dkk1* und *Apoe* Lokus wurden die Mäuse genotypisiert.

Oligonukleotide

<i>Dkk1</i> 1	5'AGA ACT AAC CCA GCC CCA CAG CAG A 3'
Dkk1 2	5'CTC CTC AGG GAA GAC AAC AAA GCC G 3'
Dkk1 3	5'GGG TCA ACT CCA AGT TCC ACC CAA A 3'
Apoe 1	5'GCC GCC CCG ACT GCA TCT 3'
Apoe 2	5'TGT GAC TTG GGA GCT CTG CAG C 3'
Apoe 3	5'GCC TAG CCG AGG GAG AGC CG 3'

PCR-Programm:

95°C 5 min 95°C 1 min 67°C/ 68°C 1 min 72°C 1 min 72°C 5 min

2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Die DNA-Fragmente wandern aufgrund ihres negativ geladenen Phospat-Rückgrats innerhalb eines angelegten Spannungsfeldes in Richtung des positiven Pols (Anode). Dabei bewegen sich kleine Fragmente schneller durch das Gel als große. Dazu wurden die DNA-Proben (PCR-Produkte) und ein entsprechender Größenmarker in die Taschen von Agarosegelen (0,8-2 % w/v) mit GelRed (1:10000) pipettiert und in einer Gelkammer, gefüllt mit TAE-Puffer, wurde dann konstante Spannung von 5 Volt/cm bei Raumtemperatur angelegt. Nach ca. 20-40 min Laufzeit wurden die Gele mithilfe einer UV-Lampe (254 nm) und Fotodokumentationsanlage fotografiert. Das sich an die DNA anlagernde GelRed wurdedurch das UV-Licht sichtbar und zeigte somit die DNA-Fragmente auf dem Gel an.

Material:

1 kb-DNA-Leiter (Invitrogen #15615-061) Lambda/HindIII-Marker (Stratagene, #201109) Agarose (Applichem) GelRed Nuclear Acid Gel stain (Biotium,#41003) TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat 2 mM EDTA

pH 8.2 (mit Essigsäure eingestellt)

2.5 Tierhaltung und Zucht

Die Tierhaltung und Zucht erfolgte in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. Die Haltung erfolgte unter konstanten Bedingungen mit einer Raumtemperatur von 22-24°C, 60-80 % Lufttemperatur und einem künstlich geschaffenen 12 stündigen Tag - Nacht - Rhythmus entsprechend der Haltungsbedingungen für Labortiere. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Eingriffe und Behandlung erfolgten nach Genehmigung des beantragten Versuchsvorhabens durch das Landesamt für Natur-, Umwelt-, und Verbraucherschutz NRW (LANUV).

2.6 Zucht der *Apoe^{-/-}; Dkk1*^{+/-} Mauslinie

Um $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}$ und $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}$ Tiere für die Analysen zu erhalten, wurden $Apoe^{+/+};Dkk1^{+/-}$ (gemischter Hintergrund) mit $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}$ (C57Bl6) Tieren gekreuzt. Die Nachkommen wurden genotypisiert und $Apoe^{+/-};Dkk1^{+/-}$ Tiere wurden wiederum mit $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}$ gekreuzt. Aus diesen Kreuzungen resultierten dann $Apoe^{-/-} Dkk1^{+/-}$ Tiere die für die Zucht verwendet werden konnten. Im Alter von 6 Wochen wurden $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}$ Mäuse in den Versuch genommen. Als Kontrolltiere wurden aus denselben Würfen $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}$ Tiere verwendet. Die Zucht der Mäuse gestaltete sich mitunter sehr schwierig, da die Zahl der Nachkommen klein war und die Würfe selten. Ob dies dem genetischen Hintergrund geschuldet ist, bleibt offen.

2.7 Provokation der Atherosklerose in den *Apoe^{-/-};Dkk1*^{+/+} und *Apoe^{-/-};Dkk1*^{+/-} Mäusen

Zur Provokation der Atheroskleroseentwicklung wurden männliche Geschwistertiere (*Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+} und Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}*) im Alter von sechs Wochen auf hoch-kalorische Diät (*eng.: High fat diet*; HFD) gesetzt und für weitere 18 Wochen mit dieser gefüttert. Da bekannt ist, dass Mäuse auf *Apoe^{-/-}* Hintergrund auch ohne HFD Atherosklerose entwickeln wurden des Weiteren männliche Mäuse beider Genotypen bis zum Alter von 11-12 Monaten auf Standardfutter (SF) gehalten.

HFD-Futter:

ssniff® EF R/M acc.TD88137 mod.Experimental diet for rodent with butter fat & cholesterol; Western Type Diet

2.8 Ermittlung der Körpermassenanteile

Die Ermittlung der Körperfett-Masse und der fettfreien Masse (Mager-Masse) erfolge mit einer NMR- (*engl.: Nuclear Magnetic Resonance*) Analyse. Die Mäuse wurden dazu nach der Anästhesie im Minispec analysiert.

Gerät: Minispec mq7.5 NMR Analyzer, Bruker

Software: OPUS 6.5, Bruker Minispec Plus

2.9 Organisolierung und Präparation des Truncus brachiocephalicus

Die Anästhesie der Mäuse wurde mittels Ketamin und Xylazin herbeigeführt. 120 mg/kg KG Ketamin und 16 mg/kg KG Xylazin wurden in einer entsprechenden Menge PBS verdünnt und intraperitoneal appliziert (Dosis: 10 ml/kg = 0,1 ml/10 g intraperitoneal). Nachdem die Narkosetiefe durch Testen der Reflexe sichergestellt wurde, wurde mit der Präparation begonnen.

Der Bauchraum wurde durch einen vertikalen Schnitt geöffnet und durch das Zwerchfell über Herzpunktion ca. 1 ml Blut aus dem schlagenden Herzen entnommen. Anschließend wurde der Brustraum geöffnet und die rechte Mikroschere angeschnitten. Über Herzvorkammer mit einer eine Schmetterlingsnadel, die in die linke Herzkammer eingeführt wurde, wurden 5 ml kaltes PBS langsam durch den Kreislauf gedrückt um das restliche Blut aus den Gefäßen zu spülen. Als nächstes wurde der Darm beiseite geschoben um die untere Hohlvene und die abdominale Aorta freizulegen. Mit Mikroschere und Pinzette wurde dann die abdominale Aorta freipräpariert, unterhalb der Gabelung in die beiden Hinterbeinarterien und oberhalb der Nieren abgetrennt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurden Herz, Lunge, Thymus, Aortenbogen mit Aorta ascendens und descendens im Verbund entnommen und unter dem Stereomikroskop voneinander getrennt. Von der freiliegenden Aorta wurde der Truncus brachiocephalicus am Aortenursprung abgetrennt und mit der Bifurkation nach oben in OCT Medium eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aorta wurde ebenfalls in Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurden weitere Gewebe wie Leber, Fett und Lunge ebenfalls schockgefroren und/oder für die histologische Analyse zur späteren Einbettung in Paraffin in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Material:

Ketavet® (100 mg/ml, Pfizer)

Rompun® (2 % Injektionslösung, Bayer)

2.10 Serumgewinnung

Das durch Herzpunktion entnommene Blut wurde bis zum Ende der Präparation auf Eis gelagert und anschließend 10 min bei 2000 Upm zentrifugiert. Das Serum wurde vorsichtig abgenommen und bei -80°C für weitere Analysen aufbewahrt.

2.11 Messung von Blutparametern im Mausserum

Die Messung der Serumspiegel von Cholesterin, Triglyceriden und Kalzium wurde extern im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Uniklinikums Düsseldorf durchgeführt.

2.12 RNA-Isolierung aus Gewebe

Für die RNA-Isolierung aus Zellen wurde das Rneasy Mini Kit (Qiagen) oder TRIzol® (life technologies) verwendet.

Für beide Verfahren wurde zunächst das Gewebe entweder mit Hilfe des Precellys® Homogenisators oder mit einem Mörser im 1,5 ml Reaktionsgefäß mechanisch dissoziiert.

Für die RNA-Extraktion mit dem Rneasy Mini Kit wurde die Gewebesuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 12 min bei 4°C >13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl 70 % Ethanol versetzt. Nach mehrmaligem Auf- und Ab-pipettieren wurde das gesamte Volumen in 700 µl Schritten auf die Säule gegeben und 15 s bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Darauf folgte ein Waschschritt in dem 350 µl RW-Puffer auf die Säule gegeben und erneut 15 s bei 13.000 Upm zentrifugiert wurde. Um sämtliche gebundenen DNA von der Säule zu entfernen wurden 10 µl DNase mit 70 µl RDD-Puffer mittig auf die Säule pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Waschschritt mit RW-Puffer wiederholt. Die Säule wurde auf ein neues 2ml Reaktionsgefäß gesetzt und zweimal wurden je 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut für 15 s bzw. 2 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um sämtliches Ethanol von der Säule zu entfernen wurde die Säule anschließend trocken zentrifugiert.

Um die RNA von der Säule zu eluieren wurden diese in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und 30 µl RNase freies Wasser mittig auf die Säule pipettiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt bei 13.000 Upm für 1 min wurde die gelöste RNA bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die RNA und Protein Extraktion mit TRIzol® erfolgte nach Hersteller Protokoll. Für 100 mg Gewebe wurde 1 ml TRIzol-Reagent eingesetzt und das Gewebe darin homogenisiert.

Material:

RNeasy Mini Kit (Qiagen #74104) Tischzentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415D 2–Mercaptoethanol (SIGMA) DNase (RNase free DNase Set, Qiagen #79254) TRIzol® (life technologies #15596026) Precellys®24 (# EQ03119.200.RD000.0)

2.13 Reverse Transkriptase PCR/ cDNA Synthese

Um eine Expressions-Analyse durchzuführen muss aus der isolierten RNA cDNA hergestellt werden. Diese kann dann mittels sqRT-PCR bzw. "Realtime" PCR quantifiziert werden. Dafür wurde zunächst die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt und dann je 1 μ g RNA für die "Reverse Transkriptase PCR" eingesetzt. Zur RNA wurden 2 μ l OligodT Primer (10 μ M) gegeben und mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10,5 μ l aufgefüllt. Dieser Mix wurde dann 10 min bei 65°C hybridisiert.

Danach wurden zu diesem Ansatz

2 µl NTPs (10 µM),

2 µl DTT

4 µl Reverse Transkriptions-Puffer

1 µl Reverse Transkriptase

0,5 µl RNase Inhibitor

gegeben und die Reaktiongefäße für 1 h auf 42°C gestellt wobei entlang der RNA-Matritzen cDNA synthetisiert wurde. Zur Kontrolle der DNase-Behandlung während der RNA-Isolierung wurde eine zusätzliche Probe ohne Reverse Transkriptase angesetzt. Bei erfolgreicher DNase-Behandlung darf bei dieser Probe in der folgenden PCR kein Produkt entstehen. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Material:

Eppendorf Mastercycler personal Reverse Transkriptase Kit (Roche # 11785834001) Primer p(dT)₁₅ (Roche # 10814270001) Ribonuclease Inhibitor (Stratagene # 300151) DEPC-H₂O (0,1 % Diethyl-Pyrocarbonat in dest. H₂O gelöst und autoklaviert)

2.14 Real-time PCR

Die "Real-time" PCR ist eine schnelle und einfache Methode zur Expressionsanalyse. Dabei wird die Expression des Gens von Interesse mit der eines sogenannten *"house-keeping*" Gens wie *Gapdh* verglichen. Als Template dient die cDNA, die mittels der RNA aus dem untersuchten Gewebe bzw. Zellen synthetisiert wurde. Das TaqMan "Real-time" PCR

System funktioniert über Fluoreszenzmessungen während der laufenden PCR. Die Taq-Man-Sonde besitzt an einem Ende einen Quencher, der die Fluoreszenz unterdrückt und am anderen Ende ein Fluorophor. Bei der Synthese des Gegenstranges baut die Polymerase die Sonde am 5' Ende ab und trennt so Quencher und Fluorophor voneinander wodurch dann Fluoreszenz gemessen werden kann. Zum Ende wird der sogenannte CT-Wert bestimmt. Das ist der Zyklus in dem das Amplifikat einen bestimmten Schwellenwert der Fluoreszenz überschritten hat. Je geringer dieser Wert ist, desto mehr cDNA war im Ansatz, d.h. die Expression des Genes im Gewebe war umso höher.

Material:

TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems)

Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

2.15 sqRT-PCRs

Oligonukleotide

Templa- te c-DNA	Sequenz	Frag- ment (bp)	Anneal- ing T°C	Zyk- len
HPRT fw	5´CAC AGG ACT AGA ACA CCT GC 3´	249	56	24-26
HPRT bw	5 GCT GGT GAA AAG GAC CTC T 3			
Axin2 fw	5 ´CTC CTT GGA GGC AAG AGC 3 ´	657	54	28-30
Axin2 bw	5 GGC CAC GCA GCA CCG CTG 3			
OPN fw	5 CAG AAT CTC CTT GCG CCA CA 3	265	61,4	26-28
OPN bw	5 CGA CTG TAG GGA CGA TTG GAG3			
Mgp fw	5 GCA ACC CTG TGC TAC GAA TCT 3	182	56,1	19-21
Mgp bw	5 TAG TCA TCG CAG GC CTC TCT 3			
Runx2 fw	5 CGC ATT CCT CAT CCC AGT AT 3	288	57	31-33
Runx2 bw	5 GGT GGC AGT GTC ATC ATC TG 3			

Die semiquantitativen RT-PCRs wurden bei den jeweils angegebenen Annealingtemperaturen durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass immer einer Intron überspannend ist. Um sicherzustellen, dass sich die PCR noch in der exponentiellen Phase befindet wurde bei jeweils drei Zyklenzahlen amplifiziert und ein Zyklus in der exponentiellen Phase zur densitometrischen Bestimmung ausgewählt.

2.16 Densitometrische Bestimmung

Die sqRT-PCRs wurden auf 1,5 %ige Agarosegele aufgetragen und unter der UV-Lampe fotografiert. Die Intensität der Banden wurde mit dem Programm Image J quantifiziert und als Menge an Expression gewertet. Die zu untersuchenden Gene wurden jeweils auf *Hprt*-Expression aus dem entsprechenden Gewebe bezogen und so die relative Expression bestimmt.

2.17 Anfertigung von Paraffinschnitten

Für genauere histologische Untersuchungen wurden die Organe nach der Fixierung zur Entwässerung in eine aufsteigende Ethanol-Reihe gegeben. Sie wurden über Nacht in 70 % EtOH und dann für je 2 h in 80 %, 90 %, 96 % und schließlich 100 % EtOH dehydriert. Nach Inkubation über Nacht in Butanol wurden die Organe für 2 h ins Paraffinbad gelegt an welches anschließend für 2 h Vakuum angelegt wurde, um zu ermöglichen, dass das Paraffin die gesamten Gewebeschichten durchdringt. Im Anschluss wurden die Organe in Paraffin eingebettet und die Blöcke über Nacht bei Raumtemperatur ausgehärtet. An einem Mikrotom wurden 9 µm dünne Schnitte angefertigt, für ca. 4 min im Wasserbad bei 50°C gestreckt und anschließend auf Objektträger gezogen. Die Objektträger wurden auf einer Heizplatte (45°C) für 5-10 min getrocknet und dann über Nacht bei 37°C aufbewahrt.

Material:

Mikrotom Leica RM2035 Paraplast Plus (Paraffin) (Leica) Ethanol abs. (Sigma) 1-Butanol (Grüssing)

2.18 Hämalaun Eosin-Färbung von Paraffinschnitten

Zunächst wurden die Schnitte in den Glasgondeln 3 mal für je 3 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Ethanol-Reihe gewässert. Dazu wurden sie je 2 min in 100 %, 96 %, 70 %, 50 % EtOH und zuletzt in ddH₂O gestellt. Für 20 s wurden die Schnitte in Eosin-Lösung gefärbt und anschließend kurz in ddH₂O gespült. Zum Eindeckeln ist es notwendig die gefärbten Schnitte wieder zu entwässern, deshalb wurden sie dann durch eine aufsteigende EtOH-Reihe geführt (je1 min in 70 %, 96 % 100 % EtOH und 2 min in Xylol) bevor sie mit Entellan und Deckglas eingedeckelt wurden.

Material:

Eosin: 96 % (v/v) Ethanol

2 % (v/v) Eosin G (Merck #1.5935.0100)

1 % (v/v) Essigsäure

die Lösung wurde filtriert

Xylol (Prolabo)

2.19 Anfertigung von Gefrierschnitten

Direkt nach der Präparation des *Truncus brachiocephalicus*, wurde dieser in OCT Einbettmedium mit der Bifurkation nach oben eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aufbewahrt wurden die OCT-Blöcke bei - 80°C. Im Kryostat wurden dann Schnitte von 6µm Dicke angefertigt. Der *Truncus* wurde von seinem Ursprung am Aortenbogen bis zur Bifurkation geschnitten und jeweils 3 Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgenommen und für die darauffolgenden Färbungen bei -20°C aufbewahrt.

2.20 Von Kossa-Färbung von Gefrierschnitten

Die von Kossa-Färbung dient der Detektierung von Kalziumablagerungen in Form von Kalziumphosphat in Zellen und Geweben. Hierbei werden Silberionen durch Phosphate ausgefällt und durch eine photochemische Reaktion kommt es zu der Braun/Schwarz-Färbung. Zur Färbung der Gefrierschnitte des Truncus brachiocephalicus, wurden die Schnitte zunächst 3 mal in destilliertem Wasser für je 3 Minuten gespült. Anschließend wurden die Schnitte auf den Obektträgern mit einem Fettstift umrandet und mit 1 %iger Silbernitratlösung benetzt. Unter einer UV-Lampe wurde die Reaktion für 20 Minuten katalysiert und danach wurden die Objektträger weitere 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Mit 5 %iger Sodium-Thiosulfatlösung wurden die Schnitte anschließend weitere 5 min inkubiert, nochmals kurz in destilliertem Wasser gespült und zuletzt mit Nuklear fast red Lösung für 5 Minuten gegengefärbt. Vor dem Abdecken der Präparate mit Entellan wurden die Schnitte wieder durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50 %;70 %,90 % und 100 % Ethanol für je 5 Minuten) entwässert und 5 Minuten im Intermedium Xylene inkubiert.

2.21 Movat's-Färbung von Gefrierschnitten

Die Movat's-Färbung dient der Färbung unterschiedlicher Strukturen im atherosklerotischen Plaque zur Auswertung der Plaquemorphologie. Die Gefrierschnitte wurden zunächst für 10 min bei 50°C in Bouin's-Lösung fixiert, anschließend 10 min in Leitungswasser gespült und dann kurz in destilliertes Wasser getaucht. Nach 5 min in 5 %iger Natrium-Thiosulfat-Lösung wurden die Schnitte erneut 3 mal kurz in destilliertem Wasser gespült. Der erste Färbeschritt erfolgte dann für 15 min in 5 %iger Alcian Blau-Lösung. Nach einem weiteren Waschschritt in Leitungswasser für 3,5 min und kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte 10 min in alkalinem Alkohol inkubiert und anschließend die Waschschritte in Leitungswasser und destilliertem Wasser wiederholt. In Movat's-Weigert's-Lösung wurden die Schnitte dann für 20 min gefärbt und nach 3 maligem Spülen in dest. Wasser (2 min, 2 min, 1 min) für 1 min in Crocein Scarlet/ Fuchsin-Lösung gefärbt. Nach erneutem 3maligen Spülen in dest. Wasser wurden die Schnitte für 5 min in 5 %ige Phosphotungstic-Säure gestellt und anschließend direkt für 5 min in 1 %ige Essigsäure. Daraufhin werden die Schnitte wieder 3 mal in dest. Wasser gespült und dann in 95 % Ethanol (1min) und 100 % Ethanol (2x1min) entwässert. Der letzte Färbeschritt erfolgte für 8 min in alkoholischer Safranlösung, anschließend wurden die Schnitte noch 2 mal in 100 % Ethanol gewaschen, 2 mal für 5 min im Intermedium Xylol inkubiert und zuletzt mit Cytoseal-Eindeckmedium eingedeckt. Das Cytoseal wurde über Nacht bei 37°C ausgehärtet.

Material:

Alcian Blue 25 g, Sigma # A5268 Ammonium Hydroxid 500 ml Sigma #A6899 Hematoxylin 25 g, Sigma #H9627 Feric Chloric Hexahydrate 100 g, Sigma #F2877 Iodine 100 g, Sigma #I2280 Potassium Iodid 100 g, Sigma # P8256 Crocein Scarlett 5 g, Sigma #C8822 Acid Fuchsin 25 g, Sigma #F8129 Phosphotungstic Acid 100 g, Sigma #P4006 Sodiumthiosulfat 5 g, Sigma #21726-3 Bouin's Solution 1 L, Sigma #HT10 Cytoseal mounting Medium, Microm # 8310-4 Saffran 5 g, Sigma #98381

2.22 Immunfluoreszenzfärbung von Gefrierschnitten

Für die Antikörperfärbung wurden die Gefrierschnitte 2 mal 15 min in PBT (0,3 %Triton in PBS) permeabilisiert. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und in einer feuchten Kammer mit 10 % Eselsserum in PBT(0,1 %Triton) für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Über Nacht

wurden die Schnitte dann mit dem spezifischen Erst-Antikörper (anti-Collagen II 1:50; anti-OPN 1:200) in der Blocklösung bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgekippt und die Schnitte 3 mal für 15 min in PBT(0,1 % Triton) gewaschen. Dann wurde der entsprechende Zweit-Antikörper in der Blocklösung verdünnt (1:200) und bei 37 °C im Dunkeln 3-4 Stunden auf den Schnitten inkubiert. Nach erneutem 3 maligen Waschen in PBT (0,1 % Triton) wurden die Schnitte mit Mowiol/DAPI eingedeckt und über Nacht im Dunkeln ausgehärtet.

Material:

Anti-Collagen II Antibody (Acris;R1039)

Anti-OPN Antibody (R&D Systems, AF808)

2.23 Foto-Dokumentation

Die Bilder von den Schnittpräparaten wurden mit dem Zeiss Stereomikroskop Stemi SV11 und dem Zeiss Axioskop2 über das Programm AxioVision aufgenommen. Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte in Photoshop und Image J.

2.24 Auswertung der atherosklerotischen Plaques

Der Stenosegrad wurde ermittelt indem die Plaqueflache durch die Lumenfläche dividiert wurde. Pro Tier wurden 4-5 Schnitte aus vergleichbaren Bereichen des *Truncus brachiocephalicus* vermessen und gemittelt. Für die Berechnung der Fläche des nekrotischen Kerns, wurden Cholesterin-Kristalle und alle anderen zellfreie Bereiche im Plaque vermessen und auf die Plaquefläche bezogen (Abb.6). Hierzu wurden jeweils 3 Movat's gefärbte Schnitte pro Tier analysiert. Zusätzlich wurden Bereiche im nekrotischen Kern, die von extrazellulärer Matrix ausgefüllt werden, vermessen. Dies sind die in der Movat's-Färbung gelblich gefärbten Bereiche, die eine fibrilläre Struktur aufweisen. Auch hier wurden jeweils 3 Movat's gefärbte Schnitte pro Tier analysiert. Als kalzifizierte Fläche wurde



der braun gefärbte Bereich der von Kossa-Färbung vermessen (Abb.6). Hier wurden 4-5 Schnitte/Tier aus vergleichbaren Bereichen analysiert.

Abbildung 6: A: Movat's-Färbung, Vermessung von Lumen, Plaque-Fläche und nekrotischem Kern B: Movat's-Färbung ,Vermessung der Plaque-Fläche und EZM Bereichs
C: Identifizierung Chondrozyten-ähnlicher Zellen im Plaque. Links Movat's-Färbung Rechts: Immunfärbung gegen Collagen II. D: von Kossa-Färbung des *Truncus brachiocephalicus*. Vermessung der Plaque-Fläche und der kalzifizierten Fläche.

Die Vermessung der fibrösen Kappe erfolgte jeweils im größten Plaque jedes Tieres. Dazu wurde die Schicht aus Zellen und EZM die auf dem nekrotischen Kern aufliegt vermessen und die dünnste und die dickste Stelle wurden dokumentiert. Die Identifizierung der Chondrozyten-ähnlichen Zellen erfolgte anhand der Movat's-Färbung und wurde durch eine Immunfärbung von Collagen Typ II bestätigt (Abb.6).



Abbildung 7:

Oben: Movat's-Färbung, Identifizierung eines lateralen Xanthoms (Pfeilspitze)

Unten: Movat's-Färbung, Identifizierung von Cholesterin-Kristallen (Pfeilspitzen)

2.25 Auswertung der Daten

Die gewonnenen Daten wurden mit Computerprogrammen wie Exel, Photoshop, Adobe Illustrater und Image J ausgewertet und beurteilt. Die Erstellung der Graphen und die statistische Auswertung erfolgte mit Prism 6 (graphpad). Hier wurden die gewonnenen Daten wenn möglich auf Normalverteilung getestet und mit den entsprechenden Tests (t-Test, Fisher Exact) wurden die p Werte ermittelt (* p<0,05). In den Säulendiagrammen ist der Mittelwert (Mean) und der Standardfehler (SEM) dargestellt. Unter den Graphen sind meist nochmal die Werte genannt (Mean±SEM).

3.Ergebnisse

3.1 Analyse des Phänotyps von Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Männchen

nach 18 Wochen auf hoch-kalorischer Diät (HFD)

Um zu ermitteln ob Dkk1 einen Einfluss auf die Atherogenese hat wurden männliche Apoe^{-/-}; Dkk1^{+/-} und Apoe^{-/-}; Dkk1^{+/+} Mäuse im Alter von 6 Wochen für 18 eine hoch-kalorische gesetzt Wochen auf Diät um Atheroskleroseentwicklung zu provozieren. Während der Analyse der ersten Mäuse fiel ein Unterschied im Körperumfang bzw. des Körpergewichts zwischen den Genotypen auf, woraufhin dieses bei den folgenden Tieren näher analysiert wurde. Dabei wurde festgestellt, dass die Dkk1 heterozygoten Tiere ein signifikant geringeres Körpergewicht aufwiesen (Abb.8). Um festzustellen ob die geringere Körpermasse mit einem geringeren Körperfettanteil zusammenhängt, wurde das epigonadale Fett (epigonadal White Adipose Tissue (eWAT)) der Tiere entnommen und gewogen. Auch hier wurde bei den Dkk1 heterozygoten Tieren ein signifikant geringeres Gewicht festgestellt. Histologische Untersuchungen ergaben, dass die Adipozyten im eWAT der Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Mäuse signifikant kleiner sind als die der Dkk1 wildtypischen Geschwistertiere (Anhang Abb.II). Andere Fettdepots hingegen wiesen keine Unterschiede im Gewicht auf (Abb.8). Für die Atheroskleroseentwicklung sind vor allem die Blutfettwerte ein entscheidender Faktor. Bei der Analyse der Cholesterin- und Triglyceridspiegel im Mausplasma konnte jedoch kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden (Abb.8). Da durch das Wiegen des epigonadalen Fettdepots nur ein Teil des Körperfettes berücksichtigt wurde, wurde bei weiteren Mäusen die Körperfett-Masse und die Mager-Masse der Mäuse analysiert. Hier konnte in beiden Fällen kein signifikanter Unterschied ausgemacht werden. Das geringere Körpergewicht der Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Mäuse ist nicht allein durch die geringere eWAT-Masse zu erklären. Es muss weitere Unterschiede geben die aber aufgrund fehlender Signifikanz an dieser Stelle nicht auszumachen sind.



Abbildung 8: Bestimmung phänotypischer Merkmale und Plasmaspiegel nach 18 Wochen auf HFD

Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Männchen nach 18 Wochen HFD weisen ein signifikant reduziertes Körpergewicht (p=0,0181) und eine signifikant geringere Masse epigonadalen Fettes (eWAT) (p=0,0162) im Vergleich zu den *Apoe^{-/-};Dkk1*^{+/+} Geschwistertieren auf. In der Körperlänge unterscheiden sich die Genotypen nicht. Auch in anderen Fettdepots wie dem mesenterialen und retroperitonealen Fett (Daten nicht gezeigt) konnte kein signifikanter Unterscheiden sich nicht zwischen den Genotypen und auch in der Körperfett-Masse und Mager-Masse liegt kein signifikanter Unterschied vor.

Der Gewichtsunterschied, den es zwischen den *Apoe^{-/-};Dkk1*^{+/+} und *Apoe^{-/-};Dkk1*^{+/+} Männchen auf HFD gibt, kann auch bei jüngeren Tieren auf Standardfutter festgestellt werden (**Abb.9**). Doch auch bei den 9 Wochen alten Tieren konnte bei Messung von Körperfett-Masse und Mager-Masse jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen ausgemacht werden (Daten nicht gezeigt). Auf *Apoe*^{+/+} Hintergrund mit Standardfutter gibt es jedoch keine Gewichtsunterschiede zwischen *Dkk1*^{+/+} und *Dkk1*^{+/-} Mäusen (**Anhang Abb. III**).



Abbildung 9: Bestimmung des Körpergewichts von *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+} und Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Männchen im Alter von 9 Wochen auf Standardfutter.

9 Wochen alte $Apoe^{-/2};Dkk1^{+/-}$ (24,69 ± 0,7444) Männchen weisen ein signifikant geringeres Körpergewicht im Vergleich zu ihren $Apoe^{-/2};Dkk1^{+/+}$ (27,55 ± 0,6141) Geschwistern auf (p=0,0078).

3.2 Unterschiede in der Morphologie atherosklerotischer Plaques von *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Männchen nach 18 Wochen auf hoch-kalorischer Diät (HFD)

Um herauszufinden wie sich die reduzierte *Dkk1*-Dosis auf die Atheroskleroseentwicklung auswirkt wurde der *Truncus brachiocephalicus* der Mäuse isoliert und histologisch analysiert. Wie auch bei der Analyse der Blutfettwerte konnte beim Grad der Stenose in den Gefäßen kein Unterschied zwischen den *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}* und *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Tieren festgestellt werden (**Abb.10**). Zur Berechnung der Stenose wurden je 4 Schnitte pro Tier aus vergleichbaren Stellen der *Trunci brachiocephalicus* vermessen und gemittelt. Auch die Vermessung der nekrotischen Kerne und

der kalzifizierten Flächen ergab keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Eine kalzifizierte Fläche >1% der Plaquefläche trat aber bei 33 % der $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}$ Kontrollen und damit ca. doppelt so oft im Vergleich zu den $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}$ Tieren (14 %) auf. Chondrozyten-ähnliche Zellen konnten in keinem Fall identifiziert werden und die Häufigkeit lateraler Xanthome und Cholesterin-Kristalle weist keinen Unterschied zwischen den Genotypen auf (**Tab.1**).



Abbildung 10: Vergleich der Stenose, der Größe des nekrotischen Kerns und dem Grad der Kalzifizierung bei den männlichen Mäusen zwischen $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}$ und $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}$ nach 18 Wochen HFD. A: Im Grad der Stenose gibt es keinen Unterschied zwischen $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}$ (67,13 ± 5,418) und $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}$ (67,38 ± 3,000) Mäusen (p=0,966). B: Movat's-Färbung von Gefrierschnitten des *Truncus brachiocephalicus* (Vergrößerung 100x). Auch der nekrotische Bereich des Plaques oder die Fläche der Kalzifizierung weisen keine signifikanten Unterschiede auf (p=0,767; p=0,670) (C,D)

18 Wochen HFD	Apoe ^{-/-} ;Dkk1 ^{+/+}	Apoe ^{-/-} ;Dkk1 ^{+/-}	р
	n=9	n=7	
Kalzifizierung	33 % (3/9)	14 % (1/7)	n.s.
laterale Xanthome	78 % (7/9)	57 % (4/7)	n.s.
Chondrozyten-ähnliche Zellen	0 % (0/9)	0 % (0/7)	n.s.
Cholesterin-Kristalle	33 % (3/9)	42 % (3/7)	n.s

Tabelle 1: Prozentuales Auftreten der Merkmale in den Plaques der jeweiligen Genotypen.

Kalzifizierungen <1% wurden ausser Acht gelassen

Die Vermessung der fibrösen Kappe ergab an der jeweils dünnsten Stelle keinen Unterschied. An der jeweils dicksten Stelle gibt es aber eine Tendenz zu einer dickeren fibrösen Kappe in den $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}$ Mäusen (**Abb.11**).



Abbildung 11: Vermessung der fibrösen Kappe.

Dünnste Stelle: *Apoe^{-/-};Dkk1*^{+/+} (8,930 ± 1,420) n=9; *Apoe^{-/-};Dkk1*^{+/-} (11,94 ± 2,101) n=6 p=0,237

Dickste Stelle: $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}$ (20,53 ± 2,648); $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}$ (30,54 ± 4,595) p=0,063

Bei der Analyse der nekrotischen Kerne in den Plaques wurde ein Unterschied in der Zusammensetzung der atherosklerotischen Plaques deutlich. In den *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}* Mäusen sind mehr Bereiche zu erkennen, die weder von Zellen oder nekrotischem Gewebe noch von extrazellulärer Matrix (EZM) ausgefüllt sind und den nekrotischen Kern löchrig erscheinen lassen. Die Bereiche, die völlig substanzfrei sind, sind in den *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}* Tieren signifikant größer (Daten nicht gezeigt). Um herauszufinden, welche Bestandteile in den Plaques der *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Tiere dann mehr vorhanden sind, wurden die Bereiche im Plaque vermessen die von EZM ausgefüllt sind,


diese sind durch die Movat's-Färbung gelblich gefärbt und haben eine fibrilläre Struktur.

Abbildung 12: Bestimmung der EZM-Menge im atherosklerotischen Plaque und der Wnt-Signalwegaktivität (sqRT-PCR) in der Aorta. A/B:EZM wird in der Movat's-Färbung gelblich gefärbt und hat eine fibrilläre Struktur. In den $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}$ (6,767 ± 1,369) Mäusen sind diese Bereiche signifikant größer als in den $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}$ Mäusen (3,191 ± 0,6367) (p=0,0228) 3 Schnitte/Tier. C: Die relative Axin2-Expression zeigt eine Tendenz (p=0,076) zur Erhöhung in den thorakalen Aorten der $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}$ Mäusen (1,172 ± 0,1806) im Vergleich zu den $Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}$ Mäusen (0,6897 ± 0,1667) D:Je höher die relative Axin2-Expression ist, desto mehr EZM ist vorhanden (Korrelationskoeffizient 0,433).

Die Vermessung ergab, dass die *Dkk1* heterozygoten Mäuse signifikant mehr EZM im Plaque aufweisen als ihre wildtypischen Geschwistertiere (**Abb. 12**). Die EZM-Menge korelliert mit der *Axin2*-Expression in der thorakalen Aorta

(Abb. 12). Dies könnte ein Hinweis auf eine *Wnt* gesteuerte Regulation der EZM-Menge sein.

Weder im Grad der Stenose, noch der Größe des nekrotischen Kerns weisen die *Apoe*^{-/-};*Dkk1*^{+/-} Mäuse Unterschiede zu den Kontrolltieren auf. Bei der Vermessung der fibrösen Kappe ist eine Tendenz zu einer dickeren fibrösen Kappe in den *Apoe*^{-/-};*Dkk1*^{+/-} Tieren zu erkennen. In der Morphologie der atherosklerotischen Plaques ist der einzig signifikante Unterschied die erhöhte Menge an EZM in den *Apoe*^{-/-};*Dkk1*^{+/-} Mäusen.

3.3 Die Entwicklung von Atherosklerose in männlichen *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäusen nach einem Jahr Standardfutter ist reduziert im Vergleich zu *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}* Mäusen

Apoe^{-/-} Mäuse entwickeln auch auf Standardfutter (SF) Atherosklerose. Um herauszufinden ob die *Dkk1*-Heterozygotie ohne HFD andere oder weitere Auswirkungen auf die Atherogenese hat, wurden männliche Mäuse beider Genotypen auch nach einem Jahr auf SF analysiert. Im Gegensatz zu den Tieren auf HFD weisen die Tiere nach einem Jahr auf SF keinen signifikanten Unterschied im Körpergewicht auf. Auch bei der Masse des epigonadalen Fettes und den Blutfettwerten unterscheiden sich die beiden Genotypen nicht voneinander (**Abb.13**).



Abbildung 13: Bestimmung phänotypischer Merkmale und Plasmaspiegel nach einem Jahr auf Standardfutter. $Apoe^{-/-}$; $Dkk1^{+/-}$ Männchen, die 1 Jahr mit Standardfutter gefüttert wurden, zeigen im Gegesatz zu den Tieren auf HFD, keinen Unterschied im Körpergewicht im Vergleich mit ihren $Apoe^{-/-}$; $Dkk1^{+/+}$ Geschwistertieren. Auch in der Fettmasse und den Plasmaspiegeln der Blutfette konnte kein Unterschied detektiert werden.



Abbildung 14: Bestimmung des Grads der Stenose in $Apoe^{-/-};Dkk1^{*/+}$ und $Apoe^{-/-};Dkk1^{*/-}$ Männchen nach 1 Jahr auf Standardfutter. Beim Vermessen der Plaquegrößen und des Truncuslumen zeigen die $Apoe^{-/-}$; $Dkk1^{+/-}$ Tiere eine signifikant geringere Stenose (34,67 ± 7,221) im Vergleich mit den $Apoe^{-/-};Dkk1^{*/+}$ Mäusen (56,90 ± 4,534) (p=0,0243). Bei der Analyse der Trunci hingegen zeigt sich, dass der Stenosegrad in den *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Tieren signifikant geringer ist im Vergleich zu dem der *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}* Mäuse (**Abb.14**).

Die histologische Analyse der atherosklerotischen Plaques zeigte auch morphologische Unterschiede in der Plaquezusammensetzung. So ist der nekrotische Kern in den *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäusen signifikant kleiner im Vergleich zu dem in den *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}* Mäusen (**Abb.15**).



Abbildung 15: Vermessung der Größe der nekrotischen Kerne den in atherosklerotischen Plaques nach einem Jahr Standardfutter. **A**: Die atherosklerotischen Plaques der Apoe^{-/-}: $Dkk1^{+/-}$ (4,573 ± 2,570) Tiere weisen einen signifikant kleineren nekrotischen Bereich im Vergleich zu den Apoe--;Dkk1++ (20,14 ± 4,765) Tieren auf (p=0,049). B: Movat's-Färbung von Gefrierschnitten des Truncus brachiocephalicus.

Je 3 Schnitte /Tier wurden mittels der Movat's-Färbung auf morphologische Unterschiede hin untersucht. *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Tiere weisen in den untersuchten histologischen Schnitten keine Cholesterin-Kristalle und keine Chondrozyten-ähnlichen Zellen auf. Die Anzahl der Schnitte die eine Kalzifizierung zeigen ist mit rund 22 % wesentlich geringer als bei den *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}* Mäusen (58 %)(Daten nicht gezeigt).

Bei den Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Mäuse ist die atherosklerotische Entwicklung teilweise nur bis zu einer Ansammlung von Schaumzellen, manchmal mit

eingewanderten VSMCs fortgeschritten (Xanthom-Präatherom). In den *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}* Mäusen ist bei allen ein fortgeschrittenes Fibroatherom vorhanden. Hier konnten teilweise Chondrozyten-ähnliche Zellen, Cholesterin-Kristalle und laterale Xanthome an den Plaqueschultern nachgewiesen werden.

Tabelle	2:	Prozentuales	Auftreten	der	Merkmale	in	den	Plaques	der	jeweiligen
Genotyp	oen.									

1Jahr Standardfutter	Apoe ^{-/-} ;Dkk1 ^{+/+}	Apoe ^{-/-} ;Dkk1 ^{+/-}	
	n=4/6	n=3/5	р
Kalzifizierung	66 % (4/6)	40 % (2/5)	n.s.
laterale Xanthome	75 % (3/4)	33 % (1/3)	n.s.
Chondrozyten-ähnliche Zellen	75 % (3/4)	0 % (0/3)	n.s.
Cholesterin-Kristalle	100 % (4/4)	0 % (0/3)	* 0,029

Bei den Cholesterin-Kristallen gibt es einen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit zwischen den Genotypen. Kalzifizierungen <1 % der Plaquefläche wurden ausser Acht gelassen.

Aufgrund der Rolle von Dkk1 in der Regulierung der Knochendichte (Pinzone et al., 2009) und dem Zusammenhang zwischen Osteoporose und der Kalzifizierung von Gefäßen (Schulz et al., 2004) war die Untersuchung der Kalzifizierung der atherosklerotischen Plaques naheliegend. Da sich schon in der Movat's-Färbung Unterschiede in der Zahl der Schnitte mit Kalzifizierung herausgestellt haben, wurden mit der von Kossa-Färbung die Flächen der Kalzifizierung in den beiden Genotypen miteinander verglichen. Aufgrund der hohen Standardabweichung und der geringen Tierzahl konnte hier kein signifikanter Unterschied in der kalzifizierten Fläche festgestellt werden (**Abb.16**). Lässt man die Mikrokalzifizierungen in den Plaques ausser acht, und betrachtet nur die Tiere mit einer kalzifizieren Fläche >1 % des Plaques, so weisen 4 von 6 (66,67 %) *Dkk1* wildtypischen Mäusen aber nur 2 von 5 (40 %) *Dkk1* heterozygoten Mäusen eine Kalzifizierung >1 % der Plaquefläche auf. Auch wenn bisher keine Signifikanz erreicht ist, ist doch eine Tendenz zu Unterschieden in der Kalzifizierung zu erkennen.



Abbildung 16: Vergleich der kalzifizierten Flächen in den atherosklerotischen Plaques nach einem Jahr auf Standardfutter. Mittels von Kossa-Färbung wurde die Kalzifizierung im *Truncus brachiocephalicus* sichtbar gemacht. A: Bei den $Dkk1^{+/-}$ Mäusen wurde bei 2 von 5 (40 %) Tieren eine Kalzifizierung (>1 %) festgestellt, in den $Dkk1^{+/+}$ in 4 von 6 (66,6 %). In der Fläche der Kalzifizierung ist eine Tendenz zur Verringerung in den heterozygoten Tieren (0,8460 ± 0,5676) im Vergleich zu den Wildtypischen zu erkennen (3,932 ± 1,965)(p=0,2001) (A,B). B: von Kossa-Färbung atherosklerotischer Plaques der beiden Genotypen.

In molekularen Analysen der thorakalen Aorten wird der Unterschied der Kalzifizierung deutlicher. Die ermittelte Expression der Markergene *Mpg* (*Matrix-Gla-Protein*), *Opn* (*Osteopontin*) und *Runx2* (*Runt-related transcription factor 2*) ist in den *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäusen reduziert im Vergleich zu den *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}* Mäusen (**Abb.17**). *Runx2* ist hierbei ein Marker für Osteoblastenreifung. *Mgp* und *Opn* sind Kalzifizierungsinhibitoren, die in kalzifizierten Plaques verstärkt expimiert werden (Speer et al., 2009; Trion & van der Laarse, 2004).



Abbildung 17: Expression der Kalzifizierungsmarker in den thorakalen Aorten (sqRT-PCR).

Matrix-Gla-Protein, Osteopontin und *Runx2* als Kalzifizierungsmarker sind in den *Apoe*^{-/-};*Dkk1*^{+/-} Aorten reduziert exprimiert (p=0,08; p=0,07; p=0,05).

Die *Dkk1*-Heterozygotie führt nach einem Jahr SF bei den Mäusen zu einer geringeren Atheroskleroseentwicklung. Die atherosklerotischen Plaques sind weniger weit entwickelt und weisen eine geringere Stenose und einen kleineren nekrotischen Kern auf. Ebenfalls wird eine Tendenz zu einer geringeren Kalzifizierung deutlich.

4. Diskussion

4.1 Dkk1 und seine Rolle in der Adipogenese haben

vermutlich Einfluss auf das Körpergewicht in Apoe^{-/-}Mäusen

In den Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Männchen führen 18 Wochen HFD zu signifikanten Unterschieden im Körpergewicht und der eWAT-Masse (Abb.6). Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Adipozyten im eWAT der Apoe^{-/-}:Dkk1^{+/-} Mäuse auf HFD signifikant kleiner sind als die der Apoe^{-/-}:Dkk1^{+/+} Mäuse (Anhang Abb.II). Die errechnete Gesamt-Adipozytenzahl im eWAT ist, bedingt durch die geringere eWAT-Menge, allerdings kleiner als bei den Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+} Mäusen (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Körperfett-Masse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Die nicht vorhandenen Unterschiede in den übrigen Fettdepots haben wohl den vorhandenen Unterschied im eWAT nivelliert. Insgesamt ist anzunehmen, dass sowohl Körperfett-, als auch Mager-Masse in den heterozygoten Tieren reduziert sind. Die Mittelwerte liegen in beiden Fällen unter denen der Kontrolltiere (Abb.8) Dass der Gewichtsunterschied nur für das eWAT und nicht für die anderen viszeralen Fettdepots gezeigt werden konnte, könnte an der Verschiedenheit dieser Fettdepots liegen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass je nach Lage der Fettdepots diese sehr unterschiedlich in Genexpression und Wachstum sein können (DeClercq et al., 2016; Rosen & Spiegelman, 2014; Tchkonia et al., 2013).

Da der Gewichtsunterschied auch in jungen Tieren auf SF zu sehen ist (**Abb.7**), scheint dieser nicht durch die HFD bedingt zu sein. Der Unterschied ist allerdings nur auf *Apoe*^{-/-} Hintergrund zu beobachten, die *Dkk1*-Heterozygotie alleine führt nicht zu einem Gewichtsunterschied (Anhang Abb.III). Das Apoe-Protein wird unter anderem in der Leber, dem Gehirn, Adipozyten, Makrophagen und den Blutgefäßen gebildet. Apoe- und Wnt-Liganden haben Rezeptoren die miteinander verwandt sind. Eine mögliche Überschneidung ihrer Bindungspräferenzen ist aber nicht bekannt.

Bekannt ist hingegen, dass ein aktivierter Wnt-Signalweg die Adipogenese inhibiert, indem adipogene Transkriptionsfaktoren wie C/EBPa und PPARy inhibiert werden (Bennett et al., 2002; S. E. Ross et al., 2000). Diese Faktoren werden für die Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten benötigt. Eine Überexpression von Dkk1 hingegen erhöht die Adipogenese in vitro (Morvan et al., 2006). In den Dkk1 heterozygoten Tieren liegt eine geringere Dkk1-Expression vor (Anhang Abb.I) und somit ist dort potentiell auch die Adipogenese beeinflusst. Jedoch ist dies auch auf Apoe^{+/+} Hintergrund der Fall und hier konnten diese Unterschiede im Körpergewicht nicht nachgewiesen werden. Eine aktuelle Studie an Ratten konnte zeigen, dass hyperlipidämisches Plasma in der Lage ist den Wnt-Signalweg in VSMCs zu aktivieren (Zhuang et al., 2016). Da Apoe^{-/-} Mäuse generell einen erhöhten Lipidspiegel im Blut aufweisen (S. H. Zhang et al., 1992), kann man vermuten, dass es zu einer systemischen Aktivierung des Wnt-Signalweges in diesen Mäusen kommt. Zusammen mit der Dkk1-Heterozygotie könnte ein Schwellenwert überschritten werden und zur Inhibierung der Adipogenese führen. Die Adipozyten des eWAT in den Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Tieren sind kleiner und in geringerer Anzahl vorhanden. Demnach scheint sowohl die Adipogenese als auch die Fetteinlagerung in die Zellen verändert zu sein. Dies ist möglicherweise sowohl eine Erklärung für das geringere Körpergewichte in den *Dkk1^{+/-}* Tieren auf *Apoe^{-/-}* Hintergrund als auch dafür, warum dies nicht auf Appe^{+/+} Hintergrund zu sehen ist. Bei den Appe^{-/-} ;Dkk1^{+/-} Tieren, die 1 Jahr mit Standardfutter gefüttert wurden, konnte der Gewichtsunterschied nicht mehr festgestellt werden. Eventuell spielen hier altersbedingte Veränderungen eine Rolle.

4.2 Dkk1 und Wnt/β-Catenin in der frühen und späten

Atherogenese

Bisherige Studien über *Dkk1* und Atherosklerose, ließen die Frage offen, ob die erhöhte *Dkk1*-Expression in atherosklerotischen Plaques (Ueland et al., 2009) und die erhöhte DKK1-Menge im Blut von Patienten (K. I. Kim et al., 2011) eine Ursache der Atherogenese oder eine Folge dieser sind. Die 45

Diskussion

vorliegende Arbeit hatte zum Ziel mittels der Dkk1 heterozygoten Maus zur Aufklärung dieser Fragestellung beizutragen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine geringere Dkk1-Dosis und die damit verbundene Aktivierung des Wnt-Signalweges die Ausprägung der Atherosklerose verringern. In Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Mäusen zeigten sich nach einem Jahr SF signifikante Unterschiede im Grad der Stenose im Vergleich zu den wildtypischen Mäusen (Abb.14). Es scheint, als gäbe es in der Atherogenese eine zeitliche Verzögerung durch die Heterozygotie. Der Stenosegrad in den heterozygoten Tieren liegt im Mittel 22,2 % unter dem der Dkk1 wildtypischen Mäuse. Bei den Tieren auf HFD zeigte sich zwischen den Genotypen (Apoe^{-/-} ;Dkk1^{+/+} und Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}) kein Unterschied in der Ausprägung der Stenose. Diese Beobachtung kann der Tatsache geschuldet sein, dass nach 18 Wochen auf HFD eine sehr weit fortgeschrittene Plaqueentwicklung zu beobachten ist und somit eventuelle Unterschiede zwischen den Genotypen möglicherweise nivelliert werden. Zu einem früheren Zeitpunkt könnte somit unter Umständen ein Unterschied auszumachen sein.

Andere Studien haben bereits die Wirkung eines veränderten Wnt-Signalweges auf die Atherogenese gezeigt. So kommt es in *LRP5*^{-/-} Mäusen, in denen der Wnt-Signalweg beeinträchtigt ist, zu einer verstärkten Bildung atherosklerotischer Plaques (Magoori et al., 2003). Dies stimmt mit dem Ergebnis dieser Arbeit überein, dass die Heterozygotie eines Wnt-Antagonisten die Plaquebildung verringert. Die Ausprägung der Plaquentwicklung scheint demnach Wnt beziehungsweise Dkk1 abhängig zu sein.

Die Rolle von Dkk1 und Wnt in der frühen Atherogenese wurde unter anderem von Zhang et al. untersucht. Sie konnten *in vitro* zeigen, dass ox-LDL die *Dkk1*-Expression in Makrophagen aktiviert, und dass Dkk1 die Aufnahme von ox-LDL und damit die Schaumzellbildung inhibiert (Y. Zhang et al., 2015). Dkk1 wäre in diesem Fall zu Beginn der Atherosklerose ein antiatherogener Faktor indem er die Schaumzellbildung verhindert, jedoch bleibt die Frage offen, was das freie nicht aufgenommene ox-LDL für eine Wirkung in der Intima hat. Die Gruppe um Borell-Pages hat auch eine positive Wirkung des Wnt-Signalweges auf die Schaumzellbildung zeigen können. Sie zeigten, dass LRP5 durch aggregiertes LDL in Makrophagen aktiviert wird und die Schaumzellbildung fördert (Borrell-Pages et al., 2011). Die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen scheint ebenso durch einen aktivierten Wnt-Signalweg begünstigt zu sein (D. K. Lee et al., 2006). Diese Resultate unterstützen die These, dass der Wnt-Signalweg wie auch bei seiner Rolle in der VSMC- Proliferation (Siehe 4.3.1.1), im ganz frühen Stadium die Entstehung der Atherosklerose begünstigt aber später für Stabilisierung sorgt.

Über den Wnt-Signalweg in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques ist bisher wenig bekannt. Lediglich Wnt5a, ein Ligand des nicht kanonischen Wnt-Signalweges, wurde etwas näher untersucht. Die Expression von WNT5a wurde sowohl in humanen Plaques als auch in Plaques Apoe defizienter Mäuse in Regionen reich an Makrophagen nachgewiesen (Christman et al., 2008). Zwei Studien zeigen, dass WNT5a-Expression in humanen Plagues positiv mit deren Fortschritt korelliert (Bhatt et al., 2012; Malgor et al., 2014). In Makrophagen wird die WNT5a-Expression durch ox-LDL stimuliert (Bhatt et al., 2012) und auch im Serum von Patienten mit Atherosklerose wurde im Vergleich mit gesunden Kontrollen signifikant mehr WNT5a gefunden (Malgor et al., 2014). In vitro Analysen zeigen, dass nicht kanonische Wnt-Liganden wie Wnt5a/b den kanonischen Wnt-Signalweg inhibieren können (Ishitani et al., 2003; Kanazawa et al., 2005; Maye et al., 2004; Topol et al., 2003). Auch in vivo konnte in der Gliedmaßenknospe der Maus gezeigt werden, dass die β -Catenin-Expression ansteigt wenn Wnt5a fehlt (Topol et al., 2003). Geht man davon aus, dass Wnt5a pro-atherogene Wirkung hat und auch in atherosklerotischen Plaques den kanonischen Wnt-Signalweg inhibiert, hieße das im Umkehrschluss, dass der kanonische Wnt/β-Catenin-Signalweg anti-atherogen wirkt. Auch die Beobachtungen von Magoori et al. unterstützen diese Vermutung. Sie haben gezeigt, dass Apoe^{-/-} ;LRP5^{-/-} Mäuse verstärkt Atherosklerose im Vergleich zu Apoe^{-/-};LRP5^{+/+} Mäusen entwickeln (Magoori et al., 2003). Im Menschen wurde eine Mutation des LRP6 Gens mit CAD (Coronary Artery Disease) in Verbindung gebracht und auch hier kommt es zu einer Beeinträchtigung des Wnt-Signalweges (Mani et al., 2007). Ein beeinträchtigter Wnt-Signalweg wirkt demnach atherogen. Dies unterstützt das Ergebnis dieser Arbeit, dass ein überaktivierter Wnt-Signalweg, wie er in den *Apoe^{-/-}; Dkk1^{+/-}* Mäusen vorliegt, die Atheroskleroseentwicklung insgesamt vermindert und zu stabileren Plaques führt.

Eine aktuelle Studie in Ratten zeigt, dass erhöhte Plasmaspiegel von Cholesterin und Triglyceriden positiv auf die Aktivierung des Wnt-Signalweges wirken. Ratten auf HFD zeigten hier eine erhöhte Proliferationsrate in den VSMCs der thorakalen Aorten im Vergleich zu Aorten aus Ratten auf SF. Gleichzeitig wurde auf mRNA und Proteinebene gezeigt, dass mehrere Faktoren des Wnt-Signalweges (Wnt3a, β -Catenin, Tcf4 und der Proliferationsmarker CyclinD1) in den Aorten aus HFD-Ratten signifikant vermehrt exprimiert werden. Auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass Serum aus HFD-Ratten im Gegensatz zu Serum aus SF-Ratten die Proliferation von VSMCs aktiviert und zur Aktivierung der Expression der genannten Faktoren des Wnt-Signalweges führt. Die gleichzeitige Zugabe von Dkk1 zu Serum aus HFD-Ratten verminderte die Proliferationsrate der VSMCs signifikant und verminderte auch die Expression von Wnt, β -Catenin, Tcf-4 und CyclinD1 auf mRNA und Proteinebene (Zhuang et al., 2016).

Diese Studie lässt annehmen, dass in *Apoe^{-/-}* Mäusen, aufgrund des erhöhten Lipidspiegels im Blut, der Wnt-Signalweg in den Aorten generell stärker aktiviert ist als in *Apoe^{+/+}* Mäusen. Da der Faktor, der den Wnt-Signalweg aktiviert, im hyperlipidämischen Plasma zu finden ist stellt sich die Frage ob der Wnt-Signalweg nicht sogar systemisch im gesamten Organismus überaktiviert ist. Nimmt man das Ergebnis dieser Arbeit, dass ein aktivierter Wnt-Signalweg protektiv wirkt hinzu, so kann man vermuten, dass diese Aktivierung eine Art natürlicher Schutzmechanismus vor verstärkerter Plaquebildung und instabilen Plaques sein könnte. Es wäre interessant herauszufinden ob diese Wnt-Aktivierung auf Normalniveau auslösen würde.

4.3 Morphologische Unterschiede der atherosklerotischen Plaques

4.3.1 Die *Dkk1*-Heterozygotie führt zu einer vermehrten Ansammlung extrazellulärer Matrix in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques und tendenziell dickeren fibrösen Kappen

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei den Mäusen nach 18 Wochen auf HFD ein signifikanter Unterschied in der Menge der extrazellulärer Matrix (EZM) im atherosklerotischen Plague vorliegt. In den Dkk1 heterozygoten Mäusen befindet sich mehr EZM im Plague als in den wildtypischen Tieren (Abb. 12), was ein möglicher Hinweis auf das Entwicklungsstadium der Plaques sein kann. Ein früher nekrotischer Kern besitzt mehr EZM-Bestandteile wie Kollagen, Hyaluronan, Versican, welche im späten nekrotischen Kern nicht mehr vorhanden sind (Finn et al., 2010; Kolodgie et al., 2003; Virmani et al., 2006). Da aber der Grad der Stenose nicht unterschiedlich ist und in beiden Genotypen bei ca 67 % liegt (Abb.10), handelt es sich wohl nur um das Erscheinungsbild eines frühen nekrotischen Kerns, da die Plaqueentwicklung schon so weit fortgeschritten ist, dass man nicht mehr von einem frühen Stadium sprechen kann. Die veränderte EZM-Menge ist also vermutlich molekular bedingt und auf die Dkk1-Heterozygotie zurückzuführen. Bei den fibrösen Kappen konnte eine Tendenz zu dickeren fibrösen Kappen in den Apoe^{+/+}; Dkk1^{+/-} Mäusen festgstellt werden (Abb.11). Die fibröse Kappe setzt sich hauptsächlich aus VSMCs und EZM zusammen und verleiht dem Plaque Stabilität (Stary et al., 1995; Virmani et al., 2000). Je dünner eine fibröse Kappe ist, desto eher kann es zu einer Ruptur des Plagues kommen (Finn et al., 2010; Virmani et al., 2006)

Die extrazelluläre Matrix trägt auch ausserhalb der fibrösen Kappe zur Stabilität eines atherosklerotischen Plaques bei (Davies et al., 1993; Newby, 1997). Sie repariert den Plaque dort, wo der Lipidkern die normale Zellstruktur verändert oder vernichtet (Stary et al., 1995). Sie wird im Plaque überwiegend von den glatten Muskelzellen produziert. Der Abbau der EZM findet durch Matrix Metalloproteinasen statt (MMPs). Der Wnt-Signalweg reguliert sowohl die Expression diverser Komponenten der extrazellulären Matrix, als auch die Expression verschiedener MMPs. Die Zusammensetzung der EZM und die Aktivität der MMPs wiederum regulieren Proliferation, Migration und Apoptose der glatten Muskelzellen (Mill & George, 2012).

Welche Rolle Dkk1 und Wnt in der Regulation der VSMCs und der EZM-Produktion haben soll in den nächsten zwei Abschnitten detailliert geklärt werden.

4.3.1.1 Der Wnt-Signalweg in der Regulation der VSMCs

Die VSMCs tragen mit ihrer Rolle in der Bildung der fibrösen Kappe und der Produktion von EZM einen wesentlichen Teil zur Stabilität atherosklerotischer Plaques bei. Mehrere Studien zeigen auf, dass der Wnt/β-Catenin-Signalweg das Überleben und die Proliferation von arteriellen glatten Muskelzellen unterstützt (Mill & George, 2012). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in humanen Gefäßmuskelzellen die Akkumulation von ß-Catenin zur Proliferation führt (Bedel et al., 2008). Auch Wang et al. konnten in der Ratte nachweisen, dass über β-Catenin die CyclinD1-Expression aktiviert und somit die Proliferation der VSMCs aktiviert und Apoptose verhindert wird (X. Wang et al., 2002). LRP6 als Bestandteil des kanonischen Wnt-Signalweges ist notwendig für die VSMC-Proliferation und deren Überleben, indem es zur Aktivierung von β -Catenin/Tcf-4 führt (X. Wang et al., 2004). In der Maus konnte in der verdickten Intima nach Carotis-Ligatur eine erhöhte β-Catenin-Expression nachgewiesen werden. Wnt4 wurde als der Ligand identifiziert, glatten Muskelzellen aktiviert (Tsaousi et al., 2011). Zudem wurde in Wnt4^{+/-} Mäusen eine geringere Intima-Verdickung mit geringerer
ß-Catenin-Expression im Vergleich zu Wnt4^{+/+} Mäusen nach Carotis-Ligatur festgestellt (Tsaousi et al., 2011). Auch die Motilität der VSMCs scheint durch den Wnt-Signalweg positiv reguliert zu werden (Pena et al., 2013).

Diese Funktion des Wnt-Signalweges könnte zu Beginn der Atherosklerose von Nachteil sein indem er durch seine proliferative Wirkung die Entstehung

einer verdickten Intima fördert und damit eine Grundlage für die Atherogenese schafft. In der weiteren Atherogenese hingegen könnte das Überleben und die Proliferation der VSMCs durch die Zellmenge selbst und die von ihr sezernierte extrazelluläre Matrix zur Stabilität des atherosklerotischen Plagues führen und somit von Vorteil sein. Schwartz et al. stellten die Vermutung auf, dass eine Proliferation der VSMCs nur sehr früh in der Entstehung des atherosklerotischen Plagues stattfindet und im späten Plague so gut wie keine Rolle mehr spielt (Schwartz et al., 1995). In Apoe^{-/-}:Dkk1^{+/-} Mäusen könnte dies durch die Überaktivierung des Wnt-Signalweges (Abb. 12) verändert sein. Die größere EZM-Menge in den atherosklerotischen Plaques der Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Mäuse ist möglicherweise eine Folge von mehr VSMCs im Plague, die die EZM-Bestandteile produzieren. Auch die Tendenz zu dickeren fibrösen Kappen kann ein Hinweis auf mehr VSMCs und/oder EZM sein.

4.3.1.2 Die Rolle von Dkk1 und Wnt in EZM-Produktion/Fibrose

Die Gruppe um Brack konnte zeigen, dass in alten Mäusen eine systemische Überaktivierung des Wnt-Signalweges vorliegt und diese zur verstärkten Fibrose von myogenen Zellen führt. Die Injektion von Dkk1 in gealterte Muskeln konnte die Fibrose reduzieren (Brack et al., 2007). In vivo und in vitro kann Dkk1 die Ausbildung einer Fibrose durch Nieren-Myofibroblasten mindern (S. Ren et al., 2013). In Menschen die an Fibrose leiden, einer krankhaften Aktivierung von Fibroblasten und der erhöhten Produktion von extrazellulärer Matrix, wurde eine Überexpression von WNT-1 und 10b nachgewiesen. Zugleich wurde festgestellt, dass DKK1 in den betroffenen Geweben vermindert exprimiert wurde. In in vitro Analysen wurde gezeigt, dass Wnt1 die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten und deren Collagenproduktion indirekt steigert (Akhmetshina et al., 2012). Mäuse die Wnt10b überexprimieren zeigen in derselben Studie ebenfalls eine Myofibroblastenzahl und EZM-Produktion. erhöhte Eine gleichzeitige Überexpression von Dkk1 in diesen Mäusen normalisierte die Myofibroblastenzahl und EZM-Produktion wieder. Eine Behandlung mit neutralisierenden Antikörpern gegen Dkk1 verhindert den protektiven Effekt von überexprimiertem Dkk1. In der wildtypischen Maus führt hingegen eine

Neutralisation von Dkk1 nicht zu einer signifikant verstärkten Fibrose, im Gegensatz zum transgenen Model konnte hier eine kompensatorische Hochregulierung von Dkk2 festgestellt werden. In dieser Studie wurde auch gezeigt, dass Tgf- β den Wnt-Signalweg durch die Inhibition von *Dkk1*-Expression aktiviert (Akhmetshina et al., 2012).

Der Zusammenhang von TGF- β und dem WNT-Signalweg wurde auch in einer Studie von Zhou et al. gezeigt. In humanen Zellen wurde in dieser nachgewiesen, dass TGF- β die Expression von WNT-Genen (WNT-2;-4;-5a;-7a;-10a) aktiviert und zu einer erhöhten Akkumulation von β -Catenin in der Zelle führt. Sie zeigte auch auf, dass eine Kombination von TGF- β - und WNT-Signalen für die Differenzierung humaner Knochenmarksbindegewebszellen zu Chondrozyten und für die Inhibition der Differenzierung zu Adipozyten verantwortlich ist (S. Zhou et al., 2004).

Die Rolle des anti-inflammatorischen Zytokins TGF-ß in der Atherosklerose wurde in einigen Studien untersucht. Grainger et al. stellten in ihrer Studie fest, dass Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose geringere Mengen von aktiviertem TGF- β im Serum aufweisen und stellten die Hypothese auf, dass aktives TGF-B die Atheroskleroseentwicklung vermindert (Grainger et al., 1995). Zwei Studien im Apoe^{-/-} Mausmodell zeigten, dass Tgf-ß eine protektive Wirkung hat. Die Behandlung von Apoe^{-/-} Mäusen mit Tgf-ß neutralisierenden Antikörpern führte zu größeren atherosklerotischen Plaques und einer erhöhten Anzahl an Immunzellen. Zudem zeigten die Plagues der behandelten Tiere einen verringerten Kollagengehalt (Mallat et al., 2001). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls im Apoe^{-/-} Mausmodell ein rekombinanter Tgf-β-Rezeptor zur Inhibierung des Tgf-β-Signalweges verwendet. In diesem Fall wurden nach der Behandlung kleinere atherosklerotische Plaques nachgewiesen, allerdings wurden auch ältere Tiere mit fortgeschritteneren Plagues analysiert. Wie bei Mallat et al., wurde aber auch hier eine vermeintlich verringerte Stabilität der Plaques durch verminderte Fibrose, vemehrte Inflammation und größere nekrotische Kerne in den behandelten Tieren festgestellt. In fortgeschrittenen Plaques trat die verminderte Fibrose durch Tgf-ß Inhibierung zusammen mit Einblutungen im Plaque auf (Lutgens et al., 2002).

Die Ergebnisse beider Studien deuten darauf hin, dass Tgf- β durch die Inhibierung inflammatorischer Prozesse und durch Aktivierung der Produktion von EZM zur Stabilität atherosklerotischer Plaques beiträgt. Nimmt man nun an, dass Tgf- β dies über die Aktivierung des Wnt-Signalweges erreicht wie von Zhou et al. 2004 und Akhmetshina et al. 2012 gezeigt, so könnte dies eine Erklärung für die hier gemachten Beobachtungen der größeren Menge an extrazellulärer Matrix in den atherosklerotischen Plaques der *Apoe*^{-/-};*Dkk1*^{+/-} Mäuse sein, denn auch hier konnte eine Aktivierung des Wnt-Signalweges festgestellt werden.



Abbildung 17: Einfluss des Wnt-Signalweges auf die EZM-Produktion (A,B) Mögliche Interaktion zwischen Tgf-β und Wnt-Signalweg bei der Produktion extrazellulärer Matrix im Plaque. C: Mögliche Ursache für die vermehrte extrazelluläre Matrix in *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäusen

Neben der übermäßigen Produktion von EZM, könnte die Beobachtung von größeren Mengen EZM in *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäusen auch durch geringere Degradierung dieser hervorgerufen werden. Zum Beispiel durch eine verminderte Expression von MMPs. MMPs werden in humanen und murinen atherosklerotischen Plaques exprimiert. Sie nehmen eine ambivalente Rolle in der Plaquestabilität ein. Einerseits bauen sie extrazelluläre Matrix ab, was den Plaque anfälliger für eine Ruptur macht, andererseits ist dieser Abbau der extrazellulären Matrix notwendig für die Migration und Proliferation der VSMCs die zur Plaquestabilität beitragen (J. L. Johnson, 2007; Newby et al., 2009).

Einige Studien lassen vermuten, dass ein aktivierter Wnt-Signalweg MMPs aktiviert und damit zur EZM-Degradierung führt. Eine Studie zeigte, dass DKK1 protektiv gegen den Abbau von extrazellulärer Matrix wirkt indem es

die Expression von *MMP-13* in fibrotischen Zellen inhibiert (Ye et al., 2011). Eine Überaktivierung des Wnt-Signalweges in Darmkrebsgewebe des Menschen führt zur Überexpression von *MMP-7* (Brabletz et al., 1999). Wnts aus Endothel-Zellen aktivieren die Expression von *MMP-2* und -9 in T-Zellen (B. Wu et al., 2007).

Im Fall der *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäuse liegt die Vermutung nahe, dass die verstärkte EZM-Produktion bedingt durch den aktivierten Wnt-Signalweg (**Abb.12**) dem Abbau über MMPs überwiegt. Um dies abschließend zu klären sind allerdings weitere Analysen notwendig, die nachweisen, dass die EZM-Produktion hier tatsächlich direkt durch den Wnt-Signalweg gesteuert wird.

4.3.2 Die Dkk1-Dosis hat Einfluss auf die Größe des nekrotischen

Kerns

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führt die Dkk1-Heterozygotie auch bei Mäusen auf Standardfutter zu einer Veränderung in der Plaquemorphologie. Wie durch weiterführende Analysen gezeigt werden konnte, ist der nekrotische Kern der Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} nach einem Jahr SF signifikant kleiner als in den entsprechenden Kontrolltieren (Abb. 15) und es gibt keine Cholesterin-Kristalle im Gegensatz zu den Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+} Tieren (**Tab. 2**). Daraus lässt sich vermuten, dass die Dkk1-Heterozygotie zu stabileren atherosklerotischen Plagues führt, denn Studien im Menschen zeigen, dass in humanen ruptierten Plaques und TCFAs (Thin-Cap Fiboatheroma) der nekrotische Kern größer ist und die Cholesterin-Kristalle im Vergleich zu stabileren Plagues vermehrt auftreten (Cappendijk et al., 2008; Davies et al., 1993; Pasterkamp et al., 2000; Virmani et al., 2000). Der nekrotische Kern sagt nicht nur etwas über die Stabilität eines Plagues aus, sondern kann auch darüber Aufschluss geben, wie weit fortgeschritten die Atherosklerose schon ist. Sowohl in der Maus als auch in der humanen Atherogenese wächst der nekrotische Kern mit Fortschreiten der Erkrankung (Nakashima et al., 1994; Stary et al., 1995) unter anderem durch Apoptose von Makrophagen und glatten Muskelzellen (Clarke et al., 2008; Hegyi et al., 1996). Eine geringere Apoptoserate in den atherosklerotischen Plaques der Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Mäuse könnte eine Erklärung für die kleineren nekrotischen Kerne sein. Mehrere Studien zeigen, dass die Induktion von *Dkk1* zur Apoptose in verschiedenen Zelltypen führt (Grotewold & Ruther, 2002a, 2002b; Hirata et al., 2011; H. K. Kim et al., 2013; Scali et al., 2006). Auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS= *reactive oxygen species*) können die *Dkk1-Expression* indirekt aktivieren und zum programmierten Zelltod führen (Knobloch et al., 2007).

Neben dem Einfluss, den Dkk1 während der Atherogenese auf apoptotische Vorgänge haben könnte, wäre auch eine Wechselwirkung mit einer nekrotischen Signalkaskade denkbar, da auch die Nekrose eine Rolle bei der Entstehung des nekrotischen Kerns spielt (Crisby et al., 1997; Kunishima et al., 1999). Zur Nekrose kommt es durch Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, Fehlern in der Kalzium-Homöostase und der Aktivierung von nicht apoptotischen Proteasen (Martinet et al., 2011).



Abbildung 18: Die potentielle pro-atherogene Rolle von Dkk1 in der Plaqueentwicklung. Durch Inhibierung des Wnt-Signalweges vermindert Dkk1 die Proliferation der VSMCs und die EZM-Produktion, welche zur Stabilität des Plaques beitragen. Es fördert hingegen Apoptose und somit die Vergrößerung des nekrotischen Kerns der zur Vulnerabilität beiträgt.

Wu et al. haben *in vitro* zeigen können, dass der Wnt/β-Catenin-Signalweg die Nekrose von Makrophagen vermindert, indem es die intrazelluläre Menge von ROS reduziert. Dies geschieht durch eine vermehrte Produktion des endogenen Antioxidans Glutathion (GSH). Dkk1 ist in der Lage diese

vermehrte Produktion von GSH durch den Wnt-Signalweg wieder zu mindern (X. Wu et al., 2015).

4.3.3 Die Rolle von Dkk1 in der Gefäßkalzifizierung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäusen nach einem Jahr SF, eine Tendenz zu kleineren kalzifizierten Flächen im atherosklerotischen Plaque vorhanden ist (**Abb.16**). Auch die untersuchten Markergene für die Kalzifizierung sind in diesen Tieren geringer exprimiert (**Abb.17**).

Die extraossäre Kalzifizierung der Gefäße und atherosklerotischer Plaques entsteht durch Ablagerung von Kalziumphosphat in Form von Hydroxyapatit. Die Kalzifizierung im Gefäß, weist viele Parallelen zur Kalzifizierung im Knochen auf. So kommt es im Gefäß zur Bildung Chondrozyten-ähnlicher Zellen und zur Expression knochenspezifischer Gene (Rattazzi et al., 2005; Tyson et al., 2003).

In der Knochenentwicklung ist die Rolle von Dkk1 und dem Wnt-Signalweg weitestgehend bekannt. Der Wnt-Signalweg aktiviert die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoblasten und inhibiert die Bildung von Osteoklasten (Goldring & Goldring, 2007). In einigen Studien wurde der Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Knochenbildung untersucht. Ein beeinträchtigter Wnt-Signalweg, wie er in *LRP5^{-/-}* und auch in *Wnt10b^{-/-}* Mäusen vorliegt, führt zu einer verringerten Knochendichte und auch im Menschen werden Mutationen von *LRP5* mit Osteoporose in Verbindung gebracht (Glass & Karsenty, 2007; M. L. Johnson et al., 2004).

Einige Studien weisen einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten DKK1-Serumspiegel und Osteoporose oder anderen Krankheiten nach, bei denen Osteopenie (Minderung der Knochendichte) ein Symptom ist (Butler et al., 2011; Kaiser et al., 2008; Thambiah et al., 2012; Voskaridou et al., 2009; S. Y. Wang et al., 2011). Auch in der Maus ist die *Dkk1* Überexpression mit Osteopenie asoziiert (Li et al., 2006; Yao et al., 2011), wohingegen eine Behandlung mit Dkk1 neutralisierenden Antikörpern zu einer höheren Knochendichte führt (Glantschnig et al., 2010). Zusammengefasst ist Wnt für

den Knochenaufbau und die damit verbundene Kalzifizierung verantwortlich, wohingegen Dkk1 für den Abbau von Knochensubstanz und die Dekalzifizierung zuständig ist.

extraossären Kalzifizierung in den Gefäßen scheint Bei der die Aufgabenteilung ähnlich. Hier wird die chondrogene Transformation von VSMCs durch die Aktivierung des Wnt/β-Catenin-Signalweges hervorgerufen und Dkk1 kann diese Transformation inhibieren (Beazley et al., 2013). Auch Shao et al. haben gezeigt, dass Msx2 über eine Aktivierung des Wnt-Signalweges und Inhibierung der Dkk1-Expression zur Kalzifizierung der Gefäße in der Maus führt (Shao et al., 2005). In einer Human-Studie wurde gezeigt, dass die Serumkonzentration von DKK1 und die Elastizität, von Gefäßen positiv miteinander korellieren. Das heisst, je weniger DKK1 die Patienten im Serum aufwiesen, desto geringer war die Elastizität, vermutlich aufgrund stärkerer Kalzifizierung (Thambiah et al., 2012).

So könnte man bei den Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Mäusen, in denen die Dkk1-Expression verringert (Anhang Abb.I) und der Wnt-Signalweg aktiviert ist, davon ausgehen, dass die Kalzifizierung, der osteogene Prozess im Plague verstärkt wird. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. In den atherosklerotischen Plaques der Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Männchen konnte eine Tendenz zu weniger Kalzifizierung festgestellt werden. Man könnte vermuten, dass die Kalzifizierung geringer ist, da auch die Plaques nicht so weit fortgeschritten sind wie in den Kontrolltieren. Die Kalzifizierung ist jedoch nicht nur eine Frage des Plaquefortschritts, was man im Vergleich zu den Tieren 18 Wochen auf HFD sehen kann. In den Kontrollmäusen ist hier die Kalzifizierung geringer (1,287 %) als bei den 1 Jahr alten Tieren (3,93 %), obwohl die Plaques weiter fortgeschritten sind (67,38 % vs 56,9 % Stenose). Bei den 1 Jahr alten Tieren auf SF sind mit 66 % der Tiere auch doppelt so viele von der Kalzifizierung betroffen wie bei den jüngeren Tieren auf HFD. Ein wichtiger Faktor für die Kalzifizierung ist demnach die Zeit, also das Alter der Tiere. Die Tendenz zu einer geringeren Kalzifizierung in den 1 Jahr alten Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Mäusen hat demnach vermutlich auch andere Gründe. Einer davon könnte sein, dass in Dkk1^{+/-} Mäusen eine erhöhte Knochendichte vorliegt (Morvan et al., 2006). Es ist bekannt, dass die Knochendichte umgekehrt proportional zur Dkk1-Menge ist (MacDonald et al., 2007; Morvan et al., 2006). Ebenso zeigen Studien, dass der Verlust von Knochendichte und die Kalzifizierung der Gefäße eine positive Korrelation aufweisen (Hyder et al., 2007; Hyder et al., 2009; Marcovitz et al., 2005; Naves et al., 2008; Schulz et al., 2004). So liegt die Vermutung nahe, dass bei erhöhter Knochendichte nur geringes Potential zur Gefäßkalzifizierung vorhanden ist, da viel Kalzium im Knochen gebunden und somit weniger freies Kalzium im Organismus zirkuliert. Schon Mani et al. haben die Vermutung aufgestellt, dass Osteoporose und koronare Herzkrankheit pleiotrope Konsequenzen eines beeinträchtigten Wnt-Signalweges sind (Mani et al. 2007). In $Mgp^{-/-}$ Mäusen ist der der Zustand von Knochen und Gefäßen genau umgekehrt verglichen mit den $Dkk1^{+/-}$ Mäusen. In diesen kommt es zu einer sehr starken Gefäßkalzifizierung, die früh zur Ruptur der Gefäße und zum Tod führt, parallel leiden sie an Osteopenie (Luo et al., 1997).

In den Appe^{-/-}: Dkk1^{+/-} nach einem Jahr SF sind im Gegensatz zu den Kontrolltieren auch keine Chondrozyten-ähnlichen Zellen gefunden worden, obwohl dies, aufgrund der Rolle von Dkk1 und Wnt in der Knochenentwicklung, eher in den Dkk1 heterozygoten Tieren zu erwarten gewesen ware. Diese Zellen entstehen vermutlich aus VSMCs und sind ein Marker für den Grad der Ossifikation/Kalzifizierung im Plague (Rattazzi et al., 2005; Speer et al., 2009)

Die hier untersuchten Marker Runx2, Opn und Mgp stehen sowohl mit der der Kalzifizierung Knochenbildung als auch mit in Gefäßen im Zusammenhang. Runx2 (oder Cbfa1) wird früh auch in der Osteoblastenbildung exprimiert die und aktiviert Expression knochenspezifischer Gene, unter anderem Osteopontin (Ducy et al., 1997). *Runx2* kann direkt durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktiviert werden und Dkk1 kann seine Expression inhibieren (Gaur et al., 2005; Hamidouche et al., 2008).

Speer et al. haben in Gefäßen von *Mgp^{-/-}* Mäusen gezeigt, dass *Runx2* ein früher Marker für die Transdifferenzierung der VSMCs in in osteochondrogene Vorläuferzellen ist (Speer et al., 2009). *Opn* ist ein Kalzifizierungsinhibitor, der auch die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten fördert und somit eine wichtige Rolle in der Knochenhomöostase

spielt. Zudem wird *Opn* unter anderem mit inflammatorischen Reaktionen in Fettgewebe und Insulinresistenz in Verbindung gebracht (Kahles et al., 2014). Osteopontin wird im atherosklerotischen Plaque von VSMCs, Endothelzellen, Makrophagen und Chondrozyten-ähnlichen Zellen exprimiert und ist vermehrt in kalzifizierten Bereichen zu finden (Bini et al., 1999; Dhore et al., 2001; O'Brien et al., 1994; Rattazzi et al., 2005). Das Matrix-Gla-Protein ist wie Opn ein Kalzifizierungsinhibitor. *Mgp*^{-/-} Mäuse weisen stark kalzifizierte Arterien auf (Luo et al., 1997). In humanen atherosklerotischen Plaques nimmt die *MGP*-Expression mit Fortschreiten des Plaques zu und ist in kalzifizierten Plaques am höchsten (Dhore et al., 2001).

Alle drei untersuchten Markergene weisen eine deutliche Tendenz zur geringeren Expression in *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäusen auf (**Abb.17**). Dies wirft die Frage auf, ob die geringere Kalzifizierung tatsächlich nur mit einer vermeintlich geringeren Menge an zirkulierendem Kalzium erklärt werden kann. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Kalziuminhibitoren Mgp und Opn erst durch einen erhöhten Kalziumspiegel im Blut oder die Kalzifizierung selbst aktiviert werden. Für Mgp wurde eine solche Aktivierung durch Kalzium und Kalzimimetika in Rattenaorten und bovinen VSMCs nachgewiesen (Mendoza et al., 2011). In Maus-Osteoblasten konnte Kalzium zusammen mit anorganischem Phosphat die Expression von *Opn* und *Mgp* über den ERK1/2-Signalweg aktivieren (Khoshniat et al., 2011). Es gibt Hinweise darauf, dass auch die *Runx2*-Expression auf diesem Weg, über ERK1/2, aktiviert werden könnte (D. Ren et al., 2015; Xiao et al., 2002).

All dies deutet darauf hin, dass die geringere Kalzifizierung in den atherosklerotischen Plaques der *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäuse nach einem Jahr SF eher eine sekundäre Folge der *Dkk1*-Heterozygotie, bedingt durch die höhere Knochendichte, ist.

Die hier gezeigte geringere Kalzifizierung in den Gefäßen der *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäuse ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Kim et al. Sie wiesen eine positive Korrelation des Dkk1-Serumspiegels und der Kalzifizierung in Gefäßen von Patienten nach (K. I. Kim et al., 2011), was ebenfalls nicht dem bisherigen Wissen über Dkk1 in der Kalzifizierung entspricht. Bei erhöhtem Dkk1-Spiegel würde man, entsprechend den bekannten Befunden im Knochen, eine geringere Kalzifizierung erwarten. Ob der erhöhte Dkk1-



Spiegel, den Kim et al. gemessen haben, ursächlich für die erhöhte Kalzifizierung ist bleibt offen.

Abbildung 19: Mögliche molekulare Auswirkungen eines veränderten Dkk1-Spiegels auf die Mineralisierung im Knochen und in den Arterien. (Schriftdicke symbolisiert die Menge/Vorkommen) Bei geringerer Dkk1-Menge wird die Reifung der Osteoblasten gefördert und die der Osteoklasten inhibiert. Folglich gibt es mehr Knochenmaterial und es wird mehr Kalzium eingespeichert. Das zirkulierende Kalzium wird dadurch verringert und eine Gefäßkalzifizierung unterdrückt. Ein Überangebot von Dkk1 führt zu Osteopenie durch vermehrte Osteoklastenaktivierung, Kalzium wird freigesetzt und steht für die Gefäßkalzifizierung zur Verfügung.

Leider konnte der Kalziumspiegel im Serum der Mäuse bei den Analysen im Zentrallabor des Uniklinikums Düsseldorf nicht bestimmt werden, da die Werte unterhalb der Messgrenze von 0,2 mmol/l lagen.

Dennoch gibt das Ergebnis Anlass dazu, den Wnt-Signalweg und Dkk1 bei der Kalzifizierung von Gefäßen weiter zu analysieren. Kalzifizierungen spielen nicht nur in der Atherosklerose eine Rolle, wo ihre Bedeutung was die Stabilität der atherosklerotischen Plaques angeht sehr umstritten ist (Alexopoulos & Raggi, 2009; Speer & Giachelli, 2004). Denn nicht nur die

Diskussion

Kalzifizierung in atherosklerotischen Plaques, sondern auch die Media-Kalzifizierung in Zusammenhang mit dem natürlichen Alterungsprozess oder anderen Erkrankungen wie chronischer Niereninsuffiziens (*CKD=Chronic Kidney Disease*) und Diabetes verläuft über den Wnt gesteuerten osteochondrogenen Prozess (Chen & Moe, 2003; Rong et al., 2014; Speer & Giachelli, 2004) Bei Patienten mit CKD führt die Kalzifizierung der Gefäße häufig zum Tod (Mizobuchi et al., 2009), sie gilt generell als ein Risikofaktor für weitere kardiovaskuläre Komplikationen und erhöhte Sterblichkeit (Nakanishi et al., 2015; Speer & Giachelli, 2004; Tota-Maharaj et al., 2012).

4.4 Dkk1 und Wnt und ihre Rolle in der inflammatorischen

Kaskade und der mögliche Einfluss auf die Atherogenese

Die hier gezeigte geringere Ausbildung atherosklerotischen Plaques und deren veränderter Morphologie in *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäusen, könnte auch auf die Rolle von Dkk1 in der inflammatorischen Kaskade zurückzuführen sein, die dieser Erkrankung zugrunde liegt.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Atherosklerose eine inflammatorische Erkrankung. Die Aktivierung der Endothelzellen an Stellen die zur Plaquebildung neigen führt zur Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und ICAM-1(Intercellular adhesion molecule-1) in den Endothelzellen (Nakashima et al., 1998). Diese ermöglichen die Adhäsion von Monozyten und T-Lymphozyten und erleichtern deren Migration in die Intima. Eingewanderte Monozyten phagozytieren das oxidierte LDL und werden so zu aktivierten Schaumzellen. Die Schaumzellen sezernieren inflammatorische Zytokine wie TNF-a, IL-1,MCP-1,und VEGF (Hansson, 2001; Libby, 2002; R. Ross, 1993). So wird die inflammatorische Kaskade initiiert und die Atherogenese schreitet voran. TNF-a ist eines der potentesten pro-inflammatorischen Zytokine und spielt in der Atherogenese eine entscheidende Rolle. Ein Ausschalten von Tnf- α in der Maus, systemisch oder im Knochenmark, führt zu einer signifikanten Verringerung der Größe atherosklerotischer Plaques (Branen et al., 2004). TNF-α spielt auch in chronischen inflammatorischen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis

eine entscheidende Rolle. In diesem Zusammenhang wurde auch eine Verbindung zwischen Dkk1 und TNF-a entdeckt. In vitro aktiviert TNF-a über TNFR1 und p38MAPK die DKK1-Expression in Gelenk-Fibroblasten. Auch in vivo konnte in einem Mausmodell für Arthritis gezeigt werden, dass die systemische Blockade von Tnf-a oder p38MAPK den erhöhten Dkk1-Serumspiegel normalisiert (Diarra et al., 2007). Chae et al. konnten zeigen, dass die Dkk1 doubleridge Maus-Mutante, in der die Dkk1-Expression um ca. 90 % reduziert ist, vor einer Typ2 Immunreaktion in einem induzierten Asthma-Modell geschützt ist. In vitro kann Dkk1 die Produktion von IL-4, -10 und -13 in CD4+ T Zellen induzieren. In dieser Studie wurden auch die Thrombozyten als Hauptquelle für das zirkulierende Dkk1 ausgemacht. Auch die inflammatorische Reaktion, hervorgerufen durch eine parasitäre Infektion der Maus, kann durch Injektion eines Dkk1-Inhibitors drastisch reduziert werden (Chae et al., 2016). IL-4 ist ein typisches Th2-Zytokin und scheint proatherogene Wirkung zu haben, denn Apoe^{-/-}:/L4^{-/-} Mäuse entwickeln weniger schwerwiegende Atherosklerose als Apoe^{-/-};IL4^{+/+} Mäuse (Davenport & Tipping, 2003). Dkk1 scheint also nicht nur durch inflammatorische Zytokine aktiviert zu werden, sondern spielt eine entscheidende pro-inflammatorische Rolle in der Th2-Immunreaktion chronischer entzündlicher Erkrankungen. Auch in der Atherosklerose spielt die Th2-Immunreaktion eine Rolle. Zhou et al. haben gezeigt, dass auf normaler Diät die Th1 gesteuerte Immunreaktion in den atherosklerotischen Plaques überwiegt, jedoch auf einer Cholesterin reichen Diät eine Verschiebung zur Th2 gesteuerten Reaktion stattfindet (X. Zhou et al., 1998).

Der nicht kanonische Ligand WNT5a reguliert inflammatorisch relevante Gene in humanen Endothelzellen *in vitro* und *WNT5a*-Expression wurde auch in Endothelzellen und proliferierenden VSMCs in humanen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen. In derselben Studie wurde gezeigt, dass die Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalweges auch zu einer Hochregulierung inflammatorischer Gene führt. Dies legt die Vermutung nahe, dass der kanonische Wnt-Signalweg in humanen Endothelzellen anti-inflammatorische Wirkung hat (J. Kim et al., 2010). Diese Beobachtung passt zu der von Ueland et al. (2011), dass Dkk1 die Expression inflammatorischer Zytokine wie IL-8 und MCP-1 in Endothelzellen aktiviert.

Eine pro-inflammatorische /pro-atherogene Rolle von Dkk1 passt zu den hier gemachten Beobachtungen, der geringeren Atherosklerose und der höheren Stabilität der Plaques in den *Apoe*^{-/-};*Dkk1*^{+/-} Mäusen.

Dkk1-Expression wird auch durch Corticosteroide gesteuert. Corticosteroide sind körpereigene Hormone die in der Nebennierenrinde produziert werden und eine anti-inflammatorische Wirkung besitzen. Corticosteroide werden zum Beispiel als Immunsuppressiva bei Asthma oder Autoimmunerkrankungen eingesetzt. So kann zum Beispiel Dexamethason die DKK1-Produktion in humanen Gelenk-Fibroblasten aktivieren (Hardy et al., 2012). In dieser Studie wurde Vermutung aufgestellt. dass die auch die proinflammatorischen Marker wie TNFa DKK1-Expression indirekt, nämlich über eine gesteigerte Corticosteroid-Produktion, aktivieren. Die Dexamethason-Behandlung von primären humanen Osteoblasten führt zu einer Beeinträchtigung der Osteoblastendifferenzierung und einer verminderten β-Catenin-Menge. Eine zusätzliche Behandlung mit DKK1-siRNA verhindert diese Wirkung von Dexamethason (Butler et al., 2010). In Apoe^{-/-} Mäusen scheint der Corticosteroid-Spiegel generell erhöht zu sein im Vergleich zu Apoe^{+/+} Mäusen (Thorngate et al., 2002). Corticosteroide haben Auswirkungen auf die Atherogenese, sie verstärken diese und man kann nun vermuten, dass dieser Effekt auch auf eine Aktivierung von Dkk1 zurückzuführen ist (Hermanowski-Vosatka et al., 2005; Walker, 2007).

4.5 Wnt/β-Catenin unabhängige Wirkung von Dkk1

Es gibt Hinweise darauf, dass Dkk1 auch noch eine Rolle abseits der Inhibierung des kanonischen Wnt-Signalweges spielt. So vermuten Krause et al. eine Verschiebung vom kanonischen Wnt-Signalweg zum nicht kanonischen durch die Wirkung von Dkk1. Ren et al. konnten in Maus-Perizyten zeigen, dass Dkk1 über einen β -Catenin unabhängigen Weg die Aktivierung von MAPK und JNK durch PDGF inhibieren kann. Lee et al. haben in β -Catenin defizienten Zellen eine Apoptose Induktion durch *Dkk1*-Überexpression festgestellt und dies auf die Aktivierung von JNK zurückgeführt (Krause et al., 2014; A. Y. Lee et al., 2004; S. Ren et al., 2013). JNKs spielen eine Rolle in der Inflammation, Apoptose und Proliferation (Manning & Davis, 2003) und auch ihre direkte Rolle in der Atherosklerose wurde schon gezeigt (Ricci et al., 2004). Es könnte hier also auch auf anderen Ebenen als dem kanonischen Wnt-Signalweg Veränderungen durch *Dkk1*-Heterozygotie geben, die die Atherogenese beinflussen könnten.

5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Dkk1-Dosis eine Rolle in der Stabilität atherosklerotischer Plagues im Mausmodell spielt. Weitere Untersuchungen könnten Aufschluss darüber geben, in welchen Bereichen der Plagueentwicklung Dkk1 von Bedeutung ist und ob die Mechanismen die betroffen sind den kanonischen Wnt-Signalweg betreffen oder sogar davon unabhängig sind. Zunächst sollte die Proliferations- und Apoptoserate der VSMCs untersucht werden, um herauszufinden ob Dkk1 hier den vermuteten Einfluss ausübt und die Überlebensrate der VSMCs mindert. Hier wäre es nach Unterschieden in frühen auch angebracht. und späten atherosklerotischen Plagues zu suchen. Um den Einfluss auf die Expression von EZM-Bestandteilen zu untersuchen könnten hier Expressionsanalysen und Western-Blots Aufschluss geben. Auch die Anwesenheit und Aktivität von MMPs könnte so untersucht werden.

Um herauszufinden, ob die systemische Eliminierung von Dkk1 zu einer drastischeren Veränderung der atherosklerotischen Plaqueentwicklung führt kann man über einen definierten Zeitraum Dkk1-Antikörper applizieren. Auch ein gefäßspezifisches Ausschalten von *Dkk1* könnte genaueren Aufschluss über seine Rolle in der Plaqueentwicklung bringen.

Die potentiell pro-inflammatorische Wirkung von Dkk1 im Plaque könnte in Apoe^{-/-}:Dkk1^{+/-} Mäusen zu einer geringeren Expression von den inflammatorisch wirksamen Zytokinen führen und zu einer geringeren Anzahl inflammatorischer Zellen. Dies soll mittels Antikörperfärbungen, Durchflusszytometrie und Expressionsanalysen geklärt werden. In frühen atherosklerotischen Plaques könnte untersucht werden. ob die Beobachtungen von Zhang et al. (2015), dass Dkk1 in vitro die Aufnahme von ox-LDL in Makrophagen vermindert, auch in vivo zu beobachten ist. In den Apoe^{-/-}, Dkk1^{+/-} Mäusen müsste dann eine vermehrte Schaumzellbildung zu sehen sein.

Mit sensitiveren Methoden könnte man erneut versuchen den Kalziumspiegel im Serum der Mäuse zu bestimmen um dem Grund für die geringere Kalzifizierung in den Plaques der *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäuse nach einem Jahr SF auf die Spur zu kommen. Durch Zugabe von zusätzlichem Kalzium zum Futter könnte man die Auswirkungen eines erhöhten Kalziumspiegels auf die Kalzifizierung in den Plaques der *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäuse analysieren.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob Dkk1 eine Rolle in der Atherogenese spielt. Anhand eines Mausmodells konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Dkk1-Dosis innerhalb des ersten Lebensjahres in männlichen Mäusen zu stabileren und/oder kleineren atherosklerotischen Plaques führt. Die Dkk1-Heterozygotie führt zu einer vermehrten Ansammlung von EZM im atherosklerotischen Plaque und tendenziell dickeren fibrösen Kappen. Die Plagues der Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Mäuse sind nach einem Jahr SF signifikant kleiner als die der Kontrolltiere und haben einen kleineren nekrotischen Kern. Alle diese Attribute lassen auf stabilere Plagues schliessen. Auch in der Kalzifizierung der Plagues konnte eine Tendenz zu einer Verringerung in den Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} Mäusen festgestellt werden. Dkk1 und der Wnt-Signalweg spielen aufgrund ihrer bekannten Rolle in der Proliferation, der Beständigkeit und der Apoptose von Zellen eine nicht zu unterschätzende Rolle in der Plagueentstehung. Denn sowohl die Proliferation von VSMCs, die eine wichtige Rolle in der Bildung der fibrösen Kappe spielt, als auch die Apoptose von VSMCs und Makrophagen, die zur Entstehung des nekrotischen Kerns beitragen, haben einen großen Anteil an Stabilität oder Vulnerabilität in der Atherosklerose. Auch der Einfluss des Wnt-Signalweges auf inflammatorische Signalwege und in der Produktion von extrazellulärer Matrix spielen dabei eine Rolle. Diese Omnipräsens des Wnt-Signalweges macht es schwierig Einblick und Klarheit über seine Funktion in einzelnen, begrenzten Bereichen zu bekommen. Sie verdeutlicht auch die Bedeutsamkeit dieses Signalweges weit über die aber Embryonalentwicklung hinaus. Somit bleibt der Wnt-Signalweg ein interessanter und relevanter Forschungsbereich um die Atherosklerose und ihre Folgen wie Schlaganfall und Herzinfarkt besser zu verstehen und zu behandeln. Sollte sich die Rolle von Dkk1 in weiteren Analysen bestätigen, könnte es ein therapeutisches Ziel für die Stabilisierung der SO Atherosklerose in vorbelasteten Patienten sein. Auch das Wissen über die Rolle von Dkk1 in der Kalzifizierung könnte bei CKD-Patienten hilfreich sein.

6. Summary

It was the aim of this work to evaluate, if Dkk1 is involved in atherogenesis. With the help of the Apoe^{-/-} mouse model one could show, that less Dkk1expression attenuates plaque development and leads to more stable atherosclerotic plaques in the first year of male mice. Dkk1 heterozygosity leads to an accumulation of more ECM in the atherosclerotic plague and probably to a thickening of the fibrous cap. Plaques of Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-} mice after 1 year SF are significantly smaller and exhibit a significant smaller necrotic core compared to the control mice. All these characteristics, indicate on more stable plaques. As well the calcification in the plaques of the Appe---; $Dkk1^{+/-}$ mice shows a tendency to reduction compared to the Apoe^{-/-}; $Dkk1^{+/+}$ mice. Because of their role in proliferation, cell stability and apoptosis, Dkk1 and Wnt have a relevant role in atherogenesis. Proliferation of VSMCs is significantly involved in the formation of the fibrous cap and apoptosis of macrophages and VSMCs are crucial events in the development of the necrotic core. Also the influence on inflammatory pathways and ECM production by Wnt and its inhibitor contribute to their role in atherogenesis. The omnipresence of the Wnt pathway makes it complicated to get insights into its precise role and function, but also turns out ist remarkableness beyond embryonic development. Wnt and Dkk1 still are an interesting and relevant field of research to understand and medicate atherosclerosis and its consequences like stroke and myocardial infarction. If the role of Dkk1 can be verifed in further studies it could become a therapeutic target for stabilisation of atherosclerosis in predisposed patients. Also the knowledge about its role in calcification processes can be helpful for CKD patients.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Арое	Apolipoprotein E
APC	Adenmatous polyposis coli
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
°C	Grad Celsius
CK1	Casein Kinase 1
cm	centimeter
Dkk1/DKK1	Dickkopf 1-Gen murin/human
Dkk1/DKK1	Dickkopf 1-Protein murin/human
dest.	Destilliert
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphatgemisch

Dvl	Disheveled
et al.	und andere (et alii)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
Engl.	englisch
EMT	Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere
ERK1/2	Extracelluar signal-Regulated Kinase ½
EZM/ECM	Exrazelluläre Matrix / Extracellular Matrix
Fgf	Fibroblast growth factor
G	Gramm
н	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCI	Salzsäure
HFD	High Fat Diet
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KG	Körpergewicht
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoprotein Related superfamily
LRP	Low density lipoprotein Receptor related Protein
М	Molar
mA	Milliampere
Мдр	Matrix-Gla-Protein
ml	Milliliter

mM	Millimolar
mmol	Millimol
min.	Minuten
hð	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
µmol	Mikromol
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
SF	Standardfutter
Opn	Osteopontin
ox-LDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
р	p-Wert , Angabe für Signifikanzen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldehyd
рН	pH-Wert
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RLT	Lysepuffer für RNA-Präparation
RW1	Waschpuffer für RNA-Präparation
RPE	Präparationspuffer für RNA-Präparation
RDD	Puffer für DNase

Runx2	Runt-related transcriptoin factor 2
S	Sekunde
si-RNA	silencing-RNA
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaricus
Tcf	T-cell factor
TE	Tris-EDTA
Upm	Umdrehungen pro Minute
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
Ü/N	über Nacht
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (engl. volume/volume)
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. weight/volume)
V	Volt
VSMCs	Vascular Smooth Muscle Cells
z.B.	zum Beispiel
8. Literaturverzeichnis

- Aguilera, O., Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Herranz, M., Espada, J., . . . Gonzalez-Sancho, J. M. (2006). Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene*, 25(29), 4116-4121. doi: 10.1038/sj.onc.1209439
- Akhmetshina, A., Palumbo, K., Dees, C., Bergmann, C., Venalis, P., Zerr, P., . . . Distler, J. H. (2012). Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis. *Nat Commun*, *3*, 735. doi: 10.1038/ncomms1734
- Alexopoulos, N., & Raggi, P. (2009). Calcification in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol, 6*(11), 681-688. doi: 10.1038/nrcardio.2009.165
- Ang, S. J., Stump, R. J., Lovicu, F. J., & McAvoy, J. W. (2004). Spatial and temporal expression of Wnt and Dickkopf genes during murine lens development. *Gene Expr Patterns*, 4(3), 289-295. doi: 10.1016/j.modgep.2003.11.002
- Beazley, K. E., Lima, F., Borras, T., & Nurminskaya, M. (2013). Attenuation of chondrogenic transformation in vascular smooth muscle by dietary quercetin in the MGP-deficient mouse model. *PLoS One*, 8(9), e76210. doi: 10.1371/journal.pone.0076210
- Bedel, A., Negre-Salvayre, A., Heeneman, S., Grazide, M. H., Thiers, J. C., Salvayre, R., & Maupas-Schwalm, F. (2008). E-cadherin/beta-catenin/T-cell factor pathway is involved in smooth muscle cell proliferation elicited by oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res, 103*(7), 694-701. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.166405
- Bennett, C. N., Ross, S. E., Longo, K. A., Bajnok, L., Hemati, N., Johnson, K. W., . . MacDougald, O. A. (2002). Regulation of Wnt signaling during adipogenesis. J Biol Chem, 277(34), 30998-31004. doi: 10.1074/jbc.M204527200
- Bhatt, P. M., Lewis, C. J., House, D. L., Keller, C. M., Kohn, L. D., Silver, M. J., ... Malgor, R. (2012). Increased Wnt5a mRNA Expression in Advanced Atherosclerotic Lesions, and Oxidized LDL Treated Human Monocyte-Derived Macrophages. *Open Circ Vasc J*, 5, 1-7.
- Bini, A., Mann, K. G., Kudryk, B. J., & Schoen, F. J. (1999). Noncollagenous bone matrix proteins, calcification, and thrombosis in carotid artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(8), 1852-1861.
- Borrell-Pages, M., Romero, J. C., Juan-Babot, O., & Badimon, L. (2011). Wnt pathway activation, cell migration, and lipid uptake is regulated by low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in human macrophages. *Eur Heart J*, *32*(22), 2841-2850. doi: 10.1093/eurheartj/ehr062
- Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F., & Kirchner, T. (1999). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol*, *155*(4), 1033-1038.
- Brack, A. S., Conboy, M. J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C. J., Keller, C., & Rando, T. A. (2007). Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science*, 317(5839), 807-810. doi: 10.1126/science.1144090
- Branen, L., Hovgaard, L., Nitulescu, M., Bengtsson, E., Nilsson, J., & Jovinge, S. (2004). Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(11), 2137-2142. doi: 10.1161/01.ATV.0000143933.20616.1b

- Butler, J. S., Murray, D. W., Hurson, C. J., O'Brien, J., Doran, P. P., & O'Byrne, J. M. (2011). The role of Dkk1 in bone mass regulation: correlating serum Dkk1 expression with bone mineral density. *J Orthop Res, 29*(3), 414-418. doi: 10.1002/jor.21260
- Butler, J. S., Queally, J. M., Devitt, B. M., Murray, D. W., Doran, P. P., & O'Byrne, J. M. (2010). Silencing Dkk1 expression rescues dexamethasone-induced suppression of primary human osteoblast differentiation. *BMC Musculoskelet Disord*, 11, 210. doi: 10.1186/1471-2474-11-210
- Campuzano, R., Moya, J. L., Garcia-Lledo, A., Salido, L., Guzman, G., Tomas, J. P., . . . Asin, E. (2003). [Endothelial dysfunction and intima-media thickness in relation to cardiovascular risk factors in patients without clinical manifestations of atherosclerosis]. *Rev Esp Cardiol*, 56(6), 546-554.
- Cappendijk, V. C., Kessels, A. G., Heeneman, S., Cleutjens, K. B., Schurink, G. W., Welten, R. J., . . . Kooi, M. E. (2008). Comparison of lipid-rich necrotic core size in symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque: Initial results. *J Magn Reson Imaging*, 27(6), 1356-1361. doi: 10.1002/jmri.21359
- Chae, W. J., Ehrlich, A. K., Chan, P. Y., Teixeira, A. M., Henegariu, O., Hao, L., ... Bothwell, A. L. (2016). The Wnt Antagonist Dickkopf-1 Promotes Pathological Type 2 Cell-Mediated Inflammation. *Immunity*, 44(2), 246-258. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.008
- Chamorro, M. N., Schwartz, D. R., Vonica, A., Brivanlou, A. H., Cho, K. R., & Varmus, H. E. (2005). FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of betacatenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J*, 24(1), 73-84. doi: 10.1038/sj.emboj.7600460
- Chen, N. X., & Moe, S. M. (2003). Arterial calcification in diabetes. *Curr Diab Rep*, 3(1), 28-32.
- Christman, M. A., 2nd, Goetz, D. J., Dickerson, E., McCall, K. D., Lewis, C. J., Benencia, F., . . . Malgor, R. (2008). Wnt5a is expressed in murine and human atherosclerotic lesions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol, 294*(6), H2864-2870. doi: 10.1152/ajpheart.00982.2007
- Clarke, M. C., Littlewood, T. D., Figg, N., Maguire, J. J., Davenport, A. P., Goddard, M., & Bennett, M. R. (2008). Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ Res, 102*(12), 1529-1538. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.175976
- Crisby, M., Kallin, B., Thyberg, J., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Kostulas, V., & Nilsson, J. (1997). Cell death in human atherosclerotic plaques involves both oncosis and apoptosis. *Atherosclerosis*, 130(1-2), 17-27.
- Davenport, P., & Tipping, P. G. (2003). The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*, *163*(3), 1117-1125. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63471-2
- Davies, M. J., Richardson, P. D., Woolf, N., Katz, D. R., & Mann, J. (1993). Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J*, *69*(5), 377-381.
- DeClercq, V. C., Goldsby, J. S., McMurray, D. N., & Chapkin, R. S. (2016). Distinct Adipose Depots from Mice Differentially Respond to a High-Fat, High-Salt Diet. J Nutr. doi: 10.3945/jn.115.227496
- Dhore, C. R., Cleutjens, J. P., Lutgens, E., Cleutjens, K. B., Geusens, P. P., Kitslaar, P. J., . . Daemen, M. J. (2001). Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(12), 1998-2003.

- Diarra, D., Stolina, M., Polzer, K., Zwerina, J., Ominsky, M. S., Dwyer, D., . . . Schett, G. (2007). Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med*, 13(2), 156-163. doi: 10.1038/nm1538
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., & Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89(5), 747-754.
- Ellwanger, K., Saito, H., Clement-Lacroix, P., Maltry, N., Niedermeyer, J., Lee, W. K., . . . Niehrs, C. (2008). Targeted disruption of the Wnt regulator Kremen induces limb defects and high bone density. *Mol Cell Biol*, 28(15), 4875-4882. doi: 10.1128/MCB.00222-08
- Finn, A. V., Nakano, M., Narula, J., Kolodgie, F. D., & Virmani, R. (2010). Concept of vulnerable/unstable plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(7), 1282-1292. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179739
- Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V., Komm, B. S., . . . Lian, J. B. (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem*, 280(39), 33132-33140. doi: 10.1074/jbc.M500608200
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2009). Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res, 50 Suppl*, S156-161. doi: 10.1194/jlr.R800058-JLR200
- Glagov, S., Weisenberg, E., Zarins, C. K., Stankunavicius, R., & Kolettis, G. J. (1987). Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. N Engl J Med, 316(22), 1371-1375. doi: 10.1056/NEJM198705283162204
- Glantschnig, H., Hampton, R. A., Lu, P., Zhao, J. Z., Vitelli, S., Huang, L., . . . Wang, F. (2010). Generation and selection of novel fully human monoclonal antibodies that neutralize Dickkopf-1 (DKK1) inhibitory function in vitro and increase bone mass in vivo. *J Biol Chem*, 285(51), 40135-40147. doi: 10.1074/jbc.M110.166892
- Glass, D. A., 2nd, & Karsenty, G. (2007). In vivo analysis of Wnt signaling in bone. *Endocrinology*, 148(6), 2630-2634. doi: 10.1210/en.2006-1372
- Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A. P., Blumenstock, C., & Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 391(6665), 357-362. doi: 10.1038/34848
- Goldring, S. R., & Goldring, M. B. (2007). Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. *Nat Med*, 13(2), 133-134. doi: 10.1038/nm0207-133
- Grainger, D. J., Kemp, P. R., Metcalfe, J. C., Liu, A. C., Lawn, R. M., Williams, N. R., . . . Chauhan, A. (1995). The serum concentration of active transforming growth factor-beta is severely depressed in advanced atherosclerosis. *Nat Med*, 1(1), 74-79.
- Grotewold, L., & Ruther, U. (2002a). Bmp, Fgf and Wnt signalling in programmed cell death and chondrogenesis during vertebrate limb development: the role of Dickkopf-1. *Int J Dev Biol, 46*(7), 943-947.
- Grotewold, L., & Ruther, U. (2002b). The Wnt antagonist Dickkopf-1 is regulated by Bmp signaling and c-Jun and modulates programmed cell death. *EMBO J*, 21(5), 966-975. doi: 10.1093/emboj/21.5.966
- Hamidouche, Z., Hay, E., Vaudin, P., Charbord, P., Schule, R., Marie, P. J., & Fromigue, O. (2008). FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signalingdependent Runx2 expression. *FASEB J*, 22(11), 3813-3822. doi: 10.1096/fj.08-106302

- Hansson, G. K. (2001). Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol, 21*(12), 1876-1890.
- Hardy, R., Juarez, M., Naylor, A., Tu, J., Rabbitt, E. H., Filer, A., . . . Cooper, M. S. (2012). Synovial DKK1 expression is regulated by local glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*, 14(5), R226. doi: 10.1186/ar4065
- Hegyi, L., Skepper, J. N., Cary, N. R., & Mitchinson, M. J. (1996). Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. J Pathol, 180(4), 423-429. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199612)180:4<423::AID-PATH677>3.0.CO;2-1
- Hermanowski-Vosatka, A., Balkovec, J. M., Cheng, K., Chen, H. Y., Hernandez, M., Koo, G. C., . . . Thieringer, R. (2005). 11beta-HSD1 inhibition ameliorates metabolic syndrome and prevents progression of atherosclerosis in mice. J Exp Med, 202(4), 517-527. doi: 10.1084/jem.20050119
- Hirata, H., Hinoda, Y., Nakajima, K., Kawamoto, K., Kikuno, N., Ueno, K., . . . Dahiya, R. (2011). Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer*, *128*(8), 1793-1803. doi: 10.1002/ijc.25507
- Humphries, S. E., & Morgan, L. (2004). Genetic risk factors for stroke and carotid atherosclerosis: insights into pathophysiology from candidate gene approaches. *Lancet Neurol*, 3(4), 227-235. doi: 10.1016/S1474-4422(04)00708-2
- Hyder, J. A., Allison, M. A., Criqui, M. H., & Wright, C. M. (2007). Association between systemic calcified atherosclerosis and bone density. *Calcif Tissue Int*, 80(5), 301-306. doi: 10.1007/s00223-007-9004-6
- Hyder, J. A., Allison, M. A., Wong, N., Papa, A., Lang, T. F., Sirlin, C., . . . Criqui, M. H. (2009). Association of coronary artery and aortic calcium with lumbar bone density: the MESA Abdominal Aortic Calcium Study. *Am J Epidemiol*, 169(2), 186-194. doi: 10.1093/aje/kwn303
- Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., ... Matsumoto, K. (2003). The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/betacatenin signaling. *Mol Cell Biol*, 23(1), 131-139.
- Johnson, J. L. (2007). Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 5(2), 265-282. doi: 10.1586/14779072.5.2.265
- Johnson, M. L., Harnish, K., Nusse, R., & Van Hul, W. (2004). LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. *J Bone Miner Res, 19*(11), 1749-1757. doi: 10.1359/JBMR.040816
- Kahles, F., Findeisen, H. M., & Bruemmer, D. (2014). Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab*, *3*(4), 384-393. doi: 10.1016/j.molmet.2014.03.004
- Kaiser, M., Mieth, M., Liebisch, P., Oberlander, R., Rademacher, J., Jakob, C., ... Heider, U. (2008). Serum concentrations of DKK-1 correlate with the extent of bone disease in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol, 80*(6), 490-494. doi: 10.1111/j.1600-0609.2008.01065.x
- Kanazawa, A., Tsukada, S., Kamiyama, M., Yanagimoto, T., Nakajima, M., & Maeda, S. (2005). Wnt5b partially inhibits canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun, 330*(2), 505-510. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.007

- Khoshniat, S., Bourgine, A., Julien, M., Petit, M., Pilet, P., Rouillon, T., ... Beck, L. (2011). Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium. *Bone, 48*(4), 894-902. doi: 10.1016/j.bone.2010.12.002
- Kim, H. K., Oxendine, I., & Kamiya, N. (2013). High-concentration of BMP2 reduces cell proliferation and increases apoptosis via DKK1 and SOST in human primary periosteal cells. *Bone*, 54(1), 141-150. doi: 10.1016/j.bone.2013.01.031
- Kim, J., Kim, J., Kim, D. W., Ha, Y., Ihm, M. H., Kim, H., . . . Lee, I. (2010). Wnt5a induces endothelial inflammation via beta-catenin-independent signaling. J Immunol, 185(2), 1274-1282. doi: 10.4049/jimmunol.1000181
- Kim, K. I., Park, K. U., Chun, E. J., Choi, S. I., Cho, Y. S., Youn, T. J., ... Kim, C. H. (2011). A novel biomarker of coronary atherosclerosis: serum DKK1 concentration correlates with coronary artery calcification and atherosclerotic plaques. J Korean Med Sci, 26(9), 1178-1184. doi: 10.3346/jkms.2011.26.9.1178
- Knobloch, J., Shaughnessy, J. D., Jr., & Ruther, U. (2007). Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway. *FASEB J*, 21(7), 1410-1421. doi: 10.1096/fj.06-7603com
- Kolodgie, F. D., Gold, H. K., Burke, A. P., Fowler, D. R., Kruth, H. S., Weber, D. K., . . . Virmani, R. (2003). Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. N Engl J Med, 349(24), 2316-2325. doi: 10.1056/NEJMoa035655
- Krause, U., Ryan, D. M., Clough, B. H., & Gregory, C. A. (2014). An unexpected role for a Wnt-inhibitor: Dickkopf-1 triggers a novel cancer survival mechanism through modulation of aldehyde-dehydrogenase-1 activity. *Cell Death Dis*, 5, e1093. doi: 10.1038/cddis.2014.67
- Krupnik, V. E., Sharp, J. D., Jiang, C., Robison, K., Chickering, T. W., Amaravadi, L., . . . McCarthy, S. A. (1999). Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene*, 238(2), 301-313.
- Kunishima, A., Takemura, G., Takatsu, H., Hayakawa, Y., Kanoh, M., Qiu, X., ... Fujiwara, H. (1999). Mode and role of cell death during progression of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic rabbits. *Heart Vessels*, 14(6), 295-306.
- Lee, A. Y., He, B., You, L., Xu, Z., Mazieres, J., Reguart, N., . . . Jablons, D. M. (2004). Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma. *Biochem Biophys Res Commun*, 323(4), 1246-1250. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.001
- Lee, D. K., Nathan Grantham, R., Trachte, A. L., Mannion, J. D., & Wilson, C. L. (2006). Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway enhances monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 347(1), 109-116. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.06.082
- Lee, J., Yoon, Y. S., & Chung, J. H. (2008). Epigenetic silencing of the WNT antagonist DICKKOPF-1 in cervical cancer cell lines. *Gynecol Oncol*, 109(2), 270-274. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.01.034
- Li, J., Sarosi, I., Cattley, R. C., Pretorius, J., Asuncion, F., Grisanti, M., . . . Richards, W. G. (2006). Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone*, 39(4), 754-766. doi: 10.1016/j.bone.2006.03.017
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature, 420*(6917), 868-874. doi: 10.1038/nature01323

- Libby, P., & Aikawa, M. (2002). Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med*, 8(11), 1257-1262. doi: 10.1038/nm1102-1257
- Lieven, O., Dronka, J., Burmuhl, S., & Ruther, U. (2014). Differential binding of Lef1 and Msx1/2 transcription factors to Dkk1 CNEs correlates with reporter gene expression in vivo. *PLoS One*, 9(12), e115442. doi: 10.1371/journal.pone.0115442
- Luo, G., Ducy, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R., & Karsenty, G. (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 386(6620), 78-81. doi: 10.1038/386078a0
- Lutgens, E., de Muinck, E. D., Heeneman, S., & Daemen, M. J. (2001). Compensatory enlargement and stenosis develop in apoE(-/-) and apoE*3-Leiden transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(8), 1359-1365.
- Lutgens, E., Gijbels, M., Smook, M., Heeringa, P., Gotwals, P., Koteliansky, V. E., & Daemen, M. J. (2002). Transforming growth factor-beta mediates balance between inflammation and fibrosis during plaque progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(6), 975-982.
- MacDonald, B. T., Joiner, D. M., Oyserman, S. M., Sharma, P., Goldstein, S. A., He, X., & Hauschka, P. V. (2007). Bone mass is inversely proportional to Dkk1 levels in mice. *Bone*, 41(3), 331-339. doi: 10.1016/j.bone.2007.05.009
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17(1), 9-26. doi: 10.1016/j.devcel.2009.06.016
- Magoori, K., Kang, M. J., Ito, M. R., Kakuuchi, H., Ioka, R. X., Kamataki, A., ... Yamamoto, T. T. (2003). Severe hypercholesterolemia, impaired fat tolerance, and advanced atherosclerosis in mice lacking both low density lipoprotein receptor-related protein 5 and apolipoprotein E. J Biol Chem, 278(13), 11331-11336. doi: 10.1074/jbc.M211987200
- Malgor, R., Bhatt, P. M., Connolly, B. A., Jacoby, D. L., Feldmann, K. J., Silver, M. J., . . . Goetz, D. J. (2014). Wnt5a, TLR2 and TLR4 are elevated in advanced human atherosclerotic lesions. *Inflamm Res, 63*(4), 277-285. doi: 10.1007/s00011-013-0697-x
- Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., Kamate, C., Merval, R., . . . Tedgui, A. (2001). Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res, 89*(10), 930-934.
- Mani, A., Radhakrishnan, J., Wang, H., Mani, A., Mani, M. A., Nelson-Williams, C., . . . Lifton, R. P. (2007). LRP6 mutation in a family with early coronary disease and metabolic risk factors. *Science*, 315(5816), 1278-1282. doi: 10.1126/science.1136370
- Manning, A. M., & Davis, R. J. (2003). Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat Rev Drug Discov*, 2(7), 554-565. doi: 10.1038/nrd1132
- Mao, B., & Niehrs, C. (2003). Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signaling. *Gene*, 302(1-2), 179-183.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B. M., . . . Niehrs, C. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/betacatenin signalling. *Nature*, 417(6889), 664-667. doi: 10.1038/nature756
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A., & Niehrs, C. (2001). LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*, 411(6835), 321-325. doi: 10.1038/35077108

- Marcovitz, P. A., Tran, H. H., Franklin, B. A., O'Neill, W. W., Yerkey, M., Boura, J., . . . Dickinson, C. Z. (2005). Usefulness of bone mineral density to predict significant coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 96(8), 1059-1063. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.06.034
- Martinet, W., Schrijvers, D. M., & De Meyer, G. R. (2011). Necrotic cell death in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol*, 106(5), 749-760. doi: 10.1007/s00395-011-0192-x
- Masckauchan, T. N., Shawber, C. J., Funahashi, Y., Li, C. M., & Kitajewski, J. (2005). Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis*, 8(1), 43-51. doi: 10.1007/s10456-005-5612-9
- Maye, P., Zheng, J., Li, L., & Wu, D. (2004). Multiple mechanisms for Wnt11mediated repression of the canonical Wnt signaling pathway. *J Biol Chem*, 279(23), 24659-24665. doi: 10.1074/jbc.M311724200
- Mendoza, F. J., Martinez-Moreno, J., Almaden, Y., Rodriguez-Ortiz, M. E., Lopez, I., Estepa, J. C., . . . Aguilera-Tejero, E. (2011). Effect of calcium and the calcimimetic AMG 641 on matrix-Gla protein in vascular smooth muscle cells. *Calcif Tissue Int*, 88(3), 169-178. doi: 10.1007/s00223-010-9442-4
- Mill, C., & George, S. J. (2012). Wnt signalling in smooth muscle cells and its role in cardiovascular disorders. *Cardiovasc Res*, 95(2), 233-240. doi: 10.1093/cvr/cvs141
- Mizobuchi, M., Towler, D., & Slatopolsky, E. (2009). Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. J Am Soc Nephrol, 20(7), 1453-1464. doi: 10.1681/ASN.2008070692
- Monaghan, A. P., Kioschis, P., Wu, W., Zuniga, A., Bock, D., Poustka, A., . . . Niehrs, C. (1999). Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mech Dev*, 87(1-2), 45-56.
- Morvan, F., Boulukos, K., Clement-Lacroix, P., Roman Roman, S., Suc-Royer, I., Vayssiere, B., . . . Rawadi, G. (2006). Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res*, 21(6), 934-945. doi: 10.1359/jbmr.060311
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., . . Westphal, H. (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell, 1*(3), 423-434.
- Nakanishi, R., Li, D., Blaha, M. J., Whelton, S. P., Darabian, S., Flores, F. R., ... Budoff, M. J. (2015). All-cause mortality by age and gender based on coronary artery calcium scores. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. doi: 10.1093/ehjci/jev328
- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., & Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, 14(1), 133-140.
- Nakashima, Y., Raines, E. W., Plump, A. S., Breslow, J. L., & Ross, R. (1998). Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(5), 842-851.
- Naves, M., Rodriguez-Garcia, M., Diaz-Lopez, J. B., Gomez-Alonso, C., & Cannata-Andia, J. B. (2008). Progression of vascular calcifications is associated with greater bone loss and increased bone fractures. *Osteoporos Int, 19*(8), 1161-1166. doi: 10.1007/s00198-007-0539-1

- Newby, A. C. (1997). Molecular and cell biology of native coronary and vein-graft atherosclerosis: regulation of plaque stability and vessel-wall remodelling by growth factors and cell-extracellular matrix interactions. *Coron Artery Dis*, 8(3-4), 213-224.
- Newby, A. C., George, S. J., Ismail, Y., Johnson, J. L., Sala-Newby, G. B., & Thomas, A. C. (2009). Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foam cell phenotypes. *Thromb Haemost*, 101(6), 1006-1011.
- Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol, 13*(12), 767-779. doi: 10.1038/nrm3470
- Niida, A., Hiroko, T., Kasai, M., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Suzuki, Y., . . . Akiyama, T. (2004). DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene*, 23(52), 8520-8526. doi: 10.1038/sj.onc.1207892
- O'Brien, E. R., Garvin, M. R., Stewart, D. K., Hinohara, T., Simpson, J. B., Schwartz, S. M., & Giachelli, C. M. (1994). Osteopontin is synthesized by macrophage, smooth muscle, and endothelial cells in primary and restenotic human coronary atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb*, 14(10), 1648-1656.
- Pasterkamp, G., Falk, E., Woutman, H., & Borst, C. (2000). Techniques characterizing the coronary atherosclerotic plaque: influence on clinical decision making? J Am Coll Cardiol, 36(1), 13-21.
- Pena, E., Arderiu, G., & Badimon, L. (2013). Tissue factor induces human coronary artery smooth muscle cell motility through Wnt-signalling. J Thromb Haemost, 11(10), 1880-1891. doi: 10.1111/jth.12327
- Pinzone, J. J., Hall, B. M., Thudi, N. K., Vonau, M., Qiang, Y. W., Rosol, T. J., & Shaughnessy, J. D., Jr. (2009). The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood*, 113(3), 517-525. doi: 10.1182/blood-2008-03-145169
- Rattazzi, M., Bennett, B. J., Bea, F., Kirk, E. A., Ricks, J. L., Speer, M., . . . Rosenfeld, M. E. (2005). Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(7), 1420-1425. doi: 10.1161/01.ATV.0000166600.58468.1b
- Reddick, R. L., Zhang, S. H., & Maeda, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb, 14*(1), 141-147.
- Ren, D., Wei, F., Hu, L., Yang, S., Wang, C., & Yuan, X. (2015). Phosphorylation of Runx2, induced by cyclic mechanical tension via ERK1/2 pathway, contributes to osteodifferentiation of human periodontal ligament fibroblasts. *J Cell Physiol*, 230(10), 2426-2436. doi: 10.1002/jcp.24972
- Ren, S., Johnson, B. G., Kida, Y., Ip, C., Davidson, K. C., Lin, S. L., . . . Duffield, J. S. (2013). LRP-6 is a coreceptor for multiple fibrogenic signaling pathways in pericytes and myofibroblasts that are inhibited by DKK-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(4), 1440-1445. doi: 10.1073/pnas.1211179110
- Ricci, R., Sumara, G., Sumara, I., Rozenberg, I., Kurrer, M., Akhmedov, A., . . . Luscher, T. F. (2004). Requirement of JNK2 for scavenger receptor Amediated foam cell formation in atherogenesis. *Science*, 306(5701), 1558-1561. doi: 10.1126/science.1101909
- Rong, S., Zhao, X., Jin, X., Zhang, Z., Chen, L., Zhu, Y., & Yuan, W. (2014). Vascular calcification in chronic kidney disease is induced by bone

morphogenetic protein-2 via a mechanism involving the Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Physiol Biochem*, 34(6), 2049-2060. doi: 10.1159/000366400

- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell*, *156*(1-2), 20-44. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.012
- Rosenfeld, M. E., Polinsky, P., Virmani, R., Kauser, K., Rubanyi, G., & Schwartz, S. M. (2000). Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20*(12), 2587-2592.
- Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature, 362*(6423), 801-809. doi: 10.1038/362801a0
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 340(2), 115-126. doi: 10.1056/NEJM199901143400207
- Ross, S. E., Hemati, N., Longo, K. A., Bennett, C. N., Lucas, P. C., Erickson, R. L., & MacDougald, O. A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, 289(5481), 950-953.
- Saini, S., Majid, S., & Dahiya, R. (2011). The complex roles of Wnt antagonists in RCC. *Nat Rev Urol*, *8*(12), 690-699. doi: 10.1038/nrurol.2011.146
- Scali, C., Caraci, F., Gianfriddo, M., Diodato, E., Roncarati, R., Pollio, G., . . . Caricasole, A. (2006). Inhibition of Wnt signaling, modulation of Tau phosphorylation and induction of neuronal cell death by DKK1. *Neurobiol Dis*, 24(2), 254-265. doi: 10.1016/j.nbd.2006.06.016
- Schulz, E., Arfai, K., Liu, X., Sayre, J., & Gilsanz, V. (2004). Aortic calcification and the risk of osteoporosis and fractures. J Clin Endocrinol Metab, 89(9), 4246-4253. doi: 10.1210/jc.2003-030964
- Schwartz, S. M., deBlois, D., & O'Brien, E. R. (1995). The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res*, 77(3), 445-465.
- Semenov, M. V., Tamai, K., Brott, B. K., Kuhl, M., Sokol, S., & He, X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol*, *11*(12), 951-961.
- Semenov, M. V., Zhang, X., & He, X. (2008). DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation. J Biol Chem, 283(31), 21427-21432. doi: 10.1074/jbc.M800014200
- Shao, J. S., Cheng, S. L., Pingsterhaus, J. M., Charlton-Kachigian, N., Loewy, A. P., & Towler, D. A. (2005). Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J Clin Invest*, 115(5), 1210-1220. doi: 10.1172/JCI24140
- Sorensen, K. E., Celermajer, D. S., Georgakopoulos, D., Hatcher, G., Betteridge, D. J., & Deanfield, J. E. (1994). Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level. J Clin Invest, 93(1), 50-55. doi: 10.1172/JCI116983
- Speer, M. Y., & Giachelli, C. M. (2004). Regulation of cardiovascular calcification. *Cardiovasc Pathol, 13*(2), 63-70. doi: 10.1016/S1054-8807(03)00130-3
- Speer, M. Y., Yang, H. Y., Brabb, T., Leaf, E., Look, A., Lin, W. L., . . . Giachelli, C. M. (2009). Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ Res, 104*(6), 733-741. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183053
- Stary, H. C., Blankenhorn, D. H., Chandler, A. B., Glagov, S., Insull, W., Jr., Richardson, M., . . . et al. (1992). A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 85(1), 391-405.

- Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., ... 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 15(9), 1512-1531.
- Steinberg, H. O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G., & Baron, A. D. (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*, 97(11), 2601-2610. doi: 10.1172/JCI118709
- Tchkonia, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab*, 17(5), 644-656. doi: 10.1016/j.cmet.2013.03.008
- Thambiah, S., Roplekar, R., Manghat, P., Fogelman, I., Fraser, W. D., Goldsmith, D., & Hampson, G. (2012). Circulating sclerostin and Dickkopf-1 (DKK1) in predialysis chronic kidney disease (CKD): relationship with bone density and arterial stiffness. *Calcif Tissue Int*, 90(6), 473-480. doi: 10.1007/s00223-012-9595-4
- Thorngate, F. E., Strockbine, P. A., Erickson, S. K., & Williams, D. L. (2002). Altered adrenal gland cholesterol metabolism in the apoE-deficient mouse. J Lipid Res, 43(11), 1920-1926.
- Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P. J., & Yang, Y. (2003). Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3independent beta-catenin degradation. J Cell Biol, 162(5), 899-908. doi: 10.1083/jcb.200303158
- Tota-Maharaj, R., Blaha, M. J., McEvoy, J. W., Blumenthal, R. S., Muse, E. D., Budoff, M. J., . . . Nasir, K. (2012). Coronary artery calcium for the prediction of mortality in young adults <45 years old and elderly adults >75 years old. *Eur Heart J*, 33(23), 2955-2962. doi: 10.1093/eurheartj/ehs230
- Trion, A., & van der Laarse, A. (2004). Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *Am Heart J*, 147(5), 808-814. doi: 10.1016/j.ahj.2003.10.047
- Tsaousi, A., Williams, H., Lyon, C. A., Taylor, V., Swain, A., Johnson, J. L., & George, S. J. (2011). Wnt4/beta-catenin signaling induces VSMC proliferation and is associated with intimal thickening. *Circ Res, 108*(4), 427-436. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233999
- Tyson, K. L., Reynolds, J. L., McNair, R., Zhang, Q., Weissberg, P. L., & Shanahan, C. M. (2003). Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23(3), 489-494. doi: 10.1161/01.ATV.0000059406.92165.31
- Ueland, T., Otterdal, K., Lekva, T., Halvorsen, B., Gabrielsen, A., Sandberg, W. J., .
 Aukrust, P. (2009). Dickkopf-1 enhances inflammatory interaction between platelets and endothelial cells and shows increased expression in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol, 29*(8), 1228-1234. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.189761
- Virmani, R., Burke, A. P., Farb, A., & Kolodgie, F. D. (2006). Pathology of the vulnerable plaque. J Am Coll Cardiol, 47(8 Suppl), C13-18. doi: 10.1016/j.jacc.2005.10.065
- Virmani, R., Burke, A. P., Kolodgie, F. D., & Farb, A. (2002). Vulnerable plaque: the pathology of unstable coronary lesions. *J Interv Cardiol, 15*(6), 439-446.

- Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., & Schwartz, S. M. (2000). Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(5), 1262-1275.
- Voskaridou, E., Christoulas, D., Xirakia, C., Varvagiannis, K., Boutsikas, G., Bilalis, A., . . . Terpos, E. (2009). Serum Dickkopf-1 is increased and correlates with reduced bone mineral density in patients with thalassemia-induced osteoporosis. Reduction post-zoledronic acid administration. *Haematologica*, 94(5), 725-728. doi: 10.3324/haema-tol.2008.000893
- Walker, B. R. (2007). Glucocorticoids and cardiovascular disease. *Eur J Endocrinol*, 157(5), 545-559. doi: 10.1530/EJE-07-0455
- Wang, S. Y., Liu, Y. Y., Ye, H., Guo, J. P., Li, R., Liu, X., & Li, Z. G. (2011). Circulating Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 38(5), 821-827. doi: 10.3899/jrheum.100089
- Wang, X., Adhikari, N., Li, Q., & Hall, J. L. (2004). LDL receptor-related protein LRP6 regulates proliferation and survival through the Wnt cascade in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 287(6), H2376-2383. doi: 10.1152/ajpheart.01173.2003
- Wang, X., Xiao, Y., Mou, Y., Zhao, Y., Blankesteijn, W. M., & Hall, J. L. (2002). A role for the beta-catenin/T-cell factor signaling cascade in vascular remodeling. *Circ Res*, 90(3), 340-347.
- Wu, B., Crampton, S. P., & Hughes, C. C. (2007). Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity*, 26(2), 227-239. doi: 10.1016/j.immuni.2006.12.007
- Wu, X., Deng, G., Li, M., Li, Y., Ma, C., Wang, Y., & Liu, X. (2015). Wnt/betacatenin signaling reduces Bacillus Calmette-Guerin-induced macrophage necrosis through a ROS -mediated PARP/AIF-dependent pathway. BMC Immunol, 16, 16. doi: 10.1186/s12865-015-0080-5
- Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R., & Franceschi, R. T. (2002). Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. J Biol Chem, 277(39), 36181-36187. doi: 10.1074/jbc.M206057200
- Yamabuki, T., Takano, A., Hayama, S., Ishikawa, N., Kato, T., Miyamoto, M., . . . Daigo, Y. (2007). Dikkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res, 67*(6), 2517-2525. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3369
- Yao, G. Q., Wu, J. J., Troiano, N., & Insogna, K. (2011). Targeted overexpression of Dkk1 in osteoblasts reduces bone mass but does not impair the anabolic response to intermittent PTH treatment in mice. *J Bone Miner Metab*, 29(2), 141-148. doi: 10.1007/s00774-010-0202-3
- Ye, S., Wang, J., Yang, S., Xu, W., Xie, M., Han, K., . . . Wu, Z. (2011). Specific inhibitory protein Dkk-1 blocking Wnt/beta-catenin signaling pathway improve protectives effect on the extracellular matrix. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 31(5), 657-662. doi: 10.1007/s11596-011-0577-y
- Zaman, A. G., Helft, G., Worthley, S. G., & Badimon, J. J. (2000). The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 149(2), 251-266.
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A., & Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*, 258(5081), 468-471.

- Zhang, Y., Ge, C., Wang, L., Liu, X., Chen, Y., Li, M., & Zhang, M. (2015). Induction of DKK1 by ox-LDL negatively regulates intracellular lipid accumulation in macrophages. *FEBS Lett*, 589(1), 52-58. doi: 10.1016/j.febslet.2014.11.023
- Zhou, S., Eid, K., & Glowacki, J. (2004). Cooperation between TGF-beta and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow stromal cells. *J Bone Miner Res, 19*(3), 463-470. doi: 10.1359/JBMR.0301239
- Zhou, X., Paulsson, G., Stemme, S., & Hansson, G. K. (1998). Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. J Clin Invest, 101(8), 1717-1725. doi: 10.1172/JCI1216
- Zhuang, Y., Mao, J. Q., Yu, M., Dong, L. Y., Fan, Y. L., Lv, Z. Q., . . . Yuan, Z. X. (2016). Hyperlipidemia induces vascular smooth muscle cell proliferation involving Wnt/beta-catenin signaling. *Cell Biol Int*, 40(2), 121-130. doi: 10.1002/cbin.10543

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther für die Bereitstellung der finanziellen Mittel und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Doktorarbeit. Für seine stetige Hilfsbereitschaft, die Möglichkeit der flexiblen Arbeitsgestaltung und die freundschaftliche Unterstützung in jeder Situation.

Herrn Prof. Dr. Kelm danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ich danke Tanja, Renate, Peter und Uli für viele gemütliche und kulinarisch wertvolle Abende .

Ich danke meinen lieben Kollegen des "vivid" Graduiertenkollegs für geteilte Freude und geteiltes Leid.

Besonderer Dank gilt meinem Mann Bartosz Dronka und unserer wundervollen Tochter Hanna.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit mit dem Titel "Dkk1 beeinflusst quantitativ die Stabilität und Größe atherosklerotischer Plaques im Mausmodell" selbstständig angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, sowie Zitate gekennzeichnet habe.

Ich versichere außerdem, dass ich diese Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Wuppertal, Juli 2016

(Julia Dronka)

Anhang



Abbildung I : Geringere *Dkk1*-Expression in der Leber (links) und dem eWAT (rechts) der *Dkk1* heterozygoten Tiere nach 18 Wochen HFD. Mittels Real-time PCR wurde die *Dkk1*-Expression in verschiedenen Geweben ermittelt. Die *Dkk1*-Expression in den *Apoe*^{-/-} ;*Dkk1*^{+/-} Tieren ist reduziert im Vergleich zu den *Apoe*^{-/-} ;*Dkk1*^{+/+} Tieren (p=0,0219 (Leber) p= 0,0513 (eWAT))



Abbildung II: *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäuse nach 18 Wochen HFD haben kleinere Adipozyten im Vergleich zu *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}* Mäusen. A: Adipozyten der *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/-}* Mäuse sind signifikant kleiner im Vergleich zu denen der *Apoe^{-/-};Dkk1^{+/+}* Mäuse (p=0,0165). B: HE-Färbung des epigonadalen Fettgewebes von Mäusen nach 18 Wochen auf HFD.



Abbildung III: Körpergewichte der Mäuse auf $Apoe^{+/+}$ Hintergrund im Alter von 9 Wochen. Auf $Apoe^{+/+}$ Hintergrund zeigt sich kein Unterschied im Körpergewicht zwischen den *Dkk1* heterozygoten (24,24 ± 1,017) und den *Dkk1* wildtypischen (24,91 ± 1,248) Männchen.